

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

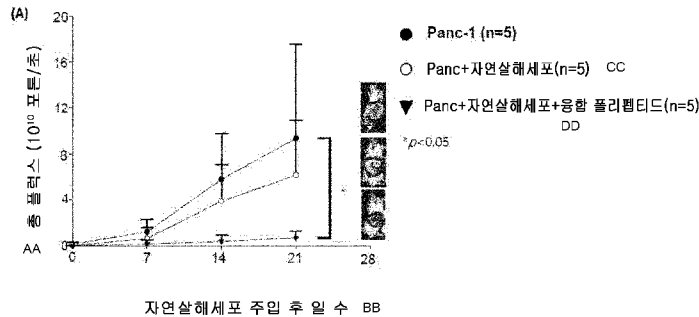
(43) 국제공개일
2018년 10월 11일 (11.10.2018) WIPO | PCT

WO 2018/186706 A1

- (51) 국제특허분류: C07K 16/30 (2006.01) A61K 35/17 (2015.01)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/004043
- (22) 국제출원일: 2018년 4월 5일 (05.04.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2017-0043988 2017년 4월 5일 (05.04.2017) KR
- (71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 김석호 (KIM, Seok Ho); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 이재민 (LEE, Jaemin); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 조덕 (CHO, Duck); 06351 서울시 강남구 일원로 81, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 안소영 (AHN, So Young); 06224 서울시 강남구 논현로 416, 3층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: NK CELL-ACTIVATING FUSION PROTEIN, NK CELL, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION INCLUDING SAME

(54) 발명의 명칭: NK 세포 활성화 융합 단백질, NK 세포 및 이들을 포함하는 약제학적 조성물



AA ... Total flux (10^{10} photons/second)
 BB ... Days after introduction of natural killer cell
 CC ... Panc+natural killer cell (n=5)
 DD ... Panc+natural killer cell+fusion polypeptide (n=5)
 EE ... Control group IgG
 FF ... Uncleaved fusion polypeptide
 GG ... Fusion polypeptide

(57) Abstract: The present invention relates to a fusion protein for treating cancer, and uses thereof. The fusion protein for preventing or treating cancer according to the present invention includes: an antibody or fragment thereof that binds to a tumor-associated antigen; a linker; and a fusion polypeptide including a natural killer cell-inducing protein of CXCL16. Accordingly, when coadministered with a natural killer cell, which is an immunocyte therapeutic agent, the fusion protein greatly increases the introduction of the natural killer cell into a cancer expressing a specific antigen, and thus exhibits a remarkable effect in the prevention or treatment of cancer.



WO 2018/186706 A1

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 암 치료용 융합 단백질 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 암 예방 또는 치료용 융합 단백질은 종양 관련 항원에 결합하는 항체 또는 이의 단편; 링키; 및 CXCL16의 자연 살해 세포 유도 단백질을 포함하는 융합 폴리펩티드를 포함하여 면역세포치료제인 자연 살해 세포와 공-투여시 특정 항원을 발현하는 암으로의 자연 살해 세포 유입을 크게 증강시킴으로써 암 예방 또는 치료에 현저한 효과를 보인다.

명세서

발명의 명칭: NK 세포 활성화 융합 단백질, NK 세포 및 이들을 포함하는 약제학적 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 자연살해세포의 암 유입 증대 및 항체의존적 세포독성(ADCC) 극대화를 위한 융합 단백질 및 자연살해세포를 이용한 신규 항암 면역세포 치료에 관한 것이다.
- [2] 또한, 본 발명은 융합 단백질을 이용한 암을 치료하는 방법 및 융합 단백질의 다양한 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [3] 자연살해세포 (Natural killer cell; NK cell)는 항원에 의한 사전 감각 없이도 종양세포, 박테리아, 세포 내 기생생물 또는 바이러스에 감염된 숙주 세포를 제거하는 기능을 수행하며, 부적절한 골수 이식을 거부하고, T 세포의 면역반응을 조절하는 등 생체 내 면역계 방어기작의 제1선에서 작용하는 행동세포이다.
- [4] 자연살해세포의 면역학적 기능은 그 살상 기능을 유발하는 활성화 신호 (stimulatory signal) 및 살상 기능을 억제하는 비활성화 신호 (inhibitory signal)의 균형에 의해 좌우된다. 구체적으로는 활성화 신호를 강하게 받은 자연살해세포는 표적 세포를 공격 및 제거하고, 비활성화 신호를 강하게 받은 자연살해세포는 표적세포를 살려두게 된다.
- [5] 자연살해세포의 살상기능으로는 ADCC (antibody-dependent cell cytotoxicity)와 자연살 (Natural Killing)을 들 수 있다. ADCC와 자연살은 모두 PTK (Protein Tyrosine Kinase)의 활성화를 필요로 하고, 자연살해세포의 비활성화 수용체에 의해 전달되는 비활성화 신호에 의해 차단된다는 공통점을 가진다. NK 세포의 살상 기능이 활성화 신호 및 비활성화 신호의 균형에 의해 좌우되기 때문에, 자연살해세포는 정상적인 숙주세포와 감염되거나 종양화된 세포를 구분하여 제거할 수 있게 된다.
- [6] 자연살해세포는 CD56의 발현정도에 따라 분류할 수 있으며, CD56^{dim} 자연살해세포는 말초혈액 (peripheral blood) 자연살해세포에 90% 이상 분포되어 있다. CD56^{dim}은 다른 CD56 발현 자연살해세포 보다 세포독성 (cytotoxicity)이 높은 것으로 알려져 있으며, 자연살해세포의 활성화 수용체 (activating receptor)인 killer Ig-like receptors (KIR) 및 퍼포린 (perforin)의 발현이 높은 것으로 알려져 있다. CD56^{bright} 자연살해세포는 CD56^{dim} 자연살해세포보다 그 수가 적으며, 세포독성 능력도 낮은 것으로 알려져 있다. 하지만 CD56^{bright} 자연살해세포는 면역조절기능 (IFN-gamma, TNF-alpha 등)이 높을 뿐만 아니라 ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity) 기능이 높은 것으로 보고되었다(

- The Journal of Immunology*, 2011, 186:6753-6761). 특히, CD56^{bright} 자연살해세포는 항체와 암에 대한 병합치료 시 상승된 효과가 있을 것으로 기대된다.
- [7] 한편, 종양은 그의 악성 표현형과 연관된 독특한 단백질을 발현할 수 있거나 특정 단백질을 정상 세포보다 더 많은 수로 과다 발현할 수 있음이 잘 알려져 있다. 종양 세포의 표면상에서의 특유한 단백질의 발현은 종양의 표현형적 아이덴티티 (identity) 및 생화학적 조성 및 활성을 프로빙함으로써 질환을 진단하고 특성화하는 기회를 제공하거나 종양 관련 항원을 타겟으로 하여 종양에 대한 새로운 치료 방법을 개발하게 한다.
- [8] 상기 종양 관련 항원에 대하여 특이적인 항원-항체 반응을 나타내는 항체는, 여러 가지 생체 면역 반응 (항체 의존성 세포성 세포 독성 활성 (ADCC), 보체 의존성 세포 독성 활성 (CDC) 등)을 유도하여 암 세포를 공격해 세포사를 유도하는 것이 알려져 있기 때문에, 종양의 치료에 유용한 항체 등이 개발되고 있으나 이의 치료 효능을 증진시키기 위한 연구 개발이 미비한 실정이다.
- [9] 이러한 배경 하에, 암 세포 표면에 특이적으로 발현되는 암 항원 및 자연살해세포를 이용하여 효과적으로 암을 치료할 수 있는 방법에 관한 연구개발이 수행될 필요성이 있다.

[10]

[11] [선행기술문헌]

[12] [특허문헌]

[13] 대한민국 공개특허 제10-2006-0079180호

[14] 대한민국 공개특허 제10-2015-0063145호

[15]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [16] 본 발명은 종양 관련 항원에 결합하는 항체 또는 이의 단편;
- [17] 링커; 및
- [18] CXCL16의 자연살해세포 유도 단백질을 포함하는 융합 폴리펩티드를 제공한다.
- [19] 본 발명은 또한 상기 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산, 이를 포함하는 벡터 또는 상기 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [20] 본 발명은 또한 종양 관련 항원에 결합하는 항체 또는 이의 단편;
- [21] 링커; 및
- [22] CXCL16의 자연살해세포 유도 단백질을 포함하는 융합 폴리펩티드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [23] 본 발명은 또한 종양 관련 항원에 결합하는 항체 또는 이의 단편;
- [24] 링커; 및
- [25] CXCL16의 자연살해세포 유도 단백질을 포함하는 융합 폴리펩티드, 및

자연살해세포 (Natural killer 세포, NK 세포)를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

- [26] 본 발명은 또한 암의 치료에 사용하기 위한 상기 융합 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [27] 본 발명은 또한 암의 치료를 위한 약제의 제조에서 상기 융합 폴리펩티드의 용도를 제공한다.
- [28] 본 발명은 또한 암의 치료를 위한 상기 융합 폴리펩티드의 용도를 제공한다.
- [29] 본 발명은 또한 상기 융합 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 약제학적으로 유효한 양을 환자에게 투여하여 암을 치료하는 방법을 제공한다.

과제 해결 수단

- [30] 본 발명자는 면역세포치료제인 자연살해세포를 암 조직 내로 효과적으로 유입시키기 위한 방법에 관해 연구 개발을 수행한 결과, 자연살해세포 표면에 발현되는 활성유도물질의 리셉터 중 자연살해세포의 표면에 CXCR3과 CXCR6가 과발현됨을 확인하고 이의 리간드 중 CXCL16이 자연살해세포의 migration에 효과적인 것을 확인한 후, 자연살해세포 유도 특성을 지닌 CXCL16과 종양 관련 항원에 특이적인 항체의 융합 단백질을 제조하여 이를 투여함으로써, 자연살해세포의 암으로 유도를 현저히 증강시키고 암의 치료에 현저한 효과가 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[31]

- [32] 본 발명에 있어서 용어, "종양 관련 항원"이란 정상 세포에서 발현되지 않거나 정상 세포와 대비하여 종양 세포에만 과다발현되는 종양 세포 상에, 바람직하게 종양 세포 표면상에 특이적으로 발현되는 항원으로, 종양 세포들에서 생성된 항원성 물질을 말한다.

- [33] 이에 제한되지 않지만, 종양에서 특이적으로 발현되는 종양 관련 항원은 예를 들어, 4-1BB (CD137), 5T4, AGS-5, AGS-16, 양기오포이에틴 (Angiopoietin) 2, CD19 (Cluster of Differentiation 19), B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), B7DC, B7H1, B7H2, B7H3, BT-062, BTLA, CAIX, 암태아성 (Carcinoembryonic) 항원, CTLA4, 크립토 (Cripto), ED-B, ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFL7, EpCAM, EphA2, EphA3, EphB2, FAP, 피브로넥틴, 엽산 수용체, 갱글리오사이드 (Ganglioside) GM3, GD2, 글루코코르티코이드-유도의 종양 괴사 인자 수용체 (GITR), gp100, gpA33, GPNMB, ICOS, IGFIR, 인테그린 α v, 인테그린 α v β , KIR, LAG-3, 루이스 (Lewis) Y, 메소텔린 (Mesothelin), c-MET, Her2 (human EGFR-related 2), MN 탄산무수화효소 IX, MUC1, MUC16, 넥틴(Nectin)-4, NKGD2, NOTCH, OX40, OX40L, PD-1, PD-L1 (Programmed death-ligand 1), PSCA, PSMA, RANKL, ROR1, ROR2, SLC44A4, 신테칸(Syndecan)-1, TACI, TAG-72, 테나신 (Tenascin), TIM3, TRAILR1, TRAILR2, EGFR, VEGFR-1, VEGFR-2 또는 VEGFR-3 등을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 메소텔린, PD-L1, Her2, CD19, MUC1, EGFR 및

VEGFR에 대하여 본 발명의 융합 폴리펩티드의 효과를 확인하였다.

[34]

[35] 본 발명에 있어서 용어, "항체"란 전체항체, 항원 인식 및 결합 능력을 보유하는 항체 단편, 단클론 항체, 다클론 항체, 및 항체 유사물질을 포함한다. 상기 항체는 IgM, IgG(예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4), IgD, IgA, 또는 IgE 일 수 있다.

[36] 본 발명에 있어서 용어, "항체 단편"이란 완전한 항체의 일부, 일반적으로 상기 완전한 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함하는 분자를 의미한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편; 단일 도메인 항체를 포함한다.

[37] 상기 "항체 또는 이의 단편"은 비-종양 세포 또는 정상 세포와 비교하여 종양 세포, 바람직하게 종양에서 특이적으로 발현하는 종양 관련 항원과 특이적으로 또는 바람직하게 결합할 수 있다. 여기에서 "특이적으로 결합하다" 또는 "바람직하게 결합하다"는 두 결합 파트너들 사이(예로, 항체 및 그의 결합 파트너인 항원)의 결합은 상기 두개의 결합 파트너들에 선택적이며, 원하지 않거나 비-특이적인 상호작용들과 구분될 수 있음을 의미한다.

[38] 본 발명에 있어서 용어, "단일쇄 Fv" 또는 "scFv (single-chain variable fragment)"란 전통적인 2쇄 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인들이 결합하여 하나의 쇠를 형성하는 항체를 지칭한다. 전형적으로, 링커 펩타이드가 상기 두 쇠 사이에 삽입되어 적합한 폴딩 및 활성 결합 부위의 생성을 허용한다.

[39] 본 발명에 있어서, "항원에 결합하는 항체"라는 용어는 충분한 친화성으로 항원과 결합함으로써 상기 항체가 항원을 표적화하는 치료성 제제로서 유용한 항체를 지칭한다.

[40] 본 발명에 있어서 용어, "링커"는 제1 분자(예컨대, 종양 관련 항원에 결합하는 항체 또는 이의 단편)를 제2 분자(CXCL16의 자연살해세포 유도 단백질)에 화학 결합 등을 통해 연결하는 펩타이드를 의미한다.

[41] 본 발명에 있어서 용어, "암" 또는 "종양"이란 비조절의 세포 증식에 의하여 특성화되는 인간들에서의 병리학적 상태를 의미한다. 이에 제한되지 않지만, 암종, 림프종, 아세포종, 및 백혈병을 포함한다. 암들의 더욱 특정한 예시들은 비제한적으로: 폐암 (소세포 및 비-소세포), 유방암, 전립선암, 암양종, 방광암, 위암, 췌장암, 간암 (간세포성), 간아종, 결장암, 두경부 편평암 (squamous) 세포 암종, 식도암, 난소암, 자궁경부암, 자궁내막암, 중피종, 흑색종, 육종, 골육종, 지방육종, 갑상선암, 유건종, 급성 (acute) 골수성 백혈병 (AML), 및 만성 (chronic) 골수성 백혈병 (CML)을 포함한다.

[42] 본 발명에 있어서, "발현 벡터"란 용어는 프로모터에 작동적으로 결합되는 관심 분자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[43] 본 발명에 사용된 바와 같이, "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은 호환적으로 사용되며 아미노산 잔기의 중합체에 대한 언급을 포함한다. 상기 용어들을 천연 아미노산 중합체들뿐만 아니라, 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 천연 아미노산의 인공적인 화학적 유사체인 아미노산 중합체들에

- 적용한다. 상기 용어들을 또한 단백질이 작용성으로 남아있도록 보존적인 아미노산 치환을 함유하는 상기 중합체들에 적용한다.
- [44] 본 발명에 있어서, "숙주 세포"는 상기 발현 벡터의 복제 또는 발현을 지지할 수 있는 세포를 의미한다. 숙주 세포는 원핵생물 세포, 예를 들어 에스케리키아 콜라이, 또는 진핵생물 세포, 예를 들어 효모, 곤충, 양서류 또는 포유동물 세포일 수 있다.
- [45] 종양 또는 암 성장 또는 진행에 관하여 "억제하는", "감소시키는", "줄이는"이란 용어들은 당해 분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 측정 가능한 양까지 환자의 종양 또는 암의 성장, 확산, 전이를 억제시킴을 지칭한다. 종양 또는 암의 성장, 진행 또는 확산은, 상기 종양 크기가 예를 들어 본 발명의 융합 폴리펩티드와 면역 세포 치료제인 자연살해세포의 공-투여 전, 또는 융합 폴리펩티드 투여 전 종양 크기에 비해 약 10%, 20%, 30%, 50%, 80% 또는 100% 이상 감소하는 경우 억제되거나, 감소되거나 줄어든다.
- [46] 본 발명은 종양 관련 항원에 결합하는 항체 또는 이의 단편; 링커; 및 CXCL16의 자연살해세포 유도 단백질을 포함하는 융합 폴리펩티드를 제공한다.
- [47] 본 발명에 따른 융합 폴리펩티드는 종양 관련 항원에 결합하는 항체 또는 이의 단편을 포함하여 종양의 세포 표면에 특이적으로 결합할 수 있으며, 항원-항체 결합 후 절단되어 방출되는 자연살해세포 유도 단백질인 CXCL16을 통해 자연살해세포를 목적하는 종양 세포로 유도할 수 있다.
- [48] 본 발명에 따른 융합 폴리펩티드는 종양 관련 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편을 포함하여 종양 표적 표면 항원에 결합한다. 종양 표적 표면 항원은 당해 분야에 널리 공지되어 있으며, 예컨대 메소텔린, PD-L1, Her2, CD19, MUC1, EGFR, VEGFR, B7H1, B7H2, B7H3, BT-062, BTLA, CAIX, 4-1BB, 5T4, AGS-5 또는 AGS-16 일 수 있으며, 이에 제한되지 아니한다.
- [49] 상기 종양 관련 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편은 단일쇄 Fv(scFv), Fab, Fab', F(ab')₂, 다이설파이드 안정화된 항체 등을 포함하며, 구체적으로 단일쇄 Fv (scFv)일 수 있다.
- [50] 상기 종양 관련 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편의 제조는 당업계에 알려진 제조방법에 따라 제조될 수 있다.
- [51] 본 발명에 따른 실시양태에 있어서, 상기 항체는 단일쇄 Fv (scFv)이다. scFv 항체의 V_H 및 V_L 영역은, 폴딩되어 2쇄 항체 중에서 발견되는 것과 유사한 항원 결합 부위를 생성시키는 단일쇄를 포함한다. 일단 폴딩되면, 비공유 상호작용이 상기 단일쇄 항체를 안정화시킨다. 보다 구체적인 실시태양에서, 상기 scFv를 재조합에 의해 생성시킨다. 본 발명의 항체의 보존적인 변체는 통상적으로 제조될 수 있으며, scFv 단편에 사용되는 보존적인 변체는 상기 V_H 및 V_L 영역들 간의 정확한 폴딩 및 안정화에 필요한 중요한 아미노산 잔기를 유지할 것이다.
- [52] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, scFv는 메소텔린의 scFV로 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 가지며, 구체적으로 서열번호 2로 표시되는

염기서열에 의해 코딩될 수 있다.

- [53] 본 발명의 다른 실시양태에 따르면, scFV는 PD-L1의 scFV로 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열, 구체적으로 서열번호 4로 표시되는 염기서열에 의해 코딩되는 중쇄 (V_H); 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열, 구체적으로 서열번호 6으로 표시되는 염기서열에 의해 코딩되는 경쇄 (V_L)를 포함할 수 있으며, 상기 종양 관련 항원인 PD-L1은 서열번호 7로 표시되는 염기서열에 의해 코딩되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [54] 본 발명의 또 다른 실시양태에 따르면, scFV는 Her2의 scFV로 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열, 구체적으로 서열번호 9로 표시되는 염기서열에 의해 코딩되는 중쇄; 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열, 구체적으로 서열번호 11로 표시되는 염기서열에 의해 코딩되는 경쇄를 포함할 수 있으며, 상기 종양 관련 항원인 Her2는 서열번호 12로 표시되는 염기서열에 의해 코딩되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [55] 본 발명의 또 다른 실시양태에 따르면, scFV는 CD19의 scFV로 서열번호 28로 표시되는 아미노산 서열, 구체적으로 서열번호 29로 표시되는 염기서열에 의해 코딩되는 중쇄; 및 서열번호 30으로 표시되는 아미노산 서열, 구체적으로 서열번호 31로 표시되는 염기서열에 의해 코딩되는 경쇄를 포함할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [56] 본 발명의 또 다른 실시양태에 따르면, scFV는 MUC-1의 scFV로 서열번호 32로 표시되는 아미노산 서열, 구체적으로 서열번호 33으로 표시되는 염기서열에 의해 코딩되는 중쇄; 및 서열번호 34로 표시되는 아미노산 서열, 구체적으로 서열번호 35로 표시되는 염기서열에 의해 코딩되는 경쇄를 포함할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [57] 본 발명의 또 다른 실시양태에 따르면, scFV는 EGFR의 scFV로 서열번호 36으로 표시되는 아미노산 서열, 구체적으로 서열번호 37로 표시되는 염기서열에 의해 코딩되는 중쇄; 및 서열번호 38로 표시되는 아미노산 서열, 구체적으로 서열번호 39로 표시되는 염기서열에 의해 코딩되는 경쇄를 포함할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [58] 본 발명의 또 다른 실시양태에 따르면, scFV는 VEGFR의 scFV로 서열번호 40으로 표시되는 아미노산 서열, 구체적으로 서열번호 41로 표시되는 염기서열에 의해 코딩되는 중쇄; 및 서열번호 42로 표시되는 아미노산 서열, 구체적으로 서열번호 43으로 표시되는 염기서열에 의해 코딩되는 경쇄를 포함할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [59] 상기 scFv 항체를 경쇄를 통해 펩타이드 링커에 직접 결합시킬 수 있으며 scFv가 결합된 Fc 영역을 통해 결합시킬 수 있다.
- [60] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, Fc(불변 영역)은 서열번호 13의 아미노산 서열을 가질 수 있으며, 구체적으로 서열번호 14로 표시되는 염기서열에 의해 코딩될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [61] 본 발명에 따른 링커는 펩타이드 링커로써 상기 영역들을 결합시키거나 또는 이들 간의 일부 최소 거리 또는 다른 공간적 관계를 보존하는 것 이외에 특정한 생물 활성을 갖지 않을 것이나, 구성 아미노산들은 상기 분자의 일부 성질, 예를 들어 폴딩, 순 전하, 또는 소수성에 영향을 미치도록 선택될 수 있다. 또한, 링커는 종양 관련 항원에 항체가 결합한 후 CXCL16이 분리되도록 절단 서열을 포함할 수 있다. 종양 관련 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 50개 이하 아미노산, 일반적으로 40개 이하 아미노산, 바람직하게는 30개 이하 아미노산, 및 보다 바람직하게는 20개 이하 아미노산의 길이, 보다 더 바람직하게 1 내지 10개의 아미노산 길이를 갖는 펩타이드 링커를 통해 연결될 수 있다.
- [62] 예컨대, 상기 펩타이드 링커는 임의의 프로테아제에 의해 절단되는 서열을 포함할 수 있고, 구체적으로 퓨린에 의해 절단되는 RVKR의 연속적인 아미노산 잔기를 포함하는 펩타이드 링커일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [63] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 본 발명에 따른 융합 폴리펩티드는 퓨린에 의해 절단되는 퓨린 절단부위, 즉 퓨린에 의해 절단될 수 있는 연속적인 아미노산 잔기를 포함하는 퓨린 절단부위를 포함하여 자연살해세포 유도 단백질이 암 세포에서 방출될 수 있게 한다.
- [64] 퓨린 절단 부위는 퓨린에 의해 절단 가능한 임의의 폴리펩타이드 부위일 수 있다. 듀커트(Duckert) 등(문헌 [Duckert et al., Protein Engineering, Design & Selection 17(1):107-112 (2004)], 본 문헌에서 그 내용 전체가 참조로 포함됨)에 의해 보고되는 바와 같이, 퓨린은 "서브스틸리신/켁신-유사 프로단백질 전환효소라 지칭되는 진화상 보존된 이염기- 및 일염기-특이적 CA^{2+} -의존성 세린 프로테아제 계열"의 효소이다.
- [65] 상기 문헌 등에서 알려진 퓨린 절단 부위 서열은 본 명세서에 포함되며, 구체적으로 서열번호 15의 아미노산 서열을 가지며, 서열번호 16으로 표시되는 염기서열에 의해 코딩될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [66] 상기 종양 관련 항원에 결합하는 항체 또는 이의 단편은 퓨린 절단 부위 아미노 말단을 통해 퓨린 절단 서열에 결합될 수 있고, 상기 항체의 중쇄, 경쇄, Fc(불변 영역) 또는 프레임워크 영역들에 직접 결합시킬 수도 있다.
- [67] 본 발명의 융합단백질은 CXCL16의 자연살해세포 유도 단백질을 포함하여 종양 관련 항원과 결합된 항체를 가진 종양 세포로 자연살해세포를 유도할 수 있다.
- [68] 본 발명에 따른 "자연살해세포 유도 단백질"이란 종양 세포로 자연살해세포의 유입을 유도하는 단백질, 즉 케모카인 (chemokine)으로 자연살해세포를 암 세포로 migration 시킬 수 있는 단백질인 CXCL16을 의미한다.
- [69] 구체적으로, 상기 CXCL16은 서열번호 17의 아미노산 서열을 가질 수 있다. CXCL16은 서열번호 18의 염기서열에 의해 코딩될 수 있다.
- [70] 상기 자연살해세포 유도 단백질은 펩타이드 링커를 통해 항체 또는 이의

단편에 연결될 수 있다. 본 발명에 따른 링커는 펩타이드 링커로써 상기 영역들을 결합시키거나 또는 이들 간의 일부 최소 거리 또는 다른 공간적 관계를 보존하는 것 이외에 특정한 생물 활성을 갖지 않을 것이나, 구성 아미노산들은 상기 분자의 일부 성질, 예를 들어 폴딩, 순 전하, 또는 소수성에 영향을 미치도록 선택될 수 있다. 또한, 링커는 중앙 관련 항원에 항체가 결합한 후 CXCL16이 분리되도록 절단 서열, 예컨대 임의의 프로테아제에 의해 절단 서열을 포함할 수 있다.

- [71] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 펩타이드 링커는 퓨린에 의해 절단되는 퓨린 절단부위 즉, 퓨린에 의해 절단될 수 있는 연속적인 아미노산 잔기를 포함하는 퓨린 절단 부위를 포함한다.
- [72] 본 발명에 따른 융합 폴리펩티드는 당업계에 알려진 비-제조합 방법 또는 제조합 방법을 통해 제조될 수 있으며, 바람직하게 제조합 방법을 통해 제조될 수 있다.
- [73] 즉, 상기 중앙 관련 항원에 결합하는 항체 또는 이의 단편; 링커; 및 CXCL16의 자연살해세포 유도 단백질을 암호화하는 cDNA를 벡터에 삽입함으로써 발현 벡터가 제조될 수 있다.
- [74] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 메소텔린 scFv 및 Fc를 포함하는 염기 서열을 벡터, 구체적으로 pcDNA3.1 벡터에 삽입하고, 퓨린 절단 부위 및 자연살해세포 유도 단백질을 암호화하는 염기 서열을 면역글로블린 (immunoglobulin) 서열 뒤에 삽입하여 발현벡터를 제조한다. 제조된 발현벡터의 예는 하기 도 2에 기재된 바와 같다.
- [75] 제조된 발현벡터는 세균, 식물, 효모, 곤충 및 포유동물 세포에서 발현시킬 수 있다. 당업자들은 에스케리키아 콜라이, 다른 세균 숙주, 효모 및 다양한 고등 진핵생물 세포, 예를 들어 COS, CHO, HeLa 및 골수종 세포주를 포함하여 단백질 발현에 이용될 수 있는 다수의 발현 시스템들을 이용하여 융합 폴리펩티드를 제조할 수 있다.
- [76] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 발현 벡터를 퓨린이 제거된 CHO 세포에 형질주입하여, 융합 폴리펩티드를 제조할 수 있다.
- [77] 제조된 융합 폴리펩티드는 암모늄 설페이트 침전, 친화성 컬럼, 컬럼 크로마토그래피 등을 포함한 당해 분야의 표준 과정에 따라 정제되어 목적하는 융합 폴리펩티드를 제공할 수 있다.
- [78] 본 발명은 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 제공한다.
- [79] 본 발명은 상기 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 구체적으로 도 2에 표시된 구조를 가진 발현 벡터를 제공할 수 있으며, 서열번호 19의 염기 서열을 가질 수 있다.
- [80] 본 발명은 상기 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 구체적으로, COS, CHO, HeLa 및 골수종 세포주로부터 선택되는 어느 하나의 세포일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

- [81] 본 발명은 종양 관련 항원에 결합하는 항체 또는 이의 단편;
- [82] 링커; 및 CXCL16의 자연살해세포 유도 단백질을 포함하는 융합 폴리펩티드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [83] 본 발명에 따른 암 예방 또는 치료용 약학 조성물은 면역세포치료제로서, 구체적으로 자연살해세포의 암으로의 유도를 통해 암 예방 또는 치료에 현저한 효과를 가진다. 본 발명에 따른 암 예방 또는 치료용 약학 조성물은 직접적 치료 효과뿐만 아니라 항암 보조제로써의 작용을 모두 포함한다.
- [84] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 본 발명에 따라 제조된 융합 폴리펩티드의 CXCL16에 의해 자연살해세포의 CD56^{dim}에서 CD56^{bright}로 세포의 분포가 변화되는 것이 확인되었으며, CD56^{dim}에 비해 ADCC 효과가 큰 CD56^{bright}로 분화시킴으로써, 본 발명의 약학 조성물은 암 예방 또는 치료에 효과적임을 확인하였다.
- [85] 본 발명은 또한 종양 관련 항원에 결합하는 항체 또는 이의 단편; 링커; 및 CXCL16의 자연살해세포 유도 단백질을 포함하는 융합 폴리펩티드, 및 자연살해세포(Natural killer cell)를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [86] 본 발명에 따라 면역세포치료제인 자연살해세포와 융합 폴리펩티드를 공-투여시 암으로의 자연살해세포 유입을 크게 증강시킴으로써 암 예방 또는 치료에 현저한 효과를 가진다.
- [87] 본 발명에 사용하기 위한 상기 약학 조성물을 하나 이상의 생리학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 사용하여 표준 기법에 의해 제형화할 수 있다. 적합한 약학 담체는 본 발명 및 문헌(Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed., University of the Sciences in Philadelphia, Lippencott Williams & Wilkins (2005))에 개시된다.
- [88] 본 발명의 융합 폴리펩티드 및/또는 자연살해세포를 임의의 적합한 경로, 예를 들어 흡입을 통해, 국소, 코, 경구, 비경구 또는 직장에 의해 투여하기 위해서 제형화할 수 있다. 따라서, 상기 언급된 약학 조성물의 투여를 피내, 피하, 정맥 내, 근육 내, 비내, 흡입에 의해, 대뇌 내, 기관 내, 동맥 내, 복강 내, 방광 내, 흉막 내, 관상동맥 내, 피하 또는 종양 내 주사에 의해, 주사기 또는 다른 장치를 사용하여 수행할 수 있다. 경피 투여가 또한, 흡입 또는 에어로졸 투여와 같이 고려된다. 정제 및 캡슐을 경구, 직장 또는 질내 투여할 수 있다.
- [89] 상기 약학 조성물은 통상적으로 약학적으로 허용 가능한 담체, 바람직하게는 수성 담체 중에 용해된 융합 폴리펩티드, 또는 융합 폴리펩티드 및 자연살해세포를 포함할 것이다. 융합 폴리펩티드 및 자연살해세포는 함께 또는 별개로 제공될 수 있다. 다양한 수성 담체, 예를 들어 완충된 염수 등을 사용할 수 있다. 이들 용액은 살균성이며 바람직하지 못한 물질이 일반적으로 없다. 이들 조성물을 통상적인, 널리 공지된 살균 기법에 의해 살균시킬 수 있다. 상기 조성물은 생리학적 조건에 근접하기 위해 요구되는 바와 같은 약학적으로 허용

가능한 보조 물질, 예를 들어 pH 조절 및 완충제, 독성 조절제 등, 예를 들어 나트륨 아세테이트, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 나트륨 락테이트 등을 함유할 수도 있다. 이들 제형 중 용합 폴리펩티드의 농도는 광범위하게 다양할 수 있으며, 선택된 특정한 투여 모드 및 환자의 필요에 따라 주로 유체 부피, 점도, 체중 등을 근거로 선택될 것이다.

[90] 본 발명의 약학 조성물은 정맥 내 투여 또는 체강 내 투여를 포함하여 비경구 투여에 적합하다.

[91] 본 발명의 용합 폴리펩티드 및/또는 자연살해세포를 주사, 예를 들어 일시 주사 또는 연속 주입에 의한 비경구 투여를 위해 제형화할 수 있다. 주사용 제형은 단위 투여형, 예를 들어 앰플 또는 수화-용량 용기 중에, 첨가된 보존제와 함께 존재할 수 있다. 주사 가능한 조성물은 바람직하게는 수성 등장성 용액 또는 현탁액이며, 좌약을 바람직하게는 지방 유화액 또는 현탁액으로부터 제조한다. 상기 조성물을 살균하고/하거나 상기 조성물이 보조제, 예를 들어 보존제, 안정제, 습윤 또는 유화제, 용해 촉진제, 삼투압 조절용 염 및/또는 완충제를 함유할 수 있다. 한편으로, 상기 활성 성분은 사용 전에, 적합한 비히클, 예를 들어 멸균성의 발열원이 없는 물에 의해 조성되는 분말 형태로 존재할 수 있다. 또한, 상기 활성 성분은 다른 치료학적으로 귀중한 물질을 함유할 수도 있다. 상기 조성물들을 통상적인 각각의 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제조하며, 이들은 약 0.1 내지 75%, 바람직하게는 약 1 내지 50%의 활성 성분을 함유한다.

[92] 경구 투여의 경우, 약학 조성물 또는 약제는 약학적으로 허용 가능한 부형제와 함께, 예를 들어 통상적인 수단에 의해 제조된 정제 또는 캡슐의 형태를 취할 수 있다. 활성 성분, 즉 본 발명의 조성물을 (a) 희석제 또는 충전제, 예를 들어 락토오스, 덱스트로스, 슈크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로스(예를 들어 에틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스), 글리신, 펙틴, 폴리아크릴레이트 및/또는 칼슘 수소 포스페이트, 칼슘 설페이트, (b) 윤활제, 예를 들어 실리카, 탭컴, 스테아르산, 그의 마그네슘 또는 칼슘 염, 금속성 스테아레이트, 콜로이드성 이산화규소, 수소화된 식물성 오일, 옥수수 전분, 나트륨 벤조에이트, 나트륨 아세테이트 및/또는 폴리에틸렌글리콜과 함께; 정제의 경우 또한 (c) 결합제, 예를 들어 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸트, 메틸셀룰로스, 나트륨 카복시메틸셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈 및/또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로스; 경우에 따라 (d) 붕해제, 예를 들어 전분(예를 들어 감자 전분 또는 나트륨 전분), 글리콜레이트, 아가, 알긴산 또는 그의 나트륨 염, 또는 발포성 혼합물; (e) 습윤제, 예를 들어 나트륨 라우릴 설페이트, 및/또는 (f) 흡수제, 착색제, 풍미제 및 감미제와 함께 포함하는 정제 및 젤라틴 캡슐이 바람직하다.

[93] 본 발명은 약학 조성물을 암과 같은 질병 또는 이의 악성 상태를 예방하거나, 치료하거나 또는 억제하기 위한 치료 유효 용량으로 환자에게 투여한다. 상기

약학 조성물을 환자에게서 유효한 치료 또는 진단 반응을 이끌어내기에 충분한 양으로 상기 환자에게 투여한다. 유효한 치료 또는 진단 반응은 상기 병 또는 악성 상태의 증상 또는 합병증을 적어도 부분적으로 저지하거나 늦추는 반응이다. 이를 수행하기에 적합한 양을 "치료학적으로 유효한 양"으로서 정의한다.

- [94] 투여되는 융합 폴리펩티드 및/또는 자연살해세포의 투여량은 포유동물의 종, 체중, 연령, 개별적인 조건, 치료하려는 영역의 표면적 및 투여 형태에 따라 다르다. 상기 용량의 크기는 또한 특정 환자에게서 특정 화합물의 투여에 동반되는 임의의 부작용의 존재, 성질 및 정도에 의해 결정될 것이다.
- [95] 약 50 내지 80 kg의 포유동물, 바람직하게 인간에게 투여하기 위한 단위 투여량은 융합 폴리펩티드에 대하여 약 1 mg/kg 내지 5 mg/kg의 양을 함유할 수 있으며, 자연살해세포에 대하여 약 1×10^5 cells/kg 내지 2×10^7 cells/kg의 양을 함유할 수 있다.
- [96] 전형적으로, 본 발명 조성물의 투여량은 목적하는 효과를 성취하기에 충분한 투여량이다. 최적의 투여 스케줄을 융합 폴리펩티드 및/또는 자연살해세포의 측정, 환자의 신체 중의 누적으로부터 계산할 수 있다. 하루에, 일주일에, 한 달에 또는 1년에 1 회 이상 제공될 수 있다. 당해 분야의 숙련가들은 최적 투여량, 투여 방법 및 반복 비율을 쉽게 결정할 수 있다. 당해 분야의 숙련가는 당해 분야에 공지되고 본 발명에 개시된 확립된 프로토콜에 따라 인간에게 융합 폴리펩티드 및/또는 자연살해세포의 투여를 위한 최적 투여를 결정할 수 있을 것이다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [97] 본 발명은 또한 암의 치료에 사용하기 위한 상기 융합 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [98] 본 발명은 또한 암의 치료를 위한 약제의 제조에서 상기 융합 폴리펩티드의 용도를 제공한다.
- [99] 본 발명은 또한 암의 치료를 위한 상기 융합 폴리펩티드의 용도를 제공한다.
- [100] 본 발명은 또한 상기 융합 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 약제학적으로 유효한 양을 환자에게 투여하여 암을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 암의 치료방법은 자연살해세포를 함께 투여할 수 있으며, 이에 따라 상승된 치료효과를 나타낼 수 있다.
- [101] 본 발명의 용도, 조성물, 치료 방법에서 언급된 사항은 서로 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다.

발명의 효과

- [102] 본 발명의 암 예방 또는 치료용 융합 단백질은 종양 관련 항원에 결합하는 항체

또는 이의 단편; 링커; 및 CXCL16의 자연살해세포 유도 단백질을 포함하는 융합 폴리펩티드를 포함하여 면역세포치료제인 자연살해세포와 공-투여시 특정 항원을 발현하는 암세포의 자연살해세포 유입을 크게 증강시킴으로써 특이적으로 암 예방 또는 치료에 현저한 효과를 보인다.

도면의 간단한 설명

- [103] 도 1은 케모카인 종류에 따른 Expanded 자연살해세포의 migration 정도를 확인한 결과를 나타낸다.
- [104] 도 2는 본 발명에 따른 융합 폴리펩티드를 제조하기 위한 발현 벡터의 모식도를 나타낸다.
- [105] 도 3은 본 발명에 따라 제조된 융합 폴리펩티드가 메소텔린 인식 부위에 의해 췌장암 세포주 표면에 존재하는 메소텔린을 인식하여 결합함을 확인한 결과를 나타낸다.
- [106] 도 4는 본 발명에 따라 제조된 융합 폴리펩티드가 PD-L1 인식 부위에 의해 췌장암 세포주 표면에 존재하는 PD-L1을 인식하여 결합함을 확인한 결과를 나타낸다.
- [107] 도 5는 본 발명에 따라 제조된 융합 폴리펩티드가 Her2 인식 부위에 의해 췌장암 세포주 표면에 존재하는 Her2를 인식하여 결합함을 확인한 결과를 나타낸다.
- [108] 도 6은 본 발명에 따라 제조된 융합 폴리펩티드가 췌장암 세포주에 결합하여 CXCL16을 방출하는 것을 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- [109] 도 7은 메소텔린에 결합하는 항체를 포함하는 본 발명의 융합 폴리펩티드를 다양한 암세포주 처리함에 따른 자연살해세포의 이동능이 증가한 것을 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- [110] 도 8은 PD-L1에 결합하는 항체를 포함하는 본 발명의 융합 폴리펩티드를 Panc-1 세포주에 처리함에 따른 자연살해세포의 유입이 증가한 것을 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- [111] 도 9는 PD-L1에 결합하는 항체를 포함하는 본 발명의 융합 폴리펩티드를 HT-29 세포주에 처리함에 따른 자연살해세포의 유입이 증가한 것을 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- [112] 도 10은 Her2에 결합하는 항체를 포함하는 본 발명의 융합 폴리펩티드를 Panc-1 세포주에 처리함에 따른 자연살해세포의 유입이 증가한 것을 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- [113] 도 11은 Her2에 결합하는 항체를 포함하는 본 발명의 융합 폴리펩티드를 MCF7 세포주에 처리함에 따른 자연살해세포의 유입이 증가한 것을 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- [114] 도 12는 CD19에 결합하는 항체를 포함하는 본 발명의 융합 폴리펩티드를 다양한 암세포주에 처리함에 따른 자연살해세포의 이동능이 증가한 것을

확인한 결과를 나타내는 도이다.

[115] 도 13은 MUC-1에 결합하는 항체를 포함하는 본 발명의 융합 폴리펩티드를 다양한 암세포주에 처리함에 따른 자연살해세포의 이동능이 증가한 것을 확인한 결과를 나타내는 도이다.

[116] 도 14는 EGFR에 결합하는 항체를 포함하는 본 발명의 융합 폴리펩티드를 다양한 암세포주에 처리함에 따른 자연살해세포의 이동능이 증가한 것을 확인한 결과를 나타내는 도이다.

[117] 도 15는 VEGFR에 결합하는 항체를 포함하는 본 발명의 융합 폴리펩티드를 다양한 암세포주에 처리함에 따른 자연살해세포의 이동능이 증가한 것을 확인한 결과를 나타내는 도이다.

[118] 도 16은 메소텔린에 결합하는 항체를 포함하는 본 발명의 융합 폴리펩티드를 다양한 암세포주에 처리함에 따른 자연살해세포의 침윤능이 증가한 것을 확인한 결과를 나타내는 도이다.

[119] 도 17은 PD-L1에 결합하는 항체를 포함하는 본 발명의 융합 폴리펩티드를 Panc-1 세포주에 처리함에 따른 자연살해세포의 침윤능이 증가한 것을 확인한 결과를 나타내는 도이다.

[120] 도 18은 PD-L1에 결합하는 항체를 포함하는 본 발명의 융합 폴리펩티드를 HT-29 세포주에 처리함에 따른 자연살해세포의 침윤능이 증가한 것을 확인한 결과를 나타내는 도이다.

[121] 도 19는 Her2에 결합하는 항체를 포함하는 본 발명의 융합 폴리펩티드를 Panc-1 세포주에 처리함에 따른 자연살해세포의 침윤능이 증가한 것을 확인한 결과를 나타내는 도이다.

[122] 도 20은 Her2에 결합하는 항체를 포함하는 본 발명의 융합 폴리펩티드를 MCF7 세포주에 처리함에 따른 자연살해세포의 침윤능이 증가한 것을 확인한 결과를 나타내는 도이다.

[123] 도 21은 CD19에 결합하는 항체를 포함하는 본 발명의 융합 폴리펩티드를 다양한 암세포주에 처리함에 따른 자연살해세포의 침윤능이 증가한 것을 확인한 결과를 나타내는 도이다.

[124] 도 22는 MUC-1에 결합하는 항체를 포함하는 본 발명의 융합 폴리펩티드를 다양한 암세포주에 처리함에 따른 자연살해세포의 침윤능이 증가한 것을 확인한 결과를 나타내는 도이다.

[125] 도 23은 EGFR에 결합하는 항체를 포함하는 본 발명의 융합 폴리펩티드를 다양한 암세포주에 처리함에 따른 자연살해세포의 침윤능이 증가한 것을 확인한 결과를 나타내는 도이다.

[126] 도 24는 VEGFR에 결합하는 항체를 포함하는 본 발명의 융합 폴리펩티드를 다양한 암세포주에 처리함에 따른 자연살해세포의 침윤능이 증가한 것을 확인한 결과를 나타내는 도이다.

[127] 도 25는 본 발명에 따라 Her2을 인식 할 수 있게 제조된 융합 폴리펩티드(Her2

scFv NRP-body)에 의해 자연살해세포의 침윤능이 증가한 것을 확인한 결과를 나타내는 도이다.

- [128] 도 26은 본 발명에 따라 제조된 융합 폴리펩티드 및 자연살해세포의 투여에 따른 암 조직으로 자연살해세포 유도를 나타내는 도이다.
- [129] 도 27은 본 발명에 따라 제조된 메소텔린 scFv 융합 폴리펩티드를 췌장암 이식 동물 모델에서 자연살해세포와 함께 투여하여 치료효과를 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- [130] 도 28은 본 발명에 따라 제조된 PD-L1 scFv 융합 폴리펩티드를 췌장암 이식 동물 모델에서 자연살해세포와 함께 투여하여 치료효과를 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- [131] 도 29는 본 발명에 따라 제조된 Her2 scFv 융합 폴리펩티드를 췌장암 이식 동물 모델에서 자연살해세포와 함께 투여하여 치료효과를 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- [132] 도 30은 자연살해세포에 CXCL16 및 IL-2를 단기간으로 처리시 자연살해세포의 분포 변화를 나타내는 도이다.
- [133] 도 31은 자연살해세포에 CXCL16 및 IL-2를 장기간으로 처리시 자연살해세포의 분포 변화를 나타내는 도이다.
- [134] 도 32는 본 발명에 따라 제조된 융합 폴리펩티드를 NK 세포에 처리시 분포되는 CD56^{bright} CD16⁺ 자연살해세포에 의한 세포 사멸 증진을 확인한 결과를 나타내는 도이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [135] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [136]
- [137] <실시예 1> 케모카인에 의한 Expanded 자연살해세포 migration 확인
- [138] 케모카인 종류에 따라 Expanded 자연살해세포의 migration 정도를 확인하기 위하여, Expanded NK cell을 회수 후 1,500 rpm으로 원심 분리하였다. 그리고 나서, 상층액을 제거하고 PBS로 워싱 후 세포 수를 세었다. Boyden chamber plate의 bottom layer에 케모카인으로 CXCL9, CXCL10, CXCL11 및 CXCL16을 10 nM 씩 분주하고, Boyden chamber plate의 upper layer에 Expanded NK cell 2 x 10⁵ cells를 분주하였다. 그 후, 37°C의 CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하고, Bottom layer를 회수하여, 1,500 rpm으로 원심 분리하였다. 그리고 나서, PBS 워싱을 수행한 후, CD56-PE 염색을 4°C 에서 30분 동안 수행하고, PBS로 워싱하였다. FAC 분석을 위해 Count Bright Absolute Counting Beads (Invitrogen)을 50 ul 씩 분주하고, FACS 분석을 수행하였다.
- [139] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[140] 도 1에서 확인되는 바와 같이, 다른 케모카인과 대비하여 CXCL16가 Expanded 자연살해세포의 migration에 현저한 효과를 보임이 확인되었다.

[141]

[142] <실시예 2> 융합 폴리펩티드 [NK cell recruitment protein(NRP)-body]의 제조 및 정제

[143] 암 표적 항원을 인식하는 scFv 서열, 링커역할을 하는 퓨린 서열, 및 가장 높은 효율로 자연살해세포의 유입을 유도하는 CXCL16 (NK cell Recruitment Protein; NRP)이 결합된 재조합 벡터를 제조하였다.

[144] 표적 항원으로서 메소텔린(mesothelin)을 인식하는 scFv 서열이 결합된 구체적인 재조합 벡터의 구조를 도 2에 나타내었다.

[145] pcDNA3.1 벡터를 Sfi1 효소로 2시간 분해시키고, 정제하여 결찰용 벡터를 제조했다. 메소텔린 scFv를 제조하기 위해 하기 표 1의 프라이머 서열을 기초로 PCR을 통해 증폭하여, 서열번호 2의 메소텔린 scFv 염기서열을 얻었으며 벡터 및 삽입물 샘플과 T4 리가아제를 혼합하여 25°C에서 2시간 배양하여 벡터와 삽입물의 결찰을 수행했다. 이를 pcDNA3.1 벡터의 Sfi1 enzyme site에 삽입하였다.

[146]

[147] [표1]

메소텔린 scFv 제조용 프라이머 서열

	서열
Mesothelin scFv Forward primer	5'-GGCCCAGCCGGCCATGCAGGTACAACACTGCAGCAG-3'(서열번호 20)
Mesothelin scFv Reverse primer	5'-GGCCCTTGGTGGAGGCACTCGAGACGGTGACCAGGGTTC-3'(서열번호 21)

[148]

[149] PD-L1 scFv를 제조하기 위해 하기 표 2의 프라이머 서열을 기초로 PCR을 통해 증폭하여, 서열번호 4의 중쇄 및 서열번호 6의 경쇄를 포함하는 PD-L1 scFv 염기서열을 얻었으며, 상기 메소텔린 scFv이 결합된 벡터의 제조방법과 동일한 방법으로 벡터와 삽입물의 결찰을 수행하여, 이를 pcDNA3.1 벡터의 Sfi1 enzyme site에 삽입하였다.

[150]

[151] [표2]

PD-L1 scFv 제조용 프라이머 서열

	서열
PD-L1 scFv Forward primer	5'-GGCCCAGCCGGCCATGCAGGTCCAAC TTGTGCAGTC-3'(서열번호 22)
PD-L1 scFv Reverse primer	5'-GGCCCTTGGTGGACCAAGCTGGAGATCAAA-3'(서열번호 23)

[152]

[153] Her2 scFv를 제조하기 위해 하기 표 3의 프라이머 서열을 기초로 PCR을 통해 증폭하여, 서열번호 9의 중쇄 및 서열번호 11의 경쇄를 포함하는 Her2 scFv 염기서열을 얻었으며, 상기 메소텔린 scFv이 결합된 벡터의 제조방법과 동일한 방법으로 벡터와 삽입물의 결찰을 수행하여, 이를 pcDNA3.1 벡터의 Sfi1 enzyme site에 삽입하였다.

[154] [표3]

Her2 scFv 제조용 프라이머 서열

	서열
Her2 scFv Forward primer	5'-GGCCCAGCCGGCCATGGAGGTTC AGCTGGTGGGA-3'(서열번호 24)
Her2 scFv Reverse primer	5'-GGCCCTTGGTACCAAGGTGGAGATCAAA-3'(서열번호 25)

[155]

[156] 또한, CD19, MUC-1, EGFR 및 VEGFR scFv를 제조하기 위해 각 scFv의 아미노산 서열을 기초로 scFv에 대한 염기서열(서열번호 29의 중쇄 및 서열번호 31의 경쇄를 포함하는 CD19 scFv; 서열번호 33의 중쇄 및 서열번호 35의 경쇄를 포함하는 MUC-1 scFv; 서열번호 37의 중쇄 및 서열번호 39의 경쇄를 포함하는 EGFR scFv; 서열번호 41의 중쇄 및 서열번호 43의 경쇄를 포함하는 VEGFR scFv)을 합성하였으며, 상기 메소텔린 scFv이 결합된 벡터의 제조방법과 동일한 방법으로 벡터와 삽입물의 결찰을 수행하여, 이를 pcDNA3.1 벡터의 Sfi1 enzyme site에 삽입하였다.

[157]

[158] CXCL16 및 퓨린 절단 부위는 하기 표 4의 프라이머 서열을 기초로 PCR로 증폭하여 벡터에 존재하는 면역글로불린 뒤 Not1 enzyme site를 이용하였다. 표적 항원을 인식하는 scFV가 삽입된 벡터에 Not1 효소로 2시간 분해시키고 정제를 한 후 벡터와 삽입물인 CXCL16 샘플을 리가아제 효소를 혼합하여 25°C에서 2시간 배양하여 벡터와 삽입물의 결찰을 수행했다.

[159]

[160] [표4]

CXCL16 및 퓨린 절단 부위 제조용 프라이머 서열

	서열
CXCL16 , Furin cleavage site Forward primer	5'-CACACTGGCGGCCGCACGGGTGAAGCGGAACGAGGGCAG-3'(서열번호 26)
CXCL16 , Furin cleavage site Reverse primer	5'-AATCTCGAGCGGCCGCCTAAGGAAGTAAATGCTTCTGTG-3'(서열번호 27)

[161] 제조된 발현백터로 퓨린이 제거된 CHO (Chinese hamster ovary) 세포에 형질 전환시켜 융합 폴리펩티드 (NRP-body)를 대량 생산하였다. 상기 발현 백터가 트랜스펙션된 CHO 세포를 150 mm 플레이트에서 배양하고, 회전병 (roller bottle) 배양기에서 72시간 배양하여 회수하였다. 회수한 배양액은 원심 분리 후 상층액을 AKTA 단백질 정제 시스템 (GE Healthcare Life Sciences)의 단백질 A-아가로스 컬럼을 이용하여, 정제를 수행함으로써 융합 폴리펩티드를 생산하였다.

[162]

[163] <실시예 3> 융합 폴리펩티드의 항원에 대한 결합확인

[164] 췌장암 세포주인 Panc-1 세포 2 x 10⁵ 개에 상기 실시예 2에서 제조된 메소텔린 인식 융합 폴리펩티드 (Mesothlin scFV NRP-body) (0.1 - 2 µg/ml)을 분주하여 4°C에서 20분간 배양하였다. 그 후 세포를 회수하고 PBS로 세정한 뒤 FITC가 결합된 FC 항체 (1 µg/ml)를 분주하고 4°C에서 20분간 배양하였다. 그 후, 다시 세포를 회수한 후에, PBS로 세정하여 FACS로 분석을 수행하였다.

[165] 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[166] 도 3에서 확인되는 바와 같이, 상기 실시예 2에서 제조된 융합 폴리펩티드의 메소텔린 인식 부위를 통해, 췌장암 세포주 표면에 존재하는 메소텔린이 인식되어 세포 표면에 융합 폴리펩티드가 결합되는 것이 확인되었다.

[167] 또한, 항원인식부위가 상이하더라도 본원발명의 융합 폴리펩티드가 표적 세포주 표면에 결합되는 것을 확인하기 위하여, 상기 실시예 2에서 제조된 PD-L1 scFv 융합 폴리펩티드 및 Her2 scFv 융합 폴리펩티드에 대해서도 상기 메소텔린 scFv 융합 폴리펩티드의 항원결합 실험과 동일한 조건으로 FACS 분석을 수행하였으며, 그 결과를 도 4(PD-L1 scFv NRP-body) 및 도 5(Her2 scFv NRP-body)에 나타내었다.

[168] 도 4 및 5에서 확인되는 바와 같이, PD-L1 scFv NRP-body 및 Her2 scFv NRP-body은 항원 인식 부위를 통해 각각 췌장암 세포주 표면에 존재하는 PD-L1

또는 Her2를 인식하여 세포 표면에 융합 폴리펩티드가 특이적으로 결합되는 것이 확인되었으며, 이를 통해 본 발명의 융합 폴리펩티드는 표적으로 하는 종양 관련 항원에 따라 표적 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 달리 적용할 수 있음을 확인하였다.

[169]

[170] <실시예 4> CXCL16 방출 특성 확인

[171] 상기 실시예 2에서 제조된 융합 폴리펩티드 (NRP-body)의 퓨린 절단 부위가 암 세포주의 퓨린에 의해 절단되고, CXCL16가 방출되는지를 인간 CXCL16 ELISA를 통해 확인하였다.

[172] CXCL16 ELISA는 R&D system의 Human CXCL16 ELISA 키트 (#DCX160)의 방법에 따라서 수행하였다. ELISA 분석에는 메소텔린 scFv 융합 폴리펩티드 (Mesothlin scFv NRP-body)를 96-웰 ELISA용 플레이트 (R&D)에 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{l}/\text{Well}$ 로 분주하여, 실온에서 2시간 방치하여 흡착시킨 것을 이용하였다. 상기 플레이트를 세정한 후, 2차 항체로서 퍼옥시다제 표지를 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 가하여 실온에서 2시간 방치하였다. 상기 플레이트를 Tween-PBS로 세정한 후, ABTS 기질액을 첨가하고, 발색시켜 OD 415 nm의 흡광도를 플레이트 판독기를 이용하여 측정하였다.

[173] 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[174] 도 6에서 확인되는 바와 같이, 융합 폴리펩티드 (NRP-body)가 췌장암 세포주 Panc-1의 메소텔린에 결합되고 융합 폴리펩티드의 퓨린 절단 부위가 암 세포의 퓨린에 의해 절단되면서 CXCL16이 방출되는 것이 확인되었다.

[175]

[176] <실시예 5> 융합 폴리펩티드에서 방출되는 CXCL16에 의한 자연 살해 세포 이동능(유입) 증진 확인

[177] 상기 실시예 2에서 제조된 융합 폴리펩티드가 타겟 항원을 발현하는 암을 인식해서 결합한 후 자연살해세포 유입 유도 단백질인 CXCL16이 방출되어 자연살해세포 유입이 증가되는지를 Boyden chamber system을 이용하여 확인하였다.

[178] HPDE, Panc-1(ATCC, Cat.CRL-1469), HCT116(ATCC, Cat.CCL-247), MCF7(ATCC, Cat.HTB-22) 및 HT-29(ATCC, Cat.HTB-38) 세포주를 2×10^5 개로 Boyden Chamber assay plate (Fisher Scientific, #07-200-155)의 bottom layer에 분주 후 37°C, CO₂ 배양기에서 2시간 배양하였다. 메소텔린 scFv-융합 폴리펩티드 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 상기 각 세포주에 분주하고 37°C, CO₂ 배양기에서 4시간 배양하였다. 자연살해세포는 CFSE (BioLegend, #RUO 423801)로 라벨링하고, upper layer에 2×10^5 개로 분주하고 37°C, CO₂ 배양기에서 4시간 배양하였다. 그 후, Bottom layer 세포를 회수하고, FACS를 통해 CFSE-labelling 자연살해세포의 분포를 확인하였다.

[179] 그 결과를 도 7에 나타내었다.

- [180] 도 7에서 확인되는 바와 같이, human expanded NK cell의 이동능이 메소텔린 scFv 융합 폴리펩티드에서 방출되는 CXCL16에 의해 증가됨이 확인되었으며, 나아가 암세포주의 종류에 따라 자연살해세포의 유입 증가정도가 상이함을 확인하였다.
- [181] 또한, 상기 실시예 2에서 제조된 PD-L1 scFv-융합 폴리펩티드 및 Her2 scFv-융합 폴리펩티드를 Panc-1, HT-29 또는 MCF7 세포주에 분주하여 상기 메소텔린 scFv-융합 폴리펩티드 실험과 동일한 조건으로 Boyden chamber system를 통해 자연살해세포의 유입 증가를 확인하였으며, 그 결과를 도 8(Panc-1에 대한 PD-L1 scFV NRP-body), 도 9(HT-29에 대한 PD-L1 NRP-body), 도 10(Panc-1에 대한 Her2 NRP-body) 및 도 11(MCF7에 대한 Her2 scFV NRP-body)에 나타내었다.
- [182] 도 8 내지 11에서 확인되는 바와 같이, 메소텔린 scFv-융합 폴리펩티드와 마찬가지로 human expanded NK cell의 이동능이 각 융합 폴리펩티드에서 방출되는 CXCL16에 의해 증가됨이 확인되었다.
- [183] 또한, 상기 실시예 2에서 제조된 CD-19, MUC-1, EGFR 및 VEGFR scFv-융합 폴리펩티드를 HPDE, K562(ATCC, Cat.CCL-243), HCT116(ATCC, Cat.CCL-247), Panc-1(ATCC, Cat.CRL-1469) 또는 MCF7(ATCC, Cat.HTB-22) 세포주에 분주하여 상기 메소텔린 scFv 실험과 동일한 조건으로 Boyden chamber system를 통해 자연살해세포의 유입 증가 여부를 확인하였으며, 그 결과를 각각 도 12(CD19 scFV NRP-body), 도 13(MUC-1 scFV NRP-body), 도 14(EGFR scFV NRP-body) 및 도 15(VEGFR scFV NRP-body)에 나타내었다.
- [184] 도 12 내지 15에서 확인되는 바와 같이, human expanded NK cell의 이동능이 융합 폴리펩티드에서 방출되는 CXCL16에 의해 증가됨이 확인되었으며, 나아가 암세포주의 종류에 따라 자연살해세포 유입의 증가정도가 상이함을 확인하였다.
- [185]
- [186] <실시예 6> 융합 폴리펩티드에서 방출되는 CXCL16에 의한 자연살해세포의 침윤능 확인
- [187] 상기 실시예 2에서 제조된 각 융합 폴리펩티드가 암세포에서 발현되는 타겟 항원을 인식해서 결합한 후 자연살해세포 유입 유도 단백질인 CXCL16이 방출되어 암세포에 대한 자연살해세포의 침윤능이 증가되는지를 침윤 분석(invasion assay)를 이용하여 확인하였다.
- [188] 구체적으로, HPDE, Panc-1, HCT116, MCF7, HT-29 및 K562 세포주를 2×10^5 개로 Boyden Chamber assay plate (Fisher Scientific, #07-200-155)의 bottom layer에 분주 후 37°C, CO₂ 배양기에서 2시간 배양하고, 실시예 2에서 제조된 융합 폴리펩티드 1 µg/ml를 상기 각 세포주에 분주하였다. Upper layer에 matrigel (BD, #354234)을 처리 한 후, 자연살해세포 2×10^5 개로 분주하고 37°C, CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. 그 후, Upper layer를 회수하고, 크리스탈

- 바이올렛 (crystal violet)에 1시간 염색 후, upper layer를 임의적으로 3부분 촬영하여 image J program으로 자연살해세포의 침윤능을 측정하였다.
- [189] 각 융합 폴리펩티드에 대한 결과를 각각 도 16 내지 24에 나타내었다.
- [190] 도 16 내지 24에서 확인되는 바와 같이, human expanded NK cell의 침윤성이 융합 폴리펩티드에서 방출되는 CXCL16에 의해 증가됨이 확인되었으며, 나아가 암세포주의 종류에 따라 자연살해세포의 침윤능 증가정도가 상이함을 확인하였다.
- [191]
- [192] <실시예 7> 유입이 증가된 자연살해세포에 의한 암 세포주의 사멸 유도 확인
- [193] 상기 실시예 2에서 제조된 융합 폴리펩티드에서 CXCL16이 방출된 후 유입이 증가된 자연살해세포에 의해 암 세포주의 사멸을 유도하는 ADCC (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity) 효능을 확인하였다.
- [194] Panc-1 세포주 2×10^5 개를 96-웰 플레이트에 분주 후 37°C, CO₂ 배양기에서 2시간 배양하였다. 메소텔린 scFV-융합 폴리펩티드 1 µg/ml을 target cell에 처리 후 37°C, CO₂ 배양기에서 2시간 배양하였다. Target cell과 Effector cell의 비율이 1:1이 되도록 자연살해세포를 2×10^5 개로 첨가하고 37°C, CO₂ 배양기에서 4시간 배양하였다. 세포를 회수하고, PBS로 세정 후, Annexin V (1 µg/ml)와 PI (1 µg/ml)로 30분간 염색하고 FACS로 분석을 수행하였다.
- [195] 그 결과를 도 25에 나타내었다.
- [196] 도 25에서 확인되는 바와 같이, CXCL16이 방출된 후 유입이 증가된 자연살해세포에 의해 암 세포의 사멸이 현저히 증가하였음이 확인되었다.
- [197]
- [198] <실시예 8> 암 이식 동물모델에서 융합 폴리펩티드의 치료 효능 확인
- [199] 실시예 2에서 제조된 융합 폴리펩티드를 암 이식 동물 모델에 주입하여 in vivo에서 효과를 확인하였다.
- [200] In vivo 실험을 위해 6주령 암컷 NSG (NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1wjl/SzJ) 마우스를 사용하였다. 마우스 관리는 한국생명공학연구원의 실험동물자원센터의 Animal Care Committee에 의거하여 수행하였다. Panc-1을 마우스 췌장에 주입하여 2주간 종양을 형성하고, 메소텔린, PD-L1 또는 Her2 scFV 융합 폴리펩티드 (5 mg/kg)을 5일 간격으로 복강에 주입하였다.
- [201] 종양 성장 (Tumor growth) 실험을 위해 자연살해세포를 1×10^7 /마우스로 I.V 주입하였다. 종양성장 관찰은 IVIS Living Image 3.0 program을 이용하여 루시페라아제 (luciferase)를 발현하는 Panc-1의 성장을 관찰하였고, 자연살해세포의 이동능 실험은 DiR로 염색한 자연살해세포를 1×10^7 /마우스로 정맥 투여하여 IVIS fluorescence Image program 및 FACS로 관찰하였다.
- [202] 그 결과를 도 26 내지 29에 나타내었다. 도 26은 상기 실시예 2에서 제조된 융합 폴리펩티드 및 자연살해세포의 투여에 따른 암 조직으로의 자연살해세포 유도를 나타낸 것이며, 도 27은 메소텔린 scFV NRP-body, 도 28은 PD-L1 scFV

NRP-body 및 도 29는 Her2 scFV NRP-body를 자연살해세포와 함께 투여하여 치료 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[203] 도 26의 A에서 확인되는 바와 같이, NRP-body에 의해 자연살해세포의 암 조직으로의 유입이 크게 증가하였으며, 도 26의 B에서와 같이 이러한 작용 효과는 NRP-body의 첨가에 의해서만 일어났다.

[204] 또한, 도 27 내지 29에서 확인되는 바와 같이, 실시예 2에서 제조된 융합 폴리펩티드를 자연살해세포와 함께 투여하는 경우, 종양 성장이 현저히 억제되었으며, 종양 조직 내로 자연살해세포의 이동이 크게 증가하였다.

[205] 상기 결과로부터 본 발명의 융합 폴리펩티드가 면역 세포 치료제인 자연살해세포의 유입을 증강시킴으로써 암 치료에 현저한 효과를 보임을 확인하였다.

[206]

[207] <실시예 9> CXCL16 처리에 따른 자연살해세포의 특성 변화 확인

[208] 자연살해세포가 융합 폴리펩티드에서 방출되는 CXCL16에 의해 변화되는 특성을 확인하기 위하여, 자연살해세포의 성장을 촉진하는 IL-2와 CXCL16을 함께 각각 200 U 및 100 nM의 농도로 0, 1, 2, 8 또는 16시간 처리하고, CD56^{dim} 및 CD56^{bright}의 분포를 FACS를 통해 확인하여 그 결과를 도 30에 나타내었으며, 오른쪽 상단의 사각형 내 세포들은 CD56^{bright} 세포를 나타낸다.

[209] 도 30에서 확인되는 바와 같이, CXCL16 처리에 따른 시간 경과에 따라 CD56^{dim}에서 CD56^{bright}로 세포의 분포가 변화하는 것이 확인되었다.

[210] 또한, 위 실험 방법과 유사하게 장기간 (14일간) IL-2와 CXCL16을 동시에 처리한 후 CD56의 발현 변화를 확인하여 그 결과를 도 31에 나타내었다.

[211] 도 31에서 확인되는 바와 같이, IL2 및 CXCL16을 같이 투여한 실험군(도 31 A의 IL-2+CXCL16, 도 31 B의 CXCL16)에서 CD56^{bright} 세포로 변화가 확인되었다.

[212] 위 결과를 통해, CXCL16가 CD56^{dim}를 ADCC (Antibody dependent cellular cytotoxicity) 효과가 큰 CD56^{bright}로 변화시킴으로써 자연살해세포의 특성에 영향을 미치는 것이 확인되었다.

[213]

[214] <실시예 10> 융합 폴리펩티드(NRP-body)처리에 따른 자연살해세포의 특성 변화

[215] CXCL16에 의해 변화된 자연살해세포의 분포에 따라 암세포의 사멸을 유도하는 ADCC (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity) 효능 변화를 확인하였다.

[216] Panc-1 세포주 2×10^5 개를 96-웰 플레이트에 분주 후 37°C, CO₂ 배양기에서 2시간 배양하였다. Target cell과 Effector cell의 비율이 1:1이 되도록 자연살해세포를 2×10^5 개로 첨가하고 37°C, CO₂ 배양기에서 4시간 배양하였다. 세포를 회수한 후, PBS로 세정 후 Annexin V (1 µg/ml)와 PI (1 µg/ml)로 30분간 염색하고 FACS로 분석을 수행하였다.

[217] 그 결과를 도 32에 나타내었다.

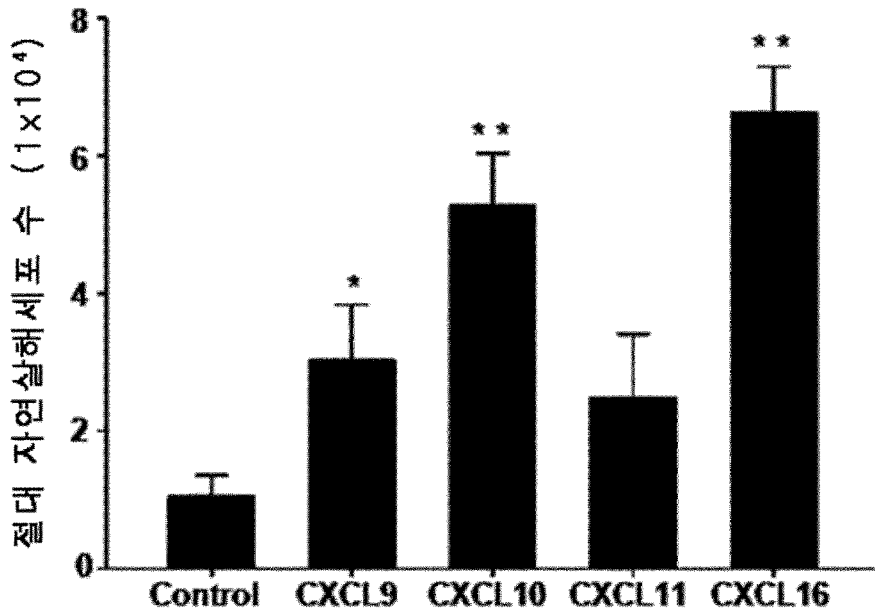
[218] 도 32에서 확인되는 바와 같이, 융합폴리펩티드의 CXCL16에 의해 증가된 CD56^{bright} CD16⁺ 자연살해세포에 의해 암세포의 사멸이 증가하였음이 확인되었다.

청구범위

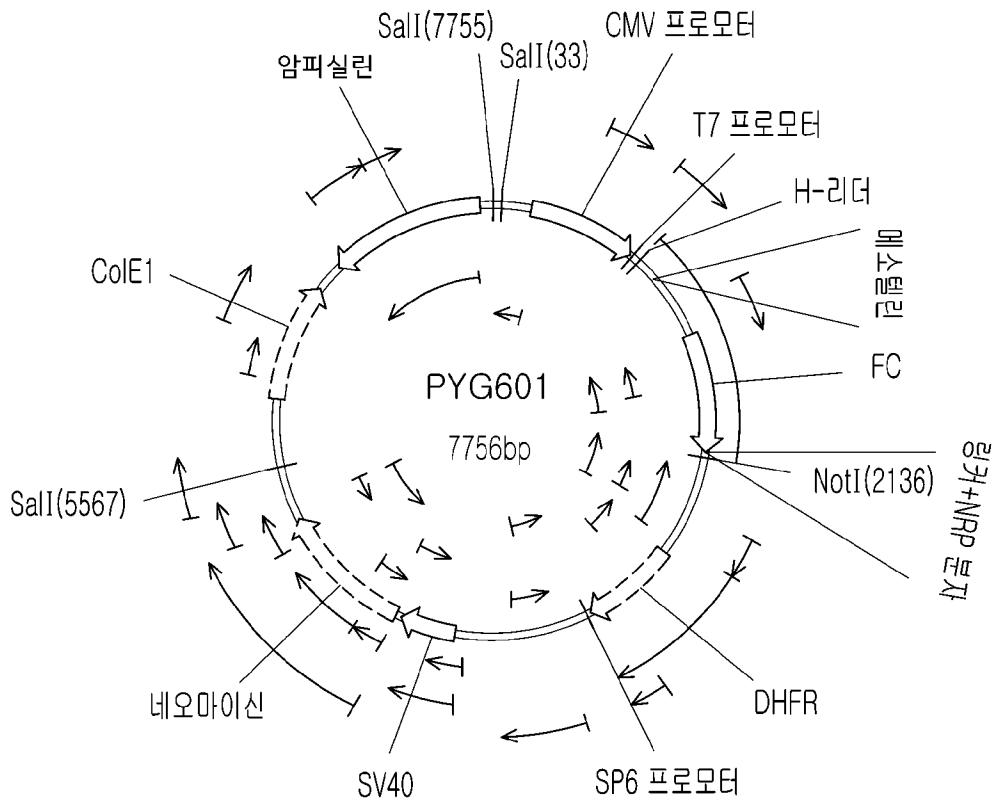
- [청구항 1] 종양 관련 항원에 결합하는 항체 또는 이의 단편; 링커; 및 CXCL16의 자연살해세포 유도 단백질을 포함하는 융합 폴리펩티드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 종양 관련 항원은 메소텔린 (Mesothelin), PD-L1 (Programmed death-ligand 1), Her2 (human EGFR-related 2), CD19, MUC1, EGFR, VEGFR, B7H1, B7H2, B7H3, BT-062, BTLA, CAIX, 4-1BB, 5T4, AGS-5 또는 AGS-16으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 융합 폴리펩티드.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 항체는 단일쇄 Fv 단편(scFv)인 융합 폴리펩티드.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 링커는 퓨린 절단 부위를 포함하는 융합 폴리펩티드.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 퓨린 절단 부위는 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 융합 폴리펩티드.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 CXCL16은 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 융합 폴리펩티드.
- [청구항 7] 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산.
- [청구항 8] 제7항에 따른 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 발현 벡터.
- [청구항 9] 제8항에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 숙주 세포는 COS, CHO, HeLa 및 골수종 세포주로부터 선택되는 어느 하나인, 숙주 세포.
- [청구항 11] 종양 관련 항원에 결합하는 항체 또는 이의 단편; 링커; 및 CXCL16의 자연살해세포 유도 단백질을 포함하는 융합 폴리펩티드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 항원은 메소텔린, PD-L1, Her2, CD19, MUC1, EGFR, VEGFR, B7H1, B7H2, B7H3, BT-062, BTLA, CAIX, 4-1BB, 5T4, AGS-5 또는 AGS-16으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 13] 제11항에 있어서, 상기 암은 췌장암, 유방암, 전립선암, 위암, 간암 또는 폐암으로부터 선택되는 어느 하나인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 14] 제11항에 있어서, 상기 링커는 퓨린 절단 부위를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 15] 제11항에 있어서, 상기 CXCL16은 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 16] 종양 관련 항원에 결합하는 항체 또는 이의 단편; 링커; 및 CXCL16의

자연살해세포 유도 단백질을 포함하는 융합 폴리펩티드; 및
자연살해세포 (Natural killer cell)를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학
조성물.

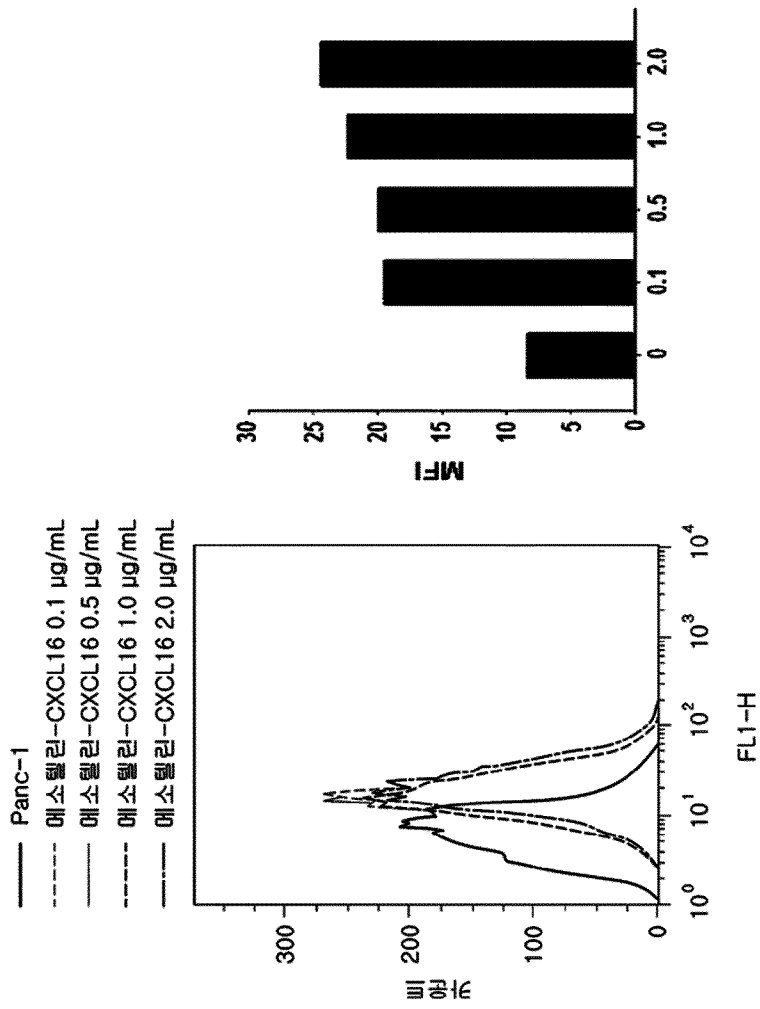
[도1]



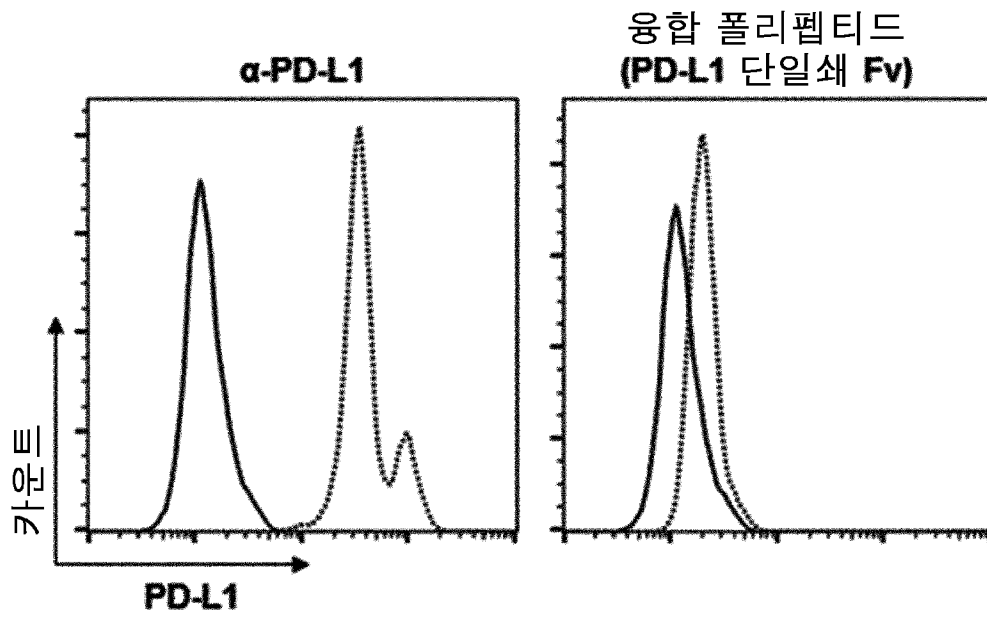
[도2]



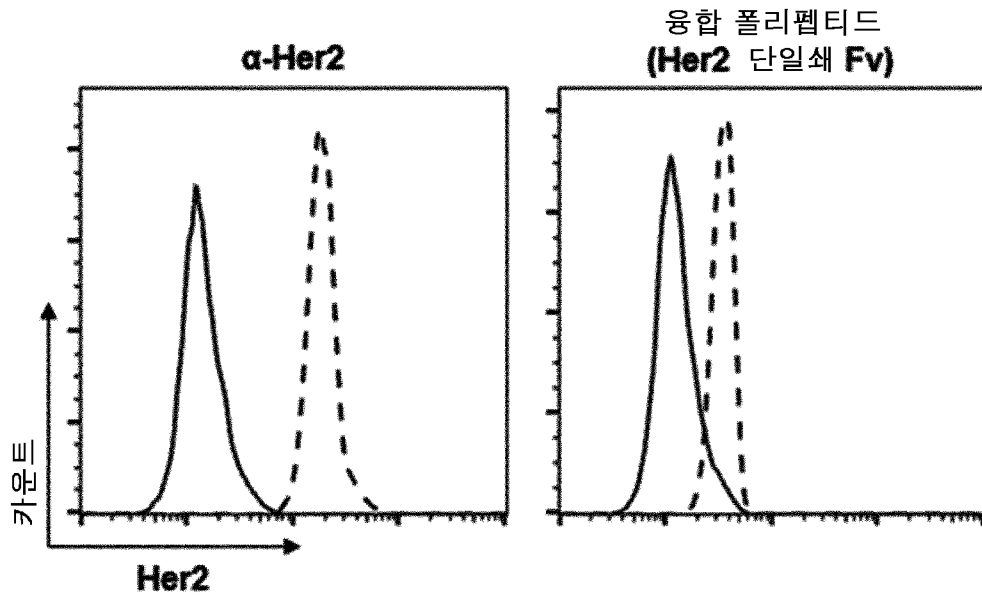
[도3]



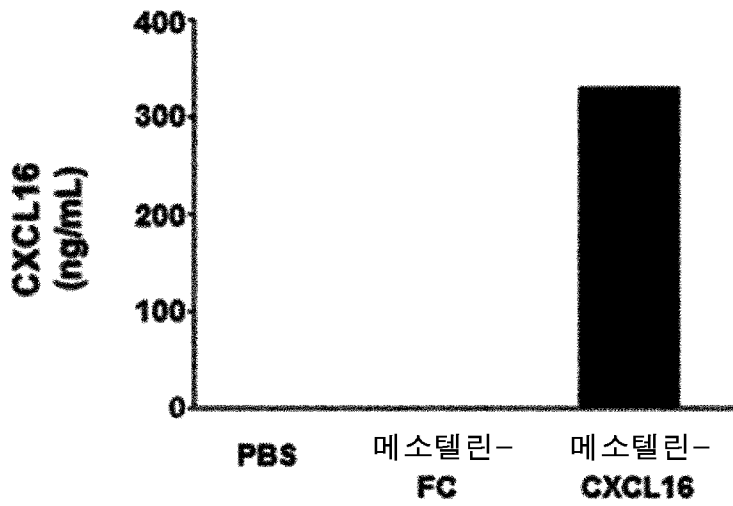
[도4]



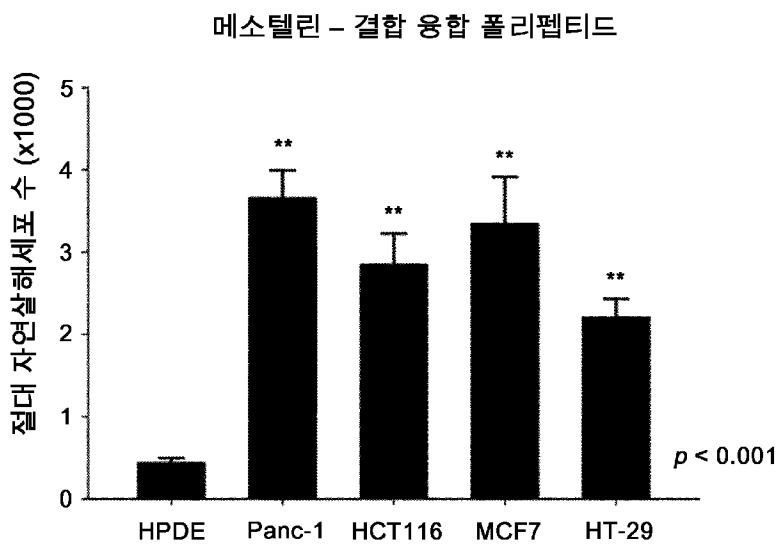
[도5]



[도6]

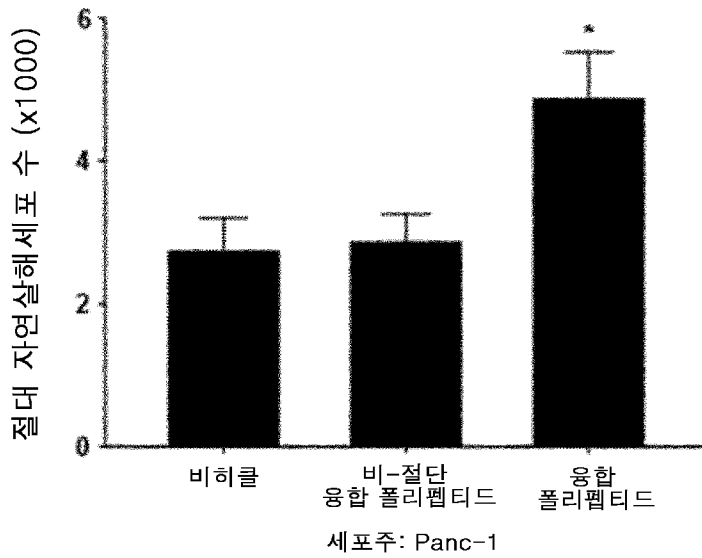


[도7]



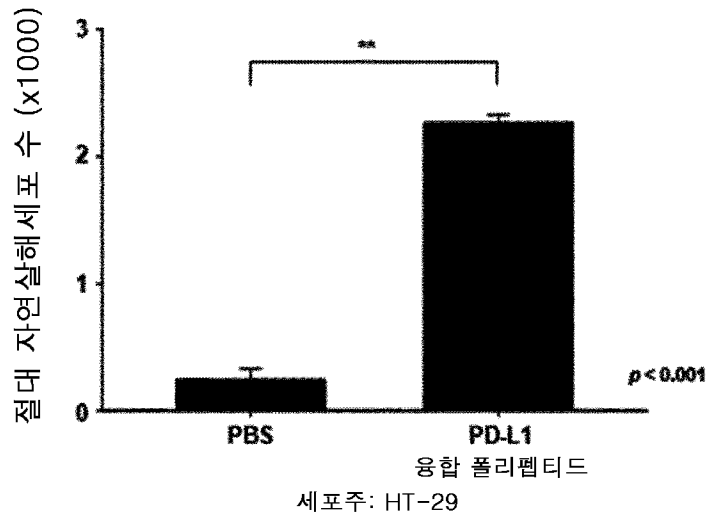
[도8]

PD-L1 - 결합 융합 폴리펩티드

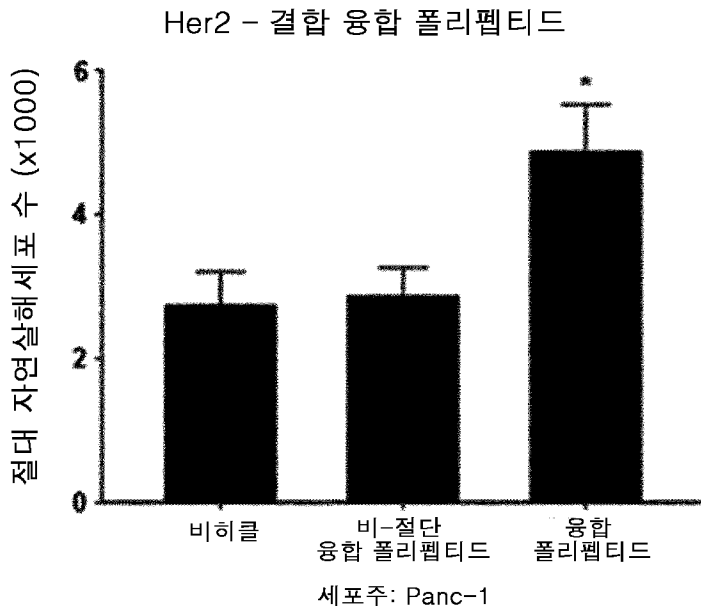


[도9]

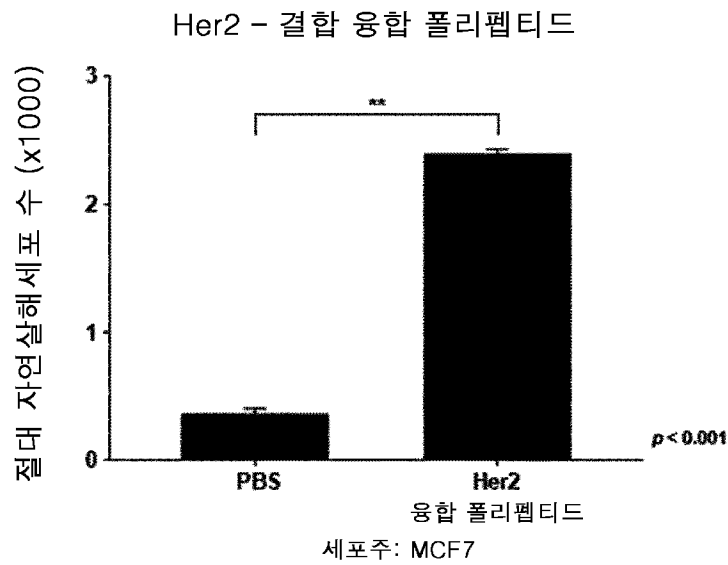
PD-L1 - 결합 융합 폴리펩티드



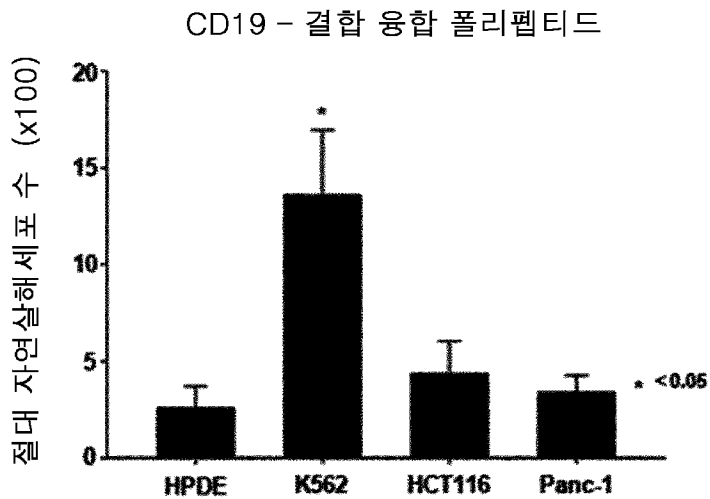
[도10]



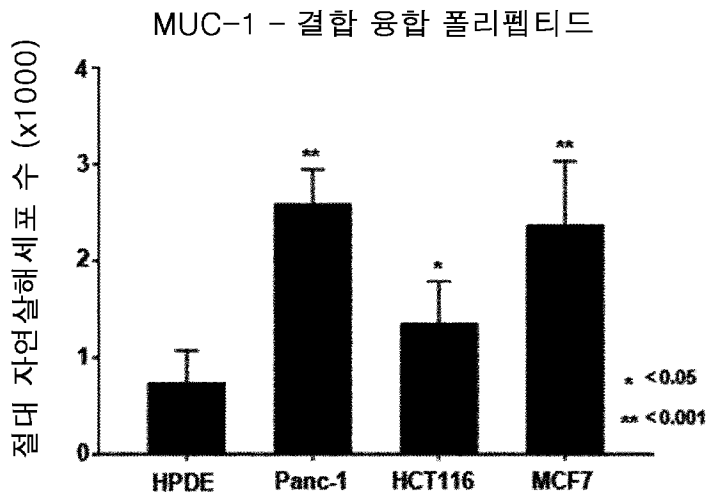
[도11]



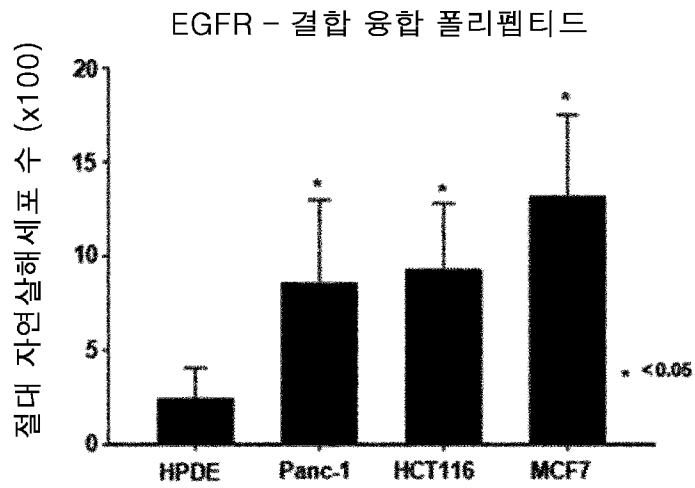
[도12]



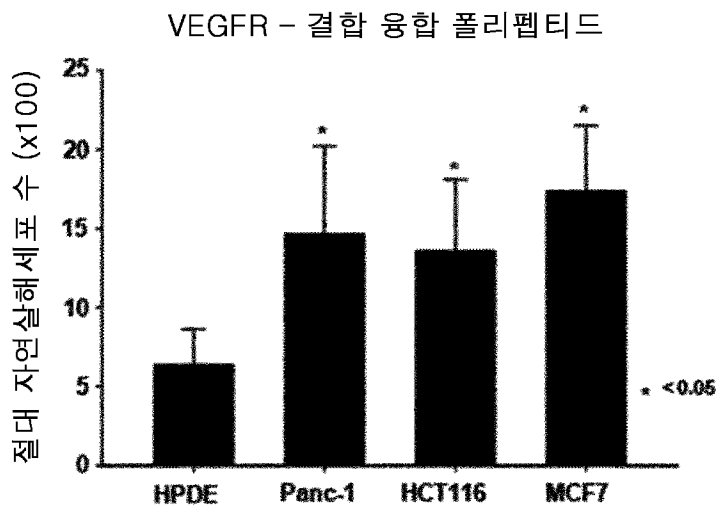
[도13]



[도14]

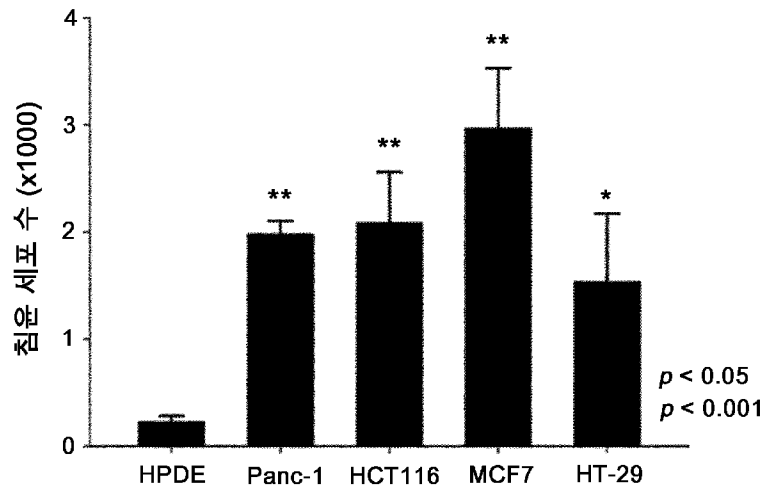


[도15]



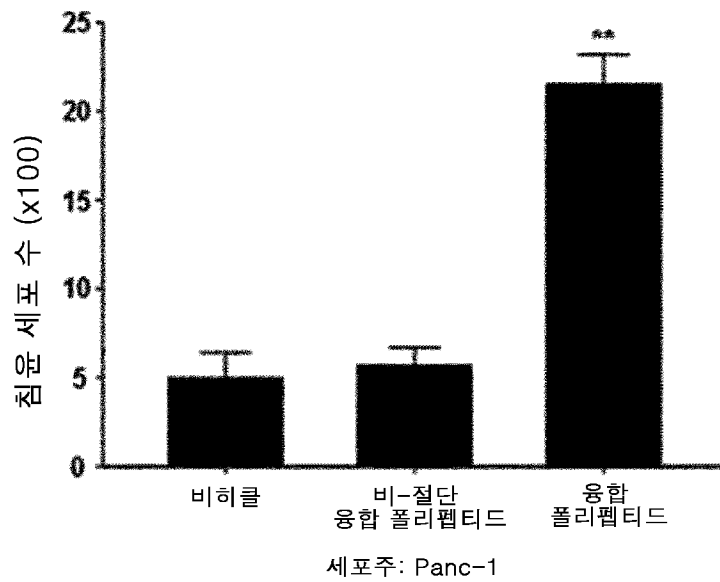
[도16]

메소텔린 - 결합 융합 폴리펩티드



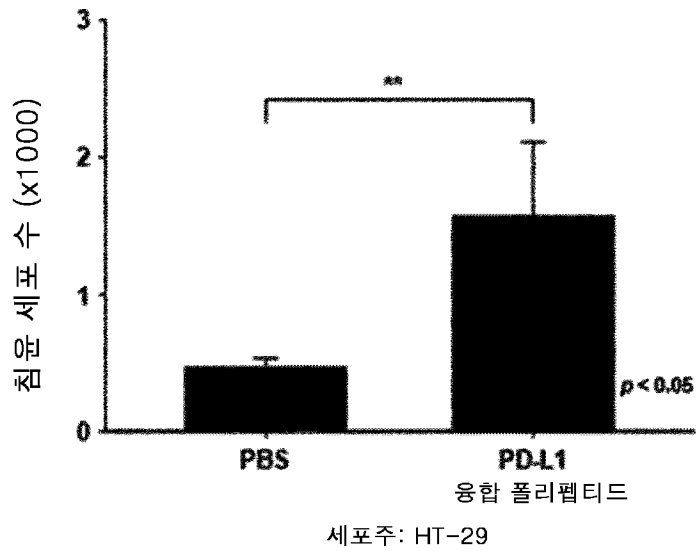
[도17]

PD-L1 - 결합 융합 폴리펩티드



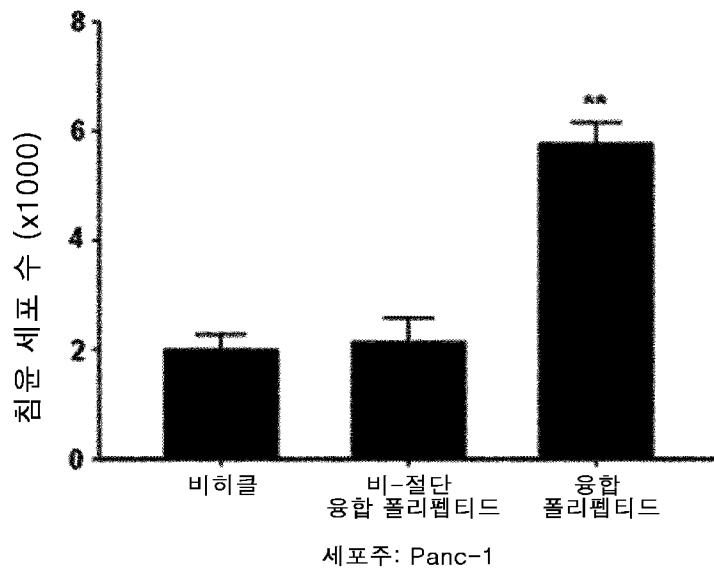
[도18]

PD-L1 - 결합 융합 폴리펩티드

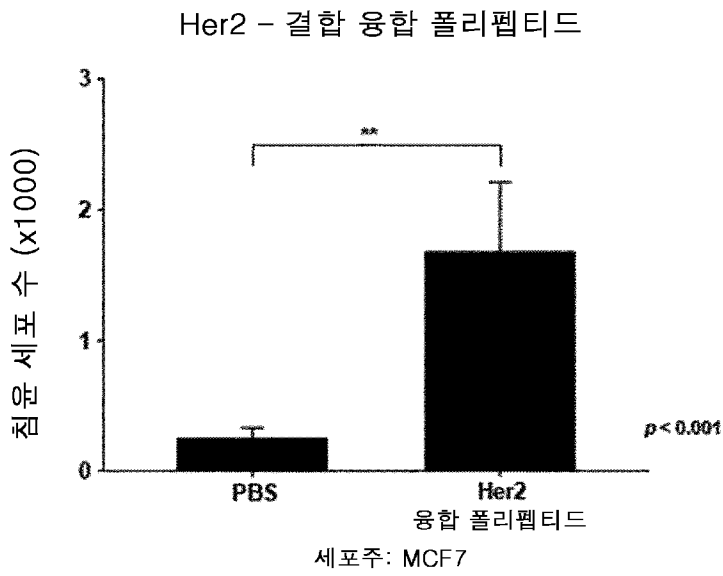


[도19]

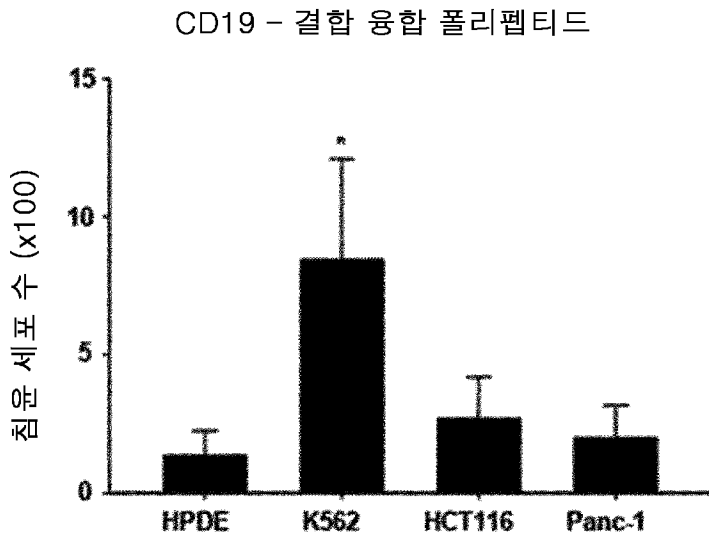
Her2 - 결합 융합 폴리펩티드



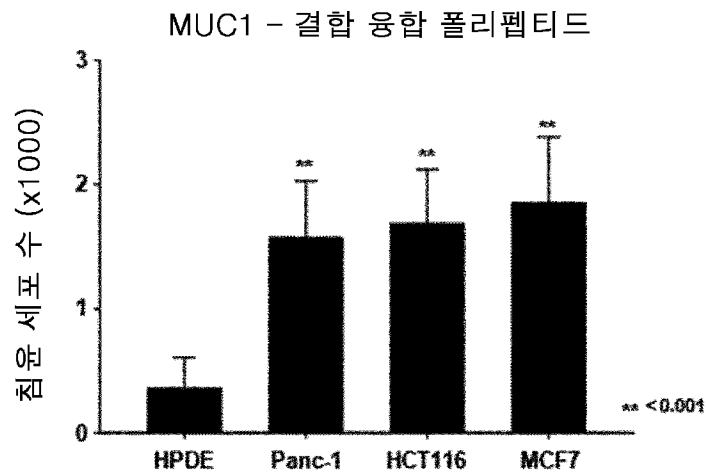
[도20]



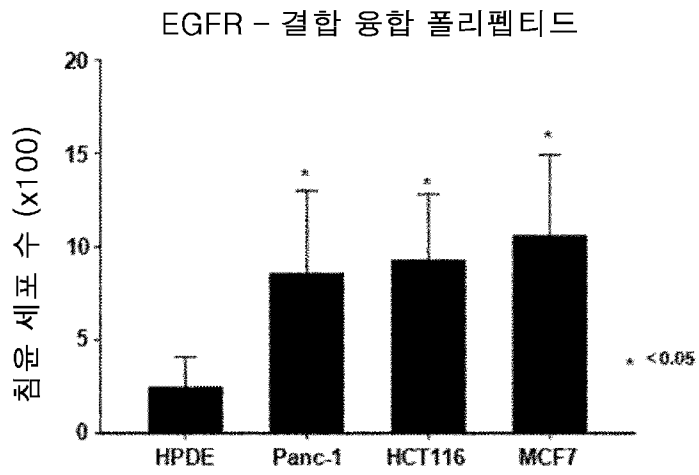
[도21]



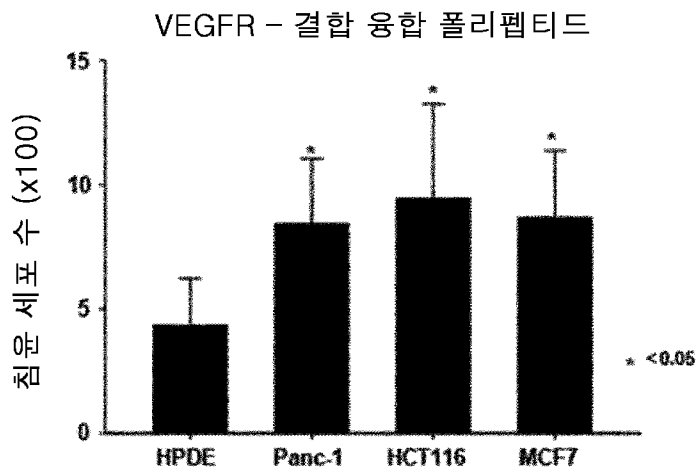
[도22]



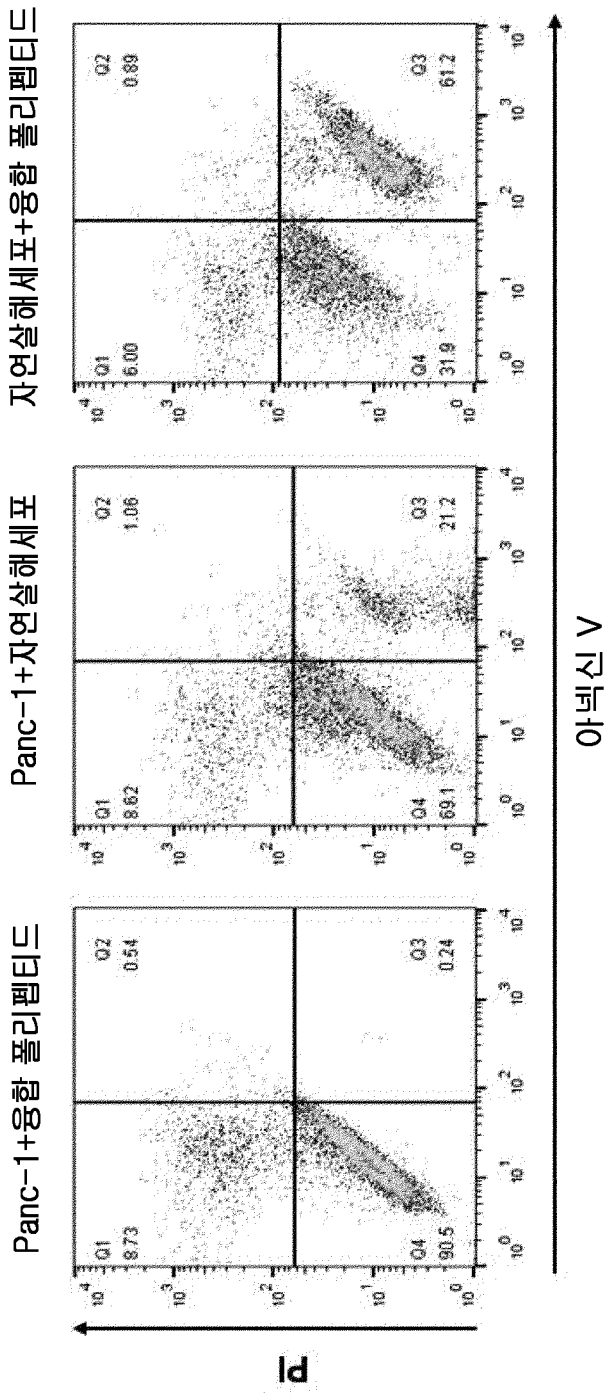
[도23]



[도24]

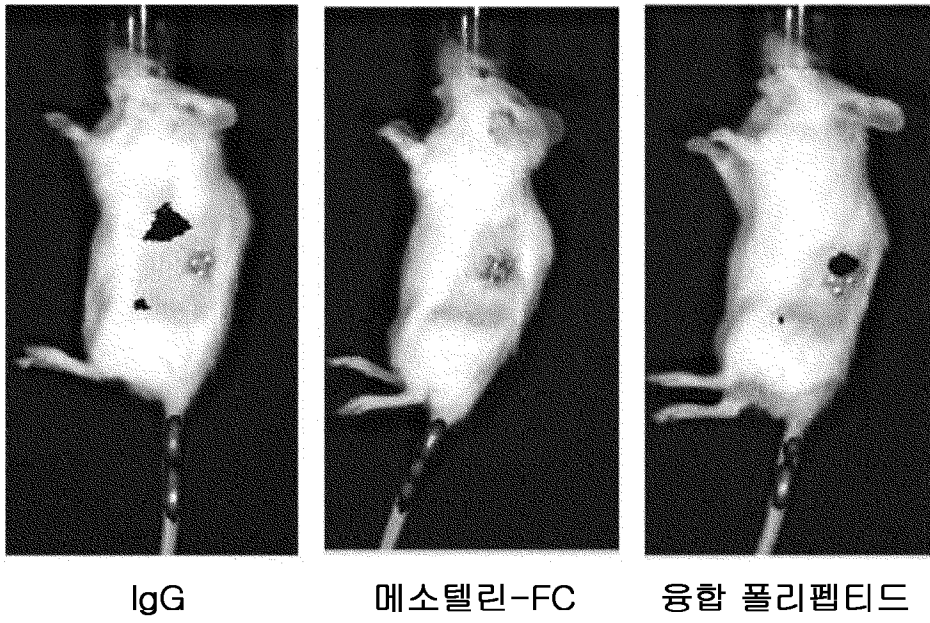


[도 25]

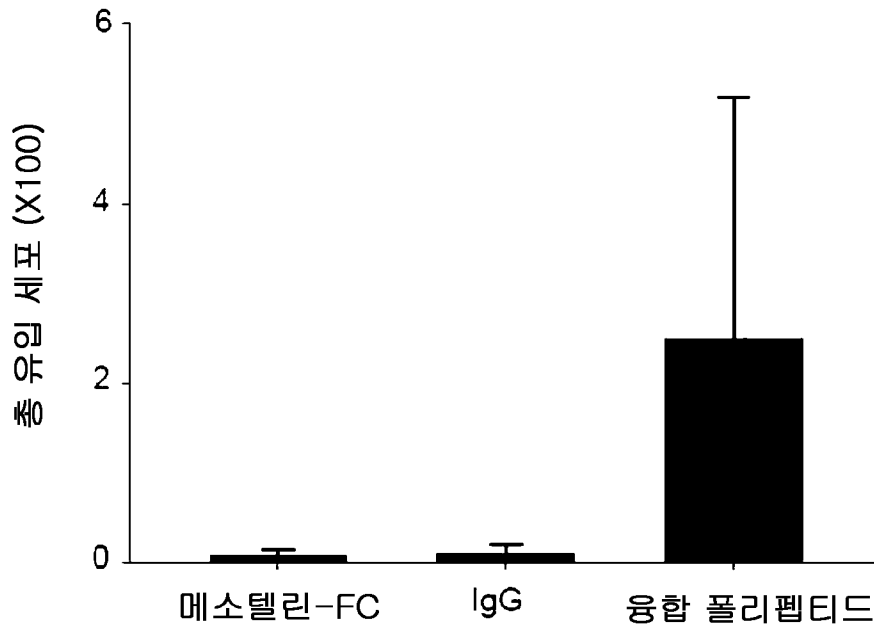


[도26]

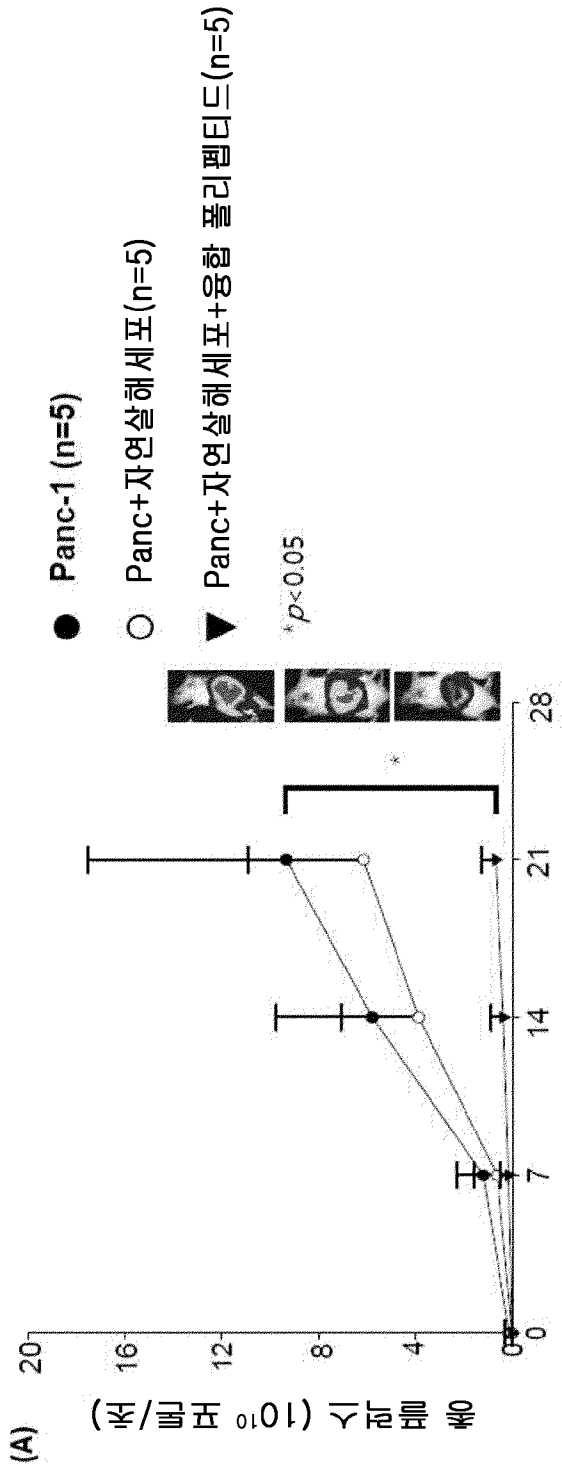
(A)



(B)



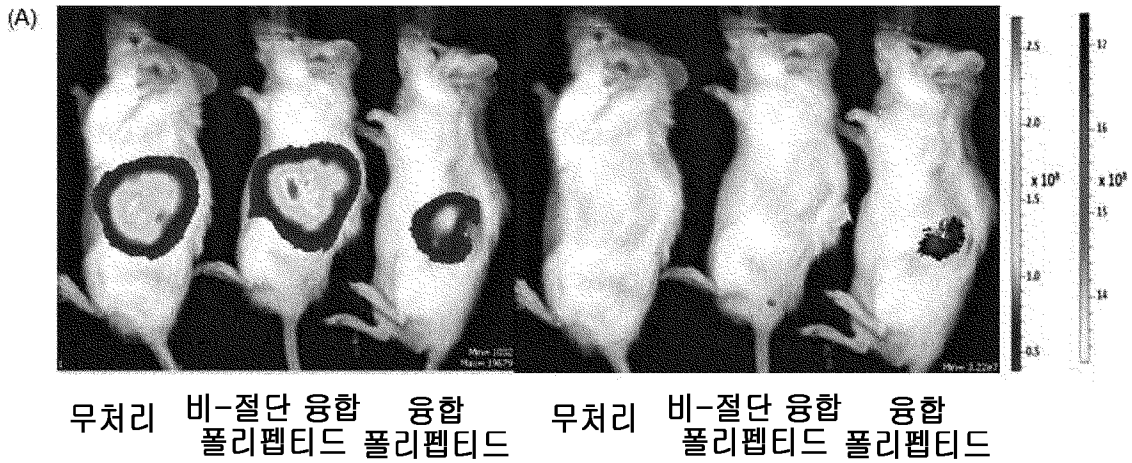
[도27]



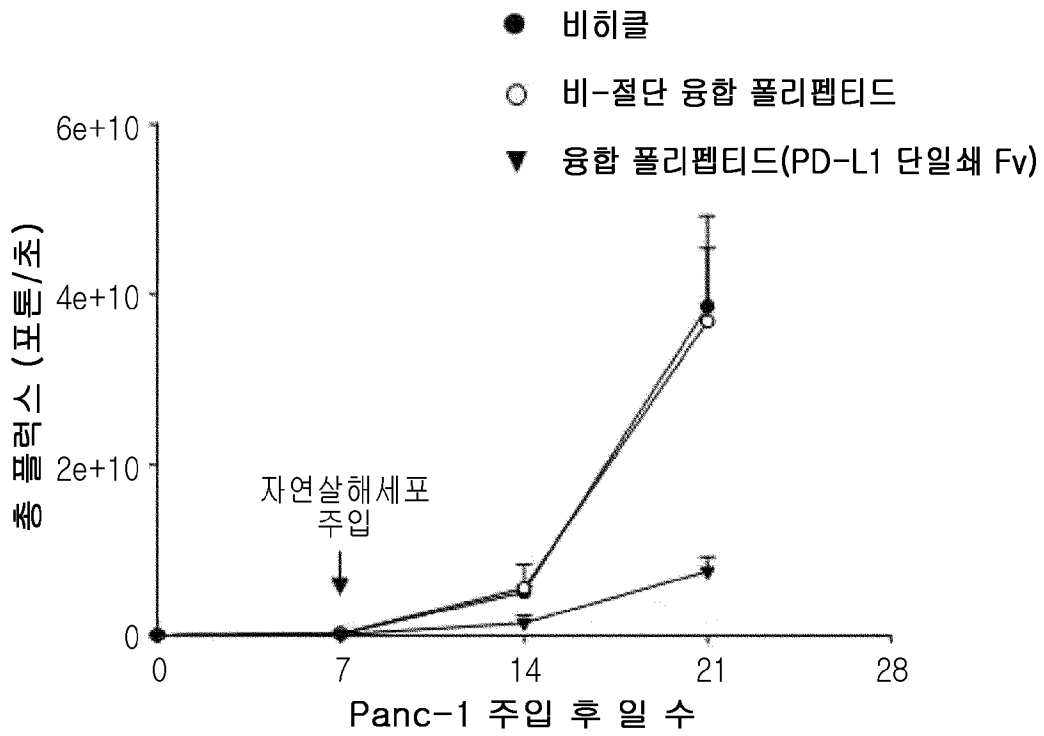
(B)



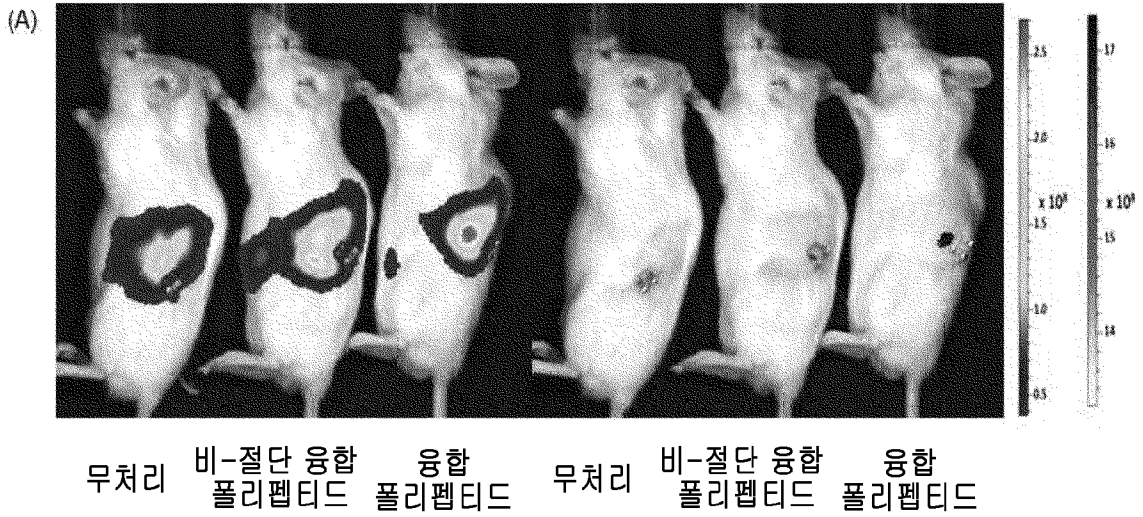
[도28]



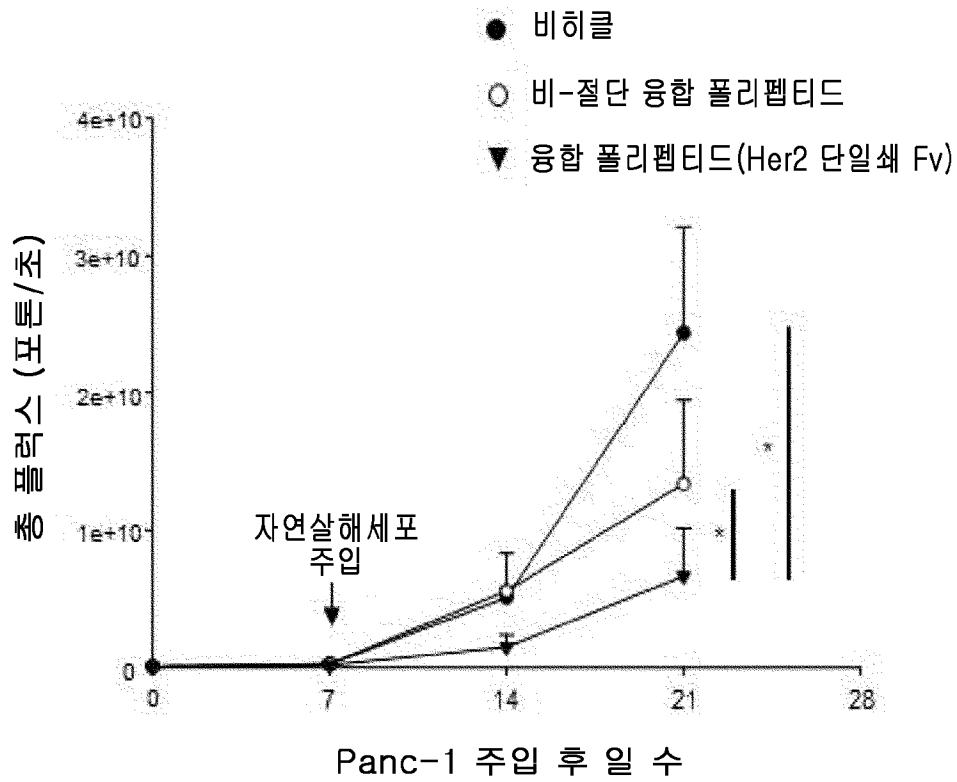
(B)



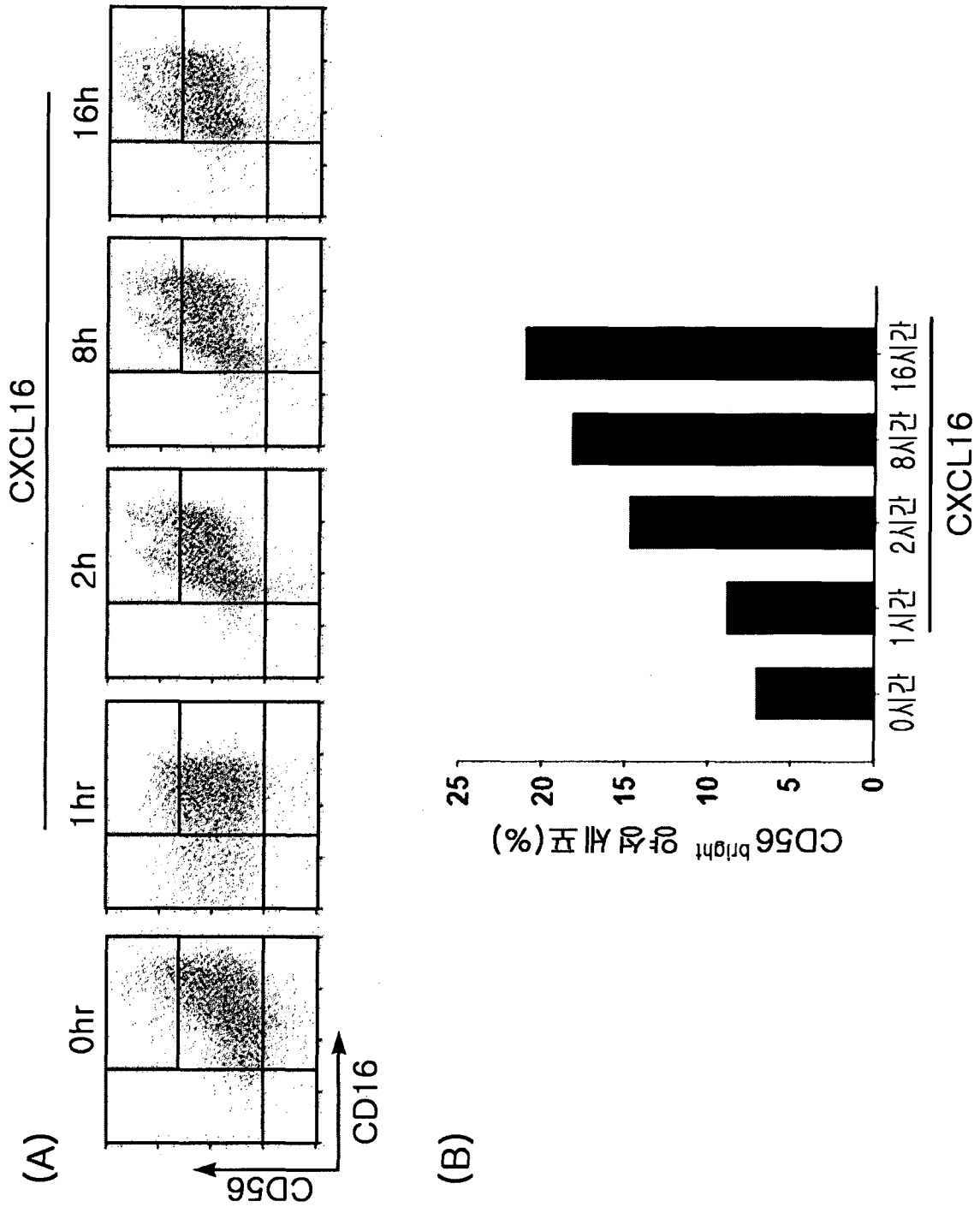
[도29]



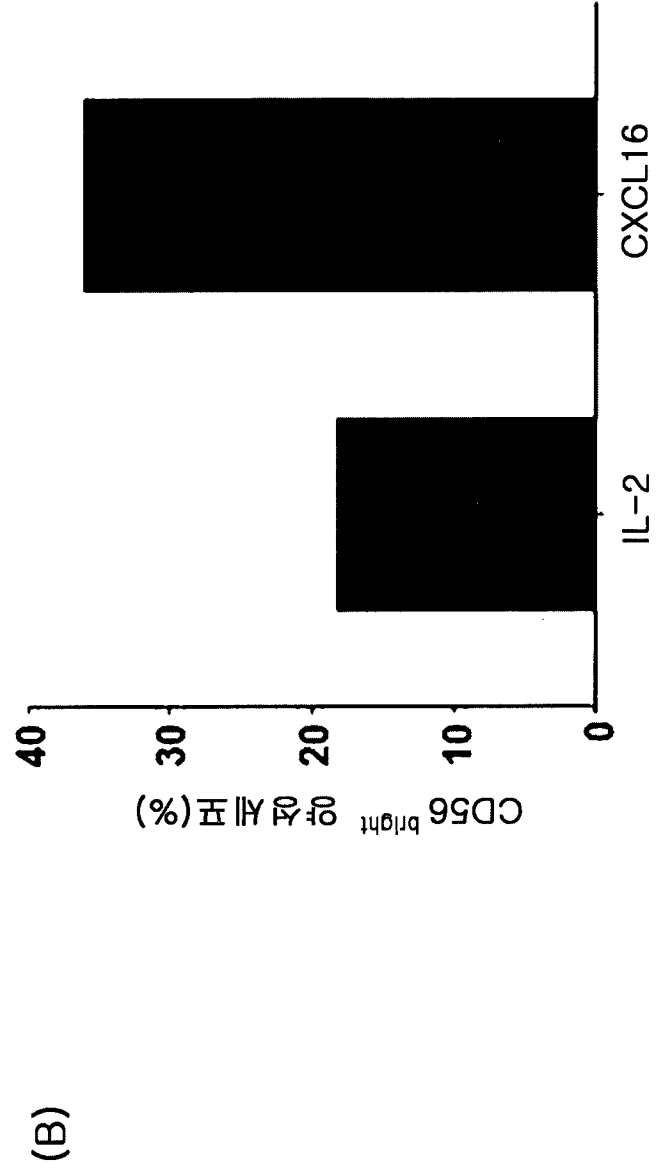
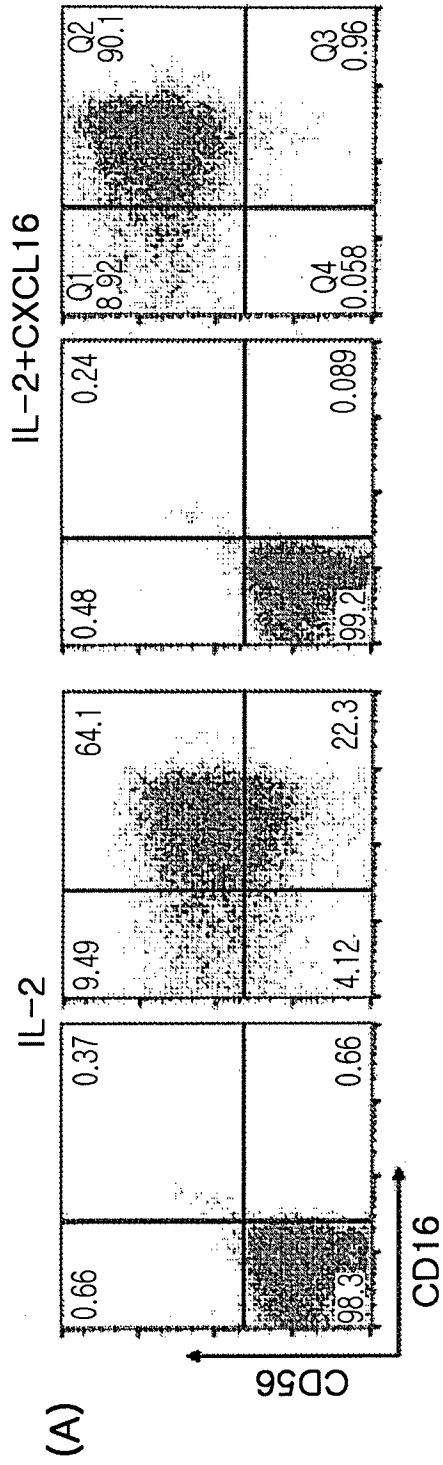
(B)



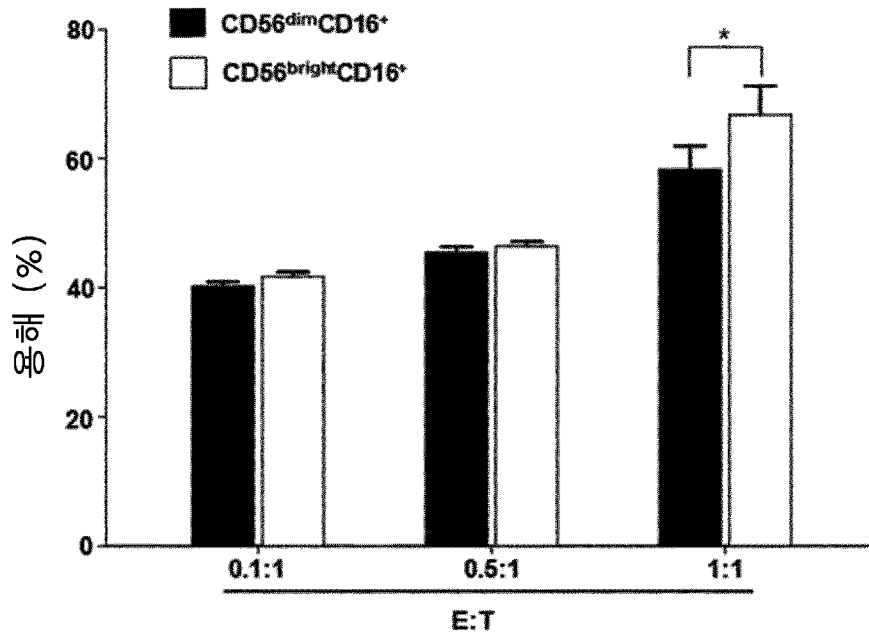
[도30]



[도31]



[도32]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/004043

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/30(2006.01)i, C07K 16/28(2006.01)i, C07K 16/32(2006.01)i, A61K 35/17(2014.01)i, A61K 39/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/30; A61K 39/395; A61K 49/00; A61K 35/17; C12N 9/96; C12N 15/09; C07K 14/52; A61P 35/00; C07K 16/46; C12N 15/13; C07K 16/28; C07K 16/32; A61K 39/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: CXCL16, fused polypeptide, linker, antibody, cancer treatment, purine cutting part, mesothelin, PD-L1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2014-043523 A1 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 20 March 2014 See claims 1-13; and paragraphs [0060]-[0061], [0073].	1-16
Y	JP 2014-518632 A (MOREHOUSE SCHOOL OF MEDICINE) 07 August 2014 See abstract; claims 1, 16-19; and figure 12-4.	1-16
Y	WO 2016-176756 A1 (UNIVERSITY HEALTH NETWORK) 10 November 2016 See abstract; and claims 43-44.	16
A	HESS, Christian et al., "Evaluation of Antibody-chemokine Fusion Proteins for Tumor-targeting Applications", Experimental Biology and Medicine, 2014, vol. 239, no. 7, pages 842-852 See the entire document.	1-16
A	US 2010-0183516 A1 (RIBBERT, Markus et al.) 22 July 2010 See the entire document.	1-16
PX	KR 10-1732126 B1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 02 May 2017 See abstract; and claims 1-6, 11.	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 JULY 2018 (17.07.2018)

Date of mailing of the international search report

18 JULY 2018 (18.07.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/004043

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2014-043523 A1	20/03/2014	US 2015-0231239 A1	20/08/2015
		US 2017-0137493 A1	18/05/2017
		US 9561275 B2	07/02/2017
JP 2014-518632 A	07/08/2014	AU 2012-262491 A1	16/01/2014
		CN 103857406 A	11/06/2014
		CN 103857406 B	23/02/2018
		EP 2714065 A2	09/04/2014
		EP 3253797 A1	13/12/2017
		HK 1198126 A1	13/03/2015
		US 2012-0308565 A1	06/12/2012
		US 2013-0315909 A1	28/11/2013
		US 2013-0323245 A1	05/12/2013
		US 2013-0330337 A1	12/12/2013
		US 2015-0166623 A1	18/06/2015
		US 2016-0115214 A1	28/04/2016
		US 8541564 B2	24/09/2013
		US 8796422 B2	05/08/2014
		US 8987210 B2	24/03/2015
		US 9249204 B2	02/02/2016
		US 9493531 B2	15/11/2016
		WO 2012-166588 A2	06/12/2012
		WO 2012-166588 A3	14/02/2013
		WO 2016-126719 A1	11/08/2016
		WO 2016-176756 A1	10/11/2016
EP 3291833 A1	14/03/2018		
US 2010-0183516 A1	22/07/2010	CA 2693155 A1	29/01/2009
		CN 101828113 A	08/09/2010
		CN 101828113 B	16/04/2014
		EP 2171456 A2	07/04/2010
		EP 2587263 A1	01/05/2013
		US 2014-0023592 A1	23/01/2014
		WO 2009-013359 A2	29/01/2009
WO 2009-013359 A3	19/03/2009		
KR 10-1732126 B1	02/05/2017	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
C07K 16/30(2006.01)i, C07K 16/28(2006.01)i, C07K 16/32(2006.01)i, A61K 35/17(2014.01)i, A61K 39/00(2006.01)i

B. 조사된 분야
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C07K 16/30; A61K 39/395; A61K 49/00; A61K 35/17; C12N 9/96; C12N 15/09; C07K 14/52; A61P 35/00; C07K 16/46; C12N 15/13; C07K 16/28; C07K 16/32; A61K 39/00
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: CXCL16, 융합 폴리펩티드, 링커, 항체, 암 치료, 퓨린 절단 부위, 메소텔린, PD-L1

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	WO 2014-043523 A1 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 2014.03.20 청구항 1-13; 및 문단 [0060]-[0061], [0073] 참조.	1-16
Y	JP 2014-518632 A (MOREHOUSE SCHOOL OF MEDICINE) 2014.08.07 요약; 청구항 1, 16-19; 및 도면 12-4 참조.	1-16
Y	WO 2016-176756 A1 (UNIVERSITY HEALTH NETWORK) 2016.11.10 요약; 및 청구항 43-44 참조.	16
A	HESS, CHRISTIAN 등, 'Evaluation of antibody-chemokine fusion proteins for tumor-targeting applications', Experimental Biology and Medicine, 2014, 239권, 7호, 페이지 842-852 전체 문헌 참조.	1-16
A	US 2010-0183516 A1 (RIBBERT, MARKUS 등) 2010.07.22 전체 문헌 참조.	1-16
PX	KR 10-1732126 B1 (한국생명공학연구원) 2017.05.02 요약; 및 청구항 1-6, 11 참조.	1-16

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
 "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2018년 07월 17일 (17.07.2018)	국제조사보고서 발송일 2018년 07월 18일 (18.07.2018)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 감유림 전화번호 +82-42-481-3516
---	------------------------------------

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2014-043523 A1	2014/03/20	US 2015-0231239 A1 US 2017-0137493 A1 US 9561275 B2	2015/08/20 2017/05/18 2017/02/07
JP 2014-518632 A	2014/08/07	AU 2012-262491 A1 CN 103857406 A CN 103857406 B EP 2714065 A2 EP 3253797 A1 HK 1198126 A1 US 2012-0308565 A1 US 2013-0315909 A1 US 2013-0323245 A1 US 2013-0330337 A1 US 2015-0166623 A1 US 2016-0115214 A1 US 8541564 B2 US 8796422 B2 US 8987210 B2 US 9249204 B2 US 9493531 B2 WO 2012-166588 A2 WO 2012-166588 A3 WO 2016-126719 A1	2014/01/16 2014/06/11 2018/02/23 2014/04/09 2017/12/13 2015/03/13 2012/12/06 2013/11/28 2013/12/05 2013/12/12 2015/06/18 2016/04/28 2013/09/24 2014/08/05 2015/03/24 2016/02/02 2016/11/15 2012/12/06 2013/02/14 2016/08/11
WO 2016-176756 A1	2016/11/10	CA 2984934 A1 EP 3291833 A1	2016/11/10 2018/03/14
US 2010-0183516 A1	2010/07/22	CA 2693155 A1 CN 101828113 A CN 101828113 B EP 2171456 A2 EP 2587263 A1 US 2014-0023592 A1 WO 2009-013359 A2 WO 2009-013359 A3	2009/01/29 2010/09/08 2014/04/16 2010/04/07 2013/05/01 2014/01/23 2009/01/29 2009/03/19
KR 10-1732126 B1	2017/05/02	없음	