



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0028150  
(43) 공개일자 2021년03월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/715 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) C07K 1/14 (2006.01)  
C07K 14/54 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 14/7155 (2013.01)  
A61K 38/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7034734  
(22) 출원일자(국제) 2019년05월03일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2020년12월02일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/030594  
(87) 국제공개번호 WO 2019/213517  
국제공개일자 2019년11월07일  
(30) 우선권주장  
201810420739.6 2018년05월04일 중국(CN)

- (71) 출원인  
이문 타켓팅 인코퍼레이티드  
미국, 텍사스 75225, 댈러스, 그린브리에 드라이브 4305
- (72) 발명자  
푸, 양-신  
미국, 텍사스 75225, 댈러스, 그린브리에 드라이브 4305  
펑, 후아  
중국, 차오양 디스트릭트, 다 툰 로드 15, #6923  
구오, 징야  
중국, 차오양 디스트릭트, 다 툰 로드 15, #6923
- (74) 대리인  
정영수

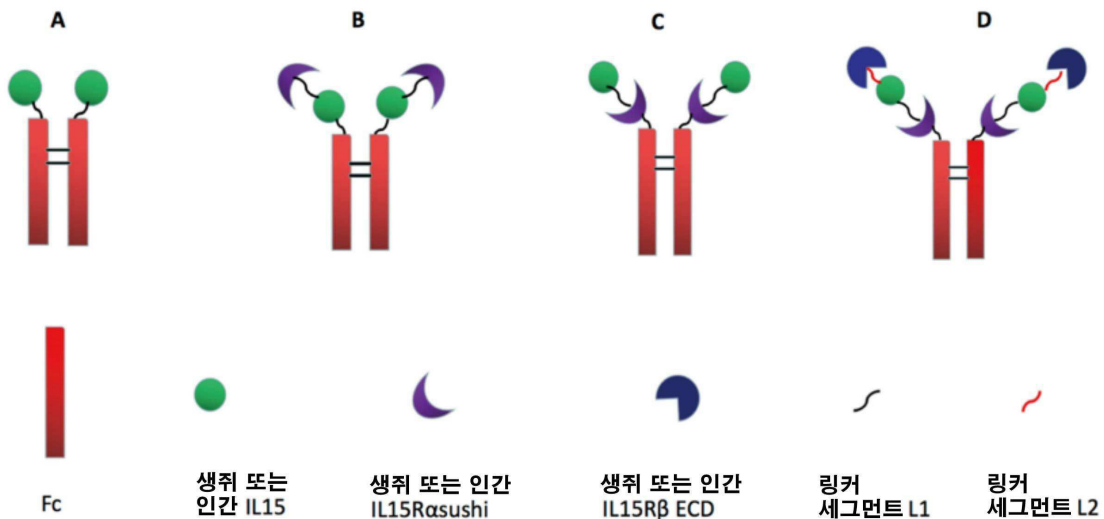
전체 청구항 수 : 총 50 항

(54) 발명의 명칭 인터루킨 15 융합 단백질, 이의 조성물 및 치료 방법

(57) 요약

본 발명은 다양한 질병 및 장애(예를 들어, 과다 형성, 고형 종양 또는 조혈 악성 종양)를 치료하는데 유용한 인터루킨 15 및 프로드러그의 신규 융합 단백질, 및 그의 조성물 및 제조 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A61P 35/00* (2018.01)

*C07K 1/14* (2013.01)

*C07K 14/5443* (2013.01)

*C12N 15/62* (2013.01)

*C07K 2319/30* (2013.01)

*C07K 2319/50* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

융합 단백질로서,

제 1 구조 유닛: 인터루킨 15 수용체(IL15R)의 서브 유닛 또는 이의 단편;

제 2 구조 유닛: 활성 인터루킨 15(IL15);

제 3 구조 유닛: 융합 단백질의 C-말단에 위치하는 항체 Fc 단편; 및

상기 제 1, 제 2 및 제 3 구조 유닛을 공유적으로 연결하는 제 1 링커 세그먼트;

를 포함하고,

여기서, 상기 제 1 구조 유닛은 융합 단백질의 N-말단에 있고, 상기 제 2 구조 유닛은 상기 제 1 구조 유닛과 상기 제 3 구조 유닛 사이에 위치하는 융합 단백질.

#### 청구항 2

융합 단백질로서,

제 1 구조 유닛: 인터루킨 15 수용체(IL15R)의 서브 유닛 또는 이의 단편;

제 2 구조 유닛: 활성 IL15;

제 3 구조 유닛: 융합 단백질의 C-말단에 위치하는 항체 Fc 단편; 및

상기 제 1, 제 2 및 제 3 구조 유닛을 공유적으로 연결하는 링커 세그먼트(L1);

를 포함하고,

여기서, 상기 제 2 구조 유닛은 융합 단백질의 N-말단에 있고, 상기 제 1 구조 유닛은 상기 제 2 구조 유닛과 상기 제 3 구조 유닛 사이에 위치하는 융합 단백질.

#### 청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 IL15R의 서브 유닛은  $\alpha$  서브 유닛,  $\beta$  서브 유닛 및  $\gamma$  서브 유닛으로부터 선택되는 융합 단백질.

#### 청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 IL15R의 서브 유닛은  $\alpha$  서브 유닛인 융합 단백질.

#### 청구항 5

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단편은 서열 번호 4에 제시된 아미노산 서열을 갖는, IL15R의  $\alpha$  서브 유닛의 스시 도메인인 융합 단백질.

#### 청구항 6

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL15는 인간 또는 뮤린 IL15인 융합 단백질.

#### 청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 IL15는 생쥐 IL15인 융합 단백질.

#### 청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 생쥐 IL15는 서열 번호 1에 제시된 아미노산 서열을 갖는 융합 단백질.

**청구항 9**

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 Fc 단편은 인간 Fc 단편을 포함하는 융합 단백질.

**청구항 10**

제 9 항에 있어서, 상기 항체 Fc 단편은 서열 번호 3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 인간 IgG1-Fc를 포함하는 융합 단백질.

**청구항 11**

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 링커 세그먼트(L1)는 다수의 GGS를 포함하는 융합 단백질.

**청구항 12**

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제 3 구조 유닛에 연결된 제 1 링커 세그먼트는 서열 번호 9에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질.

**청구항 13**

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 구조 유닛을 연결하는 링커 세그먼트(L1)는 서열 번호 8에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질.

**청구항 14**

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서,

융합 단백질의 N-말단에 위치하는 제4 구조 유닛: IL15 수용체  $\beta$  서브 유닛(RB)의 세포 외 도메인; 및

상기 제4 구조 유닛과 융합 단백질의 나머지 구조 유닛을 공유적으로 연결하는 링커 세그먼트(L2);

를 더 포함하고,

여기서, 상기 제 1 구조 유닛은 상기 제 4 구조 유닛의 C-말단에 공유적으로 연결되고, 상기 제 2 구조 유닛은 상기 제 1 구조 유닛과 상기 제 3 구조 유닛 사이에 위치하고,

상기 링커 세그먼트(L2)는 종양 미세 환경에서 특이적으로 발현되는 단백질 분해 효소에 의해 인식 및 가수 분해될 수 있는 융합 단백질.

**청구항 15**

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서,

융합 단백질의 N-말단에 위치하는 제4 구조 유닛: IL15 수용체  $\beta$  서브 유닛(RB)의 세포 외 도메인; 및

상기 제4 구조 유닛과 융합 단백질의 나머지 구조 유닛을 공유적으로 연결하는 링커 세그먼트(L2);

를 더 포함하고,

여기서, 상기 제 2 구조 유닛은 상기 제 4 구조 유닛의 C-말단에 공유적으로 연결되고, 상기 제 1 구조 유닛은 상기 제 2 구조 유닛과 상기 제 3 구조 유닛 사이에 위치하고,

상기 링커 세그먼트(L2)는 종양 미세 환경에서 특이적으로 발현되는 단백질 분해 효소에 의해 인식 및 가수 분해될 수 있는 융합 단백질.

**청구항 16**

제 14 항 또는 제 15 항에 있어서, 상기 RB의 아미노산 서열은 서열 번호 6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 융합 단백질.

**청구항 17**

제 14 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 미세 환경에서 특이적으로 발현되는 단백질 분해 효소는

매트릭스 메탈로프로테이나제인 융합 단백질.

**청구항 18**

제 17 항에 있어서, 상기 매트릭스 메탈로프로테이나제는 매트릭스 메탈로프로테이나제 9(MMP9)인 융합 단백질.

**청구항 19**

제 17 항에 있어서, 상기 매트릭스 메탈로프로테이나제는 매트릭스 메탈로프로테이나제 14(MMP14)인 융합 단백질.

**청구항 20**

제 14 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 링커 세그먼트(L2)는 서열 번호 10-23에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질.

**청구항 21**

제 1 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는 동종 이량체 또는 이종 이량체 단백질.

**청구항 22**

제 20 항에 있어서, RA-IL15-Fc의 모노머: IL15 수용체  $\alpha$  서브 유닛의 스시 도메인, 링커 세그먼트(L1), 뮤린 IL15, 링커 세그먼트(L2), 인간 IgG1 Fc의 융합 단백질을 포함하며, 서열 번호 24에 제시된 아미노산 서열을 갖는 동종 이량체 또는 이종 이량체 단백질.

**청구항 23**

제 20 항에 있어서, IL15-RA-Fc의 모노머: 뮤린 IL15, 링커 세그먼트(L1), IL15 수용체  $\alpha$  서브 유닛의 스시 도메인, 링커 세그먼트(L1), 인간 IgG1 Fc의 융합 단백질을 포함하며, 서열 번호 26에 제시된 아미노산 서열을 갖는 동종 이량체 또는 이종 이량체 단백질.

**청구항 24**

제 20 항에 있어서, IL15-RA-Fc의 모노머: 인간 IL15, 링커 세그먼트(L1), IL15 수용체  $\alpha$  서브 유닛의 스시 도메인, 링커 세그먼트(L1), 인간 IgG1 Fc의 융합 단백질을 포함하며, 서열 번호 27에 제시된 아미노산 서열을 갖는 동종 이량체 또는 이종 이량체 단백질.

**청구항 25**

제 20 항에 있어서, RB-IL15-RA-Fc의 모노머: IL15 수용체  $\beta$  서브 유닛의 세포 외 도메인, 링커 세그먼트(L2), 뮤린 IL15, 링커 세그먼트(L1), IL15 수용체  $\alpha$  서브 유닛의 스시 도메인, 링커 세그먼트(L1), 인간 IgG1 Fc의 융합 단백질을 포함하며, 서열 번호 28에 제시된 아미노산 서열을 갖는 동종 이량체 또는 이종 이량체 단백질.

**청구항 26**

제 20 항에 있어서, RB-IL15-RA-Fc의 모노머: IL15 수용체  $\beta$  서브 유닛의 세포 외 도메인, 링커 세그먼트(L2), 인간 IL15, 링커 세그먼트(L1), IL15 수용체  $\alpha$  서브 유닛의 스시 도메인, 링커 세그먼트(L1), 인간 IgG1 Fc의 융합 단백질을 포함하며, 서열 번호 29-41에 제시된 아미노산 서열을 갖는 동종 이량체 또는 이종 이량체 단백질.

**청구항 27**

제 21 항 내지 제 26 항 중 어느 한 항에 있어서, 중앙 미세 환경에서 특이적으로 발현되는 단백질 분해 효소에 의해 가수 분해되는 동종 이량체 또는 이종 이량체 단백질.

**청구항 28**

제 1 항 내지 제 27 항 중 어느 한 항의 실질적으로 정제된 단백질.

**청구항 29**

제 1 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항의 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.

**청구항 30**

제 29 항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

**청구항 31**

제 1 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항에 따른 단백질 및 약학적으로 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물.

**청구항 32**

질병 또는 병태를 치료하기 위한 방법으로서,

제 1 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항의 단백질 또는 제 31 항의 약학 조성물의 치료적 유효량을, 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하고,

여기서, 상기 질병 또는 병태는 과다 형성, 고형 종양 또는 조혈 악성 종양으로부터 선택되는 방법.

**청구항 33**

제 32 항에 있어서, 화학 요법 및 방사선 요법 중 하나 이상을 피험자에게 해주는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 34**

제 33 항에 있어서, 화학 요법 제를 투여하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 35**

제 33 항에 있어서, 방사선 요법을 해 주는 것을 포함하는 방법.

**청구항 36**

질병 또는 장애를 치료 또는 감소시키기 위한 제 1 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항의 단백질의 용도.

**청구항 37**

질병 또는 장애를 치료 또는 감소시키기 위한 약제의 제조에 있어서, 제 1 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항의 단백질 및 약학적으로 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제의 용도.

**청구항 38**

제 35 항 또는 제 36 항에 있어서, 상기 질환 또는 장애는 두경부암, 자궁 내막암, 결장 직장암, 난소암, 유방암, 흑색종, 폐암, 신장암, 간암, 항문암, 육종, 림프종, 백혈병, 뇌종양, 위암, 고환암, 췌장암, 갑상선암으로부터 선택되는 용도.

**청구항 39**

약제의 제조를 위한 제 1 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항의 단백질의 용도.

**청구항 40**

제 39 항에 있어서, 상기 약제는 항종양 약물인 용도.

**청구항 41**

제 40 항에 있어서, 상기 항 종양 약물은 B-세포 림프종 또는 항-결장 직장암 치료에 효과적인 용도.

**청구항 42**

제 1 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항의 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포주.

**청구항 43**

제 42 항의 세포주를 배양하는 것을 포함하는 단백질 제조 방법.

**청구항 44**

제 43 항에 있어서, 생성된 단백질을 정제 또는 분리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 45**

단백질 제조 방법으로서,

제 1 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항에 따른 단백질을 인코딩하는 발현 벡터를 제공하는 단계;

상기 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하는 단계;

단백질을 발현하기에 충분한 조건 하에서 숙주 세포를 배지에서 배양하는 단계; 및

숙주 세포 또는 배지로부터 단백질을 정제하는 단계;

를 포함하는 방법.

**청구항 46**

제 45 항에 있어서, 상기 숙주 세포는 293F 및 CHO 세포로부터 선택되는 방법.

**청구항 47**

제 45 항 또는 제 46 항에 있어서, 상기 발현 벡터의 도입은 일시적 형질 감염에 의한 것인 방법.

**청구항 48**

제 45 항 내지 제 47 항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질의 정제는 단백질 A/G의 친화성 크로마토그래피 또는 크기 배제 방법에 의한 것인 방법.

**청구항 49**

제 45 항 내지 제 48 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된, 분리된 단백질.

**청구항 50**

제 49 항에 있어서, 실질적으로 순수한 분리된 단백질.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 우선권 주장 및 관련 출원

[0002] 본 출원은 2018 년 5 월 4 일에 출원된 중국 출원 제 201810420739.6 호에 대한 우선권 이익을 주장하며, 그 전체 내용은 모든 목적을 위해 여기에 참조로 포함된다.

[0003] 본 발명은 일반적으로 신규 융합 단백질 및 이의 치료 용도에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 다양한 질병 및 장애(예를 들어, 과다 형성, 고형 종양 또는 조혈 악성 종양)를 치료하는데 유용한 인터루킨 15 및 프로드러그의 신규 융합 단백질, 및 이의 조성물 및 제조 방법을 제공한다.

**배경 기술**

[0004] 14-15 kDa 당단백질인 인터루킨 15(IL15)는 1994 년에 처음 발견된 가용성 사이토카인이다.(Grabstein et al. 1994 Science 264: 965-8.) 인터루킨 2와 유사하게, IL15는 4-헬릭스-번들 사이토카인의 패밀리에 속한다. 인간

IL15 유전자는 염색체 4 영역 q25-35에 매핑되었다. 성숙한 IL15는 112 개의 아미노산으로 구성되며, 3 개의 N-글리코실화 부위를 포함한다. IL15의 발현은 엄격하게 조절된다. IL-15 mRNA는 섬유 아세포, 근육 세포, 각질 세포, 신장 세포, 림프구, 비만 세포 및 종양 세포를 포함한 많은 조직과 세포에서 발견될 수 있지만, 성숙한 단백질은 T 세포가 아닌, 주로 수지상 세포, 단핵구, 대식세포 및 간질 세포에 의해 생성된다. IL-15의 발현은 과립구 마크로파지 콜로니-자극인자(Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)(GM-CSF), 인터페론, 톨-유사 수용체(Toll-like receptors)(TLR)의 작용제와 같은 사이토카인에 의해 자극된다.(Marek et al. 2011 Cytokine & Growth Factor Reviews 22: 99-108.)

- [0005] IL15 수용체(IL15R)는 조혈 계의 수퍼 패밀리에 속한다. 이종삼량체 IL15R은  $\alpha$ ,  $\beta$  (CD122) 및  $\gamma$  (CD132, 공통 감마 사슬,  $\gamma c$ ) 서브 유닛을 포함한다.  $\beta$  서브 유닛(IL15R $\beta$ )은 IL2 수용체와 공유된다. 인간 IL15R $\alpha$ 는 I 형 막관통 단백질에 속한다. IL2R $\alpha$ 와 IL15R $\alpha$ 는 모두 보존된 스시 도메인을 포함한다. IL15는 T 및 NK 세포의 증식을 촉진하는 것과 같은 IL2와 일부 유사한 기능을 가지고 있다.(Thomas et al. 2006 J of Immunology 177: 6072-6080.)
- [0006] IL15R $\alpha$ 는 주로 수지상 세포(DC) 및 단핵구에서 발현된다. 대부분의 경우, IL15는 트랜스-프리젠티드(trans-presented) 형태로 수용체에 결합한다. 트랜스-프리젠테이션(tans-presentation) 모델에서, IL15와 IL15R $\alpha$ 는 동일한 세포에서 합성된다. IL15와 IL15R $\alpha$  스시 도메인은 세포질에서 높은 친화력으로 서로 결합하여, IL-15를 세포막으로 운반한다. 그 다음, IL15R $\alpha$ 는 T 세포 및 NK 세포와 같은 반응 세포에 IL-15를 전이(trans-present)시킬 수 있다.
- [0007] IL15는 다음과 같이 항상성 및 선천성과 적응성 면역 모두의 활성화에서 다발성 기능을 나타낸다:
- [0008] (1) IL15는 CD8<sup>+</sup> T 세포의 활성화, 증식 및 생존에 중요한 역할을 한다.
- [0009] (2) IL15는 기억 CD8<sup>+</sup> T 세포의 활성화 및 항상성에 중요한 역할을 한다.
- [0010] (3) IL15는 NK 세포 및 NKT 세포의 발달, 활성화 및 증식에 중요한 역할을 한다.
- [0011] (4) IL15는 항-종양 항체 생산에 중요한 역할을 한다.
- [0012] (5) IL15는 자가 분비 모델에 의한 DC의 활성화, 증식 및 분화에 중요한 역할을 하고, DC에서 MHC II 및 CD80/CD86의 발현을 촉진하고, DC의 CD8<sup>+</sup> T 세포로의 프리젠테이션을 증가시킨다.
- [0013] (6) IL15는 단핵구와 대식세포의 활성화에 중요한 역할을 한다.
- [0014] (7) IL15는 AICD의 억제에 중요한 역할을 하고, Treg에 의한 억제로부터 T 세포를 보호하고, 종양 항원에 대한 내성을 극복한다.
- [0015] IL2는 전이성 신장 세포 암종 및 악성 흑색종의 치료를 위해 FDA에 의해 승인되었다. 그러나, 항암 치료제로서 IL-2의 효과는 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-조절 세포의 유지 및 활성화-유도 세포 사멸(AICD)에서의 그 중추적인 역할 때문에, 의문 제기되어 왔다. 이 과정은 자극된 T 세포를 제거하고, T 세포 내성을 유도하여 치료 효과를 제한한다.
- [0016] IL2와 달리, IL15는 활성화-유도 세포 사멸(AICD) 및 조절 T 세포의 유지에 관여하지 않는다. 따라서, IL15는 암 치료에서 IL2보다 상당한 이점을 가질 수 있다. 최근 보고서에 따르면, 가용성 수용체 IL15R $\alpha$ 와 함께 미리 형성된 IL15 복합체의 투여는 IL15의 반감기를 향상시키고, T 및 NK 세포의 증식을 증가시켰다.(Thomas et al. 2006 J of Immunology 177: 6072-6080.)
- [0017] 중요하게는, 유연한 펩타이드로 연결된 IL15R $\alpha$  스시 도메인과 IL15의 가용성 융합 단백질이 IL15의 반감기 향상과 T 및 NK 세포의 증식을 나타냈다는 것이다. 생쥐 B16F10 및 DEN-유도 HCC 종양 모델에서, 이러한 융합 단백질은 종양 성장을 억제하고 종양의 전이를 억제할 수 있다. 또한, IL15는 병용 연구에서 향상된 항-종양 효과를 나타내거나 종양의 성장을 억제하였다.(Cheng et al. 2014 J of Hepatology 61: 1297-1303; Guo et al. 2017 Cytokine and Growth Factor Reviews 38: 10-21.)
- [0018] 다음과 같은 다양한 부작용이 IL15 요법과 관련되어 있다.
- [0019] (1) TNF $\alpha$ , IL1, IL6, GM-CSF 및 전-염증성 사이토카인을 포함하는 사이토카인 캐스케이드의 유도;

- [0020] (2) 일부 종양 세포의 증식, 생존 및 전이 촉진;
  - [0021] (3) 자가 면역 T 세포 활성화 및 자가 면역 질환 관여(participation)
  - [0022] (4) 관상 동맥 심장병의 유도; 및
  - [0023] (5) 억제 분자 PD1/PDL1의 발현 유도.
- [0024] 예를 들어, 과다 형성, 고행 종양 또는 조혈 악성 종양에 대해 현재 이용 가능한 치료제 및 방법은 부적절하다. 그러한 질병과 병태를 효과적으로 치료하기 위해 새롭고 개선된 치료제에 대한 긴급하고 지속적인 요구가 남아 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

**과제의 해결 수단**

- [0025] 본 발명은 부분적으로 새로운 융합 단백질 및 그 치료적 용도의 놀라운 발견에 기초한다. 다양한 질병 및 장애, 예를 들어 과다 형성, 고행 종양 또는 조혈 악성 종양을 치료하는데 유용한 IL15의 신규 융합 단백질 및 이의 프로드러그, 이의 조성물 및 제조 방법이 본원에 개시되어 있다.
- [0026] 일 측면에서, 본 발명은 일반적으로 융합 단백질에 관한 것이다. 융합 단백질은 제 1 구조 유닛: 인터루킨 15 수용체 알파(IL15R $\alpha$ )의 서브 유닛 또는 이의 단편; 제 2 구조 유닛: 활성 IL15; 제 3 구조 유닛: 융합 단백질의 C-말단에 위치하는 항체 Fc 단편; 및 제 1, 제 2 및 제 3 구조 유닛을 공유적으로 연결하는 제 1 링커 세그먼트(L1)를 포함하며, 여기서 융합 단백질의 N-말단에는 제 1 구조 유닛이 있고, 제 2 구조 유닛은 제 1 구조 유닛과 제 3 구조 유닛 사이에 위치한다.
- [0027] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 융합 단백질에 관한 것이다. 융합 단백질은 제 1 구조 유닛: 인터루킨 15 수용체 알파(IL15R $\alpha$ )의 서브 유닛 또는 이의 단편; 제 2 구조 유닛: 활성 IL15; 제 3 구조 유닛: 융합 단백질의 C-말단에 위치하는 항체 Fc 단편; 및 제 1, 제 2 및 제 3 구조 유닛을 공유적으로 연결하는 제 1 링커 세그먼트(L1)를 포함하며, 여기서 융합 단백질의 N-말단에는 제 2 구조 유닛이 있고, 제 1 구조 유닛은 제 2 구조 유닛과 제 3 구조 유닛 사이에 위치한다.
- [0028] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 융합 단백질에 관한 것이다. 융합 단백질은 제 1 구조 유닛: 인터루킨 15 수용체 알파(IL15R $\alpha$ )의 서브 유닛 또는 이의 단편; 제 2 구조 유닛: 활성 IL15; 제 3 구조 유닛: 융합 단백질의 C-말단에 위치하는 항체 Fc 단편; 제4 구조 유닛: 인터루킨 15 수용체 베타(IL15R $\beta$ )의 서브 유닛 또는 이의 단편; 및 제 1, 제 2, 제 3 및 제 4 구조 유닛을 공유적으로 연결하는 제 1 링커 세그먼트(L1)를 포함하며, 여기서 융합 단백질의 N-말단에는 제 4 구조 유닛이 있고, 제 2 구조 유닛은 제 4 구조 유닛과 제 1 구조 유닛 사이에 위치하고, 제 1 구조 유닛은 제 2 구조 유닛과 제 3 구조 유닛 사이에 위치한다.
- [0029] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 융합 단백질에 관한 것이다. 융합 단백질은 제 1 구조 유닛: 인터루킨 15 수용체(IL15R)의 서브 유닛 또는 이의 단편; 제 2 구조 유닛: 활성 IL15; 제 3 구조 유닛: 융합 단백질의 C-말단에 위치하는 항체 Fc 단편; 제4 구조 유닛: 인터루킨 15 수용체 베타(IL15R $\beta$ )의 서브 유닛 또는 이의 단편; 제 1, 제 2 및 제 3 구조 유닛을 공유적으로 연결하는 제 1 링커 세그먼트(L1), 여기서 제 1 구조 유닛은 제 2 구조 유닛과 제 3 구조 유닛 사이에 위치하고; 및 제 4 구조 유닛을 제 2 구조 유닛에 공유적으로 연결하는 제 2 링커 세그먼트(L2)를 포함하며, 여기서 융합 단백질의 N-말단에는 제 4 구조 유닛이 있다.
- [0030] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 본원에 개시된 융합 단백질을 포함하는 동종 이량체 또는 이종 이량체 단백질에 관한 것이다.
- [0031] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 본원에 개시된 융합 단백질 또는 단편과 같은 실질적으로 정제된 단백질에 관한 것이다.
- [0032] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 본원에 개시된 융합 단백질 또는 이의 단편과 같은 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.

- [0033] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 본원에 개시된 융합 단백질 또는 이의 단편과 같은 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0034] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 본원에 개시된 융합 단백질 또는 이의 단편과 같은 단백질 및 약학적으로 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0035] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 본원에 개시된 융합 단백질 또는 이의 단편과 같은 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 약학적으로 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0036] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 질병 또는 병태를 치료하는 방법에 관한 것이다. 방법은 본원에 개시된 융합 단백질 또는 이의 단편과 같은 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 질병 또는 병태는 과다 형성, 고형 종양 또는 조혈 악성 종양으로부터 선택된다.
- [0037] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 질병 또는 장애(예를 들어, 과다 형성, 고형 종양 또는 조혈 악성 종양)를 치료 또는 감소시키기 위해 본원에 개시된 융합 단백질 또는 이의 단편과 같은 단백질의 용도에 관한 것이다.
- [0038] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 질병 또는 장애(예를 들어, 과다 형성, 고형 종양 또는 조혈 악성 종양)를 치료 또는 감소시키기 위해 본원에 개시된 융합 단백질 또는 이의 단편과 같은 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 용도에 관한 것이다.
- [0039] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 질병 또는 장애(예를 들어, 과다 형성, 고형 종양 또는 조혈 악성 종양)를 치료 또는 감소시키기 위한 약제의 제조에 있어서, 본 명세서에 개시된 융합 단백질 또는 이의 단편과 같은 단백질 및 약학적으로 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제의 용도에 관한 것이다.
- [0040] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 질병 또는 장애(예를 들어, 과다 형성, 고형 종양 또는 조혈 악성 종양)를 치료 또는 감소시키기 위한 약제의 제조에 있어서, 본원에 개시된 융합 단백질 또는 이의 단편과 같은 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 약학적으로 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제의 용도에 관한 것이다.
- [0041] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 본원에 개시된 융합 단백질 또는 이의 단편과 같은 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포주에 관한 것이다.
- [0042] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 세포주를 배양하는 것을 포함하는 단백질 제조 방법에 관한 것이다. 특정 실시 예에서, 상기 방법은 본원에 개시된 융합 단백질 또는 이의 단편과 같은 생산된 단백질을 정제 또는 분리하는 것을 추가로 포함한다.
- [0043] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 단백질을 제조하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 본원에 개시된 융합 단백질 또는 이의 단편과 같은 단백질을 인코딩하는 발현 벡터를 제공하는 단계; 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하는 단계; 단백질을 발현하기에 충분한 조건 하에서 숙주 세포를 배지에서 배양하는 단계; 및 숙주 세포 또는 배지로부터 단백질을 정제하는 단계를 포함한다.
- [0044] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 본원에 개시된 방법에 의해 생성된, 분리된 단백질에 관한 것이다.

**도면의 간단한 설명**

- [0045] 도 1은 융합 단백질의 구조를 개략적으로 나타낸 것이다. 도 1a는 IL15-Fc의 구조의 개략도를 보여준다. 도 1b 및 도 1c는 2 개의 IL15 수퍼 작용제(둘 다 수퍼 IL15로 지칭됨): RA-IL15-Fc 및 IL15-RA-Fc의 개략도를 보여준다. 도 1d는 융합 단백질 RB-IL15-RA-Fc의 개략도를 보여준다.
- 도 2는 3 개의 융합 단백질의 예시적인 SDS-PAGE 전기 영동도를 보여준다.
- 도 3은 IL15-Fc 및 수퍼 IL15에 의한 림프구 증식 분석의 예시적인 결과를 보여준다.
- 도 4는 RB-IL15-RA-Fc 및 수퍼 IL15에 의한 림프구 증식 분석의 예시적인 결과를 보여준다.
- 도 5는 A20 종양 모델에서 수퍼 IL15의 치료 효과에 대한 예시적인 결과를 보여준다. 도 5a는 종양 내 주사를 통한 수퍼 IL15 치료 효과의 예시적인 데이터를 보여준다; 도 5b는 종양 내 및 복강 내 주사 후 생쥐 생존의 예시적인 데이터를 보여준다; 도 5c는 A20 종양 세포로 재-첼린지된 종양-치료된 생쥐에 대한 예시적인 데이터를 보여준다.

보여준다.

도 6은 MC38 종양 모델에서 수퍼 IL15의 치료 효과에 대한 예시적인 결과를 보여준다. 도 6a는 종양 내 및 정맥 내 주사를 통한 수퍼 IL15 치료 효과의 예시적인 데이터를 보여준다. 도 6b는 치료 후 생쥐의 생존에 대한 예시적인 데이터를 보여준다.

도 7은 더 낮은 투여량이 주어진 A20 생쥐 모델에서 수퍼 IL15의 치료 효과에 대한 예시적인 데이터를 보여준다.

도 8은 정맥 내 주사 후 A20 종양 모델에서 RB-IL15-RA-Fc 및 수퍼 IL15의 치료 효과의 예시적인 비교를 보여준다. 도 8a는 치료 후 생쥐의 예시적인 종양 성장 곡선을 보여준다. 도 8b는 치료 후 혈청에서 예시적인 사이토카인의 레벨을 보여준다.

도 9는 복강 내 주사 후 생쥐 A20 종양 모델에서 RB-IL15-RA-Fc 및 수퍼 IL15의 치료 효과의 예시적인 비교를 보여준다. 도 9a는 치료 후 생쥐의 예시적인 생존을 보여준다. 도 9b는 치료 후 혈청에서 예시적인 사이토카인의 레벨을 보여준다.

도 10은 MMP14 소화가 있거나 없는 정제된 인간 IL15 융합 단백질의 예시적인 SDS-PAGE 전기 영동도를 보여준다. RB-IL15-RA-Fc는 RB-L1-15RA-Fc 또는 RB-L2-15RA-Fc로 표시되어, L1 또는 L2가 RB에 부착된 링커 세그먼트로 사용되는지 여부를 강조한다. IL15-RA-Fc는 15RA-Fc로 표시된다.

도 11은 HEK-Blue™ IL2 리포터 세포 분석을 사용하여 평가된 MMP14 인큐베이션을 갖거나 갖지 않는 인간 IL15 융합 단백질 활성의 예시적인 결과를 보여준다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### [0046] 정의들

[0047] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 다음의 용어들은 용어가 발견되는 문맥에 따라 달리 표시되지 않는 한, 다음과 같은 의미를 갖는 것으로 의도된다.

[0048] 본원에서 상품명 사용될 때, 상품명은 문맥에 의해 달리 지시되지 않는 한, 상품 제형, 제네릭 의약품 및 상품명 제품의 활성 제약 성분(들)을 포함한다.

[0049] 본원에 제공된 범위는 범위 내의 모든 값에 대한 약칭인 것으로 이해된다. 예를 들어, 1에서 50까지의 범위는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50로 구성된 그룹으로부터 임의의 숫자, 숫자 조합 또는 하위 범위를 포함하는 것으로 이해된다.

[0050] 본원에 사용된 "적어도" 특정 값은 그 값 및 그 값보다 큰 모든 값으로 이해된다.

[0051] 본원에 사용된 "하나 이상"은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 100 등 또는 그 사이의 값으로 이해된다.

[0052] 본원 및 첨부된 청구 범위에서, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥 상 명백하게 달리 지시하지 않는 한, 복수 참조를 포함한다.

[0053] 구체적으로 언급되거나 문맥 상 명백하지 않는 한, 본원에서 사용된 용어 "약"은 당 업계의 정상 허용 범위 내, 예를 들어 평균의 2 표준 편차 내로 이해된다. 약은 명시된 값의 대략 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05% 또는 0.01% 이내로 이해될 수 있다. 문맥에서 달리 명확하지 않은 한, 여기에 제공된 모든 수치는 약이라는 용어에 의해 수정될 수 있다.

[0054] 구체적으로 언급되거나 문맥 상 명백하지 않는 한, 본원에 사용된 용어 "또는"은 포괄적인 것으로 이해된다.

[0055] 용어 "포함하는"은 조성물 및 방법을 정의하기 위해 사용될 때, 조성물 및 방법이 인용된 요소를 포함하지만, 다른 요소를 배제하지 않음을 의미하는 것으로 의도된다. 용어 "본질적으로 구성되는"은 조성물 및 방법을 정의하기 위해 사용될 때, 조성물 및 방법이 언급된 요소를 포함하고 조성물 및 방법에 대해 임의의 본질적인 중요성을 갖는 다른 요소를 배제함을 의미할 것이다. 예를 들어, "본질적으로 구성되는"은 명시적으로 언급된 약리학 활성제의 투여를 지칭하고 명시적으로 언급되지 않은 약리학 활성제를 배제한다. 본질적으로 구성되는

이라는 용어는 약리학적 불활성 또는 불활성 제제, 예를 들어 약학적으로 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제를 배제하지 않는다. 용어 "이루어진"은 조성물 및 방법을 정의하는 데 사용될 때, 다른 성분 및 실질적인 방법 단계의 미량 성분을 배제하는 것을 의미한다. 이들 전환 용어 각각에 의해 정의된 실시 예는 본 발명의 범위 내에 있다.

- [0056] 본원에 사용된 용어 "작용제"는 수용체와 조합하여 세포 반응을 생성할 수 있는 화합물을 지칭한다. 작용제는 수용체에 직접 결합하는 리간드일 수 있다. 대안적으로, 작용제는 예를 들어, (a) 수용체에 직접 결합하는 다른 분자로 복합체를 형성하거나, (b) 그렇지 않으면 다른 화합물이 변형되어, 다른 화합물이 수용체에 직접 결합하게 함으로써, 간접적으로 수용체와 결합할 수 있다.
- [0057] 본원에 사용된 용어 "길항제"는 수용체에 결합하기 위한 작용제 또는 역 작용제와 경쟁하여, 수용체에 대한 작용제 또는 역 작용제의 작용을 차단하는 화합물을 지칭한다. 그러나, 길항제는 구성 수용체 활성화에 영향을 미치지 않는다.
- [0058] 본원에 사용된 용어 "항체"는 에피토프 또는 항원 결정인자에 결합할 수 있는 분자를 지칭한다. 이 용어는 전체 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함하는 것을 의미한다. 이 용어는 다중 클론, 단일 클론, 키메라, Fabs, Fvs, 단일 사슬 항체 및 단일 또는 다중 면역 글로불린 가변 사슬 또는 CDR 도메인 디자인뿐만 아니라 이중 특이적 및 다중 특이적 항체를 포함한다. 항체는 모든 동물 기원에서 유래할 수 있다. 바람직하게는, 항체는 포유 동물, 예를 들어 인간, 생쥐, 토끼, 염소, 기니피그, 낙타, 말 등 또는 기타 적합한 동물이다. 항체는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 항원을 인식할 수 있다. 이 용어는 예를 들어 면역 글로불린의 항원 결합 단편, 중쇄의 가변 및/또는 불변 영역, 경쇄의 가변 및/또는 불변 영역, 상보성 결정 영역(cdr), 및 프레임워크 영역을 포함하는 활성 단편을 포함한다. 이 용어는 다중 클론 및 단일 클론 항체 제제뿐만 아니라 하이브리드 항체, 변경된 항체, 키메라 항체, 하이브리드 항체 분자, F(ab)<sub>2</sub> 및 F(ab) 단편을 포함하는 제제; Fv 분자(예를 들어, 비공유 이중 이량체), 이합체 및 삼합체 항체 단편 구축물; 미니바디, 인간화 항체 분자 및 이러한 분자로부터 얻은 임의의 기능적 단편(여기서 이러한 단편은 특이적 결합을 유지함)을 포함한다.
- [0059] 본원에 사용된 용어 "항원"은 면역 체계가 항체 또는 이에 대한 특정 세포 매개 면역 반응을 생성하게 하는 임의의 물질을 의미한다. 질병 관련 항원은 면역 체계가 항체 또는 이에 대한 특정 세포 매개 반응을 생성하도록 하는 임의의 질병과 관련된 모든 물질이다. 항원은 면역 체계에 의해 인식될 수 있고, 및/또는 B- 및/또는 T-림프구의 활성화로 이어지는 체액성 면역 반응 및/또는 세포 면역 반응을 유도할 수 있다. 항원은 하나 이상의 에피토프(B-세포 및/또는 T-세포 에피토프)를 가질 수 있다. 항원은 바람직하게는, 그의 상응하는 항체 또는 TCR과 전형적으로 매우 선택적 방식으로 반응할 것이고, 다른 항원에 의해 유발될 수 있는 다수의 다른 항체와는 반응하지 않을 것이다. 본원에서 사용되는 항원은 또한 여러 개별 항원의 혼합물일 수 있다.
- [0060] 본원에 사용된 용어 "생물학적 활성" 독립체(entity), 또는 "생물학적 활성"을 갖는 독립체는 자연 발생 분자의 구조적, 조절적 또는 생화학적 기능 또는 대사 또는 생리적 과정과 관련된 임의의 기능을 갖는 것이다. 생물학적 활성 폴리펩티드 또는 이의 단편은 생물학적 과정 또는 반응에 참여할 수 있고, 및/또는 원하는 효과를 생성할 수 있는 것을 포함한다. 생물학적 활성은 개선된 원하는 활성 또는 감소된 바람직하지 않은 활성을 포함할 수 있다. 예를 들어, 독립체는 다른 분자와 분자 상호 작용에 참여할 때, 질병 상태를 완화하는 데 치료적 가치가 있을 때, 면역 반응을 유도하는 데 예방적 가치가 있을 때, 또는 분자의 존재를 결정하는 데 진단적 및/또는 예후적 가치가 있을 때, 생물학적 활성을 나타낸다. 생물학적 활성 단백질 또는 폴리펩티드는 자연적으로 발생하거나 예를 들어, 재조합 또는 화학적 합성에 의해 공지된 성분으로부터 합성될 수 있고, 이중 성분을 포함할 수 있다.
- [0061] 본원에 사용된 용어 "암" 및 "암성"은 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장을 특징으로 하는 포유 동물의 생리학 적 병태를 지칭하거나 나타낸다. 암의 예는 암종, 림프종, 육종, 모세포종 및 백혈병을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 암의 보다 특정한 예는 편평 세포 암종, 폐암, 췌장암, 자궁 경부암, 방광암, 간종, 유방암, 결장암 및 두경부암을 포함한다.
- [0062] 본원에 사용된 용어 "세포"는 임의의 원핵 생물, 진핵 생물, 1 차 세포 또는 불멸화된 세포주, 조직 또는 기관과 같은 세포의 임의 그룹을 의미한다. 바람직하게는 세포는 포유 동물(예를 들어, 인간) 기원이고, 하나 이상의 병원체에 의해 감염될 수 있다.
- [0063] 본원에 사용된 용어 "공동-투여"는 동시에 혈액에서의 2 개의 약리학적 작용제의 존재를 지칭한다. 2 개의 약리학적 제제는 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

- [0064] 본원에 사용된 용어 "공동 발현"은 2 개의 별개 폴리펩티드가 숙주 세포에서 동시에 발현되어, 2 개의 폴리펩티드가 숙주 세포 또는 숙주 세포 배양 배지에서 상호 작용하거나 결합하여 콤플렉스를 형성할 수 있음을 의미하는 것으로 의도된다.
- [0065] 본원에 사용된 용어 "질병" 또는 "장애"는 병리학적 상태, 예를 들어 증상 또는 기타 식별 인자에 의해 건강 또는 정상 상태로부터 벗어나는 것으로 식별될 수 있는 상태를 지칭한다. 용어 "질병"은 장애, 증후군, 병태 및 부상을 포함한다. 질병은 증식성, 염증성, 면역성, 대사성, 감염성 및 허혈성 질환이 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0066] 본원에 사용된 용어인 활성제의 "유효량"은 원하는 생물학적 반응을 유도하기에 충분한 양을 지칭한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본 발명의 화합물의 유효량은 원하는 생물학적 종점, 화합물의 약동학, 치료할 질병, 투여 방식, 및 환자에 따라 달라질 수 있다.
- [0067] 본원에 사용된 용어 "핵산 분자의 발현"은 핵산 분자에 포함된 정보를 유전자 생성물로 변환하는 것을 지칭한다. 유전자 생성물은 유전자의 직접 전사 생성물(예를 들어, mRNA, tRNA, rRNA, 안티센스 RNA, 리보자임, 구조적 RNA, 또는 임의의 다른 유형의 RNA) 또는 mRNA의 번역에 의해 생성된 펩티드 또는 폴리펩티드일 수 있다. 유전자 생성물은 캡핑, 폴리아데닐화, 메틸화 및 에디팅과 같은 과정에 의해 변형된 RNA; 및 예를 들어 메틸화, 아세틸화, 인산화, 유비퀴틴화, ADP-리보실화, 미리스틸화(myristilation) 및 글리코실화에 의해 변형된 단백질을 포함한다.
- [0068] 본원에 사용된 용어 "숙주 세포"는 임의의 재조합 벡터(들) 또는 분리된 폴리뉴클레오티드(들)의 수용자일 수 있거나 수용자였던 개별 세포 또는 세포 배양물을 지칭한다. 숙주 세포는 원핵 생물, 진핵 생물, 포유류, 조류, 곤충, 식물 또는 박테리아 세포를 포함하는 임의의 기원의 형질 감염, 형질 전환, 형질 도입 또는 감염된 세포일 수 있거나, 본원에 기재된 핵산을 증식시키는 데 사용할 수 있는 임의의 기원의 세포일 수 있다. 숙주 세포는 단일 숙주 세포의 자손을 포함하며, 그 자손은 자연적, 우발적 또는 고의적 돌연변이 및/또는 변화로 인해, (형태 또는 전체 DNA 보체에서) 원래 모세포와 완전히 동일할 필요가 없다. 숙주 세포는 본 발명의 재조합 벡터 또는 폴리뉴클레오티드에 의해 생체 내 또는 시험관 내 형질 감염 또는 감염된 세포를 포함한다. 본 발명의 재조합 벡터를 포함하는 숙주 세포는 "재조합 숙주 세포"로 지칭될 수 있다.
- [0069] 숙주 세포는 제한없이, 포유 동물, 식물, 곤충, 진균 및 박테리아의 세포를 포함한다. 박테리아 세포는 제한없이, 바실러스, 스트렙토마이세스 및 스태필로코커스 속의 종과 같은 그람 양성 박테리아의 세포 및 에스케리키아 및 슈도모나스 속의 세포와 같은 그람 음성 박테리아의 세포를 포함한다. 진균 세포는 바람직하게는 사카로미세스, 피치아 파스토리스 및 한세놀라 폴리모파와 같은 효모 세포를 포함한다. 곤충 세포는 제한없이, 초파리 및 Sf9 세포의 세포를 포함한다. 식물 세포는 특히 곡물, 약용 또는 관상용 식물 또는 구근과 같은 작물 식물의 세포를 포함한다. 본 발명에 적합한 포유 동물 세포는 상피 세포주(돼지 등), 골육종 세포주(인간 등), 신경 모세포종 세포주(인간 등), 상피 암종(인간 등), 아교 세포(쥐 등), 간 세포주(원숭이 등), CHO 세포(중국 햄스터 난소), COS 세포, BHK 세포, HeLa, 911, AT1080, A549, 293 또는 PER.C6 세포, 인간 ECC NTERA-2 세포, mESC 계통의 D3 세포, 인간 배아 줄기 세포, 예컨대 HS293 및 BGV01, SHEF1, SHEF2 및 HS181, 세포 NIH3T3, 293T, REH 및 MCF-7 및 hMSCs 세포를 포함한다.
- [0070] 본원에 사용된 용어 "Fc"는 단량체 또는 다량체 형태로든 전체 항체의 비-항원 결합 단편의 서열을 포함하는 분자 또는 서열을 지칭한다. 천연 Fc의 원래 면역 글로불린 공급원은 바람직하게는 인간 기원이고 임의의 면역 글로불린(예를 들어, IgG1, IgG2)일 수 있다. 천연 Fc는 공유(즉, 이황화 결합) 및 비공유 결합에 의해 이량체 또는 다량체 형태로 연결될 수 있는 단량체 폴리펩티드로 구성된다. 천연 Fc 분자의 단량체 서브 유닛 사이의 분자간 이황화 결합의 수는 클래스(예를 들어, IgG, IgA, IgE) 또는 서브 클래스(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgA2)에 따라 1 내지 4 범위이다.
- [0071] 본원에 사용된 용어 "Fc 도메인" 또는 "Fc 영역"은 면역 글로불린 중쇄 "결정화 가능한 단편" 영역을 의미한다. 일반적으로, Fc 도메인은 이량체 복합체를 형성하기 위해 제 2 Fc 도메인과 상호 작용할 수 있다. Fc 도메인은 Fc 수용체로 불리는 세포 표면 수용체 및/또는 보체 시스템의 단백질에 결합할 수 있거나 이러한 결합 활성을 감소 또는 증가시키기 위해 변형될 수 있다. Fc 도메인은 IgG, IgA, IgD, IgM 또는 IgE 항체 동형 표본으로부터 유래될 수 있으며, 흡소닌화, 세포 용해, 비만 세포, 호염기성 세포 및 호산구성 세포의 탈과립화 및 기타 Fc 수용체 의존적 과정; 보체 경로의 활성화; 및 생체 내 단백질 안정성을 포함하는 면역 활성에 영향을 미친다.
- [0072] "Fc 도메인"은 본원에 정의된 바와 같은 천연 Fc 및 Fc 변이체 분자 및 서열을 포함한다. Fc 변이체 및 천연 Fc

와 마찬가지로, "Fc 도메인"이라는 용어는 전체 항체에서 분해되거나 재조합 유전자 발현 또는 기타 수단에 의해 생성되는지 여부에 관계없이 단량체 또는 다량체 형태의 분자를 포함한다.

- [0073] Fc 융합 단백질은 IgG의 Fc 영역을 다양한 사이토카인 및 가용성 수용체와 같은 다른 단백질의 도메인과 결합하는 것으로 보고되었다.(예를 들어, Capon et al. 1989 Nature 337: 525-531; Chamow et al. 1996 Trends Biotechnol. 14: 52-60; 미국 특허 번호 5,116,964 및 5,541,087).
- [0074] Fc 융합체의 사용은 당 업계에 공지되어 있다(예를 들어, 미국 특허 번호 7,754,855; 5,480,981; 5,808,029; W07/23614; W098/28427 및 여기에 인용된 참고 문헌). Fc 융합 단백질은 변이체 Fc 분자(예를 들어, 미국 특허 번호 7,732,570에 기술된 바와 같이)를 포함할 수 있다. Fc 융합 단백질은 혈장에 용해될 수 있거나 특정 Fc 수용체를 갖는 세포의 세포 표면에 결합할 수 있다.
- [0075] 본원에 사용된 용어 "Fc 변이체"는 천연 Fc로부터 변형되었지만, 여전히 구제(salvage) 수용체인 FcRn에 대한 결합 부위를 포함하는 분자 또는 서열을 의미한다. 국제 출원 WO 97/34631(1997년 9월 25일 공개) 및 WO 96/32478은 예시적인 Fc 변이체뿐만 아니라 구제 수용체와의 상호 작용을 설명하고 있으며, 여기에 참조로 포함된다. 따라서, 용어 "Fc 변이체"는 비-인간 천연 Fc로부터 인간화된 분자 또는 서열을 포함한다. 또한, 천연 Fc는 본 발명의 융합 분자에 필요하지 않은 구조적 특징 또는 생물학적 활성을 제공하기 때문에, 제거될 수 있는 부위를 포함한다. 따라서, 특정 실시 예에서, 용어 "Fc 변이체"는 (1) 이항화 결합 형성, (2) 선택된 숙주 세포와의 비호환성, (3) 선택된 숙주 세포에서 발현시 N-말단 이질성, (4) 글리코실화, (5) 보체와의 상호 작용, (6) 구제 수용체 이외의 Fc 수용체에 대한 결합, 또는 (7) 항체 의존성 세포 독성(ADCC)에 영향을 미치거나 이에 관여하는 하나 이상의 천연 Fc 부위 또는 잔기가 결여된 분자 또는 서열을 포함한다. Fc 변이체는 이후에 더 자세히 설명된다.
- [0076] 본원에 사용된 용어 "융합 단백질"은 재조합, 화학적 또는 다른 적합한 방법에 의해 공유 결합된(즉, "융합된") 상이한 또는 이종 단백질로부터의 2 개 이상의 영역을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 원하는 경우, 융합 분자는 펩티드 또는 다른 링커 세그먼트 또는 서열을 통해 하나 또는 여러 부위에서 융합될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 펩티드 링커가 융합 단백질의 구성을 돕기 위해 사용될 수 있다.
- [0077] 본원에 사용된 용어 "GC 함량"은 데옥시구아노신(G) 및/또는 데옥시시티딘(C) 데옥시리보뉴클레오사이드, 또는 구아노신(G) 및/또는 시티딘(C) 리보뉴클레오사이드 잔기로 구성된 핵산 서열의 백분율을 지칭한다.
- [0078] 본원에 사용된 용어 "고 투여량"은 인간 질병 또는 병태의 치료를 위해 특정 화합물의 최고 표준 권장 투여량보다 적어도 5%(예를 들어, 적어도 10%, 20%, 50%, 100%, 200% 또는 심지어 300%) 더 많은 것을 지칭한다.
- [0079] 본원에 사용된 용어 "면역 반응"은 면역 세포가 뚜렷한 부착 및/또는 활성화 단계를 포함하는 다인성 과정을 통해, 비-림프 조직뿐만 아니라 혈액으로부터 림프까지 자극 및/또는 동원되는 과정을 지칭한다. 활성화 조건은 사이토카인, 성장 인자, 케모카인 및 기타 인자의 방출을 유발하고, 면역 세포에 대한 부착 및 기타 활성화 분자의 발현을 상향 조절하고, 조직을 통한 화학 주성과 동시에 부착, 형태학적 변화 및/또는 분출을 촉진하고, 세포 증식 및 세포 독성 활성을 증가시키고, 항원 제시를 자극하고 기억 세포 유형의 생성을 포함한 기타 표현형 변화를 제공한다. 면역 반응은 또한 다른 면역 세포의 염증성 또는 세포 독성 활성을 억제하거나 조절하는 면역 세포의 활성을 지칭한다. 면역 반응은 생체 내 또는 시험관 내 면역 세포의 활동을 의미한다.
- [0080] 2 개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열과 관련하여, 용어 "동일한" 또는 퍼센트 "동일성"은 아래에 기재된 기본(default) 매개 변수를 갖는 BLAST 또는 BLAST 2.0 서열 비교 알고리즘을 사용하여 측정되거나 또는 수동 정렬 및 육안 검사에 의한 경우, 동일하거나 특정 비율의 동일한(즉, 비교 창 또는 지정된 영역에 대한 최대 대응을 위해 비교 및 정렬된 경우, 지정된 영역(예를 들어, IL12 또는 IL12R 서열)에 대한 약 75% 동일성, 바람직하게는 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 동일성) 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 갖는 2 개 이상의 서열 또는 서브 서열을 지칭한다. 그러면, 이러한 서열은 "실질적으로 동일"하다고 한다. 이 정의는 또한 테스트 서열의 보체를 지칭하거나 또는 이에 적용될 수 있다. 이 정의는 또한 삭제 및/또는 추가가 있는 서열뿐만 아니라 치환이 있는 서열도 포함한다. 아래에 설명된 바와 같이, 바람직한 알고리즘은 갭 등을 설명할 수 있다. 바람직하게는, 동일성은 길이가 적어도 약 25, 50, 75, 100, 150, 200 개의 아미노산 또는 뉴클레오티드인 영역에 걸쳐 존재하며, 종종 길이가 225, 250, 300, 350, 400, 450, 500 개의 아미노산 또는 뉴클레오티드인 영역에 걸쳐 존재하며, 또는 아미노산 또는 핵산 서열의 전체 길이에 걸쳐 존재한다.

- [0081] 서열 비교를 위해, 전형적으로 하나의 서열이 참조 서열로 기능하며, 테스트 서열이 그 참조 서열과 비교된다. 서열 비교 알고리즘을 사용하는 경우, 테스트 및 참조 서열을 컴퓨터에 입력하고, 필요에 따라 하위 서열 좌표를 지정하고, 서열 알고리즘 프로그램 매개 변수를 지정한다. 바람직하게는, 기본 프로그램 매개 변수를 사용하거나 대체 매개 변수를 지정할 수 있다. 그 다음, 서열 비교 알고리즘은 프로그램 매개 변수에 기초하여 참조 서열에 대한 테스트 서열의 퍼센트 서열 동일성을 계산한다.
- [0082] 퍼센트 서열 동일성 및 서열 유사성을 결정하는 데 적합한 알고리즘의 바람직한 예는 BLAST 알고리즘이며, 이는 Altschul et al. 1977 Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402 및 Altschul et al. 1990 J. Mol. Biol. 215: 403-410에 각각 기재되어 있다. BLAST 소프트웨어는 월드와이드 웹 사이트 [ncbi.nlm.nih.gov/](http://ncbi.nlm.nih.gov/)의 National Center for Biotechnology Information을 통해 공개적으로 이용가능하다. 기본 매개 변수 또는 기타 기본이 아닌 매개 변수를 모두 사용할 수 있다. (뉴클레오티드 서열의 경우) BLASTN 프로그램은 기본값으로 단어 길이(W) 11, 기대 값(E) 10, M=5, N=-4 및 두 가닥의 비교를 사용한다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램은 기본값으로 단어 길이 3, 기대 값(E) 10, BLOSUM62 스코어링 매트릭스(Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915(1989) 참조) 정렬(B) 50, 기대 값(E) 10, M=5, N=-4 및 두 가닥의 비교를 사용한다.
- [0083] 본원에 사용된 용어 "억제하다"는 생물학적 활성의 임의의 측정 가능한 감소를 지칭한다. 따라서, 본원에서 사용되는 "억제하다" 또는 "억제"는 정상적인 활성 수준의 백분율로 지칭될 수 있다.
- [0084] 본원에 사용된 용어 "인터루킨 15" 또는 "IL15"는 생물학적으로 활성인 천연 포유류 IL15 아미노산 서열에 대한 적어도 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % 또는 99 % 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 의미한다. 즉, 이는 돌연변이된 단백질("뮤테인")이 하나 이상의 기능 분석에서 천연 IL15 단백질과 유사한 기능(75 % 이상)을 가짐을 의미한다. 기능적으로, IL15는 T 세포와 자연 살해 세포의 활성화 및 증식을 조절하는 사이토카인이다.
- [0085] IL15 및 IL2는 IL2 $\beta$ /IL15 $\beta$  수용체 서브 유닛인 CD122에 대한 결합을 포함하여 많은 생물학적 활성을 공유한다. CD8<sup>+</sup> 기억 세포의 수는 이러한 IL15와 IL2 사이의 균형에 의해 제어된다. IL15는 전사 활성화제 STAT3, STAT5 및 STAT6의 인산화 및 활성화뿐만 아니라 JAK 키나제의 활성화를 유도한다. IL15는 또한 STAT6의 전사 활성화 활성을 통해 세포 사멸 억제제 BCL2L1/BCL-x(L)의 발현을 증가시켜, 세포 사멸을 방지한다. 동일한 성숙 단백질을 인코딩하는 IL15 유전자의 두 가지 대안적으로 스플라이싱된(spliced) 전사체 변이가 보고되어 왔다.
- [0086] IL15 폴리펩티드의 예시적인 기능적 분석은 T-세포의 증식(예를 들어, Montes et al. 2005 Clin Exp Immunol 142:292) 및 NK 세포, 대식세포 및 호중구의 활성화를 포함한다. 특정 면역 세포 하위 집단의 분리 및 증식 검출(즉, <sup>3</sup>H-티미딘 혼입) 방법은 당 업계에 잘 알려져 있다. 세포-매개 세포 독성 분석은 NK 세포, 대식세포 및 호중구 활성화를 측정하는 데 사용될 수 있다. 동위 원소(<sup>51</sup>Cr), 염료(예를 들어, 테트라졸륨, 중성 적색) 또는 효소의 방출을 포함하는 세포-매개 세포 독성 분석은 또한 상업적으로 이용 가능한 키트(Oxford Biomedical Research, Oxford, M; Cambrex, Walkersville, Md.; Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 동종 업계에 널리 알려져 있다. IL15는 또한 Fas 매개 세포 사멸을 억제하는 것으로 나타났다(예를 들어, Demirci et al. 2004 Cell Mol Immunol 1:123). 예를 들어, TUNEL 분석 및 아넥신 V 분석을 포함하는 세포사멸사(apoptosis) 분석은 상업적으로 이용한 키트(R & D Systems, Minneapolis, Minn.)를 사용하여 동종 업계에 널리 알려져 있다.(예를 들어, Coliga et al. 1991-2006 Current Methods in Immunology John Wiley & Sons.)
- [0087] 본원에 사용된 용어 "인터루킨 15 수용체 알파" 또는 "IL15R $\alpha$ "는 포유 동물 종으로부터의 인터루킨 15 수용체 알파 아미노산 서열을 지칭한다. 당업자는 인터루킨-15 수용체 알파 핵산 및 아미노산 서열이 유전자 데이터베이스, 예를 들어 [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov/)의 월드와이드웹에서 National Center for Biotechnological Information을 통해 GenBank에서 공개적으로 이용 가능함을 인식할 것이다. 예시된 천연 포유류 IL-15 수용체 알파 핵산 또는 아미노산 서열은 예를 들어, 인간, 영장류, 개, 고양이, 돼지, 말, 소, 양, 설치류, 무린, 쥐, 햄스터, 기니피그 등에서 유래할 수 있다. 예시적인 천연 포유 동물 IL-15 핵산 서열에 대한 수탁 번호는 NM\_172200.1(인간 동형 2); 및 NM\_002189.2(인간 동형 1 전구체)를 포함한다. 예시적인 천연 포유류 IL-15 아미노산 서열에 대한 수탁 번호는 NP\_751950.1(인간 동형 2); 및 NP\_002180.1(인간 동형 1 전구체)를 포함한다.
- [0088] 본원에 사용된 "인터루킨 15 수용체 알파" 또는 "IL15R $\alpha$ "는 또한 적어도 하나의 기능 분석에서 천연 IL15R $\alpha$  단백질과 유사한(75 % 이상) 기능성을 가지며, 생물학적으로 활성인 천연 포유류 IL15R $\alpha$  아미노산 서열에 대한 적어도 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % 또는 99 % 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를

의미한다. IL15R α는 높은 친화력으로 IL15에 특이적으로 결합하는 사이토카인 수용체이다. 하나의 기능 분석은 천연 IL15 단백질에 대한 특이적 결합이다.

- [0089] 본원에 사용된 용어 "분리된" 분자(예를 들어, 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드)는 자연에서 보다 더 높은 농도로 존재하도록 조작되었거나 자연 환경으로부터 제거된 분자이다. 예를 들어, 대상 항체는 본질적으로 관련된 비-대상 항체 물질의 적어도 10 %, 20 %, 40 %, 50 %, 70 % 또는 90 %가 제거될 경우, 분리, 정제, 실질적으로 분리 또는 실질적으로 정제된다. 예를 들어, 살아있는 동물에 자연적으로 존재하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 "분리"되지 않지만, 자연 상태의 공존 물질로부터 분리된 동일한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 "분리"된다. 또한, 벡터에 포함된 재조합 DNA 분자는 본 발명의 목적을 위해 분리된 것으로 간주된다. 분리된 RNA 분자는 DNA 및 RNA 분자의 생체 내 또는 시험관 내 RNA 복제 생성물을 포함한다. 분리된 핵산 분자는 합성적으로 생성된 분자를 추가로 포함한다. 또한, 재조합 숙주 세포에 포함된 벡터 분자도 분리된다. 따라서, 모든 "분리된" 분자가 "정제"될 필요없다.
- [0090] 본원에 사용된 용어 "링커" 또는 "연결 세그먼트"는 2 개의 다른 분자 또는 그룹을 연결하는 분자 또는 그룹을 지칭한다. 펩티드 링커는 연결된 분자 또는 그룹이 기능적 구성을 획득하도록 할 수 있다. 링커 펩티드는 바람직하게는 적어도 2 개의 아미노산, 적어도 3 개의 아미노산, 적어도 5 개의 아미노산, 적어도 10 개의 아미노산, 적어도 15 개의 아미노산, 적어도 20 개의 아미노산, 적어도 30 개의 아미노산, 적어도 40 개의 아미노산, 적어도 50 개의 아미노산, 적어도 60 개의 아미노산, 적어도 70 개의 아미노산, 적어도 80 개의 아미노산, 적어도 90 개의 아미노산 또는 대략 100 개의 아미노산을 포함한다.
- [0091] 사이토카인 또는 기타 생리활성 분자 및 임의의 펩티드 링커와 같은 융합 단백질의 성분은 융합 단백질이 의도한 기능을 갖는다면, 거의 모든 방식으로 조직화될 수 있다. 특히, 융합 단백질의 각 성분은 원하는 경우 적어도 하나의 적합한 펩티드 링커 세그먼트 또는 서열에 의해 다른 성분으로부터 이격될 수 있다. 추가로, 융합 단백질은 예를 들어, 융합 단백질의 변형, 식별 및/또는 정제를 용이하게 하기 위해 태그를 포함할 수 있다. 보다 구체적인 융합 단백질은 아래 설명된 예에 있다.
- [0092] 본원에 사용된 용어 "저 투여량"은 임의의 인간 질병 또는 병태의 치료를 위해 주어진 투여 경로에 대해 제형화된 특정 화합물의 최저 표준 권장 투여량보다 적어도 5 %(예를 들어, 적어도 10 %, 20 %, 50 %, 80 %, 90 % 또는 심지어 95 %) 더 적은 것을 지칭한다. 예를 들어, 흡입 투여 용으로 제형화된 제제의 저 투여량은 경구 투여 용으로 제형화된 동일한 제제의 저 투여량과 상이할 것이다.
- [0093] 본원에 사용된 용어 "배지" 또는 "배지들"은 박테리아 숙주 세포, 효모 숙주 세포, 곤충 숙주 세포, 식물 숙주 세포, 진핵 숙주 세포, 포유류 숙주 세포, CHO 세포, 원핵 숙주 세포, 대장균 또는 슈도모나스 숙주 세포, 및 세포 함량을 포함하여 임의의 숙주 세포를 지지하거나 함유할 수 있는 임의의 배양 배지, 용액, 고체, 반-고체 또는 경질 지지체를 포함한다. 따라서, 이 용어는 숙주 세포가 성장하는 배지, 예를 들어 증식 단계 이전 또는 이후의 배지를 포함하여 폴리펩티드가 분비된 배지를 포함할 수 있다. 이 용어는 또한 폴리펩티드가 세포 내에서 생산되고 숙주 세포가 폴리펩티드를 방출하기 위해 용해되거나 파괴되는 경우와 같이, 숙주 세포 용해물을 함유하는 완충제 또는 시약을 포함할 수 있다.
- [0094] 본원에 사용된 용어 "조절하다"는 적절한 대조군과 비교할 때, 측정된 활성의 증가 또는 감소, 자극, 억제, 간섭 또는 차단, 직접적 또는 간접적 생성을 지칭한다. 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 "조절제"는 적합한 대조군과 비교할 때, 예를 들어 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 측정된 활성을 증가, 감소, 자극, 억제, 방해 또는 차단하는 등의 영향을 주는 물질을 지칭한다. 예를 들어, "조절제"는 측정 가능한 친화도를 갖는 표적에 결합 및/또는 활성화 또는 억제하거나, 또는 수용체 활성의 정상적인 조절에 직접 또는 간접적으로 영향을 미칠 수 있다.
- [0095] 용어 "작동 가능하게 연결된"은 제 1 및 제 2 핵산 서열이 단일 핵산 서열로 전사되도록, 제 1 핵산 서열과 제 2 핵산 서열 사이의 기능적 연결을 지칭한다. 작동 가능하게 연결된 핵산 서열은 물리적으로 서로 인접할 필요가 없다. 용어 "작동 가능하게 연결된"은 또한 핵산 발현 대조군 서열(예를 들어, 프로모터 또는 전사 인자 결합 부위의 어레이)과 전사 가능한 핵산 서열 사이의 기능적 연결을 지칭하며, 여기서 발현 대조군 서열은 전사 가능한 서열에 대응하는 핵산의 전사를 지시한다.
- [0096] 본원에 사용된 용어 "약학적으로 허용되는" 부형제, 담체 또는 희석제는 대상 약제를 신체의 하나의 기관 또는 일부로부터 신체의 다른 기관 또는 일부로 이송 또는 수송하는 것과 관련된, 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 물질과 같은 약학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클을 지칭한다. 각 담체는

제형의 다른 성분과 양립할 수 있고 환자에게 해를 끼치지 않는다는 의미에서 "허용 가능"해야 한다. 약학적으로 허용되는 담체로 작용할 수 있는 물질의 일부 예는 다음을 포함한다: 락토스, 글루코스 및 수크로스와 같은 당; 옥수수 전분 및 감자 전분과 같은 전분; 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스 및 셀룰로오스 아세테이트와 같은 셀룰로오스 및 그 유도체; 분말형 트라가칸스; 맥아; 젤라틴; 활석; 코코아 버터 및 좌약 왁스와 같은 부형제; 땅콩 유, 면실유, 홍화유, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 대두유와 같은 오일; 프로필렌 글리콜과 같은 글리콜; 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리올; 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트와 같은 에스테르; 한천; 수산화 마그네슘 및 수산화 알루미늄과 같은 완충제; 알긴산; 발열원이 없는 물; 등장 식염수; 링거 용액; 에틸 알코올; 인산염 완충액; 및 제약 제형에 사용되는 기타 무독성 호환 가능한 물질. 소듐 라우릴 설페이트, 마그네슘 스테아레이트 및 폴리에틸렌 옥사이드-폴리프로필렌 옥사이드 공중합체와 같은 습윤제, 유화제 및 윤활제뿐만 아니라 착색제, 이형제, 코팅제, 감미료, 향료 및 방향제, 방부제 및 항산화제가 또한 조성물에 존재할 수 있다.

[0097] 본원에서 사용되는 용어 "폴리뉴클레오티드", "핵산 분자", "뉴클레오티드", "올리고뉴클레오티드" 및 "핵산"은 임의 길이의 데옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드를 포함하여 뉴클레오티드의 중합체 형태를 지칭하기 위해 본원에서 상호 교환적으로 사용된다. 이들은 이중-가닥, 단일-가닥 또는 삼중 나선 서열을 모두 포함할 수 있으며, 바이러스, 원핵 및 진핵 소스로부터의 cDNA; mRNA; 바이러스(예를 들어, DNA 바이러스 및 레트로바이러스) 또는 원핵 소스로부터의 게놈 DNA 서열; RNAi; cRNA; 안티센스 분자; 재조합 폴리뉴클레오티드; 리보자임; 및 합성 DNA 서열을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 이 용어는 또한 DNA 및 RNA의 알려진 임의의 염기 유사체를 포함하는 서열을 포함한다. 뉴클레오티드는 일반적으로 허용되는 단일-문자 코드로 참조할 수 있다.

[0098] 폴리뉴클레오티드는 자연에서 나타나는 폴리뉴클레오티드로 제한되지 않고, 비천연 뉴클레오티드 유사체 및 뉴클레오티드간 결합이 나타나는 폴리뉴클레오티드도 포함한다. 핵산 분자는 변형된 핵산 분자(예를 들어, 변형된 염기, 당 및/또는 뉴클레오티드간 링커)를 포함할 수 있다. 이러한 유형의 비천연 구조의 비-제한적 예는 당이 리보스와 상이한 폴리뉴클레오티드, 포스포디에스테르 결합(3'-5' 및 2'-5')이 나타나는 폴리뉴클레오티드, 역결합(3'-3' 및 5'-5')이 나타나는 폴리뉴클레오티드 및 분기된 구조를 포함한다. 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 펩타이드 핵산(PNA), 잠금 핵산(LNA)과 같은 비천연 뉴클레오티드간 결합, 메틸포스포네이트, 포스포라미데이트, C1-C6 알킬포스포트리에스테르, 포스포로티오에이트 및 포스포로디티오에이트 유형의 C1-C4 알킬포스포네이트 결합을 포함한다. 어쨌든, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 천연 폴리뉴클레오티드와 유사한 방식으로 표적 핵산과 혼성화하는 능력을 유지한다.

[0099] 달리 지시되거나 문맥 상 명백하지 않는 한, 특정 핵산 서열은 또한 그의 보존적으로 변형된 변이체(예를 들어, 퇴화 코돈 치환) 및 상보적 서열뿐만 아니라 명시적으로 지시된 서열을 암시적으로 포함한다. 퇴화 코돈 치환은 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈의 제3 위치가 혼합 염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다.(Batzer et al. 1991 Nucleic Acid Res. 19: 5081; Ohtsuka et al. 1985 J. Biol. Chem. 260: 2605-2608; Rossolini et al. 1994 Mol. Cell. Probes 8: 91-98.)

[0100] 본원에 사용된 용어 "예방하다", "예방하는" 또는 "예방"은 질병 또는 병태의 발병, 발생, 중증도 또는 재발을 불가능, 지연, 예방 또는 중지하는 방법을 지칭한다. 예를 들어, 그 방법을 받지 못하는 피험자와 비교할 때, 질병 또는 병태에 취약한 피험자에서 질병 또는 병태 또는 하나 이상의 그 증상의 발병, 발생, 중증도 또는 재발의 감소 또는 지연이 있는 경우, 예방으로 간주된다. 개시된 방법은 또한 치료를 받기 이전 피험자의 진행과 비교할 때, 상기 방법을 받은 후 질병 또는 병태에 민감한 피험자에서 질병 또는 병태의 하나 이상의 증상의 발병, 발생, 중증도 또는 재발의 감소 또는 지연이 있는 경우, 예방으로 간주된다. 골다공증의 발병, 발생, 중증도 또는 재발의 감소 또는 지연은 약 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 %, 또는 그 사이의 임의의 양의 감소일 수 있다.

[0101] 예방 등은 피험자가 특정 질병이나 장애에 걸리지 않도록 예방하는 것을 의미하지 않는다. 예방에는 여러 번의 투여가 필요할 수 있다. 예방에는 모든 질병 증상이 제거된 피험자의 질병 재발 방지 또는 재발 경감 질병에서의 재발 방지가 포함될 수 있다.

[0102] 본원에 사용된 용어 "프로모터"는 포유 동물 세포에서 RNA 폴리머라제에 결합하고 이에 작동 가능하게 연결된 다운스트림(3' 방향) 인코딩 서열의 전사를 개시할 수 있는 DNA 조절 영역을 지칭한다. 프로모터 서열은 배경 위로 검출 가능한 수준에서 관심 유전자의 전사를 시작하는 데 필요한 최소한의 염기 또는 요소를 포함한다. 프로모터 서열 내에는 RNA 폴리머라제의 결합을 담당하는 단백질 결합 도메인(컨센서스 서열)뿐만 아니라 전사 개시 부위가 있을 수 있다. 진핵 생물 프로모터는 종종 "TATA" 박스 및 "CAT" 박스를 포함하지만, 항상 그런 것은



노산, 적어도 50 개의 아미노산, 적어도 60 개의 아미노산, 적어도 70 개의 아미노산, 적어도 80 개의 아미노산, 적어도 90 개의 아미노산 또는 대략 100 개의 아미노산을 포함한다.

- [0110] 사이토카인 또는 기타 생리활성 분자 및 임의의 펩티드 링커와 같은 융합 단백질의 성분은 융합 단백질이 의도한 기능을 갖는다면, 거의 모든 방식으로 조직화될 수 있다. 특히, 융합 단백질의 각 성분은 원하는 경우 적어도 하나의 적합한 펩티드 링커 세그먼트 또는 서열에 의해 다른 성분으로부터 이격될 수 있다. 추가로, 융합 단백질은 예를 들어, 융합 단백질의 변형, 식별 및/또는 정제를 용이하게 하기 위해 태그를 포함할 수 있다. 보다 구체적인 융합 단백질은 아래 설명된 예에 있다.
- [0111] 본원에 사용된 용어 "저 투여량"은 임의의 인간 질병 또는 병태의 치료를 위해 주어진 투여 경로에 대해 제형화된 특정 화합물의 최저 표준 권장 투여량보다 적어도 5%(예를 들어, 적어도 10%, 20%, 50%, 80%, 90% 또는 심지어 95%) 더 적은 것을 지칭한다. 예를 들어, 흡입 투여 용으로 제형화된 제제의 저 투여량은 경구 투여 용으로 제형화된 동일한 제제의 저 투여량과 상이할 것이다.
- [0112] 본원에 사용된 용어 "배지" 또는 "배지들"은 박테리아 숙주 세포, 효모 숙주 세포, 곤충 숙주 세포, 식물 숙주 세포, 진핵 숙주 세포, 포유류 숙주 세포, CHO 세포, 원핵 숙주 세포, 대장균 또는 슈도모나스 숙주 세포, 및 세포 함량을 포함하여 임의의 숙주 세포를 지지하거나 함유할 수 있는 임의의 배양 배지, 용액, 고체, 반-고체 또는 경질 지지체를 포함한다. 따라서, 이 용어는 숙주 세포가 성장하는 배지, 예를 들어 증식 단계 이전 또는 이후의 배지를 포함하여 폴리펩티드가 분비된 배지를 포함할 수 있다. 이 용어는 또한 폴리펩티드가 세포 내에서 생산되고 숙주 세포가 폴리펩티드를 방출하기 위해 용해되거나 파괴되는 경우와 같이, 숙주 세포 용해물을 함유하는 완충제 또는 시약을 포함할 수 있다.
- [0113] 본원에 사용된 용어 "조절하다"는 적절한 대조군과 비교할 때, 측정된 활성의 증가 또는 감소, 자극, 억제, 간섭 또는 차단, 직접적 또는 간접적 생성을 지칭한다. 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 "조절제"는 적합한 대조군과 비교할 때, 예를 들어 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 측정된 활성을 증가, 감소, 자극, 억제, 방해 또는 차단하는 등의 영향을 주는 물질을 지칭한다. 예를 들어, "조절제"는 측정 가능한 친화도를 갖는 표적에 결합 및/또는 활성화 또는 억제하거나, 또는 수용체 활성의 정상적인 조절에 직접 또는 간접적으로 영향을 미칠 수 있다.
- [0114] 용어 "작동 가능하게 연결된"은 제 1 및 제 2 핵산 서열이 단일 핵산 서열로 전사되도록, 제 1 핵산 서열과 제 2 핵산 서열 사이의 기능적 연결을 지칭한다. 작동 가능하게 연결된 핵산 서열은 물리적으로 서로 인접할 필요가 없다. 용어 "작동 가능하게 연결된"은 또한 핵산 발현 대조군 서열(예를 들어, 프로모터 또는 전사 인자 결합 부위의 어레이)과 전사 가능한 핵산 서열 사이의 기능적 연결을 지칭하며, 여기서 발현 대조군 서열은 전사 가능한 서열에 대응하는 핵산의 전사를 지시한다.
- [0115] 본원에 사용된 용어 "약학적으로 허용되는" 부형제, 담체 또는 희석제는 대상 약제를 신체의 하나의 기관 또는 일부로부터 신체의 다른 기관 또는 일부로 이송 또는 수송하는 것과 관련된, 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 물질과 같은 약학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클을 지칭한다. 각 담체는 제형의 다른 성분과 양립할 수 있고 환자에게 해를 끼치지 않는다는 의미에서 "허용 가능"해야 한다. 약학적으로 허용되는 담체로 작용할 수 있는 물질의 일부 예는 다음을 포함한다: 락토스, 글루코스 및 수크로스, 같은 당; 옥수수 전분 및 감자 전분과 같은 전분; 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스 및 셀룰로오스 아세테이트와 같은 셀룰로오스 및 그 유도체; 분말형 트라가칸스; 맥아; 젤라틴; 활석; 코코아 버터 및 좌약 왁스와 같은 부형제; 땅콩 유, 면실유, 홍화유, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 대두유와 같은 오일; 프로필렌 글리콜과 같은 글리콜; 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리올; 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트와 같은 에스테르; 한천; 수산화 마그네슘 및 수산화 알루미늄과 같은 완충제; 알긴산; 발열원이 없는 물; 등장 식염수; 링거 용액; 에틸 알코올; 인산염 완충액; 및 제약 제형에 사용되는 기타 무독성 호환 가능한 물질. 소듐 라우릴 설페이트, 마그네슘 스테아레이트 및 폴리에틸렌 옥사이드-프로필렌 옥사이드 공중합체와 같은 습윤제, 유화제 및 윤활제뿐만 아니라 착색제, 이형제, 코팅제, 감미료, 향료 및 방향제, 방부제 및 항산화제가 또한 조성물에 존재할 수 있다.
- [0116] 본원에서 사용되는 용어 "폴리뉴클레오티드", "핵산 분자", "뉴클레오티드", "올리고뉴클레오티드" 및 "핵산"은 임의의 길이의 데옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드를 포함하여 뉴클레오티드의 중합체 형태를 지칭하기 위해 본원에서 상호 교환적으로 사용된다. 이들은 이중-가닥, 단일-가닥 또는 삼중 나선 서열을 모두 포함할 수 있으며, 바이러스, 원핵 및 진핵 소스로부터의 cDNA; mRNA; 바이러스(예를 들어, DNA 바이러스 및 레트로바이러스) 또는 원핵 소스로부터의 게놈 DNA 서열; RNAi; cRNA; 안티센스 분자; 재조합 폴리뉴클레오티드; 리보자임;

및 합성 DNA 서열을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 이 용어는 또한 DNA 및 RNA의 알려진 임의의 염기 유사체를 포함하는 서열을 포함한다. 뉴클레오티드는 일반적으로 허용되는 단일-문자 코드로 참조할 수 있다.

[0117] 폴리뉴클레오티드는 자연에서 나타나는 폴리뉴클레오티드로 제한되지 않고, 비천연 뉴클레오티드 유사체 및 뉴클레오티드간 결합이 나타나는 폴리뉴클레오티드도 포함한다. 핵산 분자는 변형된 핵산 분자(예를 들어, 변형된 염기, 당 및/또는 뉴클레오티드간 링커)를 포함할 수 있다. 이러한 유형의 비천연 구조의 비-제한적 예는 당이 리보스와 상이한 폴리뉴클레오티드, 포스포디에스테르 결합(3'-5' 및 2'-5')이 나타나는 폴리뉴클레오티드, 역결합(3'-3' 및 5'-5')이 나타나는 폴리뉴클레오티드 및 분기된 구조를 포함한다. 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 펩타이드 핵산(PNA), 잠금 핵산(LNA)과 같은 비천연 뉴클레오티드간 결합, 메틸포스포네이트, 포스포라미데이트, C1-C6 알킬포스포트리에스테르, 포스포로티오에이트 및 포스포로디티오에이트 유형의 C1-C4 알킬포스포네이트 결합을 포함한다. 어쨌든, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 천연 폴리뉴클레오티드와 유사한 방식으로 표적 핵산과 혼성화하는 능력을 유지한다.

[0118] 달리 지시되거나 문맥 상 명백하지 않는 한, 특정 핵산 서열은 또한 그의 보존적으로 변형된 변이체(예를 들어, 퇴화 코돈 치환) 및 상보적 서열뿐만 아니라 명시적으로 지시된 서열을 암시적으로 포함한다. 퇴화 코돈 치환은 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈의 제3 위치가 혼합 염기 및/또는 테옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다.(Batzer et al. 1991 Nucleic Acid Res. 19: 5081; Ohtsuka et al. 1985 J. Biol. Chem. 260: 2605-2608; Rossolini et al. 1994 Mol. Cell. Probes 8: 91-98.)

[0119] 본원에 사용된 용어 "예방하다", "예방하는" 또는 "예방"은 질병 또는 병태의 발병, 발생, 중증도 또는 재발을 불가능, 지연, 예방 또는 중지하는 방법을 지칭한다. 예를 들어, 그 방법을 받지 못하는 피험자와 비교할 때, 질병 또는 병태에 취약한 피험자에서 질병 또는 병태 또는 하나 이상의 그 증상의 발병, 발생, 중증도 또는 재발의 감소 또는 지연이 있는 경우, 예방으로 간주된다. 개시된 방법은 또한 치료를 받기 이전 피험자의 진행과 비교할 때, 상기 방법을 받은 후 질병 또는 병태에 민감한 피험자에서 질병 또는 병태의 하나 이상의 증상의 발병, 발생, 중증도 또는 재발의 감소 또는 지연이 있는 경우, 예방으로 간주된다. 골다공증의 발병, 발생, 중증도 또는 재발의 감소 또는 지연은 약 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 %, 또는 그 사이의 임의의 양의 감소일 수 있다.

[0120] 예방 등은 피험자가 특정 질병이나 장애에 걸리지 않도록 예방하는 것을 의미하지 않는다. 예방에는 여러 번의 투여가 필요할 수 있다. 예방에는 모든 질병 증상이 제거된 피험자의 질병 재발 방지 또는 재발 경감 질병에서의 재발 방지가 포함될 수 있다.

[0121] 본원에 사용된 용어 "프로모터"는 포유 동물 세포에서 RNA 폴리머라제에 결합하고 이에 작동 가능하게 연결된 다운스트림(3' 방향) 인코딩 서열의 전사를 개시할 수 있는 DNA 조절 영역을 지칭한다. 프로모터 서열은 배경 위로 검출 가능한 수준에서 관심 유전자의 전사를 시작하는 데 필요한 최소한의 염기 또는 요소를 포함한다. 프로모터 서열 내에는 RNA 폴리머라제의 결합을 담당하는 단백질 결합 도메인(컨센서스 서열)뿐만 아니라 전사 개시 부위가 있을 수 있다. 진핵 생물 프로모터는 종종 "TATA" 박스 및 "CAT" 박스를 포함하지만, 항상 그런 것은 아니다. 프로모터는 핵산 분자에 자연적으로 인접하는 것과 핵산 분자에 자연적으로 인접하지 않은 것을 포함한다. 추가로, 용어 "프로모터"는 유도성 프로모터, 조건부 활성 프로모터, 예컨대 크레-록스(cre-lox) 프로모터, 구성적 프로모터 및 조직 특이적 프로모터를 포함한다.

[0122] 본원에서 사용되는 용어 "단백질" 및 "폴리펩티드"는 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 상호 교환적으로 사용되며, 최소 길이로 제한되지 않는다. 따라서, 펩티드, 올리고펩티드, 이량체, 다량체 등이 정의 내에 포함된다. 전장(full-length) 단백질 및 이의 단편은 모두 정의에 포함된다. 이 용어는 또한 폴리펩티드의 발현 후 변형, 예를 들어 글리코실화, 아세틸화, 인산화 등을 포함한다. 더욱이, 폴리펩티드는 단백질이 요구되는 활성을 유지하는 한, 천연 서열에 대한 결실, 첨가 및 치환(일반적으로 본질적으로 보존적)과 같은 변형을 포함하는 단백질을 지칭할 수 있다. 이러한 변형은 의도적이거나 우발적일 수 있다. 아미노산은 일반적으로 알려진 세 글자 기호 또는 IUPAC-IUB 생화학 명명위원회에서 권장하는 한 글자 기호로 여기서 참조될 수 있다.

[0123] 본원에 사용된 용어 "정제된"은 자연 발생 환경, 즉 천연 세포 또는 재조합으로 생산된 단백질의 경우 숙주 세포에서 발견되는 바와 같이, 단백질과 정상적으로 동반 또는 상호 작용하는 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 없을 수 있는 단백질을 지칭한다. 세포 물질이 실질적으로 없을 수 있는 단백질은 약 30 % 미만, 약 20 % 미만, 약 15 % 미만, 약 10 % 미만, 약 5 % 미만, 약 4 % 미만, 약 3 % 미만, 약 2 % 미만, 또는 약 1 % 미만(건조 중량 기준)의 오염 단백질(들)을 갖는 단백질 제제를 포함한다. 단백질 또는 이의 변이체가 숙주 세포에 의해 재조합적으로 생성될 때, 단백질은 약 30 %, 약 20 %, 약 15 %, 약 10 %, 약 5 %, 약 4 %, 약 3 %, 약 2 % 또

는 약 1 % 이하의 세포 건조 중량으로 존재할 수 있다. 단백질 또는 이의 변이체가 숙주 세포에 의해 재조합적으로 생산될 때, 단백질은 약 5g/L, 약 4g/L, 약 3g/L, 약 2g/L, 약 1g/L, 약 750 mg/L, 약 500 mg/L, 약 250 mg/L, 약 100 mg/L, 약 50 mg/L, 약 10 mg/L, 또는 약 1 mg/L 이하의 세포 건조 중량으로 배양 배지에 존재할 수 있다. 따라서, "실질적으로 정제된" 단백질은 SDS/PAGE 분석, RP-HPLC, SEC 및 모세관 전기영동과 같은 적절한 방법에 의해 결정될 때, 적어도 약 80 %의 순도 수준, 구체적으로는 적어도 약 85 %의 순도 수준, 보다 구체적으로는 적어도 약 90 %의 순도 수준, 적어도 약 95 %의 순도 수준, 적어도 약 99 % 이상의 순도 수준을 가질 수 있다.

- [0124] 본 발명의 단백질 및 프로드러그는 이들의 제조 후에 바람직하게는 분리 및/또는 정제되어, 80 % 이상("실질적으로 순수한")의 중량을 함유하는 조성물을 수득한 다음, 또는 본원에 기재된 바와 같이 사용 또는 제형화된다. 특정 실시 예에서, 본 발명의 화합물은 95 % 이상의 순도를 갖는다.
- [0125] 본원에 사용된 용어 "수용체"는 리간드라고 불리는 다른 분자와 상호 작용할 수 있는 당 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 단백질을 지칭한다. 리간드는 모든 종류의 생화학적 또는 화학적 화합물에 속할 수 있다. 리간드는 수용체에 결합할 때, 신호 전달 경로의 개시와 같이 세포 반응을 일반적으로 개시하는 세포 외 분자이다. 수용체는 반드시 멤브레인-결합 단백질일 필요는 없다.
- [0126] 핵산 분자와 관련하여 본원에 사용된 용어 "재조합"은 게놈, cDNA, 바이러스, 반합성 및/또는 합성 기원의 폴리뉴클레오티드를 의미하며, 이는 그 기원 또는 조작에 의해 자연적으로 결합된 폴리뉴클레오티드의 전부 또는 일부와 결합되지 않는다. 단백질 또는 폴리펩티드와 관련하여 사용되는 용어 "재조합"은 재조합 폴리뉴클레오티드의 발현에 의해 생성된 폴리펩티드를 의미한다. 숙주 세포와 관련하여 사용되는 용어 "재조합"은 재조합 폴리뉴클레오티드가 도입된 숙주 세포를 의미한다.
- [0127] 본원에서 사용되는 용어 "샘플"은 인간, 동물 또는 연구 샘플, 예를 들어 세포, 조직, 기관, 유체, 가스, 에어로졸, 슬러리, 콜로이드 또는 응고된 물질로부터의 샘플을 의미한다. "샘플"은 예를 들어, 인간 또는 동물로부터 제거하지 않고 생체 내에서 테스트될 수 있거나, 시험관 내에서 테스트될 수 있다. 샘플은 처리 후, 예를 들어 조직학적 방법에 의해 테스트될 수 있다. "샘플"은 또한, 예를 들어 유체 또는 조직 샘플을 포함하는 세포, 또는 유체 또는 조직 샘플로부터 분리된 세포를 지칭한다. "샘플"은 또한 인간 또는 동물로부터 갖 채취한 세포, 조직, 기관 또는 유체, 또는 처리되거나 저장되는 세포, 조직, 기관 또는 유체를 지칭할 수 있다.
- [0128] 본원에 사용된 용어 "가용성"은 저 중력 원심 분리(예를 들어, 표준 원심 분리기에서 분당 약 30,000 회전 미만) 하에서 수성 완충액, 예를 들어 세포 배지로부터 쉽게 침전되지 않는 용해 분자, 특히 용해 단백질을 의미한다. 용해 분자는 음이온성 또는 비-이온성 세정제의 농도가 낮거나 없는 상태에서, 약 5-37°C 이상의 온도 및 중성 pH 또는 그 근처에서 수용액 내에 남아 있으면, 가용성이다. 이러한 조건 하에서, 가용성 단백질은 종종 낮은 침전 값, 예를 들어 약 10 내지 50 스베드버그 단위 미만을 갖는다.
- [0129] 본원에서 언급된 수용액은 전형적으로 pH를 확립하기 위해 전형적으로 약 5-9의 pH 범위 및 약 2mM 내지 500mM의 이온 강도 범위 내에 있는 완충 화합물을 갖는다. 때때로, 프로테아제 억제제 또는 순환 비-이온성 세정제가 추가된다. 추가로, 원하는 경우 캐리어 단백질(예를 들어, 소 혈청 알부민)을 첨가할 수 있다. 예시적인 수성 완충액은 표준 인산염 완충 식염수, 트리스 완충 식염수, 또는 기타 잘 알려진 완충액 및 세포 배지 제형을 포함한다.
- [0130] 본원에 사용된 용어 "가용성 IL15 수용체 알파"는 수용체의 막관통 앵커 부분이 결여되어, 원형질막에 고정되지 않고 세포 밖으로 분비될 수 있는 IL15 수용체 알파의 형태를 의미한다.
- [0131] 본원에 사용된 용어 "자극하다" 또는 "자극하는"은 생리적 활성화, 예를 들어 면역 반응을 증가, 증폭, 증강, 증진시키는 것을 지칭한다. 자극은 긍정적인 변화가 될 수 있다. 예를 들어, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % 또는 심지어 90-100 %까지 증가할 수 있다. 다른 예시적인 증가는 2 배, 5 배, 10 배, 20 배, 40 배 또는 심지어 100 배를 포함한다.
- [0132] 본원에서 사용되는 용어 "피험자" 및 "환자"는 살아있는 동물(인간 또는 비-인간)을 지칭하기 위해 본원에서 상호 교환적으로 사용된다. 피험자는 포유류일 수 있다. 용어 "포유 동물" 또는 "포유류"는 분류학적 분류 포유류 내의 임의의 동물을 지칭한다. 포유류는 인간 또는 인간이 아닌 포유류, 예를 들어 개, 고양이, 돼지, 소, 양, 염소, 말, 쥐 및 생쥐일 수 있다. 용어 "피험자"는 질병 또는 병태에 대해 완전히 정상이거나 모든면에서 정상인 개인을 배제하지 않는다.
- [0133] 본원에 사용된 용어 "억제하다" 또는 "억제하는"은 생리적 활성화, 예를 들어 면역 반응을 감소시키거나, 경감시

키거나, 약화시키거나, 정지시키거나 안정화시키는 것을 지칭한다. 억제는 부정적인 변화일 수 있다. 예를 들어, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % 또는 심지어 90-100 %까지 감소할 수 있다. 예시적인 감소는 2 배, 5 배, 10 배, 20 배, 40 배, 또는 심지어 100 배를 포함한다.

[0134] 본원에 사용된 용어 "치료적 유효량"은 바람직하지 않은 부작용을 최소화하거나 전혀없이 의도된 치료 효과를 달성하기에 충분한 치료제 또는 제제의 투여량을 지칭한다. 치료적 유효량은 예를 들어, 먼저 저 투여량의 약리학 적 제제(들)를 투여한 다음, 바람직하지 않은 부작용을 최소화하거나 전혀없이 원하는 치료 효과가 달성될 때까지, 투여량을 점진적으로 증가시킴으로써, 숙련된 의사에 의해 쉽게 결정될 수 있다.

[0135] 본원에 사용된 용어 "형질 감염된"은 리포펙타민과 같은 임의의 동반 촉진제를 사용하거나 사용하지 않고 도입된 DNA 또는 RNA를 보유하는 것을 의미한다. 당 업계에 공지된 형질 감염 방법은 예를 들어, 인산 칼슘 형질 감염, DEAE 텍스트란 형질 감염, 원형질체 융합, 전기 천공법 및 리포펙션을 포함한다.

[0136] 본원에 사용된 용어 질병 또는 장애를 "치료" 또는 "치료하는"은 발병 이전 또는 발병 이후에, 그러한 병태 또는 그러한 질병 또는 병태의 하나 이상의 증상을 감소, 지연 또는 개선하는 방법을 지칭한다. 치료는 질병 및/또는 기저 병리의 하나 이상의 효과 또는 증상을 겨냥할 수 있다. 치료는 임의의 감소일 수 있고, 질병 또는 질병 증상의 완전한 제거일 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 동등한 미치료리 대조군과 비교하여, 그러한 감소 또는 예방 정도는 임의의 표준 기술에 의해 측정된 바와 같이, 적어도 5 %, 10 %, 20 %, 40 %, 50 %, 60 %, 80 %, 90 %, 95 % 또는 100 %이다.

[0137] 본원에 사용된 용어 "종양"은 임의의 악성 세포 또는 신생물 세포를 지칭한다.

[0138] 본원에 사용된 용어 "백터"는 유전 물질을 숙주 세포 또는 유기체에 전달할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 백터는 DNA 또는 RNA로 구성될 수 있다. 백터는 자체 복제 기점, 외래 DNA 삽입에 사용될 수 있는 제한 엔도뉴클레아제를 위한 하나 이상의 고유한 인식 부위, 항생제 내성을 위해 인코딩하는 유전자와 같은 통상적인 선택 가능한 마커, 종종 삽입된 DNA의 발현을 위한 인식 서열(예를 들어, 프로모터)을 가진다. 일반적인 백터는 플라스미드 백터와 파지 백터를 포함한다.

[0139] 본원에 개시된 임의의 조성물 또는 방법은 본원에 제공된 임의의 다른 조성물 및 방법 중 하나 이상과 조합될 수 있다.

[0140] **발명의 상세한 설명**

[0141] 본 발명은 신규 융합 단백질 및 이의 치료 용도를 제공한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 치료 중에 감소된 오프-표적 독성 및 부작용을 가지면서 다양한 질병 및 장애, 예를 들어 과다 형성, 고형 종양 또는 조혈 악성 종양을 치료하는데 유용한 IL15의 신규 융합 단백질 및 이의 프로드러그, 이의 조성물 및 제조 방법을 제공한다.

[0142] 일 측면에서, 본 발명은 일반적으로 융합 단백질에 관한 것이다. 융합 단백질은 제 1 구조 유닛: 인터루킨 15 수용체(IL15R)의 서브 유닛 또는 이의 단편; 제 2 구조 유닛: 활성 IL15; 제 3 구조 유닛: 융합 단백질의 C-말단에 위치하는 항체 Fc 단편; 및 제 1, 제 2 및 제 3 구조 유닛을 공유적으로 연결하는 제 1 링커 세그먼트를 포함하고, 여기서 융합 단백질의 N-말단에 제 1 구조 유닛이 있고, 제 2 구조 유닛이 제 1 구조 유닛과 제 3 구조 유닛 사이에 위치한다.

[0143] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 융합 단백질에 관한 것이다. 융합 단백질은 제 1 구조 유닛: 인터루킨 15 수용체(IL15R)의 서브 유닛 또는 이의 단편; 제 2 구조 유닛: 활성 IL15; 제 3 구조 유닛: 융합 단백질의 C-말단에 위치하는 항체 Fc 단편; 및 제 1, 제 2 및 제 3 구조 유닛을 공유적으로 연결하는 제 1 링커 세그먼트를 포함하고, 여기서 융합 단백질의 N-말단에 제 2 구조 유닛이 있고, 제 1 구조 유닛은 제 2 구조 유닛과 제 3 구조 유닛 사이에 위치한다.

[0144] 융합 단백질의 특정 실시 예에서, IL15R의 서브 유닛은  $\alpha$  서브 유닛,  $\beta$  서브 유닛 및  $\gamma$  서브 유닛으로부터 선택된다.

[0145] 융합 단백질의 특정 실시 예에서, IL15R의 서브 유닛은  $\alpha$  서브 유닛이다.

[0146] 융합 단백질의 특정 실시 예에서, 단편은 서열 번호 4에 제시된 아미노산 서열을 갖는 생쥐 IL15R의  $\alpha$  서브 유닛의 스시 도메인이다.

[0147] 융합 단백질의 특정 실시 예에서, 단편은 서열 번호 5에 제시된 아미노산 서열을 갖는 인간 IL15R의  $\alpha$  서브 유닛의 스시 도메인이다.

- [0148] 융합 단백질의 특정 실시 예에서, IL15는 인간 또는 뮤린 IL15이다.
- [0149] 융합 단백질의 특정 실시 예에서, IL15는 생쥐 IL15이다. 융합 단백질의 특정 실시 예에서, 생쥐 IL15는 서열 번호 1에 제시된 아미노산 서열을 갖는다.
- [0150] 융합 단백질의 특정 실시 예에서, IL15는 인간 IL15이다. 융합 단백질의 특정 실시 예에서, 인간 IL15는 서열 번호 2에 제시된 아미노산 서열을 갖는다.
- [0151] 융합 단백질의 특정 실시 예에서, 항체 Fc 단편은 인간 Fc 단편을 포함한다.
- [0152] 융합 단백질의 특정 실시 예에서, 인간 Fc 단편은 서열 번호 3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 인간 IgG1-Fc를 포함한다.
- [0153] 융합 단백질의 특정 실시 예에서, 링커 세그먼트(L1)는 다수의 GGGs를 포함한다.
- [0154] 융합 단백질의 특정 실시 예에서, 제 1 구조 유닛을 제 3 구조 유닛에 연결하는 링커 세그먼트(L1)는 서열 번호 9에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0155] 융합 단백질의 특정 실시 예에서, 제 1 및 제 2 구조 유닛을 연결하는 링커 세그먼트(L1)은 서열 번호 8에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0156] 특정 실시 예에서, 융합 단백질은 융합 단백질의 N-말단에 위치하는 제 4 구조 유닛: IL15 수용체  $\beta$  서브 유닛 (R $\beta$ )의 세포 외 도메인; 및 융합 단백질의 제 4 구조 유닛과 나머지 구조 유닛을 공유적으로 연결하는 링커 세그먼트(L2)를 포함하며, 여기서 제 1 구조 유닛은 제 4 구조 유닛의 C-말단에 공유적으로 연결되고, 제 2 구조 유닛은 제 1 구조 유닛 및 제 3 구조 유닛 사이에 위치하고, 여기서 링커 세그먼트(L2)는 종양 미세 환경에서 특이적으로 발현되는 단백질 분해 효소에 의해 인식되고 가수 분해될 수 있다.
- [0157] 특정 실시 예에서, 융합 단백질은 융합 단백질의 N-말단에 위치하는 제 4 구조 유닛: IL15 수용체  $\beta$  서브 유닛 (R $\beta$ )의 세포 외 도메인; 및 융합 단백질의 제 4 구조 유닛과 나머지 구조 유닛을 공유적으로 연결하는 링커 세그먼트(L2)를 더 포함하며, 여기서 제 2 구조 유닛은 제 4 구조 유닛의 C-말단에 공유적으로 연결되고, 제 1 구조 유닛은 제 2 구조 유닛 및 제 3 구조 유닛 사이에 위치하고, 여기서 링커 세그먼트(L2)는 종양 미세 환경에서 특이적으로 발현되는 단백질 분해 효소에 의해 인식되고 가수 분해될 수 있다.
- [0158] 특정 실시 예에서, 생쥐 R $\beta$ 의 아미노산 서열은 서열 번호 6에 제시된 아미노산 서열을 갖는다.
- [0159] 특정 실시 예에서, 인간 R $\beta$ 의 아미노산 서열은 서열 번호 7에 제시된 아미노산 서열을 갖는다.
- [0160] 융합 단백질의 특정 실시 예에서, 종양 미세 환경에서 특이적으로 발현되는 단백질 분해 효소는 매트릭스 메탈로프로테이나제이다.
- [0161] 융합 단백질의 특정 실시 예에서, 매트릭스 메탈로프로테이나제는 매트릭스 메탈로프로테이나제 9(MMP9)이다.
- [0162] 융합 단백질의 특정 실시 예에서, 매트릭스 메탈로프로테이나제는 매트릭스 메탈로프로테이나제 14(MMP14)이다.
- [0163] 융합 단백질의 특정 실시 예에서, 링커 세그먼트(L2)는 서열 번호 10-23에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0164] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 본원에 개시된 융합 단백질을 포함하는 동종 이량체 또는 이종 이량체 단백질에 관한 것이다.
- [0165] 특정 실시 예에서, 동종 이량체 또는 이종 이량체 단백질은 RA-IL15-Fc의 모노머: 뮤린 IL15 수용체  $\alpha$  서브 유닛의 스시 도메인, 링커 세그먼트(L1), 뮤린 IL15, 링커 세그먼트(L1), 예를 들어 서열 번호 24에 제시된 아미노산 서열을 갖는 인간 IgG1 Fc의 융합 단백질을 포함한다.
- [0166] 특정 실시 예에서, 동종 이량체 또는 이종 이량체 단백질은 RA-IL15-Fc의 모노머: 인간 IL15 수용체  $\alpha$  서브 유닛의 스시 도메인, 링커 세그먼트(L1), 인간 IL15, 링커 세그먼트(L1), 예를 들어 서열 번호 25에 제시된 아미노산 서열을 갖는 인간 IgG1 Fc의 융합 단백질을 포함한다.
- [0167] 특정 실시 예에서, 동종 이량체 또는 이종 이량체 단백질은 IL15-RA-Fc의 모노머: 뮤린 IL15, 링커 세그먼트(L1), IL15 수용체  $\alpha$  서브 유닛의 스시 도메인, 링커 세그먼트(L1), 예를 들어 서열 번호 26에 제시된 아미노산 서열을 갖는 인간 IgG1 Fc의 융합 단백질을 포함한다. .

- [0168] 특정 실시 예에서, 동종 이량체 또는 이종 이량체 단백질은 IL15-RA-Fc의 모노머: 인간 IL15, 링커 세그먼트(L1), IL15 수용체  $\alpha$  서브 유닛의 스시 도메인, 링커 세그먼트(L1), 예를 들어 서열 번호 27에 제시된 아미노산 서열을 갖는 인간 IgG1 Fc의 융합 단백질을 포함한다
- [0169] 특정 실시 예에서, 동종 이량체 또는 이종 이량체 단백질은 RB-IL15-RA-Fc의 모노머: 생쥐 IL15 수용체  $\beta$  서브 유닛의 세포 외 도메인, 링커 세그먼트(L2), 뮤린 IL15, 링커 세그먼트(L1), 스시 IL15 수용체  $\alpha$  서브 유닛의 도메인, 링커 세그먼트(L1), 예를 들어 서열 번호 28에 제시된 아미노산 서열을 갖는 인간 IgG1 Fc의 융합 단백질을 포함한다
- [0170] 특정 실시 예에서, 동종 이량체 또는 이종 이량체 단백질은 RB-IL15-RA-Fc의 모노머: 인간 IL15 수용체  $\beta$  서브 유닛의 세포 외 도메인, 링커 세그먼트(L2), 인간 IL15, 링커 세그먼트(L1), 스시 IL15 수용체  $\alpha$  서브 유닛의 도메인, 링커 세그먼트(L1), 예를 들어 서열 번호 29-41에 제시된 아미노산 서열을 갖는 인간 IgG1 Fc의 융합 단백질을 포함한다
- [0171] 특정 실시 예에서, 동종 이량체 또는 이종 이량체 단백질은 RB-IL15-RA-Fc의 모노머: 인간 IL15 수용체  $\beta$  서브 유닛의 세포 외 도메인, 링커 세그먼트(L1), 인간 IL15, 링커 세그먼트(L1), 스시 IL15 수용체  $\alpha$  서브 유닛의 도메인, 링커 세그먼트(L1), 예를 들어 서열 번호 42에 제시된 아미노산 서열을 갖는 인간 IgG1 Fc의 융합 단백질을 포함한다
- [0172] 특정 실시 예에서, 동종 이량체 또는 이종 이량체 단백질은 종양 미세 환경에서 특이적으로 발현되는 단백질 분해 효소에 의해 가수 분해된다.
- [0173] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 본원에 개시된 융합 단백질 또는 단편과 같은 실질적으로 정제된 단백질에 관한 것이다.
- [0174] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 본원에 개시된 융합 단백질 또는 이의 단편과 같은 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.
- [0175] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 본원에 개시된 융합 단백질 또는 이의 단편과 같은 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0176] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 본원에 개시된 융합 단백질 또는 그의 단편과 같은 단백질 및 약학적으로 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0177] 또 다른 측면에서, 본 발명은 예컨대 본원에 개시된 융합 단백질 또는 그의 단편과 같은 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약학 조성물 및 약학적으로 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제에 관한 것이다.
- [0178] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 질병 또는 병태를 치료하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 본원에 개시된 융합 단백질 또는 이의 단편과 같은 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 질병 또는 병태는 과다 형성, 고형 종양 또는 조혈 악성 종양으로부터 선택된다.
- [0179] 특정 실시 예에서, 치료되는 질병 또는 병태는 과다 형성이다.
- [0180] 특정 실시 예에서, 치료되는 질병 또는 병태는 고형 종양이다.
- [0181] 특정 실시 예에서, 치료되는 질병 또는 병태는 조혈 악성 종양이다.
- [0182] 특정 실시 예에서, 치료되는 피험자에게는 화학 요법, 방사선 요법, 표적 요법, 면역 요법 또는 호르몬 요법 중 하나 이상이 추가로 처치된다.
- [0183] 특정 실시 예에서, 방법은 화학 요법 제를 피험자에게 투여하는 것을 추가로 포함한다.
- [0184] 특정 실시 예에서, 방법은 대상체에게 방사선 요법을 하는 것을 추가로 포함한다.
- [0185] 특정 실시 예에서, 방법은 표적 요법을 대상체에게 하는 것을 추가로 포함한다.
- [0186] 특정 실시 예에서, 방법은 대상체에게 면역 요법을 하는 것을 추가로 포함한다.
- [0187] 특정 실시 예에서, 방법은 대상체에게 호르몬 요법을 하는 것을 추가로 포함한다.
- [0188] 본원에 사용된 용어 "화학 요법 제"는 암 치료에 유용한 화합물을 지칭한다. 화학 요법 제의 예로는 에를로티닙

(Erlotinib)(TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), 보르테조마이브(Bortezomib)(VELCADE®, Millennium Pharm.), 풀베스트란트(Fulvestrant)(FASLODEX®, AstraZeneca), 수텐트(Sutent)(SU11248, Pfizer), 레트로졸(Letrozole)(FEMARA®, Novartis), 이마티니브 메실레이트(Imatinib mesylate)(GLEEVEC®, Novartis), PTK787/ZK 222584(Novartis), 옥살리플라틴(Oxaliplatin)(Eloxatin®, Sanofi), 5-FU(5-fluorouracil), 류코보린(Leucovorin), 라파마이신(Rapamycin)(Sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), 라파티니브(Lapatinib)(TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), 로나파니브(Lonafarnib)(SCH 66336), 소라페니브(Sorafenib)(BAY43-9006, Bayer Labs) 및 게피티니브(Gefitinib)(IRESSA®, AstraZeneca), AG1478, AG1571(SU 5271; Sugen), 티오테파 및 CYTOXAN®과 같은 알킬화제, 사이클로스포스파미드; 부설판, 임프로설판 및 피포설판과 같은 알킬 설포네이트; 벤조도파, 카보쿠 온, 메투레도파 및 우레도파와 같은 아지리딘; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸오멜라민을 포함하는 에틸렌이민 및 메틸라멜아민; 아세토게닌(특히, 불라타신 및 불라타시논); 캄프토테신(합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스트아틴; CC-1065(아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 크립토피신(특히, 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 둘라스타틴; 듀오카르마이신(합성 유사체, KW-2189 및 CBI-TM1 포함); 엘레우테로빈(eleutherobin); 판크라티스타틴; 사코딕틴(sarcodictyin); 스펜지스타틴; 클로람부실, 클로마파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드와 같은 질소 머스타드; 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라님누스틴과 같은 니트로수레아; 엔디인 항생제(예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감말 및 칼리케아미신 오메갈(Angew Chem. Intl. Ed. Engl.(1994) 33: 183-186))와 같은 항생제; 다이네미신(dynemicin) A를 포함하는 다이네미신; 클로드로네이트와 같은 비스포스포네이트; 에스페라미신(esperamicin); 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 색소 단백질 에네다인 항생제 발색단, 아클라시노미신스(aclacinomysins), 악티노마이신, 아우트라마이신(authramycin), 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신(cactinomycin), 카라비신(carabicin), 카미노마이신(caminomycin), 카르치노필린(carzinophilin), 크로모마이시니스(chromomycinis), 닥티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신, 데토루비신(detorubicin), 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, ADRIAMYCIN®(독소루비신), 모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 테옥시독소루비신, 에피루비신, 예소니비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신 C와 같은 미토마이신, 마이코페놀산, 노갈라마이신(nogalamycin), 올리보마이신, 페플로마이신(peplomycin), 포르피로마이신(porfiromycin), 퓨로마이신, 켈라마이신, 로도루비신, 스트랩토니그린, 스트랩토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 메토티렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU)과 같은 항 대사 물질; 테노프테린, 메토티렉세이트, 프테로프 테린, 트리메트렉세이트와 같은 엽산 유사체; 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아마니프린, 티오구아닌과 같은 퓨린 유사체; 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 예노시타빈, 플록수리딘과 같은 피리미딘 유사체; 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토라톤과 같은 안드로겐; 아미노글루테티미드, 미토탄, 트리로스탄과 같은 항 부신제; 프로브닉 산과 같은 엽산 보충제; 아세글라톤; 알도포스파 미드 배당체; 아미노레불린 산; 예닐루라실; 암사크린; 베스트라부실(bestrabucil); 비산트렌; 에다트락세이트; 테포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포미틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산 갈륨; 히드록시우레아; 렌티난(lentinan); 로니다이닌; 메이탄신 및 안사미토신과 같은 메이탄신노이드; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린(nitraerine); 펜토스타틴; 페나멧(phenamet); 피라루비신; 로속산트론; 포도필브닉 산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK® 다당류 복합체(JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); 라조산(razoxane); 리족신; 시조푸란; 스피로저마늄(spirogermanium); 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리메틸아민; 트리코테센(특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로 니톨; 미톨락톨; 피포로만; 가시토신; 아라비노사이드("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 티오테파; 텍소이드, 예를 들어 TAXOL®(파클리탁셀; Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), ABRAXANE®(Cremophor-free), 알부민 가공 나노 입자 제형의 파클리탁셀(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, 111.) 및 TAXOTERE®(doxetaxel; Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로람부실(chloranmbucil); GEMZAR®(gemcitabine); 6-티오구아닌; 메르캅토피린(mercaptapurine); 메토티렉세이트(methotrexate); 시스플라틴 및 카르보플라틴과 같은 플래티넘 유사체; 빈블라스틴(vinblastine); 에토포시드(VP-16); 이포스파미드(ifosfamide); 미톡산트론; 빈크리스틴; NAVELBINE®(vinorelbine); 노바트론(novantrone); 테니포사이드(teniposide); 에다트렉세이트(edatrexate); 다우노마이신(daunomycin); 아미노프테린; 카페시타빈(XELODA®); 이반드로네이트; CPT-11; 국소이성화효소 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸로미틴(difluoromethylomithine)(DMFO); 레티노산과 같은 레티노이드; 및 상기 중 어느 것의 약학적으로 허용되는 염, 산 및 유도체를 포함한다.

- [0189] 제 2 (또는 추가) 제제 또는 요법의 예는 이에 제한되지 않지만, 면역 요법(예를 들어, PD-1 억제제(펩블리루맙, 니볼루맙, 세미플리맙), PD-L1 억제제(아테졸리주맙, 아벨루맙, 두르발루맙)), CTLA4 길항제(이필리루맙), 세포 신호 전달 억제제(예를 들어, 이마티닙, 게피티닙, 보르테조밐, 엘로티닙, 소라페닙, 수니티닙, 다사티닙, 보리노스타트, 라파티닙, 템시롤리무스, 닐로티닙, 에베로리무스, 파조파닙, 트라스투주맙, 베마시주맙, 세특시맙, 라니비주맙, 폐갑타닙, 파니투무맙 등), 유사 분열 억제제(예를 들어, 파클리탁셀, 빈크리스틴, 빈블라스틴 등), 알킬화제(예를 들어, 시스플라틴, 사이클로포스파미드, 크로마부실, 카르무스틴 등), 항-대사 물질(예를 들어, 메토틱세이트, 5-FU 등), 인터칼레이팅 항암제(예를 들어, 악티노마이신, 안트라사이클린, 블레오마이신, 미토마이신-C 등), 토포이소머라제 억제제(예를 들어, 이리노테칸, 토포테칸, 테니포시드 등), 면역 치료제(예를 들어, 인터루킨, 인터페론 등) 및 항 호르몬제(예를 들어, 타목시펜, 랄록시펜 등)를 포함한다.
- [0190] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 질병 또는 장애(예를 들어, 과다 형성, 고형 종양 또는 조혈 악성 종양)를 치료 또는 감소시키기 위해 본원에 개시된 융합 단백질 또는 이의 단편과 같은 단백질의 용도에 관한 것이다.
- [0191] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 질병 또는 장애(예를 들어, 과다 형성, 고형 종양 또는 조혈 악성 종양)를 치료 또는 감소시키기 위해 본원에 개시된 융합 단백질 또는 이의 단편과 같은 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 용도에 관한 것이다.
- [0192] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 질병 또는 장애(예를 들어, 과다 형성, 고형 종양 또는 조혈 악성 종양)를 치료 또는 감소하기 위한 약제의 제조에서, 본원에 개시된 융합 단백질 또는 이의 단편과 같은 단백질 및 약학적으로 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제의 용도에 관한 것이다.
- [0193] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 질병 또는 장애(예를 들어, 과다 형성, 고형 종양 또는 조혈 악성 종양)를 치료 또는 감소하기 위한 약제의 제조에 있어서, 본원에 개시된 융합 단백질 또는 이의 단편과 같은 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 약학적으로 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제의 용도에 관한 것이다.
- [0194] 특정 실시 예에서, 약제는 항암제이다.
- [0195] 특정 실시 예에서, 질환 또는 장애는 두경부암, 자궁 내막암, 결장 직장암, 난소암, 유방암, 흑색종, 폐암, 신장암, 간암, 항문암, 육종, 림프종, 백혈병, 뇌종양, 위암, 고환암, 췌장암 및 갑상선암으로부터 선택된 하나 이상이다.
- [0196] 특정 실시 예에서, 항암 약물은 B-세포 림프종 또는 항-결장 직장암 치료에 효과적이다.
- [0197] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 본원에 개시된 융합 단백질 또는 이의 단편과 같은 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포주에 관한 것이다.
- [0198] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 세포주를 배양하는 것을 포함하는 단백질 제조 방법에 관한 것이다. 특정 실시 예에서, 상기 방법은 본원에 개시된 융합 단백질 또는 그의 단편과 같이 생산된 단백질을 정제 또는 분리하는 것을 추가로 포함한다.
- [0199] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 단백질을 제조하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 본원에 개시된 융합 단백질 또는 이의 단편과 같은 단백질을 코딩하는 발현 벡터를 제공하는 단계; 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하는 단계; 단백질을 발현하기에 충분한 조건 하에서 숙주 세포를 배지에서 배양하는 단계; 및 숙주 세포 또는 배지로부터 단백질을 정제하는 단계를 포함한다.
- [0200] 임의의 적합한 발현 벡터가 사용될 수 있다. 예시적인 발현 벡터는 pEE12.4 발현 벡터이다.
- [0201] 예를 들어, 293F 및 CHO 세포와 같은 임의의 적합한 숙주 세포가 사용될 수 있다.
- [0202] 발현 벡터의 도입은 임의의 적합한 형질 감염 방법에 의해 달성될 수 있고 일시적 형질 감염 또는 안정한 세포주를 통해 이루어질 수 있다.
- [0203] 임의의 적절한 정제 방법이 사용될 수 있다. 예시적인 정제 방법은 단백질A/G의 친화성 크로마토그래피 또는 크기 배제 방법에 의한 것이다.
- [0204] 또 다른 측면에서, 본 발명은 일반적으로 본원에 개시된 방법에 의해 생산된 분리된 단백질에 관한 것이다.
- [0205] 특정 실시 예에서, 분리된 단백질은 실질적으로 순수하다.

- [0206] 본원에 개시된 바와 같이, 링커 서열은 생물학적 활성 폴리펩티드의 2 개 이상의 폴리펩티드를 연결하여, 원하는 기능적 활성을 갖는 단일 사슬 분자를 생성하는데 사용될 수 있다.
- [0207] 임의의 적합한 링커가 채택될 수 있다. 예시적인 펩티드 링커 서열은 약 7 내지 20 개의 아미노산, 예를 들어 약 8 내지 16 개의 아미노산을 갖는 것들을 포함한다. 링커 서열은 바람직하게는 생물학적 활성 폴리펩티드 또는 이펙터 분자를 바람직하지 않는 단일 형태로 보유하지 않도록 유연하다. 링커 서열은 예를 들어 융합 분자로부터 인식 부위의 간격을 두기 위해 사용될 수 있다. 구체적으로, 펩티드 링커 서열은 분자 유연성을 제공하도록 위치할 수 있다. 링커는 바람직하게는 유연성을 제공하기 위해 글리신, 알라닌 및 세린과 같은 작은 측쇄를 갖는 아미노산을 주로 포함한다.
- [0208] 일반적으로, 본 발명의 융합 단백질 복합체의 제조는 본원에 개시된 절차 및 예를 들어, 중합 효소 사슬 증폭 반응(PCR), 플라스미드 DNA 제조, 제한 효소에 의한 DNA 절단, 올리고뉴클레오티드 제조, DNA의 절찰, mRNA 분리, 적절한 세포로의 DNA 도입, 숙주의 형질 전환 또는 형질 감염, 숙주의 배양을 포함하는 인식된 재조합 DNA 기술에 의해 달성될 수 있다. 또한, 융합 분자는 카오트로픽 제제와 널리 알려진 전기영동, 원심 분리 및 크로마토그래피 방법을 사용하여 분리 및 정제될 수 있다.(Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(2nd ed.(1989)) 및 Ausubel, et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York(1989))
- [0209] 본 발명은 본 융합 단백질을 인코딩하는 핵산 서열 및 DNA 서열을 추가로 제공한다. DNA 서열은 파지, 바이러스, 플라스미드, 파지미드, 코스미드, YAC 또는 에피솜과 같은 염색체 외 복제에 적합한 벡터에 의해 운반될 수 있다. 예를 들어, 원하는 융합 단백질을 인코딩하는 DNA 벡터는 본원에 기술된 제조 방법을 용이하게 하고, 상당한 양의 융합 단백질 또는 이의 성분을 얻기 위해 사용될 수 있다. DNA 서열은 적절한 발현 벡터, 즉 삽입된 단백질 코딩-서열의 전사 및 번역에 필요한 요소를 포함하는 벡터에 삽입될 수 있다. 단백질을 코딩 서열을 발현하기 위해 다양한 숙주-벡터 시스템이 이용될 수 있다. 여기에는 바이러스에 감염된 포유류 세포 시스템(예를 들어, 우두 바이러스, 아데노 바이러스 등); 바이러스에 감염된 곤충 세포 시스템(예를 들어, 바클로 바이러스); 효모 벡터를 포함하는 효모 또는 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA로 형질 전환된 박테리아와 같은 미생물이 포함될 수 있다. 사용되는 숙주-벡터 시스템에 따라, 다수의 적합한 전사 및 번역 요소 중 임의의 하나가 사용될 수 있다.(Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(2nd ed.(1989)); 및 Ausubel, et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York(1989) for open to these methods.)
- [0210] DNA 벡터에 의해 인코딩된 융합 단백질 성분은 카세트 형식으로 제공될 수 있다. 용어 "카세트"는 각 성분이 표준 재조합 방법에 의해 다른 성분으로 쉽게 대체될 수 있음을 의미한다. 특히, 카세트 형식으로 구성된 DNA 벡터는 코딩된 융합 복합체가 혈청형을 개발할 수 있는 능력을 갖거나 가질 수 있는 병원체에 대해 사용될 때, 특히 바람직하다.
- [0211] 융합 단백질 복합체를 코딩하는 벡터를 만들기 위해, 생물학적 활성 폴리펩티드를 코딩하는 서열이 적합한 리가제를 사용하여 이펙터 펩티드를 코딩하는 서열에 연결된다. 프리젠팅 펩티드를 코딩하는 DNA는 적절한 세포주와 같은 천연 공급원으로부터 또는 공지된 합성 방법, 예를 들어 인산염 트리에스테르 방법에 의해 DNA를 분리하여 얻을 수 있다.(*Oligonucleotide Synthesis*, IRL Press, M. J. Gait, ed., 1984). 합성 올리고 뉴클레오티드는 또한 상업적으로 이용 가능한 자동 올리고뉴클레오티드 합성기를 사용하여 제조될 수 있다. 일단 분리되면, 생물학적 활성 폴리펩티드를 코딩하는 유전자는 PCR 또는 당 업계에 공지된 다른 수단에 의해 증폭될 수 있다. 생물학적 활성 폴리펩티드 유전자를 증폭시키는 데 적합한 PCR 프라이머는 PCR 생성물에 제한 부위를 추가할 수 있다. PCR 생성물은 바람직하게는 생물학적 활성 폴리펩티드-이펙터 융합 복합체의 적절한 발현 및 분비에 필요한 이펙터 펩티드 및 리더 서열을 위한 스플라이스 부위를 포함한다. PCR 생성물은 또한 바람직하게는 링커 서열을 코딩하는 서열, 또는 이러한 서열의 절찰을 위한 제한 효소 부위를 포함한다.
- [0212] 본원에 기재된 융합 단백질은 표준 재조합 DNA 기술에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어, 생물학적 활성 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 분자가 분리되면, 서열은 이펙터 폴리펩티드를 인코딩하는 다른 DNA 분자에 연결될 수 있다. 생물학적 활성 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 이펙터 펩티드를 코딩하는 DNA 서열에 직접 연결될 수 있거나, 또는 보다 일반적으로는 본원에 논의된 링커 서열을 코딩하는 DNA 서열은 적절한 리가제를 사용하여 생물학적 활성 폴리펩티드를 코딩하는 서열과 이펙터 펩티드를 코딩하는 서열 사이에 개재될 수 있다. 생성된 하이브리드 DNA 분자는 융합 단백질 복합체를 생산하기에 적합한 숙주 세포에서 발현될 수 있다. DNA 분자는 5'에서 3'방향으로 서로 연결되어, 연결 후 인코딩된 폴리펩티드의 번역 프레임이 변경되지 않는다

(즉, DNA 분자가 프레임 내에서 서로 연결된다). 생성된 DNA 분자는 프레임 내 융합 단백질을 인코딩한다.

- [0213] 다른 뉴클레오티드 서열도 유전자 구축물에 포함될 수 있다. 예를 들어, 이펙터 펩티드에 융합된 생물학적 활성 폴리펩티드를 코딩하는 서열의 발현을 제어하는 프로모터 서열, 또는 융합 단백질을 세포 표면 또는 배양 배지로 유도하는 리더 서열이 구축물에 포함될 수 있거나, 또는 구축물이 삽입된 발현 벡터에 존재할 수 있다.
- [0214] 변이체 생물학적 활성 폴리펩티드, IL15, IL15R 또는 Fc 도메인 코딩 서열을 획득함에 있어서, 당업자는 폴리펩티드가 생물학적 활동의 손실 또는 감소없이, 특정 아미노산 치환, 추가, 결실 및 변역 후 변형에 의해 변형될 수 있음을 인식할 것이다. 특히, 보존적 아미노산 치환, 즉 하나의 아미노산을 유사한 크기, 전하, 극성 및 형태의 다른 아미노산으로 치환하는 것은 단백질 기능을 크게 변경하지 않을 것으로 잘 알려져 있다. 단백질의 구성 성분인 20 개의 표준 아미노산은 다음과 같이 4 개의 보존성 아미노산 그룹으로 크게 분류될 수 있다: 비극성(소수성) 그룹은 알라닌, 이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 트립토판 및 발린이 포함하고; 극성(비하전, 중성) 그룹은 아스파라긴, 시스테인, 글루타민, 글리신, 세린, 트레오닌 및 티로신을 포함하고; 양전하(염기성) 그룹은 아르기닌, 히스티딘 및 리신을 포함하고, 음전하(산성) 그룹은 아스파르트 산과 글루탐산을 포함한다. 동일한 그룹 내에서 하나 아미노산의 다른 아미노산으로의 단백질내 치환은 단백질의 생물학적 활성에 악영향을 미치지 않을 것이다. 다른 예에서, 단백질의 생물학적 활성을 감소 또는 향상시키기 위해 아미노산 위치에 대한 변경이 이루어질 수 있다. 이러한 변화는 무작위로 또는 표적 잔기(들)의 알려진 또는 추정된 구조적 또는 기능적 특성에 기초한 부위-특이적 돌연변이를 통해 도입될 수 있다. 변이체 단백질의 발현 후, 변형으로 인한 생물학적 활성의 변화는 결합 또는 기능 분석을 사용하여 쉽게 평가될 수 있다.
- [0215] 뉴클레오티드 서열 간의 상동성은 DNA 혼성화 분석에 의해 결정될 수 있으며, 이중-가닥 DNA 혼성체의 안정성은 발생하는 염기 쌍의 정도에 따라 달라진다. 고온 및/또는 저염 함량의 조건은 혼성체의 안정성을 감소시키고, 선택된 상동성 정도 미만을 갖는 서열의 어닐링을 방지하기 위해 변경될 수 있다. 예를 들어, 약 55% G-C 함량을 갖는 서열의 경우, 40~50 °C, 6×SSC(염화나트륨/시트르산 나트륨 완충액) 및 0.1 % SDS(나트륨 도데실 설페이트)의 혼성화 및 세척 조건은 약 60-70 % 상동성을 나타내고, 50-65 °C, 1×SSC 및 0.1 % SDS의 혼성화 및 세척 조건은 약 82-97 % 상동성을 나타내고, 52 °C, 0.1×SSC 및 0.1 % SDS의 혼성화 및 세척 조건은 약 99-100 % 상동성을 나타낸다. 뉴클레오티드와 아미노산 서열을 비교하고 (상동성 정도를 측정하기) 위한 광범위한 컴퓨터 프로그램을 이용할 수도 있다. 쉽게 이용할 수 있는 서열 비교 및 다중 서열 정렬 알고리즘은 각각 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) 및 ClustalW 프로그램이다.
- [0216] 본 발명의 단백질 융합 복합체를 발현하기 위해 다수의 전략이 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 기재된 융합 단백질 구축물은 공지된 수단, 예를 들어 제한 효소를 사용하여 구축물의 삽입을 위해 벡터에서 절단한 후 절찰에 의해 적합한 벡터에 혼입될 수 있다. 그 다음, 유전자 구축물을 포함하는 벡터를 융합 단백질의 발현에 적합한 숙주에 도입한다.(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual(2nd ed.(1989) for open to these methods.)
- [0217] 적합한 벡터의 선택은 클로닝 프로토콜과 관련된 인자에 기초하여 경험적으로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 벡터는 사용되는 숙주와 호환되고 적절한 레플리콘을 가지고 있어야 한다. 또한, 벡터는 발현될 융합 단백질 복합체를 코딩하는 DNA 서열을 수용할 수 있어야 한다. 적합한 숙주 세포는 진핵 세포 및 원핵 세포, 바람직하게는 쉽게 형질 전환될 수 있고 배양 배지에서 빠른 성장을 나타내는 세포를 포함한다. 구체적으로, 바람직한 숙주 세포는 E. coli, Bacillus subtilis 등과 같은 원핵 생물, 동물 세포와 같은 진핵 생물 및 효모 균주, 예를 들어 S. cerevisiae를 포함한다. 포유류 세포, 특히 J558, NS0, SP2-0 또는 CHO가 일반적으로 바람직하다. 다른 적합한 숙주는 예를 들어, Sf9와 같은 곤충 세포를 포함한다. 기존의 배양 조건이 사용된다. 상기 Sambrook 참조. 그 다음, 안정적인 형질 전환 또는 형질 감염된 세포주를 선택할 수 있다. 본 발명의 융합 단백질 복합체를 발현하는 세포는 공지된 절차에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 면역 글로불린에 연결된 융합 단백질 복합체의 발현은 연결된 면역 글로불린에 특이적인 ELISA 및/또는 면역 블롯팅에 의해 결정될 수 있다. IL12 또는 IL12R 도메인에 연결된 생물학적 활성 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질의 발현을 검출하기 위한 다른 방법이 실시 예에 개시되어 있다.
- [0218] 숙주 세포는 원하는 융합 단백질 또는 이의 성분을 인코딩하는 핵산을 증식하기 위한 준비 목적으로 사용될 수 있다. 숙주 세포는 융합 단백질의 생산이 특별히 의도된 원핵 또는 진핵 세포를 포함할 수 있다. 따라서, 숙주 세포는 특히 효모, 파리, 벌레, 식물, 개구리, 포유류 세포 및 융합을 인코딩하는 핵산을 증식할 수 있는 기관을 포함한다. 사용될 수 있는 포유 동물 세포주의 비-제한적인 예는 CHO dhfr-세포(Urbaub and Chasm, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216), 293 세포(Graham et al. 1977 J. Gen. Virol., 36: 59()) 또는 SP2

또는 NSO와 같은 골수종 세포(Galfre and Milstein, 1981 Meth. Enzymol., 73(B): 3)를 포함한다.

- [0219] 원하는 융합 단백질 복합체를 인코딩하는 핵산을 증식할 수 있는 숙주 세포는 곤충(예를 들어, *Sp. frugiperda*), 효모(예를 들어, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *K. lactis*, *H. polymorpha*; 일반적으로 Fler, R., 1992 Current Opinion in Biotechnology, 3(5):486496)에 의해 검토됨), 곰팡이 및 식물 세포를 포함하는 비-포유동물 진핵 세포도 포함한다. 또한, 대장균 및 바실러스와 같은 특정 원핵 생물도 고려된다.
- [0220] 원하는 융합 단백질을 인코딩하는 핵산은 세포를 형질 감염시키기 위한 표준 기술에 의해 숙주 세포내로 도입될 수 있다. 용어 "형질 감염하는" 또는 "형질 감염"은 인산 칼슘 공침, DEAE-텍스트란-매개 형질 감염, 리포펙션, 전기 천공, 미세 주입, 바이러스 형질 도입 및/또는 통합을 포함하여, 핵산을 숙주 세포에 도입하기 위한 모든 종래의 기술을 포괄하는 것으로 의도된다.
- [0221] 다양한 프로모터(전사 개시 조절 영역)가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 적절한 프로모터의 선택은 제안된 발현 숙주에 따라 달라진다. 이중 소스로부터의 프로모터는 선택된 호스트에서 기능하는 한 사용될 수 있다.
- [0222] 프로모터 선택은 또한 원하는 효율 및 펩티드 또는 단백질 생산 수준에 따라 달라진다. 대장균에서 단백질 발현 수준을 극적으로 증가시키기 위해 *tac*과 같은 유도성 프로모터가 종종 사용된다. 단백질의 과발현은 숙주 세포에 해로울 수 있다. 결과적으로, 숙주 세포 성장이 제한될 수 있다. 유도성 프로모터 시스템을 사용하면, 유전자 발현을 유도하기 전에 숙주 세포를 허용 가능한 밀도로 배양하여, 더 높은 생성물 수율을 촉진할 수 있다.
- [0223] 본 발명에 따라 다양한 신호 서열이 사용될 수 있다. 생물학적 활성 폴리펩티드 코딩 서열에 상동인 신호 서열이 사용될 수 있다. 대안적으로, 발현 숙주에서 효율적인 분비 및 처리를 위해 선택되거나 설계된 신호 서열이 또한 사용될 수 있다. 신호 서열은 신호 펩티다제 절단 부위를 코딩하는 서열을 통해 단백질 코딩 서열에 직접 연결되거나, 짧은 뉴클레오티드 브리지를 통해 연결될 수 있다.
- [0224] 발현 구축물은 공지된 재조합 DNA 기술을 사용하여 어셈블할 수 있다. 제한 효소 분해 및 결찰은 2 개의 DNA 단편을 결합하는 데 사용되는 기본 단계이다. 선택된 단편의 결합을 용이하게 하기 위해 폴리링커 및 어댑터가 사용될 수 있다. 발현 구축물은 전형적으로 대장균의 제한, 결찰 및 형질 전환을 사용하는 단계에서 어셈블될 수 있다. 발현 구축물의 구축에 적합한 수많은 클로닝 벡터가 당 업계에 공지되어 있다( $\lambda$  및 pBLUESCRIPT SK-1, Stratagene, La Jolla, CA, pET, Novagen Inc., Madison, Wis., pEE12.4, Lonza Biologics, Basel, Switzerland).
- [0225] 발현 구축물은 선형 또는 원형의 클로닝 벡터 구축물로서 숙주로 형질 전환되거나, 클로닝 벡터로부터 제거되어 그대로 사용되거나, 전달 벡터에 도입될 수 있다. 전달 벡터는 선택된 숙주 세포 유형에서 발현 구축물의 도입 및 유지를 용이하게 한다. 발현 구축물은 다수의 공지된 유전자 전달 시스템(예를 들어, 자연적 능력, 화학적 매개 형질 전환, 원형질체 형질 전환, 전기 천공, 생물학적 형질 전환, 형질 감염 또는 접합)에 의해 숙주 세포에 도입된다. 선택된 유전자 전달 시스템은 사용되는 숙주 세포 및 벡터 시스템에 따라 달라진다.
- [0226] 본 발명은 관심 융합 단백질을 분리하기 위한 생산 방법을 추가로 제공한다. 이 과정에서, 조절 서열에 작동적으로 연결된 관심 단백질을 인코딩하는 핵산이 도입된 숙주 세포(예를 들어, 효모, 진균, 곤충, 박테리아 또는 동물 세포)는 관심 융합 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 전사를 자극하는 배양 배지에서 생산 규모로 성장한다. 그 후, 관심 융합 단백질은 수확된 숙주 세포 또는 배양 배지로부터 분리된다. 표준 단백질 정제 기술을 사용하여, 배지 또는 수확된 세포로부터 관심 단백질을 분리할 수 있다. 특히, 정제 기술을 사용하여, 롤러 병, 스피너 플라스크, 조직 배양 플레이트, 생물 반응기 또는 발효기를 포함한 다양한 구현으로부터 대규모(즉, 최소 밀리그램 양으로) 원하는 융합 단백질을 발현하고 정제할 수 있다.
- [0227] 발현된 단백질 융합 복합체는 공지된 방법에 의해 분리 및 정제될 수 있다. 전형적으로, 배양 배지는 원심 분리되거나 여과된 다음, 상청액은 친화성 또는 면역 친화성 크로마토그래피, 예를 들어 단백질-A 또는 단백질-G 친화성 크로마토 그래피, 또는 연결된 TCR 또는 이의 면역 글로블린 영역과 같이 발현된 융합 복합체를 결합하는 단일 클론 항체의 사용을 포함하는 면역 친화성 프로토콜에 의해 정제된다. 본 발명의 융합 단백질은 공지된 기술의 적절한 조합에 의해 분리 및 정제될 수 있다. 이러한 방법에는 예를 들어, 염 침전 및 용매 침전과 같은 용해도를 활용하는 방법, 투석, 한외-여과, 겔-여과 및 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기 영동과 같은 분자량 차이를 활용하는 방법, 이온-교환 컬럼 크로마토그래피와 같은 전하 차이를 활용하는 방법, 친화성 크로마토 그래피와 같은 특정 친화성을 활용하는 방법, 역-상 고성능 액체 크로마토 그래피와 같은 소수성 차이를 활용하는 방법 및 등전점 전기영동, Ni-NTA와 같은 금속 친화성 컬럼과 같은 등전점 차이를 활용하는 방법이 포함된다. (Sambrook et al., Molecular Cloning:A Laboratory Manual(2nd ed.(1989); and Ausubel et al., Current

Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York(1989) for open to these methods.)

- [0228] 본 발명의 융합 단백질은 실질적으로 순수한 것이 바람직하다. 즉, 융합 단백질은 자연적으로 동반되는 세포 전환체로부터 분리되어, 융합 단백질이 바람직하게는 적어도 80 % 또는 90 % 내지 95 % 균질성(w/w)으로 존재한다. 98 내지 99 % 이상의 균질성(w/w)을 갖는 융합 단백질은 많은 제약, 임상 및 연구 응용 분야에서 가장 선호된다. 일단 실질적으로 정제되면, 융합 단백질은 치료 적용을 위해 오염 물질이 실질적으로 없어야 한다. 일단 부분적으로 또는 실질적인 순도로 정제되면, 가용성 융합 단백질은 치료적으로, 또는 본원에 개시된 바와 같이 시험관 내 또는 생체 내 분석을 수행하는데 사용될 수 있다. 실질적인 순도는 크로마토그래피 및 겔 전기 영동과 같은 다양한 표준 기술에 의해 결정될 수 있다.
- [0229] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 조성물, 융합 단백질, 폴리뉴클레오티드, 유전자 구축물, 벡터 또는 숙주 세포 및 약학적으로 허용되는 부형제 또는 비히클의 치료 유효량을 포함하는 제약 제제를 제공한다.
- [0230] 본 발명에 사용하기 위한 바람직한 부형제는 당, 전분, 셀룰로스, 검 및 단백질을 포함한다. 바람직한 실시 예에서, 본 발명의 약학 조성물은 고체(예를 들어, 정제, 캡슐, 로젠지, 과립, 좌약, 액체 형태를 제공하기 위해 재구성될 수 있는 결정질 또는 무정형 멸균 고체 등), 액체(예를 들어, 용액, 현탁액, 에멀전, 엘릭서, 로션, 연고 등) 또는 반고체(젤, 연고, 크림 등)로서 투여하기 위한 약제학적 형태로 제형화된다. 본 발명의 약학 조성물은 제한 없이, 경구, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 척추 강내, 심실 내, 경피, 피하, 복강 내, 비강 내, 장내, 국소, 설하 또는 직장 경로를 포함하는 임의의 경로로 투여될 수 있다. 다양한 형태의 활성 성분 투여, 사용할 부형제 및 그 제조 절차의 개정판은 Remington 's Pharmaceutical Sciences(AR Gennaro, Ed.), 20th edition, Williams & Wilkins PA, USA(2000)에서 찾을 수 있다. 약학적으로 허용되는 비히클의 예는 동 기술 분야에서 공지되어 있으며, 인산염, 물, 에멀전, 예를 들어 오일/물 에멀전, 다양한 유형의 가습제, 멸균 용액 등으로 완충된 식염수 용액을 포함한다. 상기 비히클을 포함하는 조성물은 동 기술 분야에서 공지된 종래의 절차에 의해 제형화될 수 있다.
- [0231] 핵산(본 발명의 폴리뉴클레오티드, 벡터 또는 유전자 구축물)을 포함하는 본 발명의 약학 조성물의 경우, 본 발명은 상기 핵산을 투여하기 위해 특별히 제조된 약학 조성물을 고려한다. 약학 조성물은 네이키드 형태, 즉, 형질 감염에 사용되는 시약과 관련된 독성을 제거하는 이점을 수반하는 유기체의 뉴클레아제에 의한 분해로부터 핵산을 보호하는 화합물의 부재하에 상기 핵산을 포함할 수 있다. 네이키드 화합물에 대한 적절한 투여 경로는 혈관 내, 종양 내, 두개 내, 복강 내, 비강 내, 근육 내, 망막 하, 피하, 점액, 국소 및 경구 경로를 포함한다 (Templeton, 2002 DNA Cell Biol., 21:857-867). 대안적으로, 핵산은 리포솜의 일부를 형성하여 투여되거나, 콜레스테롤에 접합되거나, HIV-1의 TAT 단백질로부터 유래된 Tat 펩티드, 디.멜라노가스터(D.melanogaster)의 안테나페디아(Antennapedia) 단백질의 호메오도메인의 제 3 헬릭스, 단순 포진 바이러스의 VP22 단백질, 아르기닌의 올리고머 및 W007069090에 설명된 것과 같은 펩티드와 같이 세포막을 통한 전좌를 촉진할 수 있는 화합물에 접합될 수 있다(Lindgren, et al. 2000 Trends Pharmacol. Sci 21:99-103; Schwarze, et al. 2000) Trends Pharmacol. Sci. 21:45-48; Lundberg, et al. 2003 Mol. Therapy 8:143-150; 및 Snyder, et al. 2004 Pharm. Res. 21:389-393). 대안적으로, 폴리뉴클레오티드는 플라스미드 벡터 또는 바이러스 벡터의 일부, 바람직하게는 아데노바이러스에 기초한 벡터, 아데노-관련 바이러스 또는 레트로바이러스, 예를 들어 뮌헨 백혈병(MLV) 바이러스 또는 렌티 바이러스(HIV, FIV, EIAV)에 기초한 바이러스를 형성하여 투여될 수 있다.
- [0232] 본 발명의 조성물은 체중 kg 당 10mg 미만, 바람직하게는 체중 kg 당 5, 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001, 0.00005 또는 0.00001mg 미만 및 제제 200 nmol 미만의 투여량, 즉 체중 kg 당 약 4.4 × 10<sup>16</sup> 카피 또는 체중 kg 당 1500, 750, 300, 150, 75, 15, 7.5, 1.5, 0.75, 0.15 또는 0.075 nmol로 투여될 수 있다. 단일 투여량은 주사, 흡입 또는 국소 투여에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 이작용성 폴리뉴클레오티드 및 조성물은 표적 mRNA가 발현되는 기관에 직접 투여될 수 있으며, 이 경우 투여량은 기관 당 0.0001mg 내지 3mg, 또는 바람직하게는 기관 당 0.0001 내지 0.001mg, 기관 당 약 0.03 내지 3.0mg, 기관 당 약 0.1 내지 3.0mg 또는 기관 당 0.3 내지 3.0mg으로 투여될 것이다.
- [0233] 투여량은 치료할 상태에 대한 중증도 및 반응에 따라 달라지며, 며칠에서 몇 달 사이 또는 상태가 완화되는 것으로 보일 때까지 다양할 수 있다. 환자의 유기체에서 제제의 농도를 주기적으로 측정하여 최적 투여량을 결정할 수 있다. 최적의 투여량은 동물 모델에서 이전의 시험관 내 또는 생체 내 테스트를 통해 얻은 EC50 값으로부터 결정될 수 있다. 단일 투여량은 1 일 1 회 또는 1 일 1 회 미만, 바람직하게는 2, 4, 8 또는 30 일에 1 회 미만으로 투여될 수 있다. 대안적으로, 초기 투여량을 투여한 후, 일반적으로 초기 투여량보다 적은 양으로 한 번 또는 여러 번 유지 투여량을 투여할 수 있다. 유지 요법은 하루에 체중 1kg 당 0.01 μg 내지 1.4mg 범위의 투

여량, 예를 들어 하루에 체중 1kg 당 1, 0.1, 0.01, 0.001 또는 0.00001mg의 투여량으로 환자를 치료하는 것을 포함할 수 있다. 유지 투여량은 바람직하게는 5 일, 10 일 또는 30 일마다 최대 1 회 투여된다. 치료는 환자가 겪는 변화의 유형, 그 중증도 및 환자의 상태에 따라 달라지는 시간 동안 계속되어야 한다. 치료 후, 치료에 반응하지 않는 질병의 경우 투여량을 늘려야 하는지 여부 또는 질병의 개선 또는 원치 않는 2 차 효과를 관찰하는 경우 투여량을 줄여야 하는지 여부를 결정하기 위해 환자의 진전상황을 모니터링해야 한다.

[0234] 1 일 투여량은 특정 상황에 따라 단일 투여량 또는 2 회 이상의 투여량으로 투여될 수 있다. 반복 투여 또는 빈번한 투여가 필요한 경우, 펌프, 반영구 카테터(정맥 내, 복강 내, 갑골 내 또는 캡슐 내) 또는 저장소와 같은 투여 장치를 이식하는 것이 바람직하다.

[0235] 본 발명의 조성물은 제한 없이, 정맥 내, 경구, 비강, 비경구, 국소, 경피, 직장 등을 포함하는 당업자에게 공지된 방법에 따라 투여된다.

[0236] 다음의 실시 예는 본 발명의 실시를 설명하기 위한 것이며, 어떠한 방식으로든 제한하지 않는다.

[0237] **실시 예**

[0238] 하기 실시 예는 개시된 발명에 따라 제조된 화합물의 특정 예시적인 실시 예를 설명한다. 다음의 일반적인 방법 및 당업자에게 공지된 다른 방법이 본원에 개시된 화합물 및 그의 서브 클래스 및 종에 적용될 수 있음을 이해할 것이다.

[0239] **실시 예 1. 융합 단백질의 구축**

[0240] **A. 4 가지의 융합 단백질의 구축**

[0241] 대조군 단백질의 구축: IL15-Fc

[0242] 생쥐 IL15를 hIgG Fc(IL15-Fc로 명명됨)의 N 말단에 융합시켰다(도 1a). 생쥐 IL15의 아미노산 서열은 서열 번호 1이었다. hIgG Fc의 아미노산 서열은 서열 번호 3이었다.

[0243] 수퍼 IL15의 2 가지 형식:

[0244] IL15R a sushi-IL15-Fc(RA-IL15-Fc로 명명됨) 및 IL15-IL15R a sushi-Fc(IL15-RA-Fc로 명명됨)의 개략적인 표현이 도 1b 및 도 1c에 도시되어 있다. 생물학적 활성에서 유사하게, 2 가지 구조 모두 수퍼 IL15로 상호 교환적으로 참조되었다. 생쥐 IL15R a sushi의 아미노산 서열은 서열 번호 4이다. 인간 IL15R a sushi의 아미노산 서열은 서열 번호 5이다. IL15R a sushi와 IL15 사이의 링커 서열은 서열 번호 8이다. 생쥐 RA-IL15-Fc 및 IL15-RA-Fc는 서열 번호 24 및 서열 번호 26으로 완전히 표현된다. 인간 RA-IL15-Fc 및 IL15-RA-Fc는 서열 번호 25 및 서열 번호 27로 완전히 표현된다.

[0245] 프로드러그:

[0246] IL15R β의 ECD(세포 외 도메인)는 링커 세그먼트(L2)에 의해 연결된 IL15-RA-Fc의 N 말단에 융합되었다.

[0247] IL15R β ECD-L2-IL15-IL15R a sushi-Fc(RB-IL15-RA-Fc로 명명됨)의 개략적 표현이 도 1d에 도시되어 있다. 생쥐 IL15R β ECD의 아미노산 서열은 서열 번호 6이다. 인간 IL15R β ECD의 아미노산 서열은 서열 번호 7이다. 링커 세그먼트(L2)는 MMP9 또는 MMP14의 기질이다. MMP9 기질 링커의 아미노산 서열은 서열 번호 10이다. MMP14 기질 링커 아미노산 서열은 서열 번호 11-23이다.

[0248] **B. 융합 단백질의 구축, 형질 감염, 발현 및 정제**

[0249] 유전자는 pEE12.4와 같은 발현 벡터로 클로닝되었다. 플라스미드를 293F 세포로 일시적으로 형질 감염시켰다. 형질 감염 후 4-7 일에 상청액을 수집하였다. 융합 단백질은 단백질 A 세파로오스(Protein A Sepharose)를 사용하여 정제되었다. 모든 단백질은 ELISA 및 SDS-PAGE로 정량화되었다.

[0250] 상세한 프로토콜은 다음과 같다.

[0251] 융합 단백질의 구축

[0252] IL15, IL15RA 및 IL15RB ECD를 합성하고, 생쥐 IgGκ 선도(leading) 서열 및 인간 IgG1 Fc를 포함하는 pEE12.4-IgGκ-hIgG1 Fc 플라스미드로 클로닝하였다. 플라스미드는 표준 상용 플라스미드 추출 키트를 사용하여 추출되어, -80 °C에 보관되었다.

- [0253] 융합 단백질의 형질 감염
- [0254] 293F 세포를 CD OptiCHO™ 배지를 사용하여 배양하고, 135 rpm으로 진탕하는 37 °C, 8 % CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 형질 감염 2 일 전에 세포를 0.6-0.8×10<sup>6</sup> 세포/mL의 밀도로 플레이팅하였다. 세포를 약 2.5-3.5×10<sup>6</sup> 세포/mL의 밀도로 수집하고, Freestyle 293 배지를 사용하여 세척한 다음, 200 mL의 Freestyle 293에서 재현탁하였다. DNA(600 µg)를 5 mL의 Freestyle 293을 사용하여 희석하고, 0.22 µm 필터를 통해 여과하였다. PEI(1.8 mg)를 5 mL의 Freestyle 293을 사용하여 희석하고, 0.22 µm 필터를 통해 여과하였다. DNA와 PEI를 혼합하고 5 분 동안 실온에서 인큐베이션한 다음, 플라스크에서 세포와 혼합하였다. 플라스크를 85rpm으로 진탕하는 37 °C, 8 % CO<sub>2</sub> 인큐베이터에 넣었다. 200 mL EX-CELL™ 293 배지를 135 rpm에서 형질 감염 4 시간 후에 첨가하였다. 형질 감염 20 시간 후, 3.8mM VPA를 첨가하였다. 세포 생존율이 70 % 이상인 동안, 형질 감염 후 4 일 내지 7 일에 상청액을 수집하였다.
- [0255] 융합 단백질의 정제
- [0256] 융합 단백질은 매뉴얼(Repligen Corporation)에 따라 단백질 A-세파로즈 컬럼을 사용하여 정제하였다.
- [0257] 결합 완충제: 20mM 인산 나트륨, pH 7.0
- [0258] 용출 완충제: 0.1M 글리신, pH2.7
- [0259] 재생 완충제: 1M NaOH
- [0260] 중화 완충제: 1M Tris-HCl, pH 9.0
- [0261] 모든 완충제는 0.45 µm 필터로 여과되었다.
- [0262] (1) 샘플을 8000×rpm에서 2 시간 동안 원심 분리하여 세포를 제거한 후, 0.45 µm 필터를 통해 여과하였다. NaN<sub>3</sub>을 최종 농도 0.05 %로 첨가하여 박테리아 성장을 방지하였다.
- [0263] (2) 20 % 에탄올을 사용하여 컬럼을 보존한 경우, 50 내지 100cm/h의 선형 유속으로 5 컬럼 부피의 증류수로 세척하였다.
- [0264] (3) 컬럼을 5 내지 10 컬럼 부피의 용출 완충제로 세척하여 불순물을 씻어냈다;
- [0265] (4) 컬럼을 50 내지 100cm/hr의 선형 유속에서 5 내지 10 컬럼 부피의 결합 완충제로 평형화하였다 (equilibrated).
- [0266] (5) 전처리된 샘플을 컬럼에 적용하였다.
- [0267] (6) 컬럼을 5 내지 10 컬럼 부피의 결합 완충제로 세척하였다.
- [0268] (7) 컬럼을 1.5 mL 수집 튜브로 용출시켰다.
- [0269] 정제된 융합 단백질의 SDS-PAGE 전기 영동 결과를 도 2에 도시하였고, 도 2에서 라인 S1는 IL15-Fc로 로딩되었고, 라인 S2는 슈퍼 IL15로 로딩되었고, 라인 S3는 RB-IL15-RA-Fc로 로딩되었다.
- [0270] **실시 예 2. 슈퍼 IL15 융합 단백질의 생물학적 기능**
- [0271] **A. 림프구 증식 촉진 기능**
- [0272] 인터루킨 15(IL-15)는 먼저 무린 T 세포주 CTLL-2의 증식을 자극하는 능력을 특징으로 하였다. 이 프로토콜에서, CTLL-2 세포는 무린 IL-15의 연속 희석의 존재하에 배양되었고, 그들의 성장은 CCK8에 의해 측정되었다.
- [0273] 다음 절차가 사용되었다.
- [0274] (1) CTLL2 세포를 배양하기 위해 100U/mL 재조합 인간 IL-2가 보충된 CTLL-2 분석 배지를 사용한다.
- [0275] (2) 계대(passage) 후 24 내지 48 시간에 로그-상(log-phase) 성장에서 CTLL-2 세포를 수집하고, 두 번 세척하여 잔류 IL-2를 제거한다. 5 내지 10 mL CTLL-2 분석 배지에서 세포를 재현탁하고, 세포를 계산하고, 2×10<sup>4</sup> 세

포/mL의 농도로 조정한다.

- [0276] (3) CTLL-2 분석 배지를 사용하여 샘플을 희석한다. 첫 번째 최고 농도는 10 µg/mL이다. 7 개의 튜브를 통해 1:10 연속 희석을 수행한다.
- [0277] (4) 각각의 평평한 바닥 96-웰 플레이트(2×10<sup>3</sup> 세포/웰)에 100 µL의 세포 현탁액을 추가한다. 각 웰에 100 µL의 샘플을 추가한다. 200 µL 분석 배지만을 포함하는 웰 행을 음성 대조군으로 포함한다.
- [0278] (5) 플레이트를 덮고 48 내지 72 시간 동안 배양한다.
- [0279] (6) CCK8 20 µL를 추가한다. 2 내지 4 시간 후, 마이크로티터 플레이트 리더(microtiter plate reader)를 이용하여 각 웰의 OD450과 OD630을 읽는다.

[0280] 결과는 도 3에 도시되어 있는데, 이는 (1) 두 가지 형태의 수퍼 IL15의 생물학적 활성이 유사했다는 점, 즉 융합 단백질에서, 먼저 IL15 단편 또는 IL15R α sushi 단편에 관계없이, 수퍼 IL15의 기능은 영향받지 않았고, (2) 수퍼 IL15는 IL15-Fc에 비해 생물학적 활성이 약 100 배 증가하였음을 나타낸다.

[0281] **B. IL15RβECD의 융합 단편은 수퍼 IL15의 생물학적 기능을 차단할 수 있다.**

[0282] CTLL2에 대한 뮤린 RB-IL15-RA-Fc 및 수퍼 IL15의 증식 능력을 CCK8 분석에 의해 조사하였다. 결과는 도 4에 도시되어 있는데, 이는 RB-IL15-RA-Fc의 생물학적 활성이 100 배 감소되었음을 나타낸다. 이것은 IL-15Rβ의 세포 외 도메인이 수퍼 IL-15의 생물학적 기능을 차단할 수 있음을 나타낸다.

[0283] **C. 다양한 종양 모델에서 항-종양 효과 및 전신 독성**

[0284] A20 모델

[0285] **실험 1(25µg):** A20 세포(3×10<sup>6</sup>)를 Balb/c 생쥐의 오른쪽 옆구리에 피하 주사하였다. 종양(60-80 mm<sup>3</sup>)이 있는 생쥐를 10 일 및 13 일에, 25 µg 수퍼 IL15로 종양 내(i.t.) 및 정맥 내(i.v.)로 치료하였다. 대조군은 PBS로 치료하였다. 종양 부피=길이×너비×높이/2. 종양 성장 곡선을 기록하였다.

[0286] **결과:** (1) 종양 내 치료 그룹에서, 모든 생쥐의 종양은 완전한 퇴행을 나타냈다(도 5a). 이미 완전한 종양 퇴행을 겪은 생쥐는 치명적인 양의 A20 세포로 다시 시도되었다. 모든 생쥐는 재시행된 종양을 거부하였고, 이는 강력한 기억 반응을 나타내었다(도 5c). (2) 모든 생쥐는 심각한 전신 독성을 나타내는 두 번째 투여량의 iv 치료에서 죽었다(도 5b).

[0287] **실험 2(12.5µg):** A20 세포(3×10<sup>6</sup>)를 Balb/c 생쥐의 오른쪽 옆구리에 피하 주사하였다. 종양(60-80 mm<sup>3</sup>)이 있는 생쥐를 10 일 및 13 일에, 12.5 µg 수퍼 IL15로 종양 내(i.t.) 및 정맥 내(i.v.)로 치료하였다. 대조군은 PBS로 치료하였다. 종양 부피는 길이×폭×높이/2로 정의하였다. 종양 성장 곡선을 기록하였다.

[0288] **결과(도 7):** 종양 내 투여된 치료 그룹에서, 100 %의 생쥐가 완전한 퇴행을 보였다. 대조적으로, 정맥 내로 치료된 생쥐의 20 %는 완전한 퇴행을 보였고, 나머지 생쥐 종양은 부분적으로 통제되었다.

[0289] MC38 모델

[0290] **실험:** MC38 세포(5×10<sup>5</sup>)를 C57 생쥐의 오른쪽 옆구리에 피하 주사하였다. 종양(60 mm<sup>3</sup>)이 있는 생쥐를 7 일 및 10 일에, 25 µg 수퍼 IL15로 종양 내(i.t.) 및 정맥 내(i.v.)로 치료하였다. 대조군은 PBS로 치료하였다. 종양 부피=길이×너비×높이/2. 종양 성장 곡선을 기록하였다.

[0291] **결과:** 종양 내 투여된 치료 그룹에서, 생쥐의 50 %가 완전한 퇴행을 보였고(도 6a), 생존율이 현저히 증가하였다(도 6b). 대조적으로, 정맥 내 투여된 생쥐는 완전한 종양 퇴행이 없었고(도 6a), 생쥐 생존율이 약간 증가하였다(도 6b).

[0292] 상기 결과는 수퍼 IL15가 종양 미세 환경(TME)에서 국소적으로 기능하는 것으로 보인다는 것을 나타낸다.

[0293] **실시 예 3. 수퍼 IL15 및 RB-IL15-RA-Fc의 종양 치료 효과 및 부작용 비교**

[0294] A20 세포(3×10<sup>6</sup>)를 Balb/c 생쥐의 오른쪽 옆구리에 피하 주사하였다. 종양(60-80 mm<sup>3</sup>)이 있는 생쥐를 10 일 및 13 일에, 12.5 µg의 수퍼 IL15 또는 Rβ-IL15-RA-Fc로 복강 내(i.p.) 치료하였다. 종양 성장을 주 2 회 측정하였다. 두 번째 주사 후 20 시간에 혈청을 수집하였다. 혈청의 사이토카인 수준은 혈구 계산 비드 어레이(CB

A)로 측정하고, 종양 곡선을 기록하였다.

- [0295] 다음의 CBA 프로토콜이 사용되었다.
- [0296] (1) 안과 정맥으로부터 혈청을 채취하여, -80 °C에 보관하였다.
- [0297] (2) 혈청 내 IL12p70, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF  $\alpha$ , MCP1 및 IL-10은 BD의 CBA 키트를 사용하여 평가되었다.
- [0298] (3) 표준을 2.0 mL의 어세이 딜루엔트(Assay Diluent)로 재구성한 다음, 상온에서 적어도 15 분 동안 재보정하였다. 그 표준은 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 및 1:256 비율로 연속 희석되었다.
- [0299] (4) Th1/Th2/Th17 사이토카인 캡처 비드(Cytokine Capture Beads)를 혼합하였다. 실험에 필요한 분석 튜브(표준 및 대조군 포함)의 수를 결정하였다. 각 캡처 비드 현탁액은 혼합하기 전에 3 내지 5 초 동안 격렬하게 와류되었다. 분석할 각 분석 튜브에 대해, 각 캡처 비드의 2  $\mu$ L 분취량(aliquot)을 단일 튜브에 첨가한다. 생쥐 Th1/Th2/Th17 PE 검출 시약의 10  $\mu$ L 분취량을 튜브에 첨가하고, 철저히 와류되게 하였다.
- [0300] (5) Th1/Th2/Th17 사이토카인 분석을 수행하였다: 혼합된 캡처 비드를 와류되게 하고, 모든 분석 튜브에 20  $\mu$ L를 첨가하였다. 50  $\mu$ L의 생쥐 Th1/Th2/Th17 사이토카인 표준 희석액을 대조군 튜브에 첨가하였다. 각각의 알려지지 않은 샘플 50  $\mu$ L를 적절하게 표지된 샘플 분석 튜브에 첨가하였다. 분석 튜브를 빛으로부터 보호하고 실온에서 2 시간 동안 배양하였다.
- [0301] (6) 각 분석 튜브에 1 mL의 세척 완충액(Wash Buffer)을 첨가하고, 300 g에서 5 분 동안 원심 분리하였다.
- [0302] (7) 상청액을 조심스럽게 흡인하고 각 분석 튜브로부터 버렸다. 300  $\mu$ L의 세척 완충액을 각 분석 튜브에 첨가하여, 비드 펠릿을 재현탁하였다.
- [0303] (8) 유동 세포 분석법을 통해 샘플을 분석하고, 표준에 따라 사이토카인 수준을 계산하였다.
- [0304] 치료 효과는 도 8a에 도시되어 있는데, 이는 정맥 내 투여된 RB-IL15-RA-Fc의 치료 효과가 수퍼 IL15의 치료 효과와 유사함을 나타낸다.
- [0305] 혈청 염증 인자 수준의 비교 결과는 도 8b에 도시되어 있는데, 이는 RB-IL15-RA-Fc의 독성 부작용이 수퍼 IL15에 비해 현저히 감소되었음을 나타낸다.
- [0306] A20 세포( $3 \times 10^6$ )를 Balb/c 생쥐의 오른쪽 옆구리에 피하 주사하였다. 종양(60-80 mm<sup>3</sup>)이 있는 생쥐를 10 일 및 13 일에, 25  $\mu$ g의 수퍼 IL15 또는 RB-IL15-RA-Fc로 복강 내(i.p.) 치료하였다. 종양 성장을 주 2 회 측정하였다. 두 번째 주사 후 20 시간에 혈청을 수집하였다. 혈청에서의 사이토카인 수준은 혈구 계산 비드 어레이(CBA)로 측정하고 종양 곡선을 기록하였다.
- [0307] **결과:** 종양 제-켈린지 및 수퍼 IL15 치료 후, 종양 보유 생쥐는 심각한 체중 감소, 이동성 감소, 주름진 털로 상당히 병들었으며, 두 번째 치료 후 1 일 이내에 모두 사망하였다. 대조적으로, RB-IL15-RA-Fc로 처리된 생쥐는 사망하지 않았고, 건강하지 않은 생쥐는 전혀 없었다. RB-IL15-RA-Fc의 생존 곡선은 수퍼 IL15보다 상당히 길었다. 생존 곡선은 도 9a에 도시되어 있고, 혈청 염증 인자 수준은 도 9b에 도시되어 있다.
- [0308] 종합하면, RB-IL15-RA-Fc는 수퍼 IL15의 독성 부작용을 감소시켰다.
- [0309] 다양한 IL15 융합 단백질 및 프로드러그의 유사한 인간 버전이 또한 생산되었고, 시험관 내에서 테스트되었다. 인간 단백질 생산은 무린 단백질 생산을 위해 이전에 설명한 클로닝, 형질 감염 및 정제 프로토콜에 따라 수행되었다.
- [0310] 재조합 인간 MMP-14/MT1-MMP(R & D Systems)를 활성화하고, IL15 융합 단백질과 함께 인큐베이션하여, 24 시간 동안 37 °C에서 L2 링커 부위에서의 프로드러그 활성화 및 절단을 확인하였다.
- [0311] MMP14를 사용하거나 사용하지 않고 37 °C에서 24 시간 동안 배양한 정제된 인간 융합 단백질의 SDS-PAGE 전기영동 결과를 도 10에 나타내었다.
- [0312] 인간 RB-IL15-RA-Fc 기능은 HEK-Blue<sup>TM</sup> IL2 리포터 세포 분석(Invivogen)을 사용하여 측정되었다. IL-2 자극시, HEK-Blue<sup>TM</sup> IL-2 세포는 STAT5의 활성화와 SEAP의 하위 서열 분비를 유발한다. STAT5-유도 SEAP의 수준은 QUANTI-Blue<sup>TM</sup>를 사용하여 쉽게 모니터링될 수 있다. IL15는 IL-2/IL-15 수용체  $\beta$  사슬과 공통  $\gamma$  사슬로 구성

된 복합체에 결합하고 이를 통해 신호를 보내기 때문에, HEK-Blue™ IL-2 세포주는 IL15 및/또는 pro-IL15 기능적 활동을 측정하는 데 사용될 수 있다.

[0313] 다음의 HEK-Blue IL-2 리포터 분석이 사용되었다:

[0314] (1) HEK-Blue IL-2 세포를 PBS에서 부드럽게 행구고, 예열된 신선한 시험 배지(DMEM, 4.5g/L 포도당, 2mM L-글루타민, 10 %(v/v) 열-불활성화된 PBS)에서 56 °C에서 30 분  $\sim 1 \times 10^6$  cells/mL에서 현탁하였다.

[0315] (2) 샘플을 평평한 바닥 96-웰 플레이트에서 연속 희석하고, 웰당 50  $\mu$ L의 세포 현탁액( $\sim 50,000$  세포)이 있는 CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 37 °C에서 20-24 시간 동안 배양하였다.

[0316] (3) 37 °C 인큐베이터에서 웰당 100  $\mu$ L의 재현탁된 QUANTI-Blue™ 용액과 함께 평평한 바닥 96-웰 플레이트의 웰당 유도된 HEK-Blue IL-2 세포 상청액 20  $\mu$ L를 15 분 내지 1 시간 동안 배양하였다.

[0317] (4) 650 nm에서 분광 광도계를 사용하여 SEAP 수준을 결정하였다.

[0318] **결과:** 도 11은 링커 세그먼트(L2)에 내장된 MMP14 기질 서열로 구축되며 MMP14와 함께 배양된 RB-L2-15RA-Fc가 MMP14를 갖거나 갖지 않는 15RA-Fc와 동일한 수준의 기능을 나타냄을 입증한다. 따라서, 링커 세그먼트(L1)에 포함된 MMP14 기질 서열없이 구성된 RB-L1-15RA-Fc는 MMP14를 갖지 않는 샘플과 유사하게 수행되었다. 구성 표기법 15RA는 IL15-L1-RA의 약자이다.

[0319] **서열 목록**

[0320] 서열 번호 1: 생쥐 IL15

[0321] NWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLYTDSDFHPSCVKVTAMNCFLELQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSSKNVAESGCKECELEEKTFTEFLQS  
FIRIVQMFINTS

[0322] 서열 번호 2: 인간 IL15

[0323] NWNVVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCVKVTAMKCFLELQVLSLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQS  
FVHIVQMFINTS

[0324] 서열 번호 3: 인간 IgG1-Fc

[0325] EPKSSDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ  
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0326] 서열 번호 4: 생쥐 R $\alpha$ -스시 도메인

[0327] GTTCPPPVSIHADIRVKNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNTNVAHWTTPSLKCIRDPSLAHYSVPVT

[0328] 서열 번호 5: 인간 R $\alpha$ -스시 도메인

[0329] ITCPPMVSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAAP

[0330] 서열 번호 6: 생쥐 R $\beta$  세포 외 도메인

[0331] AVKNCSHLECFYNSRANVSCMWSHEEALNVTTCVHAKSNLRHWNKTCELTLVRQASWACNLILGSFPESQSLTSVDLLDINVVCWEEKGWRVRKTCDFHFP  
DNLRLVAPHSLSQLVHIDTQRCNISWKVSQVSHYIEQPYLEFEARRRLLNTGTEVQVRVKAMLIPSYPMRWSQLFLEFEARRRLLNTGTEVQVRVKAMLQR

[0332] 서열 번호 7: 인간 R $\beta$  세포 외 도메인

[0333] AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDQALQDTSQVHAWPDRRRWNQTCCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPF  
NLRLMAPISLQVVHVHETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLTLSPGHTQEWALWSTLTPDTPGHTQWEEAPLLTLKQKQEWEEAPLLTLKQKQEWEEA  
PLLTLKQKQEWEEAP

[0334] 서열 번호 8: 링커 세그먼트(L1)

[0335] SGGSGGGSGGGSGGGSGGGSLQ

[0336] 서열 번호 9: 링커 세그먼트(L1)

- [0337] GGGGS
- [0338] 서열 번호 10: 링커 세그먼트(L2)(MMP9)
- [0339] GGGGSPVGLIGGGGS
- [0340] 서열 번호 11: 링커 세그먼트(L2)(MMP14)
- [0341] GGGSSGARYRWLTAGGGGS
- [0342] 서열 번호 12: 링커 세그먼트(L2)(MMP14)
- [0343] GGGSSGRIGFLRTAGGGGS
- [0344] 서열 번호 13: 링커 세그먼트(L2)(MMP14)
- [0345] GGGSSGAIIGFLRTAGGGGS
- [0346] 서열 번호 14: 링커 세그먼트(L2)(MMP14)
- [0347] GGGSSGRAMHMYTAGGGGS
- [0348] 서열 번호 15: 링커 세그먼트(L2)(MMP14)
- [0349] GGGSSGAAMHMYTAGGGGS
- [0350] 서열 번호 16: 링커 세그먼트(L2)(MMP14)
- [0351] GGGSSGRSENIRTAGGGGS
- [0352] 서열 번호 17: 링커 세그먼트(L2)(MMP14)
- [0353] GGGSSGASENIRTAGGGGS
- [0354] 서열 번호 18: 링커 세그먼트(L2)(MMP14)
- [0355] GGGSSGRPENIRTAGGGGS
- [0356] 서열 번호 19: 링커 세그먼트(L2)(MMP14)
- [0357] GGGSSGAPENIRTAGGGGS
- [0358] 서열 번호 20: 링커 세그먼트(L2)(MMP14)
- [0359] GGGSSGLISHSITAGGGGS
- [0360] 서열 번호 21: 링커 세그먼트(L2)(MMP14)
- [0361] GGGSSGNLRSKLTAGGGGS
- [0362] 서열 번호 22: 링커 세그먼트(L2)(MMP14)
- [0363] GGGSSGVFSIPLTAGGGGS
- [0364] 서열 번호 23: 링커 세그먼트(L2)(MMP14)
- [0365] GGGSSGIKYHSLTAGGGGS
- [0366] 서열 번호 24: 생쥐 RA-IL15-Fc
- [0367] GTTCPPPVSEHADIRVKNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNTNVAHWTTPSLKCIRDPSLAHYSVPVPTSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSLQ  
LQNWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLTDSDFHPSCVKVTAMNCFLELQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSSKNVAESGCKECELEEKTFTEFL  
QSFIRIVQMFINTSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS  
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDL  
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0368] 서열 번호 25: 인간 RA-IL15-Fc
- [0369] ITCPPPMSEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSLQ

NWVNV ISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQV I SLESGDAS IHDVTENL I ILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKN I KEFLQS  
FVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQGTTCPPPVSI EHADIRVKNSVNSRERYVCNSGFKRAGTSTLIECVINKNTNVAHWTTPSLKC  
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY  
SKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0370] 서열 번호 26: 생쥐 IL15-RA-Fc

NWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLTSDSFHPSCKVTAMNCFLELQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCKECELEEKTFTEFLQS  
FIRIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQGTTCPPPVSI EHADIRVKNSVNSRERYVCNSGFKRAGTSTLIECVINKNTNVAHWTTPSLKC  
IRDPSLAHYSPVPTGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS  
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD  
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0372] 서열 번호 27: 인간 IL15-RA-Fc

NWVNV ISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQV I SLESGDAS IHDVTENL I ILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKN I KEFLQS  
FVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKYSYLSRERYICNSGFKRAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKC I  
RDPALVHQRPAPPGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD  
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0374] 서열 번호 28: 생쥐 RB-L2-IL15-RA-Fc

AVKNCSHLECFYNSRANVSCMWSHEEALNVTTCVHAKSNLRHWNKTCELTLVRQASWACNLILGSFPESQSLTSDVLLDINVCWEEKGWRRVKTCDHFHPF  
DNLRLVAPHSLSQLVHIDTQRCNI SWKVSQVSHYIEPYLEFEARRRLGHSWEDASVLSLKQRQWLFLEMLIPSTSYEVQVRVKAQRNNTGTWSPWSQPLTF  
RTRPADPMKEGGGSPVGLIGGGGNSWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLTSDSFHPSCKVTAMNCFLELQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS  
NKNVAESGCKECELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQGTTCPPPVSI EHADIRVKNSVNSRERYVCNSGFKRKA  
GTSTLIECVINKNTNVAHWTTPSLKCIRDPSLAHYSPVPTGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQMLI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE  
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY  
SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0376] 서열 번호 29: 인간 RB-L2-IL15-RA-Fc

AVNGTSQFTCFYNSRANI SCVWSQDQALQDTSQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPF  
NLRLMAPISLQVHVHETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDQYEFQVRVKPLQGEFTTSPWSQPLAFR  
TKPAALGKDTGGGGSSGARVWLTAGGGGNSWVNI SIDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQV I SLESGDAS IHDVTENL I ILANN  
SLSSNGNVTESGCKECELEEKN I KEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKYSYLSRERYICNSGFK  
RKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPSLAHYSPVPTGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSH  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0378] 서열 번호 30: 인간 RB-L2-IL15-RA-Fc

AVNGTSQFTCFYNSRANI SCVWSQDQALQDTSQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPF  
NLRLMAPISLQVHVHETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDQYEFQVRVKPLQGEFTTSPWSQPLAFR  
TKPAALGKDTGGGGSSGRI GFLRTAGGGGNSWVNI SIDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQV I SLESGDAS IHDVTENL I ILANN  
SLSSNGNVTESGCKECELEEKN I KEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKYSYLSRERYICNSGFK  
RKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPSLAHYSPVPTGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSH  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0380] 서열 번호 31: 인간 RB-L2-IL15-RA-Fc

AVNGTSQFTCFYNSRANI SCVWSQDQALQDTSQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPF  
NLRLMAPISLQVHVHETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDQYEFQVRVKPLQGEFTTSPWSQPLAFR  
TKPAALGKDTGGGGSSGRI GFLRTAGGGGNSWVNI SIDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQV I SLESGDAS IHDVTENL I ILANN  
SLSSNGNVTESGCKECELEEKN I KEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKYSYLSRERYICNSGFK  
RKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPSLAHYSPVPTGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSH  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0382] 서열 번호 32: 인간 RB-L2-IL15-RA-Fc

[0383] AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDQALQDTSQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVHVHETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTPDQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDTGGGGSSGRAMHMYTAGGGGSNWNVI SDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVLSLESGDASIHDTVENLILANN SLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFK RKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIDRDPALVHQRPAPPGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0384] 서열 번호 33 : 인간 RB-L2-IL15-RA-Fc

[0385] AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDQALQDTSQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVHVHETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTPDQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDTGGGGSSGAAMHMYTAGGGGSNWNVI SDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVLSLESGDASIHDTVENLILANN SLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFK RKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIDRDPALVHQRPAPPGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0386] 서열 번호 34 : 인간 RB-L2-IL15-RA-Fc

[0387] AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDQALQDTSQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVHVHETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTPDQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDTGGGGSSGRSENIRTAGGGGSNWNVI SDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVLSLESGDASIHDTVENLILANN SLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFK RKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIDRDPALVHQRPAPPGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0388] 서열 번호 35 : 인간 RB-L2-IL15-RA-Fc

[0389] AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDQALQDTSQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVHVHETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTPDQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDTGGGGSSGASENIRTAGGGGSNWNVI SDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVLSLESGDASIHDTVENLILANN SLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFK RKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIDRDPALVHQRPAPPGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0390] 서열 번호 36 : 인간 RB-L2-IL15-RA-Fc

[0391] AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDQALQDTSQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVHVHETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTPDQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDTGGGGSSGRPENIRTAGGGGSNWNVI SDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVLSLESGDASIHDTVENLILANN SLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFK RKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIDRDPALVHQRPAPPGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0392] 서열 번호 37 : 인간 RB-L2-IL15-RA-Fc

[0393] AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDQALQDTSQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVHVHETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTPDQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDTGGGGSSGAPENIRTAGGGGSNWNVI SDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVLSLESGDASIHDTVENLILANN

SLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFK  
RKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTTPSLKCIDRDPALVHQRPAPPGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKLSLSPGK

[0394] 서열 번호 38 : 인간 RB-L2-IL15-RA-Fc

AVNGTSQFTCFYNSRANI SCVWSQDQALQDTSQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNL ILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPF  
NLRLMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTPQYEFQVRVKPLQGEFTTWPWSQPLAFR  
TKPAALGKDTGGGGSSGLI SHSITAGGGGSNWNVI SDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVLSLESGDASIHDTVENLILANN  
SLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFK  
RKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTTPSLKCIDRDPALVHQRPAPPGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKLSLSPGK

[0396] 서열 번호 39 : 인간 RB-L2-IL15-RA-Fc

AVNGTSQFTCFYNSRANI SCVWSQDQALQDTSQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNL ILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPF  
NLRLMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTPQYEFQVRVKPLQGEFTTWPWSQPLAFR  
TKPAALGKDTGGGGSSGLI SHSITAGGGGSNWNVI SDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVLSLESGDASIHDTVENLILANN  
SLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFK  
RKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTTPSLKCIDRDPALVHQRPAPPGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKLSLSPGK

[0398] 서열 번호 40 : 인간 RB-L2-IL15-RA-Fc

AVNGTSQFTCFYNSRANI SCVWSQDQALQDTSQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNL ILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPF  
NLRLMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTPQYEFQVRVKPLQGEFTTWPWSQPLAFR  
TKPAALGKDTGGGGSSGIVSITAGGGGSNWNVI SDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVLSLESGDASIHDTVENLILANN  
SLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFK  
RKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTTPSLKCIDRDPALVHQRPAPPGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKLSLSPGK

[0400] 서열 번호 41 : 인간 RB-L2-IL15-RA-Fc

AVNGTSQFTCFYNSRANI SCVWSQDQALQDTSQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNL ILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPF  
NLRLMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTPQYEFQVRVKPLQGEFTTWPWSQPLAFR  
TKPAALGKDTGGGGSSGIKYHSLTAGGGGSNWNVI SDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVLSLESGDASIHDTVENLILANN  
SLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFK  
RKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTTPSLKCIDRDPALVHQRPAPPGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKLSLSPGK

[0402] 서열 번호 42 : 인간 RB-L1-IL15-RA-Fc

AVNGTSQFTCFYNSRANI SCVWSQDQALQDTSQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNL ILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPF  
NLRLMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTPQYEFQVRVKPLQGEFTTWPWSQPLAFR  
TKPAALGKDTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFK  
RKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTTPSLKCIDRDPALVHQRPAPPGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKLSLSPGK

[0404] 출원인의 개시 내용은 도면을 참조하여 바람직한 실시 예로 본원에서 설명되며, 도면에서 유사한 번호는 동일하  
거나 유사한 요소를 나타낸다. 본원 전체에서 "일 실시 예", "실시 예" 또는 유사한 언어에 대한 언급은 실시

예와 관련하여 설명된 특정 특징, 구조 또는 특성이 본 발명의 적어도 하나의 실시 예에 포함된다는 것을 의미한다. 따라서, "일 실시 예에서", "하나의 실시 예에서", 및 본원 전반에 걸쳐 유사한 언어의 출현은 모두 동일한 실시 예를 지칭할 수 있지만, 반드시 그런 것은 아니다.

[0405] 출원인의 개시 내용의 설명된 특징, 구조 또는 특성은 하나 이상의 실시 예에서 임의의 적절한 방식으로 결합될 수 있다. 본원의 설명에서, 다수의 특정 세부 사항이 본 발명의 실시 예들의 완전한 이해를 제공하기 위해 인용된다. 그러나, 관련 기술 분야의 당업자는 하나 이상의 특정 세부 사항 없이도, 또는 다른 방법, 구성 요소, 재료 등과 함께, 출원인의 구성 및/또는 방법이 실시될 수 있음을 인식할 것이다. 다른 예들에서, 공지된 구조들, 재료들 또는 동작들은 본 개시내용의 모호한 일 측면들을 피하기 위해 상세히 도시되거나 설명되지 않는다.

[0406] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것과 유사한 또는 동등한 임의의 방법 및 재료가 또한 본 개시내용의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 재료가 여기에 기술되어 있다. 본원에 인용된 방법은 개시된 특정 순서에 추가하여 논리적으로 가능한 임의의 순서로 수행될 수 있다.

[0407] **참조로 포함**

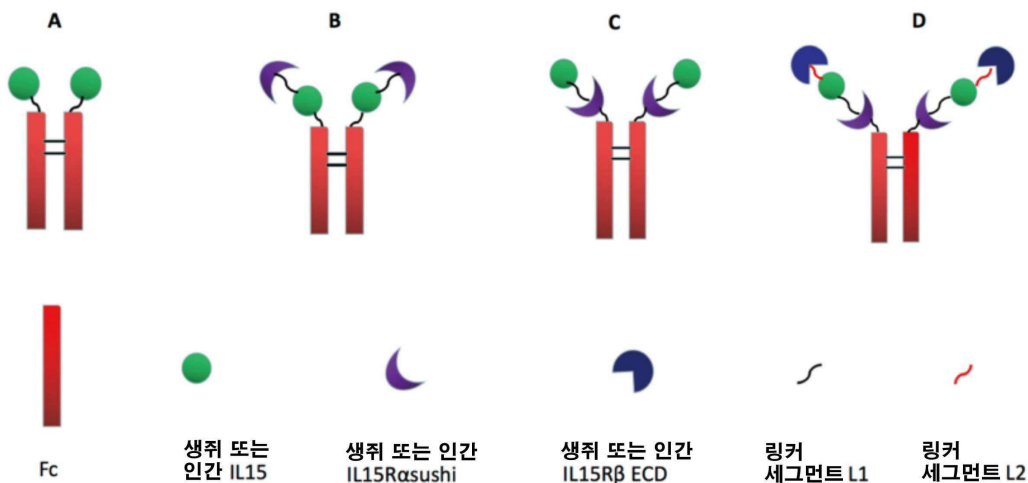
[0408] 특허, 특허 출원, 특허 공보, 저널, 서적, 논문, 웹 콘텐츠와 같은 다른 문서에 대한 참조 및 인용이 본 개시내용에 기재되어있다. 모든 상기 문헌은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참고 문헌으로 포함된다. 여기에 참조로 포함되었으나, 여기에 명시적으로 제시된 기존 정의, 진술 또는 기타 공개 자료와 충돌하는 모든 자료 또는 그 일부는 통합된 자료와 본 발명의 자료 간에 충돌이 발생하지 않는 범위 내에서만 통합된다. 충돌이 발생하는 경우, 그러한 충돌은 우선적인 개시사항으로서 본 발명의 개시내용에 유리하게 해석되어야 한다.

[0409] **등가물**

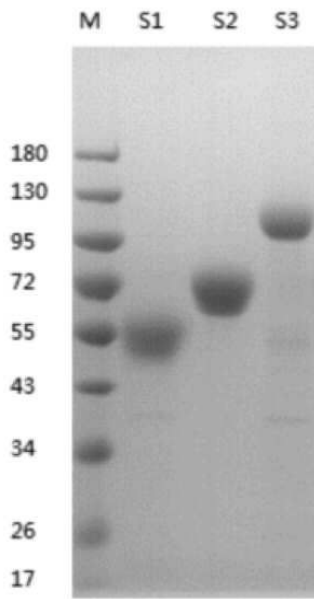
[0410] 대표적인 실시 예는 본 발명을 예시하는 것을 돕기 위한 것이며, 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것이 아니며, 또한 이들로 해석되어서는 안된다. 실제로, 여기에 도시되고 설명된 것 이외에, 본 발명의 다양한 변형 및 그 많은 실시 예는 본원의 전체 내용으로부터 당업자에게 명백하게 될 것이며, 본 발명은 실시 예 및 과학적 및 특허 문헌에 대한 참조를 포함한다. 이 예들은 그 다양한 실시 예들 및 그 등가물들에서 본 발명의 실시예에 적용될 수 있는 중요한 추가 정보, 예시 및 지침을 포함한다.

**도면**

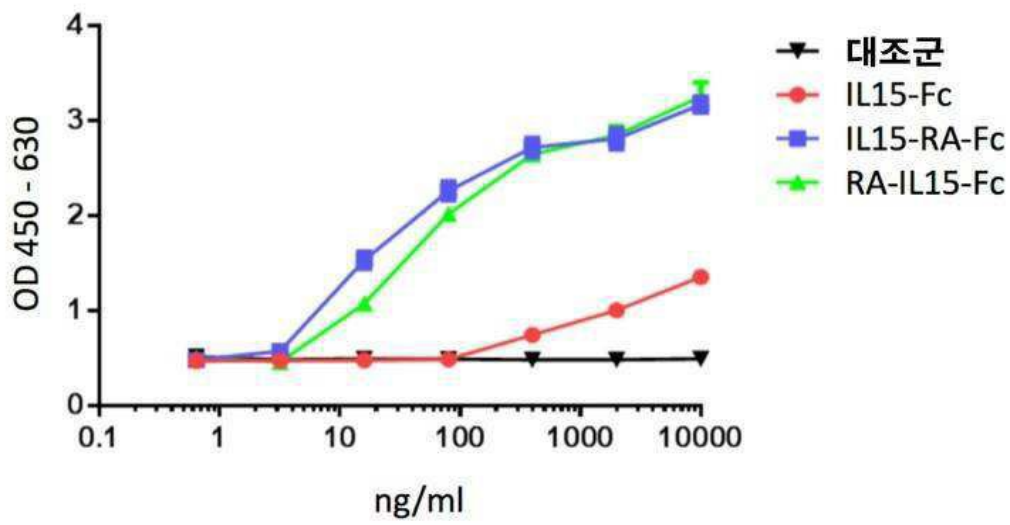
**도면1**



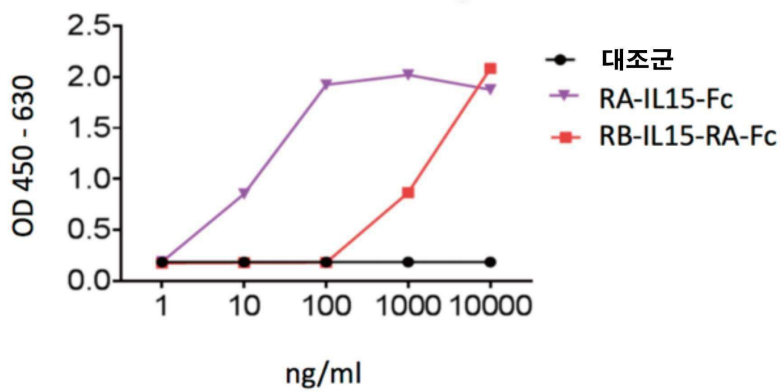
도면2



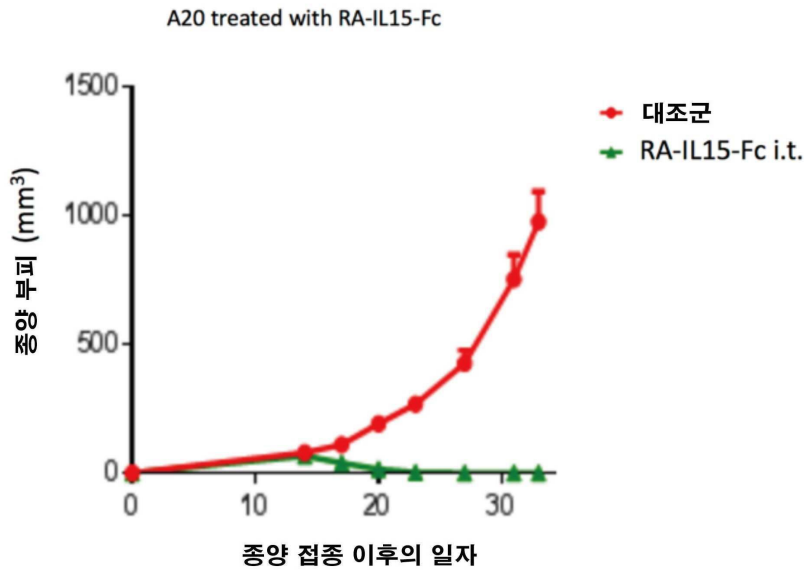
도면3



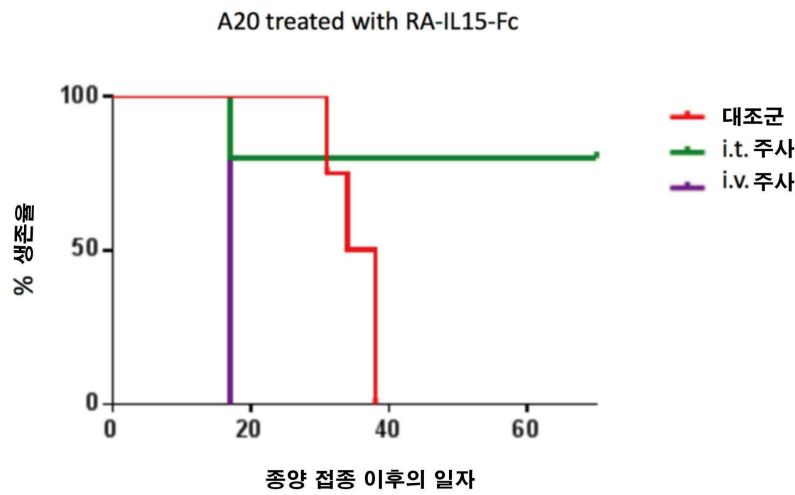
도면4



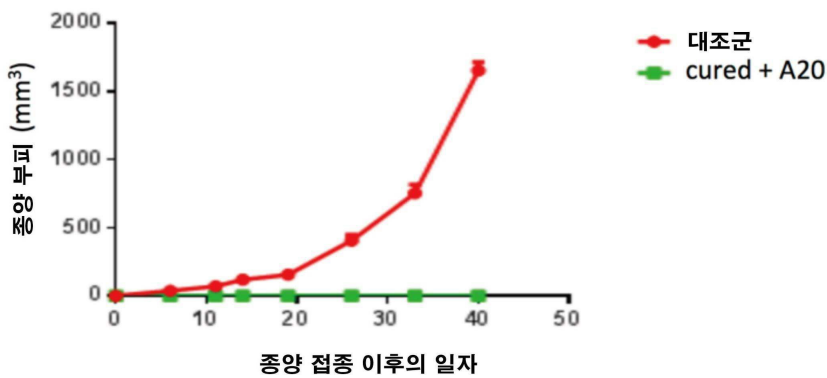
도면5a



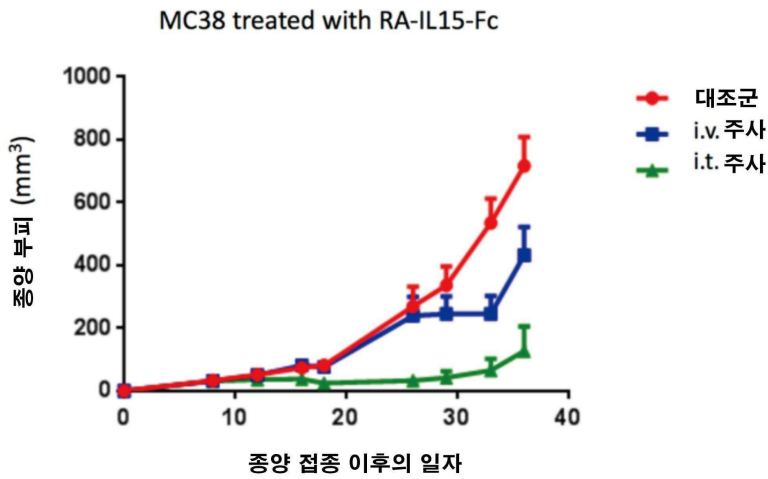
도면5b



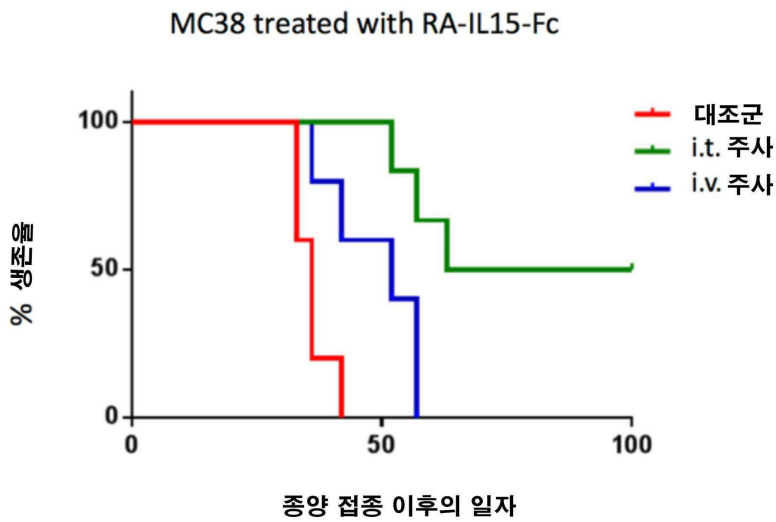
도면5c



도면6a

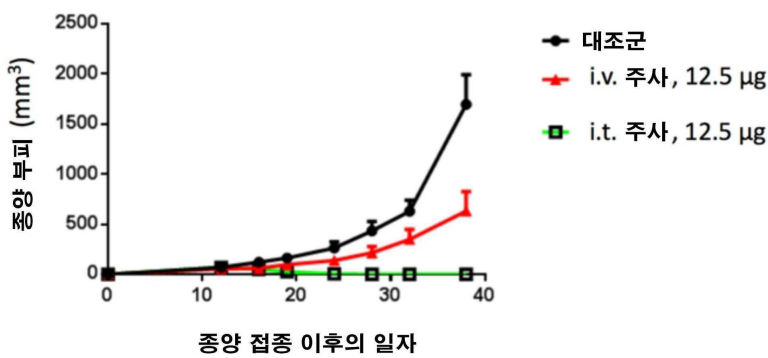


도면6b

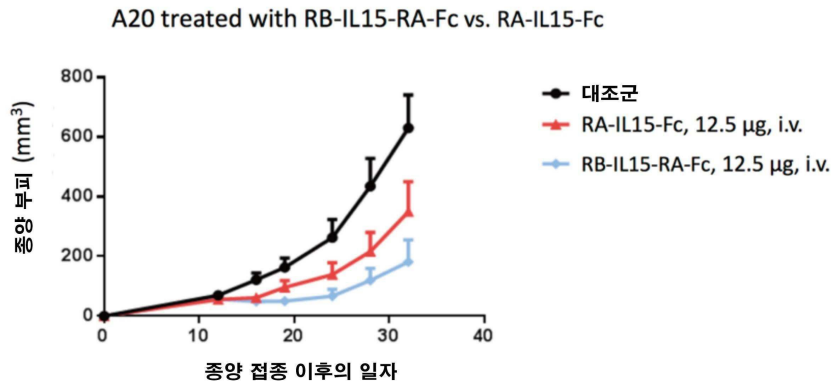


도면7

A20 treated with RA-IL15-Fc (정맥 내 vs. 종양 내 주사)

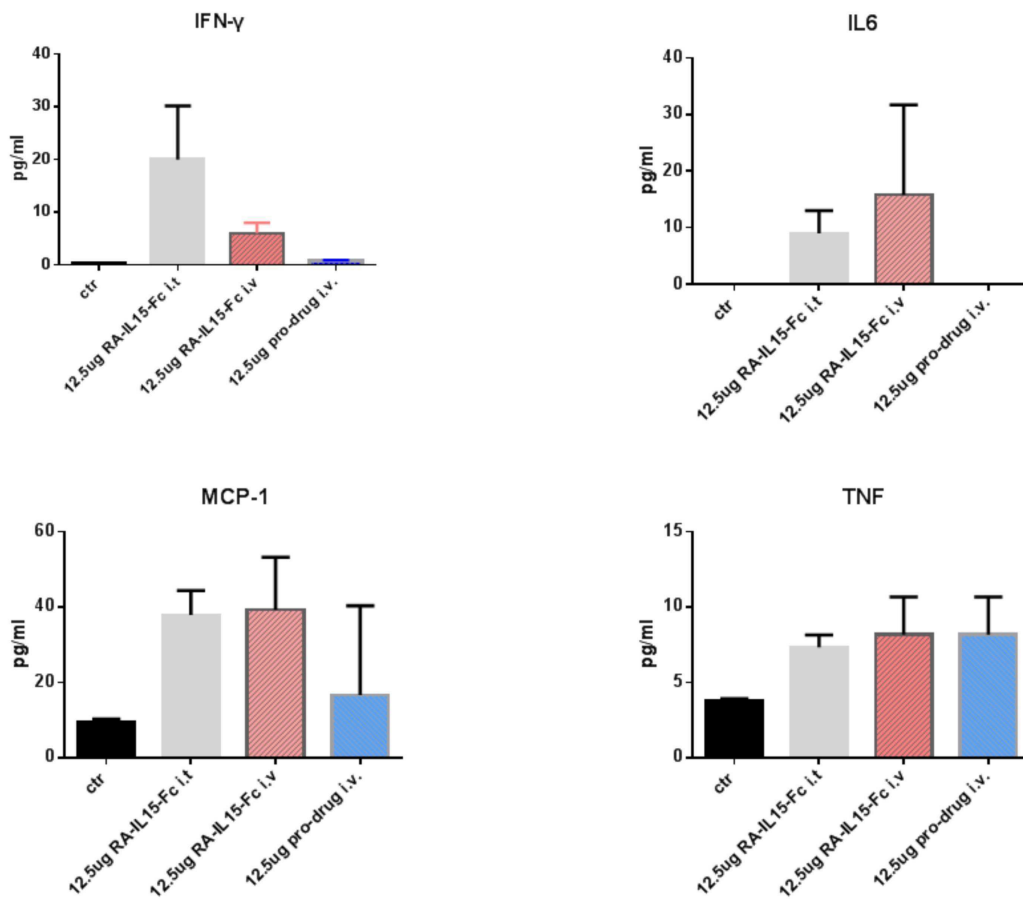


도면8a

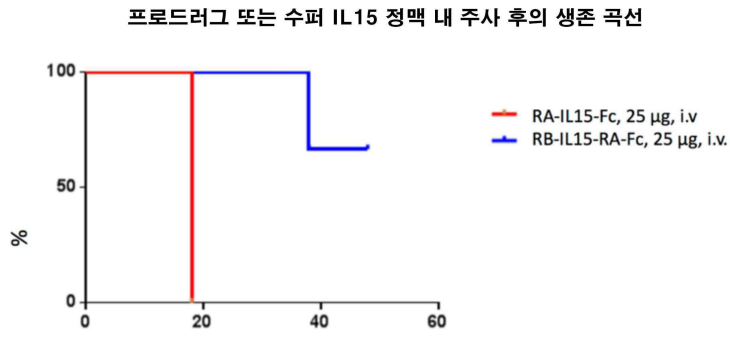


도면8b

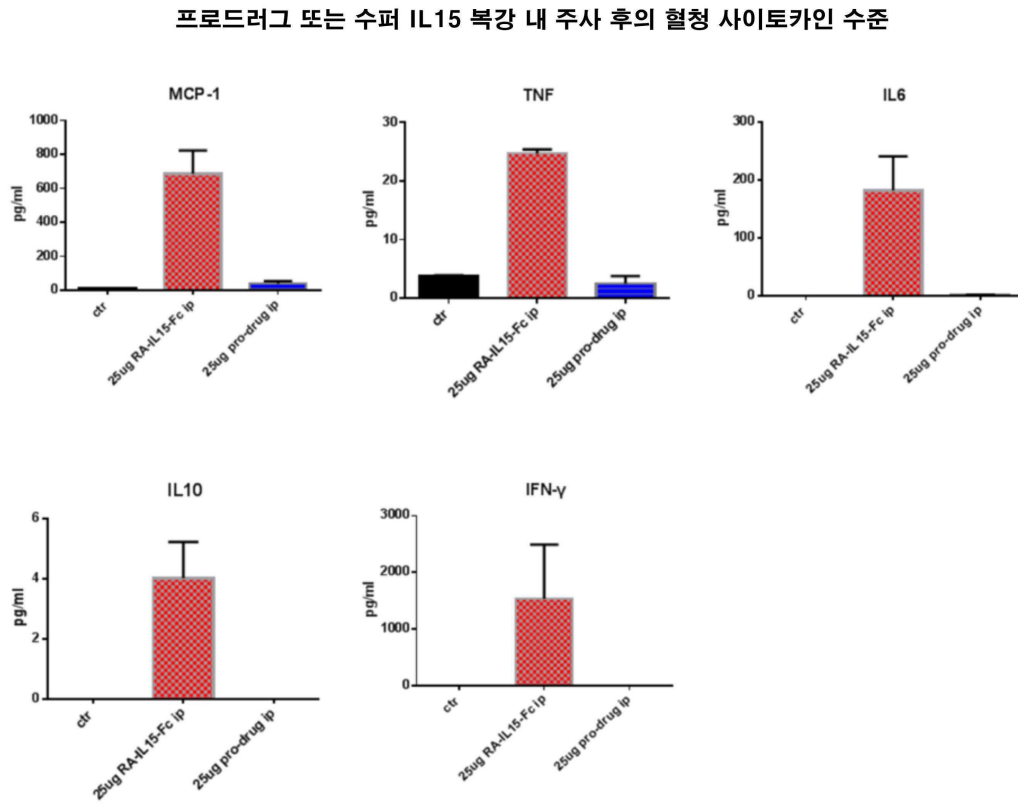
프로드러그 또는 수퍼 IL15 정맥 내 주사 후의 혈청 사이토카인 수준



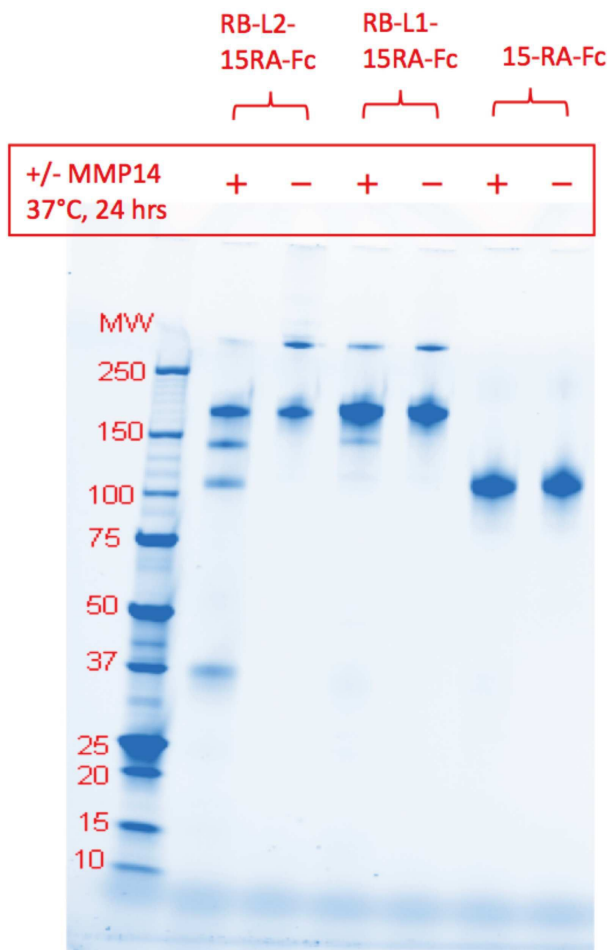
도면9a



도면9b



도면10



도면11

MMP14 배양을 갖거나 갖지 않는 인간 IL15 융합 단백질의 리포터 세포 활성

