



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0156653  
(43) 공개일자 2024년10월30일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/54 (2024.01) A61K 38/00 (2006.01)  
A61K 39/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
C07K 14/52 (2006.01) C07K 14/56 (2006.01)  
C07K 16/10 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)  
C07K 16/32 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 14/5434 (2013.01)  
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7023471
- (22) 출원일자(국제) 2022년12월13일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년07월12일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2022/081460
- (87) 국제공개번호 WO 2023/114775  
국제공개일자 2023년06월22일
- (30) 우선권주장  
63/265,339 2021년12월13일 미국(US)  
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인  
데카 바이오사이언시스, 인크.  
미국 20876 메릴랜드 저먼타운 골든로드 라인  
20271 스위트 2087
- (72) 발명자  
뎀, 존  
미국 20876 메릴랜드 저먼타운 골든로드 라인  
20271 스위트 2087 데카 바이오사이언시스, 인크.  
내
- (74) 대리인  
양영준, 이상남

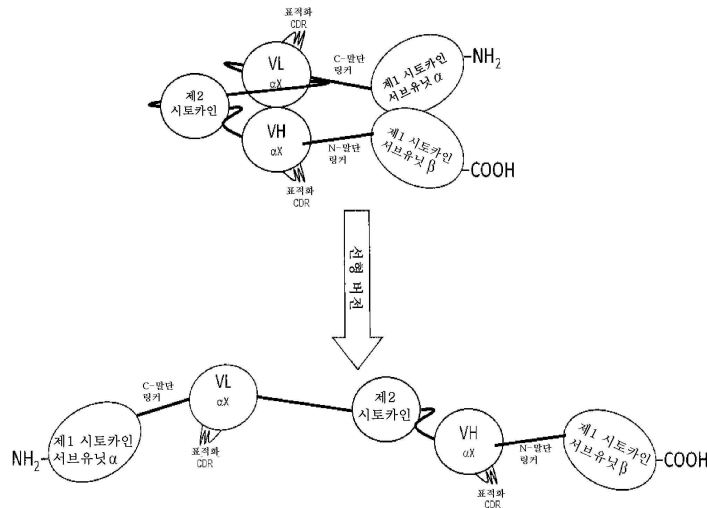
전체 청구항 수 : 총 42 항

(54) 발명의 명칭 다중-서브유닛 시토카인을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질

(57) 요약

본 출원은 단일쇄 가변 단편 스캐폴딩 시스템에 융합된 알파 및 베타 다중-서브유닛 시토카인, 예컨대 IL-12 또는 IL-27, 및 scFv의 힌지 영역에서 연결된 제2 시토카인을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질 조성물, 이의 제약 조성물 및/또는 제형에 관한 것이다. 또한 본 출원은 암, 염증성 질환 또는 장애, 및 면역 및 면역 매개 질환 또는 장애를 치료하기 위해 이중 시토카인 융합 단백질 조성물을 사용하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*C07K 14/52* (2013.01)  
*C07K 14/54* (2013.01)  
*C07K 14/5428* (2013.01)  
*C07K 14/56* (2013.01)  
*C07K 16/1045* (2013.01)  
*C07K 16/2863* (2013.01)  
*C07K 16/2896* (2013.01)  
*C07K 16/32* (2013.01)  
*C12N 15/62* (2013.01)

(30) 우선권주장

63/320,750 2022년03월17일 미국(US)  
63/328,990 2022년04월08일 미국(US)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

이중 시토카인 융합 단백질로서, 각각의 단량체성 서브유닛이 융합 단백질의 말단 단부에 융합된, 모노클로날 항체의 단일쇄 가변 영역 (scFv) 또는 항원 결합 단편에 융합된 제1 시토카인의 적어도 제1 및 제2 단량체성 서브유닛; 및 scFv 또는 항원 결합 단편의 VH 영역과 VL 영역 사이에 융합된 제2 시토카인을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 제1 시토카인이 IL-12 또는 IL-27인 이중 시토카인 융합 단백질.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 제1 단량체성 서브유닛이 p35 서브유닛이고, 제2 단량체성 서브유닛이 p40 서브유닛인 이중 시토카인 단백질.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 제1 단량체성 서브유닛이 서열식별번호(SEQ ID No): 1, 17, 19이고, 제2 단량체성 서브유닛이 서열식별번호: 3, 18, 20인 이중 시토카인 단백질.

#### 청구항 5

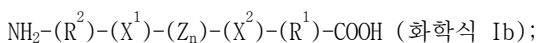
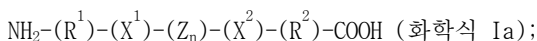
제1항에 있어서, 제1 단량체성 서브유닛이 p28 서브유닛이고, 제2 단량체성 서브유닛이 EB13 서브유닛인 이중 시토카인 단백질.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 제1 단량체성 서브유닛이 서열식별번호: 5이고, 제2 단량체성 서브유닛이 서열식별번호: 7인 이중 시토카인 단백질.

#### 청구항 7

화학식 (Ia) 또는 (Ib)의 이중 시토카인 융합 단백질:



식 중,

"R<sup>1</sup>"은 서열식별번호: 1, 17, 19 또는 5로부터 선택된 제1 시토카인 서열의 알파 서브유닛이고;

"R<sup>2</sup>"은 서열식별번호: 3, 18, 20, 또는 7로부터 선택된 제1 시토카인 서열의 베타 서브유닛이고;

여기서 R<sup>1</sup>이 서열식별번호: 1, 17, 또는 19일 때, R<sup>2</sup>는 서열식별번호: 3, 18, 20이거나, 또는 R<sup>1</sup>이 서열식별번호: 5일 때, R<sup>2</sup>는 서열식별번호: 7이고;

"X<sup>1</sup>"은 제1 모노클로날 항체로부터 획득된 VL 또는 VH 영역이고;

"X<sup>2</sup>"은 제1 모노클로날 항체로부터 획득된 VH 또는 VL 영역이고;

여기서  $X^1$ 이 VL일 때,  $X^2$ 는 VH이거나, 또는  $X^1$ 이 VH일 때,  $X^2$ 는 VL이고;

"Z"는 시토카인이고;

"n"은 0-2로부터 선택된 정수이다.

#### 청구항 8

제7항에 있어서,  $X^1$  및  $X^2$ 가 표피 성장 인자 수용체 (EGFR); CD14; CD52; PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 또는 CTLA4와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 다양한 면역 체크 포인트 표적; CD20; CD47; GD-2; VEGFR1, VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP  $\alpha$ ; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF  $\beta$  트랩(Trap); MAdCAM,  $\beta$ 7 인테그린 서브유닛;  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 인테그린;  $\alpha$ 4 인테그린 SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1; SR-J1; HIV, 또는 에볼라(Ebola)에 대해 특이적인 제1 모노클로날 항체로부터 취득된 것인 이중 시토카인 융합 단백질.

#### 청구항 9

제7항에 있어서, VL 및 VH가 항-HIV 또는 항-에볼라 항체인 제1 모노클로날 항체로부터 취득된 것인 이중 시토카인 융합 단백질.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 항-HIV 또는 항-에볼라 모노클로날 항체로부터의 VL 및 VH가 제2 항체로부터의 6개의 CDR로 인그래프팅된 (치환된) 6개의 CDR을 포함하는 것인 이중 시토카인 융합 단백질.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 제2 항체가 표피 성장 인자 수용체 (EGFR); CD14; CD52; PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 또는 CTLA4와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 다양한 면역 체크 포인트 표적; CD20; CD47; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP  $\alpha$ ; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF  $\beta$  트랩; MAdCAM,  $\beta$ 7 인테그린 서브유닛;  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 인테그린;  $\alpha$ 4 인테그린 SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1; 또는 SR-J1로부터 선택된 모노클로날 항체인 이중 시토카인 융합 단백질.

#### 청구항 12

제10항에 있어서, 제2 모노클로날 항체로부터의 6개의 인그래프팅된 CDR이 항-EGFR 항체, 항-HER2 항체, 항-VEGFR1 항체, 또는 항-VEGFR2 항체로부터의 6개의 CDR을 포함하고, 여기서 6개의 CDR이 VL로부터의 CDR 1-3 및 VH로부터의 CDR 1-3을 포함하는 것인 이중 시토카인 융합 단백질.

#### 청구항 13

제7항에 있어서, Z가 IL-6, IL-4, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-15, IL-21, IL-26, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-CSF, 인터페론- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , TGF- $\beta$ , 또는 중앙 피사 인자- $\alpha$ , - $\beta$ , 염기성 FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11, 또는 IL-13으로부터 선택된 시토카인인 이중 시토카인 융합 단백질.

#### 청구항 14

제7항에 있어서, Z가 인터페론- $\alpha$ , IL-28, 또는 IL-29인 이중 시토카인 융합 단백질.

#### 청구항 15

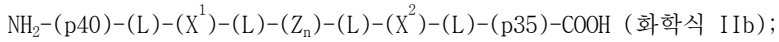
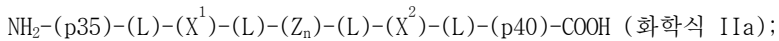
제7항에 있어서, Z가 정수 1인 이중 시토카인 융합 단백질.

#### 청구항 16

제7항에 있어서, 각각의  $R^1$ ,  $X^1$ , Z,  $X^2$ , 및  $R^2$  사이에 링커를 추가로 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질.

#### 청구항 17

IL-12를 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질로서, 여기서 융합 단백질이 화학식 (IIa) 또는 (IIb)인 이중 시토카인 융합 단백질:



식 중,

"p35"는 서열식별번호: 1, 17, 또는 19의 서열이고;

"p40"은 서열식별번호: 3, 18, 또는 20의 서열이고;

"L"은 링커이고;

"X<sup>1</sup>"은 제1 모노클로날 항체로부터 획득된 VL 또는 VH 영역이고;

"X<sup>2</sup>"는 제1 모노클로날 항체로부터 획득된 VH 또는 VL 영역이고;

여기서 X<sup>1</sup>이 VL일 때, X<sup>2</sup>는 VH이거나, 또는 X<sup>1</sup>이 VH일 때, X<sup>2</sup>는 VL이고;

"Z"는 IL-6, IL-4, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-15, IL-21, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-CSF, 인터페론- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , TGF- $\beta$ , 또는 종양 괴사 인자- $\alpha$ , - $\beta$ , 염기성 FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11, 또는 IL-13으로부터 선택된 시토카인이고;

"n"은 0-2로부터 선택된 정수이다.

#### 청구항 18

제17항에 있어서, VL 및 VH가 표피 성장 인자 수용체 (EGFR); CD14; CD52; PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 또는 CTLA4와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 다양한 면역 체크 포인트 표적; CD20; CD47; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP  $\alpha$ ; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF  $\beta$  트랩; MAdCAM,  $\beta$ 7 인테그린 서브유닛;  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 인테그린;  $\alpha$ 4 인테그린 SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1; SR-J1; HIV, 또는 에볼라에 대해 특이적인 제1 항체로부터 획득된 것인 IL-12 융합 단백질.

#### 청구항 19

제18항에 있어서, VL 및 VH가 HIV 또는 에볼라에 대해 특이적인 제1 항체로부터 획득된 것인 IL-12 융합 단백질.

#### 청구항 20

제19항에 있어서, 항-HIV 또는 항-에볼라로부터의 VL 및 VH가 제2 항체로부터의 6개의 CDR로 그래프팅된 (치환된) 6개의 CDR을 포함하는 것인 IL-12 융합 단백질.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, 제2 항체가 표피 성장 인자 수용체 (EGFR); CD14; CD52; PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 또는 CTLA4와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 다양한 면역 체크 포인트 표적; CD20; CD47; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP  $\alpha$ ; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF  $\beta$  트랩; MAdCAM,  $\beta$ 7 인테그린 서브유닛;  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 인테그린;  $\alpha$ 4 인테그린 SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1; 또는 SR-J1로부터 선택된 항체인 IL-12 융합 단백질.

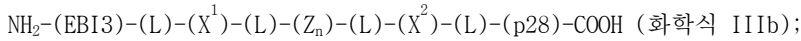
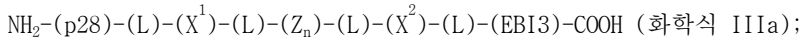
#### 청구항 22

제20항에 있어서, 제2 항체로부터의 6개의 인그래프팅된 CDR이 항-EGFR 항체, 항-VEGFR1 또는 VEGFR2 항체, 항-HER2 항체, 또는 항-CD14 항체로부터 선택된 항체로부터의 6개의 CDR을 포함하고, 여기서 6개의 CDR이 VL로부터

의 CDR 1-3 및 VH로부터의 CDR 1-3을 포함하는 것인 IL-12 융합 단백질.

**청구항 23**

IL-27을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질로서, 상기 융합 단백질이 화학식 (IIIa) 또는 (IIIb)인 이중 시토카인 융합 단백질:



식 중,

"p28"은 서열식별번호: 5의 서열이고;

"EBI3"은 서열식별번호: 7의 서열이고;

"L"은 링커이고;

"X<sup>1</sup>"은 제1 모노클로날 항체로부터 획득된 VL 또는 VH 영역이고;

"X<sup>2</sup>"은 제1 모노클로날 항체로부터 획득된 VH 또는 VL 영역이고;

여기서 X<sup>1</sup>이 VL일 때, X<sup>2</sup>는 VH이거나, 또는 X<sup>1</sup>이 VH일 때, X<sup>2</sup>는 VL이고;

"Z"는 IL-6, IL-4, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-15, IL-21, IL-26, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-CSF, 인터페론- $\alpha$ ,  $-\beta$ ,  $-\gamma$ , TGF- $\beta$ , 또는 종양 괴사 인자- $\alpha$ ,  $-\beta$ , 염기성 FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11, 또는 IL-13으로부터 선택된 시토카인이고;

"n"은 0-2로부터 선택된 정수이다.

**청구항 24**

제23항에 있어서, VL 및 VH가 표피 성장 인자 수용체 (EGFR); CD14; CD52; PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 또는 CTLA4와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 다양한 면역 체크 포인트 표적; CD20; CD47; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP  $\alpha$ ; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF  $\beta$  트랩; MAdCAM,  $\beta$ 7 인테그린 서브유닛;  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 인테그린;  $\alpha$ 4 인테그린 SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1; SR-J1; HIV, 또는 에볼라에 대해 특이적인 제1 항체로부터 획득된 것인 IL-27 융합 단백질.

**청구항 25**

제24항에 있어서, VL 및 VH가 HIV 또는 에볼라에 대해 특이적인 제1 항체로부터 획득된 것인 IL-27 융합 단백질.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 항-HIV 또는 항-에볼라로부터의 VL 및 VH가 제2 항체로부터의 6개의 CDR로 인그래프팅된 (치환된) 6개의 CDR을 포함하는 것인 IL-27 융합 단백질.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 제2 항체가 표피 성장 인자 수용체 (EGFR); CD14; CD52; PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 또는 CTLA4와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 다양한 면역 체크 포인트 표적; CD20; CD47; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP  $\alpha$ ; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF  $\beta$  트랩; MAdCAM,  $\beta$ 7 인테그린 서브유닛;  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 인테그린;  $\alpha$ 4 인테그린 SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1; 또는 SR-J1로부터 선택된 항체인 IL-27 융합 단백질.

**청구항 28**

제27항에 있어서, 제2 항체로부터의 6개의 인그래프팅된 CDR이 항-EGFR 항체, 항-VEGFR1 또는 VEGFR2 항체, 항-HER2 항체, 또는 항-CD14 항체로부터의 6개의 CDR을 포함하고, 여기서 6개의 CDR이 VL로부터의 CDR 1-3 및 VH로부터의 CDR 1-3을 포함하는 것인 IL-27 융합 단백질.

**청구항 29**

암 치료를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 제1항, 제2항 및 제7항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 30**

제29항에 있어서, 융합 단백질이 항-HIV 또는 항-에볼라로부터 선택된 제1 항체로부터의 VL 및 VH 영역을 포함하고, 제1 항체의 6개의 CDR 영역이 항-EGFR 항체, 항-HER2 항체, 항-VEGFR1 항체, 또는 항-VEGFR2 항체, 또는 항-CD14로부터 선택된 제2 항체로부터의 6개의 CDR 영역으로 인그래프팅된 것인 방법.

**청구항 31**

제30항에 있어서, 제1 항체가 항-에볼라 항체이고, 제2 항체가 항-EGFR 항체, 항-HER2 항체, 항-VEGFR1 항체, 항-VEGFR2 항체, 또는 항-CD14 항체로부터 선택된 것인 방법.

**청구항 32**

제29항에 있어서, 제1 시토카인이 IL-12 또는 IL-27인 방법.

**청구항 33**

제32항에 있어서, 시토카인 또는 "Z"가 IL-12인 방법.

**청구항 34**

제24항에 있어서, "Z"의 "n" 값이 1인 방법.

**청구항 35**

제21항에 있어서, 융합 단백질이 0.01 ng/ml 내지 100 ng/ml로 투여되는 것인 방법.

**청구항 36**

제21항에 있어서, 융합 단백질이 0.01 ng/ml 내지 10 ng/ml로 투여되는 것인 방법.

**청구항 37**

염증성 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 제1항, 제2항 및 제7항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하는, 염증성 질환을 치료하는 방법.

**청구항 38**

제37항에 있어서, 융합 단백질이 항-HIV 또는 항-에볼라로부터 선택된 제1 항체로부터의 VL 및 VH 영역을 포함하고, 제1 항체의 6개의 CDR 영역이 항-HER2 항체, 항-VEGFR1, 항-VEGFR2, 항-EGFR 항체, 또는 항-CD14 항체로부터의 6개의 CDR 영역으로 인그래프팅된 것인 방법.

**청구항 39**

제37항에 있어서, "Z"의 "n" 값이 1인 방법.

**청구항 40**

제37항에 있어서, 융합 단백질이 0.01 ng/ml 내지 100 ng/ml로 투여되는 것인 방법.

**청구항 41**

제37항에 있어서, 염증성 질환이 패혈증, 크론병, 류마티스 관절염, 건선, 및/또는 염증성 장 질환 (IBD)인 방법.

**청구항 42**

패혈증, 패혈 쇼크, 및/또는 이의 연관 증상의 치료를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 제1항, 제2항 및 제7항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하는, 패혈증, 패혈 쇼크, 및/또는 이의 연관 증상을 치료하는 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2021년 12월 13일에 출원된 미국 가출원 번호 63/265,339에 대한 우선권을 주장하고, 이의 전체 내용은 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0003] 전자 서열 목록에 대한 언급

[0004] 전자 서열 목록 (039451-00083\_Sequence-Listing.xml; 크기: 76,662 바이트; 및 생성일: 2022년 12월 13일)의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0005] 발명의 분야

[0006] 본 개시내용은 생명공학 분야, 더욱 구체적으로는 다른 염증성 및 면역 조절 시토카인과 조합된 인터루킨-12 ("IL-12") 또는 인터루킨-IL-27을 포함하는 신규한 이중 시토카인 융합 단백질을, 염증성 및 면역 질환 또는 병태를 치료하는 방법, 및/또는 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0007] 서론

[0008] IL-12는 원형 T 헬퍼 1 (Th1) 분극 시토카인인 70 kDa의 이종이량체성 시토카인이다 (Mossman, 1989; Athie-Morales, 2004). IL-12는 CD8+ T 세포 (Henry, 2008; Vacaflores, 2017; Chowdhury, 2011), NK 세포 (Martinovic, 2015; Parihar, 2002; Zhang, 2008), CD4+ T 세포 (Yoo, 2002; Vacaflores1, 2016), 그리고 제한된 정도로 단핵구 (Coma, 2006)를 활성화시키는 것을 통해 강력한 항-종양 면역을 발휘한다. 따라서, IL-12는 주로 항원 특이적 T 세포 활성화를 강화하는 한편, 부분적으로, NK 세포 및 단핵구 양쪽 모두의 중등도의 자극을 통해 선천 면역계에 증개된다.

[0009] 인터페론-알파 (IFN α-2a)는 직접적으로 수지상 세포 성숙을 유도하고 (Simmons, 2012; Gessani, 2014; Padovan, 2002) CD8+ T 세포 세포독성 기능을 강화하는 (Hiroishi, 2000; Kolumam, 2005; Lu, 2019) 단량체성 I형 인터페론이다. 따라서, IFN α-2a는 적응 면역 반응에 대한 이의 더 제한된 효과에 비교하여 선천 면역계에 더 큰 기능을 나타낸다.

[0010] IL-12의 항-종양 효과가 전임상적으로 및 임상적으로 평가되었고 (Brunda, 1993; Atkins, 1997), 여기서 독성으로 인해, 직접적인 종양내 주사가 평가되었고, 임상 투여보다 우수한 것으로 밝혀졌다 (Herpen, 2004; Li S. , 2005; Sabel, 2004).

[0011] 유사하게, IFN α-2a가 전임상적으로, 그리고 PEG화 형태로 임상적으로 평가되었고 (Lyrdal, 2009; Sunela, 2009; Medrano, 2017), 일부 암에서의 사용에 대해 승인되었다 (How, 2020).

[0012] 따라서, 강건한 항-종양 기능을 구동시키기 위해 항-종양 면역 반응을 프라이밍하는 것 (Nemunaitis, 2005) 및 CD8+, CD4+ 및 NK 세포의 자극 양쪽 모두가 요구되는 것을 고려하여, 본 발명가들은 IFN α-2a 및 IL-12 양쪽 모두를 표적화 이중 시토카인 스캐폴드 시스템 (일명 "다이아카인(Diakine)<sup>TM</sup>, ("DK"), 공동-계류 출원인 미국 출원 번호 17/110,104에 일반적으로 기술됨) 상에서 조합하여 이러한 2개의 시토카인을 종양 미세환경 내로 표적화하는 것이 M2 단핵구의 기능성 항원 제시 세포로의 분화를 유도하는 것을 통해 원위치 프라이밍을 강화하고

(Vidyarthi, 2018), T 및 NK 세포 기능을 강화한다는 것을 발견하였다. 이러한 2개의 시토카인의 조합은 적응 면역계와 선천 면역계 사이의 자극을 연결한다.

- [0013] 인터루킨 10 (IL-10)은 인터페론  $\gamma$  (IFN $\gamma$ )와의 구조적 유사성이 있는 비-공유결합의 동종이량체성 시토카인이다. IL-10 수용체는 2개의 IL10 수용체 1 (IL10R1) 분자 및 2개의 IL-10 수용체 2 (IL10R2) 분자로 이루어진다 (Moore, 2001). IL-10 수용체는 대부분의 조혈 세포의 표면에서 발견되고, 대식세포 및 T-세포에서 고도로 발현된다.
- [0014] IL-10은 면역억제성 시토카인 (Schreiber, 2000) 및 면역자극성 시토카인 (Mumm, 2011) 양쪽 모두인 것으로 보고되었지만, 크론병 환자의 치료에 대한 IL-10의 임상 평가는 역 용량 반응을 초래한 반면 (Fedorak, 2000; Schreiber, 2000), 암 환자를 PEG화 IL-10으로 치료하는 것은 용량 적정가능한 강력한 항-종양 반응을 초래하였다 (Naing, 2018).
- [0015] IL-10은 NK 및 CD4+ T 세포 양쪽 모두에 의해 분비되는 IL-2 구동 IFN $\gamma$  생산을 억제하는 것으로 보고되었지만 (Scott, 2006), IL-2 유도 CD8+ T 세포 증식에 대한 보조인자로서 작용하는 것으로도 보고되었다 (Groux, 1998).
- [0016] 본 발명가들은 IL-10 및 IL-12 양쪽 모두를 표적화 DK 시토카인 스캐폴드 시스템 상에서 조합하여 이러한 2개의 시토카인을 종양 미세환경 내로 표적화하는 것이 NK 및 T 세포 기능을 강화한다는 것을 또한 발견하였다.
- [0017] IL-27은 IL-12 패밀리와 구성원이고, p28 및 엡스타인 바(Epstein Barr) 바이러스-유도-유전자 3 ("E1B3")인 2개의 서브유닛으로 구성된 이종이량체성 시토카인이다. IL-27은 IL-10을 유도하는 것으로 공지되어 있다. IL-28은 IFN $\alpha$ -2a 방출을 유발하여 CD8+ T-세포를 자극하는 3형 인터페론이다. IL-28은 2개의 아이소형인 IL-28A 및 IL-28B를 포함한다. IL-28과 서열 상동성을 공유하는 IL-29 또한 선천 및 적응 면역 양쪽 모두에서 수반되는 3형 인터페론이다.
- [0018] 본 발명가는 IL-12와 인터루킨-28 (IL-28) 또는 인터루킨-29 (IL-29), 인터루킨-27 (IL-27)과 IFN $\alpha$ -2a, IL-28 또는 IL-29를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다른 시토카인 조합이 본원에 기술된 이종 시토카인 스캐폴딩 시스템 내로 혼입될 수 있다는 것을 또한 발견하였다 (예를 들어, 도 1 참조). 간략하게, 이종 시토카인 스캐폴딩 시스템은 다중-서브유닛 시토카인 (예를 들어, IL-12, IL-27을 포함하지만 이에 제한되지 않음)이 제2 시토카인 (예를 들어, IL-2, IL-4, IFN $\alpha$ -2a, IL-10)과 조합되어 인간 항-HIV 또는 인간 항-에볼라 모노클로날 항체의 항원 결합 도메인 또는 단일쇄 가변 영역 (scFv)을 포함하는 스캐폴딩 시스템의 말단 단부에 융합되도록 허용하고, 여기서 제2 시토카인은 항원 결합 도메인 또는 scFv의 힌지 영역에서 융합된다.
- [0019] 본 발명가는 이종 시토카인 스캐폴딩 시스템이 다중-서브유닛 시토카인 (예를 들어, IL-12, IL-27)이 단량체성 시토카인 (예를 들어, IFN- $\alpha$ , IL-28, IL-29) 또는 또 다른 다중-서브유닛 시토카인 (예를 들어, IL-10, IL-12, IL-27)과 조합되어 인간 항-HIV 또는 인간 항-에볼라 모노클로날 항체의 항원 결합 도메인 또는 scFv를 포함하는 스캐폴딩 시스템의 말단 단부에 융합되도록 허용한다는 것을 또한 발견하였다.
- [0020] 미국 특허 10,858,412에 이전에 기술된 바와 같이, 비-면역원성 가변 중쇄 ("VH") 및 가변 경쇄 ("VL") 영역을 포함하는 스캐폴딩 시스템은 올바르게 폴딩되고 여전히 기능적으로 활성인 반감기가 연장된 IL-10 변이체 분자의 생산을 초래하였다. 스캐폴딩 시스템 내로의 IL-10 혼입은 염증성 세포 (예를 들어, 단핵구/대식세포/수지상 세포) 및 면역 세포 (예를 들어, CD8<sup>+</sup> T-세포) 양쪽 모두 상에서 강화된 IL-10 기능을 나타냈다. 전문이 참고로 포함된, 2020년 3월 6일에 미국 출원 16/811,718로 출원된 미국 특허 10,858,412를 참조한다. 본 출원은 염증성 질환, 면역 질환 및/또는 암을 치료하기 위해 IL-10 대신 다른 다중-서브유닛 기반 시토카인 (예를 들어, 몇몇을 말하자면 IL-12, IL-27)으로 교체하고, 추가로 제2 시토카인을 다중-서브유닛 시토카인 (예를 들어, IL-12 또는 IL-27)의 생물학을 부가적으로 또는 상승적으로 강화하는 새로운 융합 단백질 내로 혼입함으로써 IL-10 기반 이종 시토카인 스캐폴딩 시스템의 초기 발견을 개선한다.

**발명의 내용**

- [0021] **발명의 다양한 측면의 개요**
- [0022] 본 개시내용은 일반적으로 이종 시토카인 융합 단백질에 관한 것이다.
- [0023] 따라서, 제1 측면에서, 본 개시내용은 IL-10, IL-12 또는 IL-27 및 이의 변이체와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 다중-서브유닛 시토카인이고, 여기서 각각의 서브유닛이 모노클로날 항체로부터 수득된 scFv 또는 항원 결합

합 단편의 가변 중쇄 ("VH") 또는 가변 경쇄 ("VL") 영역에 융합된 제1 시토카인, 및 scFv 또는 항원 결합 단편의 VH 영역과 VL 영역 사이에 연결된 제2 시토카인을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, 제1 시토카인은 IL-10, IL-12 또는 IL-27, 또는 IL-10, IL-12 또는 IL-27의 기능을 강화하는 하나 이상의 아미노산 치환(들)을 포함하는 이의 기능성 변이체와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 임의의 다중-서브유닛 시토카인이다. 융합 단백질은 제2 시토카인을 추가로 포함하고, 이는 제1 및 제2 시토카인이 scFv 또는 항원 결합 단편의 VH 및 VL 영역에 의해 특정 항원에 대해 표적화되는 경우에 부가적 또는 상승적 효과가 있도록 다중-서브유닛 시토카인 (예를 들어, IL-10, IL-12 또는 IL-27)과 병행으로 작용하는 시토카인이다. 이러한 제2 시토카인은 임의의 시토카인일 수 있고, 이는 IL-6, IL-4, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-15, IL-21, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-CSF, 인터페론- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , TGF- $\beta$ , 또는 종양 괴사 인자- $\alpha$ , - $\beta$ , 염기성 FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11, 또는 IL-13을 특히 포함한다. 이중 시토카인 융합 단백질은 scFv의 보체 결정 영역 ("CDR")과 이중 시토카인 융합 단백질을 표적 항원으로 지시하는 임의의 표적화 항체로부터의 CDR의 인그래프팅 또는 교체를 또한 포함할 수 있다.

[0024] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 화학식 (Ia) 또는 (Ib)의 이중 시토카인 융합 단백질에 관한 것이다:

[0025]  $\text{NH}_2-(\text{R}^1)-(\text{X}^1)-(\text{Z}_n)-(\text{X}^2)-(\text{R}^2)-\text{COOH}$  (화학식 Ia);

[0026]  $\text{NH}_2-(\text{R}^2)-(\text{X}^1)-(\text{Z}_n)-(\text{X}^2)-(\text{R}^1)-\text{COOH}$  (화학식 Ib);

[0027] 식 중,

[0028] " $\text{R}^1$ "은 임의의 다중-서브유닛 제1 시토카인으로부터의 알파 서브유닛, 바람직하게는 IL-12-알파 서브유닛 (p35) 또는 IL-27 알파 서브유닛 (p28), 더욱 바람직하게는 서열식별번호(SEQ ID No): 1 또는 5 또는 17 또는 19의 서브유닛이고;

[0029] " $\text{R}^2$ "은 임의의 다중-서브유닛 제1 시토카인으로부터의 베타 서브유닛, 바람직하게는 IL-12-베타 서브유닛 (p40) 또는 IL-27 베타 서브유닛 (EBI3), 더욱 바람직하게는 서열식별번호: 3 또는 7 또는 18 또는 20의 서브유닛이고;

[0030] 여기서  $\text{R}^1$ 이 제1 시토카인의 알파 서브유닛일 때,  $\text{R}^2$ 는 제1 시토카인의 베타 서브유닛이거나; 또는  $\text{R}^1$ 이 p35일 때,  $\text{R}^2$ 는 p40이거나; 또는  $\text{R}^1$ 이 p28일 때,  $\text{R}^2$ 는 EBI3이거나; 또는  $\text{R}^1$ 이 서열식별번호: 1, 17, 또는 19일 때,  $\text{R}^2$ 는 서열식별번호: 3, 18, 또는 20이거나; 또는  $\text{R}^1$ 이 서열식별번호: 5일 때,  $\text{R}^2$ 는 서열식별번호: 7이고;

[0031] " $\text{X}^1$ "은 제1 모노클로날 항체로부터 취득된 VL 또는 VH 영역이고; " $\text{X}^2$ "은 제1 모노클로날 항체로부터 취득된 VH 또는 VL 영역이고; 여기서  $\text{X}^1$ 이 VL일 때,  $\text{X}^2$ 는 VH이거나, 또는  $\text{X}^1$ 이 VH일 때,  $\text{X}^2$ 는 VL이고;

[0032] " $\text{Z}$ "는 다중-서브유닛 시토카인의 생물학적 기능을 강화하는 임의의 시토카인, 바람직하게는 IFN  $\alpha$ -2a, IL-28, IL-29이고;

[0033] " $n$ "은 0-2로부터 선택된 정수이다.

[0034] 한 실시양태에서, VH 및 VL은 인간 항-에볼라 항체로부터 취득된 scFv의 형태이다. 또 다른 실시양태에서, 인간 항-에볼라 항체로부터 취득된 scFv의 6개의 CDR (VH로부터의 CDR 1-3 및 VL로부터의 CDR 1-3)은 이중 시토카인 융합 단백질이 효소, 수용체, 세포외 단백질 또는 세포내 단백질, 예컨대 종양 (예를 들어, 종양 연관 항원 (TAA)), 염증성 반응, 또는 자가면역 질환과 연관된 것들과 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 특정 표적에 지시 되도록 허용하는 제2 모노클로날 항체로부터의 6개의 CDR로 교체 또는 인그래프팅된다. 제2 항체는 표피 성장 인자 수용체 (EGFR); CD14; CD52; PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 또는 CTLA4와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 다양한 면역 체크 포인트 표적; CD19; CD20; CD22; CD47; CD123; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP  $\alpha$ ; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF  $\beta$  트랩(Trap); MAdCAM,  $\beta$ 7 인테그린 서브유닛;  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 인테그린;  $\alpha$ 4 인테그린; BCMA; PSA; PSMA; CEA; GPC3; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1; 또는 SR-J1을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 IL-12를 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질에 관한 것이고, 상기 융합 단백

질은 화학식 (IIa) 또는 (IIb)이다:

[0036]  $\text{NH}_2\text{-(p35)-(L)-(X}^1\text{)-(L)-(Z}_n\text{)-(L)-(X}^2\text{)-(L)-(p40)-COOH}$  (화학식 IIa);

[0037]  $\text{NH}_2\text{-(p40)-(L)-(X}^1\text{)-(L)-(Z}_n\text{)-(L)-(X}^2\text{)-(L)-(p35)-COOH}$  (화학식 IIb);

[0038] 식 중,

[0039] "p35"는 서열식별번호: 1, 17 또는 19의 서열을 갖는 IL-12의 알파 서브유닛이고;

[0040] "p40"은 서열식별번호: 3, 18, 또는 20의 서열을 갖는 IL-12의 베타 알파 서브유닛이고;

[0041] "L"은 임의의 링커이고;

[0042] " $X^1$ "은 제1 모노클로날 항체로부터 수득된 VL 또는 VH 영역이고; " $X^2$ "는 제1 모노클로날 항체로부터 수득된 VH 또는 VL 영역이고; 여기서  $X^1$ 이 VL일 때,  $X^2$ 는 VH이거나, 또는  $X^1$ 이 VH일 때,  $X^2$ 는 VL이고;

[0043] "Z"는 IL-6, IL-4, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10 단량체, IL-15, IL-21, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-CSF, 인터페론- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , TGF- $\beta$ , 또는 종양 괴사 인자- $\alpha$ , - $\beta$ , 염기성 FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11, 또는 IL-13로부터 선택된 시토카인이고;

[0044] "n"은 0-2로부터 선택된 정수이다.

[0045] 한 실시양태에서, VH 및 VL은 인간 항-에볼라 항체로부터 수득된 scFv의 형태이다. 또 다른 실시양태에서, 인간 항-에볼라 항체로부터 수득된 scFv의 6개의 CDR (VH로부터의 CDR 1-3 및 VL로부터의 CDR 1-3)은 이중 시토카인 융합 단백질이 효소, 수용체, 세포의 단백질 또는 세포내 단백질, 예컨대 종양 (예를 들어, 종양 연관 항원 (TAA)), 염증성 반응, 또는 자가면역 질환과 연관된 것들과 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 특정 표적에 지시 되도록 허용하는 제2 모노클로날 항체로부터의 6개의 CDR로 교체 또는 인그래프팅된다. 제2 항체는 표피 성장 인자 수용체 (EGFR); CD14; CD52; PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 또는 CTLA4와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 다양한 면역 체크 포인트 표적; CD19; CD20; CD22; CD47; CD123; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP  $\alpha$ ; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF  $\beta$  트랩; MAdCAM,  $\beta$ 7 인테그린 서브유닛;  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 인테그린;  $\alpha$ 4 인테그린; BCMA; PSA; PSMA; CEA; GPC3; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1; 또는 SR-J1을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0046] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 IL-27을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질에 관한 것이고, 상기 융합 단백질은 화학식 (IIIa) 또는 (IIIb)이다:

[0047]  $\text{NH}_2\text{-(p28)-(L)-(X}^1\text{)-(L)-(Z}_n\text{)-(L)-(X}^2\text{)-(L)-(EBI3)-COOH}$  (화학식 IIIa);

[0048]  $\text{NH}_2\text{-(EBI3)-(L)-(X}^1\text{)-(L)-(Z}_n\text{)-(L)-(X}^2\text{)-(L)-(p28)-COOH}$  (화학식 IIIb);

[0049] 식 중,

[0050] "p28"은 서열식별번호: 5의 서열을 갖는 IL-27의 알파 서브유닛이고;

[0051] "EBI3"은 서열식별번호: 7의 서열을 갖는 IL-27의 베타 알파 서브유닛이고;

[0052] "L"은 임의의 링커이고;

[0053] " $X^1$ "은 제1 모노클로날 항체로부터 수득된 VL 또는 VH 영역이고; " $X^2$ "는 제1 모노클로날 항체로부터 수득된 VH 또는 VL 영역이고; 여기서  $X^1$ 이 VL일 때,  $X^2$ 는 VH이거나, 또는  $X^1$ 이 VH일 때,  $X^2$ 는 VL이고;

[0054] "Z"는 IL-6, IL-4, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10 단량체, IL-15, IL-21, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-CSF, 인터페론- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , TGF- $\beta$ , 또는 종양 괴사 인자- $\alpha$ , - $\beta$ , 염기성 FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11, 또는 IL-13으로부터 선택된 시토카인이고;

[0055] "n"은 0-2로부터 선택된 정수이다.

- [0056] 한 실시양태에서, VH 및 VL은 인간 항-에볼라 항체로부터 획득된 scFv의 형태이다. 또 다른 실시양태에서, 인간 항-에볼라 항체로부터 획득된 scFv의 6개의 CDR (VH로부터의 CDR 1-3 및 VL로부터의 CDR 1-3)은 이중 시토카인 융합 단백질이 효소, 수용체, 세포의 단백질 또는 세포내 단백질, 예컨대 종양 (예를 들어, 종양 연관 항원 (TAA)), 염증성 반응, 또는 자가면역 질환과 연관된 것들과 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 특정 표적에 지시 되도록 허용하는 제2 모노클로날 항체로부터의 6개의 CDR로 교체 또는 인그래프팅된다. 제2 항체는 표피 성장 인자 수용체 (EGFR); CD14; CD52; PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 또는 CTLA4와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 다양한 면역 체크 포인트 표적; CD19; CD20; CD22; CD47; CD123; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF β 트랩; MAdCAM, β7 인테그린 서브유닛; α4β7 인테그린; α4 인테그린; BCMA; PSA; PSMA; CEA; GPC3; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1; 또는 SR-J1을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0057] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 2개의 다중-서브유닛 단백질을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질에 관한 것이고, 상기 융합 단백질은 화학식 (IV)이다:
- [0058]  $\text{NH}_2-(R^1)-(L_a)-(X^1)-(L_b)-(W^1)-(L_b)-(W^2)-(L_a)-(X^2)-(L_a)-(R^2)-\text{COOH}$  (화학식 IV);
- [0059] 식 중,
- [0060] " $R^1$ "은 제1 시토카인, 예컨대 IL-12 또는 IL-27의 알파 서브유닛 또는 동종이량체성 시토카인, 예컨대 IL-10의 제1 단량체이고, 여기서  $R^1$ 은 바람직하게는 p40이고;
- [0061] " $R^2$ "은 제1 시토카인, 예컨대 IL-12 또는 IL-27의 베타 알파 서브유닛 또는 동종이량체성 시토카인, 예컨대 IL-10의 제2 단량체이고, 여기서  $R^2$ 은 바람직하게는 p35이고;
- [0062] " $L_a$ "는 임의의 링커; 바람직하게는 서열식별번호: 45의 (GGGG)<sub>4</sub> 또는 서열식별번호: 44의 (GGGG)<sub>5</sub>이고;
- [0063] " $L_b$ "는 임의의 링커; 바람직하게는 서열식별번호: 43의 GGGSGG 또는 서열식별번호: 46의 (GGGG)<sub>3</sub>이고;
- [0064] " $X^1$ "은 제1 모노클로날 항체로부터 획득된 VL 또는 VH 영역이고; " $X^2$ "은 제1 모노클로날 항체로부터 획득된 VH 또는 VL 영역이고; 여기서  $X^1$ 이 VL일 때,  $X^2$ 는 VH이거나, 또는  $X^1$ 이 VH일 때,  $X^2$ 는 VL이고;
- [0065] " $W^1$ "은 제1 시토카인, 예컨대 IL-12 또는 IL-27의 알파 서브유닛 또는 동종이량체성 시토카인, 예컨대 IL-10의 제1 단량체, 바람직하게는 IL-10의 제1 단량체이고;
- [0066] " $W^2$ "은 제1 시토카인, 예컨대 IL-12 또는 IL-27의 베타 알파 서브유닛 또는 동종이량체성 시토카인, 예컨대 IL-10의 제2 단량체, 바람직하게는 IL-10의 제2 단량체이다.
- [0067] 한 실시양태에서, VH 및 VL은 인간 항-에볼라 항체로부터 획득된 scFv의 형태이다. 또 다른 실시양태에서, 인간 항-에볼라 항체로부터 획득된 scFv의 6개의 CDR (VH로부터의 CDR 1-3 및 VL로부터의 CDR 1-3)은 이중 시토카인 융합 단백질이 효소, 수용체, 세포의 단백질 또는 세포내 단백질, 예컨대 종양 (예를 들어, 종양 연관 항원 (TAA)), 염증성 반응, 또는 자가면역 질환과 연관된 것들과 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 특정 표적에 지시 되도록 허용하는 제2 모노클로날 항체로부터의 6개의 CDR로 교체 또는 인그래프팅된다. 제2 항체는 표피 성장 인자 수용체 (EGFR); CD14; CD52; PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 또는 CTLA4와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 다양한 면역 체크 포인트 표적; CD19; CD20; CD22; CD47; CD123; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF β 트랩; MAdCAM, β7 인테그린 서브유닛; α4β7 인테그린; α4 인테그린; BCMA; PSA; PSMA; CEA; GPC3; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1; 또는 SR-J1을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0068] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 2개의 다중-서브유닛 단백질을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질에 관한 것이고, 상기 융합 단백질은 화학식 (V)이다:

- [0069]  $\text{NH}_2\text{-(P35)-(L}_a\text{)-(X}^1\text{)-(L}_a\text{)-(IL10}_{\text{단량체}}\text{)-(L}_b\text{)-(IL10}_{\text{단량체}}\text{)-(L}_a\text{)-(X}^2\text{)-(L}_a\text{)-(P40)-COOH}$  (화학식 Va);
- [0070]  $\text{NH}_2\text{-(P40)-(L}_a\text{)-(X}^1\text{)-(L}_a\text{)-(IL10}_{\text{단량체}}\text{)-(L}_b\text{)-(IL10}_{\text{단량체}}\text{)-(L}_a\text{)-(X}^2\text{)-(L}_a\text{)-(P35)-COOH}$  (화학식 Vb);
- [0071] 식 중,
- [0072] "p35"는 서열식별번호: 1, 17, 또는 19의 서열을 갖는 IL-12의 알파 서브유닛이고;
- [0073] "p40"은 서열식별번호: 3, 18, 또는 20의 서열을 갖는 IL-12의 베타 알파 서브유닛이고;
- [0074] "L<sub>a</sub>"는 임의의 링커; 바람직하게는 서열식별번호: 45의 (GGGG)<sub>4</sub> 또는 서열식별번호: 44의 (GGGG)<sub>5</sub>이고;
- [0075] "L<sub>b</sub>"는 임의의 링커; 바람직하게는 서열식별번호: 43의 GGGSGGG 또는 서열식별번호: 46의 (GGGG)<sub>3</sub>이고;
- [0076] "X<sup>1</sup>"은 제1 모노클로날 항체로부터 취득된 VL 또는 VH 영역이고; "X<sup>2</sup>"는 제1 모노클로날 항체로부터 취득된 VH 또는 VL 영역이고; 여기서 X<sup>1</sup>이 VL일 때, X<sup>2</sup>는 VH이거나, 또는 X<sup>1</sup>이 VH일 때, X<sup>2</sup>는 VL이고;
- [0077] "IL10<sub>단량체</sub>"는 서열식별번호: 1, 3, 5, 7, 14, 또는 16, 바람직하게는 서열식별번호: 16의 서열을 갖는 IL-10의 단량체이다.
- [0078] 한 실시양태에서, VH 및 VL은 인간 항-에볼라 항체로부터 취득된 scFv의 형태이다. 또 다른 실시양태에서, 인간 항-에볼라 항체로부터 취득된 scFv의 6개의 CDR (VH로부터의 CDR 1-3 및 VL로부터의 CDR 1-3)은 이중 시토카인 융합 단백질이 효소, 수용체, 세포의 단백질 또는 세포내 단백질, 예컨대 종양 (예를 들어, 종양 연관 항원 (TAA)), 염증성 반응, 또는 자가면역 질환과 연관된 것들과 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 특정 표적에 지시 되도록 허용하는 제2 모노클로날 항체로부터의 6개의 CDR로 교체 또는 인그래프팅된다. 제2 항체는 EGFR; CD14; CD52; PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 또는 CTLA4와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 다양한 면역 체크 포인트 표적; CD19; CD20; CD22; CD47; CD123; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF β 트랩; MAdCAM, β7 인테그린 서브유닛; α4β7 인테그린; α4 인테그린; BCMA; PSA; PSMA; CEA; GPC3; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1; 또는 SR-J1을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0079] 다른 측면에서, 본 개시내용은 이중-서브유닛 이중 시토카인 융합 단백질을 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다. 이는 화학식 (Ia), (Ib), (IIa), (IIb), (IIIa), (IIIb), (IV), (Va) 및 (Vb)로 표시되는 이중 시토카인 융합 단백질을 코딩하는 것들을 포함할 것이다.
- [0080] 다른 측면에서, 본 개시내용은 이중 시토카인 융합 단백질을 제조 및 정제하는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 이중 시토카인 융합 단백질을 제조하는 방법은 이중 시토카인 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 재조합적으로 발현시키는 것을 포함한다.
- [0081] 다른 측면에서, 본 개시내용은 암 치료를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 이중 시토카인 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하는 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0082] 다른 측면에서, 본 개시내용은 염증성 질환 또는 병태의 치료를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 이중 시토카인 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하는, 염증성 질환 또는 병태를 치료하는 방법에 관한 것이다. 바람직하게는, 염증성 질환은 크론병, 건선, 및/또는 류마티스 관절염이다.
- [0083] 다른 측면에서, 본 개시내용은 면역 질환 또는 병태의 치료를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 이중 시토카인 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하는, 면역 질환 또는 병태를 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0084] 다른 측면에서, 본 개시내용은 패혈증 및/또는 패혈 쇼크 및 이의 연관 증상을 치료, 억제 및/또는 완화하는 방법에 관한 것이다.
- [0085] 대표적인 측면의 상기의 단순화된 요약은 본 개시내용의 기본적인 이해를 제공하는 역할을 한다. 이러한 요약은 모든 구상된 측면의 광범위한 개요가 아니고, 모든 측면의 핵심적 또는 결정적인 요소를 식별하거나 본 개시내용의 임의의 또는 모든 측면의 범주를 개설하는 것으로 의도되지 않는다. 이의 유일한 목적은 하기의 본 개시내용의 더욱 상세한 설명에 대한 서두로서 단순화된 형태로 하나 이상의 측면을 제시하는 것이다. 전술한 것

을 달성하기 위해, 본 개시내용의 하나 이상의 측면은 청구범위에서 기술되고 예시적으로 지적된 특색을 포함한다.

**도면의 간단한 설명**

**[0086] 도면의 간단한 설명**

도 1은 폴딩 형태 및 선형 형태의 이중 시토카인 융합 단백질의 개략도이다.

도 2는 본 개시내용에서 구현된 이중 시토카인 융합 단백질을 나타내는 개략도이고, 여기서 이중 시토카인 융합 단백질은 말단에 연결된 IL-12 $\alpha$  (p35) 및 IL-12 $\beta$  (p40) 서브유닛을 포함하고, 제2 시토카인은 항-X 항체 (예를 들어, 인간 항-에볼라 항체)로부터의 VH와 VL 사이의 scFv의 링커 내로 혼입된다. 6개의 CDR (VH로부터의 3개 및 VL로부터의 3개)은 임의적으로 제2 항체 (예를 들어, TAA를 표적화하는 것, 예컨대 항-HER2, 항-EGFR, 항-VEGFR1, 또는 항-VEGFR2 항체)로부터의 6개의 CDR로 치환되거나 또는 인그래프팅될 수 있다.

도 3은 본 개시내용에서 구현된 이중 시토카인 융합 단백질을 나타내는 개략도이고, 여기서 이중 시토카인 융합 단백질은 말단에 연결된 IL-27 $\alpha$  (p28) 및 IL-27 $\beta$  (EBI3) 서브유닛을 포함하고, 제2 시토카인은 항-X 항체 (예를 들어, 인간 항-에볼라 항체)로부터의 VH와 VL 사이의 scFv의 링커 내로 혼입된다. 6개의 CDR (VH로부터의 3개 및 VL로부터의 3개)은 임의적으로 제2 항체 (예를 들어, TAA를 표적화하는 것, 예컨대 항-HER2, 항-HER3, 항-EGFR, 항-VEGFR1, 또는 항-VEGFR2 항체이지만, 이에 제한되지 않음)로부터의 6개의 CDR로 치환되거나 또는 인그래프팅될 수 있다.

도 4는 "DK27<sup>28</sup>"로 명명된 IL-27 및 IL-28을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질을 나타내는 개략도이다.

도 5는 "DK27<sup>29</sup>"로 명명된 IL-27 및 IL-29를 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질을 나타내는 개략도이다.

도 6은 이전에 개시된 IL-10 융합 단백질 구축물 중 하나를 나타내는 개략도이고, 여기서 IL-10 단량체는 미국 특허 10,858,412에 기술된 scFv를 포함하는 스캐폴딩에 말단에 연결된다.

도 7은 2개의 다중-서브유닛 (또는 이량체성) 시토카인을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질, 특히, DK12<sup>10</sup>로 명명된 IL-12 및 IL-10을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질을 나타내는 개략도이다.

도 8은 2개의 다중-서브유닛 (또는 이량체성) 시토카인을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질, 특히, DK27<sup>10</sup>로 명명된 IL-27 및 IL-10을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질을 나타내는 개략도이다.

도 9는 IL-10과 scFv 사이 및 IL-12와 scFv 사이에 표준 링커, 예컨대 (GGGG)<sub>3</sub>을 사용하는 DK12<sup>10</sup> (EGFR)이 BiTE와 조합되어 표적 암 세포에 대한 부분적인 세포용해성 효과를 갖는다는 것을 나타내는 그래프이다.

도 10은 IL-10과 scFv 사이 및 IL-12와 scFv 사이에 연장된 링커를 사용하는 DK12<sup>10</sup> (EGFR)이 BiTE와 조합되어 표적 암 세포에 대한 개선된 세포용해성 효과를 갖는다는 것을 나타내는 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

**[0087] 상세한 설명**

**[0088]** 다중-서브유닛 제1 시토카인 (예컨대 IL-12 또는 IL-27)을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질, 다중-서브유닛 제1 시토카인 (예컨대 IL-12 또는 IL-27)을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질을 제조하는 방법, 및 염증성 질환 또는 병태, 면역 질환 또는 병태를 치료하기 위해, 암을 치료 및/또는 예방하기 위해 다중-서브유닛 제1 시토카인 (예컨대 IL-12 또는 IL-27)을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질을 사용하는 방법의 맥락에서 예시적인 측면들이 본원에서 기술된다. 관련 기술 분야의 통상의 기술자는 하기의 설명이 예시적인 뿐이고, 어떠한 방식으로든 제한적인 것으로 의도되지 않는다는 것을 인지할 것이다. 관련 기술 분야의 기술자에게 본 개시내용의 이점을 갖는 다른 측면이 쉽게 자체적으로 제안될 것이다. 이제, 첨부된 도면에 도해된 바와 같은 예시적인 측면들의 실행이 상세하게 참조될 것이다. 동일하거나 유사한 항목을 지칭하기 위해 도면 및 하기의 설명 전반에 걸쳐 가능한 정도로 동일한 참조 지표가 사용될 것이다.

**[0089]** 본원에 기술된 것과 유사하거나 등가인 다수의 방법 및 물질이 다양한 기술된 실시양태의 실행에서 사용될 수 있지만, 바람직한 물질 및 방법이 본원에서 기술된다.

[0090] 달리 지시되지 않는 한, 본원에 기술된 실시양태는 관련 기술 분야의 기술자에게 널리 공지된 분자생물학, 생화학, 약리학, 화학 및 면역학의 통상적인 방법 및 기술을 사용한다. 다중-서브유닛 제1 시토카인 (예컨대 IL-12 또는 IL-27)을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질을 디자인하고 제작하기 위한 일반적인 기술, 뿐만 아니라 다중-서브유닛 제1 시토카인 (예컨대 IL-12 또는 IL-27)을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질의 발현 및 기능을 테스트하기 위한 검정법 중 다수는 관련 기술 분야에서 쉽게 입수가 가능하고 상술된 널리 공지된 방법이다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989)]; [Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.)]; [Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell eds., Blackwell Scientific Publications)]; [A. L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., current addition)]을 참조한다. N-말단 알테히드 기반 PEG화 화학 또한 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있다.

[0091] 정의

[0092] 본원에서 논의된 다양한 실시양태를 기술하기 위해 하기 용어가 사용될 것이고, 이는 하기에 지시된 바와 같이 정의되도록 의도된다.

[0093] 다양한 실시양태를 기술하는 것에서 본원에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 "하나"는 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다.

[0094] 용어 "약"은 지시된 숫자 또는 숫자 범위로부터의 0.0001-5%의 편차를 지칭한다. 한 실시양태에서, 용어 "약"은 지시된 숫자 또는 숫자 범위로부터의 1-10%의 편차를 지칭한다. 한 실시양태에서, 용어 "약"은 지시된 숫자 또는 숫자 범위로부터의 25%까지의 편차를 지칭한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 용어 "약"은 야생형 서열에 비교했을 때 뉴클레오티드 서열 상동성 또는 아미노산 서열 상동성의 관점에서 1-25%의 차이를 지칭한다.

[0095] 용어 "다중-서브유닛 시토카인"은 적어도 이종이량체가 제조되도록 알파 서브유닛 및 베타 서브유닛을 포함하거나 또는 동종이량체가 제조되도록 2개의 단량체를 포함하는 시토카인 단백질을 지칭한다. 참고로, 다중-서브유닛 시토카인은, 특히, IL-10, IL-12 또는 IL-27을 포함할 수 있다. 다른 다중-서브유닛 시토카인이 관련 기술 분야의 기술자에게 공지되어 있고, 본원에 기술된 이중 시토카인 융합 단백질의 말단 단부 내로 치환될 수 있다.

[0096] 용어 "인터루킨-12" 또는 "IL-12"는 이종이량체를 형성하도록 비-공유결합으로 연결된 알파 (p35) 및 베타 (p40) 서브유닛을 포함하는 단백질을 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 달리 지시되지 않는 한, "인터루킨-12" 및 "IL-12"는 인간, 마우스, 또는 변이체 형태를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 형태의 IL-12를 지칭한다. 따라서, 예를 들어, 용어 "야생형" 또는 "천연"은 알파 및 베타 서브유닛에 대해 자연에서 가장 통상적으로 발견되는 아미노산 서열에 상응할 것이다. 한 실시양태에서, p35는 서열식별번호: 1, 17 또는 19의 서열이고, p40은 서열식별번호: 3, 18, 또는 20의 서열이다.

[0097] 용어 "인터루킨-27" 또는 "IL-27"은 이종이량체를 형성하도록 비-공유결합으로 연결된 알파 (p28) 및 베타 (EBI3) 서브유닛을 포함하는 단백질을 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 달리 지시되지 않는 한, "인터루킨-12" 및 "IL-12"는 인간, 마우스, 또는 변이체 형태를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 형태의 IL-12를 지칭한다. 따라서, 예를 들어, 용어 "야생형" 또는 "천연"은 알파 및 베타 서브유닛에 대해 자연에서 가장 통상적으로 발견되는 아미노산 서열에 상응할 것이다. 한 실시양태에서, p28은 서열식별번호: 5의 서열이고, EBI3은 서열식별번호: 7의 서열이다.

[0098] 용어 "인터루킨-10" 또는 "IL-10"은 동종이량체를 형성하도록 연결된 2개의 단량체를 포함하는 단백질을 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 달리 지시되지 않는 한, "인터루킨-10" 및 "IL-10"은 인간, 마우스, 또는 변이체 형태를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 형태의 IL-10을 지칭한다. 따라서, 예를 들어, 용어 "야생형" 또는 "천연"은 알파 및 베타 서브유닛에 대해 자연에서 가장 통상적으로 발견되는 아미노산 서열에 상응할 것이다. 한 실시양태에서, 인간 IL-10은 서열식별번호: 31의 서열이고, 마우스 IL-10은 서열식별번호: 37의 서열이고, 바이러스 형태의 IL-10은 서열식별번호: 33을 갖는 EBV IL-10, 및 서열식별번호: 35를 갖는 CMV IL-10을 포함한다.

[0099] 용어 "변이체", "유사체" 및 "뮤테인"은 원하는 활성, 예를 들어, 항-염증성 활성을 유지하는, 기준 분자의 생물학적으로 활성인 유도체를 지칭한다. 일반적으로, 폴리펩티드에 관련되는 경우의 용어 "변이체", "변이체들", "유사체" 및 "뮤테인"은 천연 분자와 비교하여 하나 이상의 아미노산 부가, 치환 (성질 면에서 보존적일 수 있음) 및/또는 결실이 있는, 천연 폴리펩티드 서열 및 구조를 갖는 화합물 또는 화합물들을 지칭한다. 따라

서, 용어 "IL-12 변이체", "변이체 IL-12", "IL-12 변이체 분자", "IL-27 변이체", "변이체 IL-27", "IL-27 변이체 분자", 및 이의 문법적 변형 및 복수 형태는 모두 야생형 IL-12 또는 IL-27과 상이한 IL-12 또는 IL-27 아미노산 (또는 핵산) 서열을 지칭하는 등가의 용어인 것으로 의도된다. IL-12 또는 IL-27에 대한 아미노산 서열에서의 차이는 서열 동일성 또는 상동성에서 1-25%이도록 알파, 베타, 또는 양쪽 모두의 서브유닛 내에서의 부가, 결실, 또는 치환일 수 있다. 이러한 변이체 형태는 단백질에 대한 이의 글리코실화 (탈글리코실화 또는 무글리코실화) 형태에 대한 변형을 포함한다. IL-10 변이체 형태는 야생형 IL-10에 비교했을 때 증가 또는 감소된 결합 친화력을 갖는 것들을 포함할 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 증가 또는 감소된 결합 친화력을 갖는 IL-10의 변이체 형태는 서열식별번호: 41의 IL-10 변이체 (내부적으로 DV07로 표기됨) 또는 서열식별번호: 39의 감소되거나 더 낮은 결합 친화력을 갖는 IL-10 변이체 (내부적으로 DV06으로 표기됨)를 포함한다.

[0100] 용어 "융합 단백질"은 일반적으로는 자연적으로 존재하지 않는 신규한 단백질 배열을 초래하는 2개 이상의 단백질 또는 폴리펩티드의 조합 또는 접합을 지칭한다. 융합 단백질은 2개 이상의 단백질 또는 폴리펩티드의 공유 결합 연결의 결과이다. 융합 단백질을 구성하는 2개 이상의 단백질은 아미노-말단 단부 ("NH<sub>2</sub>")에서 카르복시-말단 단부 ("COOH")까지 임의의 형상으로 배열될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 한 단백질의 카르복시-말단 단부가 또 다른 단백질의 카르복시 말단 단부 또는 아미노 말단 단부에 공유결합으로 연결될 수 있다. 예시적인 융합 단백질은 (N-말단에서 C-말단으로) IL-12의 알파 서브유닛을 항체 VH 도메인으로 제2 시토카인 (예컨대 IFN-알파, IL-28, 또는 IL-29)으로 VL 도메인 (VH 및 VL 도메인이 VH/VL 쌍을 형성하도록)으로 IL-12의 베타 서브유닛으로 조합하는 것을 포함할 수 있다. 또 다른 예시적인 융합 단백질은 (N-말단에서 C-말단으로) IL-27의 알파 서브유닛을 항체 VH 도메인으로 제2 시토카인 (예컨대 IFN-알파, IL-28, 또는 IL-29)으로 VL 도메인 (VH 및 VL 도메인이 VH/VL 쌍을 형성하도록)으로 IL-27의 베타 서브유닛으로 조합하는 것을 포함할 수 있다. 또 다른 예시적인 융합 단백질은 (N-말단에서 C-말단으로) IL-12의 알파 서브유닛을 항체 VH 도메인으로 동종이량체성 시토카인 (예컨대 IL-10)의 제1 단량체로 동종이량체성 시토카인 (예컨대 IL-10)의 제2 단량체로 VL 도메인 (VH 및 VL 도메인이 VH/VL 쌍을 형성하도록)으로 IL-12의 베타 서브유닛으로 조합하는 것을 포함할 수 있다. 한 바람직한 실시양태에서, 대표적인 형태의 다중-서브유닛 이종 시토카인 융합 단백질은 단량체성 시토카인 예컨대 IL-6, IL-4, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-15, IL-21, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-CSF, 인터페론- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , TGF- $\beta$ , 또는 종양 괴사 인자- $\alpha$ , - $\beta$ , 염기성 FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11, 또는 IL-13와 조합된 이종이량체성 시토카인 예컨대 IL-12 또는 IL-27을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 다중-서브유닛 이종 시토카인 융합 단백질은 동종이량체성 시토카인 예컨대 IL-10, IL-10 변이체, 마우스 IL-10, DV07 (서열식별번호: 41), 또는 DV06 (서열식별번호: 39)과 조합된 이종이량체 시토카인 예컨대 IL-12 또는 IL-27을 포함할 수 있다.

[0101] 용어 "상동체", "상동성", "상동성인" 또는 "실질적으로 상동성인"은 적어도 2개의 폴리뉴클레오티드 서열 또는 적어도 2개의 폴리펩티드 서열 사이의 퍼센트 동일성을 지칭한다. 서열들이 정의된 길이의 분자에 걸쳐 적어도 약 50%, 바람직하게는 적어도 약 75%, 더욱 바람직하게는 적어도 약 80%-85%, 바람직하게는 적어도 약 90%, 가장 바람직하게는 적어도 약 95%-98% 서열 동일성을 나타낼 때 서열들은 서로 상동성이다.

[0102] 용어 "서열 동일성"은 정확한 뉴클레오티드-대-뉴클레오티드 또는 아미노산-대-아미노산 상응을 지칭한다. 서열 동일성은 100% 서열 동일성 내지 50% 서열 동일성 범위일 수 있다. 서열들을 정렬하고, 2개의 정렬된 서열 사이의 정확한 매치의 수를 계수하고, 기준 서열의 길이로 나누고, 결과에 100을 곱하는 것에 의한 2개의 분자 (기준 서열 및 기준 서열에 대한 퍼센트 동일성이 미지인 서열) 사이의 직접적인 서열 정보 비교를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 방법을 사용하여 퍼센트 서열 동일성을 결정할 수 있다. 쉽게 이용가능한 컴퓨터 프로그램을 사용하여 퍼센트 동일성의 확인을 보조할 수 있다.

[0103] 용어 "대상체", "개체" 또는 "환자"는 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 척추동물, 바람직하게는 포유동물을 지칭한다. 포유동물은 무린, 설치류, 유인원, 인간, 농장 동물, 스포츠 동물, 및 특정 애완동물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0104] 용어 "투여함"은 본 출원의 활성 성분이 이의 의도된 기능을 수행하도록 허용하는 투여 경로를 포함한다.

[0105] 예를 들어, 본원에 기술된 이종 시토카인 융합 단백질을 투여하는 것에 관련되는 경우의 "치료적 유효량"은 특정한 생물학적 활성을 촉진시키는 데 충분한 이종 시토카인 융합 단백질의 양을 지칭한다. 이는, 예를 들어, 골수 세포 기능의 억제, 강화된 쿠퍼(Kupffer) 세포 활성화, 및/또는 CD8<sup>+</sup> T 세포 또는 강화된 CD8<sup>+</sup> T-세포 활성화에 대한 임의의 효과의 결여, 뿐만 아니라 Fc 수용체의 비만 세포 상향조절의 차단 또는 탈과립화의 예방을 포함할 수 있다. 따라서, "유효량"은 의학적 병태의 증상 또는 징후를 호전시키거나 예방할 것이다. 유효량은

또한 진단을 허용하거나 용이하게 하는 데 충분한 양을 의미한다.

[0106] 용어 "치료하다" 또는 "치료"는 질환 또는 병태의 효과를 감소시키는 방법을 지칭한다. 치료는 단지 증상이 아니라 질환 또는 병태 자체의 근원적인 원인을 감소시키는 방법을 지칭할 수도 있다. 치료는 천연 수준으로부터의 임의의 감소일 수 있고, 질환, 병태, 또는 질환 또는 병태의 증상의 완전한 제거일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0107] **이중 시토카인 융합 단백질 구조**

[0108] 본 개시내용은 전문이 참고로 포함된 미국 특허 10,858,412 (미국 출원 번호 16/811,718로 출원됨)에서 이전에 기술된 IL-10 융합 단백질의 실시양태에 대한 개선을 제공한다. 도 6은 미국 특허 10,858,412에 기술된, 이전에 개시된 IL-10 융합 단백질 구축물 중 하나를 나타내는 개략도이다. 도 1은 어떻게 본 출원이 원래의 IL-10 융합 단백질을 개선하는지에 대한 일반적인 개략적 표현을 제공한다. IL-10 융합 단백질에 대한 개선은 (1) IL-10 단량체를 다중-서브유닛 시토카인의 알파 및 베타 서브유닛으로 치환하고, (2) 제2 시토카인 분자를 scFv의 VH 도메인과 VL 도메인 사이에 (즉, scFv의 힌지 영역 내에) 혼입시키는 것을 포함한다. 본 출원의 이중 시토카인 융합 단백질은 다중-서브유닛 시토카인의 알파 및 베타 서브유닛을 특색으로 하는 VH 및 VL을 포함하는 스캐폴딩 시스템 (scFv) 상에서 구축될 수 있고, 여기서 알파 서브유닛은 N-말단에 융합되고, 베타 서브유닛은 C-말단에 융합된다 (또는 그 반대). 용어에 따르면, "말단 단부"에 융합됨은 알파 (또는 베타) 서브유닛이 융합 단백질의 N-말단 단부에 위치할 것이고 베타 (또는 알파) 서브유닛이 C-말단 단부에 위치할 것임을 의미할 것이다. 스캐폴딩 시스템은 scFv, 바람직하게는 HIV 또는 에볼라에 대해 특이적인 항체로부터 수득된 것을 포함할 것이고, 바람직하게는 scFv는 인간 항-에볼라 항체로부터 수득된다. 이중 시토카인 융합 단백질은 6개의 상보성-결정 영역 ("CDR")을 갖는 scFv (바람직하게는 인간 항-에볼라 항체로부터 수득됨)를 포함하고, 여기서 VH 내에 3개의 CDR (CDR 1-3)이 있고, VL 내에 3개의 CDR (CDR 1-3)이 있다. 임의적으로, VH 및 VL 영역은 이중 시토카인 융합 단백질을 특정 항원으로 표적화할 수 있다. 이는 VH 및 VL 쌍의 6개의 CDR 영역 (VH 내의 3개의 CDR 및 VL 내의 3개의 CDR)을 수용체 또는 항원 표적화 항체, 또는 이의 항원 결합 단편의 VH 및 VL로부터의 6개의 CDR 영역으로 치환함으로써 달성될 수 있다. 이러한 프로세스는 일반적으로 CDR 그래프팅 또는 CDR 인그래프팅으로도 공지되어 있다. 관련 기술 분야의 기술자는 scFv 프레임워크 영역 내로 또는 본원에 기술된 scFv 스캐폴딩 내로 6개의 CDR을 치환시키고 그래프트 또는 인그래프팅을 최적화할 수 있다. 이는 관련 기술 분야의 기술자에 의해 널리 공지되어 있고 실행되는 기술이다. 예를 들어 인간 항-에볼라 항체로부터 수득된 scFv로부터의 6개의 CDR 영역이 관심 대상인 특정 표적을 기초로 임의의 기술자가 결정할 수 있는 임의의 모노클로날 항체로부터의 6개의 CDR로 치환될 수 있다. 예를 들어, 특정 표적은 효소, 수용체, 세포의 단백질, 또는 세포내 단백질, 예컨대 종양 (예를 들어, 종양 연관 항원 (TAA)), 염증성 반응, 또는 자가면역 질환과 연관된 것들을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 따라서, 특정 표적을 표적화하는 6개의 CDR은 EGFR; CD14; CD52; PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 또는 CTLA4와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 다양한 면역 체크포인트 표적; CD19; CD20; CD22; CD47; CD123; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF β 트랩; MAdCAM, β7 인테그린 서브유닛; α4β7 인테그린; α4 인테그린; BCMA; PSA; PSMA; CEA; GPC3; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1; 또는 SR-J1에 대해 특이적인 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 항체일 수 있다. 상기 언급된 목록은 본 개시내용의 이중 시토카인 융합 단백질 내로 혼입될 수 있는 가능한 표적화 항체를 대표하고, 관련 기술 분야의 기술자는 다른 표적화 항체, 특히 암 또는 염증성 조직 상의 표면 마커를 표적화하는 것들로부터의 CDR로 스캐폴딩 내에 인그래프팅될 수 있다는 것을 인지할 수 있을 것이다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 항-HER2, 항-HER3, 항-EGFR, 항-VEGFR1, 항-VEGFR2, 항-BCMA, 항-PSA, 항-PSMA, 항-CD19, 항-CD20, 항-CD22, 항-CEA, 항-GPC3, 또는 항-CD14 항체이다.

[0109] 제1 측면에서, 본 출원은 IL-12 또는 IL-27 및 적어도 하나의 다른 시토카인을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질에 관한 것이고, 이에 의해 개별적으로 IL-12 또는 IL-27 및 다른 시토카인 융합물에 비교했을 때 이중 시토카인 융합 단백질은 조합되거나 상승작용적인 기능성을 갖는다. 도 1은 융합 단백질의 말단 단부에 융합된 다중-서브유닛 시토카인의 알파 및 베타 서브유닛을 포함하는 개선된 이중 시토카인 융합 단백질의 대표도이다. 특히, 개선된 이중 시토카인 융합 단백질은 VH 및 VL scFv로 구성된 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 스캐폴딩 시스템을 개조하고, 이에 의해, 예를 들어, IL-12 또는 IL-27의 알파 및 베타 서브유닛이 아미노 및 카르복시 말단 단부에서 이중 융합 단백질을 중결시킨다 (예를 들어, 도 2-5 참조). 특정 실시양태에서, IL-12 서브유닛은 서열식별번호: 1, 17, 또는 19의 알파 서브유닛 또는 p35 또는 서열식별번호: 3, 18, 또는 20의 베타 서브유닛 또는 p40이고, 여기서 scFv에 융합된 아미노산 서브유닛에는 신호 펩티드 또는 리더 서열이 결여된다.

다른 실시양태에서, IL-27 서브유닛은 서열식별번호: 5의 알파 서브유닛 또는 p28 또는 서열식별번호: 7의 베타 서브유닛 및 EB13이고, 여기서 scFv에 융합된 아미노산에는 신호 펩티드 또는 리더 서열이 결합된다. 특정 실시양태에서, IL-12 또는 IL-27의 하나 또는 양쪽 모두의 서브유닛에 대한 변형은 부가, 결실 또는 치환을 포함할 수 있다. 이러한 변형은 결합 친화력을 변경시키거나 (증가 또는 감소), 글리코실화 부위를 변경시키거나, 면역원성을 감소시키는 변형을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, IL-27, 바람직하게는 EIB3 내의 글리코실화 부위, 더욱 바람직하게는 서열식별번호: 7의 아미노산 위치 55-57 및/또는 105-107, 더욱 더 바람직하게는 서열식별번호: 7의 위치 57 및/또는 107이 변형되고, 여기서 트레오닌이 치환된다. 제2 시토카인은 scFv의 VH 영역과 VL 영역 사이에서 융합됨으로써 이중 시토카인 융합 단백질에 접합되고, 이는 scFv의 힌지 영역이다 (예를 들어 도 1-5 참조). 이중 시토카인 융합 단백질은 기능성 단백질 복합체를 형성할 수 있고, 이에 의해 함께 회합되는 쌍을 형성하여 scFv 복합체를 형성하도록 VH 및 VL 영역이 쌍을 이루는 것과 함께 알파 및 베타 서브유닛이 이중이량체화된다.

- [0110] 특정 실시양태에서, 다중-서브유닛 시토카인을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질은 화학식 Ia 또는 Ib를 갖는 구조이다:
- [0111]  $\text{NH}_2-(\text{R}^1)-(\text{X}^1)-(\text{Z}_n)-(\text{X}^2)-(\text{R}^2)-\text{COOH}$  (화학식 Ia);
- [0112]  $\text{NH}_2-(\text{R}^2)-(\text{X}^1)-(\text{Z}_n)-(\text{X}^2)-(\text{R}^1)-\text{COOH}$  (화학식 Ib);
- [0113] 식 중,
- [0114] " $\text{R}^1$ "은 서열식별번호: 1, 17, 19 또는 5로부터 선택된 제1 시토카인 서열의 알파 서브유닛이고;
- [0115] " $\text{R}^2$ "는 서열식별번호: 3, 18, 20, 또는 7로부터 선택된 제1 시토카인 서열의 베타 서브유닛이고;
- [0116] 여기서  $\text{R}^1$ 이 서열식별번호: 1, 17, 또는 19일 때,  $\text{R}^2$ 는 서열식별번호: 3, 18, 20이거나, 또는  $\text{R}^1$ 이 서열식별번호: 5일 때,  $\text{R}^2$ 는 서열식별번호: 7이고;
- [0117] " $\text{X}^1$ "은 제1 모노클로날 항체로부터 획득된 VL 또는 VH 영역이고;
- [0118] " $\text{X}^2$ "는 제1 모노클로날 항체로부터 획득된 VH 또는 VL 영역이고;
- [0119] 여기서  $\text{X}^1$ 이 VL일 때,  $\text{X}^2$ 는 VH이거나, 또는  $\text{X}^1$ 이 VH일 때,  $\text{X}^2$ 는 VL이고;
- [0120] " $\text{Z}$ "는 시토카인이고;
- [0121] " $n$ "은 0-2로부터 선택된 정수이다.
- [0122] 또 다른 실시양태에서, 이중 시토카인 융합 단백질은 화학식 IIa 또는 IIb를 갖는 구조이다:
- [0123]  $\text{NH}_2-(\text{p35})-(\text{L})-(\text{X}^1)-(\text{L})-(\text{Z}_n)-(\text{L})-(\text{X}^2)-(\text{L})-(\text{p40})-\text{COOH}$  (화학식 IIa);
- [0124]  $\text{NH}_2-(\text{p40})-(\text{L})-(\text{X}^1)-(\text{L})-(\text{Z}_n)-(\text{L})-(\text{X}^2)-(\text{L})-(\text{p35})-\text{COOH}$  (화학식 IIb);
- [0125] 식 중,
- [0126] " $\text{p35}$ "는 서열식별번호: 1, 17, 또는 19의 서열이고;
- [0127] " $\text{p40}$ "은 서열식별번호: 3, 18, 또는 20의 서열이고;
- [0128] " $\text{L}$ "은 링커이고;
- [0129] " $\text{X}^1$ "은 제1 모노클로날 항체로부터 획득된 VL 또는 VH 영역이고;
- [0130] " $\text{X}^2$ "는 제1 모노클로날 항체로부터 획득된 VH 또는 VL 영역이고;
- [0131] 여기서  $\text{X}^1$ 이 VL일 때,  $\text{X}^2$ 는 VH이거나, 또는  $\text{X}^1$ 이 VH일 때,  $\text{X}^2$ 는 VL이고;

- [0132] "Z"는 IL-6, IL-4, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-15, IL-21, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-CSF, 인터페론- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , TGF- $\beta$ , 또는 종양 괴사 인자- $\alpha$ , - $\beta$ , 염기성 FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11, 또는 IL-13으로부터 선택된 시토카인이고;
- [0133] "n"은 0-2로부터 선택된 정수이다.
- [0134] 또 다른 실시양태에서, 이중 시토카인 융합 단백질은 화학식 IIIa 또는 IIIb를 갖는 구조이다:
- [0135]  $\text{NH}_2\text{-(p28)-(L)-(X}^1\text{)-(L)-(Z}_n\text{)-(L)-(X}^2\text{)-(L)-(EBI3)-COOH}$  (화학식 IIIa);
- [0136]  $\text{NH}_2\text{-(EBI3)-(L)-(X}^1\text{)-(L)-(Z}_n\text{)-(L)-(X}^2\text{)-(L)-(p28)-COOH}$  (화학식 IIIb);
- [0137] 식 중,
- [0138] "p28"은 서열식별번호: 5의 서열이고;
- [0139] "EBI3"은 서열식별번호: 7의 서열이고;
- [0140] "L"은 링커이고;
- [0141] " $X^1$ "은 제1 모노클로날 항체로부터 획득된 VL 또는 VH 영역이고;
- [0142] " $X^2$ "은 제1 모노클로날 항체로부터 획득된 VH 또는 VL 영역이고;
- [0143] 여기서  $X^1$ 이 VL일 때,  $X^2$ 는 VH이거나, 또는  $X^1$ 이 VH일 때,  $X^2$ 는 VL이고;
- [0144] "Z"는 IL-6, IL-4, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-15, IL-21, IL-26, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-CSF, 인터페론- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , TGF- $\beta$ , 또는 종양 괴사 인자- $\alpha$ , - $\beta$ , 염기성 FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11, 또는 IL-13으로부터 선택된 시토카인이고;
- [0145] "n"은 0-2로부터 선택된 정수이다.
- [0146] 또 다른 실시양태에서, VH 및 VL 영역은 항체, 항체 단편, 또는 이의 항원 결합 단편으로부터의 것이다. 항원 결합 단편은 scFv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, V-NAR, 디아바디, 또는 나노바디를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, VH 및 VL은 단일쇄 가변 단편 ("scFv")으로부터의 것이다.
- [0147] 또 다른 실시양태에서, 제1 다중-서브유닛 시토카인 (예를 들어, IL-12 또는 IL-27)을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질은 단일 항체로부터의 VH 및 VL 쌍을 포함한다. VH 및 VL 쌍은 다중-서브유닛 시토카인의 알파 및 베타 서브유닛이 기능성 시토카인으로 이중이량체화될 수 있도록 제1 다중-서브유닛 시토카인이 부착될 수 있는 스캐폴딩으로서 작용할 수 있다. 따라서, 관련 기술 분야의 기술자는 융합 단백질에서 사용된 VH 및 VL 스캐폴딩이 제1 다중-서브유닛 시토카인 (예를 들어, IL-12 또는 IL-27)의 올바른 이중이량체화에 필요한 원하는 물리적 속성 및/또는 VH 및 VL 표적화 능력을 유지하려는 요구를 기초로 선택될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 마찬가지로, 기술자는 특이적으로 표적화된 융합 단백질을 획득하기 위해 VH 및 VL 쌍 내의 6개의 CDR (VH로부터의 3개의 CDR 및 VL로부터의 3개의 CDR) 또한 다른 항체로부터의 6개의 CDR로 치환될 수 있다는 것도 이해할 것이다. 한 실시양태에서, 임의의 모노클로날 항체의 VH로부터의 3개의 CDR 및 VL로부터의 3개의 CDR (즉, VH 및 VL 쌍)로 스캐폴딩 시스템 내에 인그래프팅될 수 있다. 융합 단백질이 임의의 특이적인 항원을 표적화하도록 의도되지 않는다면, 인간 항-HIV 및/또는 인간 항-에볼라 항체로부터의 VH 및 VL 쌍과 같이, VH 및 VL 쌍이 임의의 특정 항원을 표적화하지 않는 (또는 생체 내에서 존재비가 낮은 항원인) 스캐폴딩으로서 선택될 수 있다는 것으로 또한 구상된다. 융합 단백질은 1-4개 범위의 가변 영역을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 가변 영역은 동일한 항체로부터의 것 또는 적어도 2개의 상이한 항체로부터의 것일 수 있다. 다중-서브유닛 시토카인을 코딩하는 아미노산 서열은 신호 펩티드 (또는 리더 서열) 없이 scFv 스캐폴딩에 융합될 것이다.
- [0148] 또 다른 측면에서, 이중 시토카인 융합 단백질은 2개의 다중-서브유닛 단백질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이중 시토카인 융합 단백질은 이중이량체인 제1 시토카인 (예컨대 IL12 또는 IL27이지만, 이에 제한되지 않음) 및 그 후의 제2 동중이량체성 시토카인 (예컨대 IL10이지만, 이에 제한되지 않음)을 포함할 수 있다. 제2 동중이량체성 시토카인은 VH 영역과 VL 영역 사이에 융합될 수 있을 것이다. 2개의 다중-서브유닛 이중 시토카인 융합 단백질의 대표적인 영상이 도 7 및 8에서 제공된다. 따라서, 본 발명의 한 실시양태에서, 상기 융합 단백

질은 화학식 (IV)의 일반식을 가질 것이다:

[0149]  $NH_2-(R^1)-(L_a)-(X^1)-(L_b)-(W^1)-(L_c)-(W^2)-(L_b)-(X^2)-(L_a)-(R^2)-COOH$  (화학식 IV);

[0150] 식 중,

[0151] " $R^1$ "은 제1 시토카인, 예컨대 IL-12 또는 IL-27의 알파 서브유닛 또는 동종이량체성 시토카인, 예컨대 IL-10의 제1 단량체, 바람직하게는 p40이고;

[0152] " $R^2$ "는 제1 시토카인, 예컨대 IL-12 또는 IL-27의 베타 알파 서브유닛 또는 동종이량체성 시토카인, 예컨대 IL-10의 제2 단량체, 바람직하게는 p35이고;

[0153] " $L_a$ "는 임의의 링커; 바람직하게는 서열식별번호: 46의 (GGGGS)<sub>3</sub>, 서열식별번호: 45의 (GGGGS)<sub>4</sub>, 또는 서열식별번호: 44의 (GGGGS)<sub>5</sub>이고;

[0154] " $L_b$ "는 임의의 링커; 바람직하게는 서열식별번호: 46의 (GGGGS)<sub>3</sub>, 서열식별번호: 45의 (GGGGS)<sub>4</sub>, 또는 서열식별번호: 44의 (GGGGS)<sub>5</sub>이고;

[0155] " $L_c$ "는 임의의 링커; 바람직하게는 서열식별번호: 43의 GGGSGGG 또는 서열식별번호: 46의 (GGGGS)<sub>3</sub>이고;

[0156] " $X^1$ "은 제1 모노클로날 항체로부터 수득된 VL 또는 VH 영역이고; " $X^2$ "는 제1 모노클로날 항체로부터 수득된 VH 또는 VL 영역이고; 여기서  $X^1$ 이 VL일 때,  $X^2$ 는 VH이거나, 또는  $X^1$ 이 VH일 때,  $X^2$ 는 VL이고;

[0157] " $W^1$ "은 제1 시토카인, 예컨대 IL-12 또는 IL-27의 알파 서브유닛 또는 동종이량체성 시토카인, 예컨대 IL-10의 제1 단량체, 바람직하게는 서열식별번호: 31, 33, 35, 37, 39, 또는 41의 IL-10의 제1 단량체이고;

[0158] " $W^2$ "는 제1 시토카인, 예컨대 IL-12 또는 IL-27의 베타 알파 서브유닛 또는 동종이량체성 시토카인, 예컨대 IL-10의 제2 단량체, 바람직하게는 서열식별번호: 31, 33, 35, 37, 39, 또는 41의 IL-10의 제2 단량체이다.

[0159] 한 실시양태에서, VH 및 VL은 인간 항-에볼라 항체로부터 수득된 scFv의 형태이다. 또 다른 실시양태에서, 인간 항-에볼라 항체로부터 수득된 scFv의 6개의 CDR (VH로부터의 CDR 1-3 및 VL로부터의 CDR 1-3)은 이중 시토카인 융합 단백질이 효소, 수용체, 세포의 단백질 또는 세포내 단백질, 예컨대 종양 (예를 들어, 종양 연관 항원 (TAA)), 염증성 반응, 또는 자가면역 질환과 연관된 것들과 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 특정 표적에 지시 되도록 허용하는 제2 모노클로날 항체로부터의 6개의 CDR로 교체 또는 인그래프팅된다. 제2 항체는 EGFR; CD14; CD52; PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 또는 CTLA4와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 다양한 면역 체크포인트 표적; CD19; CD20; CD22; CD47; CD123; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF β 트랩; MAdCAM, β7 인테그린 서브유닛; α4β7 인테그린; α4 인테그린; BCMA; PSA; PSMA; CEA; GPC3; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1; 또는 SR-J1을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 더욱 바람직한 실시양태에서, 2개의 다중-서브유닛 단백질을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질은 화학식 Va 또는 Vb로 표현된다:

[0160]  $NH_2-(P35)-(L_a)-(X^1)-(L_b)-(IL10_{\text{단량체}})-(L_c)-(IL10_{\text{단량체}})-(L_b)-(X^2)-(L_a)-(P40)-COOH$  (화학식 Va);

[0161]  $NH_2-(P40)-(L_a)-(X^1)-(L_a)-(IL10_{\text{단량체}})-(L_c)-(IL10_{\text{단량체}})-(L_b)-(X^2)-(L_a)-(P35)-COOH$  (화학식 Vb);

[0162] 식 중,

[0163] "p35"는 서열식별번호: 1, 17, 19의 서열을 갖는 IL-12의 알파 서브유닛이고;

[0164] "p40"은 서열식별번호: 3, 18, 20의 서열을 갖는 IL-12의 베타 알파 서브유닛이고;

[0165] " $L_a$ "는 임의의 링커; 바람직하게는 서열식별번호: 46의 (GGGGS)<sub>3</sub>, 서열식별번호: 45의 (GGGGS)<sub>4</sub>, 또는 서열식별번호: 44의 (GGGGS)<sub>5</sub>이고;

- [0166] "L<sub>b</sub>"는 임의의 링커; 바람직하게는 서열식별번호: 46의 (GGGG)<sub>3</sub>, 서열식별번호: 45의 (GGGG)<sub>4</sub>, 또는 서열식별번호: 44의 (GGGG)<sub>5</sub>이고;
- [0167] "L<sub>c</sub>"는 임의의 링커; 바람직하게는 서열식별번호: 43의 GGGSGGG 또는 서열식별번호: 46의 (GGGG)<sub>3</sub>이고;
- [0168] "X<sup>1</sup>"은 제1 모노클로날 항체로부터 수득된 VL 또는 VH 영역이고; "X<sup>2</sup>"는 제1 모노클로날 항체로부터 수득된 VH 또는 VL 영역이고; 여기서 X<sup>1</sup>이 VL일 때, X<sup>2</sup>는 VH이거나, 또는 X<sup>1</sup>이 VH일 때, X<sup>2</sup>는 VL이고;
- [0169] "IL10<sub>단량체</sub>"는 서열식별번호: 31, 33, 35, 37, 39, 또는 41, 바람직하게는 서열식별번호: 41의 서열을 갖는 IL-10의 단량체이다.
- [0170] 제1 모노클로날 항체는 항-에볼라 항체 (전문이 포함된 미국 공개 출원 2018/0180614, 특히 표 2, 3, 및 4에 기술된 mAb)이고, EGFR; CD14; CD52; PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 또는 CTLA4와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 다양한 면역 체크 포인트 표적; CD19; CD20; CD22; CD47; CD123; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF β 트랩; MAdCAM, β7 인테그린 서브유닛; α4β7 인테그린; α4 인테그린; BCMA; PSA; PSMA; CEA; GPC3; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1; 또는 SR-J1 중 어느 하나에 대한 특이성을 갖는 제2 항체로부터의 6개의 CDR로 이에 인그래프팅될 수 있다.
- [0171] 표 2a-2d는 화학식 IV로 표시되는 바와 같은 IL-12 및 IL-10을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질의 여러 조합이다.

표 2a (DK12 <sup>10</sup> 조합 1의 실시양태)					
(R <sup>1</sup> )	(X <sup>1</sup> )	(W <sup>1</sup> )	(W <sup>2</sup> )	(X <sup>2</sup> )	(R <sup>2</sup> )
P40	VH EGFR	IL10 단량체 <sup>1</sup>	IL10 단량체 <sup>1</sup>	VL EGFR	P35
	VH HER2			VL HER2	
	VH HER3			VL HER3	
	VH VEGFR2			VL VEGFR2	
	VH VEGFR1			VL VEGFR1	
	VH PDGFR			VL PDGFR	
	VH EpCAM			VL EpCAM	
	VH CD14			VL CD14	
	VH CD52			VL CD52	
	VH PD-L1			VL PD-L1	
	VH PD-1			VL PD-1	
	VH TIM3			VL TIM3	
	VH BTLA			VL BTLA	
	VH LAG3			VL LAG3	
	VH CTLA4			VL CTLA4	
	VH CD19			VL CD19	
	VH CD20			VL CD20	
	VH CD22			VL CD22	
	VH CD47			VL CD47	
	VH CD123			VL CD123	
	VH GD-2			VL GD-2	
	VH ICAM1			VL ICAM1	
	VH ICAM2			VL ICAM2	
	VH ICAM3			VL ICAM3	
	VH ICAM4			VL ICAM4	
	VH VCAM			VL VCAM	
	VH FAPa			VL FAPa	
	VH 5T4			VL 5T4	
	VH Trop2			VL Trop2	
	VH EDB-FN			VL EDB-FN	
	VH TGFb			VL TGFb	
	VH Trap			VL Trap	
	VH MAdCAM			VL MAdCAM	
VH b7 인테그린	VL b7 인테그린				
VH a4b7	VL a4b7				
VH a4	VL a4				
SR <sup>2</sup> 중 어느 하나의 VH	SR <sup>3</sup> 중 어느 하나의 VL				
VH BCMA	VL BCMA				
VH PSA	VL PSA				
VH PSMA	VL PSMA				
VH CEA	VL CEA				
VH GPC3	VL GPC3				

[0172]

<sup>1</sup> R<sup>1</sup>, X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup>, 및 R<sup>2</sup>는 각각 서열식별번호:31, 33, 35, 37, 39 및 41을 갖는 야생형 인간 IL10, EBV IL10, CMV IL10, 마우스 IL10, 고친화력 IL10 (DV07로 공지됨), 저친화력 IL10 (DV06으로 공지됨)으로부터 선택된 IL-10 단량체와 조합될 수 있다. P40 및 P35은 각각 서열식별번호: 18 및 17의 서열을 갖는다.

<sup>2</sup> SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1; 또는 SR-J1.

[0173]

표 2b (DK12 <sup>10</sup> 조합 2의 실시양태)					
(R <sup>1</sup> )	(X <sup>1</sup> )	(Z <sup>1</sup> )	(Z <sup>2</sup> )	(X <sup>2</sup> )	(R <sup>2</sup> )
P40	VL EGFR	IL10 단량체 <sup>1</sup>	IL10 단량체 <sup>1</sup>	VH EGFR	P35
	VL HER2			VH HER2	
	VL HER3			VH HER3	
	VL VEGFR2			VH VEGFR2	
	VL VEGFR1			VH VEGFR1	
	VL PDGFR			VH PDGFR	
	VL EpCAM			VH EpCAM	
	VL CD14			VH CD14	
	VL CD52			VH CD52	
	VL PD-L1			VH PD-L1	
	VL PD-1			VH PD-1	
	VL TIM3			VH TIM3	
	VL BTLA			VH BTLA	
	VL LAG3			VH LAG3	
	VL CTLA4			VH CTLA4	
	VL CD19			VH CD19	
	VL CD20			VH CD20	
	VL CD22			VH CD22	
	VL CD47			VH CD47	
	VL CD123			VH CD123	
	VL GD-2			VH GD-2	
	VL ICAM1			VH ICAM1	
	VL ICAM2			VH ICAM2	
	VL ICAM3			VH ICAM3	
	VL ICAM4			VH ICAM4	
	VL VCAM			VH VCAM	
	VL FAPa			VH FAPa	
	VL 5T4			VH 5T4	
	VL Trop2			VH Trop2	
	VL EDB-FN			VH EDB-FN	
	VL TGFb			VH TGFb	
	VL Trap			VH Trap	
VL MAdCAM	VH MAdCAM				
VL b7 인테그린	VH b7 인테그린				
VL a4b7	VH a4b7				
VL a4	VH a4				
SR <sup>2</sup> 중 어느 하나의 VL	SR <sup>2</sup> 중 어느 하나의 VH				
VL BCMA	VH BCMA				
VL PSA	VH PSA				
VL PSMA	VH PSMA				
VL CEA	VH CEA				
VL GPC3	VH GPC3				

[0174]

표 2c (DK12 <sup>10</sup> 조합 3의 실시양태)					
(R <sup>1</sup> )	(X <sup>1</sup> )	(Z <sup>1</sup> )	(Z <sup>2</sup> )	(X <sup>2</sup> )	(R <sup>2</sup> )
P35	VH EGFR	IL10 단량체 <sup>1</sup>	IL10 단량체 <sup>1</sup>	VL EGFR	P40
	VH HER2			VL HER2	
	VH HER3			VL HER3	
	VH VEGFR2			VL VEGFR2	
	VH VEGFR1			VL VEGFR1	
	VH PDGFR			VL PDGFR	
	VH EpCAM			VL EpCAM	
	VH CD14			VL CD14	
	VH CD52			VL CD52	
	VH PD-L1			VL PD-L1	
	VH PD-1			VL PD-1	
	VH TIM3			VL TIM3	
	VH BTLA			VL BTLA	
	VH LAG3			VL LAG3	
	VH CTLA4			VL CTLA4	
	VH CD19			VL CD19	
	VH CD20			VL CD20	
	VH CD22			VL CD22	
	VH CD47			VL CD47	
	VH CD123			VL CD123	
	VH GD-2			VL GD-2	
	VH ICAM1			VL ICAM1	
	VH ICAM2			VL ICAM2	
	VH ICAM3			VL ICAM3	
	VH ICAM4			VL ICAM4	
	VH VCAM			VL VCAM	
	VH FAPa			VL FAPa	
	VH 5T4			VL 5T4	
	VH Trop2			VL Trop2	
	VH EDB-FN			VL EDB-FN	
	VH TGFb			VL TGFb	
	VH Trap			VL Trap	
	VH MAdCAM			VL MAdCAM	
VH b7 인테그린	VL b7 인테그린				
VH a4b7	VL a4b7				
VH a4	VL a4				
SR <sup>2</sup> 중 어느 하나의 VH	SR <sup>2</sup> 중 어느 하나의 VL				
VH BCMA	VL BCMA				
VH PSA	VL PSA				
VH PSMA	VL PSMA				
VH CEA	VL CEA				
VH GPC3	VL GPC3				

[0175]

표 2d (DK12 <sup>10</sup> 조합 4의 실시양태)					
(R <sup>1</sup> )	(X <sup>1</sup> )	(Z <sup>1</sup> )	(Z <sup>2</sup> )	(X <sup>2</sup> )	(R <sup>2</sup> )
P35	VL EGFR	IL10 단량체 <sup>1</sup>	IL10 단량체 <sup>1</sup>	VH EGFR	P40
	VL HER2			VH HER2	
	VL HER3			VH HER3	
	VL VEGFR2			VH VEGFR2	
	VL VEGFR1			VH VEGFR1	
	VL PDGFR			VH PDGFR	
	VL EpCAM			VH EpCAM	
	VL CD14			VH CD14	
	VL CD52			VH CD52	
	VL PD-L1			VH PD-L1	
	VL PD-1			VH PD-1	
	VL TIM3			VH TIM3	
	VL BTLA			VH BTLA	
	VL LAG3			VH LAG3	
	VL CTLA4			VH CTLA4	
	VL CD19			VH CD19	
	VL CD20			VH CD20	
	VL CD22			VH CD22	
	VL CD47			VH CD47	
	VL CD123			VH CD123	
	VL GD-2			VH GD-2	
	VL ICAM1			VH ICAM1	
	VL ICAM2			VH ICAM2	
	VL ICAM3			VH ICAM3	
	VL ICAM4			VH ICAM4	
	VL VCAM			VH VCAM	
	VL FAPa			VH FAPa	
	VL 5T4			VH 5T4	
	VL Trop2			VH Trop2	
	VL EDB-FN			VH EDB-FN	
VL TGFb	VH TGFb				
VL Trap	VH Trap				
VL MAdCAM	VH MAdCAM				
VL b7 인테그린	VH b7 인테그린				
VL a4b7	VH a4b7				
VL a4	VH a4				
SR <sup>2</sup> 중 어느 하나의 VL	SR <sup>2</sup> 중 어느 하나의 VH				
VL BCMA	VH BCMA				
VL PSA	VH PSA				
VL PSMA	VH PSMA				
VL CEA	VH CEA				

[0176]

[0177]

상기 표 2a-2d에 언급된 바와 같은 IL-12 서브유닛 P40 및 P35는 야생형, 탈글리코실화, 또는 비글리코실화 형태의 IL-12로부터 선택될 수 있다. 추가적으로, IL-12는 인간 IL-12 또는 마우스 IL-12, 또는 야생형 IL-12에 비교했을 때 IL-12의 기능을 유지하거나, 강화하거나 또는 감소시키는 IL-12의 임의의 변이체로부터 유래될 수 있다. 상기 표 2a-2d에 열거된 IL-10 단량체는 인간 IL-10, EBV IL-10, CMV IL-10, 고친화력 변이체 형태의 IL-10 (예컨대 DV07, 서열식별번호: 41), 또는 저친화력 변이체 형태의 IL-10 (예컨대 DV06, 서열식별번호: 39)으로부터 선택될 수 있다. 또한, IL-10 단량체는 야생형 IL-10에 비교했을 때 IL-10의 기능을 유지하거나, 강화하거나 또는 감소시키는 IL-10의 임의의 변이체일 수 있다.

[0178]

또 다른 한 실시양태에서, 표 3a-3d는 화학식 IV로 표시되는 바와 같은 IL-27 및 IL-10을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질의 여러 조합이다.

**표 3a (DK27<sup>10</sup>조합 1의 실시양태)**

(R <sup>1</sup> )	(X <sup>1</sup> )	(Z <sup>1</sup> )	(Z <sup>2</sup> )	(X <sup>2</sup> )	(R <sup>2</sup> )
P28	VH EGFR	IL-10 단량체 <sup>4</sup>	IL-10 단량체 <sup>3</sup>	VL EGFR	EBI3
	VH HER2			VL HER2	
	VH HER3			VL HER3	
	VH VEGFR2			VL VEGFR2	
	VH VEGFR1			VL VEGFR1	
	VH PDGFR			VL PDGFR	
	VH EpCAM			VL EpCAM	
	VH CD14			VL CD14	
	VH CD52			VL CD52	
	VH PD-L1			VL PD-L1	
	VH PD-1			VL PD-1	
	VH TIM3			VL TIM3	
	VH BTLA			VL BTLA	
	VH LAG3			VL LAG3	
	VH CTLA4			VL CTLA4	
	VH CD19			VL CD19	
	VH CD20			VL CD20	
	VH CD22			VL CD22	
	VH CD47			VL CD47	
	VH CD123			VL CD123	
	VH GD-2			VL GD-2	
	VH ICAM1			VL ICAM1	
	VH ICAM2			VL ICAM2	
	VH ICAM3			VL ICAM3	
	VH ICAM4			VL ICAM4	
	VH VCAM			VL VCAM	
	VH FAPa			VL FAPa	
	VH 5T4			VL 5T4	
	VH Trop2			VL Trop2	
	VH EDB-FN			VL EDB-FN	
	VH TGFb			VL TGFb	
	VH Trap			VL Trap	
	VH MAdCAM			VL MAdCAM	
VH b7 인테그린	VL b7 인테그린				
VH a4b7	VL a4b7				
VH a4	VL a4				
SR <sup>2</sup> 중 어느 하나의 VH	SR <sup>2</sup> 중 어느 하나의 VL				
VH BCMA	VL BCMA				
VH PSA	VL PSA				
VH PSMA	VL PSMA				
VH CEA	VL CEA				
VH GPC3	VL GPC3				

[0179]

<sup>3</sup>R<sup>1</sup>, X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup>, 및 R<sup>2</sup>는 각각 서열식별번호:31, 33, 35, 37, 39 및 41을 갖는 야생형 인간 IL10, EBV IL10, CMV IL10, 마우스 IL10, 고친화력 IL10 (DV07로 공지됨), 저친화력 IL10 (DV06으로 공지됨)으로부터 선택된 IL-10 단량체와 조합될 수 있다. P40 및 P35은 각각 서열식별번호: 18 및 17의 서열을 갖는다.

[0180]

표 3b (DK27 <sup>10</sup> 조합 2의 실시양태)					
(R <sup>1</sup> )	(X <sup>1</sup> )	(Z <sup>1</sup> )	(Z <sup>2</sup> )	(X <sup>2</sup> )	(R <sup>2</sup> )
P28	VL EGFR	IL-10 단량체 <sup>3</sup>	IL-10 단량체 <sup>3</sup>	VH EGFR	EBI3
	VL HER2			VH HER2	
	VL HER3			VH HER3	
	VL VEGFR2			VH VEGFR2	
	VL VEGFR1			VH VEGFR1	
	VL PDGFR			VH PDGFR	
	VL EpCAM			VH EpCAM	
	VL CD14			VH CD14	
	VL CD52			VH CD52	
	VL PD-L1			VH PD-L1	
	VL PD-1			VH PD-1	
	VL TIM3			VH TIM3	
	VL BTLA			VH BTLA	
	VL LAG3			VH LAG3	
	VL CTLA4			VH CTLA4	
	VL CD19			VH CD19	
	VL CD20			VH CD20	
	VL CD22			VH CD22	
	VL CD47			VH CD47	
	VL CD123			VH CD123	
	VL GD-2			VH GD-2	
	VL ICAM1			VH ICAM1	
	VL ICAM2			VH ICAM2	
	VL ICAM3			VH ICAM3	
	VL ICAM4			VH ICAM4	
	VL VCAM			VH VCAM	
	VL FAPa			VH FAPa	
	VL 5T4			VH 5T4	
	VL Trop2			VH Trop2	
	VL EDB-FN			VH EDB-FN	
	VL TGFb			VH TGFb	
	VL Trap			VH Trap	
VL MAdCAM	VH MAdCAM				
VL b7 인테그린	VH b7 인테그린				
VL a4b7	VH a4b7				
VL a4	VH a4				
SR <sup>2</sup> 중 어느 하나의 VL	SR <sup>2</sup> 중 어느 하나의 VH				
VL BCMA	VH BCMA				
VL PSA	VH PSA				
VL PSMA	VH PSMA				
VL CEA	VH CEA				
VL GPC3	VH GPC3				

[0181]

표 3c (DK27 <sup>10</sup> 조합 3의 실시양태)					
(R <sup>1</sup> )	(X <sup>1</sup> )	(Z <sup>1</sup> )	(Z <sup>2</sup> )	(X <sup>2</sup> )	(R <sup>2</sup> )
EBI3	VH EGFR	IL-10 단량체 <sup>3</sup>	IL-10 단량체 <sup>3</sup>	VL EGFR	P28
	VH HER2			VL HER2	
	VH HER3			VL HER3	
	VH VEGFR2			VL VEGFR2	
	VH VEGFR1			VL VEGFR1	
	VH PDGFR			VL PDGFR	
	VH EpCAM			VL EpCAM	
	VH CD14			VL CD14	
	VH CD52			VL CD52	
	VH PD-L1			VL PD-L1	
	VH PD-1			VL PD-1	
	VH TIM3			VL TIM3	
	VH BTLA			VL BTLA	
	VH LAG3			VL LAG3	
	VH CTLA4			VL CTLA4	
	VH CD19			VL CD19	
	VH CD20			VL CD20	
	VH CD22			VL CD22	
	VH CD47			VL CD47	
	VH CD123			VL CD123	
	VH GD-2			VL GD-2	
	VH ICAM1			VL ICAM1	
	VH ICAM2			VL ICAM2	
	VH ICAM3			VL ICAM3	
	VH ICAM4			VL ICAM4	
	VH VCAM			VL VCAM	
	VH FAPa			VL FAPa	
	VH 5T4			VL 5T4	
	VH Trop2			VL Trop2	
	VH EDB-FN			VL EDB-FN	
	VH TGFb			VL TGFb	
	VH Trap			VL Trap	
VH MAdCAM	VL MAdCAM				
VH b7 인테그린	VL b7 인테그린				
VH a4b7	VL a4b7				
VH a4	VL a4				
SR <sup>2</sup> 중 어느 하나의 VH	SR <sup>2</sup> 중 어느 하나의 VL				
VH BCMA	VL BCMA				
VH PSA	VL PSA				
VH PSMA	VL PSMA				
VH CEA	VL CEA				
VH GPC3	VL GPC3				

[0182]

표 3d (DK27 <sup>10</sup> 조합 4의 실시양태)					
(R <sup>1</sup> )	(X <sup>1</sup> )	(Z <sup>1</sup> )	(Z <sup>2</sup> )	(X <sup>2</sup> )	(R <sup>2</sup> )
EBI3	VL EGFR	IL-10 단량체 <sup>3</sup>	IL-10 단량체 <sup>3</sup>	VH EGFR	P28
	VL HER2			VH HER2	
	VL HER3			VH HER3	
	VL VEGFR2			VH VEGFR2	
	VL VEGFR1			VH VEGFR1	
	VL PDGFR			VH PDGFR	
	VL EpCAM			VH EpCAM	
	VL CD14			VH CD14	
	VL CD52			VH CD52	
	VL PD-L1			VH PD-L1	
	VL PD-1			VH PD-1	
	VL TIM3			VH TIM3	
	VL BTLA			VH BTLA	
	VL LAG3			VH LAG3	
	VL CTLA4			VH CTLA4	
	VL CD19			VH CD19	
	VL CD20			VH CD20	
	VL CD22			VH CD22	
	VL CD47			VH CD47	
	VL CD123			VH CD123	
	VL GD-2			VH GD-2	
	VL ICAM1			VH ICAM1	
	VL ICAM2			VH ICAM2	
	VL ICAM3			VH ICAM3	
	VL ICAM4			VH ICAM4	
	VL VCAM			VH VCAM	
	VL FAPa			VH FAPa	
	VL 5T4			VH 5T4	
	VL Trop2			VH Trop2	
	VL EDB-FN			VH EDB-FN	
	VL TGFb			VH TGFb	
VL Trap	VH Trap				
VL MAdCAM	VH MAdCAM				
VL b7 인테그린	VH b7 인테그린				
VL a4b7	VH a4b7				
VL a4	VH a4				
SR <sup>2</sup> 중 어느 하나의 VL	SR <sup>2</sup> 중 어느 하나의 VH				
VL BCMA	VH BCMA				
VL PSA	VH PSA				
VL PSMA	VH PSMA				
VL CEA	VH CEA				
VL GPC3	VH GPC3				

[0183]

[0184]

상기 표 3a-3d에 언급된 바와 같은 IL-27 서브유닛 P28 및 EBI3은 야생형, 탈글리코실화, 또는 비글리코실화 형태의 IL-27로부터 선택될 수 있다. 추가적으로, IL-27은 인간 IL-27 또는 마우스 IL-27, 또는 야생형 IL-27에 비교했을 때 IL-27의 기능을 유지하거나, 강화하거나 또는 감소시키는 IL-27의 임의의 변이체로부터 유래될 수 있다. 상기 표 2a-2d에 열거된 IL-10 단량체는 인간 IL-10, EBV IL-10, CMV IL-10, 고친화력 변이체 형태의 IL-10 (예컨대 DV07, 서열식별번호: 41), 또는 저친화력 변이체 형태의 IL-10 (예컨대 DV06, 서열식별번호: 39)으로부터 선택될 수 있다. 또한, IL-10 단량체는 야생형 IL-10에 비교했을 때 IL-10의 기능을 유지하거나, 강화하거나 또는 감소시키는 IL-10의 임의의 변이체일 수 있다.

[0185]

또 다른 실시양태에서, 항체 가변 쇠 또는 VH 및 VL 쌍 또는 VH 및 VL 쌍의 6개의 CDR의 표적 특이성은 단백질, 세포성 수용체 및/또는 종양 연관 항원을 표적화하는 것을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 임의의 VH 및 VL 쌍으로부터의 CDR 영역으로 상기 기술된 이중 시토키인 스캐폴딩 시스템 (도 1-5에 의해 개략적으로 표현됨) 내에 인그래프팅될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 가변 영역 또는 VH 및 VL 쌍 또는 VH 및 VL 쌍의 6개의 CDR은 다양한 질환 (예를 들어, 암)과 연관된 항원 또는 건강한 대상체의 혈청에서는 전형적으로 발견되지 않거나 드물게 발견되는 것을 표적화하는 항체, 예를 들어, EGFR, PDGFR, VEGFR1, VEGFR2, Her2Neu, FGFR, GPC3, 또는 기타 종양 연관 항원, MAdCAM, ICAM, VCAM, CD14 또는 기타 염증 연관 세포 표면 단백질, HIV 및/또는 에볼라에 대해 지시된 항체로부터의 가변 영역으로부터 획득된다. 따라서, 한 실시양태에서, 가변 영역은, 예를 들어, 항-EGFR, 항-MAdCAM, 항-HIV (Chan et al., J. Virol., 2018, 92(18):e006411-19), 항-ICAM, 항-VCAM, 항-CD14, 또는 항-에볼라 (전문이 참고로 포함된 미국 공개 출원 2018/0180614, 특히

표 2, 3, 및 4에 기술된 mAb) 항체로부터 수득되거나 유래된다. 또 다른 실시양태에서, 가변 영역은 IL-12 및 IL-27이 이의 생물학적 효과를 더욱 효과적으로 유발할 수 있도록 특정 표적 영역에 대해 IFN-알파, IL-28, 또는 IL-29와 조합된 시토카인, 예컨대 IL-12 또는 IL-27의 농도를 강화할 수 있는 항체로부터 수득되거나 유래된다. 이같은 항체는 특정한 이환 영역 내의 과발현되거나 상향조절된 수용체 또는 항원 또는 영향을 받은 특정한 영역에서 특이적으로 발현되는 것들을 표적화하는 것들을 포함할 수 있다. 예를 들어, 가변 영역 또는 CDR은, 몇몇 예를 들면, EGFR; CD14; CD52; PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 또는 CTLA4와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 다양한 면역 체크 포인트 표적; CD19; CD20; CD22; CD47; CD123; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF β 트랩; MAdCAM, β7 인테그린 서브유닛; α4β7 인테그린; α4 인테그린; BCMA; PSA; PSMA; CEA; GPC3; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1; 또는 SR-J1에 대해 특이적인 항체로부터 수득될 수 있다

[0186] 이중 시토카인 융합 단백질 또는 이중 시토카인 융합 단백질 복합체는 또한 항원 표적화 가능성을 가질 수 있다. 이중 시토카인 융합 단백질 또는 이중 시토카인 융합 단백질 복합체는 항원 결합 부위 또는 ABS를 형성하도록 함께 회합할 수 있는 VH 및 VL 쌍을 포함할 것이다. 가변 영역은 대상체에서 항원성을 감소시키는 하나 이상의 아미노산을 변경하는 것에 의해 (예를 들어, 부가, 차감 또는 치환에 의해) 추가로 변형될 수 있다. 가변 영역에 대한 다른 변형은 VH 및 VL 영역의 6개의 CDR 영역의 외부에서 발견되고 scFv의 VH 및 VL 영역의 안정성 및 발현을 증가시키는 역할을 하는 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 포함할 수 있다. 관련 기술 분야의 기술자는 scFv를 안정화하고/거나 발현 목적을 위해 서열을 최적화하는 다른 변형을 결정할 수 있을 것이다.

[0187] VH 및 VL 쌍은 복수의 항체로부터 수득된 CDR 영역이 치환 또는 인그래프팅될 수 있는 스캐폴딩을 형성한다. 이같은 항체 CDR 영역은 공지되어 있고 상기에 기술된 항체를 포함한다. 상기 기술된 VH 및 VL 스캐폴딩 내의 CDR 영역은 CDR 인그래프팅/삽입에 이용가능한 하기 개수의 아미노산 위치를 포함할 것이다:

중쇄 CDR1	3-7개의 아미노산
중쇄 CDR2	7-11개의 아미노산
중쇄 CDR3	7-11개의 아미노산
경쇄 CDR1	9-14개의 아미노산
경쇄 CDR2	5-9개의 아미노산
경쇄 CDR3	7-11개의 아미노산

[0188]

[0189] 바람직한 실시양태에서, 제1 다중-서브유닛 시토카인 (예를 들어, IL-12 또는 IL-27)을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질은 인간 항-에볼라 항체 (전문이 참고로 포함된 미국 공개 출원 2018/0180614, 특히 표 2, 3, 및 4에 기술된 mAb)로부터 유래되고, 이에 의해 인간 항-에볼라 항체로부터의 6개의 CDR 영역이 제거되고, EGFR; CD14; CD52; PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 또는 CTLA4와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 다양한 면역 체크 포인트 표적; CD19; CD20; CD22; CD47; CD123; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF β 트랩; MAdCAM, β7 인테그린 서브유닛; α4β7 인테그린; α4 인테그린; BCMA; PSA; PSMA; CEA; GPC3; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1; 또는 SR-J1을 표적화하는 항체와 같지만 이에 제한되지 않는 특정 표적화 항체의 VH 및 VL 쌍으로 인그래프팅된 VH 및 VL 쌍을 포함할 것이다. 한 실시양태에서, 6개의 인간 항-에볼라 CDR 영역이 항-EGFR, 항-MAdCAM, 항-VEGFR1, 항-VEGFR2, 항-PDGFR, 또는 항-CD14로부터의 6개의 CDR 영역으로 치환된다. 바람직한 실시양태에서, IL-28, IL-29, IFN α와 같지만 이에 제한되지 않는 제2 시토카인이 인간 항-에볼라 항체로부터 수득된 scFv의 VH와 VL 사이의 힌지 영역에 연결된다. 상기 언급된 인그래프팅 전략은 상기에서 열거된 화학식 IV 및 Va 및 Vb로 표시된 바와 같은 2개의 다중-서브유닛 시토카인을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질에도 적용될 수 있다.

[0190] 또 다른 실시양태에서, 도 1-5에 도시된 바와 같이, scFv의 VH와 VL 사이에 제2 시토카인이 융합된다. 제2 시토카인은 제2 시토카인이 이의 기능적 성질을 유지하도록 VH 또는 VL 영역 사이에 접합된다. 한 실시양태에서, 제2 시토카인은 제1 다중-서브유닛 시토카인 (예를 들어, IL-12 또는 IL-27)과 상이하다. 한 실시양태에서, 제2 시토카인은 IL-6, IL-4, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-15, IL-21, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-CSF, 인터페론-α, -β, -γ, TGF-β, 또는 중양 피사 인자-α, -β, 염기성 FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11, 또는 IL-13이다. 바람직한 실시양태에서, 이중 시토카인 융합 단백질 내의 제2 시토카인은 IL-28, IL-29 또는 IFN-알파를 포함한다.

[0191] 일부 실시양태에서, 제2 시토카인은 또 다른 다중-서브유닛 시토카인, 예컨대 IL-10일 수 있다. 이러한 경우에, 제2 시토카인은 또한 스캐폴딩 시스템의 VH와 VL 사이에 융합될 것이다 (대표적인 구조에 대해 도 7 및 8 참조). 상기 기술된 화학식 IV, Va 및 Vb는 이러한 유형의 융합 단백질을 기술하는 역할을 한다.

[0192] 또 다른 실시양태에서, 제1 다중-서브유닛 시토카인 (예를 들어, IL-12 또는 IL-27)을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질에 링커가 혼입된다. 관련 기술 분야의 기술자는 다양한 융합 단백질 부분들의 올바른 공간적 형상을 달성하기 위해 링커 또는 스페이서가 사용된다는 것을 인지하고, 따라서, 제1 다중-서브유닛 시토카인 (예를 들어, IL-12 또는 IL-27)을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질의 형성에서 사용하기 위한 적절한 링커를 선택할 수 있다. 더욱 바람직한 실시양태에서, 링커 또는 스페이서는 서열식별번호: 43, 44, 45, 46, 47, 및 48의 무작위 아미노산 서열일 수 있다. 표 2a-2d 또는 3a-3d의 상기 조합 중 임의의 것이 각각 서열식별번호: 46, 45, 및 47을 갖는 GGGGS)<sub>3</sub>, (GGGS)<sub>4</sub>, 또는 (GGGS)<sub>5</sub>로부터 선택된 링커 ("L<sub>a</sub>") 및 ("L<sub>b</sub>"), 및 각각 서열식별번호: 43 및 46에 상응하는 GGGSGGG 또는 (GGGS)<sub>3</sub>의 링커 ("L<sub>c</sub>")와 조합될 수 있다. 한 바람직한 실시양태에서, 화학식 IV는 하기와 같은 표 4의 링커의 조합을 포함할 수 있다.

**표 4: 화학식 IV에서의 가능한 링커 조합**

IL-12 p40	L <sub>a</sub>	VH	L <sub>b</sub>	IL-10 단량체 1	L <sub>c</sub>	IL-10 단량체 2	L <sub>b</sub>	VL	L <sub>a</sub>	IL-12 p35
X	GGGS x 5	X	GGGS x 5	X	GGSGGG	X	GGGS x 5	X	GGGS x 5	X
X	GGGS x 4	X	GGGS x 4	X	GGSGGG	X	GGGS x 4	X	GGGS x 4	X
X	GGGS x 3	X	GGGS x 3	X	GGSGGG	X	GGGS x 3	X	GGGS x 3	X
X	GGGS x 5	X	GGGS x 5	X	GGSGGG	X	GGGS x 5	X	GGGS x 5	X
X	GGGS x 5	X	GGGS x 4	X	GGSGGG	X	GGGS x 4	X	GGGS x 4	X
X	GGGS x 5	X	GGGS x 3	X	GGSGGG	X	GGGS x 3	X	GGGS x 3	X
X	GGGS x 4	X	GGGS x 5	X	GGSGGG	X	GGGS x 5	X	GGGS x 5	X
X	GGGS x 4	X	GGGS x 4	X	GGSGGG	X	GGGS x 4	X	GGGS x 4	X
X	GGGS x 4	X	GGGS x 3	X	GGSGGG	X	GGGS x 3	X	GGGS x 3	X
X	GGGS x 3	X	GGGS x 5	X	GGSGGG	X	GGGS x 5	X	GGGS x 5	X
X	GGGS x 3	X	GGGS x 4	X	GGSGGG	X	GGGS x 4	X	GGGS x 4	X
X	GGGS x 3	X	GGGS x 3	X	GGSGGG	X	GGGS x 3	X	GGGS x 3	X
X	GGGS x 5	X	GGGS x 5	X	GGSGGG	X	GGGS x 5	X	GGGS x 5	X
X	GGGS x 4	X	GGGS x 5	X	GGSGGG	X	GGGS x 4	X	GGGS x 4	X
X	GGGS x 3	X	GGGS x 5	X	GGSGGG	X	GGGS x 3	X	GGGS x 3	X
X	GGGS x 5	X	GGGS x 4	X	GGSGGG	X	GGGS x 5	X	GGGS x 5	X
X	GGGS x 4	X	GGGS x 4	X	GGSGGG	X	GGGS x 4	X	GGGS x 4	X
X	GGGS x 3	X	GGGS x 4	X	GGSGGG	X	GGGS x 3	X	GGGS x 3	X
X	GGGS x 5	X	GGGS x 3	X	GGSGGG	X	GGGS x 5	X	GGGS x 5	X
X	GGGS x 4	X	GGGS x 3	X	GGSGGG	X	GGGS x 4	X	GGGS x 4	X
X	GGGS x 3	X	GGGS x 3	X	GGSGGG	X	GGGS x 3	X	GGGS x 3	X
X	GGGS x 5	X	GGGS x 5	X	GGSGGG	X	GGGS x 5	X	GGGS x 5	X

[0193]

X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 4	X	GGGS GGG	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 4	X
X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGS GGG	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 3	X
X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X	GGGS GGG	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 5	X
X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 4	X	GGGS GGG	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 4	X
X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGS GGG	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 3	X
X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X	GGGS GGG	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 5	X
X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 4	X	GGGS GGG	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 4	X
X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGS GGG	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X
X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X	GGGS GGG	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X
X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 4	X	GGGS GGG	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 4	X
X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGS GGG	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 3	X
X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X	GGGS GGG	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 5	X
X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 4	X	GGGS GGG	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 4	X
X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGS GGG	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X
X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X	GGGS GGG	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X
X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 4	X	GGGS GGG	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 5	X
X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGS GGG	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 5	X
X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X
X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 4	X
X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X
X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X
X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 4	X
X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X
X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X
X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 4	X

[0194]

X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X
X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X
X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 4	X
X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X
X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X
X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 4	X
X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X
X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X
X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 4	X
X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X
X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X
X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 4	X
X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X
X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X
X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 4	X
X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 3	X
X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 5	X
X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 4	X
X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 3	X
X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 5	X
X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 4	X
X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X
X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X
X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 4	X
X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 3	X

[0195]

X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 5	X
X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 4	X
X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X
X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 5	X	GGGGS x 5	X
X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 4	X	GGGGS x 5	X
X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGGS x 5	X

(GGGGS)<sub>3</sub> = 시열식별번호: 46, (GGGGS)<sub>4</sub> = 시열식별번호: 45, (GGGGS)<sub>5</sub> = 시열식별번호: 44

[0196]

[0197] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 화학식 IV는 하기와 같은 표 4의 바람직한 링커의 조합을 포함할 수 있다.

표 5: 바람직한 화학식 IV 링커 조합			
조합	"La"	"Lb"	"Lc"
1	(GGGGS) <sub>3</sub>	(GGGGS) <sub>3</sub>	GGGSGGG
2	(GGGGS) <sub>3</sub>	(GGGGS) <sub>3</sub>	(GGGGS) <sub>3</sub>
3	(GGGGS) <sub>3</sub>	(GGGGS) <sub>5</sub>	GGGSGGG
4	(GGGGS) <sub>4</sub>	(GGGGS) <sub>3</sub>	GGGSGGG
5	(GGGGS) <sub>4</sub>	(GGGGS) <sub>4</sub>	GGGSGGG
6	(GGGGS) <sub>4</sub>	(GGGGS) <sub>5</sub>	GGGSGGG
7	(GGGGS) <sub>4</sub>	(GGGGS) <sub>3</sub>	(GGGGS) <sub>3</sub>
8	(GGGGS) <sub>4</sub>	(GGGGS) <sub>4</sub>	(GGGGS) <sub>3</sub>
9	(GGGGS) <sub>4</sub>	(GGGGS) <sub>5</sub>	(GGGGS) <sub>3</sub>
10	(GGGGS) <sub>5</sub>	(GGGGS) <sub>3</sub>	GGGSGGG
11	(GGGGS) <sub>5</sub>	(GGGGS) <sub>4</sub>	GGGSGGG
12	(GGGGS) <sub>5</sub>	(GGGGS) <sub>5</sub>	GGGSGGG
13	(GGGGS) <sub>5</sub>	(GGGGS) <sub>3</sub>	(GGGGS) <sub>3</sub>
14	(GGGGS) <sub>5</sub>	(GGGGS) <sub>4</sub>	(GGGGS) <sub>3</sub>
15	(GGGGS) <sub>5</sub>	(GGGGS) <sub>5</sub>	(GGGGS) <sub>3</sub>

(GGGGS)<sub>3</sub> = 서열식별번호: 46  
 (GGGGS)<sub>4</sub> = 서열식별번호: 45  
 (GGGGS)<sub>5</sub> = 서열식별번호: 44

[0198]

[0199] 2개의 다중-서브유닛 시토카인을 포함하는 바람직한 이중 시토카인 융합 단백질은 서열식별번호: 21-30에 열거된 것들을 포함한다.

[0200]

다른 측면에서, 본 개시내용은 제1 다중-서브유닛 시토카인 (예를 들어, IL-12 또는 IL-27) 및 제2 시토카인을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질을 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다. 이는 화학식 Ia, Ib, IIa, IIb, IIIa, IIIb, VI, Va, 또는 Vb로 표현되는 이중 시토카인 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함할 것이다. 따라서, 한 실시양태는 이의 70% 내지 99% 서열 상동성을 공유하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 제1 다중-서브유닛 시토카인 (예를 들어, IL-12 또는 IL-27) 및 제2 시토카인 (예를 들어, IL-10, IFN-알파, IL-28, IL-29)을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 기술된 이중 시토카인 융합 단백질의 기능적 성질을 변경시키지 않는 변형을 포함할 수도 있다. 이같은 변형은 통상적인 DNA 기술 및 방법을 사용할 것이다. 예를 들어, 특정 아미노산 서열의 부가 또는 치환이 합성 올리고뉴클레오티드를 사용하는 부위-지정 돌연변이유발 방법을 이용하여 핵산 (DNA) 수준에서 제1 다중-서브유닛 시토카인 (예를 들어, IL-12 또는 IL-27) 서열 내로 도입될 수 있고, 이러한 방법 또한 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있다. 바람직한 실시양태에서, 이중 시토카인 융합 단백질을 코딩하는 핵산 분자는 제1 다중-서브유닛 시토카인 (예를 들어, IL-12 또는 IL-27), 제2 시토카인, 또는 scFv의 VH 또는 VL 영역의 기능성을 변경시키지 않는 삽입, 결실 또는 치환 (예를 들어, 축퇴성 코드)을 포함할 수 있다. 본원에 기술된 이중 시토카인 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 유전자 코드의 축퇴성으로 인해 아미노산 서열과 상이할 수 있고, 상기 언급된 서열과 70-99%, 바람직하게는 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상동성일 수 있다.

[0201]

본원에 기술된 이중 시토카인 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은, 예를 들어, 단백질의 발현, 생산 또는 분비를 보조하는 널리 공지된 서열을 추가로 포함할 수 있다. 이같은 서열은, 예를 들어, 리더 서열, 신호 펩티드, 및/또는 번역 개시 부위/서열 (예를 들어 코작(Kozak) 컨센서스 서열)을 포함할 수 있다. 본원에 기술된 뉴클레오티드 서열은 또한 다양한 발현 시스템/백터 내로의 삽입을 허용하는 하나 이상의 제한 효소 부위를 포함할 수 있다.

[0202]

또 다른 실시양태에서, 이중 시토카인 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 유전자 요법에서 직접적으로 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 출원의 이중 시토카인 융합 단백질은 이중 시토카인 융합 단백질을 코딩하는 백터 내의 유전자의 직접적인 투여를 포함하는, 관련 기술 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 전달될 수 있다. 유전자 요법은 플라스미드 DNA 또는 바이러스 백터, 예컨대 아데노-연관 바이러스 백터, 아데노바이러스 백터, 레트로바이러스 백터 등을 사용하여 달성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 출원의 바이러스 백터는 바이러스 입자로서 투여되고, 다른 실시양태에서, 이는 플라스미드로서 (예컨대, "네이키드" DNA로서) 투여된다.

[0203]

뉴클레오티드 서열의 전달을 위한 다른 방법은 관련 기술 분야에 이미 공지된 것들을 포함한다. 이는 세포 투과 펩티드, 소수성 모이어티, 정전기 복합체, 리포솜, 리간드, 리포솜 나노입자, 지질단백질 (바람직하게는 HDL

또는 LDL), 플레이트 표적화 리포솜, 항체 (예컨대 플레이트 수용체, 트랜스페린 수용체), 표적화 펩티드, 또는 압타머에 의해 이중 시토카인 융합 단백질을 코딩하는, DNA, RNA, siRNA, mRNA, 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 변이체와 같지만 이에 제한되지 않는 뉴클레오타이드 서열을 전달하는 것을 포함할 것이다. 이중 시토카인 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 직접적인 주사, 주입, 패치, 봉대, 미스트 또는 에어로졸에 의해, 또는 박막 전달에 의해 대상체에게 전달될 수 있다. 뉴클레오타이드 (또는 단백질)는 시토카인 자극의 표적화된 전달을 원하는 임의의 영역으로 지시될 수 있다. 이는, 예를 들어, 폐, GI 관, 피부, 간, 두개뇌 주사를 통한 뇌, 초음파 가이드 주사를 통한 심재성 전이성 종양 병변을 포함할 것이다.

[0204] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 이중 시토카인 융합 단백질을 제조하고 정제하는 방법에 관한 것이다. 예를 들어, 본원에 기술된 이중 시토카인 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 사용하여 융합 단백질을 제조합적으로 생산할 수 있다. 예를 들어, 통상적인 분자생물학 및 단백질 발현 기술을 사용하여, 본원에 기술된 이중 시토카인 융합 단백질이 포유동물 세포 시스템으로부터 발현 및 정제될 수 있다. 이러한 시스템은 널리 공지된 진핵생물 세포 발현 벡터 시스템 및 숙주 세포를 포함한다. 다양한 적절한 발현 벡터가 사용될 수 있고, 관련 기술 분야의 기술자에게 널리 공지되어 있으며, 이는 이중 시토카인 융합 단백질의 발현 및 도입에 사용될 수 있다. 이러한 벡터는, 예를 들어, pUC-유형 벡터, pBR-유형 벡터, pBI-유형 벡터, pGA-유형, pBin19, pBI121, pGreen 시리즈, pCAMBRIA 시리즈, pPZP 시리즈, pPCV001, pGA482, pCLD04541, pBIBAC 시리즈, pYLAC 시리즈, pSB11, pSB1, pGPTV 시리즈, 및 바이러스 벡터 등을 포함하며, 사용될 수 있다. 널리 공지된 숙주 세포 시스템은 CHO 세포에서의 발현을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0205] 이중 시토카인 융합 단백질을 보유하는 발현 벡터는 벡터 기능성에 요구되는 다른 벡터 부품을 또한 포함할 수 있다. 예를 들어, 벡터는 이중 시토카인 융합 단백질의 올바른 복제 및 발현에 요구되는, 신호 서열, 태그 서열, 프로테아제 식별 서열, 선별 마커 및 기타 조절 서열, 예컨대 프로모터를 포함할 수 있다. 벡터에서 사용되는 특정 프로모터는 다양한 숙주 세포 유형에서 이중 시토카인 융합 단백질의 발현을 구동시킬 수 있는 한 특별히 제한되지 않는다. 마찬가지로, 태그 서열이 발현된 이중 시토카인 융합 단백질의 정제를 더욱 간단하게 또는 더욱 쉽게 만드는 한, 태그 프로모터의 유형이 제한되지 않는다. 이는, 예를 들어, 6-히스티딘, GST, MBP, HAT, HN, S, TF, Trx, Nus, 비오틴, FLAG, myc, RCFP, GFP 등을 포함하고, 사용될 수 있다. 프로테아제 인식 서열은 특별히 제한되지 않고, 예를 들어, 인자 Xa, 트롬빈, HRV, 3C 프로테아제와 같은 인식 서열이 사용될 수 있다. 선택된 마커는 형질전환된 벼 식물 세포를 검출할 수 있는 한 특별히 제한되지 않고, 예를 들어, 네오마이신-내성 유전자, 카나마이신-내성 유전자, 히그로마이신-내성 유전자 등이 사용될 수 있다.

[0206] 상기 기술된 이중 시토카인 융합 단백질은 제작 공정 동안 융합 단백질의 회수 또는 정제를 보조하는 추가적인 아미노산 서열을 또한 포함할 수 있다. 이는 단백질 A, 알부민-결합 단백질, 알칼리성 포스파타제, FLAG 에피토프, 갈락토스-결합 단백질, 히스티딘 태그, 및 관련 기술 분야에 널리 공지된 임의의 다른 태그와 같지만 이에 제한되지 않는 다양한 서열 변형 또는 친화성 태그를 포함할 수 있다. 예를 들어, 전문이 참고로 포함된 문헌 [Kimple et al., Curr. Protoc. Protein Sci., 2013, 73:Unit 9.9, Table 9.91]을 참조한다. 한 측면에서, 친화성 태그는 HHHHHH (서열식별번호: 42)의 아미노산 서열을 갖는 히스티딘 태그이다. 히스티딘 태그는 최종 생성물로부터 제거되거나 또는 무손상으로 남을 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 친화성 태그는 융합 단백질 내로 (예를 들어, 본원에 기술된 융합 단백질의 VH 영역 내로) 혼입된 단백질 A 변형이다. 관련 기술 분야의 기술자는 임의의 본원에 기술된 이중 시토카인 융합 단백질 서열이 관련 기술 분야에 기술된 바와 같이 항체 프레임워크 영역 내에 아미노산 점 치환을 삽입하는 것에 의해 단백질 A 변형이 혼입되도록 변형될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0207] 또 다른 측면에서, 이중 시토카인 융합 단백질을 코딩하는 단백질 및 핵산 분자가 치료적 유효량의 이중 시토카인 융합 단백질 및 제약 담체 및/또는 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물로서 제형화될 수 있다. 통상적으로 사용되는 완충제, 부형제, 보존제, 안정화제로 제약 조성물이 제형화될 수 있다. 이중 시토카인 융합 단백질을 포함하는 제약 조성물은 제약상 허용되는 담체 또는 부형제와 혼합된다. 다양한 제약 담체가 관련 기술 분야에 공지되어 있고, 제약 조성물에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 담체는 본 출원의 이중 시토카인 융합 단백질 조성물을 환자에게 전달하는 데 적절한 임의의 혼화성이고 비독성인 물질일 수 있다. 적절한 담체의 예는 생리식염수, 링거액, 텍스트로스 용액, 및 헵크 용액을 포함한다. 담체는 분자량이 2900 (L64), 3400 (P65), 4200 (P84), 4600 (P85), 11,400 (F88), 4950 (P103), 5900 (P104), 6500 (P105), 14,600 (F108), 5750 (P123), 및 12,600 (F127)인 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 관련 기술 분야의 기술자에게 일반적으로 공지된 임의의 폴록사머를 또한 포함할 수 있다. 담체는 몇몇을 언급하자면 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 및 폴리소르베이트 80을 포함하지만 이에 제한되지 않는 유화제를 또한 포함할

수 있다. 비-수성 담체 예컨대 고정유 및 에틸 올레레이트가 또한 사용될 수 있다. 담체는 첨가제 예컨대 등장성 및 화학적 안정성을 강화하는 물질, 예를 들어, 완충제 및 보존제를 또한 포함할 수 있고, 예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1984)]을 참조한다. 예를 들어, 동결건조 분말, 슬러리, 수성 용액 또는 현탁액의 형태로 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합함으로써 치료 및 진단 작용제의 제형을 제조할 수 있다.

[0208] 제약 조성물은 원하는 치료 결과를 제공하는 데 충분한 치료적 유효량으로 환자에게 투여하기 위해 제형화될 것이다. 바람직하게는, 이같은 양은 부정적인 부작용이 최소화이다. 한 실시양태에서, 투여되는 이중 시토카인 융합 단백질의 양은 염증성 질환 또는 병태를 치료 또는 예방하는 데 충분할 것이다. 또 다른 실시양태에서, 투여되는 이중 시토카인 융합 단백질의 양은 면역 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 데 충분할 것이다. 또 다른 실시양태에서, 투여되는 이중 시토카인 융합 단백질의 양은 암을 치료 또는 예방하는 데 충분할 것이다. 투여되는 양은 환자마다 다를 수 있고, 대상체 또는 환자의 질환 또는 병태, 환자의 전반적인 건강, 투여 방법, 부작용의 중증도 등을 고려하여 결정될 필요가 있을 것이다.

[0209] 특정 환자에 대한 유효량은 치료될 병태, 환자의 전반적인 건강, 투여 방법 경로 및 용량 및 부작용의 중증도와 같은 요인에 따라 변할 수 있다. 환자에게 투여되는 적합한 용량은 치료에 영향을 미치는 것으로 관련 기술 분야에 공지되어 있거나 또는 관련 기술 분야에서 추정되거나, 또는 치료에 영향을 미칠 것으로 예상되는 파라미터 또는 요인을 사용하여 임상시에 의해 전형적으로 결정된다. 일반적으로, 용량은 최적 용량보다 다소 적은 양으로 시작하고, 그후 임의의 부정적인 부작용에 비해 원하는 효과 또는 최적의 효과가 달성될 때까지 소량의 증분으로 증가된다. 중요한 진단 척도는, 예를 들어, 염증의 증상, 또는 생산된 염증성 시토카인의 수준을 포함한다.

[0210] 본원에 기술된 이중 시토카인 융합 단백질의 투약을 결정하는 방법은 미국 특허 10,858,412에 기술된 것과 실질적으로 유사할 것이다. 일반적으로, 본원에 기술된 이중 시토카인 융합 단백질은 용량이 0.5 마이크로그램/킬로그램 내지 100 마이크로그램/킬로그램의 범위일 것이다. 이중 시토카인 융합 단백질은 매일, 주 3회, 주 2회, 매주, 격월 또는 매월 투여될 수 있다. 유효량의 치료제는 증상을 완화시킴으로써 염증 또는 질환 또는 병태의 수준에 영향을 미칠 것이다. 예를 들어, 영향은 질환 또는 병태가 완화되거나 또는 완전히 치료되도록 적어도 10%; 적어도 20%; 적어도 약 30%; 적어도 40%; 적어도 50%이거나; 또는 이를 초과하는 영향 수준을 포함할 수 있다.

[0211] 본 출원의 조성물은 경구로 투여되거나 또는 신체 내로 주사될 수 있다. 경구 사용을 위한 제형은 위장관에서 프로테아제로부터 이중 시토카인 융합 단백질을 추가로 보호하기 위한 화합물 또한 포함할 수 있다. 주사는 일반적으로 근육내, 피하, 피내 또는 정맥내이다. 대안적으로, 적합한 상황에서 관절내 주사 또는 다른 경로가 이용될 수 있다. 비경구로 투여되는 이중 시토카인 융합 단백질은 바람직하게는 제약 담체 및/또는 제약상 허용되는 부형제와 회합되어 단위 투여량의 주사가 가능한 형태 (용액, 현탁액, 에멀션)로 제형화된다. 다른 실시양태에서, 본 출원의 조성물은 이식가능하거나 주사가 가능한 약물 전달 시스템에 의해 환자의 신체 내로 도입될 수 있다.

[0212] **이중 시토카인 융합 단백질의 테스트**

[0213] 원하는 생물학적 기능을 테스트하기 위해 복수의 스크리닝 검정법이 관련 기술 분야의 기술자에게 공지되어 있고 이용가능하다. 한 실시양태에서, 원하는 생물학적 기능은 감소된 항-염증성 반응, 감소된 T-세포 자극, 강화된 T-세포 기능, 강화된 쿠퍼 세포 기능성 및 감소된 비만 세포 탈과립화를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0214] 예를 들어, IL-10 노출이 T 세포 수용체 자극 시 더 많은 IFN $\gamma$ 를 생성시키고 분비하도록 T 세포를 프라이밍한다는 것이 공지되어 있다. 동시에, IL-10 노출은 LPS에 반응하여 단핵구/대식세포로부터 분비되는 TNF $\alpha$ , IL-6 및 다른 염증유발성 시토카인의 분비를 방지한다. 또한 IL-10은 FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> 증식을 억제한다. 한 실시양태에서, 단핵구/대식세포 억제를 최대화하지만 자극성 및 억제성 반응 양쪽 모두를 포함하여 T 세포 효과는 결여된 이중 시토카인 융합 단백질이 양성으로 선택될 것이다. 한 실시양태에서, 증가된 항-염증성 효과를 갖는 이중 시토카인 융합 단백질에 대한 스크리닝이 자가면역, 항-염증성 질환 또는 양쪽 모두의 치료를 위해 양성으로 선택될 것이다. 또 다른 실시양태에서, 쿠퍼 세포 소거를 강화하고 T<sub>reg</sub> 억제가 결여된 이중 시토카인 융합 단백질이 비-알콜성 지방 간염 (NASH) 및/또는 비-알콜성 지방간 질환 (NAFLD)의 치료를 위해 개발되도록 또한 선

택될 것이다. 또 다른 실시양태에서, 자극성 및 억제성 반응 양쪽 모두를 포함하여 T 세포 생물학을 최대화하고 또한 강화된 쿠퍼 세포 소거를 보유하는 이중 시토카인 융합 단백질이 암 치료를 위해 개발되도록 선택될 것이다. 이중 시토카인 융합 단백질을 스크리닝하는 다양한 검증법 및 방법이 공동 계류 중인 미국 특허 10,858,412에서 이전에 기술되었고, 이는 전문이 참고로 포함된다. 미국 출원 16/811,718의 명세서의 39-42면을 참조한다.

[0215] 이중 시토카인을 사용하여 치료 및/또는 예방하는 방법

[0216] 다른 측면에서, 본 개시내용은 악성 질환 또는 병태 또는 암의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 제 1 다중-서브유닛 시토카인 (예를 들어, IL-12 또는 IL-27) 및 제 2 시토카인 (예컨대 IFN알파, IL28, IL29, 및 IL10)을 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질을 치료적 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 악성 질환 또는 병태 또는 암을 치료 및/또는 예방하는 방법에 관한 것이다. 바람직한 실시양태에서, 이중 시토카인 융합 단백질은 IL-12 또는 IL-27 및 IL-10 또는 이의 변이체, 제 2 시토카인으로서의 IFN-알파, IL28, 또는 IL-29 및 이의 변이체를 포함한다. 다른 실시양태에서, 인간 항-에볼라 scFv의 6개의 CDR 영역이 항-Her2/Neu; 항-PDGFR; 항-VEGFR1 및 항-VEGFR2, 항-FGFR; 항-CD19, 항-CD20, 항-CD22, 항-BCMA, 항-PSA, 항-PSMA, 항-HER3; 항-EGFR, 항-CEA, 또는 항-GPC3으로부터의 6개의 CDR로 치환된다. 바람직하게는, 6개의 CDR은 항-EGFR, 또는 항-HER2로부터 취득된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 제 2 시토카인은 IL-28, IL-29, IL-10, 또는 IFN-알파이고, 여기서 IL-10은 DV07 또는 DV06이다.

[0217] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 염증성 질환 또는 병태의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 치료적 유효량의 이중 시토카인 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하는, 염증성 질환 또는 병태를 치료 및/또는 예방하는 방법에 관한 것이다. 바람직한 실시양태에서, 염증성 질환 또는 장애는 크론병, 건선, 및 류마티스 관절염 ("RA")을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0218] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 면역 질환 또는 병태의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 치료적 유효량의 이중 시토카인 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하는, 면역 질환 또는 병태를 치료 및/또는 예방하는 방법에 관한 것이다.

[0219] 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 관련 기술 분야에 널리 공지된 제 2 치료제, 예를 들어, 시토카인, 스테로이드, 화학요법제, 항생제, 항염증제, 또는 방사선으로의 공동 투여 또는 치료 방법을 또한 구상한다. 이는 하기 중 하나 이상과 같지만 이에 제한되지 않는 다른 치료제와의 조합 치료를 포함할 수 있다: 화학요법제, 인터페론-β, 예를 들어, IFNβ-1α 및 IFN-β-1β; 미엘린 염기성 단백질을 모방하는 단백질; 코르티코스테로이드; IL-1 억제제; TNF 억제제; 항-TNF α 항체, 항-IL-6 항체, IL-1βr-Ig 융합물, 항-IL-23 항체, CD40 리간드 및 CD80에 대한 항체; IL-12 및 IL-23의 길항제, 예를 들어, IL-12 및 IL-23의 p40 서브유닛의 길항제 (예를 들어, p40 서브유닛에 대한 억제성 항체); IL-22 길항제; 소형 분자 억제제, 예를 들어, 메토타렉세이트, 레플루노미드, 시롤리무스 (라파마이신) 및 이의 유사체, 예를 들어, CCI-779; Cox-2 및 cPLA2 억제제; NSAID; p38 억제제; TPL-2; Mκ-2; NFκβ 억제제; RAGE 또는 가용성 RAGE; P-셀렉틴 또는 PSGL-1 억제제 (예를 들어, 소형 분자 억제제, 이에 대한 항체, 예를 들어, P-셀렉틴에 대한 항체); 에스트로겐 수용체 베타 (ERB) 효능제 또는 ERB-NFκβ 길항제.

[0220] 추가적으로, 이중 시토카인 융합 단백질과의 투여에 유용한 조합 치료는 키메라 항체, 인간화 항체, 사실상 인간형인 항체, 인간 항체 또는 시험관내에서 생성된 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 예를 들어 포함하는, TNF에 결합하는 TNF 억제제; TNF 수용체의 가용성 단편, 예를 들어, p55 또는 p75 인간 TNF 수용체 또는 이의 유도체, 예를 들어, 75 kd TNFR-IgG (75 kd TNF 수용체-IgG 융합 단백질, 엔브렐(ENBREL)<sup>TM</sup>), p55 kd TNF 수용체-IgG 융합 단백질의 가용성 단편; 및 TNF 효소 길항제, 예를 들어, TNF α 전환 효소 (TACE) 억제제를 포함할 수 있다. 다른 항염증제/항-염증 약물과의 다른 조합 치료는 표준 비-스테로이드성 항염증 약물 (NSAID) 및 시클로-옥시게나제-2 억제제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. NSAID는 아스피린, 세레콕시브, 디클로페낙, 디플루니살, 에토돌락, 이부프로펜, 인도메타신, 케토프로펜, 케토틀락, 나부메톤, 나프록센, 옥사프로진, 피록시캄, 살사레이트, 슐린다, 및/또는 톨메틴을 포함할 수 있다. 본 출원에 따른 조성물에서 사용되는 시클로-옥시게나제-2 억제제는, 예를 들어, 세레콕시브 또는 로페콕시브일 수 있다.

[0221] 이중 시토카인 융합 단백질과 공동-투여되고/거나 공동-제형화될 수 있는 추가적인 치료제는 하기 중 하나 이상을 포함한다: 인터페론-β, 예를 들어, IFN β-1α 및 IFN β-1β; 코팍손(COPAXONE)<sup>®</sup>; 코르티코스테로이드; IL-1 억제제; TNF 길항제 (예를 들어, TNF 수용체의 가용성 단편, 예컨대, p55 또는 p75 인간 TNF 수용체 또는 이의 유도체, 예를 들어, 75 kd TNFR-IgG; CD40 리간드 및 CD80에 대한 항체; 및 IL-12 및/또는 IL-23의 길항

제, 예를 들어, IL-12 및 IL-23의 p40 서브유닛의 길항제 (예를 들어, IL-12 및 IL-23의 p40 서브유닛에 결합하는 억제성 항체); 메토티렉세이트, 레플루노미드, 및 시클리루스 (라파마이신) 또는 이의 유사체, 예를 들어, CCI-779. 다른 치료제는 임피지(Imfimiz) 또는 아테졸리주브(Atezolizumb)를 포함할 수 있다.

[0222] NASH를 치료하기 위해, 예를 들어, 이중 시토카인 융합 단백질을 콜레스테롤 저하제, 예컨대 스타틴 및 비-스타틴 약물과 조합할 수 있다. 이러한 작용제는 심바스타틴, 아토르바스타틴, 로수바스타틴, 로바스타틴, 프라바스타틴, 겐피브로질, 플루바스타틴, 콜레스티라민, 페노피브레이트, 콜레스테롤 흡수 억제제, 담즙산-결합 수지 또는 격리제, 및/또는 마이크로솜 트리글리세리드 전달 단백질 (MTP) 억제제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0223] 본원에 기술된 이중 시토카인 융합 단백질과 공동-투여될 수 있는 대표적인 화학요법제는 하기의 비-포괄적인 목록을 포함할 수 있다: 알킬화제 예컨대 티오테파 및 시클로스포스파미드 (시톡산(CYTOXAN)<sup>TM</sup>); 알킬 술포네이트 예컨대 부숄판, 임프로숄판 및 피포숄판; 아지리딘 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸올멜라민을 포함하는 에틸엔이민 및 메틸아멜라민; 질소 머스타드 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노뎀비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴; 항생제 예컨대 아클라시노마이신, 악티노마이신, 오프라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 각티노마이신, 칼리케아미신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데투루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신, 에피루비신, 예소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사산물 예컨대 메토티렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체 예컨대 데노프테린, 메토티렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토피린, 티아미피린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘, 5-FU; 안드로겐 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스탄올, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항부신제 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 엽산 보충제 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레블린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 히드록시우레아; 웬티난; 로니다민; 미토구아존; 미톡산트론; 모피다몰; 니트라크린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK®; 라족산; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토프로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 (Ara-C); 시클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어, 파클리탁셀 (탁솔 (TAXOL)® (브리스틀-마이어스 스쿼 온콜로지(Bristol-Myers Squibb Oncology), 뉴저지주 프린스턴)) 및 도세탁셀 (탁소테레(Taxotere)<sup>TM</sup> (롱-프랑 로라(Rhone-Poulenc Rorer), 프랑스 앙토니)); 클로람부실; 겐시타빈; 6-티오구아닌; 메르캅토피린; 메토티렉세이트; 백금 유사체 예컨대 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포시드; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다(Xeloda)® (로슈(Roche), 스위스); 이반드로네이트; CPT11; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노산; 에스페라마이신; 카페시타빈; 및 상기 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체, 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하도록 작용하는 항호르몬제 예컨대 타목시펜, 탈록시펜, 아로마타제 억제 4(5)-이미다졸, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤, 및 토레미펜 (파레스톤(Fareston))을 포함하는 항에스트로겐; 및 항안드로겐 예컨대 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드, 및 고세렐린; 및 상기 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체 또한 이러한 정의에 포함된다.

[0224] 실시예

[0225] **실시예 1: IL-12 및 IL-IFN-알파 이중 시토카인 융합 단백질 시험관내 연구**

[0226] 2개의 시토카인을 종양에 표적화하는 것의 시험관내 효과를 평가하기 위해, IL-12 및 IFN-알파를 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질 (구조의 대표도로서 도 2를 참조하고, 이는 "DK α<sup>12</sup>"로 명명됨)을 하기 성분으로부터 구축한다:

- [0227] (a) p35 및 p40 서브유닛이 항-EGFR, 항-HER2, 항-VEGFR1, 항-VEGFR1, 또는 항-CD14 항체 중 어느 하나로부터의 6개의 CDR로 인그래프팅된 인간 항-에볼라 scFv에 말단에 융합됨; 및
- [0228] (b) IFN-알파 (서열식별번호: 9);
- [0229] 여기서, IFN-알파는 항-EGFR, 항-HER2, 항-VEGFR1, 항-VEGFR1, 또는 항-CD14 항체로부터의 6개의 CDR로 인그래프팅된 인간 항-에볼라 scFv의 VH와 VL 사이의 힌지 (또는 링커) 영역에 접합되거나 연결된다.
- [0230]  $DK\alpha^{12}$ 는 NK,  $CD4^+$  및  $CD8^+$  T 세포로부터의 IFN  $\gamma$ 의 유도에 대한 이러한 2개의 시토카인 - IL-12 및 IFN-알파 -의 조합 효과를 평가하기 위해 생성된다.
- [0231]  $DK\alpha^{12}$ 의 기능을 평가하기 위해 자기 비드 양성 선별에 의해 말초혈 단핵구, NK,  $CD4^+$  및  $CD8^+$  T 세포를 단리한 후, 시험관내 테스트에서 평가하였다. 인체 내로 피하 주사된 분자의 노출 주기 중 여러 시점에서 면역학적 기능을 모방하거나 모델링하기 위해 일련의 세포성 시험관내 검정법을 사용하였다. 이러한 검정법이 미국 특허 10,858,412 및 미국 출원 17/110,104에 기술되어 있다.
- [0232] 첫째로, IL-12 단독, IFN-알파 단독의 효과, IL-12 및 IFN-알파의 조합 효과, 및 단일 시토카인 scFv 스캐폴딩 시스템 내로 혼입된 IL-12 (예를 들어, 도 6을 참조하고, 여기서 p35 및 p40 서브유닛이 스캐폴딩 시스템의 말단 단부 상의 IL-10 단량체를 치환한다)를 단핵구/대식세포에 대한  $DK\alpha^{12}$ 의 효과에 비교한다. IFN-알파는 단독으로 및  $DK\alpha^{12}$  내로 혼입되었을 때 IL-10의 LPS 매개 유도를 억제하지만, TRAIL의 방출을 유도한다. IFN-알파로의 처리는 MHC I 및 CD80의 세포 표면 발현을 증가시킨다. IL-12는 단핵구에 효과를 발휘하지 않는다.
- [0233] 둘째로, IL-12 단독, IFN-알파 단독의 효과, IL-12 및 IFN-알파의 조합 효과, 및 단일 시토카인 scFv 스캐폴딩 시스템 내로 혼입된 IL-12 (예를 들어, 도 6을 참조하고, 여기서 p35 및 p40 서브유닛이 스캐폴딩 시스템의 말단 단부 상의 IL-10 단량체를 치환한다)를 T 세포에 대한  $DK\alpha^{12}$ 의 효과에 비교한다.  $CD8^+$  T 세포에 대한 IL-10의 주요 기능, 우세하게는 T 세포 수용체 연관 시에만 방출되는 IFN  $\gamma$ 의 강화를 직접적으로 해명하기 위해 T-세포 검정법이 사용되었다 (Chan, 2015; Mumm J., 2011; Emmerich, 2012). 이러한 동일한 검정법이 다른 시토카인, 예컨대 IL-12에 또한 적용가능하고, T-세포 자극을 확인하는 데 사용될 수 있다. IL-12는 단독으로 또는  $DK\alpha^{12}$  내로 혼입되었을 때 이러한 검정법에서 IFN-알파 분비를 유도한다. IFN-알파로의 T 세포 처리는 IFN-알파 분비를 유도하지 않는다. IFN-알파로의  $CD8^+$  T 세포 처리는 상당한 증식에 이른다. 조합으로 또는  $DK\alpha^{12}$ 에서 커플링되었을 때의 IFN-알파 및 IL-12로의 처리는 T 세포 증식의 증가 및 IFN-알파 분비의 유의한 강화 양쪽 모두에 이른다.
- [0234] **실시예 2: IL-12 및 IFN-알파 이중 시토카인 융합 단백질 생체 내 연구**
- [0235] 안정적으로 발현된 인간 EGFR CT26 무린 결장직장 종양 세포주를 생성시킴으로써 고친화력 IL-10 변이체 (DV07로 명명됨)를 항-EGFR scFv (여기서 DV07이 6개의 인그래프팅된 항-EGFR CDR을 포함하는 인간 항-에볼라 ScFv 스캐폴딩으로부터 획득된 VH 및 VL을 포함하는 scFv에 융합됨; "Degfr:DV07")를 통해 종양 미세환경 내로 표적화하는 것이 PEG-rHuIL-10과 비교했을 때 우수한 항-종양 기능을 나타내는 것으로 이전에 나타났다. 미국 특허 10,858,412를 참조한다. 동일한 생체 내 종양 연구를 사용하여, 인간 EGFR을 발현하는 CT26 세포 무린 종양 세포주에서  $DK\alpha^{12}$ 를 평가하고 Degfr:DV07에 비교한다.
- [0236] 평균 100 mm<sup>3</sup>의 종양이 있는 CT26 (hEGFR<sup>+</sup>) 종양 보유 B 세포 녹아웃 Balb/C 마우스를 표 5에 제시된 바와 같이 제공되는 테스트 물품, 용량 및 빈도로 처리하였다. 모든 테스트 물품을 목덜미에 피하 투여하였다. 모든 물품을 15일 동안 매일 투약하였다.

표 5: 테스트 물질, 용량 및 빈도

No.	테스트 물질	용량	빈도
1	비히클	100 $\mu$ l (대조군)	매일
2	Degfr:IL-12	1 mg/kg	매일
3	DK $\alpha$ <sup>12</sup>	1 mg/kg	매일
4	DK $\alpha$ <sup>12</sup>	2 mg/kg	매일
5	DK $\alpha$ <sup>12</sup>	4 mg/kg	매일

[0237]

[0238] 전자 캘리퍼로 3일마다 종양의 길이 및 너비를 측정하였고, 종양 부피를 계산하였다 ( $(L \times W^2)/2$ ). 이러한 실시예에서, 용어 "Degfr:DV07"은 인간 EGFR에 표적화된 DV07이고; DK  $\alpha^{12}$  egfr은 "DK  $\alpha^{12}$ "로 약칭되고, 세특시맵 CDR 그래프팅된 항-에볼라 scFv 스캐폴드를 통해 IL-12와 커플링된 인간 IFN-알파이다.

[0239]

**방법**

[0240] 시험관내 세포 배양: CT26<sup>(hEGFR+)</sup> 종양 세포 (ATCC)를 완전 RPMI, 10% FCS, 및 10 ug/mL 퓨로마이신에서 70% 전면성장까지 성장시킨다. 세포를 이식 전에 시험관내에서 3회 이하의 계대 배양 동안 계대시킨다. 아큐타제 (Accutase) (바이오레전드(Biolegend))를 사용하여 세포를 세포 배양 플레이트로부터 제거하고, 4°C에서 400 g 로 10분 동안 스피닝하면서 완전 RPMI에서 세정한다.

[0241] 종양 이식: 종양 세포를 50% 성장 인자 감소 매트릭셀(Matrigel), 50-100% RPMI의 존재 또는 부재 하에 100  $\mu$  L로 1-2x10<sup>5</sup>개의 세포/마우스로 B 세포 녹아웃 또는 야생형 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하로 이식한다.

[0242]

**결과**

[0243] 종양 성장에 대한 Degfr:IL-12 및 DK  $\alpha^{12}$  의 비교: 안정적으로 형질감염된 종양 세포 상에 존재하는 EGFR에 결합하는 것을 통해 IL-12를 종양 미세환경으로 표적화하는 것이 효과적인 것으로 이전에 나타났다. 미국 특허 10,858,412를 참조한다. 동일한 종양 시스템을 사용하여, Degfr:IL-12 대 DK  $\alpha^{12}$ 를 비교한다.

[0244] 종양을 주 3회 측정한다 (표 2). 75 mm<sup>3</sup> CT26<sup>(hEGFR+)</sup> 종양이 있는 암컷 Balb/C B 세포 녹아웃 마우스를 테스트 물질 및 다양한 투약 빈도로 피하 처리한다. 이러한 실험을 위해, CT26<sup>(hEGFR+)</sup> 세포를 0-50% 성장 인자 감소 매트릭셀에서 1-2x10<sup>5</sup>개의 세포로 이식하여 종양 항원에 대한 마우스의 면역화를 제한한다.

[0245] 1 mg/kg의 Degfr:IL-12의 항-종양 효과를 동일한 용량의 DK  $\alpha^{12}$ , 뿐만 아니라 2 및 4 mg/kg 용량과 비교한다.

[0246] DK  $\alpha^{12}$  의 안전성 평가: DK  $\alpha^{12}$  투약의 안전성을 테스트하기 위해, DK  $\alpha^{12}$ 로 처리된 종양 보유 마우스의 체중을 평가한다.

[0247] 생존에 대한 DK  $\alpha^{12}$  투약의 효과: DK  $\alpha^{12}$ 에 대한 CT26<sup>(hEGFR+)</sup> 종양 보유 마우스의 생존가능성을 평가한다.

**실시예 3: IL-27 및 IL-28 또는 IL-29 이중 시토카인 융합 단백질**

[0249] 2개의 시토카인을 종양에 표적화하는 것의 시험관내 효과를 평가하기 위해, (1) IL-27 및 IL-28 (구조의 대표도로서 도 4를 참조하고, "DK28<sup>27</sup>"로 명명됨) 및 (2) IL-27 및 IL-29 (구조의 대표도로서 도 5를 참조하고, "DK29<sup>27</sup>"로 명명됨)를 포함하는 이중 시토카인 융합 단백질을 하기 성분으로부터 구축한다:

[0250] DK28<sup>27</sup>:

[0251] (a) p28 및 EB13 서브유닛이 항-EGFR, 항-HER2, 항-VEGFR1, 항-VEGFR1, 또는 항-CD14 항체 중 어느 하나로부터의 6개의 CDR로 인그래프팅된 인간 항-에볼라 scFv에 말단에 융합됨; 및

[0252] (b) IL-28 (서열식별번호: 11);

[0253] 여기서 IL-28은 항-EGFR, 항-HER2, 항-VEGFR1, 항-VEGFR1, 또는 항-CD14 항체로부터의 6개의 CDR로 인그래프팅된 인간 항-에볼라 scFv의 VH와 VL 사이의 힌지 (또는 링커) 영역에 접합되거나 연결된다.

- [0254] DK29<sup>27</sup> :
- [0255] (a) p28 및 EB13 서브유닛이 항-EGFR, 항-HER2, 항-VEGFR1, 항-VEGFR1, 또는 항-CD14 항체체 중 어느 하나로부터의 6개의 CDR로 인그래프팅된 인간 항-에볼라 scFv에 말단에 융합됨; 및
- [0256] (b) IL-29 (서열식별번호: 16);
- [0257] 여기서 IL-29는 항-EGFR, 항-HER2, 항-VEGFR1, 항-VEGFR1, 또는 항-CD14 항체로부터의 6개의 CDR로 인그래프팅된 인간 항-에볼라 scFv의 VH와 VL 사이의 힌지 (또는 링커) 영역에 접합되거나 연결된다.
- [0258] DK28<sup>27</sup> 및 DK29<sup>27</sup> 양쪽 모두 NK, CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포로부터의 IFN $\gamma$ 의 유도에 대한 이중 시토카인 - IL-27 & IL-28 및 IL-28 & IL-29 -의 조합 효과를 평가하기 위해 생성된다. 단핵구/대식세포 양쪽 모두, T-세포 (CD4+ 및 CD8+), 및 NK 세포에서 이러한 이중 시토카인으로 상기 (실시예 1)에서 기술된 절차 및 검정법을 반복한다.
- [0259] **실시예 4: IL-27 & IL-28 및 IL-27 & IL-29 이중 시토카인 융합 단백질 생체 내 연구**
- [0260] 동일한 생체 내 중앙 연구를 사용하여, 인간 EGFR을 발현하는 CT26 세포 무린 중앙 세포주에서 DK28<sup>27</sup> 및 DK29<sup>27</sup> 양쪽 모두를 평가하고 단일 표적화 시토카인에 비교한다. 이러한 이중 시토카인으로 상기 (실시예 2)에서 기술된 절차 및 검정법을 반복한다.
- [0261] **실시예 5: CD19 BiTE와 조합된 시험관내 세포 사멸 검정법에서의 IL-12 & IL-10 이중 시토카인 융합 단백질**
- [0262] 이러한 연구는 CD19 이중특이적 T-세포 연관체 (CD19 BiTE)와 조합되었을 때 EGFR을 표적화하는 CDR로 인그래프팅된 항-에볼라 스캐폴딩 상으로 IL-12 및 IL-10 (DV07)를 조합하는 분자 (내부적으로 DK12<sup>10</sup>EGFR로 지정됨)에서 링커 길이가 CD8+ T 세포의 세포독성 기능에 대한 효과가 있는지 여부를 평가하기 위해 디자인되었다.
- [0263] 제조사가 제안한 프로토콜 (밀테니이(Miltenyi))에 따라 항-CD8+ 자기 비드 단리를 통해 신선한 공여자 류코팩(Leukopak)으로부터 CD8+ T 세포를 단리하였다.
- [0264] 단리된 CD8+ T 세포를 2x10<sup>6</sup>개의 세포/웰로 플레이팅하고, 2일 동안 AIMV 내의 다양한 농도 (0 또는 200 ng/mL)의 DK12<sup>10</sup>EGFR에 노출시켰다. 다양한 농도의 IL10 및 IL-12 측면 양쪽 모두에 표준 링커가 있는 DK12<sup>10</sup>EGFR 또는 연장된 링커가 있는 DK12<sup>10</sup>EGFR에 2일 동안 노출시킨 후, CD8+ T 세포를 수확하고, 계수하고, 세정하고, 최종적으로 상응하는 농도의 DK12<sup>10</sup>EGFR에 재현탁시켰다. 동시에, 녹색 형광 단백질 (GFP)을 구성적으로 발현하는 라지(Raji) 세포를 계수하고, 세정하고, 다양한 농도 (0 및 0.1 (테이터는 제시되지 않음), 또는 1 ng/mL)의 CD19 BiTE에 재현탁시켰다. 그 후, CD8+ 세포 (이펙터) 및 라지-GFP 세포 (표적)를 10:1 이펙터 대 표적 비로 조합한다. (1) 처리 없음, (2) CD19 BiTE 단독, (3) DK2<sup>10</sup>EGFR 단독, 또는 (4) CD19 BiTE 및 DK2<sup>10</sup>EGFR의 조합에 노출된 이펙터 및 표적 세포의 혼합물을 인큐사이트(Incucyte)를 사용하여 2일에 걸쳐 모니터링하였다. 2일 노출 후, 세포독성의 지표로서 GFP 소멸 백분율을 측정한다.
- [0265] CD19 BiTE, 일명 블리나투모맙(Blinatumomab)은 현재 유일한 FDA 승인 BiTE 요법이다. 본 발명가들은 CD19 BiTE를 IL10 및 IL2를 포함하는 다른 이중 시토카인 융합 단백질 (내부적으로 DK210으로 명명됨)과 조합하는 것이 CD19 BiTE 세포독성을 강화한다는 것을 나타냈다 (테이터는 제공되지 않음). 여기서, 본 발명가들은 동일한 검정법 시스템을 사용하여, CD19 BiTE를 (1) 표준 링커 (예를 들어, 서열식별번호: 46)가 있는 DK12<sup>10</sup>EGFR와 조합하는 것이 (2) 연장된 링커 (예를 들어, 서열식별번호: 44)가 있는 DK12<sup>10</sup>EGFR가 정상적인 건강한 인간 공여자에서 유래된 CD8+ T 세포가 표적 암 세포를 세포용해하도록 구동시킬 것보다 개선될 것인지 여부를 결정한다. 도 9 및 10을 참조한다.
- [0266] 표준 링커가 있는 DK12<sup>10</sup>EGFR 대 연장된 링커가 있는 DK12<sup>10</sup>EGFR 양쪽 모두와 함께 CD19 BiTE에 반응하는 건강한 인간 공여자에서 유래된 CD8+ T 세포의 평가는 연장된 링커가 2개의 양식을 조합하는 전반적인 능력을 개선하여 표적 라지 세포의 CD8+ T 세포 세포용해를 강화한다는 것을 시사한다.
- [0267] 이러한 서면 설명은 예를 사용하여, 바람직한 실시양태를 포함하는 본 개시내용의 측면들을 개시하고, 또한 관련 기술 분야의 임의의 기술자가 임의의 장치 또는 시스템을 제조 및 사용하고 임의의 통합된 방법을 수행하는 것을 포함하여 이의 측면들을 실행할 수 있게 한다. 이러한 측면들의 특허가능한 범주는 청구범위에 의해 정의

되고, 관련 기술 분야의 기술자에게 발생하는 다른 예를 포함할 수 있다. 청구범위의 문자 그대로의 언어와 상이하지 않은 구조적 요소를 갖거나, 또는 청구범위의 문자 그대로의 언어와 실질적으로 상이하지 않은 등가의 구조적 요소를 포함한다면, 이같은 다른 예들은 청구범위의 범주 내이도록 의도된다. 기술된 다양한 실시양태로부터의 측면들, 뿐만 아니라 각각의 이같은 측면에 대한 다른 공지된 등가물은 본 출원의 원리에 따라 추가적인 실시양태 및 기술을 구축하기 위해 관련 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 혼합되고 매칭될 수 있다.

[0268]

참고문헌

Assier, E. (2004). NK Cells and Polymorphonuclear Neutrophils Are Both Critical for IL-2-Induced Pulmonary Vascular Leak Syndrome. *Journal of Immunology*.

Athie-Morales, V. (2004). Sustained IL-12 Signaling Is Required for Th1 Development. *Journal of Immunology*.

Atkins, M. (1997). Phase I evaluation of intravenous recombinant human interleukin 12 in patients with advanced malignancies. *Clinical Cancer Research*.

Balce, D. R. (2011). Alternative activation of macrophages by IL-4 enhances the proteolytic capacity of their phagosomes through synergistic mechanisms. *Blood*.

Baluna, R. (1997). Vascular leak syndrome a side effect of immunotherapy. *Immunopharmacology*.

Bentebibe, S.-E. (2019). A First-in-Human Study and Biomarker Analysis of NKTR-214, a Novel IL2R $\alpha$  Biased Cytokine, in Patients with Advanced or Metastatic Solid Tumors. *Cancer Discovery*.

Brunda, M. J. (1993). Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *Journal of Experimental Medicine*.

Buchbinder, E. I. (2019). Therapy with high-dose Interleukin-2 (HD IL-2) in metastatic melanoma and renal cell carcinoma following PD1 or PDL1 inhibition. *Journal of Immunotherapy for Cancer*.

Chan, I. H. (2015). The Potentiation of IFN $\gamma$  and Induction of Cytotoxic Proteins by Pegylated IL-10 in Human CD8 T cells. *Journal of Interferon and Cytokine Research*.

Chen, X. (2018). A novel human IL-2 mutein with minimal systemic toxicity exerts greater antitumor efficacy than wild-type IL-2. *Cell Death and Disease*.

Chinen, T. (2016). An essential role for IL-2 receptor in regulatory T cell function. *Nature Immunology*.

Chowdhury, F. Z. (2011). IL-12 selectively programs effector pathways that are stably expressed in human CD8 $^{+}$  effector memory T cells in vivo. *Blood*.

Coma, G. (2006). Treatment of monocytes with interleukin (IL)-12 plus IL-18 stimulates survival, differentiation and the production of CXC chemokine ligands (CXCL8, CXCL9 and CXCL10). *Clinical and Experimental Immunology*.

Davis, I. D. (2009). A Phase I and Pharmacokinetic Study of Subcutaneously-Administered Recombinant Human Interleukin-4 (rhIL-4) in Patients with Advanced Cancer. *Growth Factors*.

Emmerich, J. (2012). IL-10 Directly Activates and Expands Tumor-Resident CD8 $^{+}$  T Cells without De Novo Infiltration from Secondary Lymphoid Organs. *Cancer Research*, 3570-3581.

Fedorak, R. (2000). Recombinant Human Interleukin 10 in the Treatment of Patients with Mild to Moderately Active Crohn's Disease. *Gastroenterology*, 1473-1482.

Gessani, S. (2014). Type I Interferons as Regulators of Human Antigen Presenting Cell Functions. *Toxins*.

Gooch, J. L. (1998). Interleukin 4 Inhibits Growth and Induces Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Research*.

Greve, J. M. (2000). *USA Patent No. 6028176*.

Groux, H. (1998). Inhibitory and Stimulatory Effects of IL-10 on Human CD8 $^{+}$  T cells. *The Journal of Immunology*.

[0269]

- Guan, H. (2007). Blockade of Hyaluronan Inhibits IL-2 Induced Vascular Leak Syndrome and Maintains Effectiveness of IL-2 Treatment in Metastatic Melanoma. *Journal of Immunology*.
- Hart, P. H. (1989). Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: Suppression of human monocyte tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 1, and prostaglandin E2. *PNAS*.
- Hart, P. H. (1991). IL-4 suppresses IL-1, TNF- $\alpha$  and PGE2 production by human peritoneal macrophages. *Immunology*.
- Henry, C. J. (2008). IL-12 Produced by Dendritic Cells Augments CD8+ T cell Activation through the Production of the Chemokines CCL1 and CCL17. *Journal of Immunology*.
- Herpen, C. M. (2004). Intratumoral Administration of Recombinant Human Interleukin 12 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients Elicits a T-Helper 1 Profile in the Locoregional Lymph Nodes. *Clinical Cancer Research*.
- Hiroishi, K. (2000). IFN- $\alpha$ -Expressing Tumor Cells Enhance Generation and Promote Survival of Tumor-Specific CTLs. *Journal of Immunology*.
- How, J. (2020). Use of Interferon Alfa in the Treatment of Myeloproliferative Neoplasms: Perspectives and Review of the Literature. *Cancers*.
- Jiang, T. (2016). Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*.
- Kirchner, G. I. (1998). Pharmacokinetics of human Interleukin-2 in advanced renal cell carcinoma patients following subcutaneous application. *British Journal Clinical Pharmacology*.
- Kolumam, G. A. (2005). Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *Journal of Experimental Medicine*.
- Lee, H. L. (2016). Tumor growth suppressive effect of IL-4 through p21-mediated activation of STAT6 in IL-4R $\alpha$  overexpressed melanoma models. *Oncotarget*.
- Li, R. (2013). Expression of recombinant human IL-4 in *Pichia pastoris* and relationship between its glycosylation and biological function. *Protein Expression and Purification*.
- Li, S. (2005). Administration Route- and Immune Cell Activation-Dependent Tumor Eradication by IL12 Electrotransfer. *Molecular Therapy*.
- Lu, C. (2019). Type I interferon suppresses tumor growth through activating the STAT3-granzyme B pathway in tumor-infiltrating cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Immunotherapy of Cancer*.
- Lyrdal, D. (2009). Metastatic renal cell carcinoma treated with PEG-interferon alfa 2b. *Acta Oncology*.
- Malefyt, R. d. (1991). Interleukin 10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *JEM*.
- Malefyt, R. d. (1991). Interleukin 10 Inhibits Cytokine Synthesis by Human Monocytes An Autoregulatory Role of IL-10 Produced by Monocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 1209-1220.
- Martinović, K. M. (2015). Favorable in vitro effects of combined IL-12 and IL-18 treatment on NK cell cytotoxicity and CD25 receptor expression in metastatic melanoma patients. *Journal of Translational Medicine*.
- McGuirk, P. (2000). A Regulatory Role for Interleukin 4 in Differential Inflammatory Responses in the Lung following Infection of Mice Primed with Th1- or Th2-Inducing Pertussis Vaccines. *Infection and Immunity*.
- Medrano, R. F. (2017). Immunomodulatory and antitumor effects of type I interferons and their application in cancer therapy. *Oncotarget*.

[0270]

- Moore, K. W. (2001). Interleukin 10 and the Interleukin 10 Receptor. *Annual Reviews Immunology*.
- Mossman, T. (1989). TH1 AND TH2 CELLS: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annual Reviews Immunology*.
- Mumm, J. (2011). IL-10 induces IFN $\gamma$ -Mediated Tumor Immunity. *Cancer Cell*.
- Mumm, J. B. (2011). IL-10 Elicits IFN $\gamma$ -Dependent Tumor Immune Surveillance. *Cancer Cell*.
- Naing, A. (2016). Safety, Antitumor Activity, and Immune Activation of Pegylated Recombinant Human Interleukin-10 (AM0010) in Patients With Advanced Solid Tumors. *Journal of Clinical Oncology*.
- Naing, A. (2018). PEGylated IL-10 (Pegilodecakin) Induces Systemic Immune Activation, CD8+ T cell Invigoration and Polyclonal T cell Expansion in Cancer Patients. *Cancer Cell*.
- Nemunaitis, J. (2005). Vaccines in Cancer: GVAX® a GM-CSF Gene Vaccine. *Vaccine*.
- Padovan, E. (2002). IFN- $\alpha$ 2a induces IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 production in monocyte-derived dendritic cells and enhances their capacity to attract and stimulate CD8 effector T cells. *Journal of Leukocyte Biology*.
- Parihar, R. (2002). IL-12 enhances the natural killer cell cytokine response to Ab-coated tumor cells. *Journal of Clinical Investigation*.
- Ryan, J. J. (1997). Interleukin-4 and its receptor: Essential mediators of the allergic response. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*.
- Sabel, M. S. (2004). *Annals of Surgical Oncology*.
- Schreiber, S. (2000). Safety and Efficacy of Recombinant Human Interleukin 10 in Chronic Active Crohn's Disease. *Gastroenterology*, 1461-1472.
- Scott, M. J. (2006). Interleukin-10 suppresses natural killer cell but not natural killer T cell activation during bacterial infection. *Cytokine*.
- Simmons, D. P. (2012). Type I interferon drives a distinctive dendritic cell maturation phenotype that allows continued class II MHC synthesis and antigen processing. *Journal of Immunology*.
- Sivakumar, P. V. (2013). Comparison of Vascular Leak Syndrome in Mice Treated with IL21 or IL2. *Comparative Medicine*.
- Spigel, D. R. (2020). Randomized phase II study of pembrolizumab (P) alone versus pegilodecakin (PEG) in combination with P as first-line (1L) therapy in patients (pts) with stage IV non-small cell lung cancer (NSCLC) with high PD-L1 expression (CYPRESS 1). ASCO, (p. 9563).
- Steinke, J. W. (2001). Th2 cytokines and asthma Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respiratory Research*.
- Sunela, K. L. (2009). A phase-II study of combination of pegylated interferon alfa-2a and capecitabine in locally advanced or metastatic renal cell cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*.
- Vacaflares, A. (2017). Pretreatment of activated human CD8 T cells with IL-12 leads to enhanced TCR-induced signaling and cytokine production. *Molecular Immunology*.
- Vacaflares1, A. (2016). Exposure of Human CD4 T Cells to IL-12 Results in Enhanced TCR-Induced Cytokine Production, Altered TCR Signaling, and Increased Oxidative Metabolism. *PLOS One*.

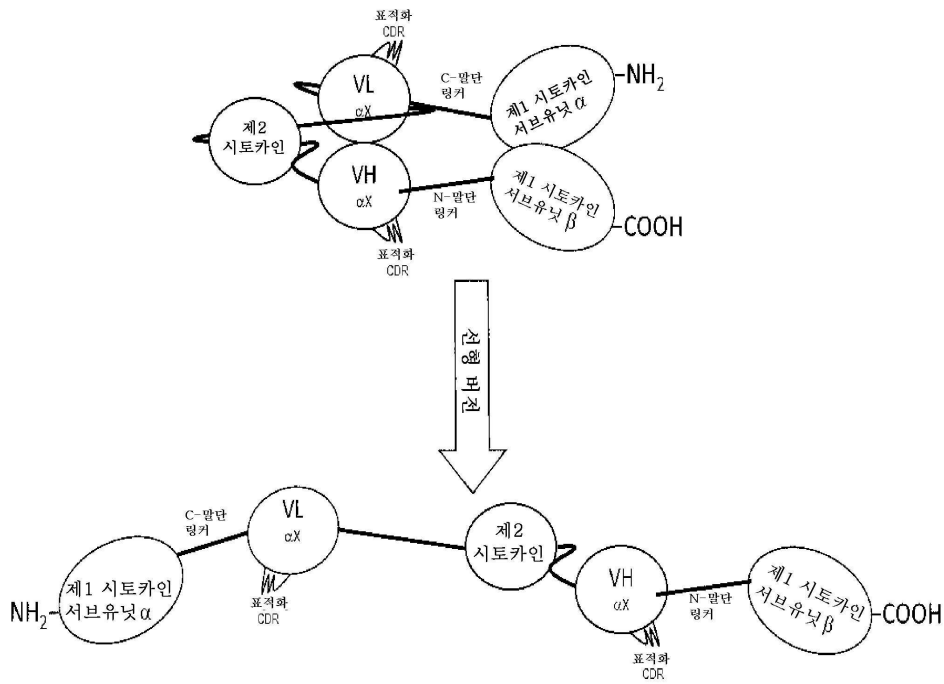
[0271]

- Varin, A. (2010). Alternative activation of macrophages by IL-4 impairs phagocytosis of pathogens but potentiates microbial-induced signalling and cytokine secretion. *Blood*.
- Vidarthi, A. (2018). TLR-3 Stimulation Skews M2 Macrophages to M1 Through IFN- $\alpha\beta$  Signaling and Restricts Tumor Progression. *Frontiers In Immunology*.
- Woodward, E. A. (2012). The anti-inflammatory actions of IL-4 in human monocytes are not mediated by IL-10, RP105 or the kinase activity of RIPK2. *Cytokine*.
- Yoo, J. K. (2002). IL-12 Provides Proliferation and Survival Signals to Murine CD4+ T Cells Through Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway. *Journal of Immunology*.
- Zhang, C. (2008). Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D. *Human Immunology*.

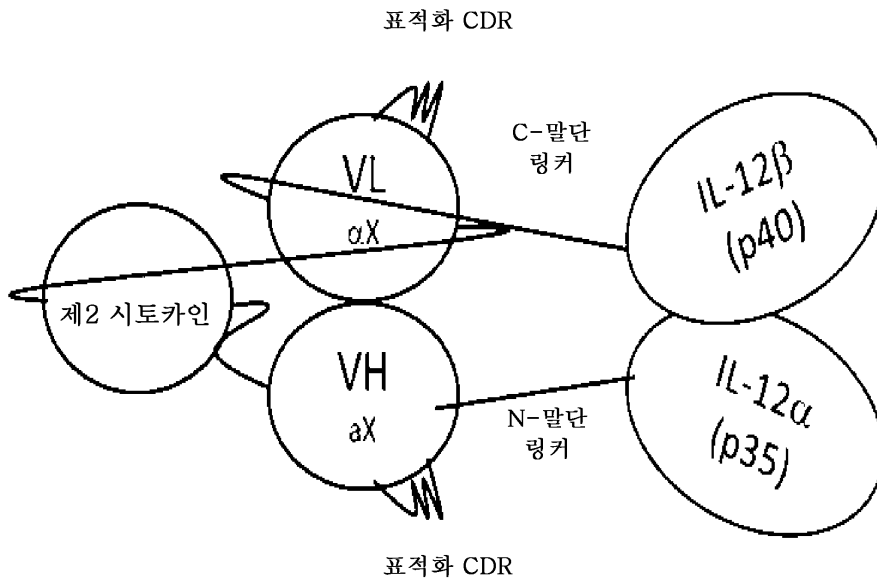
[0272]

도면

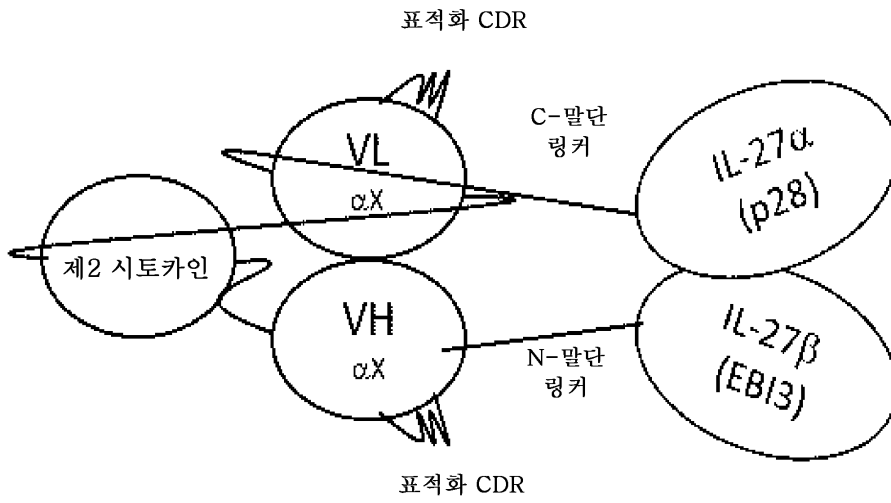
도면1



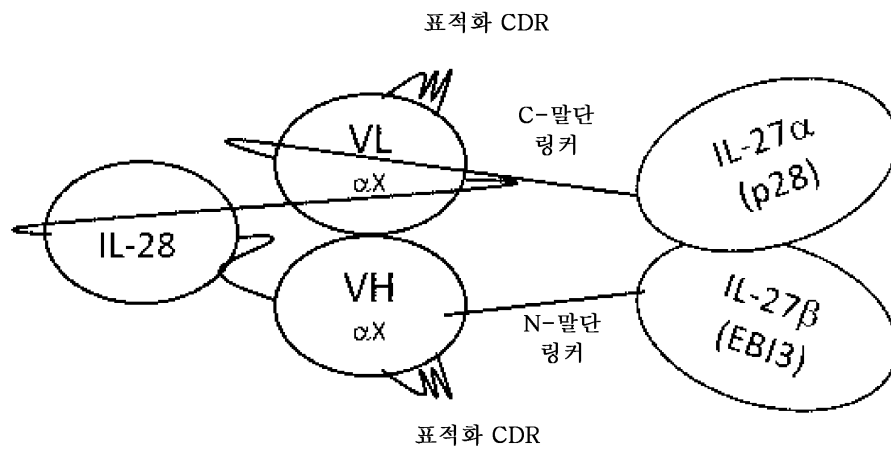
도면2



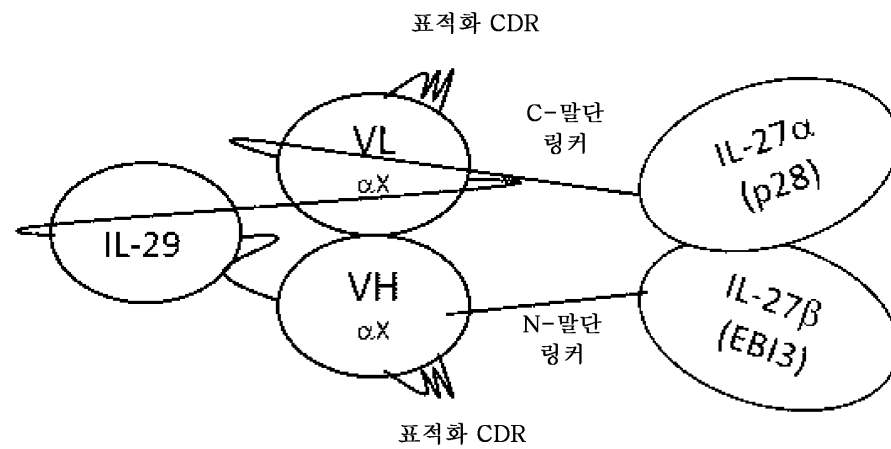
도면3



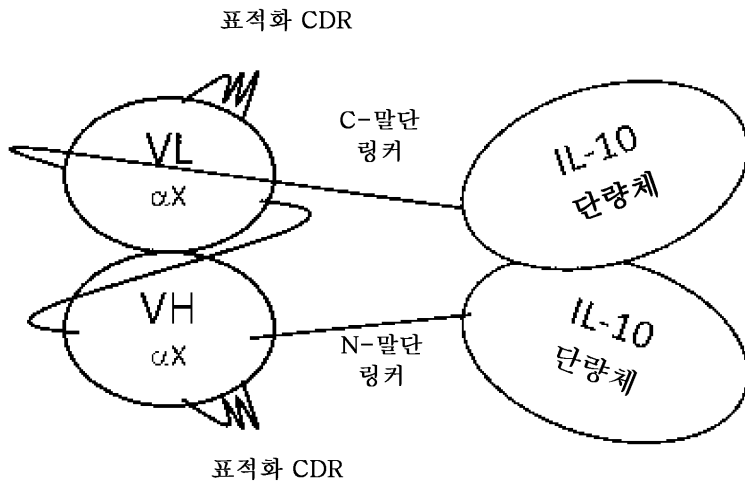
도면4



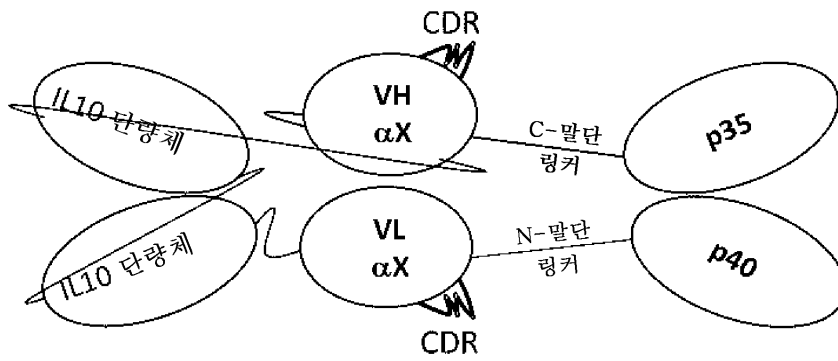
도면5



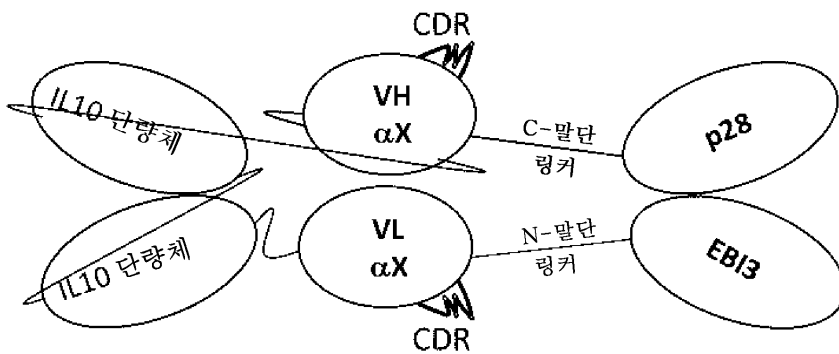
도면6



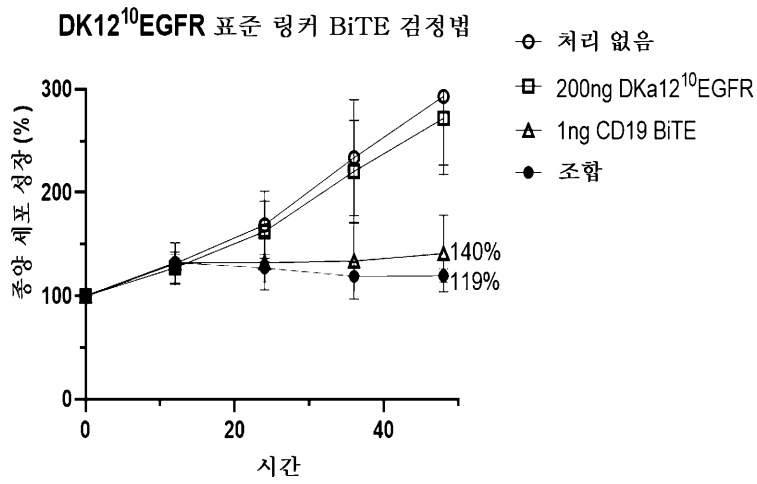
도면7



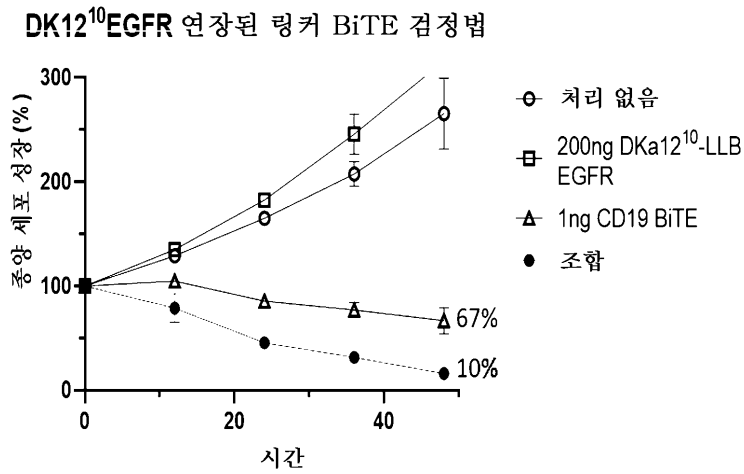
도면8



도면9



도면10



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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