



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0148306  
(43) 공개일자 2022년11월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/54 (2006.01) C07K 14/715 (2006.01)  
C07K 16/28 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C07K 14/5443 (2013.01)  
C07K 14/7155 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2022-7036271(분할)  
(22) 출원일자(국제) 2017년05월26일  
심사청구일자 2022년10월18일  
(62) 원출원 특허 10-2018-7037953  
원출원일자(국제) 2017년05월26일  
심사청구일자 2020년05월12일  
(85) 번역문제출일자 2022년10월18일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/034656  
(87) 국제공개번호 WO 2017/205726  
국제공개일자 2017년11월30일  
(30) 우선권주장  
62/342,311 2016년05월27일 미국(US)  
62/397,236 2016년09월20일 미국(US)

(71) 출원인  
알토 바이오사이언스 코퍼레이션  
미국 플로리다 33025 미라마르 노스 코머스 파크  
웨이 2810  
(72) 발명자  
리우 바이  
미국 33024 플로리다, 쿠파 씨티, 앤더블유 39터  
에이치 스트리트 9631  
로데 피터  
미국 33025 플로리다, 미라마, 노스 카머스 파크  
웨이 2810  
웁 힝, 씨.  
미국 33332 플로리다, 웨스톤, 웬트윌스 스트리트  
2966  
(74) 대리인  
특허법인 신세기

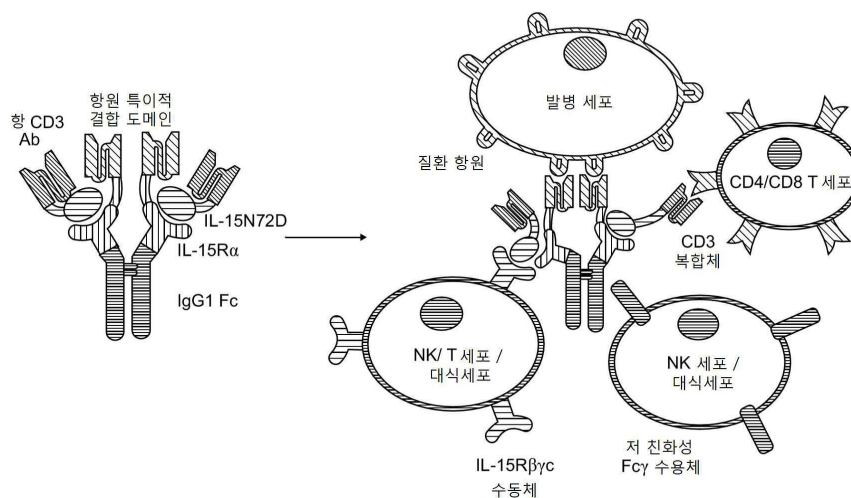
전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 발명의 명칭 CD3 결합 도메인을 가지는 다량체 IL-15 기반 분자의 구성 및 특성규명

(57) 요약

본 발명은 적어도 2개의 가용성 융합 단백질을 포함하는 가용성 융합 단백질 복합체를 특징으로 한다. 예를 들어 제1 융합 단백질은 인터루킨-15(IL-15) 폴리펩티드 또는 이의 기능성 단편에 공유 결합되어 있는 항 CD3 항체이다. 제2 융합 단백질은 질환 항원을 인지하는 결합 도메인을 포함하는데, 이 도메인은 가용성 인터루킨-15 수용체 알파(IL-15R $\alpha$ ) 폴리펩티드 또는 이의 기능성 단편에 공유 결합되어 있다. 제1 및 제2 융합 단백질 중 어느 하나 또는 둘 다는 면역글로불린 Fc 단편 또는 이의 기능성 단편을 추가로 포함하고, 제1 융합 단백질의 IL-15 도메인은 제2 융합 단백질의 가용성 IL-15R $\alpha$  도메인에 결합하여, 가용성 융합 단백질 복합체를 형성한다. 본 발명은 또한, 본 발명의 복합체를 제조 및 사용하기 위한 방법도 추가로 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C07K 16/2809** (2013.01)

**C07K 16/2887** (2013.01)

**C07K 2317/31** (2013.01)

**C07K 2317/622** (2013.01)

**C07K 2319/02** (2013.01)

**C07K 2319/30** (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

적어도 2개의 가용성 융합 단백질을 포함하는 단리된 가용성 융합 단백질 복합체로서,

A. 제1 융합 단백질은 인터루킨-15(IL-15) 폴리펩티드 도메인에 공유 결합되어 있는 제1 결합 도메인을 포함하고, 상기 제1 융합 단백질은 서열 번호 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하며; 제2 융합 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인에 융합된 가용성 IL-15 수용체 알파 스시-결합 도메인(IL-15R α Su)에 공유 결합된 제2 결합 도메인을 포함하고,

B. 제1 결합 도메인은 항 CD3 항체를 포함하고, 제2 결합 도메인은 항원 특이 결합 도메인을 포함하고, 상기 항원은 신생물 형성, 감염성 질환 또는 자가면역성질환과 연관되어 있으며,

C. 제1 융합 단백질의 IL-15 도메인은 제2 융합 단백질의 가용성 IL-15R α Su 도메인에 결합하여 가용성 융합 단백질 복합체를 형성하는, 단리된 가용성 융합 단백질 복합체.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항 CD3 항체는 폴리펩티드 링커 서열에 의해 면역글로불린 중쇄 가변 도메인에 공유 결합되어 있는 면역글로불린 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 가용성 융합 단백질 복합체.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항원 결합 도메인은 폴리펩티드 링커 서열에 의해 면역글로불린 중쇄 가변 도메인에 공유 결합되어 있는 면역글로불린 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 가용성 융합 단백질 복합체.

#### 청구항 4

제1항의 제2 가용성 융합 단백질 복합체에 공유 결합된 제1항의 제1 가용성 융합 단백질 복합체를 포함하는, 가용성 융합 단백질 복합체.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 제1 가용성 융합 단백질 복합체는 이황화 결합에 의해 제2 가용성 융합 단백질 복합체에 공유 결합되고, 그 결과 제1 가용성 융합 단백질 복합체의 Fc 도메인은 제2 가용성 융합 단백질 복합체의 Fc 도메인에 연결되는, 가용성 융합 단백질 복합체.

#### 청구항 6

제1항에 의한 제1 융합 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 핵산으로서, 상기 핵산은 서열 번호 1에 제시된 서열을 포함하는, 핵산.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 핵산은 융합 단백질을 암호화하는 서열에 작동가능하도록 결합된 촉진인자, 번역 개시 신호, 그리고 선도 서열을 추가로 포함하는, 핵산.

#### 청구항 8

제6항에 의한 핵산 서열을 포함하는, DNA 벡터.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 제1항에 의한 제2 융합 단백질을 암호화하는 제2 핵산 서열을 더 포함하는, DNA 벡터.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, 상기 항원 특이 결합 도메인은 항체 또는 그것의 결합 도메인과, T 세포 수용체 또는 그것의 결합 도메인으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 가용성 단백질 복합체.

#### 청구항 11

제1항에 있어서, 상기 항원 특이적 결합 도메인은 종양 항원에 특이적인, 가용성 융합 단백질 복합체.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 상기 종양 항원은, CD4, CD19, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44, CD51, CD52, CD70, CD74, CD80, CD123, CD152, CD147, CD221, EGFR, HER-2/neu, HER-1, HER-3, HER-4, CEA, OX40 리간드, cMet, 조직 인자, Nectin-4, PSA, PSMA, EGFL7, FGFR, IL-6 수용체, IGF-1 수용체, GD2, CA-125, EpCam, 사멸 수용체5, MUC1, VEGFR1, VEGFR2, PDGFR, Trail R2, 엽산염 수용체, 안지오프이에틴-2, 알파v베타3 인테그린 수용체 또는 HLA-DR 항원을 포함하는, 가용성 융합 단백질 복합체.

#### 청구항 13

제1항에 있어서, 상기 항원 특이 결합 도메인은 관문 억제제에 특이적인, 가용성 융합 단백질 복합체.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, 상기 관문 억제제는 PD1, PDL1, PDL2, CTLA4, CD28, CD80, CD86, B7-H3, B7-H4, B7-H5, ICOS-L, ICOS, BTLA, CD137L, CD137, HVEM, KIR, 4-1BB, OX40L, CD70, CD27, OX40, GITR, IDO, TIM3, GAL9, VISTA, CD155, TIGIT, LIGHT, LAIR-1, Siglecs 또는 A2aR를 포함하는, 가용성 융합 단백질 복합체.

#### 청구항 15

제13항에 있어서, 상기 항원 특이 결합 도메인은 관문 억제제 항원으로부터 유래하는, 가용성 융합 단백질 복합체.

#### 청구항 16

제15항에 있어서, 상기 관문 억제제 항원은 이필리무맙, 트레멜리무맙, 니볼루맙, 펄브롤리주맙, 피디리주맙, TSR-042, ANB011, AMP-514, AMP-224, MPDL3280A, MEDI4736, MEDI0680, BMS-9365569, MEDI6469, BMS-986016, IMP701, IMP731, 및 IMP321을 포함하는, 가용성 융합 단백질 복합체.

#### 청구항 17

제1항에 있어서, 상기 항원 특이 결합 도메인은 바이러스 항원에 특이적인, 가용성 융합 단백질 복합체.

#### 청구항 18

제17항에 있어서, 상기 바이러스 항원은 HIV, HCV, HBC, CMV, HTLV, HPV, EBV, RSV로부터 유래되는 항원을 포함하는, 가용성 융합 단백질 복합체.

#### 청구항 19

제18항에 있어서, 상기 바이러스 항원은 HIV 외피 스파이크 및/또는 gp120 및 gp41 에피토프로부터 유래되는 항원을 포함하는, 가용성 융합 단백질 복합체.

#### 청구항 20

적어도 2개의 가용성 융합 단백질을 포함하는 단리된 가용성 융합 단백질 복합체로서,

A. 제1 융합 단백질은 (b) 인터루킨-15(IL-15) 폴리펩티드 도메인에 공유 결합되어 있는 (a) 제1 결합 도메인을 포함하고, 상기 제1 융합 단백질은 서열 번호 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하며; 제2 융합 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인에 융합된 (d) 가용성 IL-15 수용체 알파 스시-결합 도메인(IL-15R α Su)에 공유 결합된 (c) 제2 결합 도메인을 포함하고,

B. 제1 결합 도메인은 항 CD3 항체를 포함하고, 제2 결합 도메인은 항 CD20 항체를 포함하며,

C. 제1 융합 단백질의 IL-15 도메인은 제2 융합 단백질의 가용성 IL-15R  $\alpha$  Su 도메인에 결합하여 가용성 융합 단백질 복합체를 형성하는, 단리된 가용성 융합 단백질 복합체.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, 상기 IL-15 폴리펩티드는 N72D 돌연변이를 포함하는 IL-15 변이체(IL-15N72D)인, 가용성 융합 단백질 복합체.

#### 청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 상기 항 CD3 항체는 폴리펩티드 링커 서열에 의해 면역글로불린 중쇄 가변 도메인에 공유 결합되어 있는 면역글로불린 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 가용성 융합 단백질 복합체.

#### 청구항 23

제20항 또는 제21항에 있어서, 상기 항 CD20 항체는 폴리펩티드 링커 서열에 의해 면역글로불린 중쇄 가변 도메인에 공유 결합되어 있는 면역글로불린 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 가용성 융합 단백질 복합체.

#### 청구항 24

제20항 또는 제21항에 있어서, 상기 제2 융합 단백질은 서열 번호 4에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 가용성 융합 단백질 복합체.

#### 청구항 25

제20항 또는 제21항에 의한 제2 가용성 융합 단백질 복합체에 공유 결합되어 있는, 제1항 또는 제2항에 의한 제1 가용성 융합 단백질 복합체를 포함하는, 가용성 융합 단백질 복합체.

#### 청구항 26

제25항에 있어서, 상기 제1 가용성 융합 단백질 복합체는 이황화 결합에 의해 제2 가용성 융합 단백질 복합체에 공유 결합되고, 그 결과 제1 가용성 융합 단백질 복합체의 Fc 도메인은 제2 가용성 융합 단백질 복합체의 Fc 도메인에 연결되는, 가용성 융합 단백질 복합체.

#### 청구항 27

제20항에 의한 제1 융합 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 핵산으로서, 상기 핵산은 서열 번호 1에 제시된 서열을 포함하는, 핵산.

#### 청구항 28

제27항에 있어서, 상기 핵산은 융합 단백질을 암호화하는 서열에 작동가능하도록 결합된 촉진인자, 번역 개시 신호, 그리고 선도 서열을 추가로 포함하는, 핵산.

#### 청구항 29

제27항에 의한 핵산 서열을 포함하는, DNA 벡터.

#### 청구항 30

제29항에 있어서, 제5항에 의한 제2 융합 단백질을 암호화하는 제2 핵산 서열을 더 포함하고, 상기 제2 핵산 서열은 서열 번호 3에 제시된 서열을 포함하는, DNA 벡터.

#### 청구항 31

제20항에 있어서, 상기 항원 특이적 결합 도메인은 질환 항원을 인지하는, 가용성 융합 단백질 복합체.

#### 청구항 32

제20항에 있어서, 상기 질환 항원은 신생물형성, 감염성 질환 또는 자가면역성 질환과 연관되어 있는, 가용성 융합 단백질 복합체.

## 발명의 설명

### 기술 분야

#### [0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 미국 가명세서 특허출원 제62/397,236호(2016년 9월 20일 출원) 및 미국 가명세서 특허출원 제62/342,311호(2016년 5월 27일 출원)(다만, 이 문헌들은 둘 다 전체로서 본원에 참조로 인용됨)의 우선권 이익을 주장하는 국제특허출원이다.

#### [0003] 본 발명의 분야

[0004] 본 발명은, 일반적으로 다량체 융합 분자에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0005] 본원에 기술된 발명이 있기 전까지만 해도 비 특이 면역 활성화와 연관된 부작용이 일어나지 않으면서 다양한 효과기 분자를 질환이 발병한 부위에 표적화하여 치료적 이익을 제공하고자 하는 신규 전략에 대한 필요가 절실하였다.

[0006] [특허문헌]

[0007] 미국 특허 제2016/0355567 A1 (2016, 12. 8.)

[0008] 미국 특허 제2016/0367635 A1 (2016, 12. 22.)

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

#### 과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 적어도 부분적으로, 다중 특이 단백질이, 효과기 T 세포와 자연 살해(NK) 세포를 활성화하고, 질환 세포에 대해 이 효과기 T 세포 및 자연 살해(NK) 세포의 활성을 표적화함으로써 질환 특이 세포독성을 초래한다는 놀라운 발견을 바탕으로 한다. 본원에는 질환 항원(disease antigen)을 인지하는 제1 결합 도메인과, T 세포 상 CD3을 인지하는 제2 결합 도메인을 가지는 다중 특이 단백질이 제공되어 있다. 예시적 질환 항원은 신생물형성, 감염성 질환 또는 자가면역성 질환과 연관되어 있다. 구체적으로 본원에는 항 CD3 scAb/huIL-15N72D 융합 단백질과, 항 CD20 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 융합 단백질을 포함하는 단백질 복합체가 기술되어 있다. 이 복합체는, 항 CD20 scAb 도메인을 통하여 B 세포 림프종을 인지한 다음, IL-15 활성을 통해 NK 및 T 세포 반응을 유도하여, 항 CD3 scAb 도메인을 통해 T 세포 반응을 활성화함으로써, Fc 결합 도메인을 통해 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC)과 보체 의존적 세포독성(CDC) 발현을 자극한다.

[0010] 적어도 2개의 가용성 융합 단백질을 포함하는, 분리된 가용성 융합 단백질 복합체가 제공된다. 예를 들어 제1 융합 단백질은 인터루킨-15(IL-15) 폴리펩티드에 공유 결합되어 있는 제1 결합 도메인을 포함한다. 제2 융합 단백질은 질환 항원을 인지하는 제2 결합 도메인을 포함하는데, 다만 이 제2 결합 도메인은 면역글로불린 Fc 도메인에 융합된, 가용성 IL-15 수용체 알파 스시-결합 도메인(IL-15R α Su)에 공유 결합되어 있다. 제1 결합 도메인 또는 제2 결합 도메인 중 하나는 항 CD3 항체를 포함하고, 다른 결합 도메인은 항원 특이 결합 도메인을 포함한다. 융합 단백질의 예시적 항원 특이 결합 도메인은 항 CD20 항체를 포함한다. 예를 들어 제2 융합 단백질은 IL-15R α Su/Fc 융합체에 공유 결합된 항 CD20 항체를 포함한다. 제1 융합 단백질의 IL-15 도메인은 제2 융합 단백질의 가용성 IL-15R α Su 도메인과 결합하여, 가용성 융합 단백질 복합체를 형성한다. 대안적으로 제1 융합 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인에 융합된 가용성 IL-15 수용체 알파 스시 결합 도메인(IL-15R α Su)에 공유 결합된 항 CD3 항체를 포함하는 반면에, 제2 융합 단백질은 질환 항원을 인지하여 공유 결합하는 결합 도메인과 변이체 인터루킨-15(IL-15) 폴리펩티드를 포함한다. 몇몇 경우들에 있어서, IL-15 폴리펩티드는 N72D 돌연변이를 포함하는 IL-15 변이체(IL-15N72D)를 포함한다.

[0011] 몇몇 경우들에 있어서, 항 CD3 항체는 면역글로불린 경쇄 가변 도메인이 폴리펩티드 링커 서열에 의해 면역글로

불린 중쇄 가변 도메인에 공유 결합되어 있는 단일 사슬 항체를 포함한다. 이와 유사하게, 몇몇 경우들에 있어서, 질환 항원을 인지하는 결합 도메인, 예컨대 항 CD20 항체는, 면역글로불린 경쇄 가변 도메인이 폴리펩티드 링커 서열에 의해 면역글로불린 중쇄 가변 도메인에 공유 결합되어 포함되어 있는 단일 사슬 항체이다.

[0012] 예시적인 제1 융합 단백질은 서열 번호 2에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 예시적인 제2 융합 단백질은 서열 번호 4에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 제1 융합 단백질을 암호화하는 예시적 핵산 서열은 서열 번호 1에 제시된 서열을 포함한다. 제2 융합 단백질을 암호화하는 예시적 핵산 서열은 서열 번호 3에 제시된 서열을 포함한다. 하나의 양태에서, 핵산 서열(들)은 융합 단백질을 암호화하는 서열에 작동 가능하도록 결합된 선도 서열(leader sequence), 번역 개시 신호, 그리고 촉진인자(promoter)를 포함한다.

[0013] 본원에 기술된 핵산 서열을 포함하는 DNA 벡터(들)도 또한 제공된다. 예를 들어 핵산 서열은 복제, 발현 또는 이 둘 다를 위한 벡터 내에 존재한다.

[0014] 제2 가용성 융합 단백질 복합체에 공유 결합된, 제1 가용성 융합 단백질 복합체를 포함하는 가용성 융합 단백질 복합체도 또한 제공된다. 예를 들어 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체는 다량체화, 예컨대 이량체화, 삼량체화되거나, 또는 다중 복합체화된다(예컨대 4 복합체 형성, 5 복합체 형성 등). 예를 들어 다량체는 동중다량체 또는 이종다량체이다. 가용성 융합 단백질 복합체는 공유 결합, 예컨대 이황화 결합 형성 화학 가교제에 의해 연결된다. 몇몇 경우들에서, 하나의 가용성 융합 단백질은 이황화 결합에 의해 또 다른 가용성 융합 단백질에 공유 결합되고, 그 결과 제1 가용성 융합 단백질의 Fc 도메인과 제2 가용성 융합 단백질의 Fc 도메인이 연결된다.

[0015] Fc 도메인 또는 이의 기능성 단편은, IgG Fc 도메인, 인간 IgG1 Fc 도메인, 인간 IgG2 Fc 도메인, 인간 IgG3 Fc 도메인, 인간 IgG4 Fc 도메인, IgA Fc 도메인, IgD Fc 도메인, IgE Fc 도메인 및 IgM Fc 도메인; 또는 이것들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 Fc 도메인을 포함한다. 선택적으로 Fc 도메인은 변경된 보체 또는 Fc 수용체 결합 특성 또는 변경된 이량체화 또는 당화 프로필을 보이는 Fc 도메인을 초래하는 아미노산 변화를 포함한다. 변경된 보체 또는 Fc 수용체 결합 특성 또는 변경된 이량체화 또는 당화 프로필을 보이는 Fc 도메인을 제조하기 위한 아미노산 변화는 당 분야에 공지되어 있다. 예를 들어 IgG1 CH2의 234번 및 235번 위치 루신 잔기들(번호매김은 항체 공통 서열을 기반으로 함)(즉 ... P E L L G G ...)의, 알라닌 잔기들(즉 ... P E A A G G ...)로의 치환은 Fc 감마 수용체 결합능의 상실을 초래하는 한편, IgG1 CH2의 322번 위치 리신 잔기(번호매김은 항체 공통 서열을 기반으로 함)(즉 ... K C K S L ...)의, 알라닌 잔기(즉 ... K C A S L ...)로의 치환은 보체 활성화 능력의 상실을 초래한다. 몇몇 예들에서, 이러한 돌연변이는 조합되어 발생한다.

[0016] 몇몇 양태들에서, 제1 생물 활성 폴리펩티드는 폴리펩티드 링커 서열에 의해 IL-15 폴리펩티드(또는 이의 기능성 단편)에 공유 결합된다. 이와 유사하게, 제2 생물 활성 폴리펩티드는 폴리펩티드 링커 서열에 의해 IL-15R $\alpha$  폴리펩티드(또는 이의 기능성 단편)에 공유 결합된다. 선택적으로 IL-15R $\alpha$  폴리펩티드(또는 이의 기능성 단편)는 폴리펩티드 링커 서열에 의해 Fc 도메인(또는 이의 기능성 단편)에 공유 결합된다. 각각의 폴리펩티드 링커 서열은 독립적으로 선택될 수 있다. 선택적으로 폴리펩티드 링커 서열은 동일하다. 대안적으로 폴리펩티드 링커 서열은 상이하다.

[0017] 선택적으로 가용성 융합 단백질 중 적어도 하나가 검출 가능한 표지를 포함하는, 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체가 제공된다. 검출 가능한 표지로서는 바이오틴, 스트렙타비딘, 효소 또는 이의 촉매 활성 단편, 방사성 핵종, 나노입자, 상자성 금속 이온 또는 형광 분자, 인광 분자 또는 화학발광 분자, 아니면 이것들의 임의의 조합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명은 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체를 제조하기 위한 방법을 제공한다. 이 방법은, a) 적당한 제어 서열을 가져 제1 융합 단백질을 암호화하는 DNA 벡터를 제1 숙주 세포에 도입하는 단계; b) 세포 또는 배지 중 제1 융합 단백질이 발현되기 충분한 조건하에서 제1 숙주 세포를 배지 중에서 배양하는 단계; c) 숙주 세포나 배지로부터 제1 융합 단백질을 정제하는 단계; d) 적당한 제어 서열을 가져 제2 융합 단백질을 암호화하는 DNA 벡터를 제2 숙주 세포에 도입하는 단계; e) 세포 또는 배지 중 제2 융합 단백질이 발현되기 충분한 조건하에서 제2 숙주 세포를 배지 중에서 배양하는 단계; f) 숙주 세포 또는 배지로부터 제2 융합 단백질을 정제하는 단계, 그리고 g) 제1 융합 단백질의 IL-15 도메인과, 제2 융합 단백질의 가용성 IL-15R $\alpha$  도메인 사이의 결합을 허용하여 가용성 융합 단백질 복합체 형성을 달성하기 충분한 조건하에서 제1 융합 단백질과 제2 융합 단백질을 혼합하는 단계를 포함한다.

[0019] 몇몇 경우들에 있어서, 본 방법은 발현 벡터로부터 발현되는 폴리펩티드들 간에 이황화 결합의 형성을 허용하기



충분한 조건하에서 제1 융합 단백질과 제2 융합 단백질을 혼합하는 과정을 추가로 포함한다.

- [0020] 대안적으로, 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체를 제조하기 위한 방법은, a) 적당한 제어 서열을 가져 제1 융합 단백질을 암호화하는 DNA 벡터와, 적당한 제어 서열을 가져 제2 융합 단백질을 암호화하는 DNA 벡터를 숙주 세포에 도입하는 단계; b) 융합 단백질을 세포나 배지에서 발현시키고, 제1 융합 단백질의 IL-15 도메인과 제2 융합 단백질의 가용성 IL-15R $\alpha$  도메인 간 결합을 허용하여, 가용성 융합 단백질 복합체의 형성을 달성하기 충분한 조건하에 숙주 세포를 배지 중에서 배양하는 단계; 및 c) 숙주 세포나 배지로부터 가용성 융합 단백질 복합체를 정제하는 단계에 의해 수행된다.
- [0021] 하나의 양태에서, 본 방법은 발현 벡터로부터 발현된 폴리펩티드들 간 이황화 결합의 형성을 허용하기 충분한 조건하에 제1 융합 단백질과 제2 융합 단백질을 혼합하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0022] 가용성 융합 단백질 복합체를 제조하기 위한 방법으로서, a) 적당한 제어 서열을 가져 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질을 암호화하는 DNA 벡터를 숙주 세포에 도입하는 단계; b) 융합 단백질을 세포나 배지에서 발현시키고, 제1 융합 단백질의 IL-15 도메인과 제2 융합 단백질의 가용성 IL-15R $\alpha$  도메인 간 결합을 허용하여, 가용성 융합 단백질 복합체의 형성을 달성하고, 폴리펩티드들 간 이황화 결합 형성을 허용하기 충분한 조건하에 숙주 세포를 배지 중에서 배양하는 단계; 및 c) 숙주 세포나 배지로부터 가용성 융합 단백질 복합체를 정제하는 단계를 포함하는 방법도 또한 제공된다.
- [0023] 선택적으로 본 방법은, 발현 벡터로부터 발현된 폴리펩티드들 간 이황화 결합의 형성을 허용하기 충분한 조건하에 제1 융합 단백질과 제2 융합 단백질을 혼합하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0025] \*신생물형성, 감염성 질환 또는 자가면역성 질환을, 이 질환들의 치료를 필요로 하는 대상체에서 치료하기 위한 방법은, 가용성 항 CD3 CD3 scAb/IL-15N72D: 질환 항원 특이 scAb/IL-15R $\alpha$  Su/Fc 융합 단백질 복합체를 포함하는 약학 조성물 유효량을 대상체에 투여하여, 신생물형성, 감염성 질환 또는 자가면역성 질환을 치료함으로써 달성된다. 예를 들어 B 세포 림프종 또는 B 세포 매개 자가면역성 질환의 치료를 필요로 하는 대상체 내에서 이 B 세포 림프종 또는 B 세포 매개 자가면역성 질환을 치료하기 위한 방법은, 가용성 항 CD3 scAb/huIL-15N72D: 항 CD20 scAb/huIL-15R $\alpha$  Su/huIgG1 Fc 융합 단백질 복합체(2B8T3M)를 포함하는 약학 조성물 유효량을 대상체에 투여하여, 림프종 또는 자가면역성 질환을 치료함으로써 달성된다. 예시적 항 CD3 scAb/huIL-15N72D는 서열 번호 2에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 예시적 항 CD20 scAb/huIL-15R $\alpha$  Su/huIgG1 Fc는 서열 번호 4에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게 융합 단백질 복합체는 대상체 내에서 면역 반응을 유도한다.
- [0026] 본원에 기술된 방법으로 치료하는데 적합한 신생물형성은, 교모세포종, 전립선암, 혈액암, 급성 골수성 백혈병, B 세포 신생물형성, 다발성 골수종, B 세포 림프종, B 세포 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 피부 T 세포 림프종, T 세포 림프종, 고형 종양, 요로상피/방광 암종, 흑색종, 폐암, 신세포 암종, 유방암, 위 및 식도 암, 췌장암, 두경부암, 결장직장암 및 난소암, 비 소세포 폐 암종 및 편평 세포 두경부 암종을 포함한다. 본원에 기술된 방법을 사용하여 치료될 예시적 감염으로서는 인간 면역결핍증 바이러스(HIV) 감염이 있다. 본원에 기술된 방법은 또한 세균 감염(예컨대 그람 양성 또는 그람 음성 세균 감염)을 치료하는데 유용하다(Oleksiewicz et al. 2012. Arch Biochem Biophys. 526:124-31). 본원에 기술된 방법을 사용하여 치료될 예시적 자가면역성 질환으로서는 B 세포에 의해 매개되는 자가면역성 질환이 있다. 이러한 자가면역성 질환으로서는 류머티즘성 관절염, 다발성 경화증, 특발성 혈소판감소증, IgM 매개 말초신경병증, VIII 인자 결핍증, 전신 홍반성루프스, 쇼그렌 증후군, 염증성 근염, 심상성천포창, 시속척수염, ANCA 연관 혈관염, 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증, 자가면역성 빈혈, 진성적혈구무형성증, 혈전성혈소판감소성자반(TTP), 특발성 혈소판감소성자반(ITP), 에반증후군, 혈관염(예컨대 육아종증다발혈관염, 구 베게너증), 수포성 피부 장애(예컨대 천포창, 유 천포창), 제1형 진성당뇨병, 항 NMDA 수용체 뇌염, 데빅병, 그레이브스 안구병증(<https://en.wikipedia.org/wiki/Rituximab> - cite\_note-17), 자가면역성 췌장염, 안구간대경련-근간대경련 증후군(OMS)(<https://en.wikipedia.org/wiki/Rituximab> - cite\_note-19) 및 IgG4 관련 질환을 포함한다.
- [0027] 융합 단백질을 포함하는 약학 조성물이 유효량만큼 투여된다. 예를 들어 약학 조성물의 유효량은 약 1  $\mu$ g/kg 내지 약 100  $\mu$ g/kg, 예컨대 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100  $\mu$ g/kg이다. 대안적으로 ALT-803은 고정 용량 또는 체표면적을 기반으로(즉 1 m<sup>2</sup> 당) 투여된다.
- [0028] 융합 단백질 복합체를 포함하는 약학 조성물은 1개월에 적어도 1회 투여되는데, 예컨대 1 개월에 2회, 1 주일에 1회, 1 주일에 2회, 1 일 1회, 1 일 2회, 8 시간 마다, 4 시간 마다, 2 시간 마다 또는 매시간 투여된다. 본 약



학 조성물에 적합한 투여 방식은 전신 투여, 정맥내 투여, 피하 투여, 근육내 투여, 종양내 투여, 흡입 및 복막내 투여를 포함한다.

[0029] 바람직하게 본 융합 단백질은 인터페론 감마(IFN- $\gamma$ )의 혈청 중 수준을 상승시키고/상승시키거나, CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포 및 NK 세포가 대상체 내 발병 세포 또는 종양 세포를 사멸시키도록 자극한다. 예를 들어 융합 단백질 복합체는 상기 신생물형성, 감염성 질환 또는 자가면역성 질환과 연관된 세포에 대한 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포 반응을 자극한다.

[0030] 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체에 관한 임의의 양태들에서, IL-15 폴리펩티드는 원산(native) IL-15 폴리펩티드와 상이한 아미노산 서열을 가지는 IL-15 변이체이다. 인간 IL-15 폴리펩티드는 본원에서 huIL-15, hIL-15, huIL15, hIL15, IL-15 야생형(wt)이라 지칭되고, 이의 변이체는 원산 아미노산, 성숙 서열 중 이의 위치 및 변이체 아미노산을 이용하여 지칭된다. 예를 들어 huIL15N72D는, 72번 위치에 N  $\rightarrow$  D의 치환을 포함하는 인간 IL-15를 지칭한다. 하나의 양태에서, IL-15 변이체는, 예컨대 원산 IL-15 폴리펩티드의 IL-15R $\beta$   $\gamma$ C 수용체와의 결합 활성보다 증가한, IL-15R $\beta$   $\gamma$ C 수용체와의 결합 활성으로 입증되는 바와 같이, IL-15 효현제로서 작용을 한다. 대안적으로 IL-15 변이체는, 예컨대 원산 IL-15 폴리펩티드의 IL-15R $\beta$   $\gamma$ C 수용체와의 결합 활성보다 감소한, IL-15R $\beta$   $\gamma$ C 수용체와의 결합 활성으로 입증되는 바와 같이, IL-15 길항제로서의 역할을 한다.

[0031] 표적 세포를 사멸하기 위한 방법은, a) 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체를 다수의 세포와 접촉시키는 단계 [다만 이 다수의 세포는 항 CD3 항체, 예컨대 항 CD3 단일 사슬 항체에 의해 인지되는 CD3과, IL-15 도메인에 의해 인지되는 IL-15R 사슬을 보유하는 면역 세포, 또는 Fc 도메인에 의해 인지되는 Fc 수용체 사슬을 보유하는 면역 세포, 그리고 항원 특이 scAb와 같은 결합 도메인에 의해 인지되는 항원을 보유하는 표적 질환 세포를 포함함], b) 표적 질환 세포 상 항원과, 면역 세포와 결합하여 이를 활성화하기 충분한, 면역 세포상 CD3, IL-15R 또는 Fc 수용체 사슬 간에 특이 결합 복합체(가교)를 형성하는 단계; 그리고 c) 결합되어 활성화된 면역 세포에 의해 표적 질환 세포를 사멸하는 단계에 의해 달성된다. 예를 들어 표적 질환 세포는 종양 세포, 자가면역성 질환 연관 세포, 예컨대 자가면역성 B 세포이거나, 또는 감염된 세포, 예컨대 바이러스 감염 세포이다. 예를 들어 항원 특이 결합 도메인은 항 CD20 항체를 포함한다.

[0032] 환자에서 질환을 예방 또는 치료하기 위한 방법도 또한 제공되는데, 여기서 발병 세포는 해당 질환 연관 항원을 발현하고, 이 방법은 a) scAb와 같은 질환 항원 특이 결합 도메인을 가지는 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체를 환자에 투여하는 단계; b) 면역 세포의 국소화에 충분한, 항원 발현 발병 세포와, CD3, IL-15R 또는 Fc 수용체 발현 면역 세포 간 특이적 결합 복합체(가교)를 형성하는 단계; 그리고 c) 환자에서 질환을 예방 또는 치료하기 충분하게 질환 세포를 손상 또는 사멸시키는 단계를 포함한다.

[0033] 본 발명은 또한 환자에서 질환을 예방 또는 치료하기 위한 방법을 제공하는데, 이 경우 발병된 세포는 질환 연관 항원을 발현하고, 이 방법은 a) CD3, IL-15R 사슬 또는 Fc 수용체 사슬을 보유하는 면역 세포를, 질환 항원 특이 결합 도메인을 포함하는 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체와 혼합하는 단계; b) 환자에게 이 면역 세포-융합 단백질 복합체 혼합물을 투여하는 단계; c) 항원 발현 발병 세포와, 면역 세포를 국소화하기 충분한 CD3, IL-15R 또는 Fc 수용체 발현 면역 세포 간에 특이 결합 복합체(가교)를 형성하는 단계; 그리고 d) 환자에서 질환을 예방 또는 치료하기 충분하게 질환 세포를 손상 또는 사멸시키는 단계를 포함한다.

[0034] 본 발명은, 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체 유효량을 포유동물에 투여함으로써, 포유동물 내 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체 중 임의의 하나 유효량만큼을 포유동물에 투여함으로써, 포유동물 내 면역 반응을 억제하는 방법을 제공한다.

[0035] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어와 과학 용어는 본 발명이 속한 분야의 당 업자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 갖는다. 이하 참고문헌들은 본 발명에 사용된 다수의 용어에 관한 일반적인 정의와 함께 기술 하나를 제공한다: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); 및 Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). 본원에 사용된 바와 같은 하기 용어들은 달리 명시되지 않는 한 이 용어들에 부여된 하기 의미들을 가진다.

[0036] "제제"란, 펩티드, 핵산 분자 또는 소형 화합물을 의미한다. 예시적 치료제는 2B8T3M이다.

[0037] "2B8T3M"이란, 항 CD3 scAb/huIL-15N72D 및 항 CD20 scAb/huIL-15R  $\alpha$  Su/huIgG1 Fc를 포함하는 복합체를 의미한다.

다.

- [0038] "완화하다"란, 질환의 발달 또는 진행을 늦추거나, 억제하거나, 경감시키거나, 감소시키거나, 정지시키거나 또는 안정화하는 것을 의미한다.
- [0039] "유사체"란, 동일하지는 않지만 유사한 기능상 특징 또는 구조상 특징을 가지는 분자를 의미한다. 예를 들어 폴리펩티드 유사체는, 이 유사체의 기능을 자연 발생 폴리펩티드의 기능에 비하여 증진시키는 임의의 생화학적 변형을 가지면서, 이 유사체에 상응하는 자연 발생 폴리펩티드의 생물 활성도 보유한다. 이러한 생화학적 변형은, 예를 들어 리간드 결합능을 변경시키지 않으면서, 유사체의 프로테아제 내성, 막 투과성 또는 반감기를 증가시킬 수 있었다. 유사체는 비 자연 발생 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0040] "결합 도메인" 또는 "항원 특이 결합 도메인"이란 용어는, 당 분야에 공지된 항체, 단일 사슬 항체, Fab, Fv, T 세포 수용체 결합 도메인, 리간드 결합 도메인, 수용체 결합 도메인 또는 기타 항원 특이적 폴리펩티드를 포함하도록 의도된다.
- [0041] 본 발명은 어떤 항체 또는 항체의 단편이 원하는 생물 활성을 보이는 한, 이 항체 또는 항체의 단편을 포함한다. 키메라 항체, 예컨대 인간화 항체도 또한 본 발명에 포함된다. 일반적으로 인간화 항체는, 인간이 아닌 공급원으로부터 유래한 아미노산 잔기 하나 이상이 도입되어 있다. 인간화는, 예를 들어 당 분야에 기술된 방법을 이용하여 인간 항체의 상보성 결정 영역을, 이에 상응하는 설치류의 상보성 결정 영역 최소한의 부분으로 치환함으로써 수행될 수 있다.
- [0042] "항체" 또는 "면역글로불린"이란 용어는, 폴리클로날 항체와 모노클로날 항체 둘 다를 포함하도록 의도된다. 바람직한 항체는 항원과 반응성인 모노클로날 항체이다. "항체"란 용어는 또한, 항원과 반응성인 항체 하나 초과만큼의 혼합물(예컨대 항원과 반응성인 상이한 유형들의 모노클로날 항체 콕테일)을 포함한다. "항체"란 용어는, 전 항체, 이의 생물 기능성 단편, 단일 사슬 항체, 그리고 유전자 변경된 항체, 예컨대 하나를 초과하는 종으로부터 유래하는 부분을 포함하는 키메라 항체, 이기능성 항체, 항체 접합체, 인간화 항체 및 인간 항체를 포함하도록 또한 의도된다. 추가로 사용될 수도 있는 생물 기능성 항체 단편으로서의 항원과의 결합에 충분한 항체 유래 펩티드 단편이 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "항체"는, 관심 에피토프, 항원 또는 항원 단편과 결합할 수 있는 전체 항체뿐만 아니라, 임의의 항체 단편(예컨대  $F(ab')_2$ , Fab', Fab, Fv)을 포함하는 의미이다.
- [0043] 어떤 분자"에 결합하는"이란, 해당 분자에 대하여 물리화학적 친화성을 가지는 것을 의미한다.
- [0044] "검출하다"란, 검출될 피분석물의 존재, 부재 또는 그 양을 동정하는 것을 의미한다.
- [0045] "질환"이란, 세포, 조직 또는 장기의 정상 기능을 손상시키거나 방해하는 임의의 병태나 장애를 의미한다. 질환의 예로서는 신생물형성, 자가면역성 질환 및 바이러스 감염을 포함한다.
- [0046] 제제 또는 제제 성분의"유효량"및 "치료적 유효량"이란 용어는, 해당 제제 또는 성분이 단독으로 또는 조합하여 원하는 효과를 제공하기 충분한 양을 의미한다. 예를 들어 "유효량"이란, 치료전인 환자에 있어서 어떤 질환의 증상들에 비해 해당 질환의 증상을 완화하는데 필요한, 화합물 단독의 양 또는 다른 성분과 합한 양을 의미한다. 어떤 질환의 치료적 처치를 위하여 본 발명을 수행하는데 사용되는 활성 화합물(들)의 유효량은, 투여 방식, 대상체의 나이, 체중 및 전반적 경간상태에 따라 달라진다. 궁극적으로 참여 전문의나 수의사가 적당한 양과 투여 계획을 결정할 것이다. 이러한 양은 "유효"량이라 지칭된다.
- [0047] "단편"이란, 폴리펩티드 또는 핵산 분자의 일부를 의미한다. 이 일부는, 바람직하게 기준 핵산 분자 또는 폴리펩티드의 전체 길이의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%를 함유한다. 예를 들어 단편은 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000 개의 뉴클레오티드 또는 아미노산을 함유할 수 있다. 그러나, 본 발명은 또한 폴리펩티드 및 핵산 단편이 각각 전장 폴리펩티드 및 핵산의 원하는 생물 활성을 보이는 한, 이 폴리펩티드 및 핵산 단편도 포함한다. 거의 모든 길이를 가지는 핵산 단편이 사용된다. 예를 들어 총 길이가 약 10,000, 약 5,000, 약 3,000, 약 2,000, 약 1,000, 약 500, 약 200, 약 100, 약 50 개 염기쌍(이 중간 길이도 모두 포함)인 예시적 폴리뉴클레오티드 분절이 본 발명의 다수의 실시예에 포함된다. 이와 유사하게, 거의 모든 길이를 가지는 폴리펩티드 단편이 사용된다. 예를 들어 총 길이가 약 10,000, 약 5,000, 약 3,000, 약 2,000, 약 1,000, 약 500, 약 200, 약 100 또는 약 50 개 염기쌍(이 중간 길이도 모두 포함)인 예시적 폴리펩티드 분절이 본 발명의 다수의 실시예에 포함된다.

- [0048] "단리된", "정제된" 또는 "생물학적으로 순수한"이란 용어는, 어떤 물질이 자체의 원산 상태로서 발견될 때 보통 수반되는 성분들로부터 다양한 정도로 벗어난 상태를 지칭한다. "단리하다"란, 원래의 공급원이나 주위환경으로부터 어느 정도 분리되는 것을 나타낸다. "정제하다"란, 단리시보다 더 높은 정도로 분리되는 것을 나타낸다.
- [0049] "정제된" 또는 "생물학적으로 순수한"단백질은, 어떠한 불순물도 해당 단백질의 생물 특성에 거의 영향을 미치지 않거나 여타의 부정적인 결과를 초래하지 않도록 다른 물질로부터 충분히 벗어나 있다. 즉 만일 본 발명의 핵산이나 펩티드가 재조합 DNA 기술에 의해 생산되었을 때 세포성 물질, 바이러스 물질 또는 배양 배지를 실질적으로 포함하지 않거나, 또는 만일 화학적으로 합성되었을 때 화학 전구체 또는 기타 화학물질을 실질적으로 포함하지 않는다면 정제된 것이다. 순도와 균질성은 통상 분석 화학 기술, 예컨대 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피가 사용되어 측정된다. "정제된"이란 용어는, 전기영동 겔에서 핵산이나 단백질이 본질적으로 하나의 밴드를 보일 때를 가리킬 수 있다. 변형, 예를 들어 인산화 또는 당화가 일어날 수 있는 단백질의 경우, 상이한 변형은 별도로 정제될 수 있는 상이한 단리 단백질들을 생성할 수 있다.
- [0050] 이와 유사하게 "실질적으로 순수한"이란, 어떤 뉴클레오티드나 폴리펩티드가, 자연에서 이 뉴클레오티드나 폴리펩티드와 함께 발생하는 성분들로부터 분리된 경우를 의미한다. 통상적으로 뉴클레오티드 및 폴리펩티드가, 자연에서 이것과 결합되어 존재하는 단백질 및 자연 발생 유기 분자로부터 적어도 60 중량%, 70 중량%, 80 중량%, 90 중량%, 95 중량% 또는 심지어 99% 중량% 분리되어 있다면, 해당 뉴클레오티드 및 폴리펩티드는 실질적으로 순수한 것이다.
- [0051] "단리된 핵산"이란, 어떤 핵산의 기원이 된 유기체의 자연 발생 게놈 내 이 핵산에 측접하는 유전자로부터 벗어난 핵산을 의미한다. 이 용어는, 예를 들어 (a) 자연 발생 게놈 DNA 분자의 일부이긴 하지만, 유기체 게놈 내 자연 발생하는 DNA 분자의 해당 일부와 측접하는 핵산 서열이 양쪽으로 측접되어 있지 않은 DNA; (b) 생성될 분자가 임의의 자연 발생 벡터 또는 게놈 DNA와 동일하지 않게 되는 방식으로 원핵생물 또는 진핵생물 게놈 DNA 내 또는 벡터 내에 통합된 핵산; (c) 별도의 분자, 예컨대 cDNA, 게놈 단편, 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 생성된 단편, 또는 제한 단편; 그리고 (d) 하이브리드 유전자, 즉 융합 단백질을 암호화하는 유전자의 일부인 재조합 뉴클레오티드 서열을 아우른다. 본 발명에 따른 단리 핵산 분자는 합성에 의해 생산된 분자뿐만 아니라, 화학적으로 변경되었고/변경되었거나 변형 골격을 가지는 임의의 핵산들을 추가로 포함한다. 예를 들어 단리된 핵산은 정제 cDNA 또는 RNA 폴리뉴클레오티드이다. 단리된 핵산 분자는 또한 전령 리보핵산(mRNA) 분자를 포함하기도 한다.
- [0052] "단리된 폴리펩티드"란, 자연에서 함께 발생하는 성분들로부터 분리된 본 발명의 폴리펩티드를 의미한다. 통상적으로 본 폴리펩티드는, 그것이 자연에서 결합하고 있는 단백질 및 자연 발생 유기 분자로부터 적어도 60 중량% 벗어났을 때 단리된 것이다. 바람직하게 본 제제는 본 발명의 폴리펩티드 적어도 75 중량%, 더욱 바람직하게는 적어도 90 중량%, 그리고 가장 바람직하게는 적어도 99 중량%이다. 본 발명의 단리된 폴리펩티드는, 예를 들어 자연 공급원으로부터의 추출, 이러한 폴리펩티드를 암호화하는 재조합 핵산의 발현, 또는 단백질의 화학 합성에 의해 획득될 수 있다. 순도는 적당한 임의의 방법, 예를 들어 컬럼 크로마토그래피, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 HPLC 분석에 의해 측정될 수 있다.
- [0053] "마커"란, 어떤 질환이나 장애와 연관된 발현 수준 또는 활성이 변경된 임의의 단백질 또는 폴리뉴클레오티드를 의미한다.
- [0054] "신생물형성"이란, 과도한 증식 또는 감소한 세포자멸에 의해 특징지어지는 질환이나 장애를 의미한다. 본 발명이 사용될 수 있는 예시적 신생물형성으로서는 백혈병(예컨대 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 골수아구성 백혈병, 급성 전골수성 백혈병, 급성 골수단핵구성 백혈병, 급성 단핵구성 백혈병, 급성 적백혈병, 만성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병), 진성 다혈구증, 림프종(호지킨 질환, 비호지킨 질환), 발덴스트롬 매크로글로불린혈증, 증쇄병 및 고형 종양, 예컨대 육종 및 암종(예컨대 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골원성 육종, 척색종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피모세포종, 활막종, 중피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 평평세포암종, 기저세포 암종, 선암종, 한선암종, 피지선암종, 유두갑상선암종, 유두갑상선선암종, 낭샘암종, 수질암종, 기관지원성암종, 신세포암종, 간세포암, 담관암종, 융모막암종, 정상피종, 태생성암종, 빌름 종양, 자궁경부암, 자궁암, 고환암, 폐암종, 소세포 폐암종, 방광 암종, 상피암종, 신경교종, 다형성신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 상의세포종, 송과체부종양, 혈관모세포종, 청신경종, 췌지교종, 신경초종, 뇌수막종, 흑색종, 신경아세포종 및 망막모세포종)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 특정 구현예들에서, 신생물형

성은 다발성 골수종, 베타 세포 림프종, 요로상피/방광 암종 또는 흑색종이다. 본원에 사용된 바와 같이 "제제를 수득하는 것"에서와 같이 "수득하는 것"은, 해당 제제를 합성, 구매 또는 취득하는 것을 포함한다.

[0055] "감소하다"란, 적어도 5%, 10%, 25%, 50%, 75% 또는 100%만큼의 "-"변경을 의미한다.

[0056] "기준"이란, 표준 또는 대조군인 조건을 의미한다.

[0057] "기준 서열"은, 서열 비교의 기초로서 사용되는 한정된 서열이다. 기준 서열은 지정 서열의 종속 서열 또는 전체 서열일 수 있는데; 예를 들어 전장 cDNA 또는 유전자 서열의 분절, 또는 전체 cDNA 또는 유전자 서열일 수 있다. 폴리펩티드에 있어서, 기준 폴리펩티드 서열의 길이는, 일반적으로 적어도 약 16개 아미노산, 바람직하게 적어도 약 20개 아미노산, 더욱 바람직하게 적어도 약 25개 아미노산, 그리고 더욱더 바람직하게 약 35개 아미노산, 약 50개 아미노산, 또는 약 100개 아미노산일 것이다. 핵산에 있어서, 기준 핵산 서열의 길이는, 일반적으로 적어도 약 50개 뉴클레오티드, 바람직하게 적어도 약 60개 뉴클레오티드, 더욱 바람직하게 적어도 약 75개 뉴클레오티드, 그리고 더욱더 바람직하게 약 100개 뉴클레오티드 또는 약 300개 뉴클레오티드, 또는 이 범위 정도나 이 범위 사이의 임의의 정수만큼의 개수의 뉴클레오티드일 것이다.

[0058] "특이적으로 결합하다"란, 어떤 화합물 또는 항체가 본 발명의 폴리펩티드를 인지하고 이에 결합하되, 자연에서 본 발명의 폴리펩티드를 포함하는 시료(예컨대 생물 시료) 중 다른 분자는 실질적으로 인지하지 않고 결합하지 않는 경우를 의미한다.

[0059] 본 발명의 방법에 유용한 핵산 분자는 본 발명의 폴리펩티드 또는 이의 단편을 암호화하는 임의의 핵산 분자를 포함한다. 이러한 핵산 분자는 내부 핵산 서열과 100% 동일할 필요는 없지만, 통상 실질적인 동일성을 보일 것이다. 내부 서열과의 "실질적 동일성"을 가지는 폴리뉴클레오티드는, 통상 이중 가닥 핵산 분자의 적어도 한 가닥과 잡종화될 수 있다. 본 발명의 방법에 유용한 핵산 분자는 본 발명의 폴리펩티드 또는 이의 단편을 암호화하는 임의의 핵산 분자를 포함한다. 이러한 핵산 분자는 내부 핵산 서열과 100% 동일할 필요는 없지만, 통상 실질적인 동일성을 보일 것이다. 내부 서열과의 "실질적 동일성"을 가지는 폴리뉴클레오티드는, 통상 이중 가닥 핵산 분자의 적어도 한 가닥과 잡종화될 수 있다. "잡종화하다"란, 다양한 엄중도 조건(stringency condition) 하에 쌍을 이루어 상보성 폴리뉴클레오티드 서열들(예컨대 본원에 기술된 유전자) 또는 이의 일부들 간에 이중 가닥 분자를 형성하는 경우를 의미한다. 예를 들어 문헌(Wahl, G. M. and S. L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152:399; Kimmel, A. R. (1987) Methods Enzymol. 152:507)을 참조한다.

[0060] 예를 들어 엄중한 염 농도는 보통 약 750 mM NaCl 미만 및 약 75 mM 미만의 시트르산삼나트륨, 바람직하게 약 500 mM NaCl 미만 및 약 50 mM 미만의 시트르산삼나트륨, 그리고 더욱 바람직하게 약 250 mM NaCl 미만 및 약 25 mM 미만의 시트르산삼나트륨일 것이다. 저 엄중도 잡종화는 유기 용매, 예컨대 포름아미드의 부재하에 이루어질 수 있는 반면, 고 엄중도 잡종화는 적어도 약 35%의 포름아미드, 더욱 바람직하게는 적어도 약 50%의 포름아미드의 존재하에 이루어질 수 있다. 엄중한 온도 조건은 보통 적어도 약 30℃, 더욱 바람직하게는 적어도 약 37℃, 그리고 가장 바람직하게는 적어도 약 42℃의 온도를 포함할 것이다. 추가의 가변적 매개변수, 예컨대 잡종화 시간, 세제(예컨대 도데실황산나트륨(SDS)) 농도, 그리고 운반체 DNA의 포함 또는 배제는 당 업자들에게 널리 공지되어 있다. 다양한 엄중도 수준은 필요에 따라 다양한 조건들을 조합함으로써 달성된다. 바람직한 구현예에서, 잡종화는 30℃ 및 750 mM NaCl, 75 mM 시트르산삼나트륨 및 1% SDS 중에서 일어날 것이다. 더욱 바람직한 구현예에서, 잡종화는 37℃ 및 500 mM NaCl, 50 mM 시트르산삼나트륨 및 1% SDS, 35% 포름아미드 및 100 μg/ml 변성 연어 정자 DNA(ssDNA) 중에서 일어날 것이다. 가장 바람직한 구현예에서, 잡종화는 42℃ 및 250 mM NaCl, 25 mM 시트르산삼나트륨 및 1% SDS, 50% 포름아미드 및 200 μg/ml ssDNA 중에서 일어날 것이다. 이러한 조건들에 있어서 유용한 변동은 당 업자들이 용이하게 알 것이다.

[0061] 대부분의 응용에 있어서, 잡종화에 뒤이어 행해지는 세척 단계도 또한 엄중도가 다양할 것이다. 세척 엄중도 조건은 염의 농도와 온도에 의해 한정될 수 있다. 상기와 같이 세척 엄중도는, 염 농도를 낮추거나 온도를 높임으로써 증가할 수 있다. 예를 들어 세척 단계에 있어 엄중한 염 농도는, 바람직하게 약 30 mM 미만의 NaCl 및 약 3 mM 미만의 시트르산삼나트륨이고, 가장 바람직하게는 약 15 mM 미만의 NaCl 및 약 1.5 mM 미만의 시트르산삼나트륨일 것이다. 세척 단계에 있어 엄중한 온도 조건은, 보통 적어도 약 25℃, 더욱 바람직하게 적어도 약 42℃, 더욱더 바람직하게는 적어도 약 68℃를 포함할 것이다. 바람직한 구현예에서, 세척 단계는 25℃ 및 30 mM NaCl, 3 mM 시트르산삼나트륨 및 0.1% SDS 중에서 진행될 것이다. 더욱 바람직한 구현예에서, 세척 단계는 42℃ 및 15 mM NaCl, 1.5 mM 시트르산삼나트륨 및 0.1% SDS 중에서 진행될 것이다. 더욱 바람직한 구현예에서, 세척 단계는 68℃ 및 15 mM NaCl, 1.5 mM 시트르산삼나트륨 및 0.1% SDS 중에서 진행될 것이다. 이러한 조건에 대한 추가의 변동은 당 업자들이 용이하게 알 것이다. 잡종화 기술은 당 업자들에게 널리 공지되어 있으며, 예를 들



어 문헌(Benton and Davis (Science 196:180, 1977); Grunstein and Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72:3961, 1975); Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger and Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York); and Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)에 기술되어 있다.

- [0062] "실질적으로 동일한"이란, 어떤 폴리펩티드 또는 핵산 분자가 기준 아미노산 서열(예를 들어 본원에 기술된 아미노산 서열들 중 임의의 하나) 또는 핵산 서열(예를 들어 본원에 기술된 핵산 서열들 중 임의의 하나)에 대해 적어도 50%의 동일성을 보이는 경우를 의미한다. 바람직하게 이러한 서열은 비교에 사용된 서열과 아미노산 수준 또는 핵산 수준에서 적어도 60%, 더욱 바람직하게는 80% 또는 85%, 더욱더 바람직하게는 90%, 95% 또는 심지어 99% 동일하다.
- [0063] 서열 동일성은, 통상적으로 서열 분석 소프트웨어(예를 들어 Sequencher(Gene Codes Corporation, 775 Technology Drive, Ann Arbor, MI); Vector NTI(Life Technologies, 3175 Staley Rd. Grand Island, NY)가 사용되어 측정된다. 이러한 소프트웨어는 다양한 치환, 결실 및/또는 기타 변형에 상동성의 정도를 할당함으로써 동일하거나 유사한 서열을 매칭시킨다. 보존적 치환은, 통상적으로 하기 군들, 즉 글리신, 알라닌; 발린, 이소루신, 루신; 아스파르트산, 글루탐산, 아스파라긴, 글루타민; 세린, 트레오닌; 리신, 아르기닌; 및 페닐알라닌, 티로신 내부에서의 치환을 포함한다. 동일성의 정도를 측정하기 위한 예시적 접근법에 있어서, BLAST 프로그램이 사용될 수 있는데, 이 프로그램에서 확률 스코어  $e^{-3}$  내지  $e^{-100}$ 이라 함은, 이는 두 서열이 관련성이 매우 큰 서열임을 나타낸다.
- [0064] "대상체"란, 포유동물, 예컨대 인간 또는 인간 이외의 포유동물, 예컨대 소, 돼지, 개, 양 또는 고양이(이에 한정되는 것은 아님)를 의미한다. 대상체는, 바람직하게 B 세포 림프종 또는 이에 대한 소인의 치료 또는 제거를 필요로 하는 포유동물로서, 예를 들어 B 림프종이라 진단되었거나 이에 대한 소인이 있는 것으로 진단된 대상체이다. 포유동물은 임의의 포유동물, 예컨대 인간, 영장류, 마우스, 래트, 개, 고양이, 말뿐만 아니라, 식용으로 기른 가축이나 동물, 예컨대 송아지, 양, 돼지, 닭 및 염소이다. 바람직한 구현예에서, 포유동물은 인간이다.
- [0065] 본원에 제공된 범위들은 해당 범위 내의 모든 값들에 대한 약칭인 것으로 이해된다. 예를 들어 "1 내지 50의 범위"는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50으로 이루어진 군에 속하는 임의의 수, 수들의 조합 또는 이 범위의 종속 범위를 포함하는 것으로 이해된다.
- [0066] 본원에 사용된 바와 같은 "치료하는 것" 및 "치료"란 용어는, 어떤 제제(agent)나 제제(formulation)를, 불리한 병태, 장애 또는 질환이 걸린 개체로서, 임상 증상을 보이는 개체에 투여하여, 해당 증상의 중증도 및/또는 발생 빈도의 감소, 해당 증상 및/또는 이 증상의 기저 원인의 제거, 그리고/또는 손상의 개선 또는 교정의 가속화 달성을 지칭한다. 어떤 장애나 병태를 치료하는 것은 해당 장애, 병태 또는 이러한 장애나 병태와 연관된 증상이 완전히 없어져야 하는 것은 아니지만, 그렇다고 이처럼 해당 장애, 병태 또는 이러한 장애나 병태와 연관된 증상이 완전히 없어져서는 안 될 것까지는 없음이 이해될 것이다.
- [0067] "예방하는 것" 및 "예방"이란 용어는, 특정의 불리한 병태, 장애 또는 질환에 취약하거나 이의 소인이 있는 임상 무증상 개체에 제제 또는 조성물을 투여하는 것을 지칭하므로, 증상의 발생 및/또는 해당 증상의 기저 원인을 예방하는 것에 관한 것이다.
- [0068] 달리 특별히 진술되거나, 내용으로부터 명백하지 않다면, 본원에 사용된 바와 같은 "또는"이란 용어는, 포괄적인 것으로 이해된다. 특별히 진술되거나, 내용으로부터 명백하지 않다면, 본원에 사용된 바와 같은 "하나", "하나의" 및 "본"이란 용어는 단수 또는 복수를 나타내는 것으로 이해된다.
- [0069] 특별히 진술되거나, 내용으로부터 명백하지 않다면, 본원에 사용된 바와 같은 "약"이란 용어는, 당 분야에서 보통 관용되는 범위 내, 예를 들어 평균의 2 표준 편차 내에 속하는 것으로 이해된다. "약"은 진술된 값의 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05% 또는 0.01% 이내인 것으로 이해될 수 있다. 내용으로부터 분명하지 않다면, 본원에 제공된 모든 수치 값은 용어 "약"에 의해 수식된다.
- [0070] 본원의 변인에 관한 임의의 정의에 있어서 화학기의 나열에 대한 설명은 해당 변인의 정의를, 임의의 단일 군 또는 나열된 군들의 조합으로서 포함한다. 본원의 변인 또는 양태에 대한 한 구현예의 설명은, 해당 구현예를 임의의 구현예 하나로서, 또는 또 다른 임의의 구현예들이나 이의 일부와의 조합으로서 포함한다.

- [0071] 본원에 제공된 임의의 조성물 또는 방법은, 본원에 제공된 방법 및 기타 조성물들 중 임의의 것 하나 이상과 조합될 수 있다.
- [0072] "~를 포함하는(including)", "~를 함유하는" 또는 "~에 의해 특징지어지는"과 밀접한 전이적 용어 "~를 포함하는(comprising)"은 포괄적이거나 개방적인 용어로서, 언급되지 않은 추가의 요소나 방법의 단계들을 배제하지 않는다. 이와는 대조적으로, 전이적 어구 "~으로 이루어진"은, 청구항에 지정되지 않은 임의의 요소, 단계 또는 성분을 배제한다. 전이적 어구 "본질적으로 ~으로 이루어진"은, 지정된 물질이나 단계에 대한 특허청구범위와, 청구된 발명의 "기본적이고 신규한 특징(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 물질이나 단계"를 한정하는 어구이다.
- [0073] 본 발명의 기타 특징 및 이점은 이하 본 발명의 바람직한 구현예들에 관한 설명과, 특허청구범위로부터 명백할 것이다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어와 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 의해 보통 이해되는 바와 동일한 의미를 가진다. 비록 본원에 기술된 방법 및 물질과 유사하거나 균등한 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적합한 방법과 물질이 이하에 기술되어 있다. 본원에 인용된 등록 및 공개 외국 특허 및 특허출원 모두는 본원에 참조로 인용되어 있다.
- [0074] 본원에 언급된 승인 번호에 의해 표시되는 GenBank 및 NCBI 제출에 관한 사항은 본원에 참조로 인용되어 있다. 본원에 언급된 기타 공표된 모든 참고문헌, 서류, 논문 및 과학 문헌은 참고문헌으로 인용되어 있다. 상충될 경우, 용어의 정의를 포함하는 본 발명의 설명이 이를 조정할 것이다. 또한 물질, 방법 및 실시에는 오로지 예시적인 것일뿐, 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다.

### 도면의 간단한 설명

- [0075] 도 1은, T3 분자(T3M), 다중 사슬 융합 폴리펩티드, 및 질환 세포에 대한 이의 면역 매개 효과를 도시하는 개략적 도해이다.
- 도 2는, 항 CD3 scAb/huIL-15N72D 및 항 CD20 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 융합 단백질을 포함하는 2B8T3M 복합체와, CD20 항원을 발현하는 질환 세포에 대한 이의 면역 매개 효과를 도시하는 개략적 도해이다.
- 도 3은, 이항화 결합 환원 후 T3M 복합체의 도데실황산나트륨 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 분석 결과를 보여주는 사진이다. 오른쪽 레인: 2B8T3M (3 μg); 왼쪽 레인: 마커.
- 도 4a는, Fc 수용체 보유 세포주에 대한 2B8T3M의 결합 활성을 도시하는 선 그래프이다. 도 4b는, IL-15 수용체 보유 세포주에 대한 2B8T3M의 결합 활성을 도시하는 선 그래프이다.
- 도 5a는, CD20 보유 인간 림프구에 대한 2B8T3M의 결합 활성을 보여주는 선 그래프이다. 도 5b는, CD3 보유 인간 림프구에 대한 2B8T3M의 결합 활성을 보여주는 선 그래프이다. 도 5c는, IL-15 수용체 보유 인간 림프구에 대한 2B8T3M의 결합 활성을 보여주는 선 그래프이다.
- 도 6은, 2B8T3M, 2B8T2M 및 ALT-803에 의해 매개되는 IL-15 의존적 32Dβ 세포의 증식을 도시하는 선 그래프이다.
- 도 7은, 2B8T2M 또는 2B8T3M에 의해 유도되는, 다우디(Daudi)-B 세포 림프종에 대한 인간 면역 세포의 세포독성을 도시하는 막대 그래프이다.
- 도 8은, 2B8T2M 또는 2B8T3M에 의해 유도되는, 인간 면역 세포로부터의 인터페론-γ (IFN-γ) 방출을 보여주는 막대 그래프이다.
- 도 9a ~ 도 9c는, 2B8T2M 융합 단백질 구조 및 특성규명 결과를 보여주고 있다. 도 9a는, 2B8의 단일 사슬 성분의 조직을 포함하는 2B8T2M 복합체의 개략적 도해이다. 도 9b는, 정제된 2B8T2M 융합 단백질의 환원 조건하 SDS-PAGE 분석 결과이다. 레인: (1) MW 마커, (2) 2B8T2M. 도 9c는, 2B8T2M 단백질의 크기별 배제 크로마토그래피 분석 결과를 보여주고 있다.
- 도 10a ~ 도 10c는 2B8T2M의 B 세포 결합을 보여주고 있다. 유세포분석에 의한 2B8T2M의 표적 특이적 결합 활성 분석. 인간 PBMC(시험당 5 x 10<sup>5</sup>개)가 리투시맵, 2B8T2M 또는 인간 IgG(이소타입 대조군) 1 mg/mL씩에 10분 동안 첨가되어, 최종 부피 0.1 mL가 되었다. 반응물은 30분 동안 FITC-접합 리투시맵으로 염색되었거나(도 10a) 또는 FITC-접합 2B8T2M으로 염색되었으며 (시료당 2 μg)(도 10b) PE-접합 HLA-DR(시료당 5 μl)로 염색되었다. 도 10c는, 인간 조직구 림프종 U-937 세포가 30분 동안 FITC-접합 리투시맵, 2B8T2M 또는 2B8T2M-LA 돌연변이

체로 염색된 다음, 유세포분석에 의해 Fc-수용체 결합 활성에 대해 분석되었을 때의 그래프이다.

도 11a 및 도 11b는, 2B8T2M이 CDC 및 세포자멸을 유도함을 보여주고 있다. 도 11a는, 보체(정상 인간 혈청)의 존재하에 Daudi 세포(시험당  $3 \times 10^5$  개)가 다양한 농도의 2B8T2M, 2B8T2M-LA 돌연변이체, 2B8T2M-D8N 돌연변이체 및 리톡시맙(양성 대조군)과 함께 37°C에서 2 시간 동안 항온처리되었을 때의 그래프이다. 요오드화프로피듐이 첨가된 다음, 유세포분석에 의해 분석이 이루어졌다. 사멸된 세포 %는, 요오드화프로피듐 양성 세포 %를 나타낸다( $n = 3$ ). 도 11b는, Daudi 세포가 37°C에서 3일 동안 2B8T2M, 2B8T2M-LA, 2B8T2M-D8N 또는 리톡시맙과 함께 항온처리되었을 때의 그래프이다. Daudi 세포는 어넥신 V로 염색되었으며, 세포 사멸%는 유세포분석에 의해 측정되었다. 데이터는 평균  $\pm$  SE를 나타낸다.

도 12a ~ 도 12d는, 리톡시맙과 2B8T2M의 ADCC 활성을 보여주고 있다. Daudi 세포는 CellTrace Violet으로 표지화되었고, 신선한 인간 PBMC(도 12a,  $n = 5$ ) 또는 정제된 NK 세포(도 12b,  $n = 2$ 명의 공여자)는 효과기 세포로 사용되었다. 효과기 세포는 지정된 농도의 리톡시맙 또는 2B8T2M, 그리고 바이올렛 표지화 표적 세포(지정된 효과기:표적 비율)와 함께 도말되었다. 표적 세포 생존능은, 유세포 분석을 이용하여 요오드화프로피듐 양성, 바이올렛 표지화 Daudi 세포를 분석함으로써, 2일에 PBMC에 대해 평가되었거나(도 12a), 또는 2일에 NK 세포에 대해 평가되었다(도 12b). 사멸 Daudi 세포 %는, 요오드화프로피듐 양성 세포를 나타낸다. \*는 2B8T2M 투여의 경우에 비하여  $p < 0.01$ (10nM)이고  $p < 0.05$ (1nM)임을 나타낸다. 제시된 값들은 평균  $\pm$  SE를 나타낸다. 도 12c 및 도 12d는, 인간 PBMC( $5 \times 10^6$  개)가 2B8T2M과 함께 2일 동안 RPMI-10 2 mL 중에서 항온처리되었을 때의 그래프이다. 2B8T2M 활성화 PBMC는 항 NKp46으로 염색되었거나(도 12c, NK 세포) 또는 항 CD8로 염색된 다음(도 12d, CD8<sup>+</sup> T 세포), 세포내 그랜자임 B와 퍼포린으로 염색되었다. 활성화된 CD8<sup>+</sup> T 세포와 NK 세포에 의한, 그랜자임 B 및 퍼포린의 발현 수준은 유세포분석에 의해 측정되었다.

도 13a ~ 도 13f는, 리톡시맙이 대조군일 때 2B8T2M에 대한 PET 영상화 데이터의 정량 분석 결과를 보여주고 있다. 도 13a 및 도 13d는, <sup>64</sup>Cu-NOTA-2B8T2M 및 <sup>64</sup>Cu-NOTA-리톡시맙 주사 후 상이한 시점(0.5, 6, 30 및 70 시간)에서의 일련의 2차원 투영 PET 영상들을 보여주고 있다. 도 13b 및 도 13e는, 주요 장기들의 조직 1 그램당 주사 용량 (%ID/g)를 산정하기 위한 관심 영역 분석이 다양한 시점에서 수행되었을 때의 PET 영상화 데이터 기반 그래프이다. 도 13c 및 도 13f는, 마우스가 안락사된 후 주요 장기들/조직들이 수집 및 계량되었을 때의 그래프이다. 2B8T2M 및 리톡시맙의 조직내에서의 생체내 분포는 감마-카운터를 사용하여 측정되었다. 데이터는 군당 4 마리 마우스의 대표 결과이다(평균  $\pm$  SD).

도 14a ~ 도 14d는, 2B8T2M에 의해 유도된 CD8<sup>+</sup> T 세포 및 NK 세포의 증식을 보여주고 있다. CellTrace Violet이 표지화된 증량 동계 T 세포( $1 \times 10^7$  개/마우스)는 C57BL/6 암컷 수용개체(군당  $n = 5$  또는 6)에 양자의 방식으로(adoptively) 운반되었다. 운반후 2일째 되는 날, 2B8T2M(5 mg/kg), 2B8T2M-LA(5 mg/kg), 2B8T2M-D8N(5 mg/kg), IL-15(0.056 mg/kg) 및 PBS가 정맥 내 주사되었다. 도 14a 및 도 14b에서, 5일째 되는 날 수집된 비장 세포는 T 세포에 대한 항 CD4, 항 CD8로 염색되었고(도 14a), NK 세포에 대한 항 NK1.1으로 염색되어(도 14b), 유세포분석에 의해 분석되었다. 도 14c는, CellTrace Violet의 형광 세기를 기반으로 하여 세포 분열을 보인 그래프이다(가장 밝은 세포는 증식이 일어나지 않았음을 나타냄). 도 14d는, 증식성 세포 %가 유세포분석에 의해 분석되었을 때의 그래프이다. (여타의 군들 가운데) IL-15 대 2B8T2M-D8N:  $p > 0.05$  및 2B8T2M 대 2B8T2M-LA;  $p < 0.01$ . 데이터는 평균  $\pm$  SD를 나타낸다.

도 15a 내지 도 15e는, 2B8T2M으로 처리된 종양 보유 마우스의 연장된 생존과, 2B8T2M 항종양 활성의 효능을 보여주고 있다. 도 15a는, 마우스 1마리당  $1 \times 10^7$  개 Daudi 세포가 i.v. 주사되고 나서, Daudi B 림프종 보유 마우스가 3개의 처리군으로 무작위로 할당된 후( $n = 6$ ), 접종 후 15일 및 18일에 리톡시맙(▲)(10 mg/kg), 2B8T2M(●)(5 mg/kg), 그리고 PBS(■) 비이클 대조군으로 처리되었을 때의 그래프이다. PBS 대 리톡시맙:  $p = 0.001$ ; 리톡시맙 대 2B8T2M:  $p = 0.006$ . 도 15b ~ 도 15d는, Daudi B 림프종 보유 마우스가 처리군들로 무작위로 할당된 후, 도 15a에서와 같이 리톡시맙( $n = 7$ )(10 mg/kg), 2B8T2M(0.2, 1, 5, 12.8 mg/kg)(용량 수준당  $n = 6$ ) 및 PBS( $n = 7$ )(비이클 대조군)으로 처리되었을 때의 그래프이다. 2차 처리 후인 4일에 마우스는 안락사되었고, 골수와 비장 세포가 수집되었다. 도 15b는, 골수 중 Daudi 세포 %가 유세포분석이 이용되어 HLA-DR 염색에 의해 측정되었을 때의 그래프이다. 도 15c는, 비장 내 NK 세포 %가 유세포분석이 이용되어 NKp46 염색에 의해 측정되었을 때의 그래프이다. 도 15d는, 골수 내 NK 세포 %가 유세포분석이 이용되어 NKp46 염색에 의해 측정되었을 때의 그래프이다. 도 15e는, Daudi B 림프종 보유 SCID 베이지 마우스가 3개의 처리군으로 무작위로 할당되고



나서, 접종 후 13일 및 16일 경과시 리톡시맵( $n = 8$ )(10 mg/kg), 2B8T2M(5 mg/kg)( $n = 7$ ) 및 PBS( $n = 8$ ) 비이클 대조군으로 처리되었을 때의 그래프이다. 2차 처리 후인 4일에 마우스는 안락사되었고, 골수 세포가 수집되었다. 골수 내 Daudi 세포 %는 유세포분석이 이용되어 HLA-DR 염색에 의해 측정되었다. 데이터는 평균  $\pm$  SD를 나타낸다. 도 15b ~ 도 15e에서, \*는 PBS에 비하였을 때  $p < 0.01$ 임을 나타내고; 쉼표는 리톡시맵에 비하였을 때  $p < 0.01$ 임을 나타낸다.

도 16a 및 도 16b는, 2B8T2M의 상이한 돌연변이단백질(mutein)의 항종양 기능들을 비교한 결과를 보여주고 있다. 도 16a는, 마우스 1 마리당  $1 \times 10^7$  개의 Daudi 세포가 i.v. 주사된 후, Daudi B 림프종 보유 SCID 마우스가 4개의 처리군으로 랜덤하게 할당되고 나서( $n = 8$ ), 도 15에서와 같이 2B8T2M, 2B8T2M-LA, 2B8T2M-D8N 및 PBS(비이클 대조군) 5 mg/kg씩으로 처리되었을 때의 그래프이다. 마우스는 안락사되었고, 2차 처리 후인 4일에 골수 세포가 수집되었다. 골수 내 Daudi 세포 %는 도 15에서와 같이 측정되었다. 도 16b는, Daudi B 림프종 보유 SCID 마우스가 2개의 처리군으로 랜덤하게 할당되고 나서( $n = 10$ ), 접종 후 18일 및 21일 경과시 2B8T2M, 및 c264scTCR-IL15N72D/C264scTCR-IL15R  $\alpha$  SuFc 5 mg/kg씩으로 처리되었을 때의 그래프이다. 모든 마우스는 안락사되었고, 2차 처리 후인 4일에 골수 세포가 수집되었다. 골수 내 Daudi 세포 %는 도 15에서와 같이 측정되었다. \*는 PBS에 비하였을 때  $p < 0.01$ 임을 나타내고; §는 2B8T2M에 비하였을 때  $p < 0.01$ 임을 나타낸다; 데이터는 평균  $\pm$  SD를 나타낸다.

도 17a 및 도 17b는, 사이노몰거스 원숭이에 있어서의 2B8T2M에 의한 B 세포 감소를 보여주고 있다. 본 연구는 3개의 사이노몰거스 원숭이 군으로 이루어지며, 각 군당 수컷 원숭이가 4마리씩 할당된다. 이 동물에 2B8T2M(5 mg/kg), 리톡시맵(10 mg/kg) 및 PBS 비이클 대조군이 i.v. 처리되었다. 3일 후 동일한 처리가 반복 수행되었다. B 세포 분석을 위한 혈액 시료(도 17a)가 처리전, 1차 처리 후 1일(24 시간), 1차 처리 후 3일 경과 후인 2차 처리전, 1차 처리 후 4일(2차 처리 후 24시간), 5일 및 7일에 취득되었다. 1차 처리 후 7일 경과시 모든 사이노몰거스 원숭이가 안락사되었으며, 이후 비장 및 장관막 림프절(LN) 세포가 유세포분석에 의한 B 세포 분석을 위해 수집되었다(도 17b).

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0076] 본 발명은 최소한 부분적으로 다중 특이적 단백질 복합체가 효과기 T 세포를 활성화하고, 질환 세포에 대한 효과기 T 세포의 활성을 표적화함으로써, 질환 특이적 세포독성을 발휘시킨다는 놀라운 발견에 바탕을 두고 있다. 본원에는 질환 항원(예컨대 CD20)을 인지하는 제1 결합 도메인과, T 세포상 CD3을 인지하는 제2 결합 도메인을 가지는 다중 특이적 단백질 복합체가 제공된다. 이러한 단백질 복합체는 대상체 내 신생물형성, 감염성 질환 또는 자가면역성 질환을 치료하기 위한 방법에 이용된다(도 1). 구체적으로 이하에 상세히 기술된 바와 같이 가용성 항 CD3 scAb/huIL-15N72D:항 CD20 scAb/huIL-15R  $\alpha$  Su/huIgG1 Fc 복합체("항 CD3 scAb-항 CD20 scAb T3M" 또는 "2B8T3M")는  $CD8^+$  및  $CD4^+$  T 세포를 자극하여 종양 표적 세포를 사멸시킨다(도 2). 2B8T3M은 또한 인간 말초혈액단핵구세포(PBMC)와,  $CD8^+$  및  $CD4^+$  T 세포로부터의 인터페론- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 방출을 자극하였다. 그러므로 본원에는 2B8T3M을 특징으로 하는 조성물과, 신생물형성(예컨대 B 세포 림프종 및 만성 림프구성 백혈병)에 대해 면역 반응을 증진시키고, B 세포를 감소시켜, 자가면역성 질환(예컨대 면역 및 혈전성 혈소판감소성자반 및 류머티즘성 관절염)을 치료하기 위하여 이러한 조성물을 사용하는 방법이 제공된다.

[0077] 본원에 기술된 바와 같이, 숙주 면역 인지 및 반응에 대해 발병 세포를 표적화하는 능력을 가지는 단백질을 사용하는 것은 암, 감염성 질환 및 자가면역성 질환을 치료하는데 유효한 전략이다. 미국특허 제8,507,222호(본원에 참조로서 인용됨)에 기술된 바와 같이, IL-15 및 IL-15 수용체  $\alpha$  도메인을 포함하는 단백질 스캐폴드(scaffold)가 질환 세포상 항원 및 면역세포상 수용체를 인지할 수 있는 다중특이적 단백질을 제조하는데 사용되었다. 미국특허 제8,507,222호의 실시예 15를 참조한다. 본원에는 질환 연관 항원과 CD3을 인지하는 결합 도메인에 결합되어 있는 IL-15 수용체  $\alpha$ 와 IL-15를 포함하는 가용성 다중특이적 단백질 복합체의 제조가 기술되어 있다. 예를 들어 항원 특이적 결합 도메인은 B 세포 림프종 상 인간 CD20을 인지하는 단일 사슬 항체(scAb)이고, CD3 인지 도메인은 인간 CD3에 특이적인 scAb이다.

[0078] 몇몇 경우들에 있어서 항 CD20 scAb는 리톡시맵, 즉 키메라 모노클로날 항 CD20 항체의 가변 사슬로부터 유래한다. 예를 들어 항 CD20 scAb 서열은 가요성 링커 서열을 통해 결합된, 리톡시맵 항체의 중쇄 및 경쇄 V 도메인들의 암호화 영역을 포함한다. 대안적으로 당 분야에 공지된 다른 항 CD20 Ab들로부터 유래한 결합 도메인도 사용될 수 있었다.

- [0079] 몇몇 경우들에 있어서, 항 CD3 scAb는 OKT3, 즉 마우스 모노클로날 항 CD3 항체의 가변 사슬로부터 유래한다. 예를 들어 항 인간 CD3 scAb 서열은 가요성 링커 서열을 통해 결합된, OKT3 항체의 중쇄 및 경쇄 V 도메인들의 암호화 영역을 포함한다. 대안적으로 당 분야에 공지된 다른 항 CD3 Ab들로부터 유래한 결합 도메인도 사용될 수 있었다
- [0080] 질환 항원과 CD3을 인지하는 결합 도메인은, 결합 활성이 유지되는 한, 추가의 링커를 통하거나 통하지 않고 IL-15 또는 IL-15 수용체  $\alpha$  단백질의 N-말단 또는 C-말단 중 어느 하나에 결합된다. 바람직하게 항 CD3 scAb 도메인은 인간 IL-15N72D 강력 표현성 단백질(huIL-15N72D)의 N-말단에 결합된다. 대안적으로 항 CD3 scAb 도메인은 인간 IL-15N72D 단백질의 C-말단에 결합된다. 바람직하게 항원 특이적 결합 도메인은 인간 IL-15 수용체  $\alpha$  스시 도메인(huIL-15R  $\alpha$  Su)의 N-말단에 결합되어 있다. 몇몇 경우들에 있어서, 본 발명의 다중특이적 단백질 복합체는 단백질 이량체화 및 면역세포 상 CD16 수용체의 인지를 위한 IgG Fc 도메인을 추가로 포함한다. 이러한 도메인은 표적 세포들에 대하여 항체 의존적 세포성 세포독성(ADCC) 및 보체 의존적 세포독성(CDC)을 매개한다. 몇몇 예들에 있어서, CD16 결합 활성이 증가 또는 감소한 Fc 도메인을 사용하는 것이 유용하다. 일 양태에서, Fc 도메인은, ADCC 활성은 감소시키지만, 이항화 결합 이량체를 형성하는 능력은 보유하게 하는, 아미노산 치환 L234A 및 L235A(LALA)(번호는 Fc 공통 서열을 바탕으로 함)를 함유한다.
- [0081] 인터루킨-15
- [0082] 인터루킨-15(IL-15)는 효과기 NK 세포와 CD8<sup>+</sup> 기억 T 세포의 발달, 증식 및 활성화에 중요한 시토카인이다. IL-15는 IL-15 수용체  $\alpha$  (IL-15R  $\alpha$ )에 결합한 후, 이를 경유하여(in trans) 효과기 세포 상 IL-2/IL-15 수용체  $\beta$  - 공통  $\gamma$  사슬(IL-15R  $\beta$   $\gamma_c$ ) 복합체에 제시된다. IL-15 및 IL-2는 둘 다 IL-15R  $\beta$   $\gamma_c$ 와 결합하고, STAT3 및 STAT5 경로를 통해 신호를 전달한다. 그러나 IL-2와는 달리, IL-15는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> 조절 T(Treg) 세포의 유지를 지원하지 않거나, 또는 활성화된 CD8<sup>+</sup> T 세포의 세포 사멸을 유도하지 않기 때문에, 이러한 특성들은 다 발성 골수종에 대한 IL-2의 치료 활성을 제한할 수 있다. 뿐만아니라 IL-15는 항 세포사멸 신호를 효과기 CD8<sup>+</sup> T 세포에 제공하는 것으로 알려진 유일한 시토카인이다. 단독으로 투여되거나 또는 IL-15R  $\alpha$  와의 복합체로서 투여된 IL-15는 실험 동물 모델에서 잘 확립된 고형 종양에 강력한 항종양 활성을 보이므로, 잠재적으로 암을 치료할 수 있었던 면역치료 약물로서 가장 촉망받는 것들 중 하나인 것으로 확인되었다.
- [0083] IL-15 기반 암 치료제의 임상 개발을 가속화하기 위하여, IL-15에 비해 생물 활성이 증가한 IL-15 돌연변이체(IL-15N72D)가 동정되었다(Zhu et al., J Immunol, 183: 3598-3607, 2009). 이 IL-15 강력 표현체(IL-15N72D)의 약동학적 특성과 생물 활성은 IL-15N72D:IL-15R  $\alpha$ /Fc 융합 복합체(ALT-803)를 만듦으로써 더욱 향상되었으며, 그 결과 강력 표현성 복합체는 생체 내에서 원산 시토카인의 활성보다 적어도 25배 큰 활성을 갖게되었다(Han et al., Cytokine, 56: 804-810, 2011).
- [0084] 항원 특이적 결합 도메인
- [0085] 항원 특이적 결합 도메인은 발병 세포상 표적들과 특이적으로 결합하는 폴리펩티드들로 이루어져 있다. 대안적으로 이러한 도메인은 병상(diseased state)을 지원하는 기타 세포상 표적, 예컨대 종양의 성장을 지원하는 기질 세포상 표적 또는 질환 매개성 면역억제를 지원하는 면역세포상 표적에 결합할 수 있다. 항원 특이적 결합 도메인은 당 분야에 공지된 항체, 단일 사슬 항체, Fab, Fv, T 세포 수용체 결합 도메인, 리간드 결합 도메인, 수용체 결합 도메인, 도메인 항체, 단일 도메인 항체, 미니바디, 나노바디, 펩티바디 또는 기타 다양한 항체 모의체(예컨대 아피머, 아피틴, 알파바디, 아트리머, CTLA4 기반 분자, 아드넥틴, 안티칼린, Kunitz 도메인 기반 단백질, 아비머, 노틴, 파이노머, 다르핀, 아피바디, 아필린, 모노바디 및 아르마딜로 반복 단백질 기반 단백질(Weidle, UH, et al. 2013. Cancer Genomics & Proteomics 10: 155-168))를 포함한다.
- [0086] 임의의 구현예들에서, 항원 특이적 결합 도메인에 대한 항원은 세포 표면 수용체 또는 리간드를 포함한다. 추가의 구현예에서, 항원은 CD 항원, 시토카인 또는 케모카인 수용체 또는 리간드, 성장 인자 수용체 또는 리간드, 조직 인자, 세포 부착 분자, MHC/MHC-유사 분자, Fc 수용체, Toll-유사 수용체, NK 수용체, TCR, BCR, 양성/음성 보조자극 수용체 또는 리간드, 사멸 수용체 또는 리간드, 종양 연관 항원, 또는 바이러스 암호화 항원을 포함한다.
- [0087] 바람직하게 항원 특이적 결합 도메인은 종양 세포상 항원과 결합할 수 있다. 종양 특이적 결합 도메인은 암 환자 치료용으로 승인된 항체, 예컨대 리톡시맙, 오파투무맙 및 오비누투주맙(항 CD20 Ab); 트라스투주맙 및 퍼투주맙(항 HER2 Ab); 세특시맙 및 파니투무맙(항 EGFR Ab); 그리고 알렘투주맙(항 CD52 Ab)로부터 유래할 수

있다. 이와 유사하게, 승인된 항체-효과기 분자 접합체로서, CD20에 특이적인 것(<sup>90</sup>Y-표지화 이브리투모맵 티옥세탄, <sup>131</sup>I-표지화 토시투모맵), HER2에 특이적인 것(아도-트라스투주맵 엠탄신), CD30에 특이적인 것(브렌투시맵 베도틴) 및 CD33에 특이적인 것(겔투주맵 오조가미신)으로부터 유래하는 결합 도메인이 사용될 수 있었다 (Sliwowski MX, Mellman I. 2013 Science 341:1192).

[0088]

또한, 본 발명의 바람직한 결합 도메인은 당 분야에 공지된 기타 다양한 종양 특이적 항체 도메인을 포함할 수 있다. 암 치료를 위한 항체와 이의 각각의 표적으로서는 니볼루맵(항 PD-1 Ab), TA99(항 gp75), 3F8(항 GD2), 8H9(항 B7-H3), 아바코보맵(항 CA-125(이미타티온)), 아테카투무맵(항 EpCAM), 아푸투주맵(항 CD20), 알라시주맵 페골(항 VEGFR2), 알투모맵 펜테테이트(항 CEA), 아마톡시맵(항 메소텔린), AME-133(항 CD20), 아나투모맵 마페나톡스(항 TAG-72), 아폴리주맵(항 HLA-DR), 아크리투모맵(항 CEA), 바비톡시맵(항 포스포티딜세린), 벡투모맵(항 CD22), 벨리루맵(항 BAFF), 베실레소맵(항 CEA-관련 항원), 베바시주맵(항 VEGF-A), 비바투주맵 메르탄신(항 CD44 v6), 블리나투모맵(항 CD19), BMS-663513(항 CD137), 브렌투시맵 베도틴(항 CD30(TNFRSF8)), 칸투주맵 메르탄신(항 뮤신 CanAg), 칸투주맵 라브탄신(항 MUC1), 카프로맵 펜테타이드(항 전립선암종세포), 카를루맵(항 MCP-1), 카투막소맵(항 EpCAM, CD3), cBR96-독소루비신 면역접합체(항 루이-Y 항원), CC49(항 TAG-72), 세텔리주맵(항 CD4), Ch.14.18(항 GD2), ch-TNT(항 DNA 연관 항원), 시타투주맵 보가톡스(항 EpCAM), 식수투무맵(항 IGF-1 수용체), 클리바투주맵 테트라세탄(항 MUC1), 코나투무맵(항 TRAIL-R2), CP-870893(항 CD40), 다세투주맵(항 CD40), 다클리주맵(항 CD25), 달로투주맵(항 인슐린 유사 성장 인자 I 수용체), 다라투무맵(항 CD38(사이클릭 ADP 리보스 하이드롤라아제)), 덴시주맵(항 DLL4), 데투모맵(항 B-림프종 세포), 드로지투맵(항 DR5), 돌리고투맵(항 HER3), 두시기투맵(항 ILGF2), 에크로멕시맵(항 GD3 강글리오사이드), 에드레콜로맵(항 EpCAM), 엘로투주맵(항 SLAMF7), 엘시리모맵(항 IL-6), 에나바투주맵(항 TWEAK 수용체), 에노티쿠맵(항 DLL4), 엔시톡시맵(항 5AC), 에피투모맵 시톡세탄(항 에피시알린), 에프라투주맵(항 CD22), 에르투막소맵(항 HER2/neu, CD3), 에타라시주맵(항 인테그린  $\alpha v \beta 3$ ), 파랄리모맵(항 인터페론 수용체), 파를레투주맵(항 엽산염 수용체 1), FBTA05(항 CD20), 피클라투주맵(항 HGF), 피기투무맵(항 IGF-1 수용체), 플란보투맵(항 TYRP1(당단백질 75)), 프레솔리무맵(항 TGF  $\beta$ ), 푸톡시맵(항 EGFR), 갈락시맵(항 CD80), 가니투맵(항 IGF-I), 겔투주맵 오조가미신(항 CD33), 기렌톡시맵(항 탄산무수화효소 9(CA-IX)), 글렘바투무맵 베도틴(항 GPNMB), 구셀쿠맵(항 IL13), 이발리주맵(항 CD4), 이브리투모맵 티옥세탄(항 CD20), 이크루쿠맵(항 VEGFR-1), 이고보맵(항 CA-125), IMAB362(항 CLDN18.2), IMC-CS4(항 CSF1R), IMC-TR1(TGF  $\beta$  RII), 임가투주맵(항 EGFR), 인클라쿠맵(항 셀렉틴 P), 인다톡시맵 라브탄신(항 SDC1), 이노투주맵 오조가미신(항 CD22), 인테투무맵(항 CD51), 이필리무맵(항 CD152), 이라투무맵(항 CD30(TNFRSF8)), KM3065(항 CD20), KW-0761(항 CD194), LY2875358(항 MET) 라베투주맵(항 CEA), 람브롤리주맵(항 PDCD1), 렉사투무맵(항 TRAIL-R2), 린투주맵(항 CD33), 리릴루맵(항 KIR2D), 로르보투주맵 메르탄신(항 CD56), 루카투무맵(항 CD40), 루밀릭시맵(항 CD23(IgE 수용체)), 마파투무맵(항 TRAIL-R1), 마르게톡시맵(항 ch4D5), 마투주맵(항 EGFR), 마브릴리무맵(항 GMCSF 수용체  $\alpha$ -사슬), 밀라투주맵(항 CD74), 민레투모맵(항 TAG-72), 미투모맵(항 GD3 강글리오사이드), 모가몰리주맵(항 CCR4), 목세투모맵 파수도톡스(항 CD22), 나콜로맵 타페나톡스(항 C242 항원), 남투모맵 에스타페나톡스(항 5T4), 나르나투맵(항 RON), 네시투무맵(항 EGFR), 네스바쿠맵(항 안지오프이에틴 2), 니모투주맵(항 EGFR), 니볼루맵(항 IgG4), 노페투모맵 메르헨탄, 오크렐리주맵(항 CD20), 오카라투주맵(항 CD20), 올라라투맵(항 PDGF-R  $\alpha$ ), 오나르투주맵(항 c-MET), 온톡시주맵(항 TEM1), 오포르투주맵 모나톡스(항 EpCAM), 오레고보맵(항 CA-125), 오틀레르투주맵(항 CD37), 판코맵(MUC1의 항 종양 특이적 당화), 파르사투주맵(항 EGFL7), 파스콜리주맵(항 IL-4), 파트리투맵(항 HER3), 펜투모맵(항 MUC1), 페르투주맵(항 HER2/neu), 피딜리주맵(항 PD-1), 피나투주맵 베도틴(항 CD22), 핀투모맵(항 선암종 항원), 폴라투주맵 베도틴(항 CD79B), 프리투무맵(항 비멘틴), PRO131921(항 CD20), 퀴리주맵(항 IGHE), 라코투모맵(항 N-글리코릴뉴라민산), 라드레투맵(항 피브로넥틴 여분 도메인-B), 라무시루맵(항 VEGFR2), 리로투무맵(항 HGF), 로바투무맵(항 IGF-1 수용체), 로레두맵(항 RHD), 로벨리주맵(항 CD11 및 CD18), 사말리주맵(항 CD200), 사투모맵 펜테타이드(항 TAG-72), 세리반투맵(항 ERBB3), SGN-CD19A(항 CD19), SGN-CD33A(항 CD33), 시브로투주맵(항 FAP), 실톡시맵(항 IL-6), 슬리토맵(항 EpCAM), 손투주맵(항 에피시알린), 타발루맵(항 BAFF), 타카투주맵 테트라세탄(항 알파-테아단백질), 타플리투모맵 팍톡스(항 CD19), 텔리모맵 아리톡스, 테나투모맵(항 테나신 C), 테네릭시맵(항 CD40), 테프로투무맵(항 CD221), TGN1412(항 CD28), 티실리루맵(항 CTLA-4), 티가투주맵(항 TRAIL-R2), TNX-650(항 IL-13), 토시투모맵(항 CS20), 토베투맵(항 CD140a), TRBS07(항 GD2), 트레갈리주맵(항 CD4), 트레멜리루맵(항 CTLA-4), TRU-016(항 CD37), 투코투주맵 셀모루킨(항 EpCAM), 우블리톡시맵(항 CD20), 우렐루맵(항 4-1BB), 반틱투맵(항 프리즐드(Frizzled) 수용체), 바팔릭시맵(항 AOC3(VAP-1)), 바텔리주맵(항 ITGA2), 벨투주맵(항 CD20), 베센쿠맵(항 NRP1), 비실리주맵(항 CD3), 볼로식시맵(항 인테그린  $\alpha 5 \beta 1$ ), 보르세투주맵 마포도틴(항 CD70), 보투무맵(항 종양 항원

CTAA16.88), 잘루투무맙(항 EGFR), 자놀리무맙(항 CD4), 자특시맙(항 HER1), 지랄리무맙(항 CD147(바시킨)), RG7636(항 ETBR), RG7458(항 MUC16), RG7599(항 NaPi2b), MPDL3280A(항 PD-L1), RG7450(항 STEAP1) 및 GDC-0199(항 Bcl-2)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0089]

본 발명에 유용한 기타 항체 도메인 또는 중양 결합 단백질(예컨대 TCR 도메인)로서는 하기 항원들과 결합하는 것들을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다(주의; 명시된 암의 적응증들은 비 제한적 예를 나타냄): 아미노캡티다아제 N(CD13), 어넥신 A1, B7-H3(CD276, 다수의 암), CA125(난소암), CA15-3(암종), CA19-9(암종), L6(암종), 루이 Y(암종), 루이 X(암종), 알파 태아단백질(암종), CA242(결장직장암), 태반 알칼리성 포스파타아제(암종), 전립선 특이 항원(전립선), 전립선산 포스파타아제(전립선), 상피성장인자(암종), CD2(호지킨병, NHL 림프종, 다발성 골수종), CD3 엡실론(T 세포 림프종, 폐암, 유방암, 위암, 난소암, 자가면역성 질환, 악성 복수), CD19(B 세포 악성종양), CD20(비호지킨 림프종, B-세포 신생물형성, 자가면역성 질환), CD21(B 세포 림프종), CD22(백혈병, 림프종, 다발성 골수종, SLE), CD30(호지킨 림프종), CD33(백혈병, 자가면역성 질환), CD38(다발성 골수종), CD40(림프종, 다발성 골수종, 백혈병(CLL)), CD51(전이성 흑색종, 육종), CD52(백혈병), CD56(소세포 폐암, 난소암, Merkel 세포 암종, 및 액상 종양, 다발성 골수종), CD66e(암종), CD70(전이성 신세포 암종 및 비호지킨 림프종), CD74(다발성 골수종), CD80(림프종), CD98(암종), CD123(백혈병), 뮤신(암종), CD221(고형 종양), CD227(유방암, 난소암), CD262(NSCLC 및 기타 암), CD309(난소암), CD326(고형 종양), CEACAM3(결장직장암, 위암), CEACAM5(CEA, CD66e)(유방암, 결장직장암, 폐암), DLL4(A-유사-4), EGFR(다수의 암), CTLA4(흑색종), CXCR4(CD 184, 혈액종양, 고형 종양), 엔도글린(CD 105, 고형 종양), EPCAM(상피 세포 부착 분자, 방광, 두부, 경부, 결장, NHL 전립선, 및 난소의 암), ERBB2(폐, 유방 및 전립선의 암), FCGR1(자가면역성 질환), FOLR(엽산염 수용체, 난소암), FGFR(암종), GD2 ganglioside(암종), G-28(세포 표면 항원 당지질, 흑색종), GD3 이디오타입(암종), 열충격 단백질(암종), HER1(폐암, 위암), HER2(유방, 폐 및 난소의 암), HLA-DR10(NHL), HLA-DRB(NHL, B 세포 백혈병), 인간 만성 성선자극호르몬(암종), IGF1R(고형 종양, 혈액암), IL-2 수용체(T 세포 백혈병 및 림프종), IL-6R(다발성 골수종, RA, 캐슬만씨병, IL6 의존성 종양), 인테그린 (다수의 암에 대한  $\alpha v \beta 3$ ,  $\alpha 5 \beta 1$ ,  $\alpha 6 \beta 4$ ,  $\alpha 11 \beta 3$ ,  $\alpha 5 \beta 5$ ,  $\alpha v \beta 5$ ), MAGE-1(암종), MAGE-2(암종), MAGE-3(암종), MAGE 4(암종), 항 트랜스페린 수용체(암종), p97(흑색종), MS4A1(막 확장성 4-도메인 상과 A 일원 1, 비호지킨 B 세포 림프종, 백혈병), MUC1(유방, 난소, 자궁경부, 기관지 및 위장관의 암), MUC16(CA125)(난소암), CEA(결장직장암), gp100(흑색종), MART1(흑색종), MPG(흑색종), MS4A1(막 확장성 4-도메인 상과 A, 소세포 폐암, NHL), 뉴클레올린, Neu 발암유전자 생성물(암종), P21(암종), 넥틴-4(암종), 항 (N-글리코실뉴라민산, 유방암, 흑색종)의 파라토프, PLAP-유사 고환 알칼리성 포스파타아제(난소암, 고환암), PSMA(전립선 종양), PSA(전립선), ROB04, TAG 72(종양 연관 당단백질 72, AML, 위암, 결장직장암, 난소암), T 세포 경막 단백질(암), Tie(CD202b), 조직 인자, TNFRSF10B(종양 괴사 인자 수용체 상과 일원 10B, 암종), TNFRSF13B(종양 괴사 인자 수용체 상과 일원 13B, 다발성 골수종, NHL, 기타 암, RA 및 SLE), TPBG(세포영양막 당단백질, 신세포 암종), TRAIL-R1(종양 괴사성 세포자멸 유도 리간드 수용체 1, 림프종, NHL, 결장직장암, 폐암), VCAM-1(CD106, 흑색종), VEGF, VEGF-A, VEGF-2(CD309)(다수의 암). 기타 몇몇 종양 연관 항원 표적에 관하여도 검토된 바 있다 (Gerber, et al, Mabs 2009 1:247-253; Novellino et al, Cancer Immunol Immunother. 2005 54:187-207, Franke, et al, Cancer Biother Radiopharm. 2000, 15:459-76, Guo, et al., Adv Cancer Res. 2013; 119: 421-475, Parmiani et al. J Immunol. 2007 178:1975-9). 이러한 항원의 예들로서는 분화클러스터들(CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD12w, CD14, CD15, CD16, CDw17, CD18, CD21, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD31, CD32, CD34, CD35, CD36, CD37, CD41, CD42, CD43, CD44, CD45, CD46, CD47, CD48, CD49b, CD49c, CD53, CD54, CD55, CD58, CD59, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD68, CD69, CD71, CD72, CD79, CD81, CD82, CD83, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD95, CD96, CD100, CD103, CD105, CD106, CD109, CD117, CD120, CD127, CD133, CD134, CD135, CD138, CD141, CD142, CD143, CD144, CD147, CD151, CD152, CD154, CD156, CD158, CD163, CD166, .CD168, CD184, CDw186, CD195, CD202(a, b), CD209, CD235a, CD271, CD303, CD304), 어넥신 A1, 뉴클레올린, 엔도글린(CD105), ROB04, 아미노-캡티다아제 N, -유사-4(DLL4), VEGFR-2(CD309), CXCR4(CD184), Tie2, B7-H3, WT1, MUC1, LMP2, HPV E6 E7, EGFRvIII, HER-2/neu, 이디오타입, MAGE A3, p53 비돌연변이체, NY-ESO-1, GD2, CEA, MelanA/MART1, Ras 돌연변이체, gp100, p53 돌연변이체, 프로티나아제 3(PR1), bcr-abl, 티로시나아제, 서바이빈, hTERT, 육종 전좌 결합점 (translocation breakpoint), EphA2, PAP, ML-IAP, AFP, EpCAM, ERG(TMPRSS2 ETS 융합 유전자), NA17, PAX3, ALK, 안드로젠 수용체, 사이클린 B 1, 폴리시알산, MYCN, RhoC, TRP-2, GD3, 푸코실 GM1, 메소텔린, PSCA, MAGE A1, sLe(a), CYP1B I, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GloboH, ETV6-AML, NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, 탄산무수화효소 IX, PAX5, OY-TES1, 정자 단백질 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, 레규마인, Tie 2,



Page4, VEGFR2, MAD-CT-1, FAP, PDGFR- $\beta$ , MAD-CT-2 및 Fos-관련 항원 1을 포함한다.

[0090] 추가로 본 발명의 바람직한 결합 도메인으로서, 당 분야에 공지된, 감염 세포 연관 에피토프 표적 및 항원에 특이적인 것들을 포함한다. 이러한 표적들로서는 하기 관심 감염성 체제로부터 유래하는 것들을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다:

[0091] HIV 바이러스(구체적으로 HIV 외피 스파이크 유래 항원 및/또는 gp120 및 gp41 에피토프), 인유두종바이러스(HPV), 마이코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 스트렙토코커스 아가락티아에(*Streptococcus agalactiae*), 메티실린 내성 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 레지오넬라 뉴모필리아(*Legionella pneumophila*), 스트렙토코커스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*), 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 네이세리아 고노로에아(*Neisseria gonorrhoeae*), 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 뉴모코커스(*Pneumococcus*), 크립토코커스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 히스토플라스마 캡슐라툼(*Histoplasma capsulatum*), -인플루엔자 B, 트레포네마 팔리둠(*Treponema pallidum*), 라임병 스피로헤타, 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 마이코박테리움 레프라에(*Mycobacterium leprae*), 브루셀라 아보르투스(*Brucella abortus*), 공수병 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 거대세포바이러스, 헤르페스 심플렉스(herpes simplex) 바이러스 I, 헤르페스 심플렉스 바이러스 II, 인간 혈청 파르보 유사 바이러스, 호흡기세포융합 바이러스, 바리셀라-조스터(varicella-zoster) 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 홍역 바이러스, 아데노바이러스, 인간 T 세포 백혈병 바이러스, 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스, 마우스 백혈병 바이러스, 이하선염 바이러스, 수포성구내염 바이러스, 신드비스(sindbis) 바이러스, 림프구성 맥락수막염 바이러스, 사마귀 바이러스, 청설병 바이러스, 센다이(Sendai) 바이러스, 고양이 백혈병 바이러스, 레오바이러스, 소아마비 바이러스, 유인원 바이러스 40, 마우스 유방 종양 바이러스, 탕기얼 바이러스, 풍진 바이러스, 웨스트 나일(West Nile) 바이러스, 플라스모듐 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*), 플라스모듐 비벡스(*Plasmodium vivax*), 톡소플라스마 곤디이(*Toxoplasma gondii*), 트리파노소마 란겔리(*Trypanosoma rangeli*), 트리파노소마 크루지(*Trypanosoma cruzi*), 트리파노소마 로테시엔세이(*Trypanosoma rhodesiense*), 트리파노소마 브루세이(*Trypanosoma brucei*), 쉬스토소마 만소니(*Schistosoma mansoni*), 쉬스토소마 자포니쿰(*Schistosoma japonicum*), 바베시아 보비스(*Babesia bovis*), 엘메리아 테넬라(*Elmeria tenella*), 온코세르카 볼볼루스(*Onchocerca volvulus*), 레이슈마니아 트로피카(*Leishmania tropica*), 트리키넬라 스피칼리스(*Trichinella spiralis*), 테일레리아 파르바(*Theileria parva*), 타에니아 히단티게나(*Taenia hydatigena*), 타에니아 오비스(*Taenia ovis*), 타에니아 사기나타(*Taenia saginata*), 에키노코커스 그래눌로서스(*Echinococcus granulosus*), 메소세스토이데스 코르티(*Mesocestoides corti*), 마이코플라스마 아르트리티디스(*Mycoplasma arthritidis*), 엠.하이오리니스(*M. hyorhinis*), 엠.오랄레(*M. orale*), 엠.아르기니네(*M. arginine*), 아콜레플라스마 라이드로이(*Acholeplasma laidlawii*), 엠. 살리바리움(*M. salivarium*) 및 엠. 뉴모니아에(*M. pneumoniae*).

[0093] \*다른 구현예들에서, 결합 도메인은 면역 관문 분자 또는 이의 리간드에 특이적으로서, 면역 관문 억제 활성의 억제제 또는 면역 관문 자극 활성의 효현제로서 작용을 한다. 이러한 면역 관문 분자 및 리간드로서는 PD1, PDL1, PDL2, CTLA4, CD28, CD80, CD86, B7-H3, B7-H4, B7-H5, ICOS-L, ICOS, BTLA, CD137L, CD137, HVEM, KIR, 4-1BB, OX40L, CD70, CD27, OX40, GITR, IDO, TIM3, GAL9, VISTA, CD155, TIGIT, LIGHT, LAIR-1, Siglecs 및 A2aR를 포함한다(Pardoll DM. 2012. Nature Rev Cancer 12:252-264, Thaventhiran T, et al. 2012. J Clin Cell Immunol S12:004). 뿐만 아니라, 본 발명의 바람직한 항체 도메인은 이필리무맙 및 트레멜리무맙(항 CTLA4), 니볼루맙, 펌브롤리주맙, 피디리주맙, TSR-042, ANB011, AMP-514 및 AMP-224(리간드-Fc 융합)(항 PD1), MPDL3280A, MEDI4736, MEDI0680 및 BMS-9365569(항 PDL1), MEDI6469(항 OX40 효현제), BMS-986016, IMP701, IMP731 및 IMP321(항 LAG3)을 포함할 수 있다.

[0094] T 세포 수용체(TCR)

[0095] T 세포는 기타 면역 세포 유형들(다형핵 세포, 호산구, 호염기구, 비만 세포, B 세포, NK 세포)과 함께 면역계의 세포성 성분을 이루는 세포의 하위군이다. 생리적 조건하에서 T 세포는 면역 감시와 외래 항원 제거의 역할을 담당한다. 그러나 병리학적 조건하에서는 T 세포가 질환의 유발과 확산에 중요한 역할을 한다는 강력한 증거가 있다. 이러한 장애에 있어서, T 세포 면역 관용성의 파괴는, 그것이 중심적인 것인지 아니면 주변적인 것인지간에 자가면역성 질환의 유발에 있어 근본적인 과정인 것이다.

[0096] TCR 복합체는, 적어도 7개의 경막 단백질로 이루어져 있다. 이항화 결합된 ( $\alpha\beta$  또는  $\gamma\delta$ ) 이종이량체는 단형속

항원 인지 단위를 형성하는 한편, e, g, d, z 및 h 사슬들로 이루어져 있는 CD3의 불변 사슬은 신호전달 경로에 리간드 결합을 연계하여, T 세포 활성화와 세포성 면역반응을 도모하는데 관여한다. TCR 사슬의 유전자 다양성에도 불구하고, 공지된 TCR 사슬의 모든 서브유닛들에는 2가지 구조적 특징이 공통으로 존재한다. 첫 번째 구조적 특징은 이 TCR 사슬이 (아마도 알파-나선형일) 경막 확장성 도메인 하나를 가지는 경막 단백질이라는 점이다. 두 번째 구조적 특징은, 모든 TCR 사슬들은 예측 경막 도메인 내에 하전된 아미노산을 가지는 것과 같은 일반적인이지 않은 특징을 가진다는 점이다. 불변 사슬은 하나의 음전하를 가지고, 마우스와 인간 간에 보존되어 있으며, 가변 사슬은 하나의 양전하를 가지거나(TCR-b) 또는 2개의 양전하를 가진다(TCR-a). TCR-a의 경막 서열은 다수의 종들간에 매우 보존적이어서, 계통발생상 중요한 기능상의 역할을 담당할 수 있다. 친수성 아미노산 아르기닌과 리신을 함유하는 옥타펩티드 서열은 종들 간에 동일하다.

[0097] T 세포 반응은 TCR에의 항원 결합에 의해 조정된다. TCR의 일 유형은, 면역글로불린 가변 영역(V) 및 불변 영역(C)을 닮은, a 사슬 및 b 사슬로 이루어진 막 결합 이중이량체이다. TCR a 사슬은 공유 결합된 V-a 사슬 및 C-a 사슬을 포함하는 한편, TCR b 사슬은 C-b 사슬에 공유 결합된 V-b 사슬을 포함한다. V-a 사슬 및 V-b 사슬은 주조직적합성 복합체(MHC)(인간의 경우에는 HLA 복합체로 알려짐)의 환경 중 항원 또는 초항원과 결합할 수 있는 포켓 또는 틈을 형성한다. 문헌(Davis Ann. Rev. of Immunology 3: 537(1985); *Fundamental Immunology* 3rd Ed., W. Paul Ed. Rsen Press LTD. New York(1993))을 참조한다.

[0098] TCR 사슬(ab 또는  $\gamma \delta$ )의 세포의 도메인은 또한 세포 표면상 발현을 위해 이중 경막 도메인과의 융합체로서 조작될 수 있다. 이러한 TCR은 CD3, CD28, CD8, 4-1BB 및/또는 키메라 활성화 수용체(CAR) 경막 도메인 또는 활성화 도메인과의 융합체를 포함할 수 있다. TCR은 또한 ab 또는  $\gamma \delta$  사슬의 항원 결합 도메인들 중 하나 이상을 포함하는 가용성 단백질일 수 있다. 이러한 TCR은 TCR 불변 도메인들과 결합되어 있거나 결합되어 있지 않은 TCR 가변 도메인 또는 이의 기능성 단편을 포함할 수 있다. 가용성 TCR은 이중이량체이거나 단일 사슬 분자일 수 있다.

[0099] Fc 도메인

[0100] 본 발명의 단백질 복합체는 Fc 도메인을 함유할 수 있다. 예를 들어 2B8T3M은 항 CD3 scAb/huIL-15N72D:항 CD20 scAb/huIL-15R $\alpha$  Su/huIgG1 Fc 융합 복합체를 포함한다. IgG의 Fc 영역과, 또 다른 단백질(예컨대 다양한 시토카인)의 도메인 및 가용성 수용체를 합한 융합 단백질이 보고된 바 있다(예컨대 문헌(Capon et al., Nature, 337:525-531, 1989; Chamow et al., Trends Biotechnol., 14:52-60, 1996); 미국특허 제5,116,964호 및 동 제5,541,087호) 참조). 원형 융합 단백질은 IgG Fc의 힌지 영역 내 시스테인 잔기들을 통해 결합되어, 중쇄 가변 도메인과 C $\mu$ 1 도메인, 그리고 경쇄를 포함하지 않는, IgG 분자와 유사한 분자를 이루는 동종이량체 단백질이다. Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질의 이량체로서의 성질은, 다른 분자와의 고차원적 상호작용(즉 2가 또는 이중 특이적 결합)을 제공함에 있어서 유리할 수 있다. 구조상의 상동성으로 말미암아, Fc 융합 단백질은, 유사한 이소타입을 보이는 인간 IgG의 생체 내 약동학적 프로파일과 거의 동일한 생체 내 약동학적 프로파일을 보인다. IgG군의 면역글로불린은 인간 혈액에 가장 많이 존재하는 단백질로서, 이의 혈행 반감기(circulation half-life)는 21일까지에 이를 수 있다. IL-15 또는 IL-15 융합 단백질의 혈행 반감기를 연장시키고/연장시키거나 이의 생물 활성을 증가시키기 위한, 인간 중쇄 IgG 단백질의 Fc부에 공유 결합된 IL-15R $\alpha$ 와 비공유 결합하고 있는 IL-15 도메인을 함유하는, 융합 단백질복합체가 본원에 기술되어 있다(예컨대 2B8T3M).

[0101] "Fc"란 용어는, Fc 수용체와 칭하여지는 세포 표면 수용체와, 보체계의 몇몇 단백질과 상호작용하는 항체의 불변부인 결정화가능 단편 영역(fragment crystallizable region)을 지칭한다. 이러한 "Fc"는 이량체 형태를 가진다. 원산 Fc의 원천 면역글로불린 공급원은, 바람직하게 인간 기원 면역글로불린 중 임의의 것일 수 있지만, IgG1 및 IgG2가 바람직하다. 원산 Fc들은 공유 결합(즉 이황화 결합)과 비공유 결합에 의해 이량체 형태 또는 다량체 형태로 결합될 수 있는, 단량체 폴리펩티드들로 이루어져 있다. 원산 Fc 분자들의 단량체 서브유닛들 사이의 분자간 이황화 결합의 수는, 군(예컨대 IgG, IgA, IgE) 또는 하위군(예컨대 IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgA2)에 따라서 1개 내지 4개의 범위이다. 원산 Fc의 일례로서는 IgG의 파페인 분해에 의해 생성되는 이황화 결합 이량체가 있다(문헌(Ellison et al.(1982), Nucleic Acids Res. 10: 4071-9) 참조). 본원에 사용된 바와 같은 "원산 Fc"란 용어는, 단량체 형태, 이량체 형태 및 다량체 형태를 총칭하는 것이다. Fc 도메인은 단백질 A, 단백질 G, 다양한 Fc 수용체 및 보체 단백질에 대한 결합 부위들을 함유한다. 몇몇 구현예들에서 복합체의 Fc 도메인은 Fc 수용체와 상호작용하여, 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC) 및/또는 항체 의존적 세포성 식세포작용(ADCP)을 매개할 수 있다. 다른 응용예에서, 복합체는 ADCC 또는 ADCP를 효과적으로 매개할 수 없는 Fc 도메인(예컨대 IgG4 Fc)을 포함한다.

- [0102] 몇몇 구현예들에서, "Fc 변이체"란 용어는, 원산 Fc로부터 변형되었지만, 구조 수용체(salvage receptor), 즉 FcRn에 대한 결합 부위를 여전히 포함하는 분자 또는 서열을 지칭한다. 국제특허출원공보 WO 97/34631 및 WO 96/32478는, 예시적 Fc 변이체뿐만 아니라, 구조 수용체와의 상호작용을 기술하고 있으며, 이 문헌들은 본원에 참조로 인용되어 있다. 그러므로 "Fc 변이체"란 용어는, 비인간 원산 Fc로부터 유래하여 인간화된 분자 또는 서열을 포함한다. 게다가 원산 Fc는, 본 발명의 융합 분자에 불필요한 구조적 특징 또는 생물 활성을 제공함으로써 말미암아 제거될 수 있는 부위들을 포함한다. 그러므로 임의의 구현예들에서, "Fc 변이체"란 용어는, (1) 이황화 결합 형성, (2) 선택된 숙주 세포와의 양립불가능, (3) 선택된 숙주 세포 내 발현시 N-말단의 이질성, (4) 당화, (5) 보체와의 상호작용, (6) 구조 수용체 이외의 Fc 수용체와의 결합, (7) 항체 의존적 세포성 세포독성(ADCC) 또는 (8) 항체 의존적 세포성 식세포작용(ADCP)에 영향을 미치거나 이에 수반되는 하나 이상의 원산 Fc 부위들 또는 잔기들이 변경된, 분자 또는 서열을 포함한다. 이러한 변경은 이와 같은 Fc의 특성들 중 임의의 것 하나 이상을 증가시킬 수 있거나 감소시킬 수 있다. Fc 변이체는 이하에 더욱 상세히 기술되어 있다.
- [0103] "Fc 도메인"이란 용어는, 상기 정의된 바와 같이 원산 Fc 및 Fc 변이체 분자들 및 서열들을 포함한다. Fc 변이체 및 원산 Fc와 같이, "Fc 도메인"이란 용어는, 그것이 전 항체로부터 분해되었건, 아니면 재조합 유전자 발현 또는 기타 수단에 의해 생산되었건 간에 단량체 형태 또는 다량체 형태의 분자들을 포함한다.
- [0104] 융합 단백질 복합체
- [0105] 본 발명은 융합 단백질 복합체를 제공한다(도 1). 몇몇 경우들에 있어서, 제1 융합 단백질은, 인터루킨-15(IL-15) 또는 이의 기능성 단편에 공유 결합되는 제1 생물 활성 폴리펩티드를 포함하고; 제2 융합 단백질은 가용성 인터루킨-15 수용체 알파(IL-15Ra) 폴리펩티드 또는 이의 기능성 단편에 공유 결합되는 제2의 생물 활성 폴리펩티드를 포함하는데, 여기서 제1 융합 단백질의 IL-15 도메인은 제2 융합 단백질의 가용성 IL-15Ra 도메인과 결합하여, 가용성 융합 단백질 복합체를 형성한다. 본 발명의 융합 단백질 복합체는 또한 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질 중 어느 하나 또는 둘다에 결합된 면역글로불린 Fc 도메인 또는 이의 기능성 단편을 포함한다. 바람직하게 융합 단백질에 결합된 Fc 도메인들은 상호작용하여 융합 단백질 복합체를 형성한다. 이러한 복합체는 면역글로불린 Fc 도메인들 간에 이황화 결합을 형성함으로써 안정화될 수 있다. 일 양태에서, 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체는 IL-15 폴리펩티드, IL-15 변이체 또는 이의 기능성 단편과, 가용성 IL-15Ra 폴리펩티드 또는 이의 기능성 단편을 포함하는데, 여기서 IL-15 폴리펩티드 및 IL-15Ra 폴리펩티드 중 어느 하나 또는 둘다는 면역글로불린 Fc 도메인 또는 이의 기능성 단편을 추가로 포함한다.
- [0106] 임의의 예들에서, 제1 및 제2 생물 활성 폴리펩티드 중 어느 하나 또는 둘 다는 항체 또는 이의 기능성 단편을 포함한다. 예를 들어 생물 활성 폴리펩티드들 중 하나는 제1 가용성 항 CD3 단일 사슬 항체 또는 이의 기능성 단편을 포함한다. 다른 예에 있어서, 또 다른 생물 활성 폴리펩티드 또는 제2의 생물 활성 폴리펩티드는 질환 항원 특이적 항체 또는 이의 기능성 단편을 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명은 가용성 항 CD3 scAb/huIL-15N72D: 항 CD20 scAb/huIL-15Ra Su/huIgG1 Fc 융합 단백질 복합체를 포함하는 2B8T3M을 제공한다. 이 복합체에서 huIL-15N72D 도메인 및 huIL-15Ra Su 도메인은 상호작용하고, 2개의 항 CD20 scAb/huIL-15Ra Su/huIgG1 Fc 융합 단백질상 huIgG1 Fc 도메인은 다중 사슬 융합 단백질 복합체를 형성한다(예를 들어 도 2 참조).
- [0107] 본원에 사용된 바와 같은 "생물 활성 폴리펩티드" 또는 "효과기 분자"란 용어는, 본원에 논의된 바와 같이 원하는 효과를 발휘할 수 있는 아미노산 서열, 예컨대 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드; 당체 또는 다당체; 지질 또는 당지질, 당단백질 또는 지단백질을 의미한다. 효과기 분자는 또한 화학 제제를 포함한다. 생물 활성 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드나, 또는 효과기 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드를 암호화하는 효과기 분자 핵산도 또한 고려된다. 그러므로 적합한 분자로서는 조절 인자, 효소, 항체 또는 약물뿐만 아니라, DNA, RNA 및 올리고뉴클레오타이드도 포함한다. 생물 활성 폴리펩티드 또는 효과기 분자는 자연 발생될 수 있거나, 또는, 예컨대 재조합 또는 화학 합성법에 의해 공지의 성분으로부터 합성될 수 있으며, 이중 성분을 포함할 수 있다. 생물 활성 폴리펩티드 또는 효과기 분자는, 일반적으로 표준 분자 크기분석 기술, 예컨대 원심분리나 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 판단되는 바에 따라 약 0.1 내지 100 KD 또는 이 이상으로부터 약 1000 KD까지일 수 있으며, 바람직하게는 약 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30 내지 50 KD일 수 있다. 본 발명의 원하는 효과로서는, 예를 들어 결합 활성이 증가한 본 발명의 융합 단백질 복합체의 형성, 예컨대 세포 증식 또는 세포 사멸을 유도하기 위한 표적 세포의 사멸, 면역 반응의 개시, 질환의 예방 또는 치료, 또는 진단을 목적으로 하는 검출 분자로서의 기능을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 검출을 위하여, 일련의 단계들을 포함하는 검정법, 예를 들어 세포를 증식시키기 위해 이 세포를 배양하는 단계와, 세포와 본 발명의 융합 복합체를 접촉시키는 단계, 그리고 이후 융합 복합체가 세포의 추후 발달을 억제하는지 여부를 평가하는 단계를 포함하는 검



정법이 사용될 수 있었다.

- [0108] 본 발명에 따라 효과기 분자를 본 발명의 융합 단백질 복합체에 공유 결합시키는 것은, 다수의 유의미한 이점을 제공한다. 하나의 효과기 분자, 예컨대 공지의 구조를 가지는 펩티드를 함유하는 본 발명의 융합 단백질 복합체가 제조될 수 있다. 추가로 다양한 효과기 분자가 유사한 DNA 벡터들에서 제조될 수 있다. 다시 말해, 상이한 효과기 분자 라이브러리는 감염 세포 또는 발병 세포의 인지를 위하여 융합 단백질 복합체에 결합될 수 있다. 또한, 치료적 응용을 위해서는, 본 발명의 융합 단백질 복합체를 대상체에 투여하기보다, 이 융합 단백질 복합체를 암호화하는 DNA 발현 벡터를 투여하여 융합 단백질 복합체를 생체 내 발현시킬 수 있다. 이러한 접근법은, 통상적으로 재조합 단백질 제조와 관련된 고비용의 정제 단계들을 수행하지 않고, 항원 흡수의 복잡성을 초래하지 않으며, 종래 접근법과 연관된 처리를 수행하지 않게 해준다.
- [0109] 지적된 바와 같이, 본원에 개시된 융합 단백질의 성분들, 예를 들어 효과기 분자, 예컨대 시토카인, 케모카인, 성장 인자, 단백질 독소, 면역글로불린 도메인 또는 기타 생물활성 분자와, 임의의 펩티드 링커는 거의 모든 방식으로 조직될 수 있되, 다만, 융합 단백질은 의도되었던 기능을 가진다. 구체적으로 융합 단백질의 각 성분은, 원한다면 다른 성분과 적어도 하나의 적합한 펩티드링커 서열에 의해 이격될 수 있다. 뿐만 아니라 융합 단백질은, 예컨대 융합 단백질의 변형, 동정 및/또는 정제를 가속화하기 위한 태그를 포함할 수 있다. 더욱 구체적인 융합 단백질은 이하 기술된 실시예에 제시되어 있다.
- [0110] 링커
- [0111] 본 발명의 융합 단백질은 또한, 바람직하게 IL-15 또는 IL-15Ra 도메인들과 생물 활성 폴리펩티드 사이에 놓인 가요성 링커 서열을 포함하기도 한다. 링커 서열은 IL-15 또는 IL-15Ra 도메인들에 대하여 생물 활성 폴리펩티드를 효과적으로 배치하는 것을 허용함으로써, 상기 두 도메인의 기능상의 활성이 발휘될 수 있도록 만들어야 한다.
- [0112] 임의의 경우들에 있어서, 가용성 융합 단백질 복합체는 링커를 가지는데, 이때 제1 생물 활성 폴리펩티드는 폴리펩티드 링커 서열에 의하여 IL-15(또는 이의 기능성 단편)에 공유 결합된다. 다른 양태들에서, 본원에 기술된 바와 같은 가용성 융합 단백질 복합체는 링커를 가지는데, 이때 제2 생물 활성 폴리펩티드는 폴리펩티드 링커 서열에 의하여 IL-15Ra 폴리펩티드(또는 이의 기능성 단편)에 공유 결합된다.
- [0113] 링커 서열은, 바람직하게 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되고, 그로 말미암아 항원을 인지하기 위한 항체 분자의 결합 도메인 또는 제시되는 항원을 인지하기 위한 TCR 분자의 결합 홈(binding groove)을 효과적으로 배치할 수 있는 펩티드가 생성된다. 본원에 사용된 바와 같이 "IL-15 또는 IL-15Ra 도메인에 대하여 생물 활성 폴리펩티드를 효과적으로 배치하는 것"이란 어구 또는 기타 유사한 어구는, IL-15 또는 IL-15Ra 도메인에 결합된 생물 활성 폴리펩티드가, IL-15 또는 IL-15Ra 도메인이 서로간에 상호작용을 하여 단백질 복합체를 형성할 수 있도록 배치되는 것을 의미한다. 예를 들어 IL-15 또는 IL-15Ra 도메인은, 면역 세포와의 상호작용이 면역 반응을 개시 또는 억제하거나, 세포의 발달을 억제 또는 자극하는 것을 허용하도록 효과적으로 배치된다.
- [0114] 본 발명의 융합 복합체는 또한, 바람직하게 IL-15 또는 IL-15Ra 도메인들과 면역글로불린 Fc 도메인 사이에 놓인 가요성 링커 서열을 포함한다. 링커 서열은 Fc 도메인, 생물 활성 폴리펩티드 및 IL-15 또는 IL-15Ra 도메인들의 효과적 배치를 허용함으로써, 각각의 도메인의 기능상 활성을 발휘시킬 수 있어야 한다. 예를 들어 Fc 도메인은 적절한 융합 단백질 복합체의 형성을 허용하고/허용하거나 면역 세포상 Fc 수용체 또는 보체계의 단백질과의 상호작용을 허용하여 옵소닌화, 세포 용해, 비만 세포, 호염기구 및 호산구의 탈과립화와, 기타 Fc 의존적 과정; 보체 경로의 활성화; 및 융합 단백질 복합체의 생체 내 반감기 연장을 자극하도록 효과적으로 배치된다.
- [0115] 링커 서열은 또한 생물 활성 폴리펩티드의 폴리펩티드 2개 이상을 결합시켜, 원하는 기능상 활성을 가지는 단일 사슬 분자를 제조하는데 사용될 수 있다.
- [0116] 바람직하게 링커 서열은 약 7개 아미노산 내지 약 20개 아미노산, 더욱 바람직하게 약 10개 아미노산 내지 약 20개 아미노산을 포함한다. 링커 서열은 생물 활성 폴리펩티드 또는 효과기 분자가 하나의 원치않는 형상으로 고정되지 않도록 가요성인 것이 바람직하다. 링커 서열은, 예를 들어 융합된 분자로부터 인지 부위를 이격시키는데 사용될 수 있다. 구체적으로 펩티드 링커 서열은 생물 활성 폴리펩티드와 효과기 분자 사이에 배치되어, 예컨대 이 생물 활성 폴리펩티드와 효과기 분자를 화학적으로 가교시키고, 분자 가요성을 제공할 수 있다. 링커는 가요성을 제공하기 위해, 바람직하게 주로 소형 측쇄를 가지는 아미노산, 예컨대 글리신, 알라닌 및 세린을 포함한다. 바람직하게 링커 서열 약 80% 또는 약 90%, 또는 이 이상은 글리신, 알라닌 또는 세린 잔기를 포함하며, 특히 글리신 및 세린 잔기를 포함한다.

- [0117] 항체의 가변 영역들을 하나로 성공적으로 결합시키는데 사용되었던 다수의 가요성 링커 디자인들 중 임의의 것을 비롯한 상이한 링커 서열이 사용될 수 있었다(문헌(Whitlow, M. et al.,(1991) Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 2:97-105) 참조).
- [0118] 약학 치료제
- [0119] 본 발명은 치료제로서 사용되기 위한 융합 단백질 복합체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 일 양태에서, 본 발명의 융합 단백질 복합체는, 예를 들어 약학적으로 허용 가능한 완충제, 예컨대 생리 식염수 중에 제제화되어 전신 투여된다. 환자에 본 조성물 유효 수준만큼을 연속적이면서도 지속적으로 제공하는데 바람직한 투여 경로로서는, 예를 들어 방광에의 점적 주입, 피하, 정맥내, 복막내, 근육내, 종양내 또는 피내 주사를 포함한다. 인간 환자 또는 기타 동물의 치료는, 생리적으로 허용 가능한 담체 중 본원에 동정된 치료제 치료적 유효량이 사용되어 수행된다. 적합한 담체 및 이의 제제는, 예를 들어 문헌(Remington's Pharmaceutical Sciences by E. W. Martin)에 기술되어 있다. 투여될 치료제의 양은, 투여 방식, 환자의 나이와 체중, 그리고 신생물형성의 임상 증상에 따라서 달라진다. 일반적으로 그 양은, 신생물형성, 자가면역성 질환 또는 감염성 질환과 연관된 기타 질환의 치료에 사용되는 기타 제제에 적용되는 양의 범위일 것이지만, 임의의 경우 화합물의 증가한 특이성으로 말미암아 그보다 더 적은 양이 필요할 것이다. 화합물은, 당 업자에게 공지된 방법에 의해 측정되는 바에 따르면, 대상체의 면역 반응을 증진시키거나, 신생물형성, 감염 또는 자가면역 세포의 증식, 생존 또는 침습을 감소시키는 투여량으로 투여된다.
- [0120] 약학 조성물의 제제화
- [0121] 신생물형성, 감염성 질환 또는 자가면역성 질환을 치료하기 위한 본 발명의 융합 단백질 복합체의 투여는, 다른 성분들과 합하여졌을 때 상기 신생물형성, 감염성 질환 또는 자가면역성 질환을 완화, 감소 또는 안정화하기 효과적인 치료제 농도를 달성하는데 적합한 임의의 방법에 의해 이루어진다. 본 발명의 융합 단백질 복합체는 임의의 적당량만큼 임의의 적합한 담체 물질 중에 용해되어 함유될 수 있는데, 일반적으로는 본 조성물 총 중량을 기준으로 1 중량% 내지 95 중량%의 양만큼 존재한다. 본 조성물은 비경구 투여 경로(예컨대 피하, 정맥내, 근육내, 방광내, 종양내 또는 복막내 투여 경로)에 적합한 투여형으로 제공될 수 있다. 예를 들어 본 약학 조성물은 종래의 약학 실무에 따라 제제화된다(예를 들어 문헌(Remington: The Science and Practice of Pharmacy(20th ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 and Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York) 참조).
- [0122] 인간에의 투여량은 숙련자가, 동물 모델에 대한 투여량에 비준하여 인간에 대한 투여량을 맞추는 것이 통상적인 일이라 당 분야에서 인지하는 바와 같이, 처음에 마우스나 인간 이외의 영장류에 적용되었던 화합물 양으로부터 외삽함으로써 결정된다. 예를 들어 투여량은 체중 1 kg당 화합물 약 1 mg 내지 체중 1 kg당 화합물 약 5000 mg; 또는 체중 1 kg당 화합물 약 5 mg 내지 체중 1 kg당 화합물 약 4000 mg; 또는 체중 1 kg당 화합물 약 10 mg 내지 체중 1 kg당 화합물 약 3000 mg; 또는 체중 1 kg당 화합물 약 50 mg 내지 체중 1 kg당 화합물 약 2000 mg; 또는 체중 1 kg당 화합물 약 100 mg 내지 체중 1 kg당 화합물 약 1000 mg; 또는 체중 1 kg당 화합물 약 150 mg 내지 체중 1 kg당 화합물 약 500 mg으로 다양할 수 있다. 예를 들어 용량은 체중 1 kg당 약 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1,000, 1,050, 1,100, 1,150, 1,200, 1,250, 1,300, 1,350, 1,400, 1,450, 1,500, 1,600, 1,700, 1,800, 1,900, 2,000, 2,500, 3,000, 3,500, 4,000, 4,500 또는 5,000 mg이다. 대안적으로, 용량은 체중 1 kg당 화합물 약 5 mg 내지 체중 1 kg당 화합물 약 200 mg의 범위에 있다. 다른 예에서, 용량은 체중 1 kg당 약 8, 10, 12, 14, 16 또는 18 mg이다. 바람직하게 2B8T3M은 0.5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg(예컨대 0.5, 1, 3, 5, 10 mg/kg)으로 투여된다. 물론 상기 투여량은, 이러한 치료 프로토콜에서 통상적으로 행하여지는 바와 같이 초기 임상 시험 결과와 특정 환자의 필요에 따라 상향 또는 하향 조정될 수 있다.
- [0123] 약학 조성물은 적당량 부형제와 함께 투여시 제어되는 방식으로 치료제를 방출하는 약학 조성물로 제제화된다. 그 예로서는 단일 또는 다수 단위 정제 또는 캡슐 조성물, 오일 용액, 현탁액, 에멀전, 마이크로캡슐, 미소구, 분자 복합체, 나노입자, 패치 및 리포솜을 포함한다. 바람직하게 2B8T3M은 비경구 투여에 적합한 부형제 중에 제제화된다.
- [0124] 비경구 조성물
- [0125] 본 발명의 융합 단백질 복합체를 포함하는 약학 조성물은 투여형, 제제로서 주사, 주입 또는 이식(피하, 정맥내, 근육내, 종양내, 방광내, 복막내)에 의해 비경구 투여되거나, 또는 종래의 약학적으로 허용 가능한 무

독성 담체 및 보조제를 함유하는 적합한 전달 장치나 이식물을 통하여 비경구 투여된다. 이러한 조성물의 제제 및 제조물은 약학 제제 분야의 숙련자들에게 널리 공지되어 있다. 제제에 관하여는 문헌(Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 상동)에서 살펴볼 수 있다.

[0126] 본 발명의 융합 단백질 복합체를 포함하는 비경구 투여용 조성물은 단위 투여형(예컨대 단일 용량 앰플)으로 제공된다. 대안적으로 본 조성물은 수 회의 용량이 담겨 있으며, 적합한 보존제가 첨가될 수 있는 바이알로서 제공된다(하기 참조). 본 조성물은 용액, 현탁액, 에멀전, 주입 장치 또는 이식용 전달 장치의 형태를 가지거나, 또는 사용 전 물이나 다른 적합한 비이클로 재구성될 건조 분말로서 제공된다. 신생물형성, 감염성 질환 또는 자가면역성 질환을 감소 또는 완화하는 활성 제제와는 별도로, 본 조성물은 비경구 투여가 허용되는 적합한 담체 및/또는 부형제를 포함한다. 활성 치료제(들)는 제어 방출을 위해 미소구, 마이크로캡슐, 나노입자, 리포솜에 혼입될 수 있다. 더욱이 본 조성물은 현탁제, 가용화제, 안정화제, pH 조정제, 긴장성 조정제 및/또는 분산제를 포함할 수 있다.

[0127] 상기 명시된 바와 같이, 본 발명의 융합 단백질 복합체를 포함하는 약학 조성물은 멸균 주사에 적합한 형태를 가질 수 있다. 이러한 조성물을 제조하기 위하여, 적합한 활성 치료제(들)가 비경구 투여가 허용되는 액체 비이클로 용해 또는 현탁된다. 사용될 수 있는 허용 가능 비이클 및 용매로서는 물이 있는데, 이 물의 pH는 적당량의 염화수소산, 수산화나트륨 또는 적합한 완충제, 1,3-부탄디올, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액 및 텍스트로스 용액을 첨가함으로써 적합하게 조정된다. 수성 제제는 또한 보존제(예컨대 메틸, 에틸 또는 n-프로필 p-하이드록시벤조에이트) 하나 이상을 함유할 수 있다. 화합물들 중 하나가 물에 거의 녹지 않거나 약간만 녹는 경우, 용해촉진제 또는 가용화제가 첨가될 수 있거나, 아니면 용매는 프로필렌글리콜을 10 %w/w 내지 60 %w/w 포함할 수 있다.

[0128] 본 발명은 신생물형성, 감염성 질환 또는 자가면역성 질환이나 이의 증상들을 치료하는 방법으로서, 본원의 화학식을 가지는 화합물을 포함하는 약학 조성물 치료적 유효량만큼을 대상체(예컨대 포유동물, 예컨대 인간)에 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 그러므로 일 구현에는, 신생물형성, 감염성 질환 또는 자가면역성 질환이나 이의 증상들을 앓고 있거나 이에 취약한 대상체를 치료하는 방법이다. 이 방법은 질환 또는 장애가 치료되는 조건하에 해당 질환 또는 장애 또는 이의 증상들을 치료하기 충분한, 본원의 화합물 치료량만큼을 포유동물에 투여하는 단계를 포함한다.

[0129] 본원의 방법은, 본원에 기술된 화합물 또는 본원에 기술된 조성물 유효량을 대상체(상기와 같은 치료를 필요로 하는 것으로 확인된 대상체 포함)에 투여하여 상기와 같은 효과를 얻는 단계를 포함한다. 상기와 같은 치료를 필요로 하는 대상체를 확인하는 것은, 대상체 또는 건강 관리 전문가의 판단에 의할 수 있으므로, 주관적일 수 있거나(예컨대 의견에 의할 수 있거나) 또는 객관적일 수 있다(예컨대 시험 또는 진단 방법에 의해 확인될 수 있다).

[0130] (예방적 치료를 포함하여) 본 발명의 치료 방법은, 일반적으로 본원의 화합물, 예컨대 본원의 화학식을 가지는 화합물 치료적 유효량을, 포유동물, 구체적으로 인간을 포함하여 치료를 필요로 하는 대상체(예컨대 동물, 인간)에 투여하는 단계를 포함한다. 이러한 치료는 신생물형성, 감염성 질환, 자가면역성 질환, 장애 또는 이의 증상들을 앓고 있거나, 발병하였거나, 취약하거나 또는 발병 위험이 있는 대상체, 구체적으로는 인간에게 적합하게 수행될 것이다. 이처럼 "발병 위험이 있는" 대상체인지의 결정은 진단 시험이나, 대상체 또는 건강 관리 제공자의 의견에 따라(예컨대 유전자 시험, 효소 또는 단백질 마커, (본원에 정의된 바와 같은) "마커(Marker)" 및 가족력 등에 따라) 임의의 객관적 결정 또는 주관적 결정에 의해 이루어질 수 있다. 본 발명의 융합 단백질 복합체는 면역 반응의 증가가 요망되는 기타 임의의 장애를 치료하는데 사용될 수 있다.

[0131] 본 발명은 또한 치료 과정을 모니터링하는 방법도 제공한다. 이 방법은, 본원의 화합물이 어떤 질환 또는 이의 증상을 치료하는데 충분한 치료량만큼 투여된 대상체로서, 신생물형성과 연관된 해당 질환 또는 이의 증상을 앓고 있거나 이에 취약한 대상체를 대상으로, 진단 마커("마커")(예컨대 본원의 화합물, 단백질 또는 이의 지표 등에 의해 조정되는, 본원에 기술된 임의의 표적)의 수준을 측정하는 단계, 또는 진단을 위한 측정 단계(예컨대 스크리닝, 검정)를 포함한다. 본 방법에서 측정된 "마커"의 수준은, 건강한 정상 대조군 또는 다른 발병 환자에 대해 공지된 "마커"수준과 비교될 수 있으며, 이로써 대상체의 질환 상태가 확립될 수 있다. 몇몇 경우들에 있어서, 대상체 내 "마커"의 2차 수준은 1차 수준의 측정 시점보다 나중의 시점에 측정되고, 이 두 가지 수준이 비교되어, 해당 질환의 경과와 치료법의 효능이 모니터링된다. 임의의 양태들에서, 대상체 내 "마커"의 치료전 수준은, 본 발명에 따른 치료를 시작하기 전에 측정되고; 추후 "마커"의 이 같은 치료전 수준은 치료 개시후 대상체 내 "마커" 수준과 비교될 수 있으며, 그 결과 치료의 효능이 확인될 수 있다.

- [0132] **병행 치료법**
- [0133] 선택적으로 본 발명의 융합 단백질 복합체는 기타 임의의 표준 치료법이 수행됨과 아울러 투여되는데; 이러한 방법은 당 업자에게 공지된 방법으로서, 문헌(Remington's Pharmaceutical Sciences by E. W. Martin)에 기술되어 있다. 원한다면 본 발명의 융합 단백질 복합체는 종래의 임의 항신생물형성 치료법, 예컨대 면역요법, 치료 항체 투여, 표적 치료법, 수술, 방사선 요법 또는 화학 요법(이에 한정되는 것은 아님)이 수행됨과 아울러 투여된다.
- [0134] **키트 또는 약학 시스템**
- [0135] 본 발명의 융합 단백질 복합체를 포함하는 약학 조성물은, 신생물형성, 감염성 질환 또는 자가면역성 질환을 완화하는데 사용되기 위한 키트나 약학 시스템에 통합될 수 있다. 본 발명의 이러한 양태에 따른 키트 또는 약학 시스템은 내부에 하나 이상의 용기 수단, 예컨대 바이알, 튜브, 앰플 및 병 등이 뿔뿔하게 담겨있는 운반 수단, 예컨대 박스, 갑, 튜브를 포함한다. 본 발명의 키트나 약학 시스템은 본 발명의 융합 단백질 복합체 사용에 관련된 지침을 하나의 구성품으로서 포함할 수 있다.
- [0136] **재조합 단백질 발현**
- [0137] 일반적으로 본 발명의 융합 단백질 복합체(예컨대 2B8T3M의 성분들)의 제조는 본원에 개시된 방법과, 인지된 재조합 DNA 기술에 의해 달성될 수 있다.
- [0138] 일반적으로 재조합 폴리펩티드는 적합한 숙주 세포를, 폴리펩티드 암호화 핵산 분자 또는 이의 단편 전부 또는 일부를 포함하는 적합한 발현 비이클로 형질전환시킴으로써 제조된다. 분자생물학 분야의 숙련자들은, 다양한 발현계들 중 임의의 것이 재조합 단백질을 제공하는데 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 사용된 숙주 세포가 정확히 무엇인지는 본 발명에 있어서 중요하지 않다. 재조합 폴리펩티드는 실질적으로 임의의 진핵생물 숙주(예컨대 사카로마이세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 곤충 세포, 예컨대 Sf21 세포, 또는 포유동물 세포, 예컨대 NIH 3T3, HeLa, 또는 바람직하게 COS 세포) 내에서 생산될 수 있다. 이러한 세포는 다양한 공급처(예컨대 미국 모식균 배양 수집소(American Type Culture Collection)(Rockland, Md.)로부터 입수 가능하다(예를 들어 문헌(Ausubel et al., Current Protocol in Molecular Biology, New York: John Wiley and Sons, 1997)도 참조). 형질감염 방법과 발현 비이클을 선택하는 것은, 선택된 숙주계에 따라 달라질 것이다. 형질전환 방법은, 예컨대 문헌(Ausubel et al. (상동))에 기술되어 있으며; 발현 비이클은 문헌(Cloning Vectors: A Laboratory Manual (P. H. Pouwels et al., 1985, Supp. 1987)에 제공된 것들로부터 선택될 수 있다.
- [0139] 다양한 발현계가 재조합 폴리펩티드의 제조를 위해 존재한다. 이러한 폴리펩티드를 제조하는데 유용한 발현 벡터로서는 염색체, 에피솜 및 바이러스 유래 벡터, 예컨대 세균 플라스미드 유래 벡터, 박테리오파지 유래 벡터, 트랜스포존 유래 벡터, 효모 에피솜 유래 벡터, 삽입 요소 유래 벡터, 효모 염색체 요소 유래 벡터, 바쿨로 바이러스, 파포바 바이러스(예컨대 SV40), 백시니아 바이러스, 아데노바이러스, 계두바이러스, 위광견병 바이러스 및 레트로바이러스와 같은 바이러스 유래 벡터, 그리고 이것들의 조합으로부터 유래하는 벡터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0140] 일단 재조합 폴리펩티드가 발현되면, 이 폴리펩티드는, 예컨대 친화성 크로마토그래피를 사용하여 분리된다. 일례에서, (예컨대 본원에 기술된 바와 같이 제조된) 항체로서, 이 폴리펩티드에 대해 생성된 항체는 컬럼에 부착되어, 재조합 폴리펩티드를 분리하는데 사용될 수 있다. 친화성 크로마토그래피 전 폴리펩티드를 품은 세포의 용해 및 분획화는 표준적 방법에 의해 수행될 수 있다(예컨대 문헌(Ausubel et al., 상동) 참조). 일단 분리되면, 재조합 단백질은 원할 경우, 예컨대 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 더 정제될 수 있다(예컨대 문헌(Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry and Molecular Biology, eds., Work and Burdon, Elsevier, 1980) 참조).
- [0141] 본원에 사용된 바와 같이, 본 발명의 생물 활성 폴리펩티드 또는 효력 분자는 시토카인, 케모카인, 성장 인자, 단백질 독소, 면역글로불린 도메인 또는 기타 생물활성 단백질, 예컨대 효소와 같은 인자들을 포함할 수 있다. 또한 생물 활성 폴리펩티드는 다른 화합물, 예컨대 비단백질성 독소, 세포독성 제제, 화학요법제, 검출 가능한 표지, 방사성 물질 등과의 접합체를 포함할 수 있다.
- [0142] 본 발명의 시토카인은, 다른 세포에 영향을 미치고 세포성 면역의 여러 다효성 중 임의의 것에 관여하는 세포에 의해 생산되는 임의의 인자에 의해 한정된다. 시토카인의 예들로서는 IL-2 과, 인터페론(IFN), IL-10, IL-1, IL-17, TGF 및 TNF 시토카인 과, 그리고 IL-1 내지 IL-35, IFN-a, IFN-b, IFN-g, TGF-b, TNF-a 및 TNF-b를 포함



하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0143] 본 발명의 한 양태에서, 제1 융합 단백질은 인터루킨-15(IL-15) 도메인 또는 이의 기능성 단편에 공유 결합된 제1 생물 활성 폴리펩티드를 포함한다. IL-15는 T 세포 활성화와 증식에 영향을 미치는 시토카인이다. 면역 세포 활성화 및 증식에 영향을 미치는 IL-15 활성은 어떤 면에서 IL-2의 활성과 유사하지만, 근본적인 차이점에 대해서는 특성구명이 잘 되어 있다(Waldmann, T A, 2006, *Nature Rev. Immunol.* 6:595-601).
- [0144] 본 발명의 또 다른 양태에서, 제1 융합 단백질은, IL-15 변이체(본원에서는 IL-15 돌연변이체라고도 지칭됨)인 인터루킨-15(IL-15) 도메인을 포함한다. IL-15 변이체는, 바람직하게 원산(또는 야생형) IL-15 단백질의 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 포함한다. IL-15 변이체는, 바람직하게 IL-15R $\alpha$  폴리펩티드와 결합하여, IL-15 효현제 또는 길항제로서 작용한다. 바람직하게 효현제 활성을 가지는 IL-15 변이체는 강력 효현제 활성을 가진다. IL-15 변이체는 IL-15R $\alpha$ 와의 결합 여부에 의존하지 않고 IL-15 효현제 또는 길항제로서의 작용을 할 수 있다. IL-15 효현제는 야생형 IL-15의 생물 활성과 거의 동일하거나 증가한 생물 활성에 의해 실증된다. IL-15 길항제는 야생형 IL-15의 생물 활성에 비하여 감소한 생물 활성 또는 IL-15 매개 반응을 억제하는 능력에 의해 실증된다. 몇몇 예들에 있어서, IL-15 변이체는 IL-15R $\beta$   $\gamma$ C 수용체에 증가한 활성 또는 감소한 활성으로 결합한다. 몇몇 경우들에 있어서, IL-15 변이체의 서열은 원산 IL-2 서열에 비하여 적어도 하나의 아미노산 변화, 예컨대 치환 또는 결실을 가지고, 이러한 변화는 IL-15 효현제 활성 또는 길항제 활성을 초래한다. 바람직하게 아미노산 치환/결실은, IL-15R $\beta$  및/또는  $\gamma$ C와 상호작용하는 IL-15의 도메인에서 일어난다. 더욱 바람직하게 아미노산 치환/결실은 IL-15R $\alpha$  폴리펩티드와의 결합 또는 IL-15 변이체 생산능에 영향을 미치지 않는다. IL-15 변이체를 생산하기 적합한 아미노산 치환/결실은 추정적 또는 공지된 IL-15 구조, 구조가 공지되어 있는 상동성 분자, 예컨대 IL-2와 IL-15의 비교, 합리적이거나 무작위의 돌연변이유발 및 기능 검정법(본원에 제공된 바와 같음) 또는 기타 실험 방법들을 바탕으로 동정될 수 있다. 추가로 적합한 아미노산 치환은 추가 아미노산들의 삽입과 보존적 또는 비보존적 변화일 수 있다. 바람직하게 본 발명의 IL-15 변이체는, 성숙한 인간 IL-15 서열 상 6, 8, 10, 61, 65, 72, 92, 101, 104, 105, 108, 109, 111 또는 112번 위치에 1개 또는 1개 초과개의 아미노산 치환/결실을 함유하고; 구체적으로 D8N("D8"은 원산 성숙 인간 IL-15 서열의 아미노산 및 잔기 위치를 나타내고, "N"은 IL-15 변이체 내 해당 위치에 있는 치환된 아미노산 잔기를 나타냄), I6S, D8A, D61A, N65A, N72R, V104P 또는 Q108A 치환은 길항제 활성을 가지는 IL-15 변이체를 생성하고, N72D 치환은 효현제 활성을 가지는 IL-15 변이체를 생성한다.
- [0145] 케모카인은 시토카인과 유사하게, 다른 세포에 노출되었을 때 세포성 면역의 여러 다효성 중 임의의 것에 관여하는 임의의 화학 인자 또는 분자로서 정의된다. 적합한 케모카인으로는 CXC, CC, C 및 CX<sub>3</sub>C 케모카인과, CCL-1 내지 CCL-28, CXC-1 내지 CXC-17, XCL-1, XCL-2, CX3CL1, MIP-1b, IL-8, MCP-1, 및 Rantes를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0146] 성장 인자는 특정 세포에 노출될 때 노출된 세포의 증식 및/또는 분화를 유도하는 임의의 분자들을 포함한다. 성장 인자로서는 단백질 및 화학 분자를 포함하고, 이것들 중 몇몇은 GM-CSF, G-CSF, 인간 성장 인자 및 줄기세포 성장 인자를 포함한다. 추가의 성장 인자도 또한 본원에 기술된 용도로서 적합할 수 있다.
- [0147] 독소 또는 세포독성 제제로서는 세포에 노출되었을 때 성장에 치사 효과 또는 억제 효과를 보이는 임의의 물질을 포함한다. 더욱 구체적으로 효과기 분자는, 예컨대 식물이나 세균 기원의 세포 독소, 예컨대 디프테리아 독소(DT), 쉬가 독소, 아브린, 콜레라 독소, 리신, 사포린, 슈도모나스 외독소(PE), 미국자리공 항바이러스 단백질 또는 겔로닌일 수 있다. 이러한 독소의 생물 활성 단편은 당 분야에 널리 공지되어 있으며, 예컨대 DT A 사슬 및 리신 A 사슬을 포함한다. 추가로 독소는 세포 표면에서 활성인 제제, 예컨대 포스포리파아제 효소(예컨대 포스포리파아제 C)일 수 있다.
- [0148] 또한 효과기 분자는 화학요법 약물, 예컨대 빈데신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 메토트렉세이트, 아드리아마이신, 블레오마이신 또는 시스플라틴일 수 있다.
- [0149] 추가로, 효과기 분자는 진단 연구 또는 영상화 연구에 적합한, 검출 가능하게 표지화된 분자일 수 있다. 이러한 표지로서는 바이오틴 또는 스트렙타비딘/아비딘, 검출 가능한 나노입자 또는 결정, 효소 또는 이의 촉매 활성 단편, 형광 표지, 예컨대 녹색 형광 단백질, FITC, 피코에리트린, 사이클, 텍사스 레드 또는 양자점; 방사성핵종, 예컨대 요오드-131, 이트륨-90, 레늄-188 또는 비스무트-212; 인광 분자, 화학발광 분자, 또는 PET, 초음파 또는 MRI에 의해 검출 가능한 표지, 예컨대 Gd<sup>3+</sup> 또는 상자성 금속 이온 기반 조영제를 포함한다. 예를 들어 문헌(Moskaug, et al. *J. Biol. Chem.* 264, 15709 (1989); Pastan, I. et al. *Cell* 47, 641, 1986; Pastan et al., Recombinant Toxins as Novel Therapeutic Agents, *Ann. Rev. Biochem.* 61, 331, (1992); "Chimeric

Toxins" *Olsnes and Phil, Pharmac. Ther.*, 25, 355 (1982); 공개된 PCT 특허출원공보 WO 94/29350; 공개된 PCT 특허출원공보 WO 94/04689; 공개된 PCT 특허출원공보 WO2005046449 및 미국특허 제5,620,939호(효과기 또는 태그를 포함하는 단백질을 제조 및 사용하는 것에 관하여 개시됨))을 참조한다.

[0150] IL-15 및 IL-15R $\alpha$  도메인들이 공유 결합되어 포함되어 있는 단백질 융합 또는 접합 복합체는 몇 가지 중요한 용도를 가진다. 예를 들어 항 CD3 scAb 및 항 CD20 scAb를 포함하는 단백질 융합 또는 접합 복합체는, 임의의 세포, 예컨대 CD20 수용체를 발현하는 B 세포 림프종 세포와, CD3 수용체를 발현하는 CD8<sup>+</sup> T 세포에 IL-15:IL-15R $\alpha$  복합체를 전달하는데 사용될 수 있다. 따라서 이 단백질 융합 또는 접합 복합체는 리간드를 포함하는 세포를 선택적으로 손상 또는 사멸하는 수단을 제공한다. 본 단백질 융합 또는 접합 복합체에 의해 손상 또는 사멸될 수 있는 세포나 조직의 예들로서는 종양 및 바이러스 감염 세포 또는 세균 감염 세포로서, 하나 이상의 리간드를 발현하는 세포를 포함한다. 손상 또는 사멸에 취약한 세포나 조직은 본원에 개시된 방법에 의해 용이하게 검정될 수 있다.

[0151] 본 발명의 IL-15 및 IL-15R $\alpha$  폴리펩티드는 적합하게, 그 아미노산 서열이 자연 발생 IL-15 및 IL-15R $\alpha$  분자, 예컨대 인간, 마우스 또는 기타 설치류 또는 기타 포유동물의 IL-15 및 IL-15R $\alpha$  분자의 아미노산 서열과 상응한다. 이러한 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 핵산의 서열은, 예를 들어 인간 인터루킨 15(IL15) mRNA - GenBank: U14407.1 (본원에 참조로 인용됨), Mus 근육 인터루킨 15(IL15) mRNA - GenBank: U14332.1 (본원에 참조로 인용됨), 인간 인터루킨-15 수용체 알파 사슬 전구체(IL15RA) mRNA - GenBank: U31628.1 (본원에 참조로 인용됨), Mus 근육 인터루킨 15 수용체, 알파 사슬 - GenBank: BC095982.1 (본원에 참고로 인용됨)와 같이 문헌에 공지되어 있다.

[0152] 몇몇 경우에 있어서, 예를 들어 sc-항체의 역가를 증가시키기 위해 본 발명의 단백질 융합 또는 접합 복합체를 다가로 만드는 것이 유용할 수 있다. 구체적으로 융합 단백질 복합체의 IL-15 도메인 및 IL-15R $\alpha$  도메인 간 상호작용은 다가 복합체를 제조하는 수단을 제공한다. 또한, 다가 융합 단백질은, 예를 들어 표준 바이오틴-스트렙타비딘 표지화 기술을 사용하거나, 또는 적합한 고정 지지체, 예컨대 라텍스 비드의 접합을 통해, 1개 내지 4개의 단백질(동일하거나 상이한 단백질들)을 서로 공유 결합 또는 비공유 결합시켜 제조될 수 있다. 화학 가교된 단백질(예컨대 덴드리머에 가교된 단백질)은 또한 적합한 다가 종이다. 예를 들어 단백질은, 변형될 수 있는 태그 서열, 예컨대 바이오틴화 BirA 태그, 또는 Cys 또는 His와 같이 화학 반응성 측쇄를 가지는 아미노산 잔기를 암호화하는 서열을 포함시킴으로써 변형될 수 있다. 이러한 아미노산 태그 또는 화학 반응성 아미노산은 융합 단백질 내 다양한 위치, 바람직하게는 생물 활성 폴리펩티드 또는 효과기 분자의 활성 부위로부터 멀리 떨어진 위치에 배치될 수 있다. 예를 들어 가용성 융합 단백질의 C-말단은, 이처럼 반응성 아미노산(들)을 포함하는 기타 융합 단백질 또는 태그에 공유 결합될 수 있다. 2개 이상의 융합 단백질을 적합한 덴드리머 또는 기타 나노입자에 화학적으로 결합시켜 다가 분자를 제조하기 위해서는 적합한 측쇄가 포함될 수 있다. 덴드리머는 자체의 표면에 다수의 상이한 작용기 중 임의의 것 하나를 가질 수 있는 합성 화학 중합체이다(D. Tomalia, *Aldrichimica Acta*, 26:91:101 (1993)). 본 발명에 따라 사용되는 예시적 덴드리머로서는, 예컨대 시스테인 잔기들을 결합시킬 수 있는 E9 불꽃형(combust) 폴리아민 덴드리머 및 E9 성상형(starburst) 폴리아민 덴드리머를 포함한다. 예시적 나노입자로서는 리포솜, 코어-외피(core-shell) 입자 또는 PLGA 기반 입자를 포함한다.

[0153] 다른 양태에서, 융합 단백질 복합체의 폴리펩티드들 중 하나 또는 둘 다는 면역글로불린 도메인을 포함한다. 대안적으로 단백질 결합 도메인-IL-15 융합 단백질은 면역글로불린 도메인에 추가로 결합될 수 있다. 바람직한 면역글로불린 도메인은 다른 면역글로불린 도메인과의 상호작용을 허용하여, 상기 제공된 바와 같은 다중 사슬 단백질을 형성하도록 만들 수 있는 영역들을 포함한다. 예를 들어 면역글로불린 중쇄 영역, 예컨대 IgG1 C $\mu$ 2-C $\mu$ 3은 안정적으로 상호작용하여, Fc 영역을 형성할 수 있다. Fc 도메인을 포함하여 바람직한 면역글로불린 도메인은 또한 효과기 기능, 예컨대 Fc 수용체 또는 보체 단백질 결합 활성을 가지고/가지거나 당화 부위들을 가지는 영역들을 포함한다. 몇몇 양태들에서, 융합 단백질 복합체의 면역글로불린 도메인은, Fc 수용체 또는 보체 결합 활성 또는 당화 또는 이량체화를 감소 또는 증가시켜, 생성되는 단백질의 생물 활성에 영향을 미치는 돌연변이를 함유한다. 예를 들어 Fc 수용체와의 결합을 감소시키는 돌연변이를 함유하는 면역글로불린 도메인이, 특이 항원을 인지 또는 검출하도록 디자인된 시약에 유리할 수 있도록, Fc 수용체 보유 세포에 대한 결합 활성이 낮은 본 발명의 융합 단백질 복합체를 제조하는데 사용될 수 있었다.

[0154] 핵산 및 벡터

[0155] 본 발명은 핵산 서열, 구체적으로 본 융합 단백질(예컨대 2B8T3M의 성분들)을 암호화하는 DNA 서열을 추가로 제공한다. 바람직하게 DNA 서열은 염색체의 복제에 적합한 벡터, 예컨대 파아지, 바이러스, 플라스미드,

파지미드, 코스미드, YAC 또는 에피솜에 의해 운반된다. 구체적으로 원하는 융합 단백질을 암호화하는 DNA 벡터는, 본원에 기술된 제조 방법들을 가속화하고, 융합 단백질을 유의미한 양만큼 수득하기 위해 사용될 수 있다. DNA 서열은 적당한 발현 벡터, 즉 삽입된 단백질 암호화 서열의 전사 및 번역에 필요한 요소를 함유하는 벡터로 삽입될 수 있다. 다양한 숙주-벡터계는 단백질 암호화 서열을 발현시키는데 이용될 수 있다. 이러한 계로서는 바이러스(예컨대 백시니아 바이러스, 아데노바이러스 등)로 감염된 포유동물 세포계; 바이러스(예컨대 바콜로 바이러스)로 감염된 곤충 세포계; 미생물, 예컨대 효모 벡터를 함유하는 효모, 또는 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA로 형질전환된 세균을 포함한다. 이용된 숙주-벡터계에 따라서, 다수의 적합한 전사 요소 및 번역 요소 중 임의의 하나가 사용될 수 있다. 문헌((Sambrook et al., 상동) 및 (Ausubel et al., 상동))을 참조한다.

[0156] 가용성 융합 단백질 복합체를 제조하기 위한 방법이 본 발명에 포함되는데, 이 방법은 본원에 기술된 바와 같이 제1 및 제2 융합 단백질을 암호화하는 DNA 벡터를 숙주 세포에 도입하는 단계, 세포나 배지 중 융합 단백질을 발현하기 충분한 조건하에 이 숙주 세포를 배지 중에서 배양하여, 제1 융합 단백질의 IL-15 도메인과 제2 융합 단백질의 가용성 IL-15R $\alpha$  도메인간 결합을 허용함으로써, 가용성 융합 단백질 복합체를 형성하는 단계, 그리고 숙주 세포나 배지로부터 가용성 융합 단백질 복합체를 정제하는 단계를 포함한다.

[0157] 일반적으로 본 발명에 따라 바람직한 DNA 벡터에는, 효과기 분자를 암호화하는 서열에 작동가능하도록 결합된, 생물 활성 폴리펩티드를 암호화하는 제1 뉴클레오티드 서열 도입용 제1 클로닝 부위를 5'→3'방향으로 포함하는 뉴클레오티드 서열이 포스포디에스테르 결합에 의해 결합되어 포함되어 있다.

[0158] DNA 벡터에 의해 암호화된 융합 단백질 성분들은 카세트 형태로 제공될 수 있다. "카세트"란 용어는, 각각의 성분이 표준 재조합 방법에 의해 다른 성분 대신 용이하게 치환될 수 있는 구조를 의미한다. 구체적으로 카세트 형태로 구성된 DNA 벡터는, 암호화된 융합 복합체가 혈청형을 발생시킬 능력을 가질 수 있거나 그러한 결합을 가지는 병원체에 맞서 사용될 때 특히 요망된다.

[0159] 융합 단백질 복합체를 암호화하는 벡터를 제조하기 위하여, 생물 활성 폴리펩티드를 암호화하는 서열은, 적합한 리가아제를 사용하여 효과기 펩티드를 암호화하는 서열에 결합된다. 제시 펩티드를 암호화하는 DNA는, 적합한 세포주와 같은 자연 공급원으로부터 DNA를 단리하거나, 또는 공지의 합성 방법, 예컨대 포스포이트 트리에스테르 방법에 의해 수득될 수 있다. 예컨대 문헌(Oligonucleotide Synthesis, IRL Press (M. J. Gait, ed., 1984))을 참조한다. 합성 올리고뉴클레오티드는 또한 시판되고 있는 자동화 올리고뉴클레오티드 합성기를 사용하여 제조될 수 있다. 생물 활성 폴리펩티드를 암호화하는 유전자가 일단 단리되면, 이 유전자는 중합효소 연쇄 반응(PCR) 또는 기타 당 분야에 공지된 방법에 의해 증폭될 수 있다. 생물 활성 폴리펩티드 유전자를 증폭시키는데 적합한 PCR 프라이머는 PCR 생성물에 제한 부위들을 부가할 수 있다. PCR 생성물은, 바람직하게 효과기 펩티드에 대한 스플라이싱 부위들과, 생물 활성 폴리펩티드-효과기 융합 복합체의 적절한 발현 및 분비에 필요한 선도 서열을 포함한다. PCR 생성물은 또한, 바람직하게 링커 서열을 암호화하는 서열이나, 또는 이러한 서열을 결합하기 위한 제한 효소 부위를 포함한다.

[0160] 본원에 기술된 융합 단백질은, 바람직하게 표준 재조합 DNA 기술에 의해 생산된다. 예를 들어 생물 활성 폴리펩티드를 암호화하는 DNA 분자가 일단 단리되면, 이 서열은 효과기 폴리펩티드를 암호화하는 또 다른 DNA 분자에 결합될 수 있다. 생물 활성 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은, 효과기 펩티드를 암호화하는 DNA 서열과 직접 연결될 수 있거나, 또는 더욱 통상적으로 본원에 논의된 바와 같은 링커 서열을 암호화하는 DNA 서열은, 생물 활성 폴리펩티드를 암호화하는 서열과, 효과기 펩티드를 암호화하는 서열 사이에 끼워진 후, 적합한 리가아제가 사용되어 연결될 수 있다. 생성된 하이브리드 DNA 분자는 적합한 숙주 세포 내에서 발현되어 융합 단백질 복합체로 생성될 수 있다. DNA 분자는, 결합 후 암호화되는 폴리펩티드의 번역 틀이 변경되지 않도록 서로 5'→3'방향으로 결합된다(즉 DNA 분자는 서로에 대해 틀 내(in-frame) 결합된다). 생성된 DNA 분자는 틀 내 융합 단백질을 암호화한다.

[0161] 또 다른 뉴클레오티드 서열도 또한 유전자 구조체에 포함될 수 있다. 예를 들어 효과기 펩티드에 융합된 생물 활성 폴리펩티드를 암호화하는 서열의 발현을 제어하는 촉진인자 서열, 또는 융합 단백질을 세포 표면이나 배양 배지로 안내하는 선도 서열이, 구조체에 포함될 수 있거나 또는 이 구조체가 삽입된 발현 벡터 내에 존재할 수 있다. 면역글로불린 또는 CMV 촉진인자가 특히 바람직하다.

[0162] 변이체 생물 활성 폴리펩티드, IL-15, IL-15R $\alpha$  또는 Fc 도메인 암호화 서열을 수득함에 있어서, 당 업자들은 생물 활성의 소실 또는 감소가 초래되지 않은 채 폴리펩티드가 임의의 아미노산 치환, 부가, 결실 및 번역후 변형에 의해 변형될 수 있음을 인지할 것이다. 구체적으로 보존적 아미노산 치환이 일어나면, 즉 하나의 아미노산



이 유사한 크기, 전하, 극성 및 형태를 가지는 또 다른 아미노산으로 치환되면, 단백질 기능은 유의미하게 변경되지 않을 것임은 널리 공지되어 있다. 단백질의 구성성분인 20개의 표준 아미노산은 넓게 보존적 아미노산으로 이루어진 군 4 가지로 하기와 같이 분류될 수 있다: 비극성(소수성) 군은 알라닌, 이소루신, 루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 트립토판 및 발린을 포함하고; 극성(비하전, 중성) 군은 아스파라긴, 시스테인, 글루타민, 글리신, 세린, 트레오닌 및 티로신을 포함하며; 극성 하전(염기성) 군은 아르기닌, 히스티딘 및 리신을 포함하고; 음 하전(산성) 군은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 어떤 단백질에 있어서 하나의 아미노산의, 동일 군에 속하는 또 다른 아미노산으로의 치환은 단백질의 생물 활성에 부정적인 영향을 미치지 않을 것이다. 다른 예에서, 단백질의 생물 활성을 감소 또는 증가시키기 위해 아미노산 위치에 대한 변형이 이루어질 수 있다. 이러한 변화는 표적이 된 잔기(들)의 공지되었거나 추정되는 구조적 특성 또는 기능상 특성을 바탕으로 부위 특이적 돌연변이를 통하여 도입될 수 있거나 또는 무작위로 도입될 수 있다. 변이체 단백질이 발현된 후, 변형으로 말미암은 생물 활성 변화는 결합 또는 기능 검정을 사용하여 용이하게 평가될 수 있다.

[0163] 뉴클레오티드 서열들간의 상동성은 DNA 잡종화 분석에 의해 결정될 수 있는데, 여기서 이중 가닥 DNA 하이브리드의 안정성은 일어난 염기 쌍 형성 정도에 의존적이다. 높은 온도 및/또는 낮은 염 함량의 조건은, 하이브리드의 안정성을 감소시키고, 선택된 상동성 정도에 못미치는 상동성을 가지는 서열의 어닐링(annealing)을 방지하도록 달라질 수 있다. 예를 들어 G-C 함량이 약 55%인 서열에 있어서, 40°C ~ 50°C, 6 x SSC(염화나트륨/시트르산나트륨 완충제) 및 0.1% SDS(도데실황산나트륨)의 잡종화 및 세척 조건은 약 60% ~ 약 70%의 상동성을 초래하고, 50°C ~ 65°C, 1 x SSC 및 0.1% SDS의 잡종화 및 세척 조건은 약 82% ~ 약 97%의 상동성을 초래하며, 52°C, 0.1 x SSC 및 0.1% SDS의 잡종화 및 세척 조건은 약 99% ~ 약 100%의 상동성을 초래한다. 뉴클레오티드와 아미노산 서열을 비교하기 위한(그리고 상동성의 정도를 측정하기 위한) 여러 컴퓨터 프로그램도 또한 입수 가능하고, 시판중인 소프트웨어와 무료 소프트웨어 둘 다의 공급처를 제공하는 목록은 문헌(Ausubel et al. (1999))에서 찾아볼 수 있다. 용이하게 입수 가능한 서열 비교 및 다중 서열 정렬 알고리즘으로서는 각각 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)(Altschul et al., 1997) 및 ClustalW 프로그램이 있다. BLAST는 [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)에서 입수 가능하고, ClustalW 버전은 [2.ebi.ac.uk](http://2.ebi.ac.uk)에서 입수 가능하다.

[0164] 융합 단백질의 성분들은, 각각이 의도로 하는 기능을 수행할 수 있도록 제공된 임의의 순서에 가깝게 조직될 수 있다. 예를 들어 일 구현예에서, 생물 활성 폴리펩티드는 효과기 분자의 C-말단 또는 N-말단에 위치한다.

[0165] 본 발명의 바람직한 효과기 분자는 도메인들이 의도로 하는 기능을 유도하는 크기를 가질 것이다. 본 발명의 효과기 분자는 제조된 후, 널리 공지된 화학 가교 방법을 비롯한 다양한 방법에 의해 생물 활성 폴리펩티드에 융합될 수 있다. 예를 들어 문헌(Means, G. E. and Feeney, R. E. (1974), *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day. See also, S. S. Wong (1991), *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press)을 참조한다. 그러나 일반적으로 틀 내 융합 단백질을 제조하기 위해 재조합 조작법을 사용하는 것이 바람직하다.

[0166] 언급된 바와 같이, 본 발명에 따른 융합 분자 또는 접합체 분자는 몇 가지 방식으로 조직될 수 있다. 예시적 구성에 있어서, 생물 활성 폴리펩티드의 C-말단은 효과기 분자의 N-말단에 작동 가능하도록 결합된다. 이러한 결합은 원한다면 재조합 방법에 의해 달성될 수 있다. 그러나 다른 구성에 있어서, 생물 활성 폴리펩티드의 N-말단은 효과기 분자의 C-말단에 결합된다.

[0167] 대안적으로 또는 추가로, 필요에 따라 하나 이상의 추가 효과기 분자가 생물 활성 폴리펩티드 또는 접합 복합체에 삽입될 수 있다.

#### [0168] 벡터 및 발현

[0169] 본 발명의 융합 단백질 복합체(예컨대 2B8T3M)의 성분들을 발현하는데 다수의 전략이 사용될 수 있다. 예를 들어 본 발명의 융합 단백질 복합체 성분 하나 이상을 암호화하는 구조체는, 구조체 삽입을 위해 벡터를 절단하는 제한 효소를 사용하여 적합한 벡터에 통합된 다음 결합될 수 있다. 이후 유전자 구조체를 함유하는 벡터는 융합 단백질의 발현을 위하여 적합한 숙주에 도입된다. 일반적으로 문헌(Sambrook et al., 상동)을 참조한다. 적합한 벡터의 선택은 클로닝 프로토콜에 관한 인자들을 바탕으로 실험을 통하여 이루어질 수 있다. 예를 들어 벡터는 사용되고 있는 숙주와 양립 가능하여야 하며, 이러한 숙주에 적절한 레플리콘(replicon)을 가져야 한다. 벡터는 발현될 융합 단백질 복합체를 암호화하는 DNA 서열을 수용할 수 있어야 한다. 적합한 숙주 세포로서는 진핵생물 및 원핵생물 세포, 바람직하게 용이하게 형질전환되어 배양 배지 중에서 신속한 성장을 보일 수 있는 세포를 포함한다. 특히 바람직한 숙주 세포로서는 원핵생물, 예컨대 이.콜라이, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 등과, 진핵생물, 예컨대 동물 세포 및 효소 균주, 예컨대 에스.세레비시아에를 포함한다. 포유동물 세포, 특히

J558, NS0, SP2-0 또는 CHO가 일반적으로 바람직하다. 기타 적합한 숙주로서는, 예를 들어 곤충 세포, 예컨대 Sf9를 포함한다. 종래의 배양 조건이 적용된다. 문헌(Sambrook, 상동)을 참조한다. 이후 안정적으로 형질전환되었거나 형질감염된 세포주가 선택될 수 있다. 본 발명의 융합 단백질 복합체를 발현하는 세포는 공지의 방법에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어 면역글로불린에 결합된 융합 단백질 복합체의 발현은, 결합된 면역글로불린에 특이적인 ELISA 및/또는 면역 블롯팅(immunoblotting)에 의해 확인될 수 있다. IL-15 또는 IL-15R $\alpha$  도메인들에 결합된 생물 활성 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질의 발현을 확인하기 위한 다른 방법들이 실시예들에 개시되어 있다.

[0170] 상기에서 일반적으로 언급된 바와 같이, 원하는 융합 단백질을 암호화하는 핵산을 증식시키기 위한 예비적 목적으로 숙주 세포가 사용될 수 있다. 그러므로 숙주 세포는 특별히 융합 단백질 생산이 의도되는 원핵생물 또는 진핵생물 세포를 포함할 수 있다. 따라서 숙주 세포는, 구체적으로 융합체를 암호화하는 핵산을 증식시킬 수 있는 효모, 파리, 벌레, 식물, 개구리, 포유동물 세포 및 장기를 포함한다. 사용될 수 있는 포유동물 세포주의 비제한적 예들로서는 CHO dhfr-세포(Urlaub and Chasm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)), 293 세포(Graham et al., *J. Gen. Virol.*, 36:59 (1977)) 또는 골수종 세포, 예컨대 SP2 또는 NS0(Galfre and Milstein, *Meth. Enzymol.*, 73(B):3 (1981))를 포함한다.

[0171] 원하는 융합 단백질 복합체를 암호화하는 핵산을 증식시킬 수 있는 숙주 세포는 포유동물 이외의 진핵생물 세포, 예컨대 곤충 세포(예컨대 에스피. 프루기페르다(*Sp. frugiperda*)), 효모(예컨대 에스. 세레비지아에, 에스. 폼베(*S. pombe*), 피. 파스토리스(*P. pastoris*), 케이. 락티스(*K. lactis*), 에이치. 폴리모르파(*H. polymorpha*); Fleer, R.에 의해 일반적으로 검토된 바와 같은 것들(*Current Opinion in Biotechnology*, 3(5):486496 (1992))), 진균 세포 및 식물 세포도 포함한다. 이.콜라이 및 바실러스와 같은 임의의 원핵생물도 또한 고려된다.

[0172] 세포를 형질감염시키기 위한 표준 기술에 의해 원하는 융합 단백질을 암호화하는 핵산이 숙주 세포에 도입될 수 있다. "형질감염시키는 것" 또는 "형질감염"이란 용어는, 핵산을 숙주 세포에 도입하기 위한 종래의 모든 기술, 예컨대 인산칼슘 공침전법, DEAE-덱스트란 매개 형질감염, 리포펙션(lipofection), 전기영동, 미세주입, 바이러스에 의한 형질도입 및/또는 통합을 포함하는 것으로 의도된다. 숙주 세포를 형질감염시키기 적합한 방법은 문헌(Sambrook et al., 상동) 및 기타 실험 교과서에서 찾아볼 수 있다.

[0173] 다수의 촉진인자(전사 개시 조절 영역)가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 적당한 촉진인자의 선택은 제안된 발현 숙주에 따라서 달라진다. 이중 공급원으로부터 유래하는 촉진인자는, 그것이 선택된 숙주 내에서 기능을 발휘하는 한, 사용될 수 있다.

[0174] 촉진인자 선택은 또한 원하는 효능과, 펩티드 또는 단백질 생성 수준에 따라 달라진다. 유도성 촉진인자. 예컨대 tac는 종종 이.콜라이 내 단백질 발현 수준을 극적으로 증가시키기 위해 사용된다. 단백질 과발현은 숙주 세포에 유해할 수 있다. 결과적으로 숙주 세포 성장이 제한될 수 있다. 유도성 촉진인자가 사용되면, 숙주 세포는 허용 가능한 밀도로 배양된 후 유전자 발현이 유도되고, 이로써 생성물 수율이 더 높아지는 것이 가속화되는 것이다.

[0175] 본 발명에 따라 다양한 신호 서열이 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 생물 활성 폴리펩티드 암호화 서열에 상동성인 신호 서열이 사용될 수 있다. 대안적으로 발현 숙주 내에서의 효율적 분비와 처리를 위해 선택 또는 디자인된 신호 서열도 또한 사용될 수 있다. 예를 들어 적합한 신호 서열/숙주 세포 쌍은 비.서브틸리스 sacB 신호 서열(비.서브틸리스 내 분비용)과, 사카로마이세스 세레비지아에  $\alpha$ -메이팅 인자(mating factor) 또는 피.파스토리스 산 포스파타아제 phoI 신호 서열(피.파스토리스 내 분비용)을 포함한다. 신호 서열은 신호 펩티다아제 절단 부위를 암호화하는 서열, 또는 보통은 10개 이하의 코돈으로 이루어진 짧은 뉴클레오티드 가교를 통하여 단백질 암호화 서열에 직접 연결될 수 있는데, 이 경우 상기 가교는 하류 TCR 서열의 올바른 해독를 보장한다.

[0176] 전사 및 번역을 증진시키기 위한 요소들이 진핵생물 단백질 발현계에 대해 동정되었다. 예를 들어 이중 촉진인자 양쪽 중 어느 한쪽으로부터 1,000 bp 떨어져 꽃양배추 모자이크 바이러스(CaMV) 촉진인자가 배치되면, 식물 세포에서 전사 수준은 10배 ~ 400배까지 증가할 수 있다. 발현 구조체는 또한 적당한 번역 개시 서열을 포함할 수도 있다. 적당한 번역 개시를 위하여 Kozak 공통 서열을 포함하도록 발현 구조체가 변형되면, 번역 수준은 10배까지 증가할 수 있다.

[0177] 발현 구조체의 일부일 수 있거나, 또는 이로부터 분리되어 존재할 수 있는(예를 들어 발현 벡터에 의해 운반될 수 있는) 선택 마커가 종종 사용되므로, 이러한 마커는 관심 유전자 부위와 상이한 부위에 통합될 수 있다. 그

예로서는 항생제에 대한 내성을 부여하는 마커(예컨대 bla는 이.콜라이 숙주 세포에 암피실린에 대한 내성을 부여하고, nptII는 다양한 원핵생물 및 진핵생물 세포에 카나마이신에 대한 내성을 부여함) 또는 숙주 세포가 최소 배지에서 성장하는 것을 허용하는 마커(예컨대 HIS4는 피.파스토리스 또는 His<sup>-</sup> 에스.세레비지아에 히스티딘 부재 하에서도 성장할 수 있도록 함)를 포함한다. 선택 마커는 자체만의 전사 및 번역 개시 및 종료 조절 영역을 가져서, 마커의 독립적 발현을 허용한다. 만일 항생제 내성이 마커로서 사용되면, 선택을 위한 항생제의 농도는 항생제에 따라서 달라질 것인데, 일반적으로 항생제 농도는 배지 1 mL당 항생제 10 mg 내지 600 mg의 범위이다.

[0178] 발현 구조체는, 공지의 재조합 DNA 기술을 이용하여 조립된다(Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1999). 제한 효소 분해 및 결찰은, 2개의 DNA 단편을 연결하는데 이용되는 기본 단계들이다. DNA 단편의 말단들은 결찰 전에 변형을 필요로 할 수 있는데, 이 변형은 돌출 말단(overhang)을 채우거나, 뉴클레아제(예컨대 ExoIII)로 단편(들)의 말단부를 결실시키거나, 부위 유도적 돌연변이유발법에 의하거나, 또는 PCR에 의해 신규 염기쌍들을 부가함으로써 달성될 수 있다. 선택된 단편들의 연결을 돕기 위해 폴리링커(polylinker)와 어댑터(adaptor)가 사용될 수 있다. 발현 구조체는 통상적으로 이.콜라이의 제한, 결찰 및 형질전환 라운드를 이용하는 단계들에서 조립된다. 발현 구조체를 구성하는데 적합한 클로닝 벡터 다수(IZAP 및 pBLUESCRIPT SK-1(Stratagene, La Jolla, CA), pET(Novagen Inc., Madison, WI); Ausubel et al., 1999에 예시됨)가 당 분야에 공지되어 있으며, 본 발명에 있어서 벡터에 관한 구체적인 선택은 중요하지 않다. 클로닝 벡터의 선택은 발현 구조체를 숙주 세포에 도입하기 위해 선택된 유전자 이동계에 의해 영향을 받을 것이다. 생성된 구조체는 각 단계의 말미에 제한 분석, DNA 서열 분석, 잡종화 및 PCR 분석에 의해 분석될 수 있다.

[0179] 발현 구조체는 클로닝 벡터 구조체(선형 또는 환형)로서 숙주를 형질전환시킬 수 있거나, 또는 클로닝 벡터로부터 분리되어 그대로 사용되거나 전달 벡터에 도입되어 사용될 수 있다. 전달 벡터는 선택된 숙주 세포 유형 내에 발현 구조체를 도입하여 이를 유지시키는 것을 돕는다. 발현 구조체는 다수의 공지된 유전자 이동계(예컨대 자연 순응성, 화학물질 매개 형질전환, 원형질체 형질전환, 전기천공, 유전자총 형질전환, 형질감염 또는 접합) 중 임의의 것에 의해 숙주 세포에 도입된다(Ausubel et al., 1999; Sambrook et al., 1989). 선택된 유전자 이동계는 선택된 숙주 세포와 벡터계에 의존적이다.

[0180] 예를 들어 발현 구조체는 원형질체 형질전환 또는 전기천공에 의해 에스.세레비지아에 세포에 도입될 수 있다. 에스.세레비지아에의 전기천공은 용이하게 달성되며, 그 결과 세포벽불완전체거균(spheroplast) 형질전환과 거의 동일한 형질전환 효율을 보이게 된다.

[0181] 본 발명은 또한 관심 용합 단백질을 분리하기 위한 제조 방법을 제공한다. 이 방법에 있어서, 조절 서열에 작동 가능하도록 연결된, 관심 단백질을 암호화하는 핵산이 내부에 도입된 숙주 세포(예컨대 효모, 진균, 곤충, 세균 또는 동물 세포)는 관심 용합 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 전사가 자극되는 배양 배지 중에서 생산 규모로 성장한다. 이후 관심 용합 단백질은 수득된 숙주 세포 또는 배양 배지로부터 분리된다. 배지 또는 수득된 세포로부터 관심 단백질을 분리하기 위해 표준 단백질 정제 기술이 사용될 수 있다. 구체적으로 정제 기술은 원하는 용합 단백질을 다양한 도구, 예컨대 회전병, 스피너 플라스크, 조직 배양 평판, 생물반응기 또는 발효조로부터 대규모로(즉 적어도 밀리그램 단위의 양만큼) 발현 및 정제하기 위해 사용될 수 있다.

[0182] 발현된 단백질 용합 복합체는 공지의 방법에 의해 분리 및 정제될 수 있다. 통상적으로 배양 배지는 원심분리 또는 여과되고, 이후 상청액은 발현된 용합 복합체와 결합하는 모노클로날 항체를 사용하는 것을 포함하는 면역친화성 프로토콜, 또는 친화성 또는 면역친화성 크로마토그래피, 예컨대 단백질-A 또는 단백질-G 친화성 크로마토그래피에 의해 정제된다. 본 발명의 용합 단백질은 공지의 기술들을 적당히 병행하여 분리 및 정제될 수 있다. 이러한 방법들로서는, 예를 들어 용해도를 이용하는 방법, 예컨대 염 침전법 및 용매 침전법, 분자량의 차이를 이용하는 방법, 예컨대 투석, 한외여과, 겔여과 및 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동법, 전기적 하전량의 차이를 이용하는 방법, 예컨대 이온 교환 컬럼 크로마토그래피, 특이적 친화성을 이용하는 방법, 예컨대 친화성 크로마토그래피, 소수성의 차이를 이용하는 방법, 예컨대 역상 고성능 액체 크로마토그래피, 그리고 등전점 차이를 이용하는 방법, 예컨대 등전점 맞춤 전기영동, 금속 친화성 컬럼, 예컨대 Ni-NTA를 이용하는 방법을 포함한다. 일반적으로 이러한 방법에 관하여 개시되어 있는 문헌(Sambrook et al.(상동) 및 Ausubel et al.(상동))을 참조한다.

[0183] 본 발명의 용합 단백질은 실질적으로 순수한 것이 바람직하다. 즉, 본 용합 단백질은 자연에서 이를 수반하는 세포 대체물(cell substituent)로부터 분리되고, 이로써 용합 단백질은, 바람직하게 적어도 80%(w/w) 또는 90%(w/w) 또는 95%(w/w)의 균질성을 보이며 존재한다. 적어도 98%(w/w) 내지 99%(w/w)의 균질성을 보이는 용합



단백질이 다수의 약학적 응용, 임상 응용 및 연구적 응용에 가장 바람직하다. 융합 단백질이 일단 실질적으로 정제되면, 이 단백질에는 치료적 응용을 위하여 오염물이 실질적으로 존재하지 않아야 한다. 가용성 융합 단백질이 일단 부분적으로나 실질적으로 순수한 상태로 정제되면, 이 단백질은 치료적으로 사용될 수 있거나, 또는 본원에 개시된 바와 같이 시험관 내 또는 생체 내 검정을 수행하는데 사용될 수 있다. 실질적 순도는, 다양한 표준적 기술, 예컨대 크로마토그래피 및 겔 전기영동에 의해 측정될 수 있다.

[0184] 본 융합 단백질 복합체는, 암성이거나 감염되었거나 하나 이상의 질환에 의해 감염성을 보이게 될 수 있는 여러 세포와 함께 시험관 내 또는 생체 내에서 사용되기 적합하다.

[0185] 인간의 인터루킨-15(IL-15)는, 항원 제시 세포상에 발현되는 인간 IL-15 수용체  $\alpha$  사슬(huIL-15R  $\alpha$ )에 의하여 면역 효과기 세포에 경유 제시(trans-presenting)된다. IL-15R  $\alpha$ 는, 주로 세포의 스시 도메인(huIL-15R  $\alpha$  Su)을 통하여 높은 친화도(38 pM)로 huIL-15와 결합한다. 본원에 기술된 바와 같이 huIL-15 및 huIL-15R  $\alpha$  Su 도메인은 다중 도메인 융합 복합체를 구성하기 위한 스캐폴드로서 사용될 수 있다.

[0186] IgG 도메인, 구체적으로 Fc 단편은 승인된 생물의약품을 비롯하여 다수의 치료용 분자에 대한 이량체 스캐폴드로서 성공적으로 사용된 바 있다. 예를 들어 에타너셉트는 가용성 인간 p75 종양 괴사 인자- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 수용체(sTNFR)가, 인간 IgG1의 Fc 도메인에 결합되어 있는 이량체이다. 이와 같은 이량체화는 TNF- $\alpha$  활성 억제에 대해 에타너셉트로 하여금 단량체 sTNFR보다 1000배 이하로 더 강력하게 될 수 있도록 만들고, 단량체 형태의 혈청 중 반감기보다 5배 더 긴 혈청 중 반감기를 융합체에 제공한다. 결과적으로 에타너셉트는 TNF- $\alpha$ 의 생체 내 전염증 활성을 중화하고, 다수의 상이한 자가면역성 적응증에 대한 환자의 치료결과를 개선하는데 효과적이다.

[0187] Fc 단편의 이량체화 활성에 더하여, 이 Fc 단편은 또한 보체 활성화와 자연살해(NK) 세포, 호중구, 식세포 및 수지상 세포 상에 제시되는 Fc  $\gamma$  수용체와의 상호작용을 통해 세포독성 효과기 기능도 제공한다. 항암 치료 항체 및 기타 항체 도메인-Fc 융합 단백질에 관한 내용 중, 이러한 활성은 동물 종양 모델 및 암 환자에서 관찰되는 효능에 중요한 역할을 담당할 수 있을 것이다. 그러나 이와 같은 세포독성 효과기 반응은 다수의 치료적 응용에 있어 충분치 못할 수 있다. 그러므로 Fc 도메인의 효과기 활성을 개선 및 증진하고, 세포분해성 면역 반응, 예컨대 T 세포 활성을 표적화된 치료 분자를 통해 질환 부위에 보충하는 기타 수단을 개발하는 것에 상당한 관심이 모아지고 있다. IgG 도메인은 전통적인 하이브리도마 융합 기술에 의해 생성된 생성물의 품질과 양을 개선/증가시키기 위해 이중 특이적 항체를 생성하기 위한 스캐폴드로서 사용되어 왔다. 비록 이 방법은 다른 스캐폴드의 단점들을 우회하지만, 포유동물 세포에서 이중 특이적 항체를 임상 개발 및 사용을 지원하기 충분한 수준으로 제조되는 것은 어려운 일이었다.

[0188] 인간 유래 면역자극성 다량체 스캐폴드를 개발하고자 하는 노력으로, 인간 IL-15(huIL-15) 및 IL-15 수용체 도메인이 사용되었다. huIL-15는, huIL-15 수용체  $\alpha$ -사슬(huIL-15R  $\alpha$ )과 높은 결합 친화도(평형 해리 상수 (KD) 약  $10^{-11}$  M)로 결합하는, 시토카인의 소형 4중  $\alpha$ -나선 묶음(bundle) 과의 일원이다. 생성된 복합체는 이후 T 세포 및 NK 세포 표면에 제시되는 인간 IL-2/15 수용체  $\beta$ /공통  $\gamma$  사슬(huIL-15R  $\beta$   $\gamma$  C) 복합체들에 경유 제시된다. 이 시토카인/수용체 상호작용을 통해 바이러스 감염 세포 및 악성 세포를 근절하는데 중요한 역할을 담당하는 효과기 T 세포와 NK 세포의 증식 및 활성화가 초래된다. 보통 huIL-15 및 huIL-15R  $\alpha$ 는 수지상 세포 내에서 함께 생성되어, 추후 세포 내에 이중이량체 분자로서 분비되어 세포 표면에 제시되는 복합체를 이룬다. 그러므로 huIL-15 및 huIL-15R  $\alpha$  상호작용의 특성들은, 이와 같은 사슬간 결합 도메인이 인간 유래 면역자극 스캐폴드로서 사용되어, 표적 특이적 결합이 가능한 가용성 이량체 분자를 형성함을 암시한다.

[0189] 이하에 상세히 기술된 바와 같이, huIL-15:huIL-15R  $\alpha$  Su 기반 스캐폴드는 2B8T3M을 제조하는데 사용되었다. 이 이량체 융합 단백질 복합체는 이의 huIL-15 도메인들과 결합 도메인들의 면역자극 및 표적 특이적 생물 활성을 보유하였는데, 이 점은 huIL-15 및 huIL-15R  $\alpha$ 의 부가가 융합 도메인들의 공간적 배열을 유의미하게 변경시키지 않았고, 시토카인 활성화에 영향을 미치지 않으면서 형태상의 가요성을 적당한 정도로 제공하였음을 말해주는 것이다. 그러므로 이 스캐폴드는 다가 융합 복합체, 예컨대 2B8T3M을 형성하여, 분자의 전체 결합 친화성을 증가시키는데 사용될 수 있었다. 가용성 융합 단백질은 제조용 CHO 세포 배양액 중에서 비교적 높은 수준(과도한 세포주 스크리닝 또는 최적화 없이도 세포 배양 상청액 1 리터당 mg 단위)으로 제조되었으며, 세포 배양 상청액으로부터 용이하게 정제될 수 있었다.

[0190] 본 발명의 실시에는, 달리 명시되지 않은 한, 당 업자의 이해범위 내에서 널리 알려진 종래의 분자 생물학 기술(재조합 기술 포함), 미생물학 기술, 세포 생물학 기술, 생화학 기술 및 면역학 기술이 사용된다. 이러한 기술은 문헌(예컨대 "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in

Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991))에 상세히 설명되어 있다. 이러한 기술은 본 발명의 폴리뉴클레오티드와 폴리펩티드의 제조에 적용될 수 있으며, 마찬가지로 본 발명을 제조하고 실시하는 데에도 사용될 수 있다. 특정 구현예들에 특히 유용한 기술은 이하 문단들에서 논의될 것이다.

[0191] 이하 실시예들은 본 발명의 검정, 스크리닝 및 치료 방법이 어떻게 실시되고 이용되는지에 대한 완전한 개시 및 설명을 당업자들에게 제공하기 위해 제시되는 것이지, 본 발명의 발명자들이 자신들의 발명이라고 간주하는 것에 대한 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다.

[0192] 림프종

[0193] 림프종은 B 림프구 또는 T 림프구가 정상 세포보다 더 빠르게 분열하고, 의도된 시간보다 더 오래 생존할 때 발생하는 혈액 암의 한 유형이다. 예를 들어 B 림프구는 호지킨 림프종과 대부분의 비호지킨 림프종 둘 다를 포함한다. B 림프종은 CD20을 발현한다.

[0194] 림프종은 림프절, 비장, 골수, 혈액 또는 기타 장기에서 발달할 수 있다. 이러한 악성 세포는 종종 림프절에서 기원하여, 소절의 비대(즉 림프양 세포의 고형 증양)를 초래하기도 한다. 림프종은 림프절 생검(즉 림프절의 일부 또는 전부를 절개하여 현미경으로 검사하는 것)에 의해 제한적으로 진단된다. 이러한 검사는, 림프종을 나타낼 수 있는 병리조직학적 특징들을 규명할 수 있다. 치료는 화학요법, 방사선요법 및/또는 골수 이식을 수반할 수 있다.

[0195] 실시예 1: T3 융합 단백질의 제조 및 정제

[0196] 이하에 상세히 기술되어 있는 바와 같이, 항 CD3 scAb/huIL-15N72D 및 항 CD20 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc를 포함하는 단백질 복합체가 제조되었다. 이 복합체는 항 CD20 scAb 도메인을 통해 B 세포 림프종을 인지하고, IL-15 활성을 통해 NK 세포 및 T 세포 반응을 유도하며, 항 CD3 scAb 도메인을 통해 T 세포 반응을 활성화하고, Fc 결합 도메인을 통해 ADCC 및 CDC를 자극한다(도 2).

[0197] 구체적으로 구조체는 huIL-15N72D 사슬에 단일 사슬 항 인간 CD3 항체를 결합함으로써 제조되었다. 항 인간 CD3 단일 사슬 항체(항 CD3 scAb) 서열은, 가요성 링커 서열을 통해 결합된, OKT3 항체의 중쇄 및 경쇄 V 도메인들의 암호화 영역들을 포함한다. 몇몇 경우들에서, 항 CD3 scAb는 huIL-15N72D의 C-말단에 결합된다. 다른 경우들에서, 항 CD3 scAb는 huIL-15N72D의 N-말단에 결합된다. 항 CD3 scAb가 huIL-15N72D의 N-말단에 결합되어 포함되어 있는 구조체의 핵산 및 단백질 서열이 이하에 제시되어 있다.

[0198] (신호 펩티드 서열과 종결 코돈을 포함하여) 항 CD3 scAb-IL-15N72D 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 1):

[0199] (신호 서열)

[0200] ATGGAGACAGACACTCTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCACCGGT-

[0201] (항 CD3 scAb (OKT3 VL-링커 VH scFv))

[0202] CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGAAGTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGGCAGTGGGTCTGGGACCCTTACTCTCTCACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTACGTTTCGGCTCGGGG

[0203] (링커)

[0204] ACAAAGTTGAAATAAACCGGACTAGTGGAGGTGGCGGATCAGGAGGCGGAGGTTCTGGCGGAGGTGGGAGTCTCGAGCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGGTACACGATGCATGGGTAAAACAGAGGCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCTAGCCGTGGTTATACTAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACTGCCTTGACTACTGGGGCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA-

[0205] (인간 IL-15N72D)

[0206] AACTGGGTAAACGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCCACT

TKCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAAATCTGATCATC  
CTAGCAAACGACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAAGAATTTTGCAGAGT  
TTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTAA

[0207] (신호 펩티드 서열을 포함하여) 항 CD3 scAb-IL-15N72D 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열 번호 2):

[0208] (신호 펩티드)

[0209] METDTLLLWVLLLWVPGSTG-

[0210] (항 CD3 scAb (OKT3 VL-링커 VH scFv))

[0211] QIVLTQSPAIMASPGKEVTMTCSASSSVSYMNWYQQSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSG

[0212] (링커)

[0213] TKLEINRTSGGGSGGGSGGGGSLEQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSS  
STAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS-

[0214] (인간 IL-15N72D)

[0215] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCVKVTAMKCFLELQVISLESGLDASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGKCECEELEEKNIKEFLQS  
FVHIVQMFINTS

[0216] 서열은 이미 기술된 바와 같이 발현 벡터에 클로닝되었고(미국 특허 제8,507,222호, 실시예 1 및 2; 본원에 참  
조로 인용되어 있음), 이 발현 벡터는 CHO 세포를 형질감염시켰다. 세포는 또한 항 CD20 scAb/huIL-15R α  
Su/huIgG1 Fc 구조체를 발현하는 벡터로도 형질감염되었다(미국 특허 제8,507,222호, 실시예 18; 본원에 참조로  
인용되어 있음).

[0217] (선도 서열을 포함하여) 항 CD20 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 3):

[0218] (선도 서열)

[0219] ATGGATTTTCAGGTGCAGATTATCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCTTCAGT

[0220] CATAATGTCCAGAGGA

[0221] (항 CD20 경쇄 V 도메인)

[0222] CAAATGTTCTCTCCAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCAATGACTTGCAAGGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATCCACTGG  
TTCCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACCTGGATTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACT  
TCTTACTCTCTCACAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGACTAGTAACCCACCCACGTCGGAGGGGGGACCAAG  
CTGGAATCAAA

[0223] (링커)

[0224] AGTGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

[0225] (항 CD20 중쇄 V 도메인)

[0226] CAGGTACAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATG  
CACTGGGTAAACAGACACCTGGTCGGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTTATCCCGAAATGGTGATACTTCTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAAGGCC  
ACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTAC  
GGCGGTGACTGGTACTTCTATGTCTGGGGCGCAGGGACACGGTCACMGTTCTCTGCA

[0227] (인간 IL-15R α 스시 도메인)

[0228] ATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTAAGTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAAGTCTGGTTTCAAG  
CGTAAAGCCGGCAGCTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTGAACAAGGCCAGCAATGTCGCCCACTGGACAACCCCAAGTCTCAAATGCATTAGA

[0229] (인간 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 도메인)

[0230] GAGCCGAAATCTTGTGACAAAATCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGAC

ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG  
GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG  
GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG  
CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG  
CAGCCGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG  
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGTAAATAA

[0231] (선도 서열을 포함하여) 성숙한 항 CD20 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열 번호 4):

[0232] (항 CD20 경쇄 V 도메인)

[0233] QIVLSQSPAILSASPEKVTMTCRASSSVSYIHWFKQKPGSSPKPWYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGGTK  
LEIK

[0234] (링커)

[0235] SGGGSGGGSGGGSGGGS

[0236] (항 CD20 중쇄 V 도메인)

[0237] QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYY  
GGDWYFNVWGAGTTTVSA

[0238] (인간 IL-15R α 스시 도메인)

[0239] ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPLKCI R

[0240] (인간 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 도메인)

[0241] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ  
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0242] (선도 펩티드를 포함하는) 예시적 IL-15N72D 아미노산 서열이 이하에 제공되어 있다(서열 번호 5):

[0243] (선도 펩티드)

[0244] METDTLLLWVLLLWVPGSTG-

[0245] (IL-15N72D)

[0246] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCVKTAMKCFLELQVLSLESGDASIHDTVENLI ILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQS  
FVHIVQMFINTS

[0247] 몇몇 경우들에서, 선도 펩티드는 성숙한 IL-15N72D 폴리펩티드로부터 절단된다.

[0248] (선도 펩티드를 포함하는) 예시적 IL-15R α Su/Fc 아미노산 서열이 이하에 제공되어 있다(서열 번호 6):

[0249] (선도 펩티드)

[0250] MDRLTSSFLLLIVPAYVLS-

[0251] (IL-15R α Su)

[0252] ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPLKCI R-

[0253] (IgG1 CH2-CH3 (Fc) 도메인))

[0254] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ  
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0255] 몇몇 경우들에서, 성숙한 IL-15R α Su/Fc 단백질은 선도 서열이 결여되어 있다.

[0256] CHO 세포 내 2개의 구조체의 공동 발현은, 단백질 A 친화성 크로마토그래피가 사용되어 CHO 세포 배양 상청액으



로부터 정제된, 가용성 항 CD3 scAb/huIL-15N72D:항 CD20 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 복합체(항 CD3 scAb-항 CD20 scAb T3M; 2B8T3M이라 지칭됨)의 형성 및 분비를 허용하였다. 정제된 단백질의 SDS-PAGE 분석 결과는 도 3에 제시되어 있다. 가용성 항 CD20 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 항 CD3 scAb/huIL-15N72D 단백질에 상응하는 밴드들은 각각 약 60 kDa 및 약 40 kDa에서 관찰되었다.

[0257] 실시예 2: T3 분자의 결합 활성에 관한 시험관 내 특성규명

[0258] ELISA 기반 방법은, 항 CD3 scAb/huIL-15N72D:항 CD20 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 복합체의 형성을 확인하였다. 일 실시예에서, 이 융합 단백질 복합체는, 포착 항체, 항 human IgG 항체(Jackson ImmunoResearch), 검출 항체, 바이오틴화 항 인간 IL-15 항체(BAM 247, R&D Systems)와 함께 huIgG1/huIL15) 특이적 ELISA가 사용되어 검출되었다.

[0259] 또한, 복합체와 Fc 수용체, IL-15 β γ 수용체, CD3 및 CD20의 결합은 수용체 보유 세포가 사용되는 유세포분석에 의해 평가되었다. 이 연구에 있어서, Fc 수용체 양성 U937 및 IL-15R β γ 양성 32D β 세포(시험당  $5 \times 10^5$  개 세포)는 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC) 표지화 항 CD3 scAb-항 CD20 scAb T3M (시험당 4 μg, 100 μL)로 염색되었다. 도 3에 보인 바와 같이, 유세포분석은 U937 세포 및 32D β 세포와 항 CD3 scAb-항 CD20 scAb T3M 복합체(2B8T3M)의 결합을 입증하였다. 이러한 결합의 특이성은, Fc 도메인 함유 미표지 차단 시약(항 CD20 Ab: 리툭산) 또는 IL-15 도메인 함유 미표지 차단 시약(IL-15N72D/IL-15R-Fc: ALT-803)을 시험당 80 μg씩 세포 염색 검정에 첨가함으로써 시험되었다(도 3). "ALT-803"이란, IL-15N72D가 이량체 IL-15R α Su/Fc 융합 단백질과 비공유 결합된 채 포함되어 있는 복합체를 의미하는데, 여기서 상기 복합체는 면역 자극 활성을 보인다(예를 들어 본원에 참조로 인용된 U.S.S.N. 13/769,179 참조). 이러한 시약들은 Fc 수용체 양성 U937 세포 및 IL-15R β γ 양성 32D β 세포의 FITC-2B8T3M 특이 염색을 감소시켰다(도 4).

[0260] 그 다음, 이 복합체가 수용체 보유 인간 말초혈액단핵구세포(PBMC)와 결합할지 여부가 확인되었다. 인간 PBMC (시험당  $5 \times 10^5$  개 세포)는, 차단 시약[리툭산은 CD20 결합을 차단하기 위한 것이고, cOKT3(키메라 OKT3 Ab)는 CD3 결합을 차단하기 위한 것이며, ALT-803은 IL-15 수용체 결합을 차단하기 위한 것임]의 존재(시험당 50 μg) 하에, 그리고 부재 하에 FITC 표지화 2B8T3M(시험당 2 μg, 140 μL)으로 염색되었다. 적당한 항체에 의한 염색은, PBMC 집단 중 CD20 보유 HLA-DR<sup>+</sup> B 세포, CD3 보유 CD8<sup>+</sup> T 세포 및 IL-15R 보유 CD16<sup>+</sup> NK 세포를 동정하였다. 각각의 경우에 있어서, 차단 시약에 의한 억제 및 염색이 이루어졌음을 바탕으로 이러한 세포에 대한 FITC 표지화 2B8T3M 복합체의 특이적 결합이 관찰되었다(도 5).

[0261] 실시예 3: T3M 복합체의 생물 활성에 관한 특성규명

[0262] 항 CD3 scAb-항 CD20 scAb T3M 복합체(2B8T3M)로써, IL-15R β γ 양성 32D β 세포의 증식을 기반으로 한 IL-15 생물활성 검정이 수행되었다. IL-15 의존적 세포( $1 \times 10^4$  개 세포/웰)가, 37℃ 및 (2B8T3M의 양이 점진적으로 증량되는) RPMI:10% FBS 매질 200 μL 중에서 항온처리되었다. 3일 후 WST-1(수용성 테트라졸륨 염) 증식 시약이 첨가되었다(10 μL/웰). 4 시간 후 450 nm에서 흡광도가 측정되었으며, 이로써 대사 활성 세포에 의한 WST-1의 가용성 포르마잔 염료로의 분해를 바탕으로 세포 증식 여부가 확인되었다. ALT-803 및 항 CD20 scAb T2M 복합체(2B8T2M)의 생물활성이 양성 대조군으로서 평가되었다. "2B8T2M"이란, 가용성 항 CD20 scAb/huIL-15N72D:항 CD20 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 복합체를 의미한다(예컨대 본원에 참조로 인용된 미국 특허 제8,507,222호 참조). 도 6에 보인 바와 같이, 2B8T3M은 32D β 세포의 세포 증식을 촉진할 수 있었으며, 이로써 IL-15의 활성이 입증되었다. 2B8T3M의 활성은, 2B8T2M의 활성에 약간 못 미쳤지만, ALT-803의 활성에는 유의미하게 못 미쳤는데, 이는 아마도 항 CD3 scAb와 IL-15N72D 도메인이 결합하였기 때문일 것이다.

[0263] 실시예 4: T3M 복합체의 항 종양 활성

[0264] 그 다음, 항 CD3 scAb-항 CD20 scAb T3M 복합체가 CD3-매개 T 세포 활성화를 통하여 CD20<sup>+</sup> 종양 세포(Daudi 세포)를 사멸시킬 수 있었는지 여부가 확인되었다. 인간 말초혈액단핵구세포가 공여자 혈액의 연충으로부터 분리되었다. 세포를 나일론 울 컬럼에 통과시킴으로써 자연 살해(NK) 세포 및 T 세포가 농축되었다. CD4 및 CD8 T 세포는 MACS 컬럼이 사용되는 자성 비드 분리법에 의해 정제되었다. 인간 면역 효과기 세포( $1 \times 10^6$  개/웰)가, Violet CellTrace 표지화 Daudi 표적 세포( $2 \times 10^5$  개/웰)(E:T = 5:1) 및 다양한 농도의 항 CD3 scAb-항 CD20 scAb T3M 복합체와 혼합되었다. 대조군으로서 가용성 항 CD20 scAb/huIL-15N72D:항 CD20 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 복합체(항 CD20 scAb T2M)(CD3 인지능 결여)가 사용되었다. 37℃에서 RPMI-10% FBS 중 20 시간

동안 항온처리 후, 세포는 수집되어 요오드화프로피듐(PI)(최종 농도 10  $\mu\text{g/ml}$ )으로 염색되었다. 세포는 FACSVerse 세포측정기가 사용되는 유세포측정법에 의해 분석되었다. Daudi 표적 세포는 바이올렛 표지화된 세포 인 것으로 확인되었고, 사멸한 Daudi 표적 세포는 바이올렛 PI 염색된 세포였다. 사멸한 Daudi 세포 %는 CD20 표적 특이 세포독성에 대한 척도로서 측정되었다.

[0265] 도 7에 보인 바와 같이, 항 CD3 scAb-항 CD20 scAb T3M(2B8T3M) 복합체 및 항 CD20 scAb T2M(2B8T2M) 복합체 둘 다는, 인간 PBMC 및 T 세포 + NK 세포에 의해 강력한 CD20 세포 특이 세포독성을 매개할 수 있었다. 그러나, 예상외로 2B8T3M은  $\text{CD8}^+$  T 세포와  $\text{CD4}^+$  T 세포를 자극하여(다만 이 경우  $\text{CD4}^+$  T 세포는  $\text{CD8}^+$  T 세포보다 덜 자극됨), 2B8T2M이 Daudi 세포를 사멸하는 수준보다 더 효과적인 수준으로 Daudi 세포를 사멸할 수 있었다. 이러한 결과들은, 2B8T3M이 종양 세포에 대한 CD3 양성 T 세포의 세포독성을 효과적으로 증진시킬 수 있음을 입증하는 것이다.

[0266] 이와 같은 인간 면역 세포-Daudi 세포 배양액 중 인터페론- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )의 방출을 기반으로 한 면역 활성화 수준 이 ELISA에 의해 측정되었다. 도 8에 보인 바와 같이, 예상 외로 2B8T3M(10 nM)은 인간 PBMC와,  $\text{CD4}^+$  및  $\text{CD8}^+$  T 세포로부터의 IFN- $\gamma$  방출을 2B8T2M보다 더 효과적으로 자극할 수 있었는데, 이는 CD3 결합 도메인을 통한 면역 세포 활성화를 입증해준다.

[0268] \*본원에 제시된 시험관 내 결과들을 바탕으로 하였을 때, 항 CD20 scAb T3M 분자는 표준 이중이식 종양 모델에서 면역 반응을 자극하였고, 인간 림프종 세포에 대한 항종양 활성을 보였다(예를 들어 Rossi *et al.* Blood 2009;114:3864; Gillis *et al.* Blood. 2005;105:3972; and Xuan *et al.* Blood 2010;115:2864-2871 참조).

[0269] scAb 또는 항체 인지 도메인들을 포함하는 유사 T3M 구조체들은, 다른 CD 항원, 시토카인 또는 케모카인 수용체 또는 리간드, 성장 인자 수용체 또는 리간드, 세포 부착 분자, MHC/MHC-유사 분자, Fc 수용체, Toll-유사 수용체, NK 수용체, TCR, BCR, 양성/음성 보조자극 수용체 또는 리간드, 사멸 수용체 또는 리간드, 종양 연관 항원, 바이러스 암호화 및 세균 암호화 항원에 특이적인 항체 서열과, 세균 특이적 항체 서열로 용이하게 제조될 수 있었다. CD4, CD19, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44, CD51, CD52, CD70, CD74, CD80, CD123, CD152, CD147, CD221, EGFR, HER-2/neu, HER-1, HER-3, HER-4, CEA, OX40 리간드, cMet, 조직 인자, Nectin-4, PSA, PSMA, EGFL7, FGFR, IL-6 수용체, IGF-1 수용체, GD2, CA-125, EpCam, 사멸 수용체5, MUC1, VEGFR1, VEGFR2, PDGFR, Trail R2, 엽산염 수용체, 안지오펜이테틴-2, 알파 $\nu$ 베타3 인테그린 수용체, HLA-DR 항원 및 본원에 기술된 바와 같은 기타 질환 표적들인 항원에 대한, 질환 특이적 결합 도메인(예컨대 scAb)을 가지는 T3M에 특히 관심이 간다. HIV, HCV, HBC, CMV, HTLV, HPV, EBV, RSV 및 기타 바이러스 유래 바이러스 항원에 대한 항체 도메인들, 특히 HIV 외피 스파이크 및/또는 gp120 및 gp41 에피토프를 인지하는 항체 도메인들에도 또한 관심이 간다. 이러한 항체 도메인들은 당 분야에 공지된 서열들로부터 생산될 수 있거나, 또는 당 분야에 공지된 다양한 공급원(즉 척추동물 숙주 또는 세포, 조합 라이브러리, 무작위 합성 라이브러리, 컴퓨터 모델링 등)으로부터 새로이 단리될 수 있다.

[0270] 실시예 5: ALT-803(IL-15 강력 효현제)과 항체의 신규 융합체는 항원 특이적 항 종양 반응을 나타낸다

[0271] 인터루킨(IL)-15와 이의 수용체  $\alpha$  (IL-15R  $\alpha$ )는 항원 제시 세포상에 공동 발현되어, IL-15의 IL-2R  $\beta$   $\gamma_c$  보유 면역 세포에의 경유 및 효과기 면역 반응의 자극을 허용한다. IL-15 강력 효현제(IL-15N72D) 및 세포 외 IL-15R  $\alpha$  스스 도메인(IL-15R  $\alpha$  Su) 간 고 친화성 상호작용은 다가의 질환 표적화 복합체의 디자인을 위한 기능성 스캐폴드를 형성하는데 이용될 수 있었음이 이미 보고되었다. ALT-803으로도 공지된 IL-15N72D:IL-15R  $\alpha$  SuFc 복합체는 IL-15N72D:IL-15R  $\alpha$  Su와 IgG1의 Fc 도메인의 융합에 의해 구성된 다량체인 복합체이다. ALT-803은, 강력한 항 종양 면역치료제로서 개발되었고, 임상 시험 중에 있는 IL-15 강력 효현성 복합체다. 종양 표적화 모노클로날 항체 리톡시맙의 단일 사슬 4개에 융합된 ALT-803 스캐폴드를 이용하여 신규 융합 분자인 2B8T2M을 제조하는 것이 본원에 기술되어 있다. 이 분자는, 종양 세포상 CD20 분자의 인지, 면역 효과기 세포상에 제시되는 IL-2R  $\beta$   $\gamma_c$ 를 통한 자극, 그리고 자연 살해(NK) 세포 및 대식세포상 Fc  $\gamma$  수용체와의 결합을 통해 3중 특이적 결합 활성을 보인다. 2B8T2M은 NK 세포를 활성화하여, 항체 의존적 세포성 세포독성(ADCC)을 증진시키고, 보체 의존적 세포독성(CDC)을 매개하며, B 림프종 세포의 세포사멸을 유도한다. 리톡시맙과 비교되었을 때, 2B8T2M은 이중이식 SCID 마우스 모델에서 유의미하게 더 강력한 항 종양 활성을 보이고, 사이노몰거스 원숭이에서는 B 세포를 더 효율적으로 감소시킨다. 그러므로 ALT-803은 다중 특이적 표적화 IL-15 기반 면역치료제를 생성하기 위한 기능성 스캐폴드로 변형될 수 있고, 치료 항체의 항 종양 활성 및 임상 효능을 개선하는 새로운 플랫폼으로서

사용될 수 있다.

[0272] 인터루킨(IL)-15, 즉 4중 나선형의 공통 감마 사슬( $\gamma_c$ ) 시토카인은 자연 살해(NK) 세포 및  $CD8^+$  T 세포의 발달, 증식 및 활성화에 중요한 인자이다(1,2). IL-15는, 항원 제시 세포에 의해 이의  $\alpha$ -사슬 수용체(IL-15R $\alpha$ )와 공동 발현되고, 2개의 단백질은 세포 표면상에 IL-2R $\beta$   $\gamma_c$  복합체를 보유하는 NK 세포 및 T 세포에 경유 제시되는 복합체를 형성한다(2). IL-15는 IL-15R $\alpha$ 와 높은 친화도로 결합하고, IL-15R $\alpha$ 는 사페론 및 형태 안정화 인자로서의 역할을 하여 IL-15 및 IL-2R $\beta$   $\gamma_c$  사이의 상호작용을 증진시킨다(2). IL-15 변이체는 72번 아미노산에 아스파라긴 → 아스파르트산으로 돌연변이(N72D)가 일어난 것으로 확인되었는데, 이는 면역 세포상 IL-2R $\beta$   $\gamma_c$ 와의 뛰어난 결합능과, 면역자극활성의 증가를 보인다(3). 선행 연구들은, 이 IL-15 변이체가 IgG1 Fc에 대한 가용성 IL-15R $\alpha$  스시 도메인 융합체(IL-15R $\alpha$  SuFc)와 결합할 때, 이중 이량 복합체, 즉 IL-15N72D:IL-15R $\alpha$  SuFc(ALT-803으로 명명됨)를 형성할 수 있었음을 입증하였는데, 이때 상기 복합체는 또한 IL-2R $\beta$   $\gamma_c$  복합체에 대하여 증가한 결합 활성을 보였을 뿐만 아니라, NK 세포 및 T 세포를 자극하는 능력도 증진되었으며, 또한 원산 IL-15의 생물 반감기에 비하여 더 긴 생물 반감기를 보이기도 하였다(4). 다양한 동물 모델에서, ALT-803은 면역계의 원래 가지고 있던 팔(arm) 및 획득한 팔을 동시에 활성화시켜, 신생물형성 공격에 대해 신속하고 오래 지속되는 방어 반응을 유도할 수 있는 강력한 면역자극제로서의 역할을 한다(5). 게다가 ALT-803은 관문 봉쇄 항체 또는 치료 항체와 함께 사용되었을 때, 종양 크기(tumor burden)를 감소시키고, 마우스 종양 모델의 생존을 연장하는데 효과적이다(6, 7). 질환을 공격하는데 더욱 특이적이고 효율적인 ALT-803 기반 분자를 제조하기 위해, ALT-803을 IL-15R $\alpha$  SuFc 단백질 및 IL-15N72D의 N-말단에서 단일 사슬 항체(scFv)와 유전적으로 융합함으로써, 이 ALT-803은 표적화 면역치료제로 전환되었다. 이와 같은 연구에서, 항 CD20 scFv는 ALT-803이 질환 표적화 면역자극 분자를 제조하는데 있어 다용도의 기능성 스캐폴드임을 입증하기 위한 표적 인지 도메인으로 사용되었다. 이와 같은 신규의 단일 융합 단백질 접근법은, 또한 항 CD20 치료 항체 리툽시맙의 항체 의존적 세포성 세포독성(ADCC) 및 세포자멸 기능을 개선하는 것으로 확인되었다.

[0273] IL-15:IL-15R $\alpha$  스캐폴드를 사용한 다기능성 단백질 복합체의 제조

[0274] 생물 활성 융합 단백질 복합체가 IL-15:IL-15R $\alpha$  Su 스캐폴드를 사용하여 IL-15 및 IL-15R $\alpha$  Su 단백질의 N-말단을 p53(264-272) 특이적 키메라 단일 사슬 TCR(c264scTCR)에 융합함으로써 제조될 수 있음은 이미 보인 바 있다(8). 그러므로, ALT-803(즉 IL-15N72D:IL-15R $\alpha$  SuFc 복합체)도 또한 다중 특이적 IL-15 기반 표적화 면역치료제를 제조하기 위한 단백질 스캐폴드로서 작용할 수 있다는 가설이 세워졌다. 이를 시험하기 위해, 리툽시맙의 중쇄 및 경쇄 가변 영역들은 scFv(sc2B8)로 전환되었고(9), ALT-803을 구성하는 IL-15N72D 및 IL-15R $\alpha$  SuFc 단백질들의 N-말단에 sc2B8이 유전적으로 융합되었다. IL-15N72D 도메인 및 IL-15R $\alpha$  Su 도메인 간 큰 결합 친화성을 바탕으로 하였을 때, 융합 단백질은 sc2B8-IL-15N72D 및 sc2B8-IL-15R $\alpha$  SuFc 간에 이중 이량 복합체를 형성할 것으로 예상되었다. 게다가 sc2B8-IL-15R $\alpha$  SuFc는 Fc 도메인에 의해 제공되는 이황화 결합을 이용하여 공유 이량체를 형성할 것으로 예상되었다. 그러므로 이러한 신규의 융합 단백질 복합체(2B8T2M으로 명명됨)는 2개의 sc2B8-IL-15N72D 단백질과 2개의 sc2B8-IL-15R $\alpha$  SuFc 단백질로 이루어져 있을 것으로 예상되었다(도 9a). 융합 단백질 발현 벡터의 CHO 세포로의 안정적 공동 형질감염 이후, 가용성 2B8T2M은 용이하게 제조되어 세포 배양 상청액으로부터 정제되었다(10 mg/리터 내지 40 mg/리터). 정제된 제조물이 환원 SDS-PAGE에 의해 평가될 때, 이 제조물은 약 40 kDa 및 약 60 kDa로 이동하였던 단백질 2개로 이루어져 있었으며(도 9b), 이 분자량들은 각각 sc2B8-IL-15N72D(38 kDa) 및 sc2B8-IL-15R $\alpha$  SuFc(59 kDa)의 예상 분자량들에 상응하였다. 또한 다량체 융합 단백질 복합체의 형성은 크기별 배제 크로마토그래피(단백질 크기 표준을 바탕으로 2B8T2M의 분자 질량이 162 kDa임을 규명)에 의해 입증되었다(도 9c). 2B8T2M 이외에도, Fc 수용체 결합 활성이 감소한 돌연변이Fc 도메인(2B8T2M-LA)(10) 또는 IL-2R $\beta$ 와 결합할 수 없는 돌연변이IL-15 도메인(2B8T2M-D8N) 중 어느 하나를 함유하는 유사 융합 단백질 복합체가 제조되었다. 상이한 표적화 도메인(c264scTCR(8))을 포함하는 추가의 융합 단백질 복합체(c264T2M라 명명)는 IL-15N72D 단백질 및 IL-15R $\alpha$  SuFc 단백질의 N-말단들에 유전적으로 융합되었다. 이러한 복합체는 2B8T2M의 생물 활성에 있어서 Fc, IL-15N72D 및 sc2B8 도메인들의 역할을 분석하기 위한 대조군으로 사용되었다.

[0275] 2B8T2M은 CD20 결합, Fc 수용체 결합 및 IL-15 생물 활성을 보유한다

[0276] CD20 결합 특성을 입증하기 위해, FITC 표지화된 2B8T2M 및 리툽시맙이 제조되어, 인간 HLA-DR+ B 세포를 염색하는데 사용되었다. 결과는, 인간 B 세포가 FITC 표지화된 리툽시맙과 결합할 수 있었음(도 10a)과, FITC 표지화된 2B8T2M과도 결합할 수 있었음(도 10b)을 보여준다. 이와는 대조적으로, 이러한 분자들에 대한 CD20 특이적



결합 활성은 미표지화 리톡시맵과 미표지화 2B8T2M에 의해 차단되었지만, 비특이적 인간 IgG에 의해서는 차단되지 않았다. 이러한 발견들은, 2B8T2M이 리톡시맵의 CD20 특이적 결합 활성을 보유함을 입증한다. 이와 유사하게, 세포 표면상에 Fc 수용체는 보유하지만 CD20이나 IL-2R $\beta$   $\gamma$ C는 보유하지 않는 인간 조직구 림프종 U937 세포주는, 2B8T2M의 Fc 수용체 결합을 유세포분석에 의해 평가하는데 사용되었다. 도 10c에 보인 바와 같이, 2B8T2M 및 리톡시맵은 둘 다 U937 세포와 결합할 수 있었지만, Fc 돌연변이 2B8T2M-LA 복합체는 2B8T2M에 비하여 감소한 결합능을 보였다.

[0277] 이전 보고에서는, scTCR-IL-15N72D 및 scTCR-IL-15N72D:scTCR-IL-15R $\alpha$  Su 융합 복합체가 IL-15 생물 활성을 보유하긴 했지만, IL-15의 원래 생물 활성에 비하여는 그 수준이 감소하였다고 되어 있다(3, 8). 이처럼 감소한 활성은 아마도 융합된 scTCR 도메인과 IL-15N72D:IL-2R $\beta$   $\gamma$ C 상호작용 간 입체 장애때문인 것으로 추정된다. 2B8T2M의 IL-15 생물 활성을 평가하기 위하여, IL-15 의존적 세포주인 32D $\beta$ 가 앞서 기술된 바와 같이 사용되었다(3). 결과는, 2B8T2M이 32D $\beta$  세포 증식을 지원하였지만, 원산 IL-15 또는 ALT-803에 비하여는 유의미하게 더 낮은 활성을 보였음을 입증한다(IL-15에 대한 2B8T2M의 EC50 = 889 pM: IL-15에 대한 ALT-803의 EC50=34 pM: IL-15에 대한 2B8T2M의 EC50=14 pM). 중합하였을 때, 이와 같은 발견은, 2B8T2M이 리톡시맵의 CD20- 및 Fc-수용체 결합 능뿐만 아니라 IL-15 생물 활성을 보유함을 입증한다.

[0278] 2B8T2M은 보체 의존적 세포독성(CDC)을 매개할 수 있을 뿐만 아니라 CD20+ B 림프종 세포의 세포자멸을 유도하기도 한다

[0279] 항 CD20 항체는, 이것이 CD20과 함께 변별적 복합체를 형성하는 능력과, B 세포상 상이한 기능상의 활성을 매개하는 능력을 바탕으로, 2개의 군, 즉 제I형(리톡시맵 유사) 및 제II형(토시투모맵 유사)으로 분류되었다(10). B 세포와 제I형 항체의 결합은, CD20의 지질 유동 섬으로의 재분배 및 클러스터 형성을 초래하고, 이로 말미암아 더욱 강력한 C1q-결합 및 강력한 CDC 유도가 달성되지만, 직접 항체 매개 세포 사멸의 수준은 낮아졌다(즉 세포자멸 활성)(10). 이와는 대조적으로, 제II형 항체는 지질 유동섬에서 CD20을 안정화하지 않으므로, 제I형 항체에 비해 감소한 CDC를 보였지만, 이러한 항체는 리소좀 세포 사멸을 강력하게 유도하였다. 리톡시맵은 제I형 항 CD20 mAb로서, 제II형 항 CD20 mAb, 예컨대 토시투모맵의 CDC활성보다 더 큰 CDC 활성과, 예컨대 토시투모맵의 B 림프종 세포의 세포자멸 유도능보다 더 작은 세포자멸 유도능을 보인다(11). 2B8T2M은 리톡시맵의 결합 도메인과 동일한 결합 도메인을 가지고, 유사한 특성을 가질 것으로 예측된다. 이 점을 연구하기 위해, 2B8T2M이 CD20+ Daudi 세포에 대해 CDC를 매개하는 능력이 평가되었다. 도 11a에 보인 바와 같이, Daudi 세포가 2B8T2M (또는 IL-15 돌연변이 2B8T2M-D8N 복합체)와 함께 항온처리될 때, 이 Daudi 세포는 인간 보체 인자들의 존재하에 용해되었다. Fc 돌연변이 2B8T2M-LA 복합체는, 이전 결과들을 바탕으로 하였을 때 이 Fc 돌연변이 도메인을 함유하는 항체에 대해 더 작은 CDC 활성을 보이는 것으로 예상되는 2B8T2M보다 더 작은 CDC 활성을 보였다(10). 그러므로 2B8T2M은 CDC 활성을 보였지만, 리톡시맵보다는 더 낮은 수준으로 보였다. 2B8T2M의 전세포자멸 활성(pro-apoptotic activity)을 평가하기 위해, 2B8T2M을 함유하는 배지 중에서 배양된 Daudi 세포를 대상으로 세포자멸에 대해 분석하였다(어넥신 V 염색 이용). 놀랍게도 0.4 nM ~ 10 nM의 농도 범위에서 2B8T2M은 Daudi 세포의 세포자멸을 유도하기에 효과적이었다(도 11b). 이와는 대조적으로, Daudi 세포에 대하여 거의 동일한 세포자멸 활성을 유도하는 데에는 600배를 초과하게 더 높은 리톡시맵 농도(즉 250 nM)만큼 필요하였다. 이 활성은 또한 Fc-돌연변이 2B8T2M-LA 및 IL-15-돌연변이2B8T2M-D8N 복합체에서도 관찰되었지만(도 11b), c264T2M에서는 그렇지 않았는데, 이 점은, 활성이 CD20 결합에 의존적이었음을 나타낸다. 아울러, 이러한 발견은, 2B8T2M이 제I형 유사 항 CD20 항체 특성과 제II형 유사 항 CD20 항체 특성 둘 다를 보임을 말해주는 것이다.

[0280] 2B8T2M은 리톡시맵에 비하여 월등한 항체 의존적 세포성 세포독성(ADCC)을 보인다

[0281] 제I형 mAb와 제II형 mAb 둘 다는, B 림프종 세포주에 대해 효율적인 Fc 의존적 ADCC를 나타내는 것으로 보인다(11). 그러나 ALT-803과 관련된 이전 연구들에 의해 뒷받침되는 바와 같이, 2B8T2M은 IL-15 매개 면역 세포 활성화를 통하여 이 ADCC 활성을 더 증진시킬 수 있다(7). 따라서 2B8T2M 및 리톡시맵이 CD20+ B 림프종 세포에 대해 ADCC를 유도하는 능력이 비교되었다. 이를 평가하기 위하여, 인간 PBMC가 처음에 효과기 세포로 사용되었고, Daudi 세포는 표적 T 세포로서 사용되었다. 도 12a에 보인 바와 같이, 2B8T2M은, PBMC에 의해Daudi 세포에 대한 ADCC를 유도함에 있어 리톡시맵보다 유의미하게 더 유효하였다. 기능성 Fc를 가지지 않는 또 다른 T2M 복합체(2B8T2M-LA), 생물 활성 IL-15를 가지지 않는 또 다른 T2M 복합체(2B8T2M-D8N) 또는 CD20 결합 능을 가지지 않는 또 다른 T2M 복합체(c264T2M)가 사용될 때, 2B8T2M의 증가한 ADCC 활성은 부분적으로 항 CD20 도메인 및 Fc 결합 도메인 각각에 의존적이었을 뿐만 아니라, IL-15N72D 돌연변이체 활성에도 의존적이었음이 추가로 입증되었다(도 12a). 어느 면역 세포 하위세트가 ADCC에 있어서 어떤 역할을 담당하는지를 연구하기 위해, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포 및 NK 세포가 분류되었고, 동일 검정에서 효과기 세포로서 사용되었다. 예상된 바와 같이,



결과는, NK 세포가 PBMC의 ADCC 활성의 주요 기여 원인 반면에, CD8+ T 세포 및 CD4+ T 세포는 부수적인 역할 내지는 무시할 정도로 미미한 역할을 담당함을 암시한다(도 12b). 더욱이 리톡시맙과 비교되었을 때, 이 2B8T2M은 모든 세포 하위세트에 의하여 Daudi 세포에 대해 더 강력한 ADCC를 유도하였다.

[0282] 인간 면역 세포의 세포독성 잠재력에 대한 2B8T2M의 효과를 더 평가하기 위해, 공여 PBMC가 2B8T2M 및 그랜자임 B를 함유하는 배지 중에서 배양되었고, 퍼포린 수준은 유세포분석에 의해 평가되었다. 2B8T2M은 NK 세포 내 그랜자임 B 및 퍼포린 발현을 상향 조절하였고(도 12c), 또한 CD8+ T 세포 내 그랜자임 B 발현을 농도 의존적 방식으로 상향 조절하였다(도 12d). 2B8T2M 200nM가 첨가되었을 때 CD8+ T 세포 내 퍼포린 발현은 약간 더 증가할 뿐이었다(도 12d). CD4+ T 세포에 의한 그랜자임 B 및 퍼포린의 상향 조절은 무시할 수 있을 정도이거나 아예 일어나지 않았다.

[0283] 2B8T2M의 약동학 및 생체내 분포에 관한 시각적 관찰 및 정량 측정

[0284] 연속 비침습 PET 스캔이, 64Cu-표지화 2B8T2M 및 64Cu-표지화 리톡시맙 약동학적 특성 및 전 항체 분포에 관한 시각적 관찰 및 정량 측정 수단으로서 이용되었다. 64Cu-표지화 ALT-803이 투여된 마우스를, 64Cu-IL-15가 투여된 마우스와 비교하여 이전에 행하여진 생체내 분포 연구는, 64Cu-IL-15가 신장 경로를 통해 신속하게 제거되었던 반면, 간에서 일어났던 ALT-803의 제거는 림프관 장기 내에서는 적어도 70 시간 동안 유지되었음을 입증하는 변별적 약동학 프로필을 보여주었다(12). 이 연구에서, 64Cu-NOTA-2B8T2M은 간담도 경로와 신장 경로 둘 다를 통해 마우스 몸으로부터 제거되었으며, 신장내 흡수율은 낮았다(도 13a ~ 도 13c). 림프절 내 64Cu-NOTA-2B8T2M 흡수는 이전에 64Cu-NOTA-ALT-803을 통해 관찰되었던 바와 거의 동일하였는데(12), 이는 이러한 융합 단백질 둘 다에 대한 IL-15 수용체 표적화 효율이 높음을 입증하는 것이다. 주사후(p.i.) 6 시간 경과시, 64Cu-NOTA-2B8T2M의 림프절 흡수는 지속적으로 조직 1 그램당  $4.2 \pm 0.5\%$ 의 주사 용량(%ID/g)으로 유지되었고, 심지어 p.i. 70 시간 경과시에조차도  $5.3 \pm 1.3$  %ID/g으로 유지되었는데, 이는 마우스 내 ALT-803의 반감기(18 시간)에 비하여 64Cu-NOTA-2B8T2M의 혈행 내 반감기가 비교적 더 길었기(184 시간) 때문이다. 이와 비교되게, 64Cu-NOTA-리톡시맙은, 상이한 생체내 분포 프로필을 보이는 64Cu-2B8T2M보다 더 긴 혈행 중 반감기를 보였다. 64Cu-NOTA-리톡시맙의 림프절 흡수는 더 낮았던 반면에[p.i. 6시간 경과시  $3.5 \pm 0.2$  %ID/g, 그리고 p.i. 10 시간 경과시  $4.1 \pm 0.8$  %ID/g; 도 13b], 혈액 및 근육에서의 흡수는 더 센 백그라운드 신호가 발생하였던 것으로 보아 더 높았다(도 13d ~ 도 13f). 이러한 결과는, ALT-803 단백질 스캐폴드가 2B8T2M을 림프관 조직에 우선적으로 전달하는 비이클이 된다는 것을 암시한다.

[0285] 생체 내 NK 세포 및 CD8+ T 세포의 증식은 2B8T2M에 의해 유도된다

[0286] 이전 연구들은, IL-15에 비하여 ALT-803 복합체가 생체 내에서 유의미하게 더 강력한 면역 세포 자극을 보임을 입증하였다(4). ALT-803, IL-15 및 기타 T2M 복합체의 생체 내 면역자극 활성화와 2B8T2M의 생체 내 면역자극 활성을 비교하며 평가하기 위해, CD3+ T 세포와 NK 세포가 분리되었으며, CellTrace Violet으로 표지화되었다. 증량된 바이올렛 표지화 CD3+ T 세포 및 NK 세포는 C57BL/6 암컷 마우스에 양자의 방식으로 i.v. 운반되었고, 이 처럼 운반된 후 2일 경과시 마우스는 PBS 대조군, 2B8T2M, 2B8T2M-LA, 2B8T2M-D8N, ALT-803 또는 몰당량 용량만큼의 유리 IL-15 중 어느 하나로 처리되었다. 운반 5일 후 마우스 비장 내 바이올렛 양성 세포가 유세포분석에 의해 평가되었다. 도 14a에 보인 바와 같이, 2B8T2M 처리 마우스는 비장 내 CD8+ T 세포를, IL-15 또는 PBS 처리 마우스의 비장 내 CD8+ T 세포보다 유의미하게 더 높은 비율로 보였지만( $p < 0.001$ ), ALT-803 처리군보다는 CD8+ T 세포를 유의미하게 더 낮은 비율로 보였다( $p < 0.001$ ). 2B8T2M을 투여받은 마우스는 또한 비장 내 NK 세포를, IL-15 또는 PBS 처리 마우스의 비장 내 NK 세포에 비해 더 높은 %로 보였다( $p < 0.001$ ; 도 14b). IL-15 또는 PBS 처리 마우스의 경우와 비교되게, 2B8T2M 처리 마우스에서 비장 내 CD4+ T 세포 %는 비교적 감소하였다(도 14a). Fc-돌연변이 2B8T2M-LA로 마우스를 처리하면, 양자의 방식으로 운반된 NK 세포와 CD8+ T 세포의 비장 내 %는 2B8T2M 처리 군에서 관찰되었던 바와 동일하게 증가하는 것이 확인되었던 반면에, IL-15-돌연변이체 2B8T2M-D8N으로 처리되었을 경우에는 유사한 효과가 관찰되지 않았다. 이러한 결과는, IL-15N72D 도메인이 이러한 면역 세포 하위세트를 변화시키는데 관여하였음을 보여주는 것이다.

[0287] 투여 대상인 마우스의 비장 내 공여 CD8+ T 세포와 NK 세포의 증식이 추가로 관찰되었다. 도 14c 및 도 14d에 보인 바와 같이, 2B8T2M 처리는 IL-15 또는 PBS 처리에 비하여 양자의 방식으로 전달된 세포 증식의 증가를 초래하였으나; 2B8T2M 처리후에는 ALT-803 처리후에 비하여 증식이 더 감소하였다. 비장 면역 세포 하위세트에 대한 효과와 일관되게, Fc-돌연변이 2B8T2M-LA는 2B8T2M과 유사한 면역증식 활성을 보였던 반면에, IL-15-돌연변이 2B8T2M-D8N 처리는 생체 내 양자의 방식으로 운반된 림프구의 증식을 미약하게 초래하였거나 아예 초래하지 않았다.

- [0288] SCID 마우스 내 Daudi B 림프종에 대한 리톡시맙의 효능에 비하여 탁월한, SCID 마우스 내 Daudi B 림프종에 대한 2B8T2M의 효능
- [0289] 2B8T2M과 리톡시맙의 전반적인 생체 내 항 종양 활성을 비교하기 위하여, Daudi B 림프종/SCID 마우스 모델이 사용되었다. Daudi 세포( $1 \times 10^7$ 개)를 암컷 SCID 마우스에 i.v. 주사하였으며, 이처럼 접종 후 15일 경과시 골수 내 종양 세포의 존재는, PE-접합 항 인간 HLA-DR 항체가 사용되는 유세포분석에 의해 확인되었다(즉 2 마리 마우스는 골수 내 Daudi 세포를 0.5% 및 2.8% 보였다). 나머지 Daudi 보유 마우스는 무작위적으로 3개의 군으로 할당되었으며, 15일 및 18일에 리톡시맙 10 mg/kg(비호지킨 림프종(NHL) 환자에 대한 임상 용량인  $375 \text{ mg/m}^2$ 에 상당), 2B8T2M 5 mg/kg 또는 PBS(비이클 대조군)로 처리하였다. 뒷다리가 마비되는 것을 본 연구의 생존 종말 시점으로 삼았다. 도 15a에 보인 바와 같이, PBS, 리톡시맙 및 2B8T2M 처리 마우스에 대한 생존 시간 중앙값은 각각 27 일, 35일 및 42 일이었다. 리톡시맙은 Daudi 보유 마우스의 생존을 PBS 대조군 처리 마우스에 비하여 유의미하게 개선하였던 한편( $p=0.001$ ), 2B8T2M 처리는 리톡시맙 처리시에 비해 생존 기간을 훨씬 더 연장시켰다( $p=0.006$ ).
- [0290] 추적 용량-반응 연구에 있어서, Daudi 보유 마우스는 6개의 군으로 무작위로 할당되었고, 접종후 15일 및 18일에 리톡시맙 10 mg/kg; 12.8(10 mg/kg 리톡시맙에 대한 물 당량), 5, 1 또는 0.2 mg/kg 2B8T2M; 또는 PBS(비이클 대조군)로 처리되었다. 골수 내 Daudi 종양 크기는 유세포분석에 의해 22일에 측정되었다. 도 15b에 보인 바와 같이, 리톡시맙 처리 마우스의 골수 내 Daudi 세포 %는 PBS 대조군 처리 마우스의 골수 내 Daudi 세포 %보다 유의미하게 더 낮았다( $p=0.003$ ). 게다가 2B8T2M 1, 5 또는 12.8 mg/kg으로 마우스가 처리되었을 때, 골수 내 Daudi 종양 크기는 리톡시맙 처리군( $p<0.01$ ) 또는 PBS 처리군( $p<0.001$ )에서 관찰되는 골수 내 Daudi 종양 크기보다 유의미하게 더 작았던 반면에, 0.2 mg/kg 2B8T2M 처리군 및 리톡시맙 처리군에 있어서 골수 Daudi 세포의 축소는 동일하였다( $p=0.24$ ). Daudi 세포에 더하여, 골수 및 비장 내 NK 세포 %는 유세포분석에 의해 평가되었다. 도 15c 및 도 15d에 보인 바와 같이, 리톡시맙 처리 마우스와 PBS 처리 마우스의 골수 내 NK 세포 %에는 차이가 없었다. 그러나 모든 용량만큼의 2B8T2M이 처리된 마우스는, PBS 대조군 처리 마우스의 골수 및 비장 내 NK 세포 비율에 비하여 유의미하게 더 높은 골수 및 비장 내 NK 세포 비율을 보였다( $p<0.05$ ). 증가한 NK 세포 수준은 2B8T2M의 강력한 항 종양 활성 발현의 주요 기여요인일 수 있다. NK 세포가 2B8T2M의 항 종양 활성에 필수적인지 여부를 평가하기 위하여, NK 세포 활성이 SCID 마우스에 비하여 유전적으로 감소한 SCID 베이지 마우스를 대상으로 유사 동물 연구가 행하여졌다(도 15e). Daudi 보유 SCID 베이지 마우스는 3개의 처리군으로 무작위로 나누어진 다음, 10 mg/kg 리톡시맙, 5 mg/kg 2B8T2M 또는 PBS(비이클 대조군)으로 처리되었다. 놀랍게도 Daudi 세포 %는, 대조군 처리 마우스의 골수에서보다 2B8T2M 및 리톡시맙 처리 마우스의 골수에서가 유의미하게 훨씬 더 낮았는데( $p<0.01$ ), 이 점은 NK 세포가 2B8T2M 또는 리톡시맙의 항 종양 활성에 필수적인 것이 아님을 말해주는 것이다. 이는 또한, 2B8T2M은 ADCC를 통하여 항 종양 활성을 유도하는 한편, 이 융합 단백질의 생체 내 항 종양 활성은 NK 세포 활성이 감소한 마우스 내 종양 세포에 대한 이 융합 단백질의 세포자멸 효과와 CDC에 의해 유지됨을 암시하는 것이다. 대식세포와 호중구도 또한 ADCC 및 항체 의존적 세포성 식세포(ADCP) 기능을 보이는 것으로 공지되어 있다(13). 대식세포와 호중구가 SCID 마우스에서 이 융합 단백질의 항 종양 활성에 기여하는 것은 있을 수 있는 일이다. 뿐만 아니라 이 모델에서 2B8T2M의 효능은 Daudi SCID 마우스 모델에서의 2B8T2M 효능에 비하여 감소되는 것으로 보아, NK 세포는 2B8T2M의 항 종양 활성을 증진시키는데 어떤 역할을 담당하고 있는 듯하다.
- [0291] SCID 마우스 내 Daudi B 림프종에 대한 2B8T2M의 다양한 도메인의 항 종양 활성
- [0292] 2B8T2M의 상이한 도메인들의 기능을 분석하기 위해, Daudi B 림프종/SCID 마우스 모델에서 2B8T2M, Fc-돌연변이 2B8T2M-LA 및 IL-15-돌연변이2B8T2M-D8N의 항 종양 활성이 비교되었다. 도 16a에 보인 바와 같이, 5 mg/kg만큼 투여된 모든 시험 제제는 PBS 처리군에서와 비교되었을 때 골수 내 Daudi 종양 크기를 유의미하게 감소시켰다. 뿐만 아니라, Fc-돌연변이2B8T2M-LA 및 IL-15-돌연변이2B8T2M-D8N은 2B8T2M보다 골수 내 Daudi 종양 크기를 감소시키는데 있어 효능이 더 작았다( $p<0.05$ ). 또한, c264T2M이 별도의 실험에서 비 표적화 대조군 복합체로서 사용되었는데, 이 c264T2M은 2B8T2M보다 골수 내 Daudi 세포 %를 감소시키는데 있어 효능이 더 작았다(도 16b). 종합하였을 때, 이러한 발견은, CD20의 IL-15 매개 면역 활성화, Fc 도메인 활성 및 2B8 특이적 표적화 모두는 Daudi B 림프종에 대한 2B8T2M의 생체 내 항 종양 활성을 발휘하는데 중요한 기여인자임을 말해준다.
- [0293] 사이노몰거스 원숭이에 있어 2B8T2M에 의한 B 세포 감소
- [0294] Daudi B 림프종/SCID 마우스 모델에 있어서 2B8T2M의 효능 연구 후, 사이노몰거스 원숭이를 대상으로 2B8T2M이

B 세포를 감소시키는 능력이 더 연구되었다. 당일과 3일에 동물(군당  $n = 4$ 마리)은 2B8T2M 5 mg/kg, 리툽시맙 10 mg/kg 또는 PBS(비이클 대조군)으로 주사되었으며, 이후 7일에 안락사되었다. 비장 및 장간막 림프절이 수집된 다음, 유세포분석에 의하여 B 세포 및 다른 림프구 하위세트 수준에 대해 평가되었다. 투여전과 1일(즉 1차 투여후 24시간), 3일(2차 투여전), 4일(2차 투여후 24시간), 5일 및 7일에 채취한 시료를 사용하여, 말초 혈액 중 B 세포 % 변화도 또한 측정되었다. 도 17a 및 도 17b에 보인 바와 같이, 말초 혈액 중 B 세포는 1차 투여후 1일에 2B8T2M 처리군과 리툽시맙 처리군 둘 다에서 효과적으로 감소하였다. 2차 투여후 2B8T2M 처리 동물의 말초 혈액 중 B 세포 수준은 리툽시맙 처리 동물의 말초 혈액 중 B 세포 수준보다 훨씬 더 감소하였지만, 이러한 효과는 항상 통계적으로 유의미하지는 않았다(4일  $p=0.004$ , 5일  $p=0.051$ , 그리고 7일  $p=0.067$ ). 흥미롭게도, 2B8T2M 처리 원숭이의 림프절 내 B 세포 %는 PBS 처리군의 림프절 내 B 세포 %보다 유의미하게 더 낮았다. 그러나 리툽시맙 처리군과 PBS 처리군 간에 유의미한 차이는 없었다. 2B8T2M 처리는 림프절 NK 세포 %의 유의미한 증가를 초래하였고(대조군 처리시에 비하여 2.4배), 혈중 CD8+ 및 CD4+ T 세포 %의 감소(대조군 처리시에 비해 각각 0.8배 및 0.5배) 및 비장 CD4+ T 세포 %의 감소(대조군 처리시에 비해 0.4배)를 보였는데, 이는 아마도 면역 세포 증식 및 이동(trafficking)에 대한 IL-15N72D 도메인의 면역자극 효과로 말미암는 것일 것이다. 이와는 대조적으로, 리툽시맙 처리는 마치 B 세포 소실에 대한 보상 효과라도 되듯이 비장 CD8+ 및 CD4+ T 세포 %를 1.4배 내지 1.8배 증가시켰다( $p<0.05$ ). 2B8T2M 처리군 또는 리툽시맙 처리군 중 어느 한 군에서도 유의미한 부작용은 관찰되지 않았다.

[0295]

종양 세포상 특이 항원을 인지하는 모노클로날 항체(mAb)는 현재 암 치료수단으로서 사용되고 있다. 비호지킨 림프종(NHL) 중 90% 초과에서 발현되는 CD20 항원을 표적화하는 리툽시맙은 지난 십년간 환자에게 성공적으로 사용되어 왔다. 항CD20 mAb의 작용 기작은 세포자멸 유도, ADCC, CDC 및 표적 세포의 식세포작용을 수반한다(14). mAb의 항 종양 활성은 주로 ADCC를 통하는데, 이는 효과기 세포의 활성화를 증진하는 보조제 치료법으로 더 개선될 수 있다. IL-15는 CD8+ T 세포 및 NK 세포의 강력한 자극제이자 활성화 인자로서, NK 세포 매개 ADCC를 증진시키는 mAb와 병용될 수 있는, 떠오르는 암 면역요법제이다(15). IL-15 강력 효현제인 ALT-803, 즉 IL-15N72D 돌연변이체 및 이량체 IL-15R  $\alpha$  SuFc 융합 단백질의 복합체가 제조되었다. ALT-803은, 시험관 내 및 생체 내 월등한 활성을 보인다. N72D 돌연변이는 IL-15의 생체 내 생물 활성을 원산 IL-15의 생체 내 생물 활성에 비하여 약 5배 증가시키고, IL-15N72D:IL-15R  $\alpha$  SuFc 복합체는 IL-15의 생체 내 활성을 원산 IL-15의 생체 내 생물 활성보다 약 25배 더 증가시킨다(3,4). 또한 ALT-803은 원산 IL-15보다 면역 세포 표면상에 제시되는 IL-2R  $\beta$   $\gamma$  C 복합체와의 더 큰 결합 활성, 실질적으로 더 긴 혈청중 반감기, 림프양 조직 내 더 우수한 생체내 분포 및 더 오랜 체류를 보인다(3,4,12). 강력한 면역자극 특성 및 항 종양 특성을 보이는 ALT-803은 단일 제제로서 사용될 때, 아니면 다른 치료제와 병용될 때 동물 모델 내 다양한 종양에 유효한 제제이다(5,6). 예를 들어 ALT-803 자극은, B 세포 림프종 세포주 또는 원발 소포성 림프종 세포에 대해 인간 NK 세포에 의한 리툽시맙 매개 ADCC를 시험관 내에서 유의미하게 증가시켰다. 게다가 2개의 상이한 B 세포 림프종 마우스 모델에 있어서, 항 CD20 mAb 치료제에 ALT-803을 더할 경우 유의미하게 감소한 종양 세포 크기와 유의미하게 증가한 생존이 제공되었다(7). 결과적으로, ALT-803은 현재 고형 및 혈액학적 악성종양에 대해 다수의 임상 시험이 진행되고 있다(동종이계 줄기 세포 이식후 혈액학적 악성종양, 불치의 다발성 골수종 및 무통성 비호지킨 림프종 재발여부에 대해 NCT01885897, NCT02099539 및 NCT02384954 각각을 대상으로 임상 시험중에 있다). 본원에 기술된 연구에서, ALT-803은 신규 다가 항원 특이적 면역요법용 복합체 제조를 위한 다용도 단백질 스캐폴드로서 변형될 수 있음이 추가로 입증되었다. 2B8T2M이라 지칭되는 표적화 면역요법제가 구성되었다. 이 융합 단백질은 리툽시맙과 IL-15N72D:IL-15R  $\alpha$  SuFc의 인지 도메인으로 이루어져 있고, B 림프종에 대한 ADCC 및 CDC를 매개할 수 있음과 아울러, 전세포자멸 활성 및 생체 내 면역 세포 자극을 달성할 수 있다. 그러므로 단일 분자로서의 2B8T2M 복합체는 리툽시맙의 항 CD20 특성을 보유함과 동시에, ALT-803의 면역자극 특성도 보유한다. 2B8T2M은 리툽시맙과 비교되었을 때 개선된 항 종양 활성을 보였고, 이는 Daudi B 림프종 보유 SCID 마우스의 생존 연장으로 이어졌다. 더욱이 2B8T2M 처리 마우스 내 NK 세포의 증가한 비율은, NK 세포가 2B8T2M의 생체 내 증진된 항 종양 활성에 핵심적인 역할을 한다는 것을 암시한다. NK 세포가 2B8T2M의 항 종양 활성에 필수적인지 여부를 더 평가하기 위해, NK 세포가 결여된 SCID 베이지 마우스에서 유사한 동물 연구가 수행되었다. 놀랍게도 Daudi 세포 %는 비이클 대조군 처리 마우스의 골수에서 비하여 2B8T2M 처리 마우스의 골수에서 유의미하게 훨씬 더 낮았다. 이는, 이 융합 단백질의 생체 내 항 종양 활성이, NK 세포 활성이 감소한 마우스 내 융합 단백질의 세포자멸 효과와 CDC에 의해 유지될 수 있음을 암시한다. 대식세포와 호중구는 또한 ADCC 기능을 보이는 것으로 알려져 있다(13). 대식세포와 호중구가 SCID 베이지 마우스에서 이 융합 단백질에 대한 NK 세포의 ADCC 기능을 대체할 수 있는 기능을 발휘할 수 있는 것은 있을 수 있는 일이다. SCID 마우스 연구로부터 얻어진 결과들과는 달리, SCID 베이지 마우스에서 2B8T2M의 항 종양 활성과 리툽시맙의 항 종양 활성 간에 유의미한 차이가 없다.



그러므로 NK 세포는 생체 내 2B8T2M 항 종양 활성을 증진시켰다. 이는, NK 세포 집단을 증식시키고/증식시키거나 NK 세포의 ADCC 기능들을 상향 조절하였던 2B8T2M의 IL-15 성분의 결과인 것으로 예상될 수 있다.

[0296] 항 CD20 mAb는 NHL의 치료에 효과적으로 사용되어 왔다. 제I형 및 제II형 항 CD20 항체는 각각 FcR 발현 세포를 보충하여 CD20+ 세포에 대해 유도되는 식세포작용과 ADCC를 매개할 수 있다(16). 중요한 점은, 제I형 항체 및 제II형 항체 둘 다는 다양한 CD20+ B 림프종 또는 B 세포 매개 자가면역성 질환에 대한 이 항체들의 활성을 바탕으로 임상 사용에 대해 승인을 받았다는 점이다(17,18). 본 연구에서 확인되는 바와 같이, 2B8T2M은 증진된 세포자멸 활성을 보이면서 CD20+ 표적 세포에 대하여 리툽시맙과 유사한 CDC를 보유하였다. 이러한 발견은, 2B8T2M이, 강력한 NK 세포 효과기 반응을 위해 IL-15 기반 면역자극 활성을 통해 ADCC의 강력한 증진을 달성함과 아울러, 제I형 항 CD20 항체 및 제II형 항 CD20 항체 둘 다의 기능상 이점을 보유함을 말해준다. 2B8T2M의 전세포자멸 활성은 CD20 결합 도메인에 의존적이지만, FcR 결합 또는 IL-15 활성에는 그렇지 않다. 이전 연구들은, 화학 가교된 리툽시맙 동종이량체와 재조합 4가 리툽시맙 scFv-Ig 융합체가 단량체 리툽시맙보다 B 림프종에 대한 세포자멸 유도 활성이 더 월등하였음을 보여주었다(19,20). 이 같은 결과들은, 리툽시맙의 전세포자멸 활성에 비하여 증진된 2B8T2M의 전세포자멸 활성 역시 이 융합체의 CD20+ 세포와의 다가 결합 능으로 말미암은 것일 수 있음을 암시한다.

[0297] ALT-803은 기억 CD8+ T 세포의 증식, NKG2D 상향 조절, IFN- $\gamma$  분비 및 항원 자극 없이도 악성 세포를 사멸하는 능력 획득을 유도한다(5,21). 본원에 제시된 결과들은, CD20 특이 복합체 2B8T2M이 ALT-803의 독특한 능력을 보유함을 말해준다. 예를 들어 양자 운반 실험은, 2B8T2M이 기억 CD8+ T 세포 및 NK 세포의 증식을 촉진하였음을 보여주었다. 그러므로 2B8T2M의 항 CD20 scFv 도메인은 ALT-803 성분의 기억 CD8+ T 세포에 대한 생물 효과를 변경하지 않았지만, 이 scFv 도메인은 ALT-803에 비하여 상대적 IL-15 활성을 대략 60배 낮추었다. 2B8T2M의 IL-15 활성 감소는, 다른 IL-15 융합체에서도 유사한 효과가 관찰되었던 것으로 보아, 아마도 IL-2R $\beta$   $\gamma$ C에 대한 IL-15N72D의 결합 도메인에 영향을 미치는, 항 CD20 단일 사슬 Ab의 입체장애로 말미암은 것일 수도 있겠다(3,8). 이러한 융합 분자의 더 작은 IL-15 활성은, 일반적으로 이러한 유형의 분자의 임상 유용성을 증진시킬 수 있다. 항체의 ADCC 효능 결정 인자들 중 하나는, 항체의 표적 세포와의 결합 밀도에 영향을 미치는 농도인 것으로 보였다(22). 이러한 융합 분자의 더 작은 IL-15 활성은, 잠재적으로 이 분자의 더 높은 용량만큼의 투여를 가능하게 함으로써, 원치않는 면역 관련 전신 독성을 유도하지 않고 유효한 ADCC를 도모할 수 있다. 본 연구에서 보인 마우스 모델과 인간 이외의 영장류 모델 둘 다에 있어서 2B8T2M의 ADCC 의존적 효능과 잘 관용된 안전성 프로파일은, 이러한 점을 입증하며, 이 분자의 임상 유용성을 지지한다.

[0298] 원산 IL-15가 사용되는 비교 생체 내 분포 연구에서, ALT-803은 마우스의 림프양 장기에 분포하여 더 오래체류하였다(12). 이와 유사하게 2B8T2M 생체 내 분포 데이터는, 흡수되어 적어도 70 시간 동안 림프양 조직에 체류함을 보여준다. 인간 이외의 영장류를 대상으로 한 CD40+ B 세포 감소 연구에서, 더 낮은 용량 수준의 2B8T2M의 효능은, 특히 림프절에서 리툽시맙의 효능보다 더 컸음이 확인되었다. 2B8T2M 처리는 또한 대조군 처리에 비하여 림프절 NK 세포 %의 유의미한 증가를 유도하였다. 2B8T2M은 림프양 조직 내에 체류하면서 유의미한 기간 동안 T 세포와 NK 세포를 잠재적으로 자극하였던 반면에, 리툽시맙은 이러한 활성을 보이지 않았던 것으로 생각된다. 퍼포린과 그랜자임 B의 유도로 말미암을 수 있는(23) 이러한 NK 세포의 자극은 B 세포에 대하여 ADCC의 유의미한 증진을 초래할 수 있다. 그러므로 이러한 융합 분자는 B 세포 림프종에 대하여 특히 유효할 수 있다.

[0299] 치료 항체의 ADCC는 또한 "백신 효과(vaccinal effect)"를 통하여 암 세포상에 제시되는 표적화 항원에 대해 적응성 면역 반응을 유도하는 것으로 입증된 바 있다(14,24-26). 이 효과는 Fc 의존적으로서, 항원 재공격 후 종양 거부를 통해 숙주에게 영구적인 기억 반응을 제공한다(27). 2B8T2M의 한 성분인 IL-15는 효과기 및 기억 CD8<sup>+</sup> T 세포 발달에 핵심적인 시토카인이다. 그러므로 2B8T2M 분자의 IL-15 성분은, CD8<sup>+</sup> T 세포의 면역 반응을 활성화함으로써 치료 항체 단독 투여시보다 표적화 항원에 대해 더 강력한 "백신 효과"를 보일 수 있는 것으로 생각된다. 뿐만 아니라, ALT-803 스캐폴드는 리툽시맙 결합 도메인의 림프양 조직 체류를 연장시켰음이 주목되어야 할 것이다. 그러므로 ALT-803 스캐폴드는 면역계 활성화를 도모하기 위하여 융합 성분들을 림프 장기에 전달하기 위한 비이클이 될 수 있는 것이다.

[0300] 이러한 연구는, IL-15N72D:IL-15R $\alpha$  SuFc를 기반으로 한 스캐폴드 분자가, 항체 유래 표적 인지 도메인 다수, 부착 분자 또는 기타 수용체에 잠재적으로 융합될 수 있었음을 보여준다. 적당한 표적 도메인이 사용되어 제조된 복합체는 다양한 면역 효과기 세포들의 접합을 촉진하고, 표적 세포, 예컨대 특이 표적을 제시하는 암 세포나 바이러스 감염 세포의 파괴를 매개할 수 있었다. 이 복합체의 IL-15 도메인은 면역자극 활성을 제공하여 효과기 세포 증식과 세포독성을 지지할 수 있었다. 이 단일 융합 단백질 접근법은 또한, 병용 면역요법을 이용한 복잡



한 치료 계획의 요구를 없애줄 것이다. 그러므로 IL-15N72D:IL-15R α SuFc 스캐폴드 복합체는 암 및 감염성 질환에 대해 표적화된 면역요법 약물로서 전도유망할 IL-15의 잠재성을 이용하는 독특한 기회를 제공할 수 있다.

[0301] 본 실시예를 위해 하기 실험 절차들이 이용되었다.

[0302] 마우스 및 세포주

[0303] FOX Chase SCID(C.B-17/IcrHsd-Prkdc-scid), SCID-베이지(C.B-17/IcrHsd-PrkdcscidLystbg-J) 및 C57BL/6NHsd 마우스(6 ~ 8주령 암컷, Harlan Laboratories)가 Altor BioScience의 동물 시설에 수용되었다. 모든 동물 연구는 국립 보건원(National Institutes of Health; NIH)의 동물 케어 가이드라인에 따라 실험동물운영위원회(Institutional Animal Care and Use Committee; IACUC)의 승인을 받은 프로토콜 하에 수행되었다.

[0304] 인간 Daudi B 림프종 세포주는 미국모식균배양수집소(ATCC)로부터 구입하여, 관례에 따라 완전 RPMI(Roswell Park Memorial Institute)-1640 배지 중에서 배양되었다(37°C 및 5% CO<sub>2</sub>). Daudi 세포는 본 연구에 사용되기 앞서, 세포 성장 형태학(림프아구), 성장상의 특성들, 인간 CD20의 균일한 발현의 표현형(유세포분석에 의함), 그리고 ADCC를 위한 항 CD20 mAb 흡소닌화 표적으로서의 기능이 확인됨으로써 2014년 및 2015년에 진자인 것으로 인증받은 것이다. IL-15 의존적 32Dβ 세포(3)는, IL-15 1 ~ 2 ng/ml이 보충된 완전 IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Media) 중에서 배양되었다(감사하게도 국립 암 연구소-MD 프레데릭(Frederick)의 제이.요반디치(J. Yovandich) 박사에게 의해 제공됨).

[0305] sc2B8 융합 구조체의 제조

[0306] 가용성 단일 사슬 2 도메인 항 CD20 mAb 구조체(sc2B8)를 제조하기 위하여, 2B8 mAb 경쇄 및 중쇄의 V 유전자 분절들이 2B8 하이브리도마(ATCC)로부터 클로닝되었다. VL 유전자 분절은 링커 (Gly4Ser)3를 통해 VH 유전자 분절의 5' 말단에 융합되었다. sc2B8 유전자는 (1) IL-15 강력효현제(IL-15N72D), (2) IL-15 길항제(IL-15D8N)를 비롯한 IL-15 돌연변이 단백질 서열의 5' 말단에뿐만 아니라, 이미 기술된 바와 같은 융합 구조체(IL-15R α SuFc)의 5' 말단에도 융합되었다(3). FcR 결합능 결여 돌연변이 단백질을 제조하기 위하여, sc2B8은 hIgG1 중쇄 아미노산 234번 및 235번이 루신에서 알라닌으로 돌연변이된 IL-15R α SuFc-LA에 융합되었다(10). 가용성 단일 사슬 3 도메인 T 세포 수용체(TCR)인 c264scTCR(키메라 인간 p53(264-272) 특이 단일 사슬 TCR)도 또한 이미 기술된 바와 같이 구성되었다(3,8). sc2B8 융합체와 유사하게, c264scTCR은 IL-15N72D 또는 IL-15R α SuFc에 융합되었는데, 이로써 c264scTCR-IL-15N72D 및 c264scTCR-IL-15R α SuFc 구조체가 제조되었다. 생성된 sc2B8-IL-15N72D:sc2B8-IL-15R α SuFc(2B8T2M), sc2B8-IL-15D8N:sc2B8-IL-15R α SuFc(2B8T2M-D8N), sc2B8-IL-15N72D:sc2B8-IL-15R α SuFc-LA(2B8T2M-LA) 및 c264scTCR-IL-15N72D:c264scTCR-IL-15R α SuFc(c264T2M) 유전자들은 pMSGV 레트로바이러스 벡터에서 발현되었다(28).

[0307] 융합 단백질 제조 및 정제

[0308] 다양한 구조체를 함유하는 발현 벡터는 ATCC에서 입수된 CHO 세포에 도입되어 이 세포를 형질감염시켰으며, 이후 적당한 항생제를 함유하는 배지 중에서 선택되었다. 융합 단백질을 제조하기 위해 재조합 CHO 세포는 37°C의 무혈청 제한 배지(SFM4CHO, Hyclone, Logan, UT) 중에서 생장되었다. 배양액 중 생존 세포 밀도가 최고에 도달했을 때, 가용성 복합체의 축적을 도모하기 위해 항온처리 온도는 30°C로 낮추어져 10일 ~ 14일 동안 유지되었다. 융합 단백질은 면역친화성 단백질 A 크로마토그래피에 의해 재조합 CHO 세포 배양 상청액으로부터 정제되었다. 시료가 로딩(loading)되기 전, 컬럼은 5 컬럼 부피(CV)의 20 mM Tris-HCl(pH 8.0)로 세척된 다음, 5 CV의 0.1 N NaOH로 1 시간 동안 살균된 후, 7 CV의 20 mM Tris-HCl(pH 8.0)로 평형화되었다. 상청액은 컬럼에 2 mL/분으로 로딩되었고, 이후 컬럼은 8 CV의 20 mM Tris-HCl(pH 8.0)로 세척된 다음, 다시 7 CV의 세척 완충제(0.1 M Na-시트르산염, pH 5.0)로 세척되었으며, 그 결과 비 특이적으로 결합된 단백질들이 제거되었다. 그 다음, 단백질은 0.2 M Na-시트르산염(pH 4.0)과 함께 용리되었으며, 수집된 피크별 분획들의 pH는 2 M Tris-HCl(pH 8.0)을 사용하여 바로 중화되었다. 제제는 농축되었고, Amicon Ultra-15 원심분리 농축기(30 kDa 컷오프, Millipore, Billerica, MA)를 사용함으로써 인산염 완충 염수(PBS)로의 완충제 교환이 이루어졌다. 정제된 융합 단백질 내 응집체는 크기별 배제 크로마토그래피에 의해 제거되었다. 정제된 융합 단백질은 환원 SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)(12% Bis Tris 겔) → SimplyBlue™ Safe Stain(Invitrogen)에 의해 분석되었다. 2B8T2M 분자들의 균질성은 크기별 배제 크로마토그래피에 의해 특성규명되었다. 융합 단백질은 4°C에서 적어도 12 개월 동안 안정적이었다(데이터는 제시되지 않음).

[0309] 유세포 분석

- [0310] 2B8T2M의 CD20 결합 특성을 입증하기 위하여, 말초혈액단핵구세포(PBMC)는 FITC-표지화 2B8T2M 또는 리톡시맙으로 염색되었고, 결합 특이성은, 미표지화 2B8T2M 또는 리톡시맙으로 차단함으로써 입증되었다. 2B8T2M의 Fc 수용체 결합능을 입증하기 위하여, 인간 조직구 림프종 U937 세포주(ATCC)는 FITC-표지화 2B8T2M, 리톡시맙 또는 2B8T2M-LA로 염색되었다. 염색된 PBMC와 U937 세포는 FACSuite 소프트웨어(BD Biosciences)가 사용되는 FACSVerse상에서 분석되었다.
- [0311] 세포 증식 검정
- [0312] 32D $\beta$  세포의 증식은 이미 기술된 바와 같이 측정되었다(3,8). 요약하면, 32D $\beta$  세포( $1 \times 10^4$  개 세포/웰)는 융합 단백질과 함께 37°C에서 48 시간 동안 항온처리되었다. 막바지 4시간 동안에는 세포증식 시약 WST-1(Roche Applied Science)이 첨가되었다. WST-1의 착색 포르마잔 염료로의 전환은 450 nm에서의 흡광도 측정을 통해 확인되었다. EC50은 Prism4 소프트웨어(GraphPad Software)를 사용하여 용량-반응 곡선을 기반으로 측정되었다.
- [0313] 시험관 내 세포독성 검정
- [0314] CDC 검정용 Daudi 세포는 2B8T2M, 이의 돌연변이 단백질 또는 리톡시맙의 존재하에 37°C에서 2 시간 동안 RPMI-10 중에서 항온처리되었다. 보체 반응을 위해 정상 인간 혈청(Innovative Research)이 사용되었다. Daudi 세포의 생존능은, 요오드화프로피듐(Sigma) 염색에 의해 측정되어, BD FACSVerse 상에서 분석되었다.
- [0315] ADCC 검정
- [0316] Daudi 세포는 제조자의 지침에 따라 CellTrace Violet(Invitrogen)으로 표지화되고 나서, 표적 세포로 사용되었다. 신선한 인간 PBMC 또는 MACS 정제 NK 세포가 혈액 연충(OneBlood)으로부터 분리되어 효과기 세포로서 사용되었다. 효과기 세포는 2B8T2M, 이의 돌연변이 단백질 또는 리톡시맙의 존재하에 지정 Daudi 세포와 효과기:표적 비율로 혼합되었다. Daudi 세포는 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 2 ~ 3일 동안 항온처리되었고, 이후 이 세포의 생존능은 요오드화프로피듐(Sigma) 염색에 의해 평가되어, BD FACSVerse 상에서 분석되었다.
- [0317] 세포자멸 검정
- [0318] Daudi 세포는 2B8T2M, 이의 돌연변이 단백질 또는 리톡시맙의 존재하에 37°C에서 3일 동안 RPMI-10 중에서 항온처리되었다. 3일째 되는 날, Daudi 세포는 FITC-접합 어넥신 V(BioLegend)로 염색되었고, 세포자멸성 Daudi 세포 %는 BD FACSVerse상에서 분석되었다.
- [0319] 양자방출단층촬영(PET) 영상화 및 조직 생체 내 분포 연구
- [0320] C57BL/6 마우스에 64Cu-표지화 2B8T2M 및 64Cu-NOTA-리톡시맙 10 ~ 15 MBq가 정맥내(i.v.) 주사되었다. 마취된 동물을 대상으로 주사 후 다양한 시점에서 Inveon 마이크로PET/마이크로CT 설치류 모델 스캐너(Siemens)를 사용하여 정적 PET 스캔이 수행되었다. 주요 장기들에 대한 조직 1 그래당 주사 용량(%ID/g)을 산정하기 위해 데이터 획득, 영상 재구성 및 관심 영역 분석이 이미 기술된 바와 같이 수행되었다(29,30). 각각의 조직에 있어서 방사능은 감마 카운터(Perkin Elmer)를 사용하여 측정되었고, %ID/g로 제시되었다.
- [0321] 종양 모델
- [0322] 마우스당  $1 \times 10^7$  개 Daudi 세포를 i.v. 주사한 다음, 종양 보유 FOX Chase SCID 또는 SCID 베이지 마우스는 뒷다리 마비 여부(생존의 종말점으로 간주)에 대해 면밀히 모니터링되었다. 골수 내 Daudi 세포 %는 PE-접합 인간 HLA-DR 항체(BioLegend)가 사용되는 유세포분석(FACSVerse)에 의해 측정되었다.
- [0323] T 세포 표지화 및 양자 형식의 운반
- [0324] 공여C57BL/6NHsd 마우스의 비장과 림프절로부터 얻어진 CD3+ 증량 세포(CD3 Enrichment Column, R&D Systems)는 제조자의 지침에 따라 CellTrace Violet(Invitrogen)으로 표지화되었다. 당일(SD0),  $1 \times 10^7$  개의 바이올렛 표지화 세포는 동계 C57BL/6NHsd 마우스에 양자의 방식으로 운반되었다. SD2에, 마우스는 시험 물질로 i.v. 처리되었다. SD5에, 비장이 수집된 후, 유세포분석에 의해 공여 림프구 증식이 일어났는지(바이올렛 표지)와 림프구 하위세트 조성이 분석되었다.
- [0325] 사이노몰거스 원숭이 연구
- [0326] Yunnan Laboratory Primate, Inc.(Kunming, China)에 의해 수컷 사이노몰거스 원숭이(2.20 ~ 2.85 kg, 2 ~ 3세)가 제공되었다. 이 연구는, Yunnan Laboratory Primate, Inc.의 IACUC에 의해 승인된 연구 제안에 의거 수

행되었다. 연구 당일과 3일째 되는 날, 2B8T2M 5 mg/kg과 리툽시맙 10 mg/kg이 i.v. 투여되었고, PBS는 처리 대조군으로 사용되었다. 7일째 되는 날, 원숭이는 안락사되었고, 비장 및 장간막 림프절이 수집되어 면역세포 분석용으로 처리되었다. 혈액 시료는 투여전과, 1일(투여후 24시간), 3일(2차 투여전), 4일(2차 투여후 24시간), 5일 및 7일에 채취되었다.

[0327] 데이터 분석

[0328] 생존 데이터는 Kaplan-Meier 방법을 사용하여 분석되었다. 연속 변수들의 비교는 슈튜던트 t 검정 또는 ANOVA (양측 꼬리 검정)(GraphPad Prism4)을 사용하여 행하여졌다. 0.05 이하인 P 값은 유의미한 것으로 간주되었다.

[0329] 하기 참고문헌들이 본 실시예에서 인용되었다.

1. Fehniger, T. A., and Caligiuri, M. A. (2001) Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* **97**, 14-32
2. Waldmann, T. A. (2006) The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol* **6**, 595-601
3. Zhu, X., Marcus, W. D., Xu, W., Lee, H. I., Han, K., Egan, J. O., Yovandich, J. L., Rhode, P. R., and Wong, H. C. (2009) Novel human interleukin-15 agonists. *J Immunol* **183**, 3598-3607
4. Han, K. P., Zhu, X., Liu, B., Jeng, E., Kong, L., Yovandich, J. L., Vyas, V. V., Marcus, W. D., Chavaillaz, P. A., Romero, C. A., Rhode, P. R., and Wong, H. C. (2011) IL-15:IL-15 receptor alpha superagonist complex: high-level co-expression in recombinant mammalian cells, purification and characterization. *Cytokine* **56**, 804-810
5. Xu, W., Jones, M., Liu, B., Zhu, X., Johnson, C. B., Edwards, A. C., Kong, L., Jeng, E. K., Han, K., Marcus, W. D., Rubinstein, M. P., Rhode, P. R., and Wong, H. C. (2013) Efficacy and mechanism-of-action of a novel superagonist interleukin-15: interleukin-15 receptor alphaSu/Fc fusion complex in syngeneic murine models of multiple myeloma. *Cancer Res* **73**, 3075-3086
6. Mathios, D., Park, C. K., Marcus, W. D., Alter, S., Rhode, P. R., Jeng, E. K., Wong, H. C., Pardoll, D. M., and Lim, M. (2016) Therapeutic administration of IL-15 superagonist complex ALT-803 leads to long-term survival and durable antitumor immune response in a murine glioblastoma model. *Int J Cancer* **138**, 187-194
7. Rosario, M., Liu, B., Kong, L., Collins, L. I., Schneider, S. E., Chen, X., Han, K., Jeng, E. K., Rhode, P. R., Leong, J. W., Schappe, T., Jewell, B. A., Keppel, C. R., Shah, K., Hess, B., Romee, R., Piwnica-Worms, D. R., Cashen, A. F., Bartlett, N. L., Wong, H. C., and Fehniger, T. A. (2016) The IL-15-Based ALT-803 Complex Enhances FcγRIIIa-Triggered NK Cell Responses and In Vivo Clearance of B Cell Lymphomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **22**, 596-608
8. Wong, R. L., Liu, B., Zhu, X., You, L., Kong, L., Han, K. P., Lee, H. I., Chavaillaz, P. A., Jin, M., Wang, Y., Rhode, P. R., and Wong, H. C. (2011) Interleukin-15:Interleukin-15 receptor alpha scaffold for creation of multivalent targeted immune molecules. *Protein Eng Des Sel* **24**, 373-383
9. Nishida, M., Usuda, S., Okabe, M., Miyakoda, H., Komatsu, M., Hanaoka, H., Teshigawara, K., and Niwa, O. (2007) Characterization of novel murine anti-CD20 monoclonal antibodies and their comparison to 2B8 and c2B8 (rituximab). *Int J Oncol* **31**, 29-40

[0330]



10. Hessel, A. J., Hangartner, L., Hunter, M., Havenith, C. E., Beurskens, F. J., Bakker, J. M., Lanigan, C. M., Landucci, G., Forthal, D. N., Parren, P. W., Marx, P. A., and Burton, D. R. (2007) Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. *Nature* **449**, 101-104
11. Beers, S. A., Chan, C. H., French, R. R., Cragg, M. S., and Glennie, M. J. (2010) CD20 as a target for therapeutic type I and II monoclonal antibodies. *Semin Hematol* **47**, 107-114
12. Rhode, P. R., Egan, J. O., Xu, W., Hong, H., Webb, G. M., Chen, X., Liu, B., Zhu, X., Wen, J., You, L., Kong, L., Edwards, A. C., Han, K., Shi, S., Alter, S., Sacha, J. B., Jeng, E. K., Cai, W., and Wong, H. C. (2016) Comparison of the Superagonist Complex, ALT-803, to IL15 as Cancer Immunotherapeutics in Animal Models. *Cancer immunology research* **4**, 49-60
13. Sips, M., Krykbaeva, M., Diefenbach, T. J., Ghebremichael, M., Bowman, B. A., Dugast, A. S., Boesch, A. W., Streeck, H., Kwon, D. S., Ackerman, M. E., Suscovich, T. J., Brouckaert, P., Schacker, T. W., and Alter, G. (2016) Fc receptor-mediated phagocytosis in tissues as a potent mechanism for preventive and therapeutic HIV vaccine strategies. *Mucosal immunology*
14. Abes, R., Gelize, E., Fridman, W. H., and Teillaud, J. L. (2010) Long-lasting antitumor protection by anti-CD20 antibody through cellular immune response. *Blood* **116**, 926-934
15. Wang, W., Erbe, A. K., Hank, J. A., Morris, Z. S., and Sondel, P. M. (2015) NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology* **6**, 368
16. van Meerten, T., and Hagenbeek, A. (2010) CD20-targeted therapy: the next generation of antibodies. *Semin Hematol* **47**, 199-210
17. Goede, V., Fischer, K., Busch, R., Engelke, A., Eichhorst, B., Wendtner, C. M., Chagorova, T., de la Serna, J., Dillhuydy, M. S., Illmer, T., Opat, S., Owen, C. J., Samoylova, O., Kreuzer, K. A., Stilgenbauer, S., Dohner, H., Langerak, A. W., Ritgen, M., Kneba, M., Asikanius, E., Humphrey, K., Wenger, M., and Hallek, M. (2014) Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *The New England journal of medicine* **370**, 1101-1110
18. Hillmen, P., Robak, T., Janssens, A., Babu, K. G., Kloczko, J., Grosicki, S., Doubek, M., Panagiotidis, P., Kimby, E., Schuh, A., Pettitt, A. R., Boyd, T., Montillo, M., Gupta, I. V., Wright, O., Dixon, I., Carey, J. L., Chang, C. N., Lisby, S., McKeown, A., and Offner, F. (2015) Chlorambucil plus ofatumumab versus chlorambucil alone in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia (COMPLEMENT 1): a randomised, multicentre, open-label phase 3 trial. *Lancet (London, England)* **385**, 1873-1883
19. Ghetie, M. A., Bright, H., and Vitetta, E. S. (2001) Homodimers but not monomers of Rituxan (chimeric anti-CD20) induce apoptosis in human B-lymphoma cells and synergize with a chemotherapeutic agent and an immunotoxin. *Blood* **97**, 1392-1398
20. Li, B., Shi, S., Qian, W., Zhao, L., Zhang, D., Hou, S., Zheng, L., Dai, J., Zhao, J., Wang, H., and Guo, Y. (2008) Development of novel tetravalent anti-CD20 antibodies with potent antitumor activity. *Cancer Res* **68**, 2400-2408
21. Wong, H. C., Jeng, E. K., and Rhode, P. R. (2013) The IL-15-based superagonist ALT-803 promotes the antigen-independent conversion of memory CD8 T cells into innate-like effector cells with antitumor activity. *Oncoimmunology* **2**, e26442
22. Smalls-Mantey, A., Doria-Rose, N., Klein, R., Patamawenu, A., Migueles, S. A., Ko, S. Y., Hallahan, C. W., Wong, H., Liu, B., You, L., Scheid, J., Kappes, J. C., Ochsenbauer, C., Nabel, G. J., Mascola, J. R., and Connors, M. (2012) Antibody-

[0331]



- dependent cellular cytotoxicity against primary HIV-infected CD4+ T cells is directly associated with the magnitude of surface IgG binding. *Journal of virology* **86**, 8672-8680
23. Seay, K., Church, C., Zheng, J. H., Deneroff, K., Ochsenbauer, C., Kappes, J. C., Liu, B., Jeng, E. K., Wong, H. C., and Goldstein, H. (2015) In Vivo Activation of Human NK Cells by Treatment with an Interleukin-15 Superagonist Potently Inhibits Acute In Vivo HIV-1 Infection in Humanized Mice. *Journal of virology* **89**, 6264-6274
  24. Zhu, E. F., Gai, S. A., Opel, C. F., Kwan, B. H., Surana, R., Mihm, M. C., Kauke, M. J., Moynihan, K. D., Angelini, A., Williams, R. T., Stephan, M. T., Kim, J. S., Yaffe, M. B., Irvine, D. J., Weiner, L. M., Dranoff, G., and Wittrup, K. D. (2015) Synergistic innate and adaptive immune response to combination immunotherapy with anti-tumor antigen antibodies and extended serum half-life IL-2. *Cancer cell* **27**, 489-501
  25. Park, S., Jiang, Z., Mortenson, E. D., Deng, L., Radkevich-Brown, O., Yang, X., Sattar, H., Wang, Y., Brown, N. K., Greene, M., Liu, Y., Tang, J., Wang, S., and Fu, Y. X. (2010) The therapeutic effect of anti-HER2/neu antibody depends on both innate and adaptive immunity. *Cancer cell* **18**, 160-170
  26. Hilchey, S. P., Hyrien, O., Mosmann, T. R., Livingstone, A. M., Friedberg, J. W., Young, F., Fisher, R. I., Kelleher, R. J., Jr., Bankert, R. B., and Bernstein, S. H. (2009) Rituximab immunotherapy results in the induction of a lymphoma idiotype-specific T-cell response in patients with follicular lymphoma: support for a "vaccinal effect" of rituximab. *Blood* **113**, 3809-3812
  27. DiLillo, D. J., and Ravetch, J. V. (2015) Differential Fc-Receptor Engagement Drives an Anti-tumor Vaccinal Effect. *Cell* **161**, 1035-1045
  28. Hughes, M. S., Yu, Y. Y., Dudley, M. E., Zheng, Z., Robbins, P. F., Li, Y., Wunderlich, J., Hawley, R. G., Moayeri, M., Rosenberg, S. A., and Morgan, R. A. (2005) Transfer of a TCR gene derived from a patient with a marked antitumor response conveys highly active T-cell effector functions. *Human gene therapy* **16**, 457-472
  29. Shi, S., Orbay, H., Yang, Y., Graves, S. A., Nayak, T. R., Hong, H., Hernandez, R., Luo, H., Goel, S., Theuer, C. P., Nickles, R. J., and Cai, W. (2015) PET Imaging of Abdominal Aortic Aneurysm with <sup>64</sup>Cu-Labeled Anti-CD105 Antibody Fab Fragment. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **56**, 927-932
  30. Shi, S., Hong, H., Orbay, H., Graves, S. A., Yang, Y., Ohman, J. D., Liu, B., Nickles, R. J., Wong, H. C., and Cai, W. (2015) ImmunopET of tissue factor expression in triple-negative breast cancer with a radiolabeled antibody Fab fragment. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* **42**, 1295-1303

[0332]

[0333]

#### 기타 구현예들

[0334]

본 발명은, 본 발명의 상세한 설명과 함께 기재되어 있지만, 전술된 기재는 본 발명의 범위를 예시하기 위한 것이지 제한하고자 하는 것은 아니며, 본 발명의 범위는 첨부된 특허청구범위에 의해 한정된다. 다른 양태들, 이점들, 그리고 변형예들은 하기 청구항들의 범위 내에 있다.

[0335]

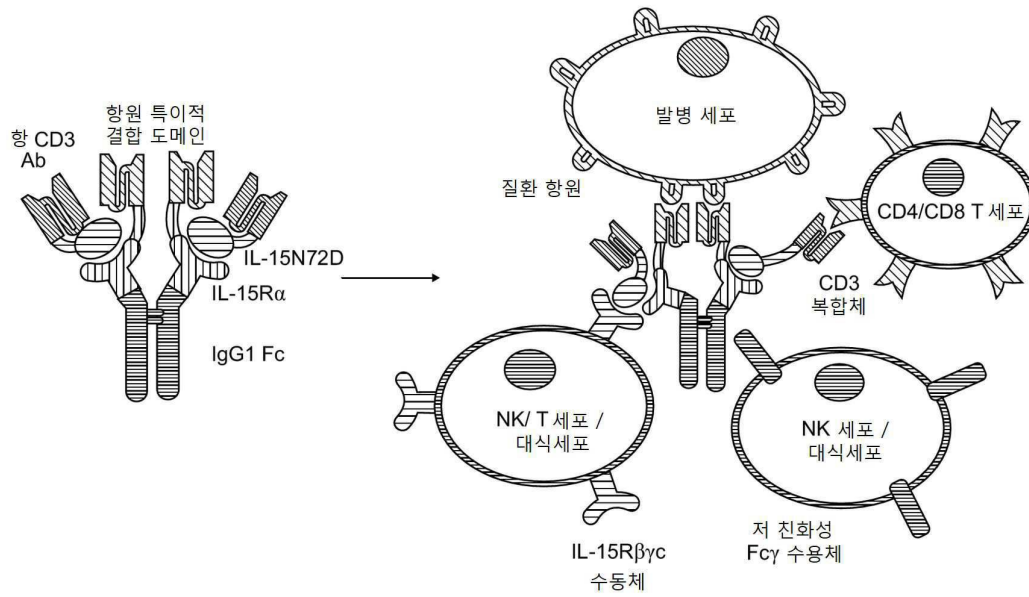
본원에 인용된 특허 문헌 및 과학 문헌은, 당 분야의 숙련자들이 이용 가능한 지식을 확립해준다. 본원에 인용된 모든 미국 특허와, 공개 또는 미공개 미국 특허 출원은 참조로 인용되어 있는 것이다. 본원에 인용된 모든 공개 외국 특허 및 특허출원은 본원에 참조로 인용되어 있는 것이다. 본원에 인용된 승인 번호로서 명시된 Genbank 및 NCBI 제출에 관한 사항도 본원에 참조로 인용되어 있는 것이다. 본원에 인용된 기타 모든 공표 참고 문헌, 서류, 논문 및 과학 문헌은 본원에 참조로 인용되어 있는 것이다.

[0336]

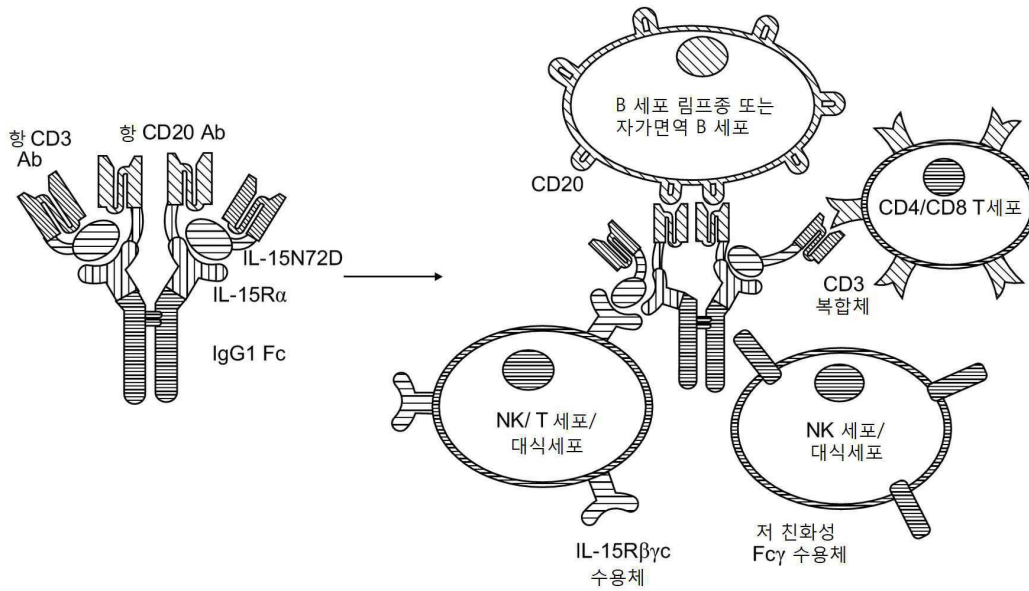
본 발명은, 본 발명의 바람직한 구현예를 참고로 하여 구체적으로 보였을 뿐만 아니라 기술되어 있긴 하지만, 그 형태와 세부사항에 대한 다양한 변화가, 첨부된 청구항들에 의해 포함되는 본 발명의 범위로부터 벗어나지 않고 내부적으로 가하여질 수 있음은 당 업자에 의해 이해될 것이다.

## 도면

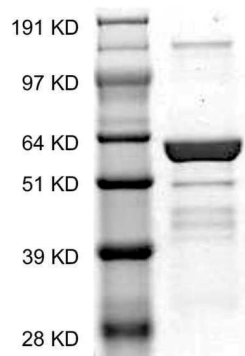
### 도면1



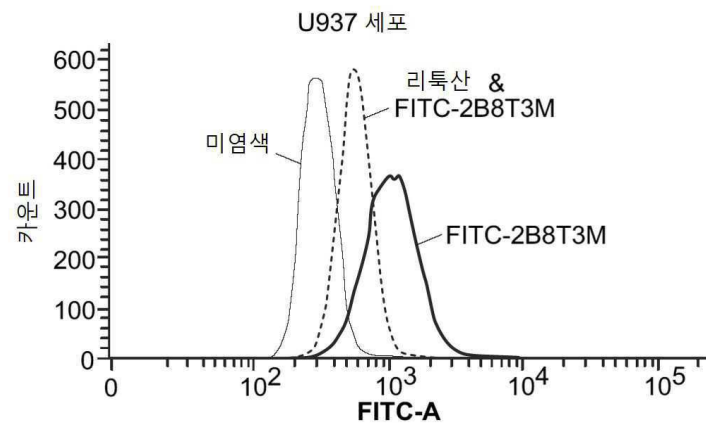
### 도면2



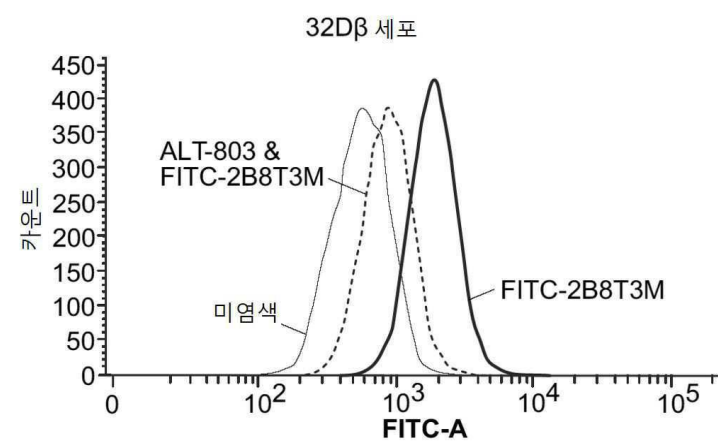
도면3



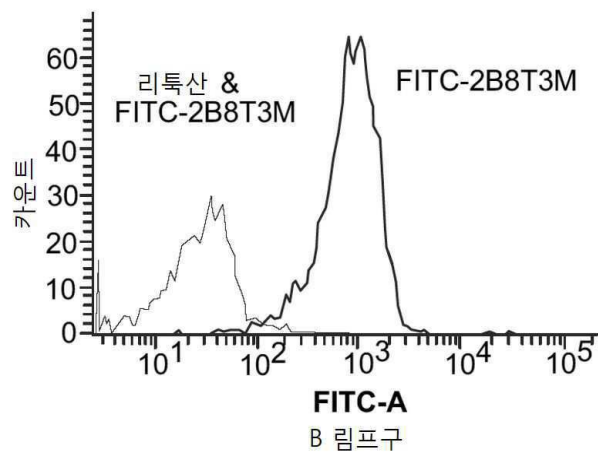
도면4a



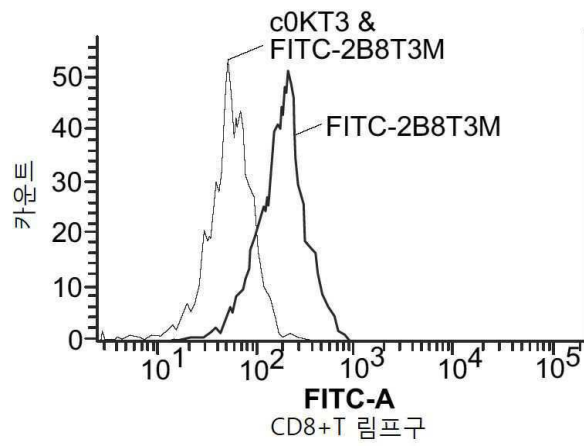
도면4b



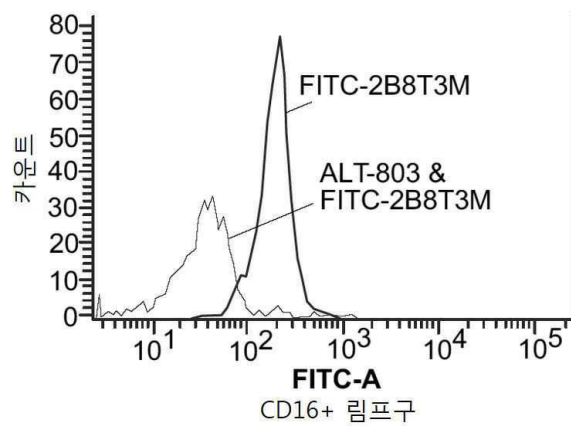
도면5a



도면5b

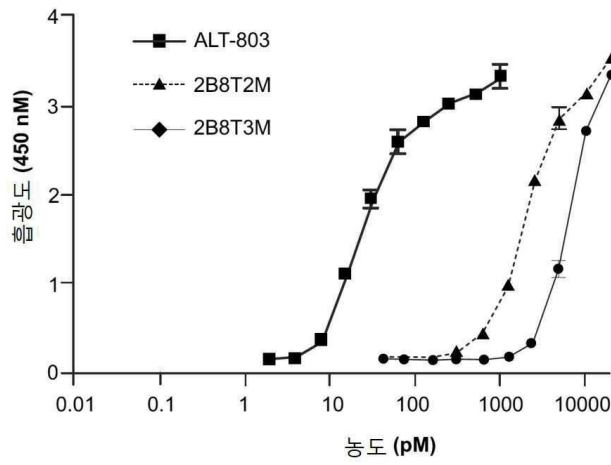


도면5c

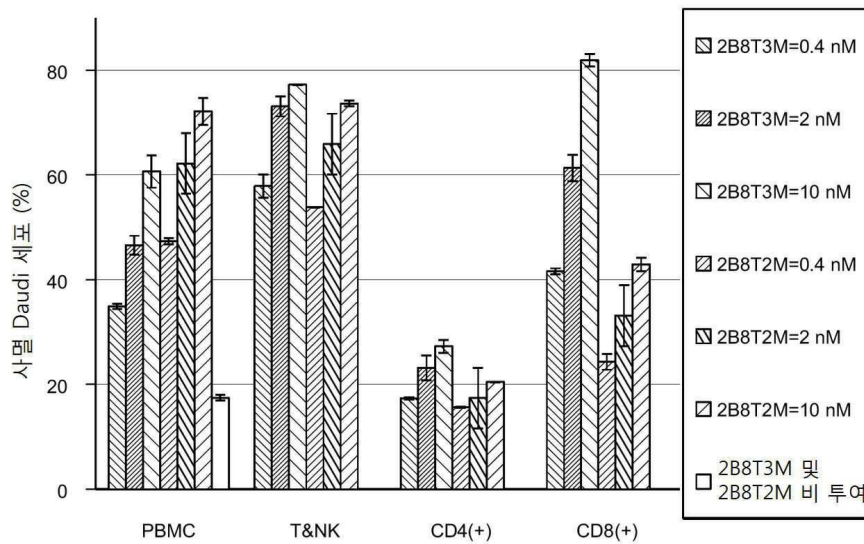




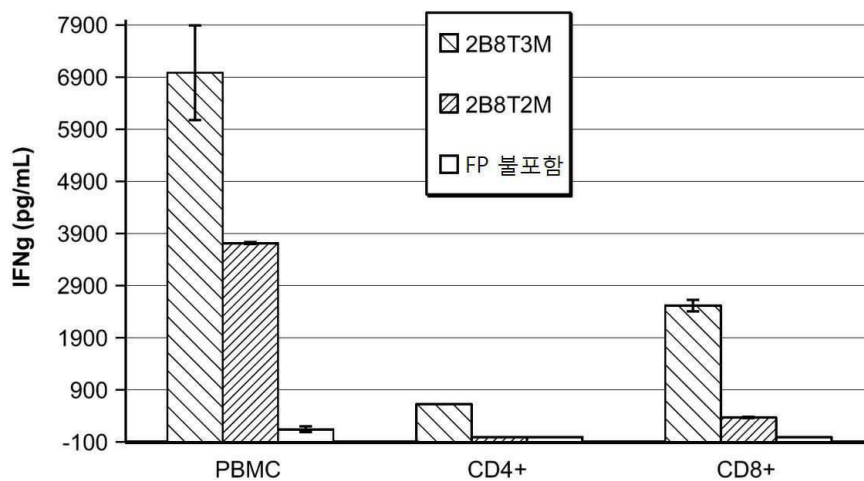
도면6



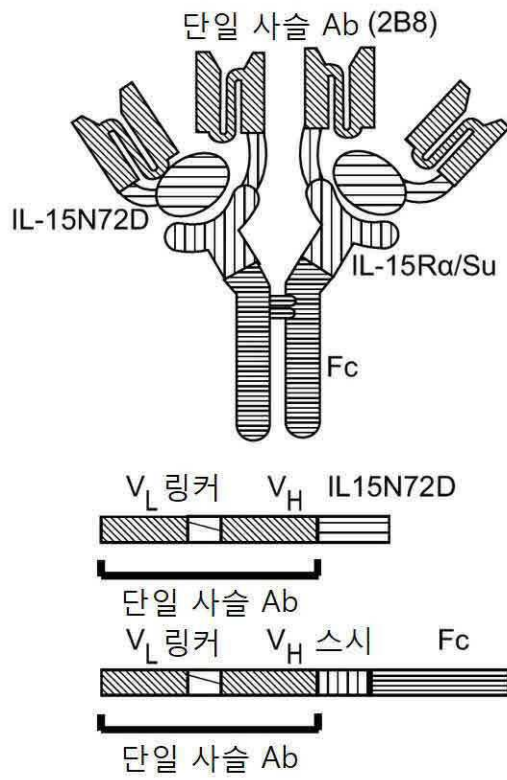
도면7



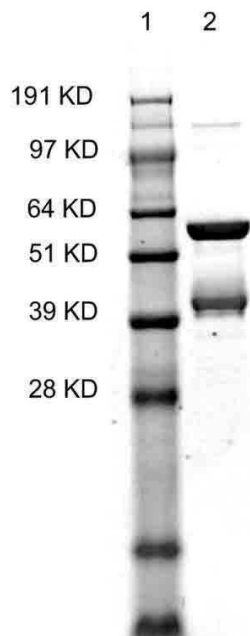
도면8



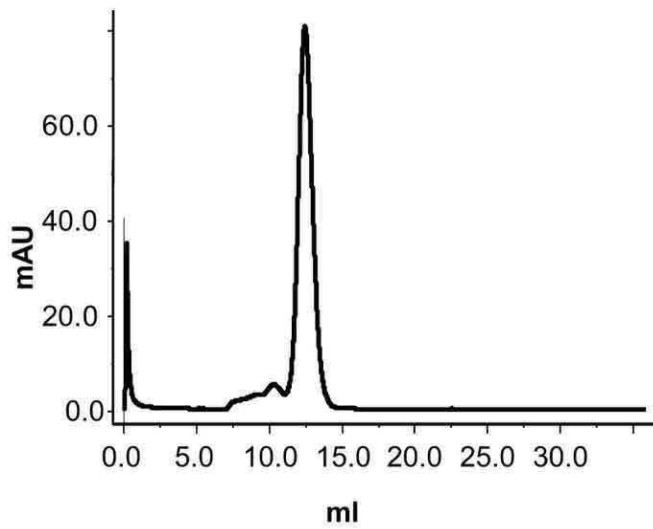
도면9a



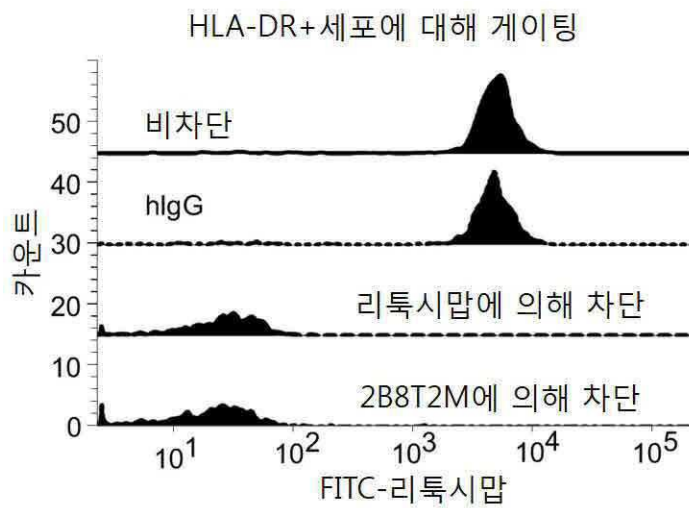
도면9b



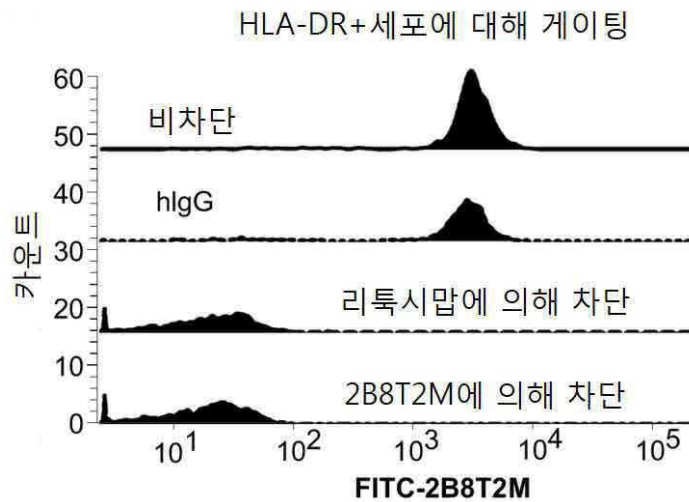
도면9c



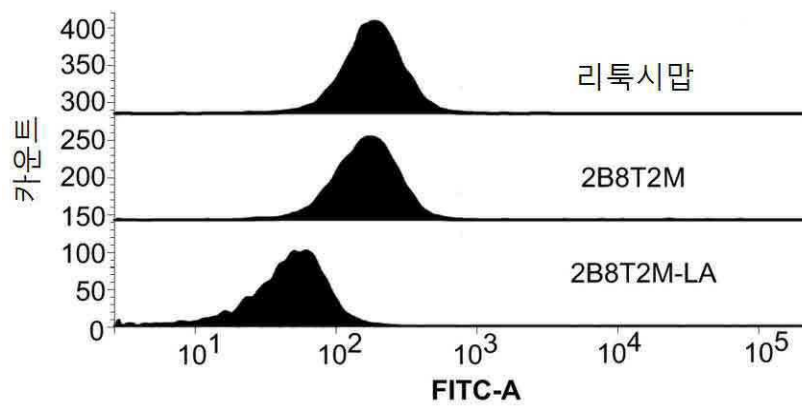
도면10a



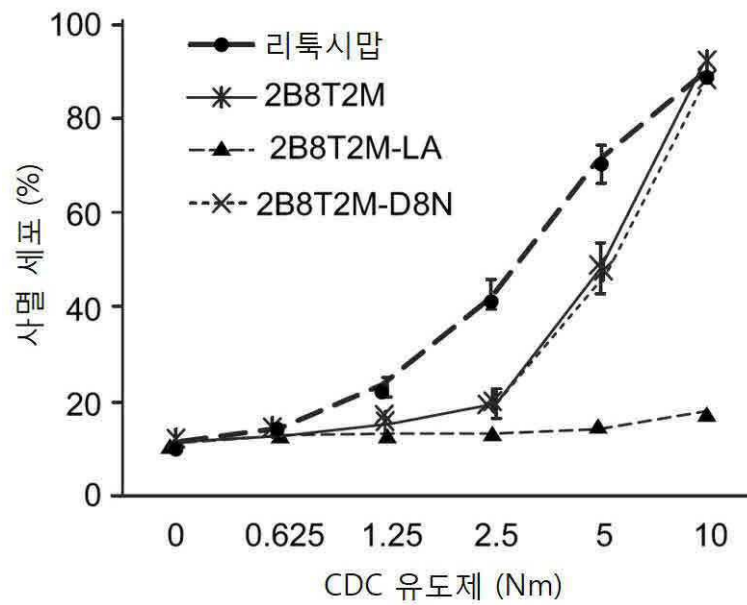
도면10b



도면10c

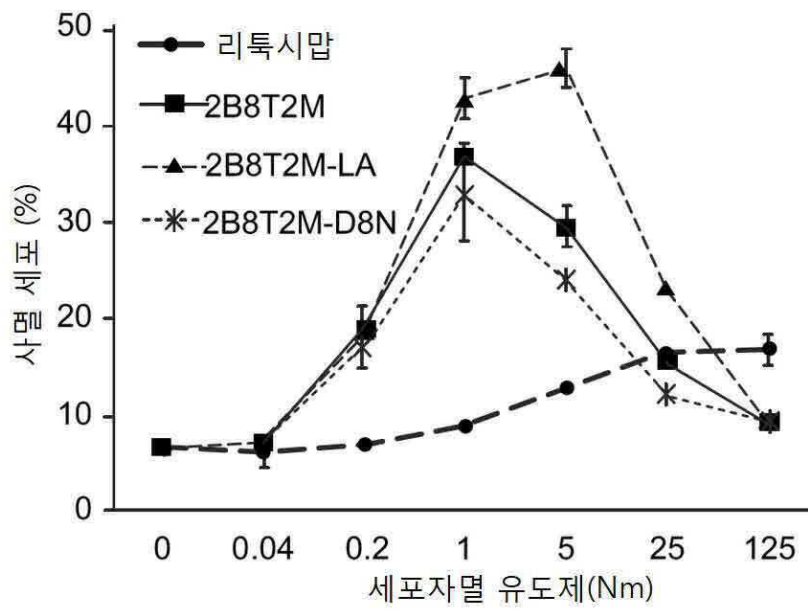


도면11a

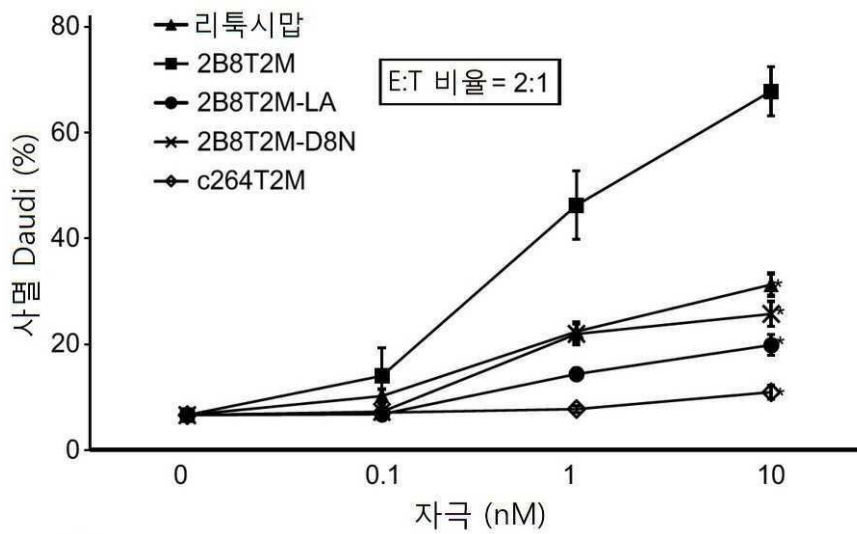




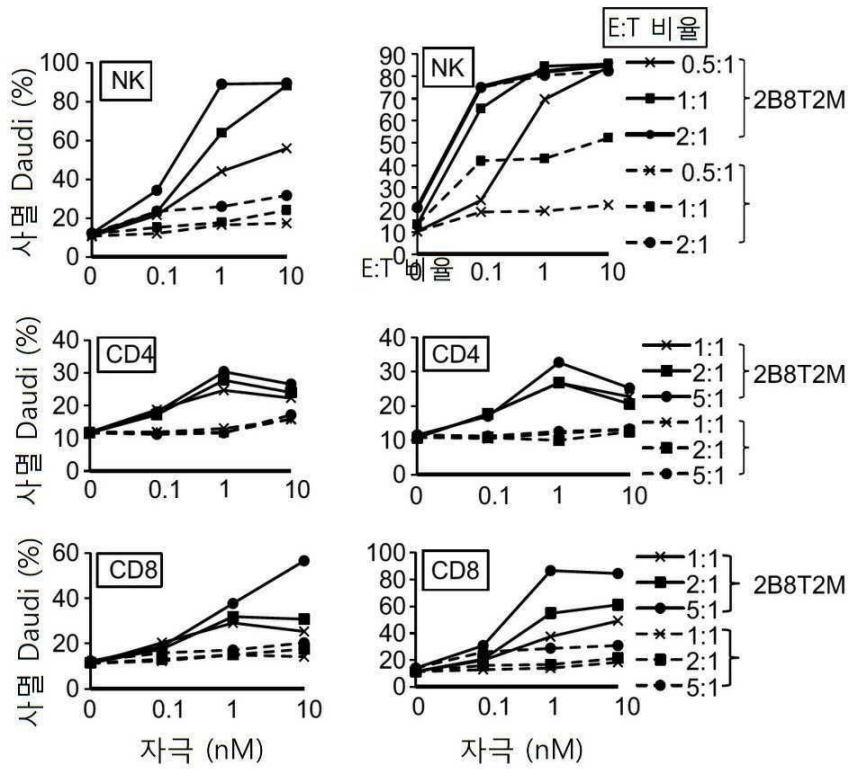
도면11b



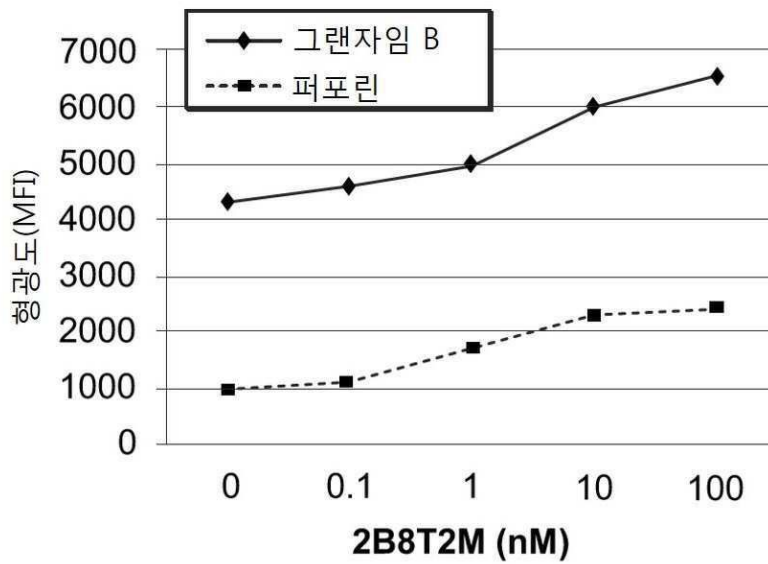
도면12a



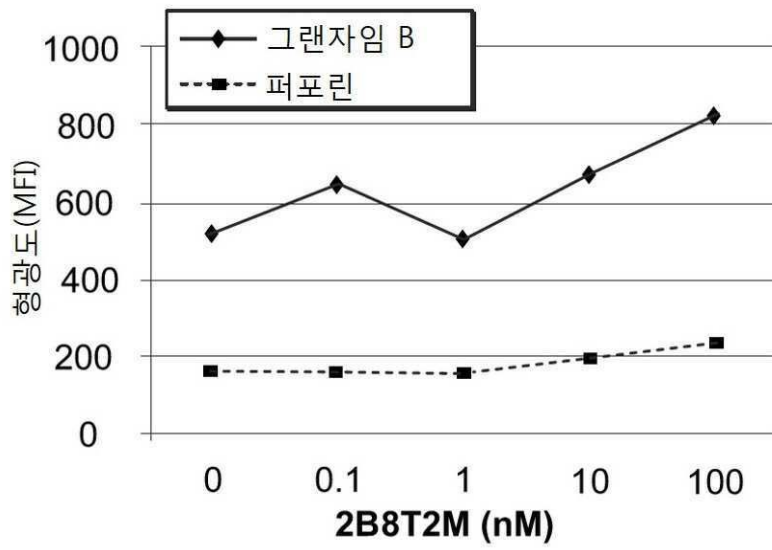
도면12b



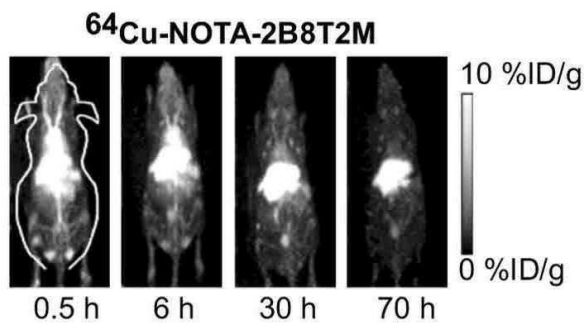
도면12c



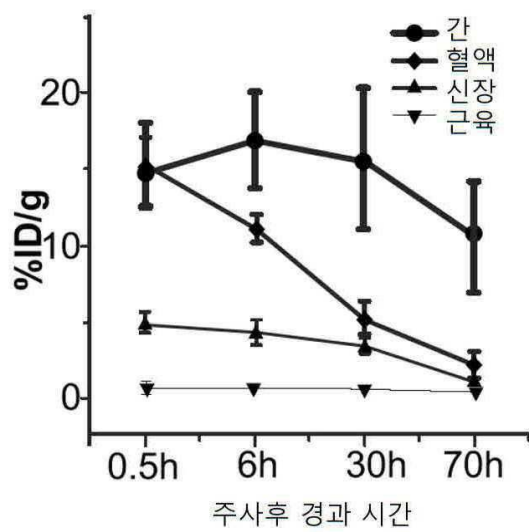
도면12d



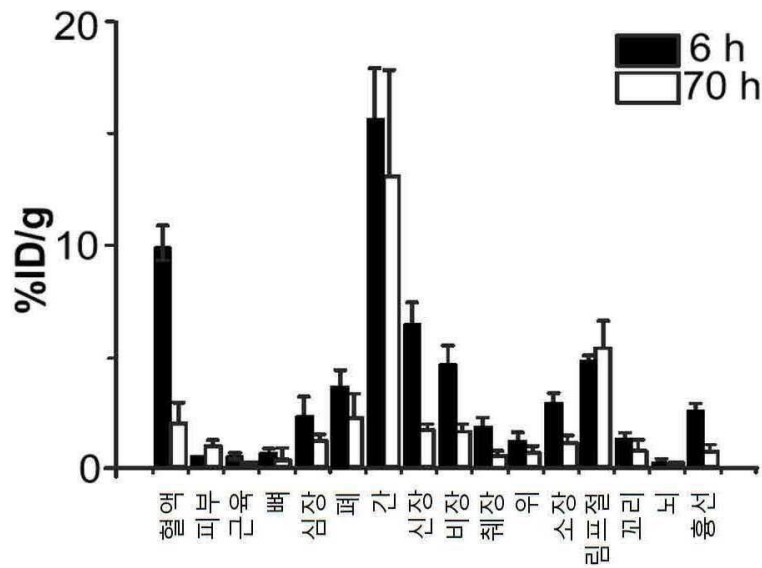
도면13a



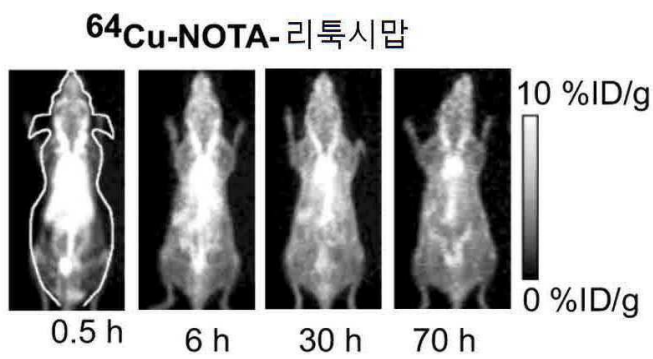
도면13b



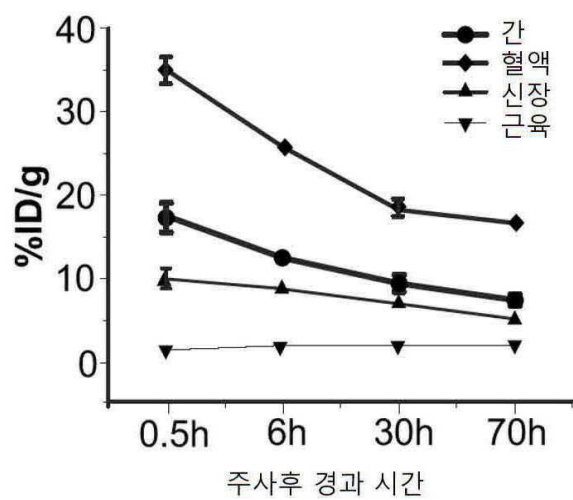
도면 13c



도면 13d

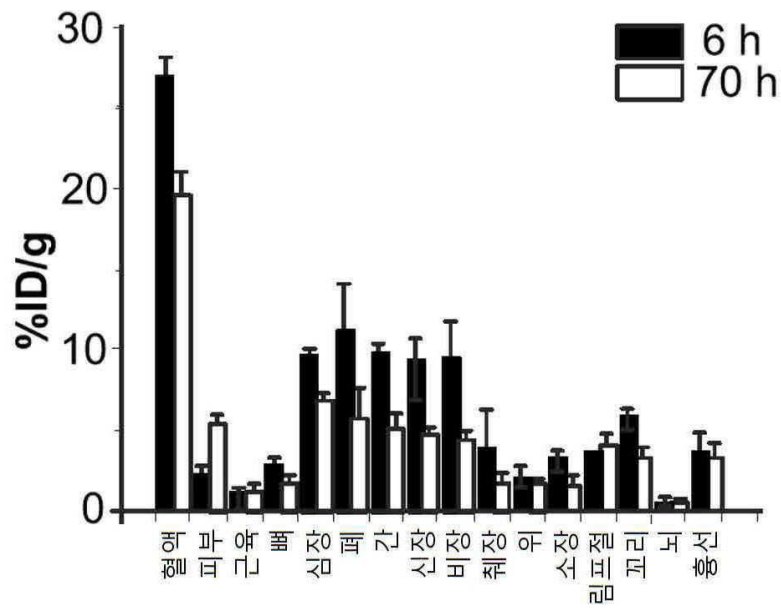


도면 13e

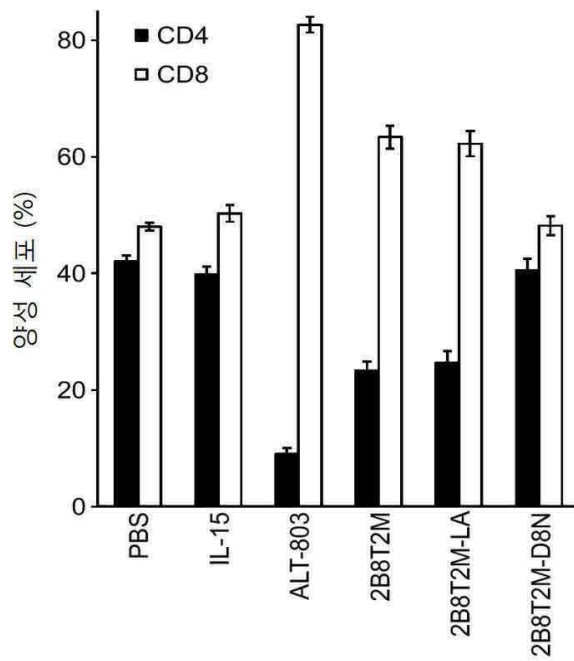




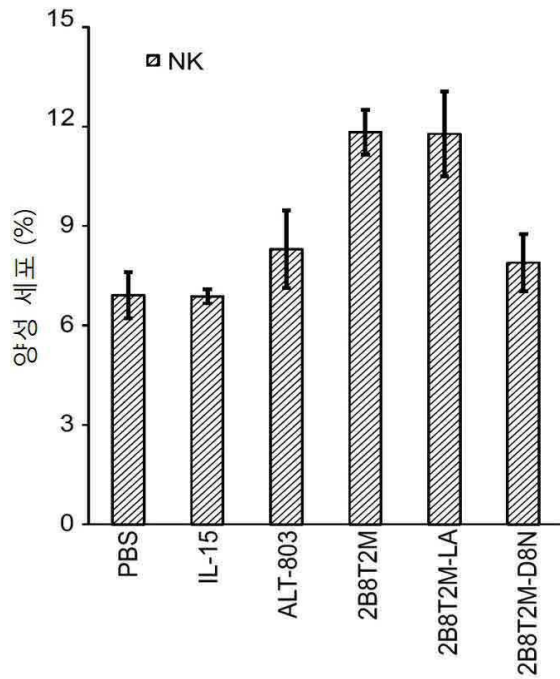
도면13f



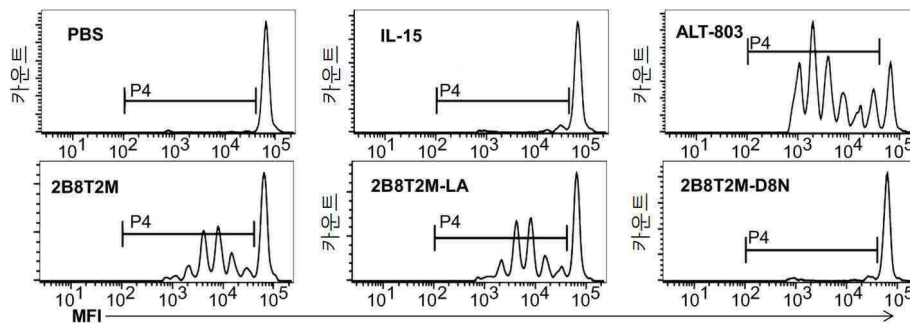
도면14a



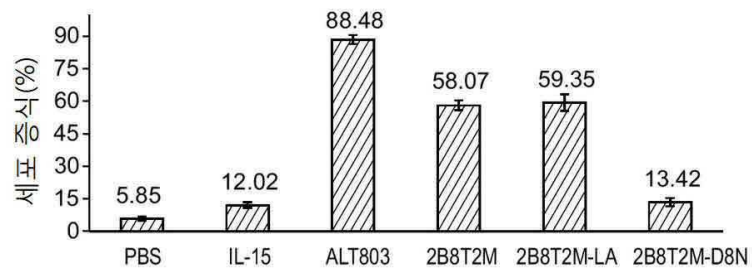
도면14b



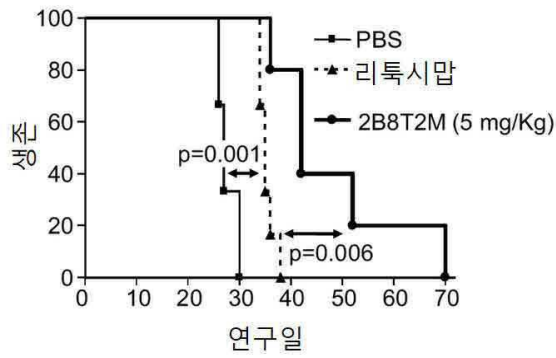
도면14c



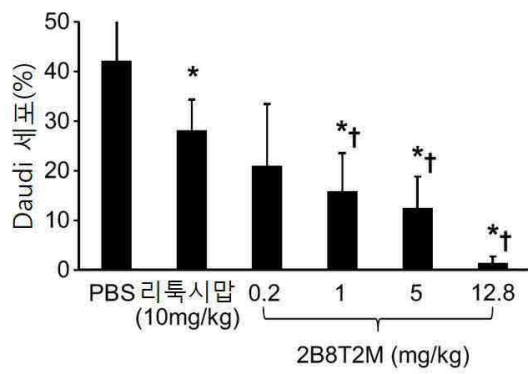
도면14d



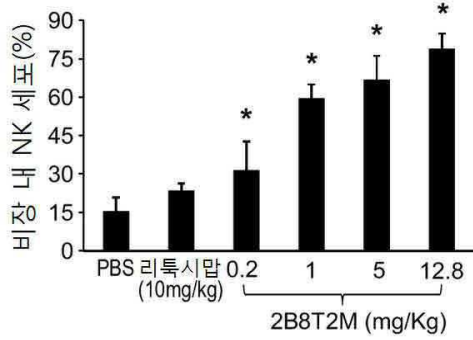
도면15a



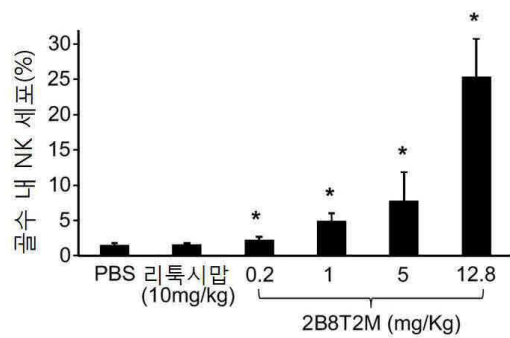
도면15b



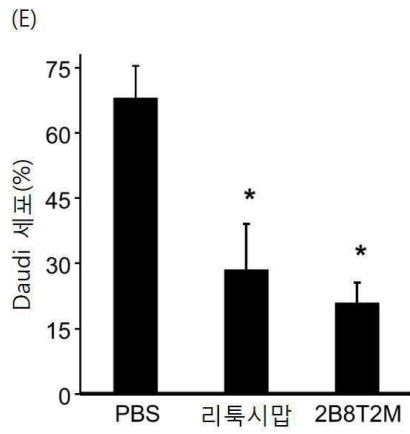
도면15c



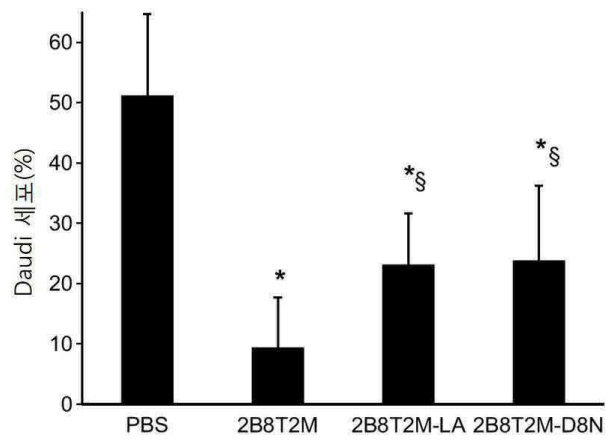
도면15d



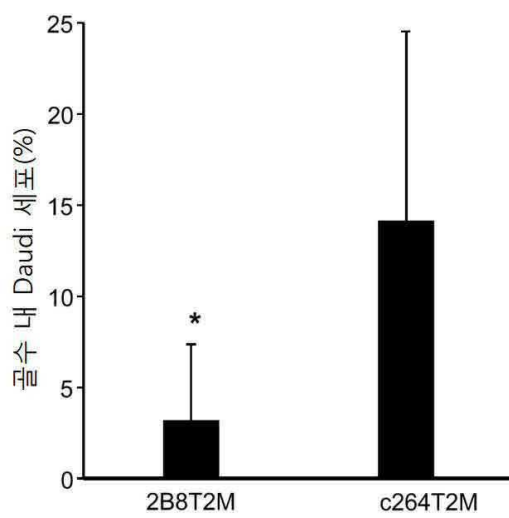
도면15e



도면16a

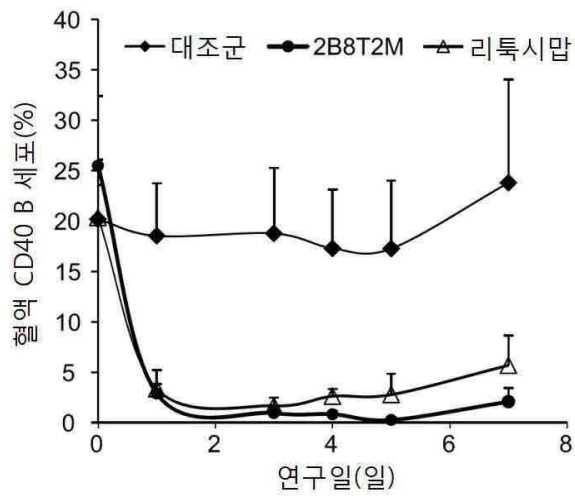


도면16b

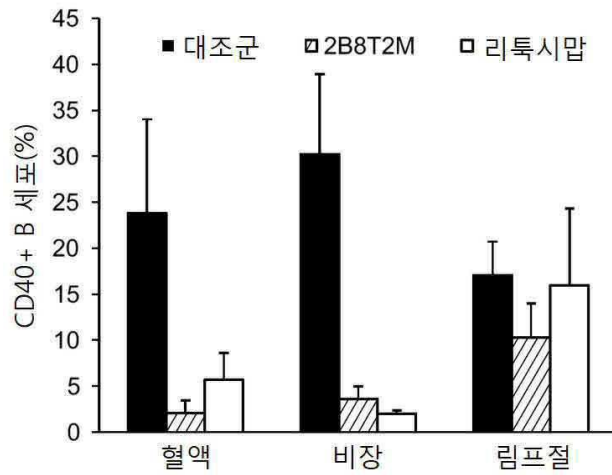




도면17a



도면17b



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> Altor Bioscience Corporation

Liu, Bai

Rhode, Peter

Wong, Hing C.

<120> CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF MULTIMERIC IL-15-BASED  
MOLECULES WITH CD3 BINDING DOMAINS

<130> 48277-525001W0

<140> PCT/US2017/034656

<141> 2017-05-26

<150> US 62/397,236

<151> 2016-09-20

<150> US 62/342,311

<151> 2016-05-27

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1140

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Synthetic polynucleotide

<400> 1

```
atggagacag acacactcct gttatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccaccggt      60
caaattgttc tcacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc      120
atgacctgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatgaact ggtaccagca gaagtcaggc      180
acctccccc aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgtcac      240
ttcaggggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcaca tcagcgcat ggaggtgaa      300
gatgtgccca cttattactg ccagcagtgg agtagtaacc cattcacgtt cggtcgggg      360
acaaagttag aaataaacgc gactagtga ggtggcggat caggaggcgg aggttctggc      420
```

```
ggaggtggga gtctcgagca ggtccagctg cagcagtctg gggctgaact ggcaagacct      480
ggggcctcag tgaagatgtc ctgcaaggct tctggctaca cctttactag gtacacgatg      540
cactgggtaa aacagaggcc tggacagggt ctggaatgga ttggatacat taatcctagc      600
cgtgggtata ctaattacaa tcagaagttc aaggacaagg ccacattgac tacagacaaa      660
tcctccagca cagcctacat gcaactgagc agcctgacat ctgaggactc tgcagtctat      720
tactgtgcaa gatattatga tgatcattac tgccttgact actggggcca aggcaccact      780
ctcacagtct cctcaaactg ggtaaacgta ataagtgatt tgaaaaaaat tgaagatctt      840
```

```
attcaatcta tgcattatga tgctacttta tatacggaaa gtgatgttca cccagttgc      900
aaagtaacag caatgaagtg ctttctcttg gagttacaag ttatttact tgagtccgga      960
gatgcaagta ttcatgatac agtagaaaat ctgatcatcc tagcaaacga cagtttgtct      1020
tctaattggga atgtaacaga atctggatgc aaagaatgtg aggaactgga ggaaaaaaat      1080
attaaagaat ttttgcagag ttttgtacat attgtccaaa tgttcatcaa cacttcttaa      1140
```

<210> 2

<211> 379

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 2

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser

20 25 30

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser

35 40 45

Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys

50 55 60

Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His

65 70 75 80

Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly

85 90 95

Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser

100 105 110

Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Thr

115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

130 135 140

Leu Glu Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro

145 150 155 160

Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

165 170 175

Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu

180 185 190

Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln

195 200 205

Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr

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

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

325 330 335  
Asp Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu  
340 345 350  
Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe  
355 360 365  
Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser  
370 375

<210> 3

<211> 1689

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 3

atggattttc aggtgcagat tatcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc 60  
agaggacaaa ttgttctctc ccagttctcca gcaatcctgt ctgcatctcc aggggagaag 120  
gtcacaatga cttgcagggc cagctcaagt gtaagttaca tccactggtt ccagcagaag 180  
ccaggatcct cccccaacc ctggattttat gccacatcca acctggcttc tggagtcctt 240  
gttcgcttca gtggcagtggt gtctgggact tcttactctc tcacaatcag cagagtggag 300



gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggacta gtaaccacc cacgttcgga 360

ggggggacca agctggaaat caaaagtga ggtggcggat ccggaggtgg aggttctggt 420

ggaggtggga gtcaggtaca actgcagcag cctggggctg agctggtgaa gcctggggcc 480

tcagtgaaga tgcctgcaa ggcttctggc tacacattta ccagttacaa tatgcactgg 540

gtaaaacaga cacctggctg gggcctggaa tggattggag ctatttatcc cggaaatggt 600

gatacttctt acaatcagaa gttaaaggc aaggccacat tgactgcaga caaatcctcc 660

agcacagcct acatgcagct cagcagcctg acatctgagg actctgcggt ctattactgt 720

gcaagatcga cttactacgg cggtagctgg tacttcratg tctggggcgc agggaccacg 780

gtcacmgtct ctgcaatcac gtgccctccc cccatgtccg tggaacacgc agacatctgg 840

gtcaagagct acagcttgta ctccaggag cgttacattt gtaactctgg tttcaagcgt 900

aaagccggca cgtccagcct gacggagtgc gtgttgaaca aggccacgaa tgcgcccac 960

tggacaaccc ccagtctcaa atgcattaga gagccgaaat cttgtgacaa aactcacaca 1020

tgccaccctg gccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttctt cttccccca 1080

aaaccaagg acacctcat gatctcccgg accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 1140

gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 1200

aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 1260

ctcacctgcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1320

aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccagaa 1380

ccacaggtgt acacctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 1440

acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1500

cagccggaga acaactacaa gaccagcct cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc 1560

ctctacagca agctcacctg ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1620

tccgtgatgc atgaggtctt gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctct 1680

ggtaaataa 1689

<210> 4

<211> 540

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 4

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly

1                      5                      10                      15  
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile  
                     20                      25                      30  
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
  
                     35                      40                      45  
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser  
                     50                      55                      60  
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu  
 65                      70                      75                      80  
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr  
                     85                      90                      95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
  
                     100                      105                      110  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln  
                     115                      120                      125  
 Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys  
                     130                      135                      140  
 Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys  
 145                      150                      155                      160  
 Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly  
  
                     165                      170                      175  
 Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu  
                     180                      185                      190  
 Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu  
                     195                      200                      205  
 Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr  
                     210                      215                      220  
 Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr  
  
 225                      230                      235                      240  
 Val Ser Ala Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp  
                     245                      250                      255

Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys  
260 265 270

Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys  
275 280 285

Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu  
290 295 300

Lys Cys Ile Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro  
305 310 315 320

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
325 330 335

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
340 345 350

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
355 360 365

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
370 375 380

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
385 390 395 400

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
405 410 415

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
420 425 430

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
435 440 445

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
450 455 460

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
465 470 475 480

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
485 490 495

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

500 505 510  
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

515 520 525  
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

530 535 540  
<210> 5

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 5

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile  
20 25 30

Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu  
35 40 45

Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu  
50 55 60

Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His  
65 70 75 80

Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asp Ser Leu Ser Ser  
85 90 95

Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu  
100 105 110

Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln  
115 120 125

Met Phe Ile Asn Thr Ser  
130

<210> 6

<211> 316

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 6

Met Asp Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr

1 5 10 15

Val Leu Ser Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp

20 25 30

Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys

35 40 45

Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys

50 55 60

Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

100 105 110

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

115 120 125

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe

130 135 140

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

145 150 155 160

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr

165 170 175

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

180 185 190

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

195 200 205

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg

210 215 220

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly



225                      230                      235                      240  
  
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
                                  245                      250                      255  
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
                                  260                      265                      270  
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
                                  275                      280                      285  
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
                                  290                      295                      300  
  
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 305                      310                      315