



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0032009
(43) 공개일자 2020년03월25일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C07K 14/55</i> (2006.01) <i>A61K 38/00</i> (2006.01)
 <i>A61P 31/12</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01)
 <i>C07K 14/705</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C07K 14/55</i> (2013.01)
 <i>A61K 38/00</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-0113659
 (22) 출원일자 2019년09월16일
 심사청구일자 2019년09월16일</p> <p>(30) 우선권주장
 1020180110698 2018년09월17일 대한민국(KR)
 (뒷면에 계속)</p> | <p>(71) 출원인
 (주)지아이이노베이션
 서울특별시 송파구 송파대로 167, 에이동 1116호
 (문정동)</p> <p>(72) 발명자
 장명호
 서울특별시 송파구 송파대로 167, 에이동 1116호
 (문정동)</p> <p>(74) 대리인
 제일특허법인(유)</p> |
|--|--|

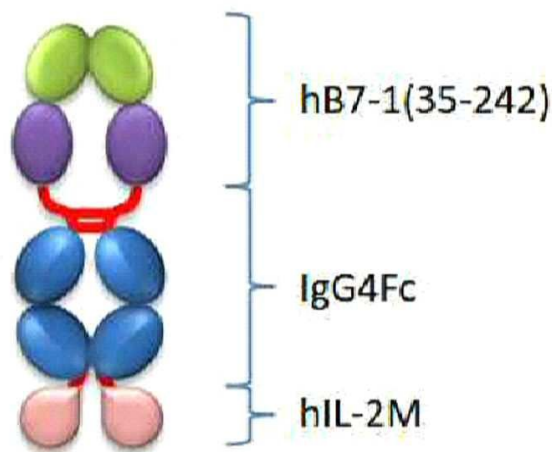
전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 발명의 명칭 IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 및 이의 용도

(57) 요약

IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질을 제공한다. 일 구체예인 CD80 단편, 면역글로불린 Fc 및 IL-2 변이체를 포함하는 융합단백질은 자연살해세포와 같은 면역세포를 활성화시킬 수 있으며, 동시에 조절 T 세포의 면역세포 조절 활성을 제어할 수 있다. 따라서, 상기 융합단백질을 유효 성분으로 포함하는 약학 조성물은 체내의 면역활성을 증가시켜 암뿐만 아니라 감염성 질환에도 효과적으로 활용할 수 있어 산업적 활용 가능성이 높다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 31/12 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/70532 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

(30) 우선권주장

1020190001867 2019년01월07일 대한민국(KR)

62/832,013 2019년04월10일 미국(US)

1020190053436 2019년05월08일 대한민국(KR)

명세서

청구범위

청구항 1

IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 IL-2 단백질 및 상기 CD80 단백질은 링커에 의해 결합된 것인, 융합단백질.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 IL-2 단백질은 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 것인, 융합단백질.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 IL-2 단백질은 IL-2 변이체인 것인, 융합단백질.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째, 45번째, 61번째 및 72번째 위치의 아미노산 중 적어도 하나가 치환된 것인, 융합단백질.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 R38A, F42A, Y45A, E61R 및 L72G로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 치환이 일어난 것인, 융합단백질.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 하기 (a) 내지 (d) 조합 중 선택되는 어느 하나의 조합의 치환이 일어난 것인, 융합단백질:

(a) R38A/F42A

(b) R38A/F42A/Y45A

(c) R38A/F42A/E61R

(d) R38A/F42A/L72G.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 IL-2 변이체는 서열번호 6, 22, 23 또는 24의 아미노산 서열을 갖는 것인, 융합단백질.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 CD80은 서열번호 11의 아미노산 서열을 갖는 것인, 융합단백질.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 CD80 단백질은 CD80의 단편인 것인, 융합단백질.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 CD80의 단편은 서열번호 11의 아미노산 서열 중 35번째 내지 242번째의 아미노산으로 이루어진 것인, 융합단백질.

청구항 12

제2항에 있어서,

상기 링커는 알부민 또는 면역글로불린의 Fc 도메인인 것인, 융합단백질.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 Fc 도메인은 야생형 또는 변이체인 것인, 융합단백질.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 Fc 도메인은 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 것인, 융합단백질.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 Fc 도메인의 변이체는 서열번호 12의 아미노산 서열을 갖는 것인, 융합단백질.

청구항 16

제1항에 있어서,

상기 융합단백질은 하기 구조식(I) 또는 (II)로 이루어진 것인, 융합단백질:

$N'-X-[\text{링커}(1)]_n\text{-Fc 도메인}-[\text{링커}(2)]_m\text{-Y-C'}$ (I)

$N'-Y-[\text{링커}(1)]_n\text{-Fc 도메인}-[\text{링커}(2)]_m\text{-X-C'}$ (II)

이때, 상기 구조식(I) 및 (II)에 있어서,

상기 N'은 융합단백질의 N-말단이고,

상기 C'는 융합단백질의 C-말단이며,

상기 X는 CD80 단백질이고,

상기 Y는 IL-2 단백질이며,

상기 링커(1) 및 링커(2)는 펩타이드 링커이고,

상기 n 및 m은 각각 독립적으로, 0 또는 1이다.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 링커(1)이 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커인 것인, 융합단백질.

청구항 18

제16항에 있어서,

상기 링커(2)가 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커인 것인, 융합단백질.

청구항 19

제16항에 있어서,

상기 융합단백질은 구조식(I)로 이루어진 것인, 융합단백질.

청구항 20

제1항에 있어서,

상기 융합단백질은 서열번호 9, 26, 28 또는 30의 아미노산 서열에 대해 85% 혹은 그 이상의 서열동일성을 갖는 것인, 융합단백질.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 융합단백질 두 개가 결합된 융합단백질 이량체.

청구항 22

제21항에 있어서,

상기 융합단백질 이량체는 동형이량체(homodimer)인 것인, 융합단백질 이량체.

청구항 23

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 24

제23항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 8, 25, 27 또는 29의 염기서열에 대해 85% 혹은 그 이상의 서열동일성을 갖는 것인, 폴리뉴클레오티드.

청구항 25

제23항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 26

제25항의 벡터가 도입된 형질전환 세포.

청구항 27

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 융합단백질; 또는 제21항 또는 제22항의 융합단백질 이량체;를 유효성분으로 포함하는 암 또는 감염성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 28

제27항에 있어서,

상기 약학 조성물이 약제학적으로 허용가능한 담체를 더 포함하는 것인, 약학 조성물.

청구항 29

제27항에 있어서,

상기 암은 위암, 간암, 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 자궁경부암, 갑상선암, 후두암, 급성 골수성 백혈병, 뇌종양, 신경모세포종, 망막 모세포종, 두경부암, 침샘암 및 림프종으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인, 약학 조성물.

청구항 30

제27항에 있어서,

상기 감염성 질환은 B형 간염, C형 간염, 인간 파필로마 바이러스 감염, 사이토메갈로바이러스 감염, 바이러스 성 호흡기 질환 및 인플루엔자로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인, 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 및 이의 용도에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 암 치료용 및 면역증강 효능을 갖는 신규한 융합단백질에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] IL-2(Interleukin 2)는 T 세포 성장 인자(T-cell growth factors, TCGF)로도 불리며, 림프구 생성, 생존 및 항상성에서 중심 역할을 하는 구형의 당단백질이다. IL-2의 단백질 크기는 15.5 kDa 내지 16 kDa이며, 133개 아미노산으로 이루어져 있다. IL-2는 개별적 3개의 서브유닛으로 구성된 IL-2 수용체(IL-2 receptor)에 결합함으로써 각종 면역 작용을 매개한다.

[0003] 또한, IL-2는 활성화된 T 세포 중 특히, CD4+ 헬퍼 T 세포(helper T cell)에 의해 주로 합성된다. IL-2는 T 세포의 증식 및 분화를 자극하고, 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte, CTL)의 생성 및 말초혈 림프구의 세포독성 세포 및 림포카인-활성화 살해 세포(lymphokine activated killer cell, LAK cell)로의 분화를 유도한다.

[0004] 나아가, IL-2는 B세포의 증식 및 분화에 관여하며, B 세포에 의한 면역글로불린의 합성을 촉진하고, 자연살해세포(natural killer cell, NK cell)의 생성, 증식 및 활성화를 자극한다. 따라서, IL-2는 생체 내에서 림프구 개체군을 증대시키고, 상기 면역세포들의 기능을 증대시킬 수 있으므로, IL-2를 항암제로 이용하고 있다. 현재, 전이성 신세포암 및 악성 흑색종을 갖는 환자에서 IL-2를 이용한 치료가 승인되어 사용되고 있다.

[0005] 그러나, IL-2는 면역세포의 증가 및 활성을 매개할 뿐만 아니라, 면역 관용(immune tolerance)을 유지하는데 중요하다라는 점에서 면역 반응에서 이중적 기능을 갖는다. 또한, IL-2는 종양의 성장을 억제하는데 최적이지 아닐 수 있는 것으로 보고되었다. 그 이유는 IL-2의 존재 시, 생성된 세포독성 T 림프구에 AICD(activation-induced cell death)가 일어날 수 있고, 면역 반응이 IL-2 의존성 조절 T 세포(Treg)에 의해 억제될 수 있기 때문이다 (Imai *et al.*, *Cancer Sci* 98, 416-423, 2007).

[0006] 그뿐 아니라, IL-2를 이용한 면역치료를 받은 환자에게 심각한 심혈관, 폐, 신장, 간, 위장, 신경, 피부, 혈액 및 전신적인 부작용이 나타난다. 따라서, IL-2의 치료 효능 개선 및 부작용을 최소화 하기 위해 다양한 IL-2 돌연변이가 연구된 바 있다(US 5,229,109 B). 그러나, 아직도 IL-2를 약리학적으로 활용하기 위해서는 해소해야 할 문제점이 많이 남아 있는 실정이다.

[0007] 한편, CD80은 B7-1로 알려져 있으며, 리간드와 결합하여 공동자극 반응(costimulatory responses) 및 공동억제 반응(coinhibitory responses)을 전달하여 면역 조절에 관여하는 막 단백질(membrane-bound proteins) 중 B7 패밀리의 하나이다. CD80은 T 세포, B 세포, 수지상 세포 및 단핵구(monocyte)의 표면에 발현하는 막관통 단백질이다. CD80은 CD28, CTLA4 (CD152) 및 PD-L1에 결합하는 것으로 알려져 있다. CD80, CD86, CTLA4 및 CD28은 공동자극-공동억제 시스템에 관여한다. 예를 들어, T 세포의 활성을 조절하고, 증식, 분화 및 생존에 관여한다.

[0008] 예를 들어, CD80 및 CD86이 CD28과 상호작용을 하게 되면, 공동자극 신호가 발생하여 T 세포를 활성화시킨다. 결국, CD80은 CTLA4와 결합하고, CTLA4를 상향조절하도록 자극하게 된다. 그 결과, CD80/CD28 상호작용에 의한 면역 반응 작동 전에, CD80은 T 세포의 반응을 억제하게 된다. 이러한 피드백 회로(feedback loop)는 면역 반응을 세밀하게 조절하게 한다.

[0009] 또한, CD80은 CD28이 PD-L1에 결합하는 것과 유사한 친화도로 또 다른 B7 패밀리에 PD-L1과 결합하는 것으로 알려져 있다. PD-L1은 PD-1(programmed death-1) 단백질에 대한 두 개의 리간드 중 하나로 알려져 있으며, PD-L1은 T 세포 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다. CD80과 PD-L1의 결합은 PD-1/PD-L1 상호 작용을 블록킹할 수 있는 또 다른 기전으로써, 종양에서 T 세포의 반응 억제를 막을 수 있다. 그러나, 이와 동시에 CD80의 수준이 증가되면 CD28과 결합을 하게 되고, CTLA4를 유발하게 되어, T 세포 반응을 유발하거나 억제할 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) US 5,229,109 B

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) Imai et al., Cancer Sci 98, 416-423, 2007

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 이에 본 발명자들은 안전하고 효과적인 IL-2를 개발하기 위해 연구한 결과, IL-2 단백질과 CD80 단백질을 한 분자 내에 포함하는 신규한 융합단백질이 면역세포를 활성화시키고, Treg 세포를 효과적으로 조절할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적 달성을 위해, 본 발명의 일 측면은, IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질을 제공한다.

[0014] 본 발명의 다른 측면은, 상기 융합단백질 두 개가 결합된 융합단백질 이량체를 제공한다.

[0015] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 벡터가 도입된 형질전환 세포를 제공한다.

[0018] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 융합단백질 또는 상기 융합단백질 이량체를 유효성분으로 포함하는 암 또는 감염성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명의 또 다른 측면은, 암 또는 감염성 질환을 치료하기 위한 상기 융합단백질의 용도를 제공한다.

[0020] 본 발명의 또 다른 측면은, 암 또는 감염성 질환 치료용 약제를 제조하기 위한 상기 융합단백질의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0021] IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질은 IL-2에 의해 면역세포를 활성화시킬 수 있을 뿐 아니라, CD80에 의해 Treg 세포를 효과적으로 조절할 수 있다. 따라서, 상기 융합단백질은 효율적으로 암세포를 공격할 수 있으므로, 암 또는 감염성 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 융합단백질의 일 실시예를 도식화한 것이다.

도 2는 융합단백질이 서로 다른 두 종류의 면역세포를 조절하는 기작을 도식화한 것이지만, 융합단백질의 작용이 발휘되는 기작이 이에 한정되는 것은 아님을 이해해야 한다.

도 3은 융합단백질이 항암 효과를 나타내는 기작을 도식화한 것이다.

도 4는 융합단백질의 구조를 도식화한 것이다. 이때, GI101 및 mGI101은 본원 융합단백질의 일 실시예이며, GI101C1, GI101C2, 및 mGI101C1은 융합단백질의 활성을 비교하기 위한 비교예이다.

도 5는 본원 융합단백질의 다양한 구체예이다. 인간 유래의 단백질과 마우스 유래의 단백질이 혼합하여 융합단백질을 제조할 수 있으며, Fc 이외에도 다양한 링커를 통해 CD80 단백질과 IL-2 단백질이 결합될 수 있다.

도 6은 수득한 융합단백질(GI101)을 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

도 7은 흡광도에 따른 융합단백질(GI101)의 함량을 나타낸 것이다.

도 8은 수득한 융합단백질(GI101)을 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로 분석한 것이다.

도 9는 수득한 mGI101 융합단백질을 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

도 10은 수득한 GI101C1 융합단백질을 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

도 11은 수득한 GI101C2 융합단백질을 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

도 12는 수득한 mGI101C1 융합단백질을 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

도 13은 수득한 GI102-M45 융합단백질을 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

도 14는 수득한 GI102-M61 융합단백질을 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

도 15는 수득한 GI102-M72 융합단백질을 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

도 16은 hCTLA4와 GI101 간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.

도 17은 hPD-L1과 GI101 간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.

도 18은 hPD-L1과 hPD-1 간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.

도 19는 mCTLA4와 mGI101 간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.

도 20은 mPD-L1과 mGI101 간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.

도 21 및 도 22는 GI-101(hCD80-Fc-hIL-2v)과 CTLA-4 및 PD-L1의 결합력을 확인한 것이다. GI-101(hCD80-Fc-hIL-2v)은 CTLA-4와 PD-L1에 대해 높은 결합력을 가짐을 확인하였다.

도 23은 GI101이 PD-1/PD-L1 결합에 미치는 영향을 확인한 것이다. GI101은 PD-1/PD-L1 결합을 효과적으로 억제시켰다.

도 24는 GI101과 IL-2R α 또는 IL-2R β 간의 결합 친화성을 확인한 것이다.

도 25는 GI101과 IL-2R α 간의 결합 친화성을 확인한 것이다.

도 26은 GI101과 IL-2R β 간의 결합 친화성을 확인한 것이다.

도 27은 IL-2R α 와 GI102-M45간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.

도 28은 IL-2R α 와 GI102-M61간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.

도 29는 IL-2R α 와 GI102-M72간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.

도 30은 IL-2R β 와 GI102-M45 간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.

도 31은 IL-2R β 와 GI102-M61 간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.

도 32는 IL-2R β 와 GI102-M72 간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.

도 33 및 도 34는 GI101, GI101C1, GI101C2 또는 IL-2를 농도 별로 세포에 처리하고 배양하였을 때의 세포에서 분비하는 IFN- γ 양을 측정한 것이다.

도 35 및 도 36은 GI101, GI101C1, GI101C2 및 IL-2(Proleukin)가 CD8+ T 세포의 증식에 미치는 영향을 확인한 것이다.

도 37은 GI101 및 GI102가 CD8+ T 세포와 CD4+ T 세포의 증식에 미치는 영향을 확인한 것이다. 이때, (A)는 CD8+ T 세포와 CD4+ T 세포의 비율을 나타내며, (B)는 CD8+ T 세포의 증식능력을 나타내고, (C)는 CD4+/FoxP3+

Treg 세포의 비율을 나타낸다.

도 38 및 도 39는 GI101 및 GI101w가 CD8+ T 세포와 NK 세포의 증식에 미치는 영향을 확인한 것이다.

도 40 및 도 41은 GI101이 effector T 세포에 미치는 영향을 확인한 것이다.

도 42는 mGI101 및 mGI102-M61이 마우스의 면역세포에 미치는 영향을 확인한 것이다.

도 43 및 도 44는 GI101이 PD-L1이 과발현된 암세포에 미치는 영향을 확인한 것이다.

도 45 및 도 46은 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서의 GI101의 종양 억제 효과를 확인한 것이다.

도 47은 마우스 유래 흑색종 식립 마우스에서의 mGI101의 종양 억제 효과를 확인한 것이다.

도 48은 마우스 유래 흑색종 식립 마우스에서의 mGI101의 종양 억제율을 나타낸 것이다.

도 49는 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서 mGI101의 용량에 따른 종양 억제 효과를 확인한 것이다.

도 50은 mGI101를 투여한 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스의 생존율을 분석한 것이다.

도 51은 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서의 GI101의 종양 억제 효과를 확인한 것이다.

도 52는 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에 hIgG4, 항-PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 CD8+ T 세포, IFN- γ T 세포, CD4+ T 세포 및 Treg 세포를 FACS로 분석한 것이다.

도 53은 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에 hIgG4, 항-PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 CD8+ T 세포, IFN- γ T 세포, CD4+ T 세포 및 Treg 세포를 FACS로 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 54는 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에 hIgG4, 항-PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 대식세포를 FACS로 분석한 것이다.

도 55는 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에 hIgG4, 항-PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 대식세포를 FACS로 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 56은 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에 hIgG4, 항-PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 수지상세포를 FACS로 분석한 것이다.

도 57은 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에 hIgG4, 항-PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 수지상세포를 FACS로 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 58은 마우스 유래 폐암세포 식립 마우스에서의 GI101의 종양 억제 효과를 확인한 것이다.

도 59는 마우스 유래 폐암세포 식립 마우스에 hIgG4, 항-PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 CD8+ T 세포, IFN- γ T 세포, CD4+ T 세포 및 Treg 세포를 FACS로 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 60은 마우스 유래 폐암세포 식립 마우스에 hIgG4, 항-PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 대식세포를 FACS로 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 61은 마우스 유래 폐암세포 식립 마우스에 hIgG4, 항-PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 수지상세포를 FACS로 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 62는 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서의 mGI102-M61의 종양 억제 효과를 확인한 것이다.

도 63은 mGI102-M61을 투여한 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스의 생존율을 분석한 것이다.

도 64는 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서의 mGI101의 종양 억제 효과를 확인한 것이다.

도 65는 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서의 mGI101의 종양 억제율을 나타낸 것이다.

도 66은 PBS 또는 GI101을 투여받은 원숭이의 15일 동안의 임상관찰 결과를 나타낸 것이다.

도 67 및 도 68은 PBS 또는 GI101을 투여받은 원숭이의 -1일, 1일, 8일 및 15일째의 체중을 측정한 것이다.

도 69는 PBS 또는 GI101을 투여받은 원숭이의 15일 동안의 섭취량을 나타낸 것이다.

도 70 내지 도 72는 PBS 또는 GI101을 투여받은 원숭이의 -1일, 1일, 8일 및 15일째의 혈액을 분석한 것이다.

도 73 내지 도 79는 PBS 또는 GI101을 투여받은 원숭이의 -1일, 1일, 8일 및 15일째의 임상화학적 분석을 한 것

이다.

도 80 및 도 81은 PBS 또는 GI101을 투여받은 원숭이의 -1일, 1일, 8일 및 15일째의 사이토카인을 분석한 것이다.

도 82 내지 도 87은 PBS 또는 GI101을 투여받은 원숭이의 -1일, 1일, 8일 및 15일째의 면역세포를 분석한 것이다.

도 88은 PBS 또는 GI101을 투여받은 원숭이를 16일째에 희생시켜 비장 조직을 병리학적으로 분석한 것이다.

도 89는 CD80 단백질과 IL-2 단백질이 캐리어(carrier) 단백질과 결합된 융합단백질을 나타낸 것이다. 구체적으로, 도 89(A)는 CD80 단백질과 IL-2 단백질이 각각 캐리어 단백질의 N-말단과 C-말단에 결합한 것을 나타낸다. 또한, 도 89(B)는 CD80 단백질과 IL-2 단백질이 각각 캐리어 단백질의 C-말단과 N-말단에 결합한 것을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질

[0024] 본 발명의 일 측면은, IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질을 제공한다.

[0025] 본 명세서에서 사용하는 용어, "IL-2" 또는 "인터루킨-2"는 달리 언급되지 않는 한, 포유동물, 예를 들어, 영장류(예, 인간) 및 설치류(예, 마우스 및 래트)를 포함하여 임의의 척추동물 공급원으로부터 수득한 임의의 야생형 IL-2를 의미한다. 상기 IL-2는 동물 세포에서 수득된 것일 수도 있으나, IL-2를 생산할 수 있는 재조합 세포로부터 수득된 것도 포함한다. 또한, 상기 IL-2는 야생형 IL-2 또는 이의 변이체일 수 있다.

[0026] 본 명세서에서는 IL-2 혹은 이의 변이체를 총칭하여 "IL-2 단백질" 혹은 "IL-2 폴리펩티드"의 용어로 표현하기도 한다. IL-2, IL-2 단백질, IL-2 폴리펩티드, 및 IL-2 변이체는 예를 들어 IL-2 수용체(receptor)에 특이적으로 결합한다. 이 특이적인 결합은 당업자에게 알려진 방법을 통해 확인할 수 있다.

[0027] 상기 IL-2의 일 구체예는 서열번호 35 또는 서열번호 36의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, 이때, 상기 IL-2는 성숙된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 성숙된 IL-2는 신호서열을 포함하지 않는 것일 수 있으며, 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 이때, 상기 IL-2는 야생형 IL-2의 N-말단 또는 C-말단의 일부가 결실된(truncated) 단편을 포함하는 개념으로 이용될 수 있다.

[0028] 또한, 상기 IL-2의 단편은 서열번호 35 또는 서열번호 36의 아미노산 서열을 가지는 단백질의 N 말단으로부터 연속적으로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개의 아미노산이 결실된 형태일 수 있다. 또한 상기 IL-2의 단편은 서열번호 35 또는 서열번호 36의 아미노산 서열을 가지는 단백질의 C 말단으로부터 연속적으로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개의 아미노산이 결실된 형태일 수 있다.

[0029] 본 명세서에서 사용하는 용어, "IL-2 변이체"는 전장(full-length) IL-2 또는 상술한 IL-2의 단편의 아미노산 일부가 치환된 형태를 의미한다. 즉, IL-2 변이체는 야생형 IL-2 또는 이의 단편과 다른 아미노산 서열을 가질 수 있다. 그러나, 상기 IL-2 변이체는 야생형 IL-2와 동등하거나 유사한 활성을 가질 수 있다. 여기에서, "IL-2 활성"은 예를 들어 IL-2 수용체에 특이적으로 결합하는 것을 의미할 수 있으며, 이 특이적 결합은 당업자에게 알려진 방법을 통해 측정할 수 있다.

[0030] 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 야생형 IL-2의 아미노산 일부가 치환된 것일 수 있다. 아미노산 치환에 의한 IL-2 변이체의 일 구체예로는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째, 45번째, 61번째 및 72번째 아미노산 중 적어도 하나가 치환된 것일 수 있다.

[0031] 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째, 45번째, 61번째 또는 72번째 아미노산 중 적어도 어느 하나가 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다. 뿐만 아니라, IL-2가 서열번호 35의 아미노산 서열의 N 말단의 일 부분이 결실된 형태일 경우, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 상보적으로 대응되는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 예를 들어, IL-2가 서열번호 35의 아미노산을 서열을 가질 경우에, 상기 IL-2의 변이체는 서열번호 35의 아미노산 서열에서 58번째, 62번째, 65번째, 81번째 또는 92번째 아미노산 중 적어도 어느 하나가 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다. 이들은 각각 서열번호 10의 아미노산 서열의 38번째, 42번째, 45번째, 61번째 및 72번째 아미노산 잔기에 각각 해당한다. 일 구체예에

따르면, IL-2 활성이 유지되는 한, 한 개, 두 개, 세 개, 네 개, 다섯 개, 여섯 개, 일곱 개, 여덟 개, 아홉 개, 혹은 열 개의 아미노산이 치환될 수 있다. 또다른 구체예에 따르면, 한 개에서 다섯 개까지의 아미노산이 치환될 수 있다.

[0032] 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 두 군데의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째 및 42번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째 및 45번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째 및 61번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 42번째 및 45번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 42번째 및 61번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 42번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 45번째 및 61번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 45번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 61번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다.

[0033] 나아가, 상기 IL-2 변이체는 세 군데의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째 및 45번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째 및 61번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 45번째 및 61번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 45번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 61번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 42번째, 45번째 및 61번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 42번째, 45번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 45번째, 61번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다.

[0034] 또한, 상기 IL-2 변이체는 네 군데의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째, 45번째 및 61번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째, 45번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 45번째, 61번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째, 61번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 42번째, 45번째, 61번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다.

[0035] 나아가, 상기 IL-2 변이체는 다섯 군데의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째, 45번째, 61번째 및 72번째 아미노산이 모두 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다.

[0036] 이때, 상기 치환에 의해 도입되는 "다른 아미노산"은 알라닌(alanine), 아르기닌(arginine), 아스파라긴(Asparagine), 아스파르트산(aspartic acid), 시스테인(cysteine), 글루탐산(glutamic acid), 글루타민(glutamine), 히스티딘(histidine), 이소류신(isoleucine), 류신(leucine), 리신(lysine), 메티오닌(methionine), 페닐알라닌(phenyl alanine), 프롤린(proline), 세린(serine), 트레오닌(threonine), 트립토판(tryptophan), 티로신(tyrosine) 및 발린(valine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다. 단, 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 상기 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째는 아르기닌으로 치환될 수 없으며, 42번째는 페닐알라닌으로 치환될 수 없고, 45번째는 티로신으로 치환될 수 없으며, 61번째는 글루탐산으로 치환될 수 없고, 72번째는 류신으로 치환될 수 없다.

[0037] 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째 아미노산인 아르기닌은

아르기닌을 제외한 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째 아미노산인 아르기닌은 알라닌으로 치환(R38A)될 수 있다.

[0038] 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 42번째 아미노산인 페닐알라닌은 페닐알라닌을 제외한 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 42번째 아미노산인 페닐알라닌은 알라닌으로 치환(F42A)될 수 있다.

[0039] 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 45번째 아미노산인 티로신은 티로신을 제외한 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 45번째 아미노산인 티로신은 알라닌으로 치환(Y45A)될 수 있다.

[0040] 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 61번째 아미노산인 글루탐산은 글루탐산을 제외한 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 61번째 아미노산인 글루탐산은 아르기닌으로 치환(E61A)될 수 있다.

[0041] 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 72번째 아미노산인 루신은 루신을 제외한 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 72번째 아미노산인 루신은 글리신으로 치환(L72G)될 수 있다.

[0042] 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 R38A, F42A, Y45A, E61R 및 L72G로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 치환이 일어난 것일 수 있다.

[0043] 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A, Y45A, E61R 및 L72G로 구성된 군에서 선택되는 위치에서 두 군데, 세 군데, 네 군데 또는 다섯 군데의 위치에서 아미노산 치환이 일어날 수 있다.

[0044] 또한, 상기 IL-2 변이체는 두 군데의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 R38A 및 F42A로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A 및 Y45A로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A 및 E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A 및 Y45A로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A 및 E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다.

[0045] 나아가, 상기 IL-2 변이체는 세 군데의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A 및 Y45A로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A 및 E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, Y45A, E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, Y45A 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A, Y45A 및 E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A, Y45A 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 Y45A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다.

[0046] 또한, 상기 IL-2 변이체는 네 군데의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A, Y45A 및 E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A, Y45A 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, Y45A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A, Y45A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다.

[0047] 나아가 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A, Y45A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다.

[0048] 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 일 구체예는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 하기 (a) 내지 (d) 조합 중 선택되는 어느 하나의 조합의 치환이 일어난 것일 수 있다:

[0049] (a) R38A/F42A

- [0050] (b) R38A/F42A/Y45A
- [0051] (c) R38A/F42A/E61R
- [0052] (d) R38A/F42A/L72G
- [0053] 이때, IL-2가 서열번호 35의 아미노산 서열을 가질 경우, 서열번호 10과 상보적으로 대응되는 위치에 아미노산 치환을 가질 수 있다. 또한, IL-2가 서열번호 35의 아미노산 서열의 단편인 경우에도, 서열번호 10과 상보적으로 대응되는 위치의 아미노산이 치환될 수 있다.
- [0054] 구체적으로, 상기 IL-2의 변이체는 서열번호 6, 22, 23 또는 24의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [0055] 또한, 상기 IL-2 변이체는 생체 내에서 낮은 독성을 가지는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다. 이때, 상기 생체 내에서 낮은 독성이란, IL-2가 IL-2 수용체의 알파체인(IL-2R α)과 결합하여 유발되는 부작용일 수 있다. 상기 IL-2와 IL-2R α 결합에 의한 부작용을 개선시키기 위해서 다양한 IL-2 변이체가 개발되었으며, 이러한 IL-2 변이체는 미국특허 5,229,109 및 대한민국특허 1667096에 개시된 것들을 사용할 수 있다. 특히, 본 출원에서 기술되는 IL-2의 변이체는 IL-2 수용체의 알파체인(IL-2R α)과 결합력이 낮아 생체내 독성이 야생형 IL-2에 비해 낮다.
- [0056] 본 명세서에서 사용하는 용어, "CD80"은 "B7-1"로도 불리며, 수지상세포, 활성화된 B세포 및 단핵구에 존재하는 막단백질이다. CD80은 T 세포의 활성화와 생존에 필수적인 공자극 신호를 제공한다. CD80은 T 세포 표면에 존재하는 서로 다른 두 단백질인 CD28 및 CTLA-4에 대한 리간드로 알려져 있다. CD80은 288개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 구체적으로 서열번호 11의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 또한, 본 명세서에서 "CD80 단백질"은 전장 CD80 또는 CD80 단편을 의미한다.
- [0057] 본 명세서에서 사용하는 용어, "CD80 단편"이란, CD80의 절단형을 의미한다. 또한, 상기 CD80 단편은 CD80의 세포외도메인일 수 있다. CD80 단편의 일 구체예로는 CD80의 신호서열인 N-말단으로부터 1번째 내지 34번째의 아미노산이 제외된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 35번째 내지 288번째의 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 또한, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 35번째 내지 242번째 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 또한, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 35번째 내지 232번째 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 또한, 또한, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 35번째 내지 139번째 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 또한, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 142번째 내지 242번째 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 상기 일 실시예로 CD80 단편은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [0058] 또한, 상기 IL-2 단백질 및 상기 CD80 단백질은 링커 혹은 캐리어(carrier)에 의해 결합된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 또는 이의 변이체 및 상기 CD80(B7-1) 또는 이의 단편은 링커 혹은 캐리어에 의해 결합된 것일 수 있다. 본 명세서에서 링커와 캐리어는 호환적으로 사용되기도 한다.
- [0059] 상기 링커는 두 개의 단백질을 연결시켜준다. 링커의 일 구체예로는 1개 내지 50개의 아미노산, 알부민 또는 이의 단편, 또는 면역글로불린의 Fc 도메인 등을 포함할 수 있다. 이때, 상기 면역글로불린의 Fc 도메인은 면역글로불린의 중쇄 불변 영역 2(CH2) 및 중쇄 불변 영역 3(CH3)을 포함하며, 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 및 경쇄 불변 영역 1(CH1)은 포함하지 않는 단백질을 의미한다. 상기 면역글로불린은 IgG, IgA, IgE, IgD 또는 IgM 일 수 있으며, 바람직하게는 IgG4일 수 있다. 이때, 야생형 면역글로불린 G4의 Fc 도메인은 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [0060] 또한, 상기 면역글로불린의 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인 뿐만 아니라, Fc 도메인 변이체일 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용하는 용어 "Fc 도메인 변이체"는 야생형 Fc 도메인의 당쇄 형태(glycosylation pattern)와 다르거나, 야생형 Fc 도메인에 비해 증가된 당쇄, 야생형 Fc 도메인에 비해 감소한 당쇄, 또는 당쇄가 제거(deglycosylate)된 형태일 수 있다. 또한 무당쇄(aglycosylated) Fc 도메인도 포함된다. Fc 도메인 혹은 변이체는 배양조건 혹은 호스트의 유전자 조작을 통해 조정된 숫자의 시알산(sialic acid), 퓨코실화(fucosylation), 당화(glycosylation)를 갖도록 한 것일 수 있다.
- [0061] 또한, 화학적 방법, 효소적 방법 및 미생물을 사용한 유전공학적 엔지니어링 방법 등과 같이 통상적인 방법으로 면역글로불린의 Fc 도메인의 당쇄를 변형시킬 수 있다. 또한, 상기 Fc 도메인 변이체는 면역글로불린은 IgG, IgA, IgE, IgD 또는 IgM의 Fc 영역이 혼합된 형태일 수 있다. 또한, 상기 Fc 도메인 변이체는 상기 Fc 도메인의 일부 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 형태일 수 있다. 상기 Fc 도메인 변이체의 일 구체예로는 서열번호

12의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

- [0062] 융합단백질은 Fc 도메인을 링커(혹은 캐리어)로 하여 이의 N-말단과 C-말단에 각각 CD80과 IL-2 단백질이 연결되거나 혹은 IL-2와 CD80이 연결된 구조를 가질 수 있다(도 89). Fc 도메인의 N-말단 혹은 C-말단과 CD-80 혹은 IL-2의 연결은 임의적으로 링커 펩타이드에 의해 이루어질 수 있다.
- [0063] 구체적으로, 상기 융합단백질은 하기 구조식(I) 또는 (II)로 이루어진 것일 수 있다:
- [0064] $N'-X-[리inker(1)]_n-Fc \text{ 도메인}-[리inker(2)]_m-Y-C'$ (I)
- [0065] $N'-Y-[리inker(1)]_n-Fc \text{ 도메인}-[리inker(2)]_m-X-C'$ (II)
- [0066] 이때, 상기 구조식(I) 및 (II)에 있어서,
- [0067] 상기 N'은 융합단백질의 N-말단이고,
- [0068] 상기 C'는 융합단백질의 C-말단이며,
- [0069] 상기 X는 CD80 단백질이고,
- [0070] 상기 Y는 IL-2 단백질이며,
- [0071] 상기 링커(1) 및 링커(2)는 펩타이드 링커이고,
- [0072] 상기 n 및 m은 각각 독립적으로, 0 또는 1이다.
- [0073] 바람직하게는, 상기 융합단백질은 구조식(I)로 이루어진 것일 수 있다. 상기 IL-2 단백질은 상술한 바와 같다. 또한, 상기 CD80 단백질은 상술한 바와 같다. 일 구체예에 따르면, IL-2 단백질은 야생형 IL-2와 비교하여 하나에서 다섯개까지의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체일 수 있다. CD80 단백질은 야생형 CD80의 N-말단 혹은 C-말단으로부터 연속적으로 약 34개까지의 아미노산 잔기가 결실된(truncated) 단편일 수 있다. 혹은 CD 단백질은 T-세포 표면 수용체(T cell surface receptors) CTLA-4와 CD28에 결합하는 활성을 갖는 세포의 면역글로불린-유사 도메인일 수 있다.
- [0074] 구체적으로, 상기 융합단백질은 서열번호 9, 26, 28 또는 30의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 또 다른 구체예에 따르면, 융합단백질은 서열번호 9, 26, 28 또는 30의 아미노산 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 혹은 100%의 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이때, 동일성은, 예를 들어, 퍼센트 상동성, NCBI(National Center of Biotechnology Information)의 BlastN software과 같은 상동성 비교 소프트웨어를 통해 결정될 수 있다.
- [0075] 상기 CD80 단백질과 Fc 도메인의 사이에는 펩타이드 링커(1)가 포함될 수 있다. 상기 펩타이드 링커(1)은 5 내지 80개의 연속된 아미노산, 20 내지 60개의 연속된 아미노산, 또는 25 내지 50개의 연속된 아미노산, 또는 30 내지 40개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 일 구체예로 펩타이드 링커(1)은 30개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 또한, 펩타이드 링커(1)은 적어도 하나의 시스테인을 포함할 수 있다. 구체적으로, 하나, 두 개 또는 세 개의 시스테인을 포함할 수 있다. 또한, 상기 펩타이드 링커(1)는 면역글로불린의 힌지에서 유래된 것일 수 있다. 한 구체예에서는, 상기 펩타이드 링커(1)이 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커일 수 있다.
- [0076] 상기 펩타이드 링커(2)는 1 내지 50개의 연속된 아미노산, 또는 3 내지 30개의 연속된 아미노산, 또는 5 내지 15개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 일 구체예로 상기 펩타이드 링커(2)는 (G4S)_n(이때, n은 1 내지 10의 정수) 일 수 있다. 이때, (G4S)_n에서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10일 수 있다. 일 실시예로, 상기 펩타이드 링커(2)가 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커일 수 있다.
- [0077] 본 발명의 다른 측면은, 상기 IL-2 단백질 및 상기 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 두 개가 결합된 이량체를 제공한다. 상기 IL-2 또는 이의 변이체 및 CD80 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질은 상술한 바와 같다.
- [0078] 이때, 이량체를 구성하는 융합단백질 간의 결합은 링커 내에 존재하는 시스테인에 의해 이황화 결합에 의해 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이량체를 구성하는 융합단백질은 동일한 것일 수도 있으나, 서로 상이한 융합단백질일 수 있다. 바람직하게는, 상기 이량체는 동형이량체(homodimer)인 것일 수 있다. 상기 이량체를 구성하는 융합단백질의 일 실시예는 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 단백질일 수 있다.
- [0079] **융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드**

- [0080] 본 발명의 또 다른 측면은, IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 구체적으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 8, 25, 27 또는 29의 염기서열을 포함하는 것일 수 있다. 상기 IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질은 상술한 바와 같다. 상기 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있다. 뉴클레오티드 서열을 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당업계에 널리 공지된 합성법, 예를 들어 문헌(Engels and Uhlmann, Angew Chem IntEd Engl., 37:73-127, 1988)에 기술된 방법을 이용할 수 있으며, 트리에스테르, 포스포이트, 포스포르아미다이트 및 H-포스포이트 방법, PCR 및 기타 오토프라이머 방법, 고체 지지체상의 올리고뉴클레오티드 합성법 등을 들 수 있다.
- [0081] 일 구체예에 따르면, 상기 폴리펩티드는 서열번호 8, 25, 27 또는 29와 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100%의 동일성을 가지는 핵산 서열을 포함할 수 있다.
- [0082] 상기 폴리뉴클레오티드는 신호서열(signal sequence) 또는 리더 서열(leader sequence)을 코딩하는 핵산을 추가적으로 포함할 수 있다. 여기에서 사용된 용어 "신호서열"은 목적 단백질의 분비를 지시하는 신호펩타이드를 의미한다. 상기 신호펩타이드는 숙주 세포에서 번역된 후에 절단된다. 구체적으로, 상기 신호서열은 ER(endoplasmic reticulum) 막을 관통하는 단백질의 이동을 개시하는 아미노산 서열이다. 일 실시예로, 상기 신호서열은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [0083] 신호서열은 당업계에 그 특징이 잘 알려져 있으며, 통상 16 내지 30개의 아미노산 잔기를 포함하나, 그보다 더 많거나 적은 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 통상적인 신호 펩타이드는 기본 N-말단 영역, 중심의 소수성 영역, 및 보다 극성인(polar) C-말단 영역의 세 영역으로 구성된다. 중심 소수성 영역은 미성숙 폴리펩타이드가 이동하는 동안 막지질 이중층을 통하여 신호서열을 고정시키는 4 내지 12개의 소수성 잔기를 포함한다.
- [0084] 개시 이후에, 신호서열은 흔히 신호 펩티다아제(signal peptidases)로 알려진 세포 효소에 의하여 ER의 루멘(lumen) 내에서 절단된다. 이때, 상기 신호서열은 tPa(tissue Plasminogen Activation), HSV gDs(signal sequence of Herpes simplex virus glycoprotein D), 또는 성장 호르몬(growth hormone)의 분비신호서열일 수 있다. 바람직하게, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵 세포에서 사용되는 분비 신호서열을 사용할 수 있다. 또한, 상기 신호서열은 야생형 IL-2 및/혹은 CD-80에 포함된 신호서열을 사용하거나, 숙주세포에서 발현 빈도가 높은 코돈으로 치환하여 사용할 수 있다.
- [0085] **융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 적재된 벡터**
- [0086] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0087] 상기 벡터는 숙주 세포에 도입되어 숙주 세포 유전체 내로 재조합 및 삽입될 수 있다. 또는 상기 벡터는 예피솜으로서 자발적으로 복제될 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 수단으로 이해된다. 상기 벡터는 선형 핵산, 플라스미드, 파지미드, 코스미드, RNA 벡터, 바이러스 벡터 및 이의 유사체들을 포함한다. 바이러스 벡터의 예로는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 및 아데노-관련 바이러스를 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0088] 구체적으로, 상기 벡터는 플라스미드 DNA, 파아지 DNA 등이 될 수 있고, 상업적으로 개발된 플라스미드(pUC18, pBAD, pIDTSAMRT-AMP 등), 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pBR325, pUC118, pUC119 등), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(pUB110, pTP5 등), 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24, YCp50 등), 파아지 DNA(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt10, λgt11, λZAP 등), 동물 바이러스 벡터(레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 백신시아 바이러스(vaccinia virus) 등), 곤충 바이러스 벡터(배큘로바이러스(baculovirus) 등)이 될 수 있다. 상기 벡터는 숙주 세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용함이 바람직하다.
- [0089] 본 명세서에서 사용하는 용어, 목적 단백질의 "유전자 발현" 또는 "발현"은, DNA 서열의 전사, mRNA 전사체의 번역 및 융합단백질 생산물 또는 이의 단편의 분비를 의미하는 것으로 이해된다. 유용한 발현 벡터는 RCMV(Invitrogen, Carlsbad) 또는 이의 변이체일 수 있다. 상기 발현 벡터는 포유류 세포에서 목적 유전자의 연속적인 전사를 촉진하기 위한 인간 CMV(cytomegalovirus) 프로모터, 및 전사 후 RNA의 안정상태 수준을 높이기 위한 우태 성장 인자(bovine growth hormone) 폴리아데닐레이션 신호서열을 포함할 수 있다.
- [0090] **융합단백질을 발현하는 형질전환된 세포**

- [0091] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 벡터가 도입된 형질전환 세포를 제공한다.
- [0092] 상기 형질전환 세포의 숙주세포로서, 원핵세포, 진핵세포, 포유동물, 식물, 곤충, 균류 또는 세포성 기원의 세포를 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 상기 원핵세포의 일 예로는 대장균을 사용할 수 있다. 또한, 진핵세포의 일 예로는 효모를 사용할 수 있다. 또한, 상기 포유동물 세포로 CHO 세포, F2N 세포, CSO 세포, BHK 세포, 바우스(Bowes) 흑색종 세포, HeLa 세포, 911 세포, AT1080 세포, A549 세포, HEK 293 세포 또는 HEK293T 세포 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 당업자에게 알려진 포유동물 숙주세포로 사용 가능한 세포는 모두 이용 가능하다.
- [0093] 또한, 숙주세포로 발현벡터를 도입하는 경우, CaCl_2 침전법, CaCl_2 침전법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 텍스트란 셀페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 사용될 수 있다.
- [0094] 전술한 바와 같이, 융합단백질의 치료제로서의 특성을 최적화하거나 기타 다른 목적을 위해 호스트 세포가 갖고 있는 당화(glycosylation) 관련 유전자를 당업자에게 알려져 있는 방법을 통해 조작하여 융합단백질의 당쇄 패턴(예를 들어, 시알산, 푸코실화, 당화)을 조정할 수 있다.
- [0095] **융합단백질 생산 방법**
- [0096] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 형질전환 세포를 배양하는 단계를 포함하는 IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질을 생산하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 상기 생산방법은 상기 생산 방법은 i) 상기 형질전환 세포를 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및 ii) 상기 배양물로부터 융합단백질을 회수하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0097] 상기 형질전환 세포를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로, 상기 배양은 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch 또는 repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있다.
- [0098] **융합단백질 또는 이의 이량체의 용도**
- [0099] 본 발명의 또 다른 측면은, IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 또는 상기 융합단백질 2개가 결합된 융합단백질 이량체를 유효성분으로 포함하는 암 또는 감염성 질환 치료 또는 예방용, 및/또는 치료효과(efficacy)를 증가시킬 수 있는 약학 조성물을 제공한다.
- [0100] 상기 IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 또는 상기 융합단백질 2개가 결합된 융합단백질 이량체는 상술한 바와 같다.
- [0101] 상기 암은 위암, 간암, 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 자궁경부암, 갑상선암, 후두암, 급성 골수성 백혈병, 뇌종양, 신경모세포종, 망막 모세포종, 두경부암, 침샘암 및 림프종으로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 감염성 질환은 B형 간염, C형 간염, 인간 파필로마 바이러스(human papilloma virus: HPV) 감염, 사이토메갈로바이러스(Cytomegalovirus) 감염, 바이러스성 호흡기 질환 및 인플루엔자로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0102] 상기 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 암 또는 감염성 질환 치료용 또는 예방용 약학 조성물에서 그 유효성분은 항암 활성을 나타내거나, 감염성 질환에 치료 효과를 나타낼 수 있는 한, 용도, 제형, 배합 목적 등에 따라 임의의 양(유효량)으로 포함될 수 있는데, 통상적인 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001 중량 % 내지 20.0 중량% 범위 내에서 결정될 것이다. 여기서 "유효량"이란 항암 효과 또는 감염성 질환 치료(treatment) 효과를 유도할 수 있는 유효성분의 양을 말한다. 이러한 유효량은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 실험적으로 결정될 수 있다.
- [0103] 본 명세서에서 사용된 용어, "치료"는 치료학적 처리 및 예방적 처리를 모두 포함하는 의미로 사용될 수 있다. 이때, 예방은 개체의 병리학적 상태 또는 질환을 완화시키거나 감소시키는 의미로 사용될 수 있다. 일 구체예에서, 용어 "치료"는 인간을 포함한 포유류에서 질환을 치료하기 위한 적용이나 어떠한 형태의 투약을 모두 포함한다. 또한, 상기 용어는 질환 또는 질환의 진행을 억제하거나 늦추는 것을 포함하며; 손상되거나, 결손된 기능을 회복시키거나, 수리하여, 질환을 부분적이거나 완전하게 완화시키거나; 또는 비효율적인 프로세스를

자극하거나; 심각한 질환을 완화하는 의미를 포함한다.

- [0104] 본 명세서에서 사용된 용어, “효능(efficacy)”은 1년, 5년, 또는 10년과 같이 일정 기간에 걸쳐 생존 또는 질병이 없는 상태에서 생존(disease-free survival)과 같은 같은 하나 이상의 파라미터에 의해 결정될 수 있다. 뿐만 아니라, 상기 파라미터는 개체에서 적어도 하나의 종양의 크기가 억제되는 것을 포함할 수 있다.
- [0105] 생체이용률과 같은 약동학적 파라미터(Pharmacokinetic parameters) 및 클리어런스율(clearance rate)과 같은 기본적인 파라미터(underlying parameters)도 효능에 영향을 줄 수 있다. 따라서, “향상된 효능”(예를 들어, 효능의 개선)은 향상된 약동학적 파라미터 및 향상된 효능에 기인할 수 있으며, 시험 동물 또는 인간 대상체에서 클리어런스율 및 종양 성장을 비교하거나, 생존, 재발율 또는 질병이 없는 상태에서 생존과 같은 파라미터를 비교하여 측정될 수 있다.
- [0106] 여기서 “치료학적으로 유효한 양” 또는 “약학적으로 유효한 양”이란 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 화합물 또는 조성물의 양으로서, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미한다. 상기 유효량의 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 일 구체예에서 치료학적으로 유효한 양은 암을 치료하는데 효과적인 약물의 양을 의미한다.
- [0107] 이때, 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 환자에게 전달하기에 적절한 비-독성 물질이면 어떠한 담체라도 가능하다. 증류수, 알코올, 지방, 왁스 및 비활성 고체가 담체로 포함될 수 있다. 약물학적으로 허용되는 애쥬번트(완충제, 분산제) 또한 약학 조성물에 포함될 수 있다.
- [0108] 구체적으로, 상기 약학 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하여 당업계에 공지된 통상의 방법으로 투여 경로에 따라 비경구용 제형으로 제조될 수 있다. 여기서 “약제학적으로 허용되는” 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적용 가능한 이상의 독성을 지니지 않는다는 의미이다.
- [0109] 상기 약학 조성물이 비경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 주사제, 경피 투여제, 비강 흡입제 및 좌제의 형태로 제제화될 수 있다. 주사제로 제제화할 경우 적합한 담체로서는 멸균수, 에탄올, 글리세롤이나 프로필렌 글리콜 등의 폴리올 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline)나 주사용 멸균수, 5% 텍스트로스 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 약제학적 조성물의 제제화와 관련하여서는 당업계에 공지되어 있으며, 구체적으로 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)] 등을 참조할 수 있다. 상기 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주 된다.
- [0110] 상기 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 성별, 연령, 환자의 중증도, 투여 경로에 따라 1일 0.01 ug/kg 내지 10 g/kg 범위, 또는 0.01 mg/kg 내지 1 g/kg 범위일 수 있다. 투여는 1일 1회 또는 수회로 나누어 이루어질 수 있다. 이러한 투여량은 어떠한 측면으로든 본원 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 아니 된다.
- [0111] 상기 약학 조성물이 적용(처방)될 수 있는 대상은 포유동물 및 사람이며, 특히 사람인 경우가 바람직하다. 본원의 약학 조성물은 유효성분 이외에, 항암 활성의 상승·보강을 위하여 이미 안전성이 검증되고 항암 활성 또는 감염성 질환에 치료 효과를 갖는 것으로 공지된 임의의 화합물이나 천연 추출물을 추가로 포함할 수 있다.
- [0112] 본 발명의 또 다른 측면은, 암 또는 감염성 질환을 치료하기 위한 IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합 단백질의 용도를 제공한다.
- [0113] 본 발명의 또 다른 측면은, 암 또는 감염성 질환의 치료효과를 향상(enhance)시키기 위한 IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질의 용도를 제공한다.
- [0114] 본 발명의 또 다른 측면은, 암 또는 감염성 질환 치료용 약제를 제조하기 위한 IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질의 용도를 제공한다.
- [0115] 본 발명의 또 다른 측면은, IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 또는 상기 융합단백질 2개가 결합된 융합단백질 이량체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 또는 감염성 질환을 치료하는 방법, 및/또는 치

효효과를 향상시키는 방법을 제공한다.

[0116] 상기 개체는 암 또는 감염성 질환을 앓고 있는 개체일 수 있다. 또한 상기 개체는 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다. 상기 IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 또는 상기 융합단백질 2개가 결합된 융합단백질 이량체는 상술한 바와 같다.

[0117] 상기 융합 단백질 또는 융합단백질 이량체의 투여경로, 투여량 및 투여횟수는 환자의 상태 및 부작용의 유무에 따라 다양한 방법 및 양으로 대상에게 투여될 수 있고, 최적의 투여방법, 투여량 및 투여횟수는 통상의 기술자가 적절한 범위로 선택할 수 있다. 또한, 상기 융합 단백질 또는 융합단백질 이량체는 치료하고자 하는 질환에 대하여 치료효과가 공지된 다른 약물 또는 생리학적 활성물질과 병용하여 투여되거나, 다른 약물과의 조합 제제 형태로 제형화될 수 있다.

[0118] 본 발명의 일 구체예의 융합단백질은 IL-2의 활성으로 인해 자연살해세포와 같은 면역세포를 활성화시킬 수 있다. 따라서, 암 및 감염성 질환에 효과적으로 활용할 수 있다. 특히, 야생형과 비교하여 2개 내지 5개 위치의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체, 특히 서열번호 10의 아미노산 서열에서 R38A, F42A, Y45A, E61R 및 L72G로 구성된 군에서 선택되는 위치에서 두 군데, 세 군데, 네 군데 또는 다섯 군데의 위치의 아미노산 치환을 포함하는 IL-2 변이체는 IL-2 수용체의 알파 체인과의 결합력을 낮추어 종래 IL-2가 가지고 있는 약리학적 부작용을 개선된 특성을 보이는 것이 확인되었다. 따라서, 이런 IL-2 변이체는 단독으로 혹은 융합단백질의 형태로 사용할 경우 종래에 알려진 IL-2의 문제점인 혈관(또는 모세관) 누출 증후군(VLS)의 발생을 감소시킬 수 있다.

[0119] 이하, 본원 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본원 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본원 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0120] I. 융합단백질 제조

[0121] 제조예 1. hCD80-Fc-IL-2 변이체(2M)의 제조: GI101

[0122] 인간 CD80 단편, Fc 도메인 및 IL-2 변이체를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), CD80 단편(서열번호 2), Ig 힌지(서열번호 3), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 두 개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(2M)(R38A, F42A)(서열번호 6)를 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 8)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 폴리뉴클레오티드를 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 9의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37℃, 125 RPM, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질을 "GI101"로 명명하였다.

[0123] 정제는 MabSelect SuRe protein A resin이 포함된 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 25 mM Tris, 25 mM NaCl, pH 7.4의 조건에서 융합단백질을 결합시켰다. 그 후, 100 mM NaCl, pH 3의 100 mM의 아세트산으로 용출하였다. pH 9의 20%의 1M Tris-HCl를 수거용 튜브에 넣은 후, 융합단백질을 수거하였다. 수거된 융합단백질을 16시간 동안 PBS 버퍼로 투석하여 바꾸어 주었다.

[0124] 그 후, TSKgel G3000SWXL column(TOSOH Bioscience)을 사용하여 크기배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)를 이용하여 시간에 따른 280 nm 파장에서의 흡광도를 측정하여 고농도 융합단백질을 확보하였다. 이때, 분리 정제된 융합단백질은 reduced(R) 또는 non-reduced(NR) 조건하에서 SDS-PAGE를 실행하고, 코마시블루(coomassie blue)로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 6). NanoDrop을 사용하여 검출시 2.78 mg/ml의 농도로 융합단백질이 포함된 것을 확인하였다(도 7). 또한, 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 분석한 결과는 도 8에 나타난 바와 같다.

[0125] 제조예 2. mCD80-Fc-IL-2 변이체(2M)의 제조: mGI101

[0126] 마우스 CD80, Fc 도메인 및 IL-2 변이체를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), mCD80(서열번호 13), Ig 힌지(서열번호 3), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 두 개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(2M)(R38A, F42A)(서열번호 6)를 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 14)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 폴리뉴클레오티드 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 15의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37℃, 125

RPM, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합 단백질 "mGI101"로 명명하였다.

[0127] 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 분리 정제된 융합단백질은 reduced(R) 또는 non-reduced(NR) 조건하에서 SDS-PAGE를 실행하고, 코마시블루로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 9). NanoDrop을 사용하여 흡광도 280 nm로 검출시 1.95 mg/ml의 농도로 융합단백질이 포함된 것을 확인하였다.

[0128] **제조예 3. hCD80-Fc의 제조: GI101C1**

[0129] 인간 CD80 단편 및 Fc 도메인을 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), CD80 단편(서열번호 2), Ig 힌지(서열번호 3) 및 Fc 도메인(서열번호 4)를 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 16)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 폴리뉴클레오티드 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHOTM)에 도입하여 서열번호 17의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37°C, 125 RPM, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질을 "GI101C1"으로 명명하였다.

[0130] 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 분리 정제된 융합단백질은 reduced(R) 또는 non-reduced(NR) 조건하에서 SDS-PAGE를 실행하고, 코마시블루로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 10). NanoDrop을 사용하여 흡광도 280 nm로 검출시 3.61 mg/ml의 농도로 융합단백질이 포함된 것을 확인하였다.

[0131] **제조예 4. Fc-IL-2 변이체(2M)의 제조: GI101C2**

[0132] Fc 도메인 및 IL-2 변이체를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 두 개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(2M)(R38A, F42A)(서열번호 6)를 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 18)을 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 폴리뉴클레오티드 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHOTM)에 도입하여 서열번호 19의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37°C, 125 RPM, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질을 "GI101C2"으로 명명하였다.

[0133] 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 분리 정제된 융합단백질은 reduced(R) 또는 non-reduced(NR) 조건하에서 SDS-PAGE를 실행하고, 코마시블루로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 11). NanoDrop을 사용하여 흡광도 280 nm로 검출시 4.79 mg/ml의 농도로 융합단백질이 포함된 것을 확인하였다.

[0134] **제조예 5. mCD80-Fc의 제조: mGI101C1**

[0135] 마우스 CD80 및 Fc 도메인을 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), 마우스 CD80(서열번호 13), Ig 힌지(서열번호 3) 및 Fc 도메인(서열번호 4)을 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 20)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 폴리뉴클레오티드 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHOTM)에 도입하여 서열번호 21의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37°C, 125 RPM, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합 단백질 "mGI101C1"으로 명명하였다.

[0136] 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 분리 정제된 융합단백질은 reduced(R) 또는 non-reduced(NR) 조건하에서 SDS-PAGE를 실행하고, 코마시블루로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 12). NanoDrop을 사용하여 흡광도 280 nm로 검출시 2.49 mg/ml의 농도로 융합단백질이 포함된 것을 확인하였다.

[0137] 상기 제조예 1 내지 5에서 제작한 융합단백질들을 하기 표 1에 정리하여 나타내었다.

표 1

구분	N 말단	링커	C 말단
제조예 1(GI101)	hCD80 단편	Fc 도메인	hIL-2m
제조예 2(mGI101)	mCD80 단편	Fc 도메인	hIL-2m
제조예 3(GI101C1)	CD80 단편	Fc 도메인	-
제조예 4(GI101C2)	-	Fc 도메인	IL-2m
제조예 5(mGI101C1)	mCD80 단편	Fc 도메인	-

제조예 6. CD80-Fc-IL-2의 제조: GI101w

인간 CD80 단편, Fc 도메인 및 인간 IL-2를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), CD80 단편(서열번호 2), Ig 힌지(서열번호 3), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 성숙된 인간 IL-2(서열번호 10)를 포함하는 N-말단으로부터 이 순서대로 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 31)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 폴리뉴클레오티드 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHOTM)에 도입하여 서열번호 32의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37℃, 125 RPM, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질을 "GI101w"로 명명하였다. 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다.

제조예 7. hCD80-Fc-IL-2 변이체(3M)의 제조: GI102-M45

인간 CD80 단편, Fc 도메인 및 세개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(3M)(R38A, F42A, Y45A)(GI102-M45)를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), CD80 단편(서열번호 2), Ig 힌지(서열번호 3), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 IL-2 변이체(서열번호 22)를 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 25)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 폴리뉴클레오티드 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHOTM)에 도입하여 서열번호 26의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37℃, 125 RPM, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질을 "GI102-M45"로 명명하였다.

상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 분리 정제된 융합단백질은 reduced(R) 또는 non-reduced(NR) 조건하에서 SDS-PAGE를 실행하고, 코마시블루로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 13).

제조예 8. hCD80-Fc-IL-2 변이체(3M)의 제조: GI102-M61

인간 CD80 단편, Fc 도메인 및 세개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(3M) (R38A, F42A, E61R)(GI101-M61)를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), CD80 단편(서열번호 2), Ig 힌지(서열번호 3), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 IL-2 변이체(서열번호 23)를 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 27)을 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 폴리뉴클레오티드 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHOTM)에 도입하여 서열번호 28의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37℃, 125 RPM, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질을 "GI102-M61"로 명명하였다.

상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 분리 정제된 융합단백질은 reduced(R) 또는 non-reduced(NR) 조건하에서 SDS-PAGE를 실행하고, 코마시블루로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 14).

제조예 9. hCD80-Fc-IL-3M의 제조: GI102-M72

인간 CD80 단편, Fc 도메인 및 세개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(3M)(R38A, F42A, L72G)(GI102-M72)를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), CD80 단편(서열번호 2), Ig 힌지(서열번호 3), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 IL-2 변이체(서열번호 24)를 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 29)을 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher

Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 폴리뉴클레오티드 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 30의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37°C, 125 RPM, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질을 "GI102-M72"로 명명하였다.

[0149] 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 분리 정제된 융합단백질은 reduced(R) 또는 non-reduced(NR) 조건하에서 SDS-PAGE를 실행하고, 코마시블루로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 15).

[0150] **제조예 10. mCD80-Fc-IL-3M의 제조: mGI102-M61**

[0151] 마우스 CD80 단편, Fc 도메인 및 세개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(3M)(R38A, F42A, E61R)(GI102-M61)를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), mCD80 단편(서열번호 13), Ig 힌지(서열번호 3), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 IL-2 변이체(서열번호 23)를 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 33)을 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 폴리뉴클레오티드 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 34의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37°C, 125 RPM, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질을 "mGI102-M61"로 명명하였다.

[0152] 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0153] **II. 융합단백질과 리간드의 결합 친화성 확인**

[0154] 융합단백질과 리간드의 결합 친화성을 확인하기 위해, Octet RED 384를 이용하여 결합 친화성을 측정하였다.

[0155] **실험예 1. hCTLA-4 및 GI101 간의 결합 친화성 확인**

[0156] AR2G biosensor(Amine Reactive 2nd gen, ForteBio, Cat: 18-5092)를 Microplate-96-well(GreinerBio-one, Cat:655209)에 증류수를 200 μ l씩 담고 미리 수화시켰다. AR2G biosensor에 붙일 리간드(CTLA-4, Human CTLA-4/CD152, His tag, Sino Biological, Cat: 11159-H08H)를 10 mM 농도의 아세트이트 버퍼(pH 5, AR2G reagent Kit, ForteBio, Cat: 18-5095)에 5 μ g/ml 농도가 되도록 희석하였다. 또한, 리간드에 붙을 GI101을 1,000 nM, 500 nM, 250 nM, 125 nM 또는 62.5 nM 농도가 되도록 1X AR2G kinetic buffer(AR2G reagent Kit, ForteBio, Cat: 18-5095)에 희석시켰다. Activation buffer는 증류수에 20 mM 농도의 EDC 및 10 mM 농도의 s-NHS(AR2G reagent Kit, ForteBio, Cat: 18-5095)를 혼합하여 제작하였다. Microplate-384-well(GreinerBio-one, Cat: 781209)에 각 시약을 80 μ l씩 넣고 프로그램을 세팅하였다.

[0157] 그 결과, hCTLA-4와 GI101 간의 결합 친화성이 도 16에 나타난 바와 같이 측정되었다.

[0158] **실험예 2. hPD-L1/GI101 및 hPD-L1/PD-1 간의 결합 친화성 확인**

[0159] Ni-NTA(Nickel charged Tris-NTA, Ni-NTA Biosensors, ForteBio, 18-5101)를 microplate-96-well에 1X Ni-NTA kinetic buffer(10X Kinetics buffer, ForteBio, 18-1042)를 200 μ l씩 담고 미리 수화시켰다. Ni-NTA Biosensors에 붙일 리간드(Human PD-L1/B7-H1 protein, His-tag, Sino biological, Cat: 10084-H08H)를 1X Ni-NTA kinetic buffer에 5 μ g/ml 농도가 되도록 희석하였다. 리간드에 붙을 GI101을 1,000 nM, 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62.5 nM로 1X Ni-NTA kinetic buffer에 희석하였다. 또한, 리간드에 붙을 인간 PD-1/PDCD1(Human PD-1/PDCD1, Fc Tag, Sino Biological, Cat: 10377-H02H)을 2,000 nM, 1,000 nM, 500 nM, 250 nM 또는 125 nM 농도가 되도록 1X Ni-NTA kinetic buffer에 희석시켰다. 그 후, microplate-384-well에 각 시약을 80 μ l씩 넣고 프로그램을 세팅하였다.

[0160] 그 결과, hPD-L1과 GI101 간의 결합 친화성은 도 17에 나타난 바와 같이 측정되었다. 또한, hPD-L1과 hPD-1 간의 결합 친화성은 도 18에 나타난 바와 같이 측정되었다.

[0161] **실험예 3. mCTLA-4 및 mGI101 간의 결합 친화성 확인**

[0162] 실험예 1과 동일한 방법으로 mCTLA-4 및 mGI101 간의 결합 친화성을 확인하였다. 이때, 사용한 장비는 다음과 같다: Biosensor: AR2G, Ligand: mCTLA-4(Recombinant Mouse CTLA-4 Fc chimera, R&D systems, Cat: 434-CT-200), Analyte: mGI101(500 nM, 250 nM, 125 nM, 62.5 nM, 31.3nM).

- [0163] 그 결과, mCTLA-4 및 mGI101 간의 결합 친화성은 도 19에 나타난 바와 같이 측정되었다.
- [0164] **실험예 4. mPD-L1 및 mGI101 간의 결합 친화성 확인**
- [0165] 실험예 1과 동일한 방법으로 mPD-L1 및 mGI101 간의 결합 친화성을 확인하였다. 이때, 사용한 장비는 다음과 같다. Biosensor: AR2G, Ligand: mPD-L1(Recombinant Mouse B7-H1/PD-L1 Fc chimera, R&D systems, Cat: 434-CT-200), Analyte: mGI101(500 nM, 250 nM, 125 nM, 62.5 nM, 31.3 nM).
- [0166] 그 결과, mPD-L1 및 mGI101 간의 결합 친화성은 도 20에 나타난 바와 같이 측정되었다.
- [0167] **실험예 5. GI-101(hCD80-Fc-hIL-2v)의 CTLA-4 및 PD-L1에 대한 결합력 확인**
- [0168] 결합 동역학 측정은 30℃ 및 1,000 rpm의 교반을 통한 Octet RED 384 기기(ForteBio, Pall Life Science)를 이용하여 수행하였다. CTLA-4에 대한 결합력 측정은 Amine Reactive 2 generation(AR2G) 바이오센서칩을 사용하여 측정하고, PD-L1에 대한 결합력 측정은 Nickel charged Tris-NTA(Ni-NTA) 바이오센서칩을 사용하여 측정하였다. Human CTLA-4-His Tag(Sino Biological, Cat: 11159-H08H)은 AR2G 바이오센서칩을 400 mM EDC와 100 mM sulfo-NHS의 조합으로 활성화시킨 후, 10 mM 아세트레이트 완충액(pH5)으로 5 µg/mL로 희석하여 AR2G 바이오센서에 300초간 로딩해서 고정시켰다.
- [0169] 그런 다음, 다양한 농도의 GI-101(hCD80-Fc-hIL-2v), GI-101C1(hCD80-Fc), Ipilimumab(Bristol-Myers Squibb) 및 GI-101C2(Fc-hIL-2v)와의 결합을 300초 동안 측정하고 해리 역시도 300초 동안 측정하였다. 반면, Human PD-L1-His tag(Sino biological, Cat: 10084-H08H)은 1XNi-NTA kinetic buffer에 5 µg/mL 농도로 희석하여 Ni-NTA 바이오센서칩에 600초간 로딩해서 고정시켰다. 그 후, 다양한 농도의 GI-101, GI-101C1, hPD-1-Fc(Sino biological, Cat: 10377-H02H) 및 GI101C2와의 결합을 300초 동안 측정하고 해리 역시도 300초 동안 측정하였다. 결합 동역학 분석은 Pall사에서 제공하는 Octet Data analysis HT software ver 10을 사용하여 하였다. 그 결과는 도 21 및 도 22에 나타내었다.
- [0170] **실험예 6. GI-101(hCD80-Fc-hIL-2v)이 PD-1/PD-L1 결합에 미치는 영향 확인**
- [0171] 블로킹 실험은 30℃ 및 1,000 rpm의 교반을 통한 Octet RED 384 기기(ForteBio, Pall Life Science)를 이용하여 수행하였다. Human PD-L1-His tag(Sino biological, Cat: 10084-H08H)은 1XNi-NTA kinetic buffer에 5µg/mL 농도로 희석하여 Ni-NTA 바이오센서칩에 600초 동안 로딩함으로써 고정시켰다. 블로킹 실험을 진행하기 위하여 바이오센서칩에 고정된 hPD-L1과 다양한 농도(300 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12.5 nM 및 0nM)의 GI-101을 600초간 결합시킨 후 경쟁물질인 human PD-1(100 nM)을 600초간 다시 결합시킴으로써 hPD-1이 얼마나 더 결합할 수 있는지 측정하였다. 반대로, 다양한 농도(300 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12.5 nM 및 0 nM)의 hPD-1을 600초간 결합시킨 후, 경쟁물질인 GI-101(100 nM)을 600초간 다시 결합시킴으로써 GI-101이 얼마나 더 결합할 수 있는지도 측정하였다. 블로킹 실험의 분석은 Pall사에서 제공하는 Octet Data analysis HT software ver 10의 epitope binning 메뉴를 이용하여 하였다. 그 결과는 도 23에 나타내었다.
- [0172] **실험예 7. IL-2Rα 또는 IL-2Rβ와 GI101 간의 결합 친화성 확인**
- [0173] IL-2Rα에 대한 결합력 측정은 AR2G biosensor를 사용하여 측정하였고, IL-2Rβ에 대한 결합력 측정은 Ni-NTA biosensors(Nickel charged Tris-NTA, Ni-NTA Biosensors, ForteBio, 18-5101)을 사용하여 측정하였다.
- [0174] AR2G biosensor에 붙일 리간드(IL-2Rα-His Tag, Acro, Cat: ILA-H52H9)를 10 mM 농도의 아세트레이트 버퍼(pH 5, AR2G reagent Kit, ForteBio, Cat: 18-5095)에 5 µg/mL 농도가 되도록 희석하였다. AR2G biosensor를 400 mM 농도의 EDC와 100 mM 농도의 sulfo-NHS를 혼합시켜 제조한 버퍼로 활성화시킨 후, 희석시켜둔 리간드를 AR2G biosensor에 300초 동안 로딩해서 고정시켰다.
- [0175] 한편, Ni-NTA biosensor에 붙일 리간드(IL-2Rβ-His Tag, Acro, Cat: CD2-H5221)를 1X Ni-NTA kinetic buffer에 5 µg/mL 농도가 되도록 희석하였다. 희석시킨 리간드를 Ni-NTA biosensor에 600초 동안 로딩해서 고정시켰다.
- [0176] 그 후, 리간드에 붙을 다양한 농도의 GI101, GI101w 또는 Proleukin(Novartis, hIL-2)를 300초 동안 로딩한 후, 결합을 측정하고, 해리도 300초 동안 측정하였다. 결합 동역학 분석은 Pall사에서 제공하는 Octet Data analysis HT software ver. 10을 사용하여 하였다. 그 결과를 도 24 내지 도 26에 나타내었다.
- [0177] 그 결과, GI101이 GI101w 및 Proleukin에 비해 IL-2 수용체의 IL-2Rα에 대한 결합력은 낮고, IL-2Rβ에 대한

결합력이 높은 것을 확인하였다.

[0178] 실험예 8. 융합단백질과 리간드의 결합 친화성 측정

[0179] 융합단백질과 리간드의 결합 친화성을 확인하기 위해, Octet RED 384를 이용하여 결합 친화성을 측정하였다.

[0180] 실험예 8.1. IL2 alpha receptor와 GI101-M45, GI101-M61 및 GI101-M72의 결합 친화성 확인

[0181] AR2G biosensor(Amine Reactive 2nd gen, ForteBio, Cat: 18-5092)를 microplate 96well(GreinerBio-one, Cat:655209)에 증류수(DW)를 200 μ l씩 담고 미리 수화시켰다. Biosensor에 붙일 리간드(Ligand)(Human IL-2 R alpha protein, His Tag, Acro, ILA-H52H9)를 10 mM 아세트이트 pH 5 버퍼(AR2G reagent Kit, ForteBio, Cat: 18-5095)에 5 μ g/ml의 농도로 희석하였다. 리간드에 붙을 Analyte(GI101-M45, GI101-M61, GI101-M72)를 각각 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62.5 nM로 1X AR2G kinetic buffer(AR2G reagent Kit, ForteBio, Cat: 18-5095)에 희석하였다. Activation buffer는 DW에 20 mM EDC, 10 mM s-NHS(AR2G reagent Kit, ForteBio, Cat: 18-5095)의 농도로 제작하였다. Microplate 384 well(GreinerBio-one, Cat:781209)에 각 시약을 80 μ l씩 넣고 프로그램을 세팅하였다.

[0182] 그 결과, IL-2 alpha receptor와 GI101-M45간의 결합 친화성은 도 27에 나타낸 바와 같다. 또한, IL-2 alpha receptor와 GI101-M61간의 결합 친화성은 도 28에, IL-2 alpha receptor와 GI101-M72 간의 결합 친화성은 도 29에 나타낸 바와 같다.

[0183] 실험예 8.2. IL-2R β 에 대한 GI102-M45, GI102-M61 및 GI102-M72의 결합 친화성 확인

[0184] Ni-NTA Biosensors를 microplate-96-well에 1X Ni-NTA kinetic buffer(10X Kinetics buffer, ForteBio, 18-1042)를 200 μ l씩 담고 미리 수화시켰다. Biosensor에 붙일 리간드(Human IL-2 R beta protein, His-Tag, Acro, CD2-H5221)를 1X Ni-NTA kinetic buffer에 2 μ g/ml 농도가 되도록 희석하였다. 리간드에 붙을 GI102-M45, GI102-M61 또는 GI102-M72를 500 nM, 250 nM, 125 nM 또는 62.5 nM 농도가 되도록 1X Ni-NTA kinetic buffer에 희석시켰다. Microplate-384-well에 각 시약을 80 μ l씩 넣고 프로그램을 세팅하였다.

[0185] 그 결과, IL-2R β 와 GI102-M45 간의 결합 친화성은 도 30에 나타난 바와 같이 측정되었으며, IL-2R β 와 GI102-M61 간의 결합 친화성은 도 31에 나타난 바와 같이 측정되었다. 또한, IL-2R β 와 GI102-M72 간의 결합 친화성은 도 32에 나타난 바와 같이 측정되었다.

[0186] III. 융합단백질의 면역 활성 확인

[0187] 실험예 9. 융합단백질에 의한 IFN- γ 생산량 확인

[0188] 실험예 9.1. CFSE-labeled PBMC의 배양

[0189] 인간에게서 분리한 PBMC(Peripheral blood mononuclear cells)를 1 μ M 농도의 CellTrace CFSE 염료와 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응을 시켜 CFSE(carboxylfluorescein succinimidyl ester)로 라벨링 시켰다. 세포에 결합하지 않은 CFSE는 염색 반응 용액의 5배 되는 배양 배지와 5분간 반응시킨 후, 1,300 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 제거하였다. CFSE가 라벨링된 PBMC는 배양 배지(RPMI1640 media containing 10% FBS, 10 mM HEPES, 100 U/ml penicillin/streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, 55 μ M 2-mercaptoethanol, 1 mM Non-essential amino acid 및 2 mM L-glutamine)에 재현탁 시킨 후, 96-웰-플레이트에 각 웰 당 1×10^5 세포수 만큼 넣고, 5 μ g/ml의 PHA(Lactin from Phaseolus Vulgaris, red kidney bean, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, cat No. L1668-5MG)와 GI101, GI101C1, GI101C2 또는 IL-2(Aldeusleukin; human recombinant IL-2, Novartis)를 처리하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 6일 동안 배양하였다.

[0190] 이때, GI101, GI101C1, GI101C2 및 IL-2는 1 nM, 10 nM 또는 100 nM 농도로 처리하였다. 세포는 FACS로 분석하였고, ELISA kit(Biolegend, San Diego, CA, USA, cat No.430103)를 이용하여 배양배지에 존재하는 인간 IFN- γ 를 측정하였다.

[0191] 실험예 9.2. FACS 분석

[0192] 상층액이 제거된 세포 펠렛을 FACS 버퍼(3% FBS, 10 mM EDTA, 1M HEPES, 100 unit/mL Penicillin Streptomycin, 10 μ g/ml, 1 mM sodium pyruvate)로 씻어준 뒤, Fc blocker(Biolegend, cat NO. 422302)와 4 $^{\circ}$ C에서 5 분간 반응시켰다. 그 후, APC anti-CD3 Ab(Biolegend, cat NO. 300412)와 PE anti-CD8a Ab(Biolegend,

cat NO. 300908)를 처리하고 4℃에서 20 분간 반응시킨 후 FACS buffer로 세척하였다. 세포 펠렛은 FACS 버퍼에 재현탁 시킨 후, BD LSR Fortessa(BD biosciences, San Diego, CA, USA)와 FlowJo Software을 사용하여 분석하였다.

[0193] 실험예 9.3. Human IFN- γ ELISA

[0194] 세포를 배양했던 각 샘플들의 상층액에 분비된 인간 IFN- γ 의 양은 인간 IFN- γ ELISA kit(Biolegend, cat No.430103)를 사용하여 측정하였다. 간단히 설명하면, 항-인간-IFN- γ 항체를 ELISA 플레이트에 넣고, 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켜 코팅시켰다. 그 후, 1% BSA가 첨가된 PBS 용액으로 상온에서 1시간 동안 블로킹시켰다. 워싱버퍼(0.05% Tween-20 in PBS)로 세척한 후, 표준 용액 및 각각의 샘플들을 적절히 희석하여 넣은 후 실온에서 2시간 반응시켰다.

[0195] 반응이 끝난 후, 플레이트를 세척하여 2차 항체(detection antibody)를 넣고 상온에서 1시간 반응시켰다. 워싱버퍼로 세척한 후, Avidin-HRP 용액을 넣고 실온에서 30분간 반응시키고, 기질용액을 넣어 상온인 어두운 곳에서 20분간 발색반응을 유도시켰다. 마지막으로 H_2SO_4 을 넣어 발색반응을 중지시켜 Epoch Microplate Spectrophotometer(BioTek instruments, Winooski, VT, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 농도계산을 하였다.

[0196] 그 결과, GI101로 처리한 세포가 GI101C1, GI101C2 또는 IL-2를 처리한 세포보다 IFN- γ 분비량이 현저하게 증가한 것을 확인하였다(도 33 및 도 34).

[0197] 실험예 10. GI101이 CD8+ T 세포의 증식에 미치는 영향 확인

[0198] 인간에서 분리한 PBMC(Peripheral blood mononuclear cells)를 1 uM 농도의 CellTrace CFSE 염료와 37℃에서 20 분간 반응을 시켜 CFSE로 라벨링시켰다. 세포에 결합하지 않은 CFSE는 염색반응 용액의 5배되는 배양 배지와 5 분간 반응시킨 후, 1,300 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 제거하였다. CFSE가 라벨링된 PBMC는 배양배지(RPMI1640 media containing 10% FBS, 10 mM HEPES, 100 U/ml penicillin/streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, 55 μ M 2-mercaptoethanol, 1 mM Non-essential amino acid & 2 mM L-glutamine)에 재현탁 시킨 후, 96-웰-플레이트에 각 웰 당 1×10^5 세포수 만큼 넣었다.

[0199] 그 후, 1 μ g/ml의 항-CD3 ϵ 항체(Biolegend cat No. L1668-5MG) 및 GI101, GI101C1, GI101C2 또는 Proleukin(Novartis)을 처리하여, 37℃, 5% CO_2 배양기에서 6일동안 배양하였다. 이때, GI101, GI101C1, GI101C2 및 IL-2는 100 nM 농도로 세포에 처리하였다. 배양된 세포들은 APC-TCR $\alpha\beta$ 항체와 PE-CD8 α 항체를 사용한 FACS 분석방법으로 CD8+ T 세포들 중 CFSE로 라벨링 되지 않은 세포들의 비율 정도를 측정함으로써 이 세포들의 증식 정도를 조사하였다.

[0200] 그 결과, GI101이 in vitro에서 야생형 IL-2인 Proleukin에 유사한 정도의 CD8+ T 세포의 증식을 활성화시키는 것을 확인하였다(도 35 및 도 36).

[0201] 실험예 11. GI101 및 GI102가 CD8+ T 세포의 증식에 미치는 영향 확인

[0202] 인간 PBMC를 Allcells(Lot#3014928, USA)에서 구입하였다. 1 M 농도의 CellTrace CFSE 염료를 이용하였으며, 이를 인간 PBMC와 상온에서 20분간 빛을 차단한 조건에서 반응시켰다. 1 uM 농도의 CellTrace CFSE 염료와 37℃에서 20 분간 반응을 시켜 CFSE로 라벨링시켰다. 세포에 결합하지 않은 CFSE는 염색반응 용액의 5배되는 배양 배지와 5 분간 반응시킨 후, 1,300 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 제거하였다. CFSE가 라벨링된 PBMC는 배양배지(RPMI1640 media containing 10% FBS, 10 mM HEPES, 100 U/ml penicillin/streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, 55 μ M 2-mercaptoethanol, 1 mM Non-essential amino acid 및 2 mM L-glutamine)에 재현탁 시킨 후, 96-웰-플레이트에 각 웰 당 1×10^5 세포수 만큼 넣었다.

[0203] 그 후, 1 μ g/ml의 항-CD3 ϵ 항체(OKT3, eBioscience, USA) 및 GI101, GI101C1, GI101C2 또는 Proleukin(Novartis)을 CFSE가 라벨링된 PBMC에 처리하여, 37℃, 5% CO_2 배양기에서 7일 동안 배양하였다. 이때, GI101, GI101C1, GI101C2 및 IL-2는 10 μ M 농도로 세포에 처리하였다.

[0204] 배양된 세포들은 항-인간 CD4-PE 항체(BioLegend, U.S.A.), 항-인간 CD8-PE/Cy7 항체(BioLegend, USA), 항-인간 FoxP3-APC 항체(BioLegend, U.S.A.)를 사용하여 FACS 분석방법으로 CD8+ T 세포들 중 CFSE로 라벨링 되지 않은 세포들의 비율 정도를 측정함으로써 이 세포들의 증식 정도를 조사하였다.

- [0205] 그 결과, GI101, GI102_M61, GI101C2, Proleukin 처리한 군은 대조군(No stimulus), 항-CD3 항체 단독, GI101C1 처리군에 비해 CD8+ T 세포의 비율을 유의미하게 증가하였다. 또한, 음성대조군(No stimulation)과 항-CD3 항체 단독 처리에 비해 GI101, GI101C2, Proleukin은 CD4+/FoxP3+ Treg 세포의 증식을 유의미하게 증가시키나, GI102와 GI101C1은 CD4+/FoxP3+ Treg 세포의 증식을 유의미하게 증가시키지 않았다(도 37).
- [0206] **실험예 12. GI101 또는 GI101w가 CD8+ T 세포 및 NK 세포의 증식에 미치는 영향 확인**
- [0207] 오리엔트 바이오(Orient Bio, Busan)에서 구입한 7주령 C57BL/6 마우스를 3 마리씩 3 그룹으로 나누어 PBS, GI101 또는 GI101w를 복강 내로 주사를 하였다. 이 때, GI101와 GI101w는 각각 PBS 200 μ l에 40.5 μ g이 되도록 제조하여 복강 내로 주사를 하였다. 주사 5일 후, 각 그룹의 마우스에서 비장을 적출하여 세포를 분리하여 혈구 계수기(hematocytometer)를 사용하여 총 세포의 수를 측정하였다. 비장세포는 APC-CD3 ϵ 항체(Biolegend; 145-2C11), PE-NK1.1 항체(Biolegend; PK136) 및 Pacific blue-CD8 α 항체(BD; 53-6.7)로 염색한 FACS 분석방법으로 비장세포 중 CD8+ T 세포와 NK 세포의 비율을 조사하였다. 그래서, 비장에 존재하는 CD8+ T 세포와 NK 세포의 수를 계산하였다.
- [0208] 그 결과, GI101이 GI101w보다 생체 내에서 CD8+ T 세포와 NK 세포를 증식을 활성화 시키는 것을 확인하였다(도 38 및 도 39).
- [0209] **실험예 13. GI101이 T 세포의 기능에 미치는 영향 확인**
- [0210] CTLA-4 blockade bioassay kit(Promega cat No. JA4005)를 사용하여 실험을 진행하였으며, 실험을 간단히 설명하면 아래와 같다. 액체질소에서 보관 중인 CTLA-4 Effector 세포를 37 $^{\circ}$ C 항온수조에서 3분 동안 녹여, 0.8 ml의 CTLA-4 Effector 세포를 예열된 3.2 ml assay buffer(90% RPMI+10% FBS)와 잘 섞어준 후, 96-well white cell culture plate(SPL, cat No. 30196)의 각 웰 당 25 μ l씩 넣었다. 그리고, 다양한 농도의 GI101을 25 μ l 넣었다. 음성 대조군의 경우는 assay buffer를 25 μ l 넣었다. 그리고, aAPC/Raji cell을 준비하기 전까지 White plat cell culture plate를 커버를 씌운 뒤 상온에 두었다.
- [0211] 액체질소에서 보관 중인 aAPC/Raji 세포를 37 $^{\circ}$ C 항온수조에서 3분 동안 녹여 0.8 ml의 aAPC/Raji 세포를 예열된 3.2 ml assay buffer와 잘 섞어준 다음 플레이트에 각 웰 당 25 μ l씩 넣고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 배양기에서 16시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 상온에서 15분 동안 놔둔 다음 거품이 생기지 않게 주의하여 Bio-Glo reagent를 넣었다. 가장 자리 바깥 웰 중 3 군데에도 Bio-Glo reagent를 넣어 블랭크로 사용하여 백그라운드 신호(background signal)를 보정하였다. 10분간 상온에서 반응시킨 후, Cytation 3(BioTek instruments, Winooski, VT, USA)로 luminescence를 측정하였다. 최종적인 데이터 분석은 RLU(GI101-background)/ RLU(No treatment-background)로 계산하였다.
- [0212] 그 결과, GI101은 effector T 세포에 발현하는 CTLA-4와 결합하여 T 세포의 기능을 억제시키지 않고 오히려 활성화시키는 것을 확인하였다(도 40 및 도 41).
- [0213] **실험예 14. mGI101 및 mGI102가 면역세포에 미치는 영향 확인**
- [0214] 오리엔트(한국)에서 구입한 7주령 C57BL/6 마우스를 3 마리씩 3 그룹으로 나누어 PBS, 3 mg/kg, 6 mg/kg, 12 mg/kg의 GI101 또는 3 mg/kg, 6 mg/kg, 12 mg/kg의 mGI102(mGI102-M61)를 정맥 내로 투여하였다. 주사 1일, 3일, 5일, 7일 및 14일째에 각 그룹의 마우스에서 비장조직을 적출하였다. 그 후, 비장조직을 각각의 항체를 이용하여 FACS 분석방법으로 effector CD8+ T 세포, NK 세포, Treg 세포의 수를 계산하고, Treg 세포에 대한 effector CD8+ T 세포와 NK 세포의 비율을 각각 계산하였다. 각각의 세포분석에 사용한 항체의 정보는 아래와 같다:
- [0215] Effector CD8+ T cell: PB anti-mouse CD3 ϵ antibody (Biolegend, # 155612; KT3.1.1), FITC anti-mouse CD8 α antibody (BD, # 553031, 53-6.7), PE/Cy7 anti-mouse CD44 antibody (Biolegend, # 103030; IM7), APC anti-mouse CD122 antibody (Biolegend, # 123214; TM- β 1)
- [0216] NK cell: PB anti-mouse CD3 ϵ antibody (Biolegend, # 155612; KT3.1.1), PE anti-mouse NK-1.1 (Biolegend, # 108708; PK136)
- [0217] Treg cell: FITC anti-mouse CD3 antibody (Biolegend, # 100204; 17A2), PB anti-mouse CD4 antibody (Biolegend, # 100531; RM4-5), PE anti-mouse CD25 antibody (Biolegend, # 102008; PC61), APC anti-mouse Foxp3 antibody (Invitrogen, # FJK-16s, 17-5773-82).

- [0218] 그 결과, mGI101 또는 mGI102(mGI102-M61)를 투여한 군에서 CD8+ T 세포와 NK세포가 투여 3일 후부터 14일까지의 시점에서 PBS 투여군과 비교하여 유의하게 증가되었다. 또한, mGI102를 투여한 군에서 활성화된 CD8+ T 세포/Treg 세포 및 NK 세포/Treg 세포의 비율이 투여 3일 후부터 7일까지의 시점에서 PBS 투여군과 비교하여 유의하게 증가되었음을 확인하였다(도 42).
- [0219] **IV. 융합단백질의 항암효과 확인**
- [0220] **실험예 15. GI101이 PD-L1이 과발현된 암세포에 미치는 영향 확인**
- [0221] PD-L1이 과발현된 NC1-H292 암세포주를 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Mitomycin C(Sigma)를 포함하는 배양배지에서 3시간 동안 배양한 후, Mitomycin C를 배양배지로 세척하여 제거하였다. 그 후, 5×10^4 세포수의 Mitomycin C를 처리한 NC1-H292 암세포주를 1×10^5 세포수의 인간 PBMC와 96-웰-플레이트에 배양하였다. 이때, T 세포의 활성을 위해 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 PHA(Sigma)를 처리하였다. 또한, 50 nM 농도의 GI101과 GI101을 50 nM 농도의 IgG1-Fc(Biolegend) 또는 abatacept(=Orencia; Bristol-Myers Squibb)에 4°C에서 30분 동안 반응시킨 후, NC1-H292 암세포에 처리하였다. 3일 후에 세포 배양액의 상층액을 회수하여 ELISA kit(Biolegend)을 사용하여 IFN- γ 의 양을 정량하였다.
- [0222] 양성대조군으로는 Mitomycin C를 처리한 NC1-H292 암세포주가 없는 상태에서 PHA로 자극시킨 인간 PBMC를 사용하였고, 음성대조군으로는 Mitomycin C 처리한 NC1-H292 암세포주가 존재하는 상태에서 PHA로 자극시킨 인간 PBMC를 사용하였다. IFN- γ ELISA kit를 이용한 실험 방법은 실험예 9.3과 동일한 방법으로 진행하였다.
- [0223] 그 결과, GI101은 PD-L1이 과발현된 암세포주에 의해 억제된 면역반응을 효과적으로 활성화 시켰다. 또한, GI101은 effector T 세포에 발현하는 CTLA-4의 신호전달을 억제 시키는 것을 확인하였다(도 43 및 도 44).
- [0224] **실험예 16. 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서의 GI101의 항암효과 확인**
- [0225] 5×10^6 세포수/0.05 ml의 마우스 유래 CT-26 암세포주를 0.05 ml Matrigel matrix phenol red-free(BD)와 혼합하여 6주령의 암컷 BALB/c 마우스(오리엔트)의 우측 등 부위의 피하에 0.1 ml씩 투여하여 이식하였다. 암세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 종양의 부피를 측정하여 약 80 mm³ 내지 120 mm³에 도달한 개체들을 분리한 후, 0.1 ml의 GI101을 정맥투여 하였다. 첫 투여 이후 3일에 한 번씩 총 3번 투여를 진행하고, 음성대조군으로는 PBS를 투여하였다. 항암효과를 확인하기 위해 매일 종양의 크기를 측정하였다.
- [0226] 그 결과, GI101을 처리한 CT-26 암세포주 식립 마우스의 종양의 크기가 음성대조군에 비해 현저하게 감소한 것을 확인하였다(도 45 및 도 46).
- [0227] **실험예 17. 마우스 유래 흑색종 식립 마우스에서의 mGI101의 항암효과 확인**
- [0228] 오리엔트 바이오에서 분양 받은 C57BL/6 마우스(암컷, 7주)를 7일의 적응기간을 거친 후에 5×10^6 세포수의 B16F10 암세포주(ATCC, USA)를 0.05 ml Matrigel matrix phenol red-free(BD)와 혼합하여 마우스의 우측 등 부위의 피하에 0.1 ml씩 투여하여 동종이식하였다. 암세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 종양의 부피를 측정하여 약 50 mm³ 내지 120 mm³에 도달한 개체들을 선별한 후, 선별한 마우스의 종양의 크기 및 체중을 기초로 하여 균등하도록 각 군당 10마리씩 분류하였다.
- [0229] 그 후, 일회용 주사기(31G, 1 ml)를 이용하여 음성대조군에는 4 mg/kg 용량으로 hIgG4를 투여하였으며, 양성대조군으로는 5 mg/kg 용량의 항-PD-1 항체를 정맥투여하였다. 실험군으로는 1 mg/kg 또는 4 mg/kg 용량의 mGI101을 정맥투여 하였다. 추가적으로, 4 mg/kg 용량의 mGI101 및 5 mg/kg 용량의 항-PD-1 항체를 정맥투여한 군도 실험군으로 설정하였다. 첫 투여 이후 3일에 한 번씩 총 3번 투여를 진행하였다. 매일 종양의 크기를 측정하였다.
- [0230] 그 결과, 모든 군은 초기 종양의 부피가 90 mm³이었으며, 각 군의 S.E.(standard error)는 5 mm³ 내지 6 mm³이었다. 음성대조군은 투여 후 15일까지 종양부피의 변동이 90 mm³에서 1,434 mm³까지 실험기간 동안 증가함이 관찰되었다.
- [0231] 1 mg/kg 용량의 mGI101 투여군은 음성대조군과 동일한 기간 동안 90 mm³에서 885 mm³까지 실험기간 동안 증가함이 관찰되었으며, 일부 측정시점에서 통계학적으로 유의하게 억제되었음이 관찰되었다(p-value: 0.5: day 11,

p-value<0.01: day 7, p-value<0.001: day 3). 4 mg/kg 용량의 mGI101 투여군은 음성대조군과 동일한 기간동안 90 mm³에서 748 mm³까지 실험기간 동안 증가함이 관찰되었으며, 일부 측정시점 및 실험종료일에 통계학적으로 유의하게 억제되었음이 관찰되었다(p-value: 0.5: day 9, p-value<0.01: day 7 및 11).

[0232] 또한, 4 mg/kg 용량의 mIgG 투여군을 기준으로 하여 각 군과 비교하여 종양성장억제율을 분석하였다. 1 mg/kg 용량의 mGI101 투여군은 음성대조군과 비교하여, 36.5%의 성장억제율이 관찰되었으며, 통계학적인 유의한 차이 (p-value: 0.5)는 확인되지 않았다. 4 mg/kg 용량의 mGI101 투여군은 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의 (p-value: 0.5)한 종양성장억제율이 관찰되었다. 첫 투여 이후 3일에 한 번씩 총 2번 투여를 진행하였다. 매일 종양의 크기를 측정하였다.

[0233] 이를 통해, C57BL/6 마우스에 동종이식한 흑색종인 B16F10의 종양성장 억제 효능시험에서 mGI101이 용량 의존적으로 종양의 성장 억제하는 효과가 있는 것을 확인하였다(도 47 및 도 48).

[0234] **실험예 18. 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서의 mGI101의 항암효과 확인**

[0235] 오리엔트 바이오에서 분양 받은 BALB/c 마우스(암컷, 7주)를 7일의 적응기간을 거친 후에 5x10⁶ 세포수의 CT-26 암세포주(ATCC, USA)를 0.05 ml Matrigel matrix phenol red-free(BD)와 혼합하여 마우스의 우측 등 부위의 피하에 0.1 ml씩 투여하여 동종이식하였다. 암세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 종양의 부피를 측정하여 약 28 mm³에 도달한 개체들을 선별한 후, 선별한 마우스의 종양의 크기 및 체중을 기초로 하여 균등하도록 각 군당 10 마리씩 분류하였다. 그 후, 일회용 주사기(31G, 1 ml)를 이용하여 음성대조군에는 6 mg/kg 용량으로 hIgG4를 투여하였다. 실험군으로는 3 mg/kg, 6 mg/kg 또는 12 mg/kg 용량의 mGI101을 정맥투여 하였다. 첫 투여 이후 3일에 한 번씩 총 3번 투여를 진행하였다. 매일 종양의 크기를 측정하였다.

[0236] 그 결과, 6 mg/kg 및 12 mg/kg 용량의 mGI101을 투여한 실험군에서 일부 측정시점 및 시험종료시점에서 음성대조군과 비교하여 유의하게 억제되었음을 확인하였다(도 49). 또한, 생존율을 측정한 결과, 6 mg/kg 용량의 mGI101을 투여한 실험군에서 일부 측정시점 및 시험종료시점에서 음성대조군과 비교하여 유의하게 개선되었음을 확인하였다(도 50).

[0237] **실험예 19. 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서의 GI101의 항암효과 확인**

[0238] **실험예 19.1. 종양 억제 효과 확인**

[0239] 오리엔트 바이오에서 분양 받은 BALB/c 마우스(암컷, 7주)를 7일의 적응기간을 거친 후에 5x10⁶ 세포수의 CT-26 암세포주(ATCC, USA)를 0.1 ml PBS에 부유하여 마우스의 우측 등 부위의 피하에 투여하여 동종이식하였다. 암세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 종양의 부피를 측정하여 약 50 mm³ 내지 200 mm³에 도달한 개체들을 선별한 후, 선별한 마우스의 종양의 크기 및 체중을 기초로 하여 균등하도록 각 군당 10마리씩 분류하였다. 그 후, 일회용 주사기(31G, 1 ml)를 이용하여 음성대조군에는 약물을 투여하지 않았으며, 양성대조군으로는 5 mg/kg 용량의 항-PD-1 항체 또는 5 mg/kg 용량의 항-PD-1 항체와 5mg/kg 용량의 항-CTLA-4 항체를 정맥투여하였다. 실험군으로는 0.1 mg/kg 또는 1 mg/kg 용량의 GI101을 정맥투여 하였다. 첫 투여 이후 3일에 한 번씩 총 3번 투여를 진행하였다. 매일 종양의 크기를 측정하였다.

[0240] 그 결과, CT-26 암세포주 식립 마우스에서 음성대조군에 비해 항-PD-1 항체, 항-PD-1 항체와 항-CTLA-4 항체, 0.1 mg/kg 또는 1 mg/kg 용량의 GI101을 투여한 군 모두 유의미하게 종양의 성장을 억제했다. 특히, 항-PD-1 항체 처리군에 비해 0.1 mg/kg GI101을 투여한 실험군에서 유의미한 종양 억제 효과를 나타냈다(* p < 0.05)(도 51).

[0241] **실험예 19.2. 암 조직 내 면역세포 분석**

[0242] 상기 실험예 19.1의 각 군의 마우스를 종양의 부피가 평균적으로 200 mm³에 도달하였을 때에 희생시켜, 암 조직을 채취하였다. 그 후, 암 조직 내 면역세포를 분석하기 위해 암조직을 단일 세포 수준으로 분리 후, 다음의 항체를 사용하여 암 조직 내 면역세포에 대한 FACS 분석을 수행하였다. 항체는 구체적으로, Anti-mouse-CD3 (Biolegend, Cat. No. 100320), Anti-mouse-CD4 (Biolegend, Cat. No. 100526), Anti-mouse-CD8 (Biolegend, Cat. No. 100750), Anti-mouse-FoxP3 (eBioscience, Cat. No. 12-5773-82), Anti-mouse-CD25 (Biolegend, Cat. No. 102049), Anti-mouse-CD44 (eBioscience, Cat. No. 61-0441-82), Anti-mouse-PD-1 (Biolegend, Cat. No. 135218), Anti-mouse-IFN-gamma (Biolegend, Cat. No. 505832), Anti-mouse-CD49b (Biolegend, Cat. No.

108906), Anti-mouse-H2 (Invitrogen, Cat. No. A15443), Anti-mouse-CD11c (Biolegend, Cat. No. 117343), Anti-mouse-CD80 (eBioscience, Cat. No. 47-4801-82), Anti-mouse-CD86 (Biolegend, Cat. No. 104729), Anti-mouse-F4/80 (eBioscience, Cat. No. 47-4801-82), 및 Anti-mouse-CD206 (eBioscience, Cat. No. 17-2061-80)을 사용하였다.

[0243] 그 결과, 0.1 mg/kg의 GI101을 투여한 실험군에서 5 mg/kg 용량의 항-PD-1 항체를 단독투여한 양성대조군에 비해 CD8+ T 세포가 유의미하게 증가했다(* p < 0.05, 도 52 및 도 53). 나아가, GI101을 투여한 실험군 모두에서 T 세포에서의 IFN- γ 의 발현이 음성대조군에 비해 유의미하게 증가했다(* p < 0.05, 도 52 및 도 53). 또한, 0.1 mg/kg의 GI101을 투여한 실험군에서 M1 대식세포가 음성대조군과 항-PD-1 항체를 단독투여한 양성대조군에 비해 증가했다(도 54 및 도 55). 또한, GI101을 투여한 실험군 모두에서 대식세포와 수지상세포의 CD86 발현이 증가했다(*p < 0.05, 도 54 내지 도 57).

[0244] **실험예 20. 마우스 유래 폐암세포 식립 마우스에서의 GI101의 항암효과 확인**

[0245] **실험예 20.1. 종양 억제 효과 확인**

[0246] 오리엔트 바이오에서 분양 받은 C57BL/6 마우스(암컷, 7주)를 7일의 적응기간을 거친 후에 5×10^6 세포수의 LLC2 암세포주(ATCC, USA)를 0.1 ml PBS에 부유하여 마우스의 우측 등 부위의 피하에 투여하여 동종이식하였다. 암세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 종양의 부피를 측정하여 약 50 mm^3 내지 200 mm^3 에 도달한 개체들을 선별한 후, 선별한 마우스의 종양의 크기 및 체중을 기초로 하여 균등하도록 각 군당 10마리씩 분류하였다. 그 후, 일회용 주사기(31G, 1 ml)를 이용하여 음성대조군에는 약물을 투여하지 않았으며, 양성대조군으로는 5 mg/kg 용량의 항-PD-1 항체 또는 5 mg/kg 용량의 항-PD-1 항체와 5 mg/kg 용량의 항-CTLA-4 항체를 정맥투여하였다. 실험군으로는 0.1 mg/kg 또는 1 mg/kg 용량의 GI101을 정맥투여 하였다. 첫 투여 이후 3일에 한 번씩 총 3번 투여를 진행하였다. 매일 종양의 크기를 측정하였다.

[0247] 그 결과, 음성대조군에 비해 실험군 모두에서 유의미한 종양 억제 효과가 나타났다(*p < 0.05)(도 58).

[0248] **실험예 20.2. 암 조직 내 면역세포 분석**

[0249] 상기 실험예 20.1의 각 군의 마우스를 종양의 부피가 평균적으로 200 mm^3 에 도달하였을 때 희생시켜, 암 조직을 채취하였다. 그 후, 암 조직 내 면역세포를 분석하기 위해 실험예 19.2와 동일한 방법으로 FACS 분석을 수행하였다.

[0250] 그 결과, 0.1 mg/kg의 GI101을 투여한 실험군에서 항-PD-1 항체를 단독투여한 양성대조군에 비해 CD8+ T 세포가 유의미하게 증가했다(* p < 0.05, 도 59). 나아가, GI101을 투여한 실험군 모두에서 IFN- γ 의 발현이 음성대조군에 비해 유의미하게 증가했다(* p < 0.05, 도 59). 또한, GI101을 투여한 실험군 모두에서 대식세포와 수지상세포의 CD86 발현이 증가했다(*p < 0.05, 도 59 내지 도 61).

[0251] **실험예 21. 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서의 mGI102-M61의 항암효과 확인**

[0252] 오리엔트 바이오에서 분양 받은 BALB/c 마우스(암컷, 7주)를 7일의 적응기간을 거친 후에 5×10^6 세포수의 CT-26 암세포주(ATCC, USA)를 0.05 ml Matrigel matrix phenol red-free(BD)와 혼합하여 마우스의 우측 등 부위의 피하에 0.1 ml씩 투여하여 동종이식하였다. 암세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 종양의 부피를 측정하여 약 28 mm^3 에 도달한 개체들을 선별한 후, 선별한 마우스의 종양의 크기 및 체중을 기초로 하여 균등하도록 각 군당 10마리씩 분류하였다. 그 후, 일회용 주사기(31G, 1 ml)를 이용하여 음성대조군에는 6 mg/kg 용량으로 hIgG4를 투여하였다. 실험군으로는 3 mg/kg, 6 mg/kg 또는 12 mg/kg 용량의 mGI102-M61을 정맥투여 하였다. 첫 투여 이후 3일에 한 번씩 총 3번 투여를 진행하였다. 매일 종양의 크기를 측정하였다.

[0253] 그 결과, 12 mg/kg 용량의 mGI102-M61을 투여한 실험군에서 일부 측정시점 및 시험종료시점에서 음성대조군과 비교하여 유의하게 억제되었음을 확인하였다(도 62). 또한, 생존율을 측정한 결과, 12 mg/kg 용량의 mGI102-M61을 투여한 실험군에서 일부 측정시점 및 시험종료시점에서 음성대조군과 비교하여 유의하게 개선되었음을 확인하였다(도 63).

[0254] **실험예 22. 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서의 mGI101의 항암효과 확인**

[0255] 오리엔트 바이오에서 분양 받은 BALB/c 마우스(암컷, 7주)를 7일의 적응기간을 거친 후에 5×10^6 세포수의 CT-26

암세포주(ATCC, USA)를 0.05 ml Matrigel matrix phenol red-free(BD)와 혼합하여 마우스의 우측 등 부위의 피하에 0.1 ml씩 투여하여 동종이식하였다. 암세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 종양의 부피를 측정하여 약 200 mm³ 내지 250 mm³에 도달한 개체들을 선별한 후, 선별한 마우스의 종양의 크기 및 체중을 기초로 하여 균등하도록 각 군당 10마리씩 분류하였다.

[0256] 그 후, 일회용 주사기(31G, 1 ml)를 이용하여 음성대조군에는 4 mg/kg 용량으로 hIgG4를 투여하였다. 실험군으로는 1 mg/kg, 4 mg/kg 또는 6 mg/kg 용량의 mGI101를 정맥투여 하였다. 추가적으로, 4.9 mg/kg의 mCD80 또는 2.8 mg/kg의 Fc-IL-2v(GI101C2)를 투여한 군도 대조군으로 설정하였다. 뿐만 아니라, 4.9 mg/kg의 mCD80 및 2.8 mg/kg의 Fc-IL-2v(GI101C2)를 동시에 투여한 군도 대조군으로 설정하였다.

[0257] 종양의 부피측정에서 6 mg/kg 용량의 mGI101 투여군에서 일부 측정시점 및 시험종료시점에서 음성대조군과 비교하여 유의하게 억제되었음을 확인하였다. mCD80 및 Fc-IL-2v(GI101C2)의 병용투여군과 비교하여 종양성장억제율이 병용투여군과 비교하여 우수한 것으로 나타났다(도 64 및 도 65).

[0258] 결론적으로, BALB/c 마우스에 동종이식한 BALB/c 마우스 유래 대장암 세포주인 CT-26의 종양성장 억제 효능시험에서 시험물질인 mGI101은 본 시험 조건하에서 mCD80 및 IL-2v 단일제제에 대해 종양억제 효능이 입증되었고, mCD80과 IL-2v의 병용투여군 대비 우수한 항암효능을 확인되었다(도 64 및 도 65). 특히, 6 mg/kg 용량의 mGI101 투여군에서 음성대조군 및 mCD80 및 Fc-IL2v(GI101C2)의 병용투여군과 비교하여 종양의 크기가 유의하게 억제되었다.

[0259] V. 융합단백질의 독성 평가

[0260] 실험예 23. 원숭이를 이용한 GI101의 독성 평가

[0261] 실험예 23.1. 원숭이 사육 및 약물 투여

[0262] 본 실험에는 2세 내지 3세 연령의 수컷 필리핀 원숭이(Cynomolgus monkey)로 9마리를 이용하였다. 일본의 "Act on Welfare and Management of Animals"와 Ina Research Inc.의 "Guidance for Animal Care and Use"에 따라 수행되었으며, Ina Research Inc.의 IACUC(the Institutional Animal Care and Use Committee)에 의해 실험 프로토콜에 대한 검토 후, AAALAC International(Accredited Unit No. 001107)에 승인되었다.

[0263] 실험은 약물 투여 하루 전부터 약물 투여 후 15일까지 진행하였으며, 케이지 주변에서 각각의 원숭이를 관찰하고, 추가적으로 대변 상태도 확인하였다. 약물 투여 하루 전, 약물 투여 후 1일, 8일 및 15일째에 디지털 체중계(LDS-150H, Shimadzu Corporation)를 이용하여 체중을 측정하였다. 또한, 약물 투여 하루 전부터 원숭이를 희생시키기 전까지 음식의 잔량을 측정하였다.

[0264] 이때, 약물은 GI101을 일회용 주사기(24G)를 충전하여 0.17 ml/초의 속도로 정맥경로로 1회씩 총 2회 투여하였다. 1 회/주 간격으로 2회에 걸쳐 5 mg/kg/day 또는 10 mg/kg/day 용량으로 GI101을 투여하였다. 대조군은 PBS(pH 7.4)를 동일하게 투여하였다.

[0265] 실험예 23.2. 임상관찰, 체중 및 식사량 변화 확인

[0266] 약물 투여 하루 전부터 약물 투여 후 1일, 8일 및 15일째까지 임상관찰 및 체중과 식사량 변화를 측정한 결과, GI101에 의해 유도되는 독성은 나타나지 않았다(도 66 내지 도 69).

[0267] 실험예 23.3. 혈액분석

[0268] 상기 실험예 23.1의 원숭이로부터 약물 투여 하루 전, 약물 투여 후 1일, 8일 및 15일째에 혈액을 채취하였으며, 이때, 혈액은 일회용 주사기(22G)로 대퇴정맥을 통해서 채취하였다. 채취한 혈액은 Automated Hematology System XN-2000(Sysmex Corporation)과 Automated Blood Coagulation Analyzer CA-510(Sysmex Corporation)을 이용하여 하기 표 2에 기재된 항목에 대하여 혈액분석을 진행하였다.

표 2

[0269]

Parameter	Abbr.	Unit	Method	Equipment
Complete blood count				
Red blood cell count	RBC	10 ⁶ / μ L	DC sheath-flow detection	XN-2000
Hemoglobin concentration	HGB	g/dL	SLS-hemoglobin	XN-2000

Hematocrit	HCT	%	RBC pulse height detection	XN-2000
Mean corpuscular volume	MCV	fL	HCT / RBC($\times 10^4 / \mu\text{L}$) $\times$ 1000	XN-2000
Mean corpuscular hemoglobin	MCH	pg	HGB / RBC($\times 10^4 / \mu\text{L}$) $\times$ 1000	XN-2000
Mean corpuscular hemoglobin concentration	MCHC	g/dL	HGB / HCT $\times$ 100	XN-2000
ReticulocytesRatioCount	RET % RET #	% $10^9 / \text{L}$	Flow cytometry	XN-2000
Platelet count	PLT	$10^3 / \mu\text{L}$	Flow cytometry	XN-2000
White blood cell count	WBC	$10^3 / \mu\text{L}$	Flow cytometry	XN-2000
Differential white blood cells ^{a)} RatioCount	Diff WBC % Diff WBC #	% $10^3 / \mu\text{L}$	Flow cytometry	XN-2000
Coagulation tests				
Prothrombin time	PT	s	Light scattering detection	CA-510
Activated partial thromboplastin time	APTT	s	Light scattering detection	CA-510
^{a)} Neutrophils(NEUT), lymphocytes(LYMPH), monocytes(MONO), eosinophils(EO) and basophils(BASO)				

[0270] 그 결과, 15일차에 5 mg/kg/day 또는 10 mg/kg/day 용량의 GI101을 투여한 군에서 망상적혈구(reticulocytes), 백혈구, 림프구 수치가 증가되었다(도 70 내지 도 72).

[0271] 실험예 23.4. 임상화학 분석

[0272] 상기 실험예 23.1의 원숭이로부터 약물 투여 하루 전, 약물 투여 후 1일, 8일 및 15일째에 혈액을 채취하였으며, 이때, 실험예 23.3과 동일한 방법으로 채취하였다. 채취한 혈액은 Clinical Analyzer Model 7180(Hitachi High-Technologies Corporation)을 이용하여 하기 표 3에 기재된 항목에 대하여 임상화학적 분석을 진행하였다.

표 3

[0273]

Parameter	Abbr.	Unit	Method
Aspartate aminotransferase	AST	U/L	JSCC traceable method
Alanine aminotransferase	ALT	U/L	JSCC traceable method
Alkaline phosphatase	ALP	U/L	JSCC traceable method
Lactate dehydrogenase	LD	U/L	JSCC traceable method
Creatine kinase	CK	U/L	JSCC traceable method
Glucose	GLU	mg/dL	Enzymatic(Gluc-DH)
Total bilirubin	BIL	mg/dL	Enzymatic(BOD)
Urea nitrogen	UN	mg/dL	Enzymatic(urease-LEDH)
Creatinine	CRE	mg/dL	Enzymatic
Total cholesterol	CHO	mg/dL	Enzymatic(cholesterol oxidase)
Triglycerides	TG	mg/dL	Enzymatic(GK-GPO with free glycerol elimination)
Phospholipids	PL	mg/dL	Enzymatic(choline oxidase)
Inorganic phosphorus	IP	mg/dL	Enzymatic(maltose phosphorylase)
Calcium	CA	mg/dL	OCPC
Sodium	NA	mEq/L	Ion-selective electrode
Potassium	K	mEq/L	Ion-selective electrode
Chloride	CL	mEq/L	Ion-selective electrode
Total protein	TP	g/dL	Biuret
Albumin	ALB	g/dL	BCG

Albumin-globulin ratio	A/G	-	Calculated
JSCC: Japan Society of Clinical Chemistry			

[0274] 그 결과, 임상화학적 분석에 있어서, GI101에 의해 유도되는 독성은 나타나지 않았다(도 73 내지 도 79).

[0275] **실험예 21.5. 사이토카인 분석**

[0276] 상기 실험예 23.1의 원숭이로부터 약물 투여 하루 전, 약물 투여 후 1일, 8일 및 15일째에 혈액을 채취하였으며, 이때, 실험예 23.3과 동일한 방법으로 채취하였다. 채취한 혈액은 Bio-Plex 200(Bio-Rad Laboratories, Inc.) 기기와 Non-Human Primate Cytokine Magnetic Bead Panel(EMD Millipore) 분석 키트를 사용하여 TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12를 분석하였다. 그 결과, 사이토카인 분석과 관련하여 GI101에 의해 유도되는 독성은 나타나지 않았다(도 80 및 도 81).

[0277] **실험예 23.6. 면역세포 분석**

[0278] 상기 실험예 23.1의 원숭이로부터 약물 투여 하루 전, 약물 투여 후 1일, 8일 및 15일째에 혈액을 채취하였으며, 이때, 실험예 23.3과 동일한 방법으로 채취하였다. 채취한 혈액은 Flow cytometer(LSRFortessa X-20, Becton, Dickinson and Company)를 이용하여 아래의 항목들을 분석하였다:

- [0279] 1) Ki67 + CD4: CD45+/CD3+/CD4+/Ki67+
- [0280] 2) Ki67 + CD8: CD45+/CD3+/CD8+/Ki67+
- [0281] 3) Ki67 + Treg: CD45+/CD3+/FoxP3+/Ki67+
- [0282] 4) Ki67 + ICOS + Treg: CD45+/CD3+/FoxP3+/Ki67+/CD278+
- [0283] 5) ICOS + Treg: CD45+/CD3+/FoxP3+/CD278+
- [0284] 6) Ki67 + NK cell: CD45+/CD16 + 및 CD56+/Ki67+.

[0285] 그 결과, 면역세포 분석에서 GI101를 투여한 군 모두에서 T 세포, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, regulatory T 세포, NK세포와 Ki67+ T 세포, Ki67+ CD4+ T 세포, Ki67+ CD8+ T 세포, Ki67+ regulatory T 세포, Ki67+ ICOS+ regulatory T 세포, Ki67+ NK 세포, ICOS+ regulatory T 세포가 15일차에 증가되었다.

[0286] 구체적으로, 림프구 내에서 T 세포, CD4+ T 세포, regulatory T 세포의 비율이 증가하고, NK세포의 비율이 감소하는 한편, CD8+ T 세포의 비율은 변화하지 않았다. regulatory T 세포의 비율은 3일차에 증가하였고, 8일 및 15일차에는 감소하였으나, 대조군에 대비해서는 여전히 높았다.

[0287] 또한, 각 면역세포에서 Ki67+인 면역세포의 비율은, Ki67+ T 세포, Ki67+ CD4+ T 세포, Ki67+ CD8+ T 세포, Ki67+ regulatory T 세포, Ki67+ ICOS+ regulatory T 세포, Ki67+ NK 세포, ICOS+ regulatory T 세포 비율이 증가하였다.

[0288] 나아가, Ki67+ T 세포, Ki67+ CD8+ T 세포, Ki67+ NK 세포의 비율은 3일, 8일 및 15일차에 증가하였고, Ki67+ CD4+ T, Ki67+ regulatory T 세포는 3일 및 8일차에 증가하였으며, Ki67+ ICOS+ regulatory T 세포, ICOS+ regulatory T 세포는 8일차에만 증가하였다(도 82 내지 도 87).

[0289] **실험예 23.7. 병리학적 분석**

[0290] 16일째에 실험예 23.1의 원숭이들을 희생시켜, 모든 장기와 조직을 10% 포르말린을 이용하여 고정하였다. 단, 고환은 FSA(Formalin-sucrose-acetic acid) 용액을 사용하였으며, 눈과 시신경은 1% Formaldehyde-2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer를 사용하여 고정하였다. 하기 표 4에 기재된 항목의 장기와 조직에 대하여 헤마톡실린/에오신 염색을 수행하여 광학현미경 하에서 관찰하였다.

표 4

[0291]

Organ/tissue	Fixation	Organ weight	Specimen preparation	
			HE-stained	Note

Heart	0	0	-	Left ventricular papillary muscle, right ventricular wall and areas including the coronary artery and aortic valve
Aorta(thoracic)	0	-		
Sternum	0	-		Decalcified
Sternal bone marrow		-		
Femurs	0(R&L)	-		Distal articular cartilage and shaft; decalcified
Femoral bone marrow	0(R)	-		Decalcified
Thymus	0	0	0	
Spleen	0	0	0	
Submandibular lymph nodes	0	-	0	
Mesenteric lymph nodes	0	-	0	
Trachea	0	-		Decalcified
Bronchi	0(R&L)	0(R&L separated)	-	Left anterior and right posterior lobes
Lungs				
Tongue	0	-		
Submandibular glands	0(R&L)	0(R&L combined)		
Parotid glands	0(R&L)	-		
Esophagus	0	-		
Stomach	0	-		Cardia, body and pylorus
Duodenum	0	-		
Jejunum	0	-		
Ileum	0	-		
Peyer's patches				
Cecum	0	-		
Colon	0	-		
Rectum	0	-		
Liver	0	0 (with bile-drained gallbladder)	0	Left lateral lobe and right medial lobe including the gallbladder
Gallbladder			0	
Pancreas	0	0	-	
Kidneys	0(R&L)	0(R&L separated)	0(R&L)	
Urinary bladder	0	-		
Pituitary	0	0		
Thyroids	0(R&L)	0(R&L separated)		
Parathyroids				
Adrenals	0(R&L)	0(R&L separated)		
Testes	0(R&L)	0(R&L separated)		
Epididymides	0(R&L)	0(R&L separated)		
Prostate	0	0		
Seminal vesicles	0	0	-	
Brain	0	0	-	Cerebrum(frontal, parietal(including basal ganglia and hippocampus) and occipital lobes); cerebellum; pons; and medulla oblongata
Spinal cord(thoracic)	0	-		
Sciatic nerve	0(L)	-		
Eyes	0(R&L)	-		
Optic nerves	0(R&L)	-		
Lacrimal glands	0(R&L)	-		

Skeletal muscle(biceps femoris)	0(L)	-		
Skin(thoracic)	0	-		
Injection site(tail vein)	0	-		Decalcified
Skin of the thoracic or medial femoral region with ID No.	0	-	-	
0: conducted -: Not conducted R&L: Both the right and left organs/tissues were conducted. L: Either the right or left organ/tissue(usually the left) was conducted. R: Either the right or left organ/tissue(usually the right) was conducted				

[0292] 그 결과, 5 mg/kg/day 또는 10 mg/kg/day 용량의 GI101을 처리한 군에서 비장의 무게가 증가하였다(도 88). 나머지 조직에서는 유의미한 변화가 관찰되지 않았다. 결론적으로, GI101을 투여한 군에서 약간의 변화들이 관찰되었으나, 독성이 나타나지는 않았다.

[0293] VI. GI102의 항암효과 확인

[0294] 실험예 24. GI102-M45의 항암 효과 확인

[0295] 실험예 24.1. 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서의 GI102-M45의 항암효과 확인

[0296] 5×10^6 세포수/0.05 ml의 마우스 유래 CT-26 암세포주를 0.05 ml Matrigel matrix phenol red-free(BD)와 혼합하여 6주령의 암컷 BALB/c 마우스(오리엔트)의 우측 등 부위의 피하에 0.1 ml씩 투여하여 이식한다. 암세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 종양의 부피를 측정하여 약 80 mm^3 내지 120 mm^3 에 도달한 개체들을 분리한 후, 0.1 ml의 GI102-M45를 정맥투여한다. 첫 투여 이후 3일에 한 번씩 총 3번 투여를 진행하고, 음성대조군으로는 PBS를 투여한다. 항암효과를 확인하기 위해 매일 종양의 크기를 측정한다. 실험예 16과 같은 방법으로 GI102-M45의 활성을 확인한다.

[0297] 실험예 24.2. 마우스 유래 폐암세포 식립 마우스에서의 GI102-M45의 항암효과 확인

[0298] 오리엔트 바이오에서 분양 받은 C57BL/6 마우스(암컷, 7주)를 7일의 적응기간을 거친 후에 5×10^6 세포수의 LLC2 암세포주(ATCC, USA)를 0.1 ml PBS에 부유하여 마우스의 우측 등 부위의 피하에 투여하여 동종이식한다. 암세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 종양의 부피를 측정하여 약 50 mm^3 내지 200 mm^3 에 도달한 개체들을 선별한 후, 선별한 마우스의 종양의 크기 및 체중을 기초로 하여 균등하도록 각 군당 10마리씩 분류한다. 그 후, 일회용 주사기(31G, 1 ml)를 이용하여 음성대조군에는 약물을 투여하지 않으며, 양성대조군으로는 5 mg/kg 용량의 항-PD-1 항체 또는 5 mg/kg 용량의 항-PD-1 항체와 5 mg/kg 용량의 항-CTLA-4 항체를 정맥투여한다. 실험군으로는 0.1 mg/kg 또는 1 mg/kg 용량의 GI102-M45를 정맥투여한다. 첫 투여 이후 3일에 한 번씩 총 3번 투여를 진행한다. 매일 종양의 크기를 측정한다. 실험예 20.1과 같은 방법으로 GI102-M45의 활성을 확인한다.

[0299] 실험예 25. GI102-M61의 항암 효과 확인

[0300] 실험예 25.1. 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서의 GI102-M61의 항암효과 확인

[0301] 5×10^6 세포수/0.05 ml의 마우스 유래 CT-26 암세포주를 0.05 ml Matrigel matrix phenol red-free(BD)와 혼합하여 6주령의 암컷 BALB/c 마우스(오리엔트)의 우측 등 부위의 피하에 0.1 ml씩 투여하여 이식한다. 암세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 종양의 부피를 측정하여 약 80 mm^3 내지 120 mm^3 에 도달한 개체들을 분리한 후, 0.1 ml의 GI102-M61을 정맥투여한다. 첫 투여 이후 3일에 한 번씩 총 3번 투여를 진행하고, 음성대조군으로는 PBS를 투여한다. 항암효과를 확인하기 위해 매일 종양의 크기를 측정한다. 실험예 16과 같은 방법으로 GI102-M61의 활성을 확인한다.

[0302] 실험예 25.2. 마우스 유래 폐암세포 식립 마우스에서의 GI102-M61의 항암효과 확인

[0303] 오리엔트 바이오에서 분양 받은 C57BL/6 마우스(암컷, 7주)를 7일의 적응기간을 거친 후에 5×10^6 세포수의 LLC2 암세포주(ATCC, USA)를 0.1 ml PBS에 부유하여 마우스의 우측 등 부위의 피하에 투여하여 동종이식한다. 암세포

를 이식하고 일정기간 경과 후에 종양의 부피를 측정하여 약 50 mm^3 내지 200 mm^3 에 도달한 개체들을 선별한 후, 선별한 마우스의 종양의 크기 및 체중을 기초로 하여 균등하도록 각 군당 10마리씩 분류한다. 그 후, 일회용 주사기(31G, 1 mL)를 이용하여 음성대조군에는 약물을 투여하지 않으며, 양성대조군으로는 5 mg/kg 용량의 항-PD-1 항체 또는 5 mg/kg 용량의 항-PD-1 항체와 5 mg/kg 용량의 항-CTLA-4 항체를 정맥투여한다. 실험군으로는 0.1 mg/kg 또는 1 mg/kg 용량의 GI102-M61을 정맥투여한다. 첫 투여 이후 3일에 한 번씩 총 3번 투여를 진행한다. 매일 종양의 크기를 측정한다. 실험예 20.1과 같은 방법으로 GI102-M61의 활성을 확인한다.

[0304] 실험예 26. GI102-M72의 항암 효과 확인

[0305] 실험예 26.1. 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서의 GI102-M72의 항암효과 확인

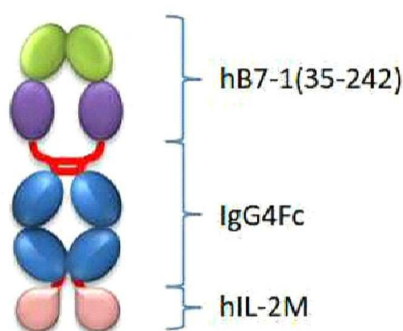
[0306] 5×10^6 세포수/0.05 mL의 마우스 유래 CT-26 암세포주를 0.05 mL Matrigel matrix phenol red-free(BD)와 혼합하여 6주령의 암컷 BALB/c 마우스(오리엔트)의 우측 등 부위의 피하에 0.1 mL씩 투여하여 이식한다. 암세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 종양의 부피를 측정하여 약 80 mm^3 내지 120 mm^3 에 도달한 개체들을 분리한 후, 0.1 mL의 GI102-M72를 정맥투여한다. 첫 투여 이후 3일에 한 번씩 총 3번 투여를 진행하고, 음성대조군으로는 PBS를 투여한다. 항암효과를 확인하기 위해 매일 종양의 크기를 측정한다. 실험예 16과 같은 방법으로 GI102-M72의 활성을 확인한다.

[0307] 실험예 26.2. 마우스 유래 폐암세포 식립 마우스에서의 GI102-M72의 항암효과 확인

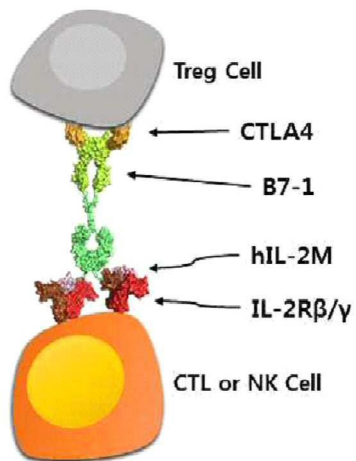
[0308] 오리엔트 바이오에서 분양 받은 C57BL/6 마우스(암컷, 7주)를 7일의 적응기간을 거친 후에 5×10^6 세포수의 LLC2 암세포주(ATCC, USA)를 0.1 mL PBS에 부유하여 마우스의 우측 등 부위의 피하에 투여하여 동종이식한다. 암세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 종양의 부피를 측정하여 약 50 mm^3 내지 200 mm^3 에 도달한 개체들을 선별한 후, 선별한 마우스의 종양의 크기 및 체중을 기초로 하여 균등하도록 각 군당 10마리씩 분류한다. 그 후, 일회용 주사기(31G, 1 mL)를 이용하여 음성대조군에는 약물을 투여하지 않으며, 양성대조군으로는 5 mg/kg 용량의 항-PD-1 항체 또는 5 mg/kg 용량의 항-PD-1 항체와 5 mg/kg 용량의 항-CTLA-4 항체를 정맥투여한다. 실험군으로는 0.1 mg/kg 또는 1 mg/kg 용량의 GI102-M72를 정맥투여한다. 첫 투여 이후 3일에 한 번씩 총 3번 투여를 진행한다. 매일 종양의 크기를 측정한다. 실험예 20.1과 같은 방법으로 GI102-M72의 활성을 확인한다.

도면

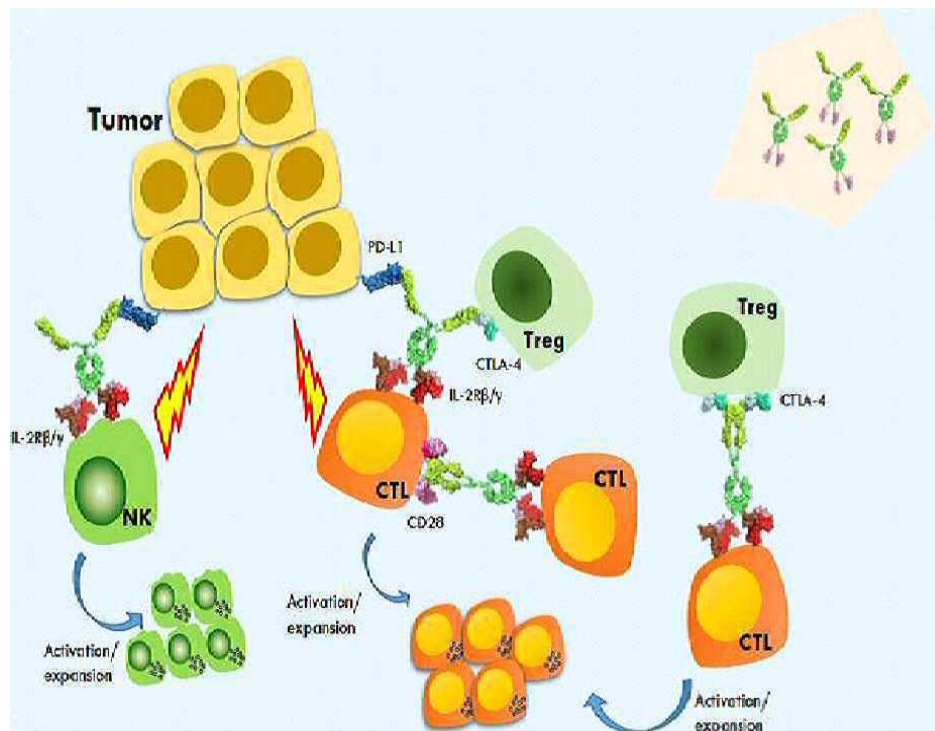
도면1



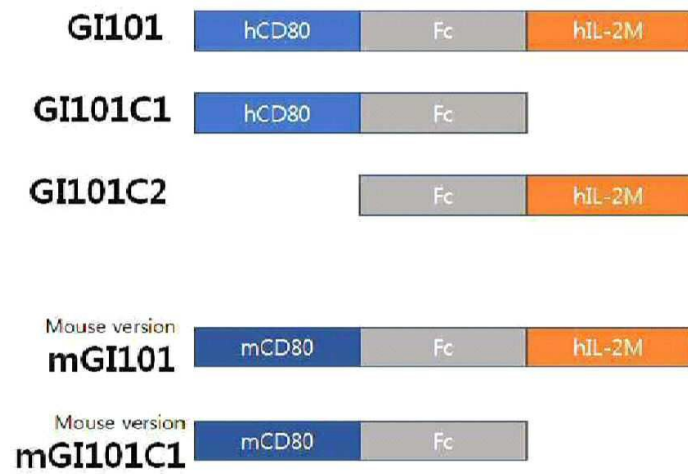
도면2



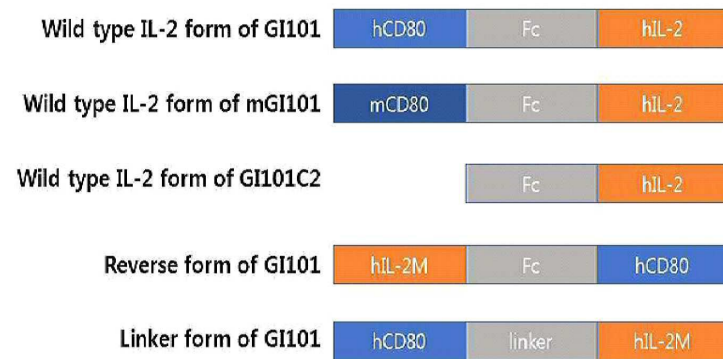
도면3



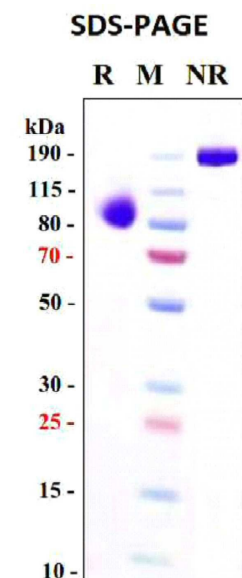
도면4



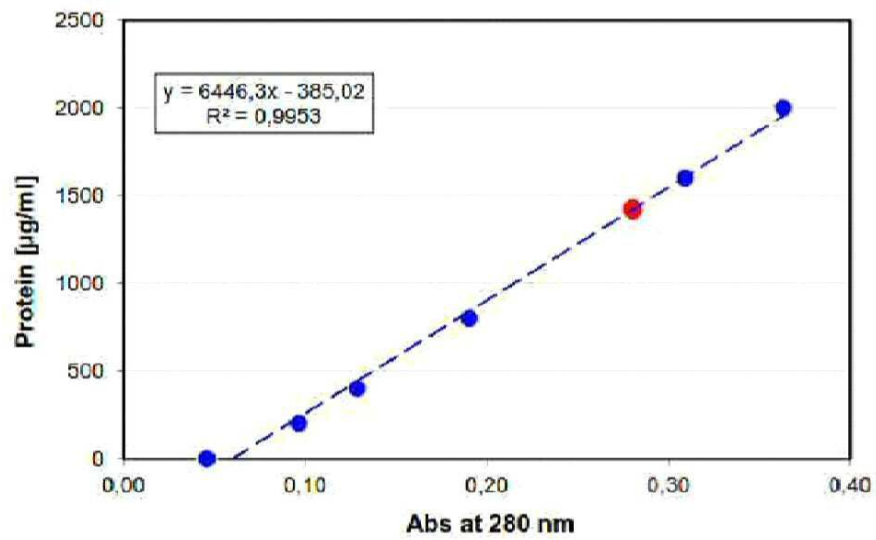
도면5



도면6

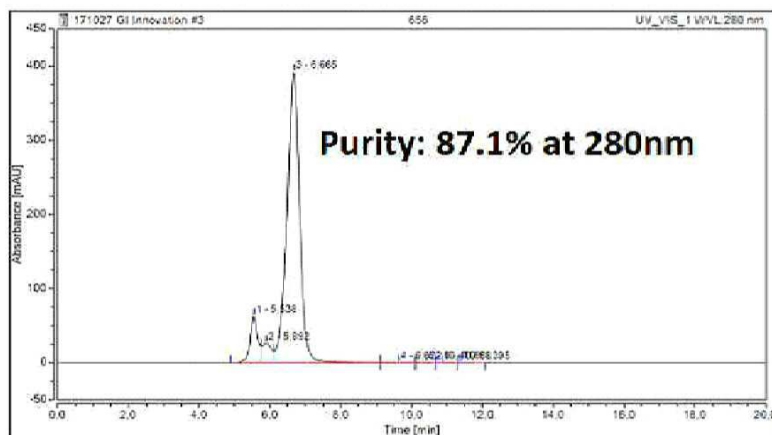


도면7

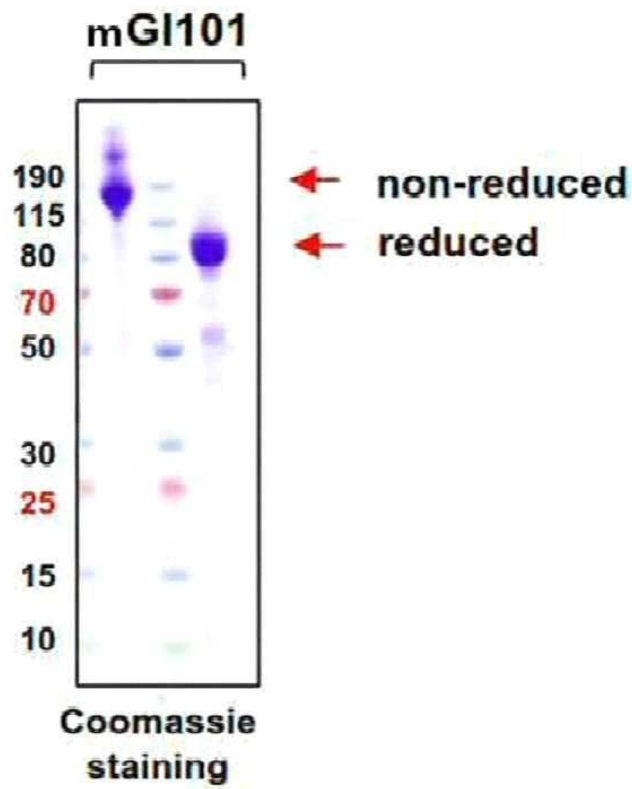


도면8

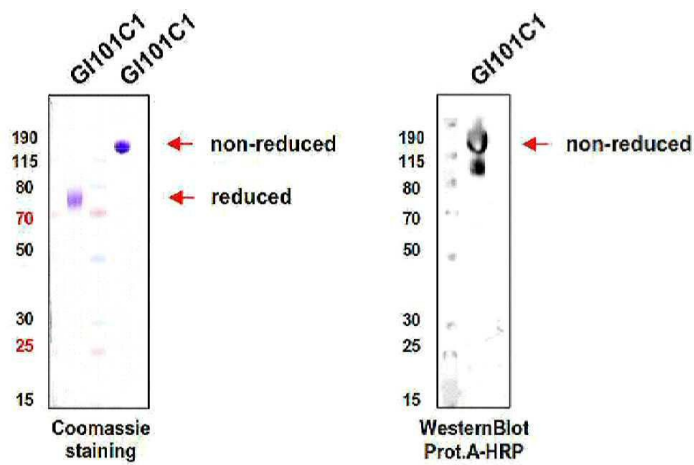
Analytical size exclusion chromatography (SEC)



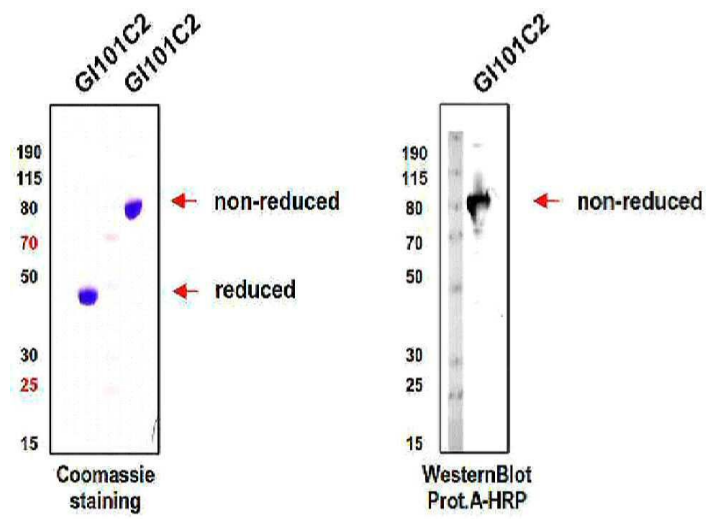
도면9



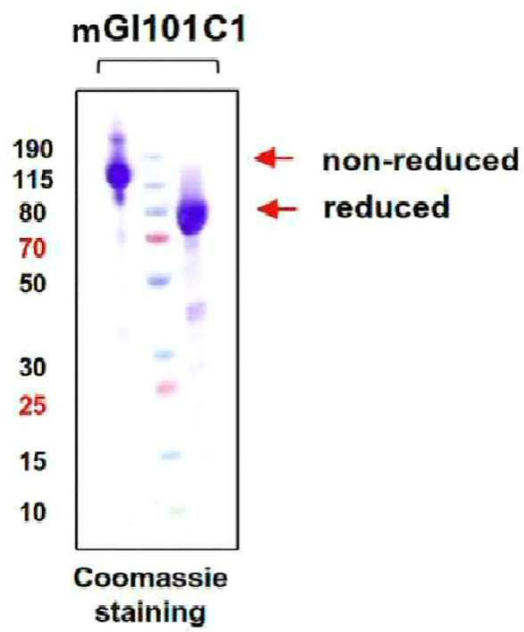
도면10



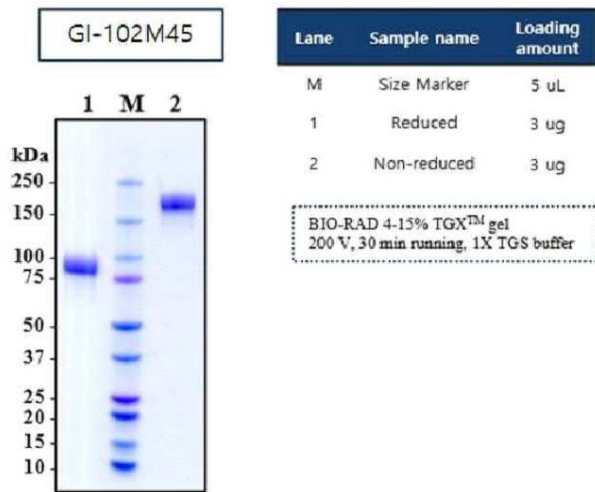
도면11



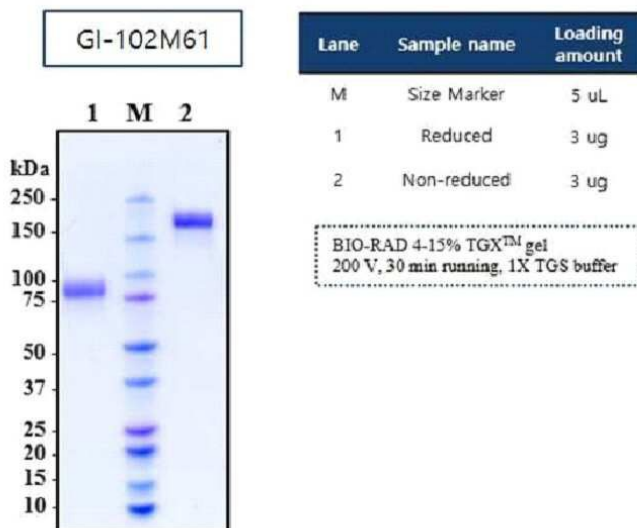
도면12



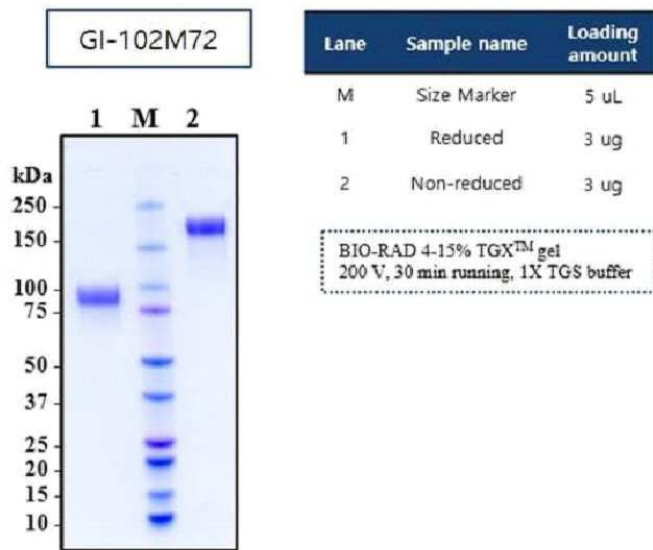
도면13



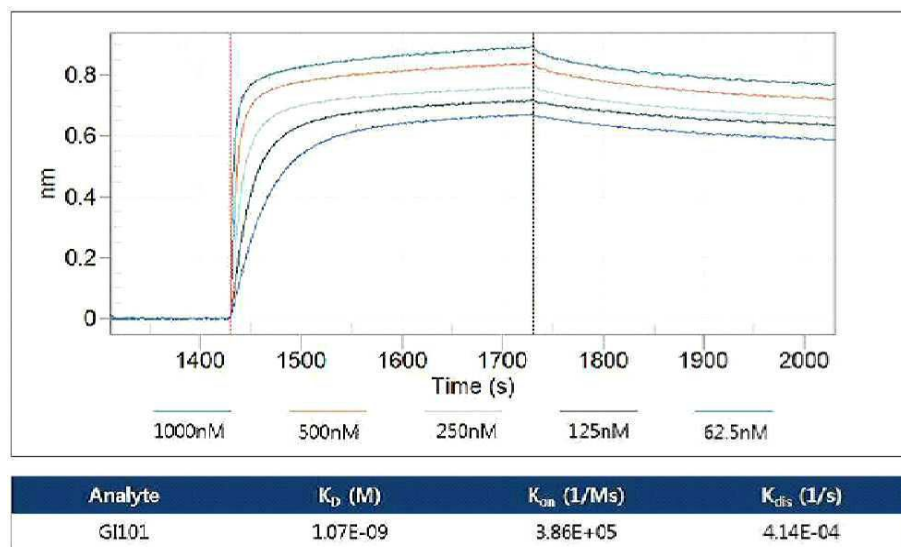
도면14



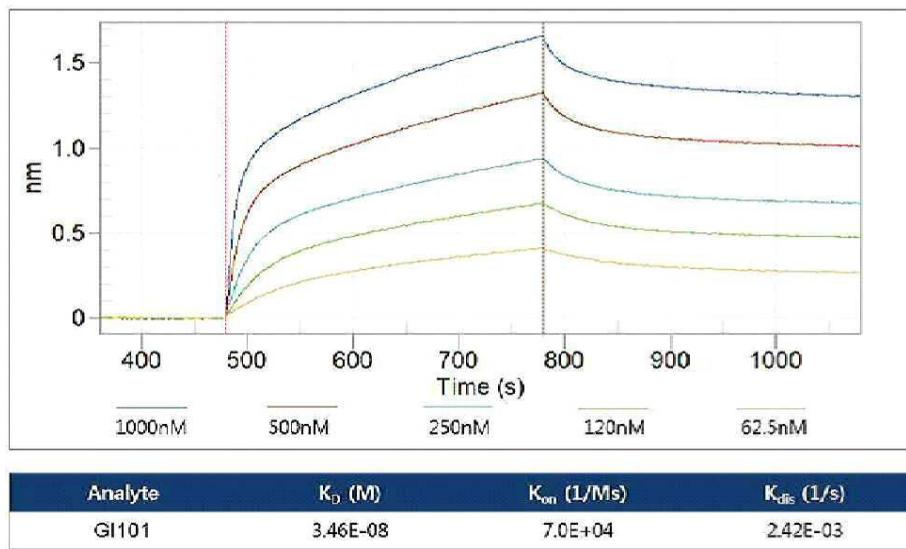
도면15



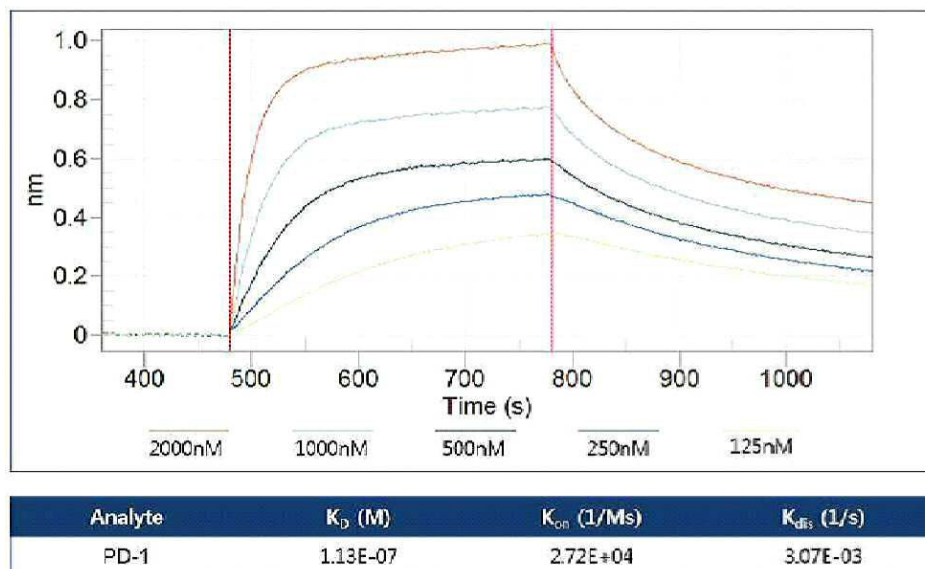
도면16



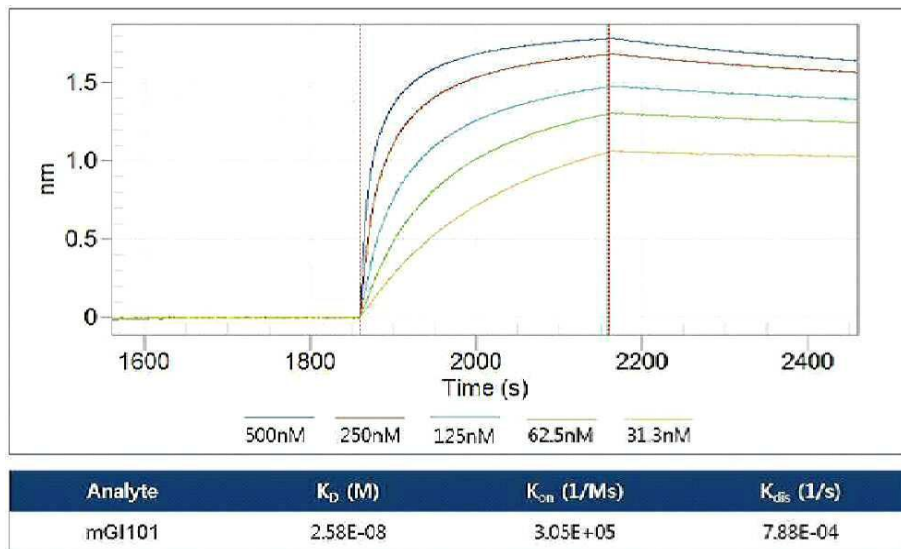
도면17



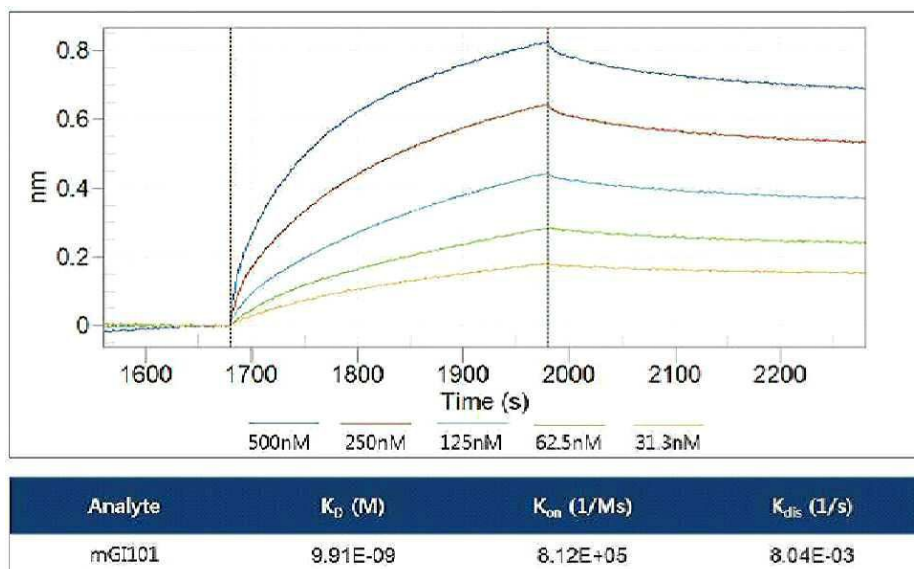
도면18



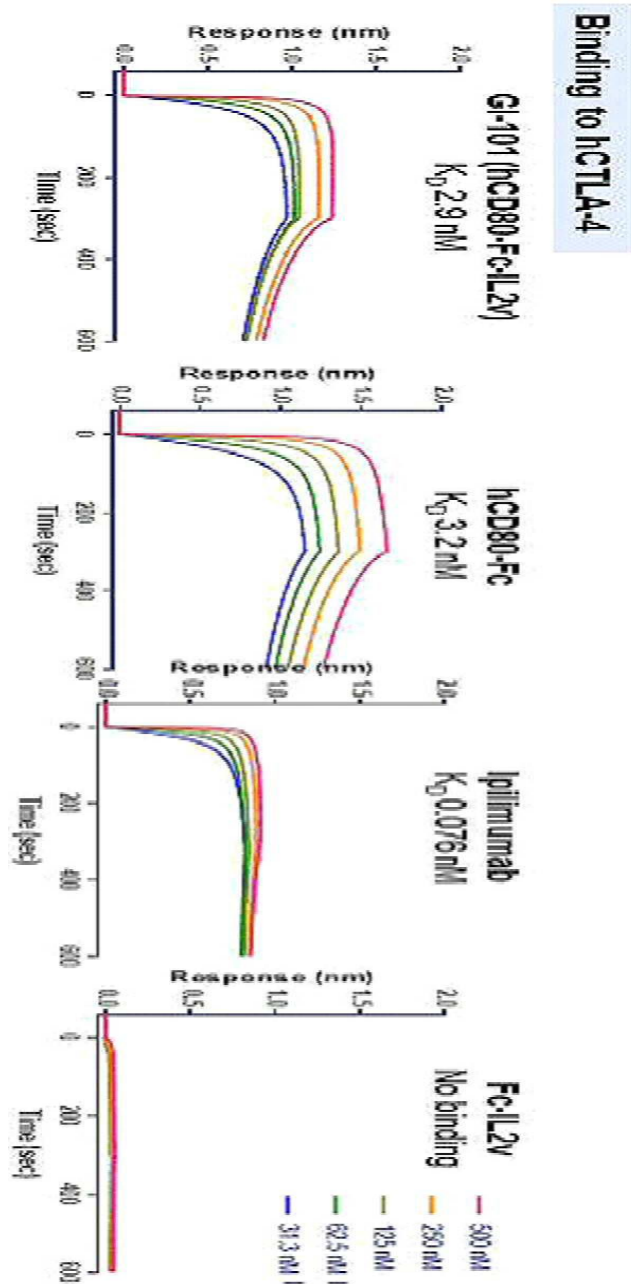
도면19



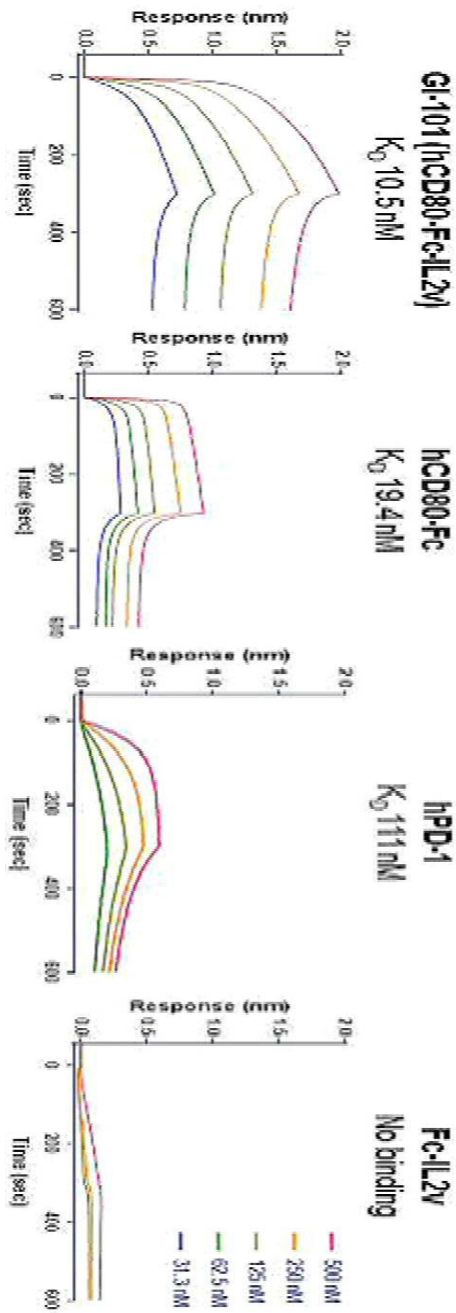
도면20



도면21

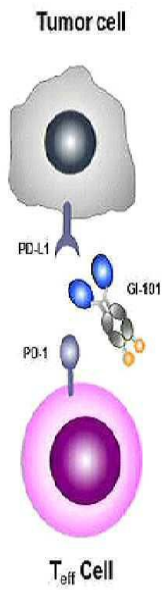


Binding to hPD-L1

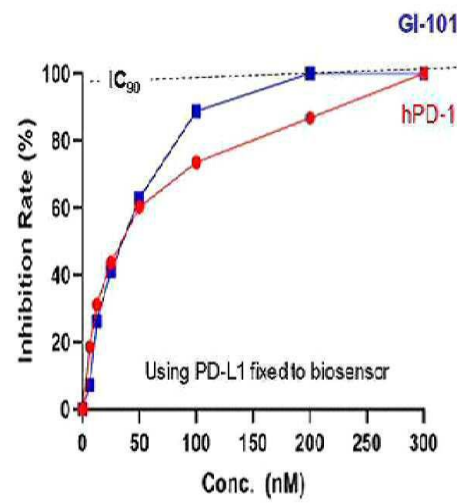


도면22

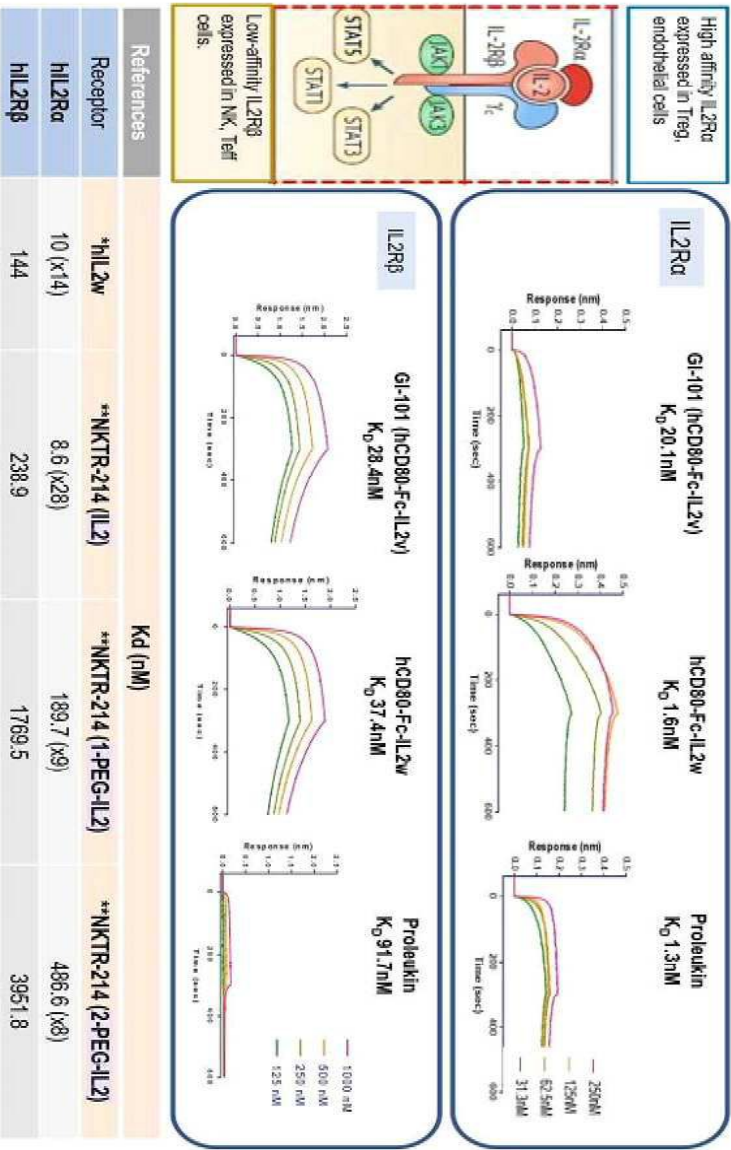
도면23



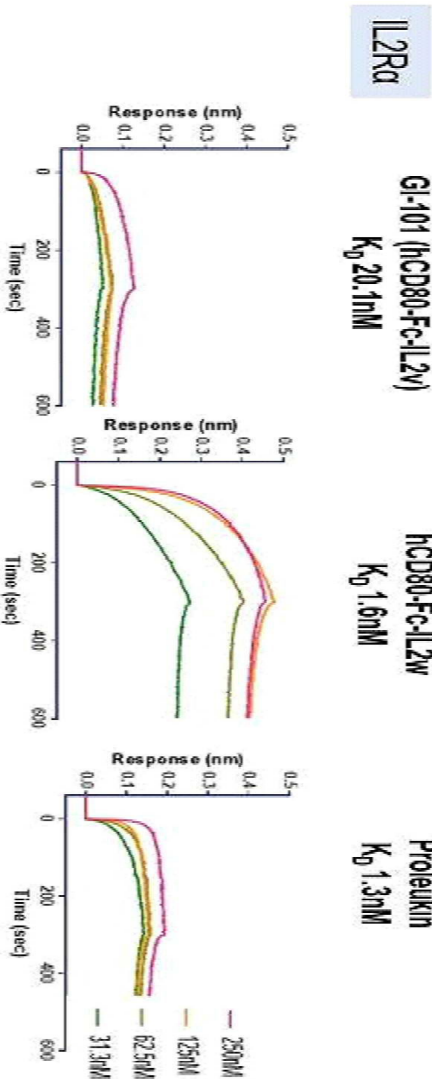
GI-101 dose-dependently inhibits PD-1/PD-L1 interactions



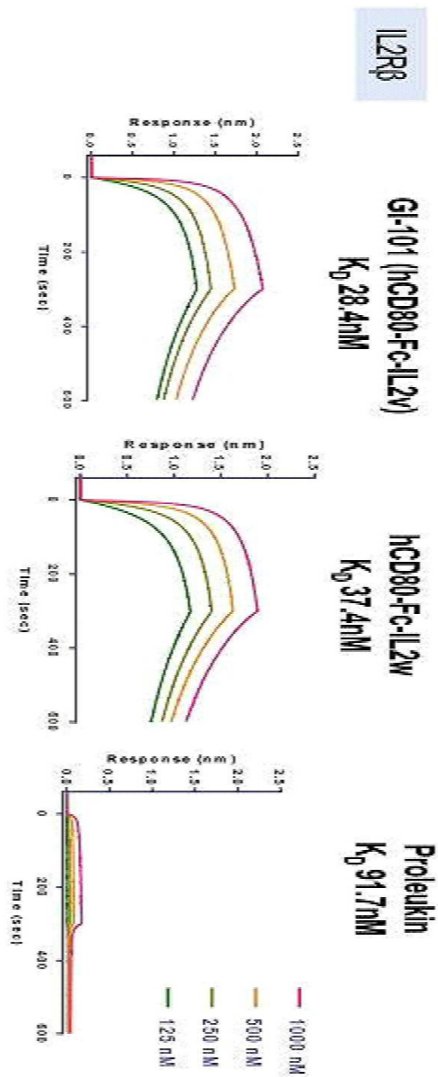
도면24



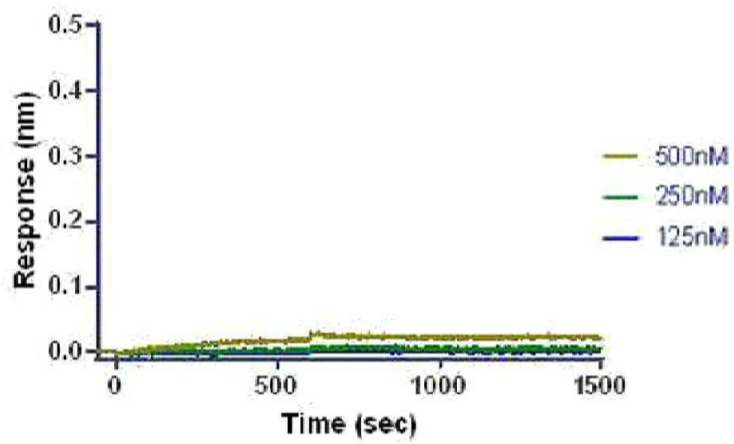
도면25



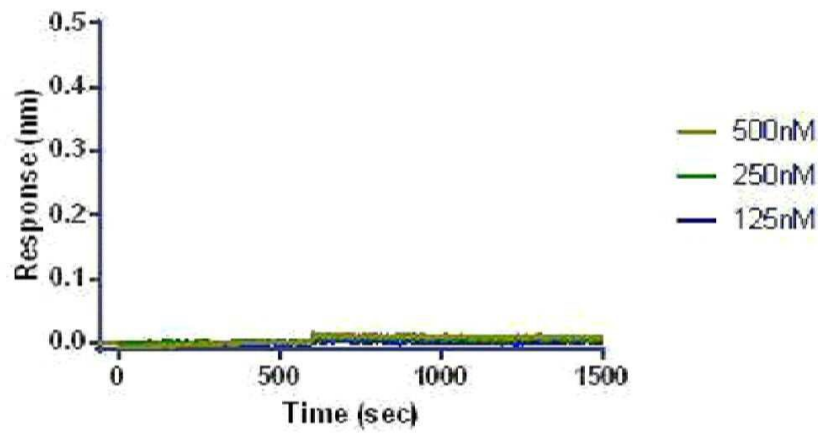
도면26



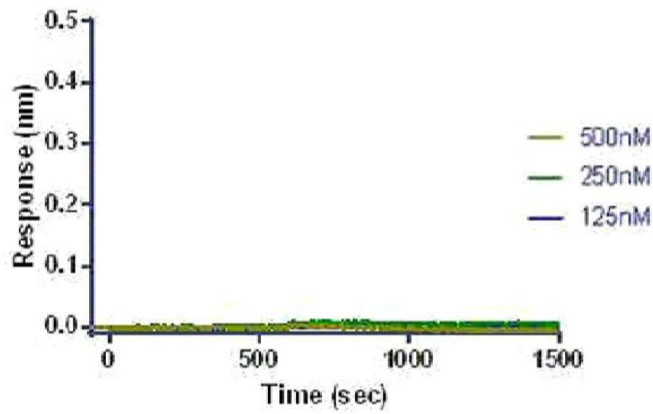
도면27



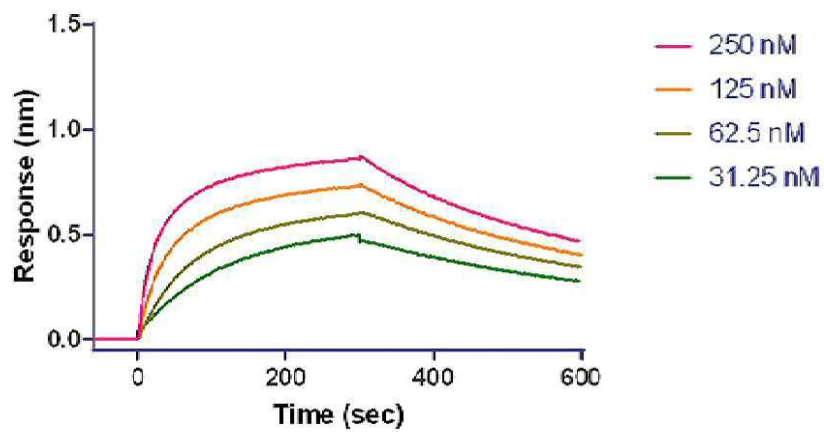
도면28



도면29

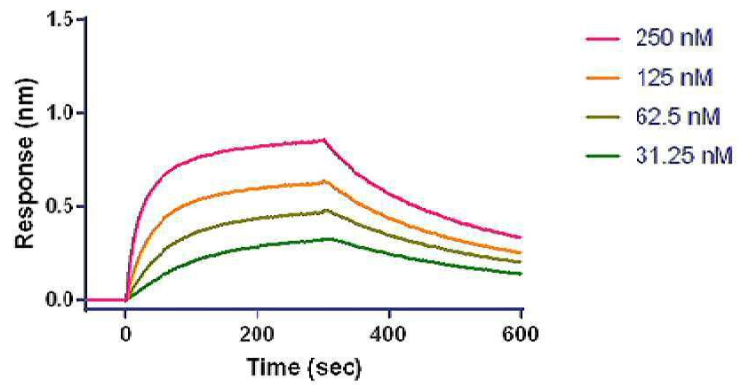


도면30



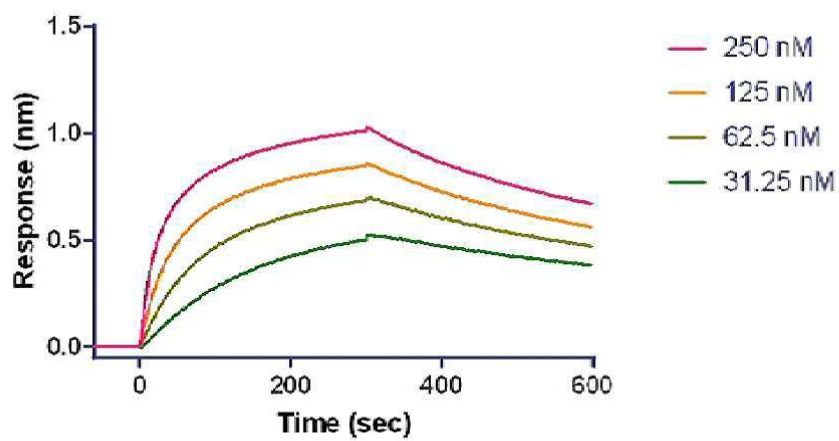
Kon	Koff	Kd
1.30X10 ⁵	2.01X10 ⁻³	1.55X10 ⁻⁸

도면31



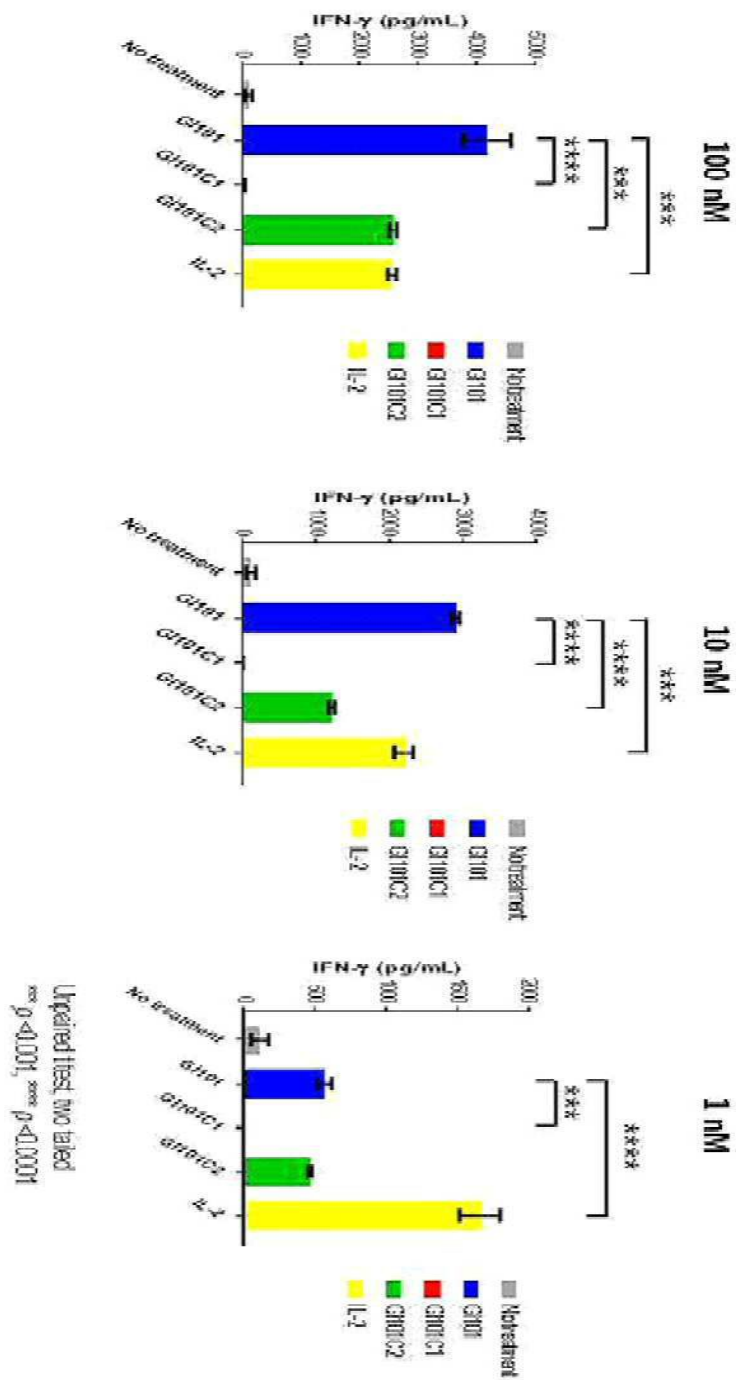
Kon	Koff	Kd
1.32X10 ⁵	3.11X10 ⁻³	2.36X10 ⁻⁸

도면32

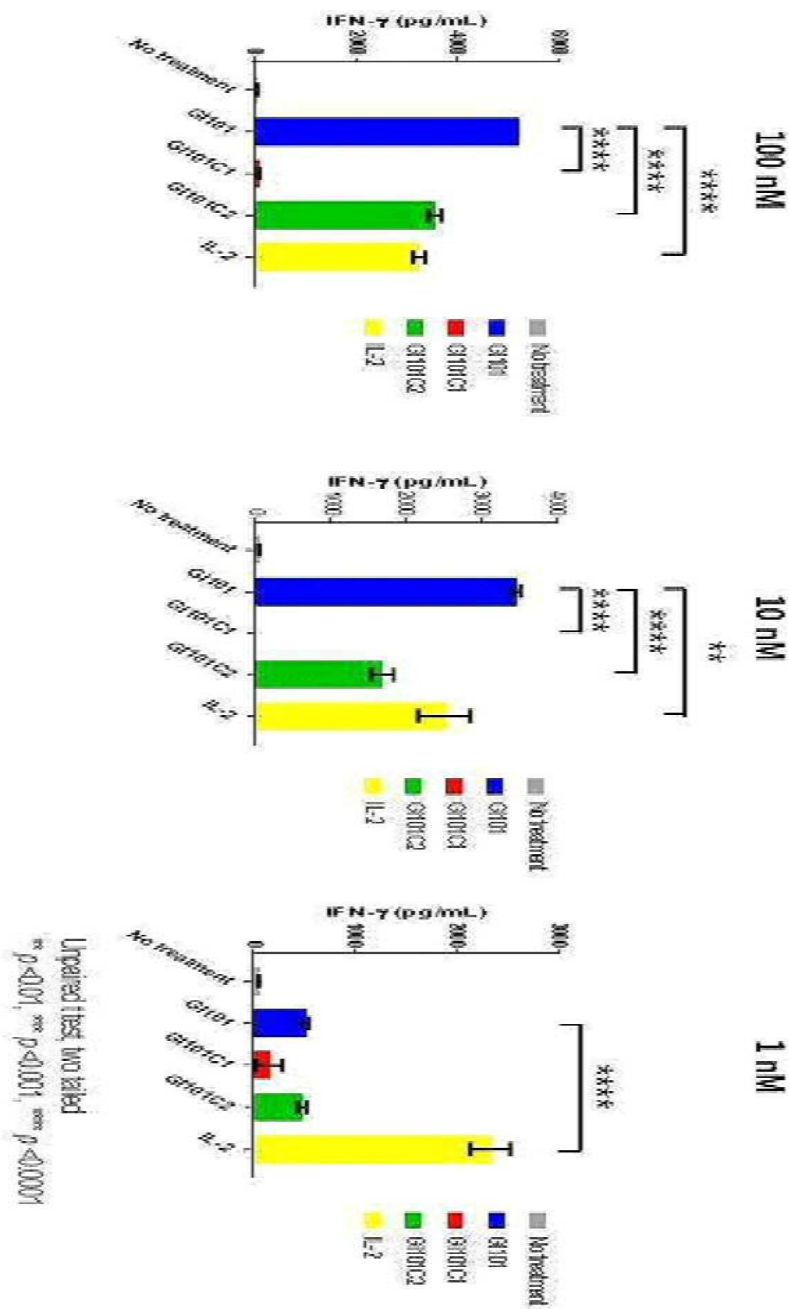


Kon	Koff	Kd
1.10X10 ⁵	1.27X10 ⁻³	1.15X10 ⁻⁸

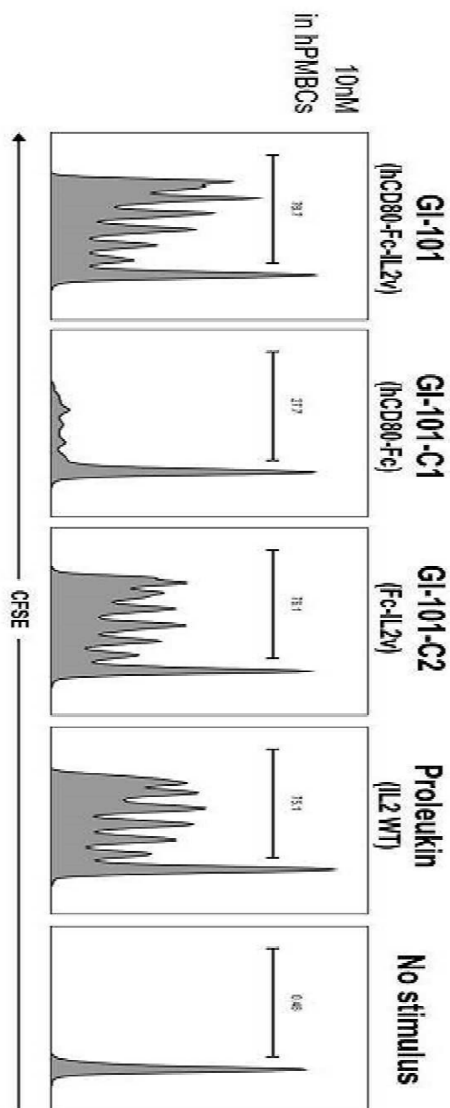
도면33



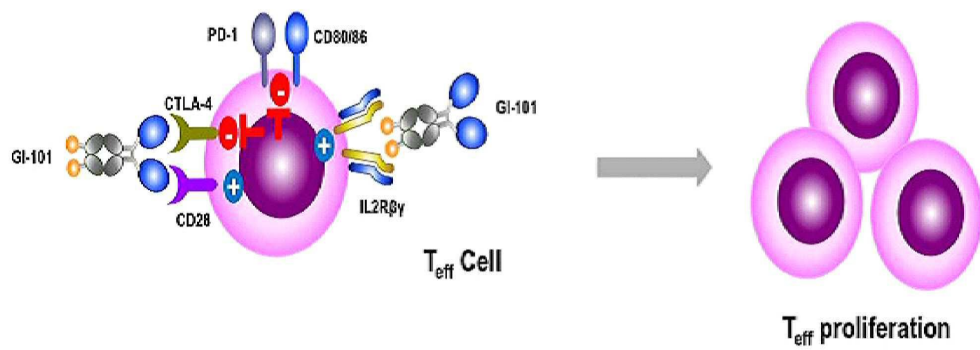
도면34



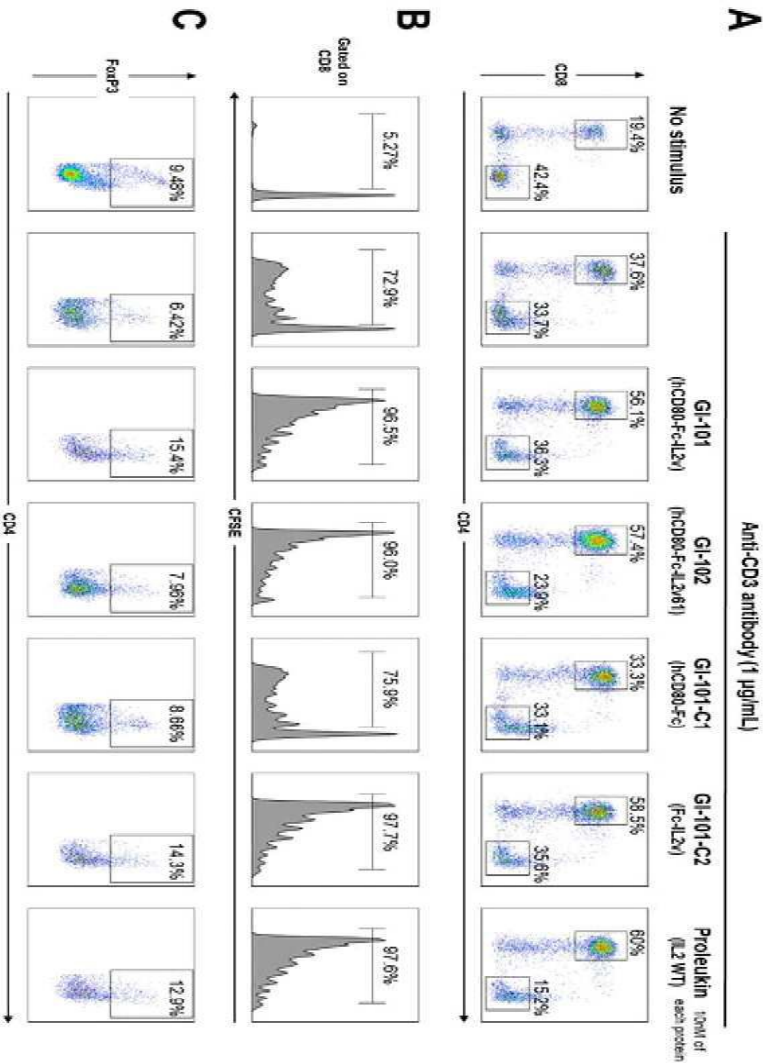
도면35



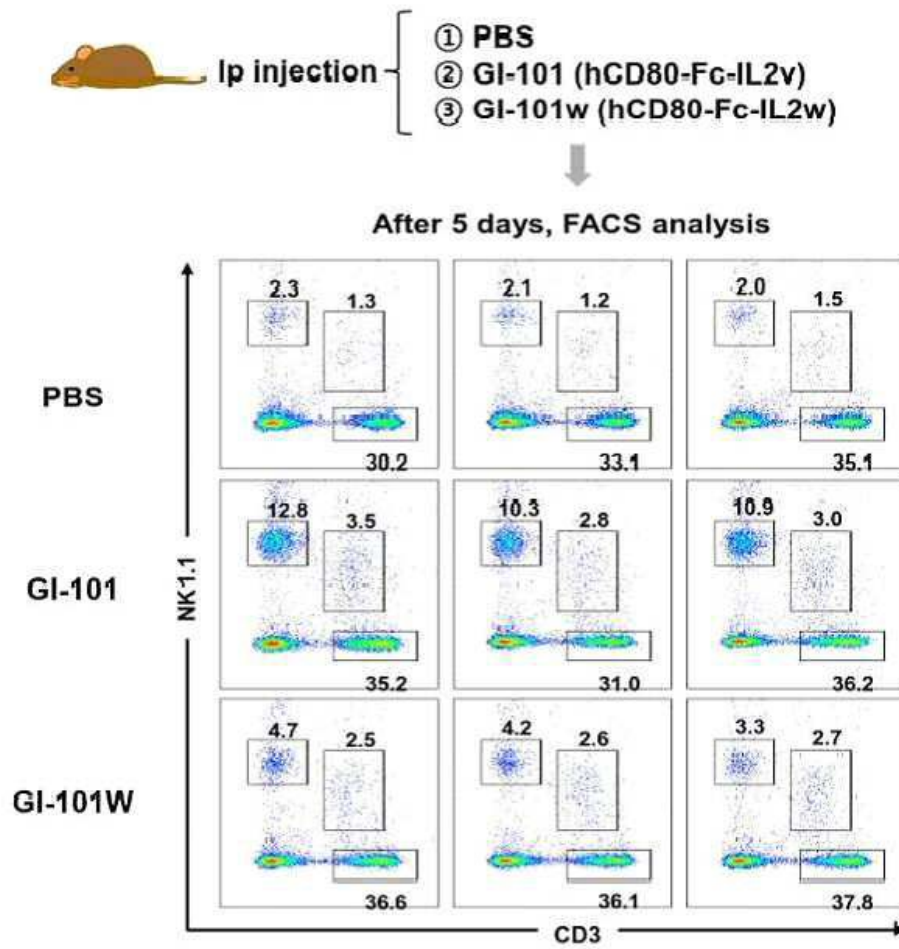
도면36



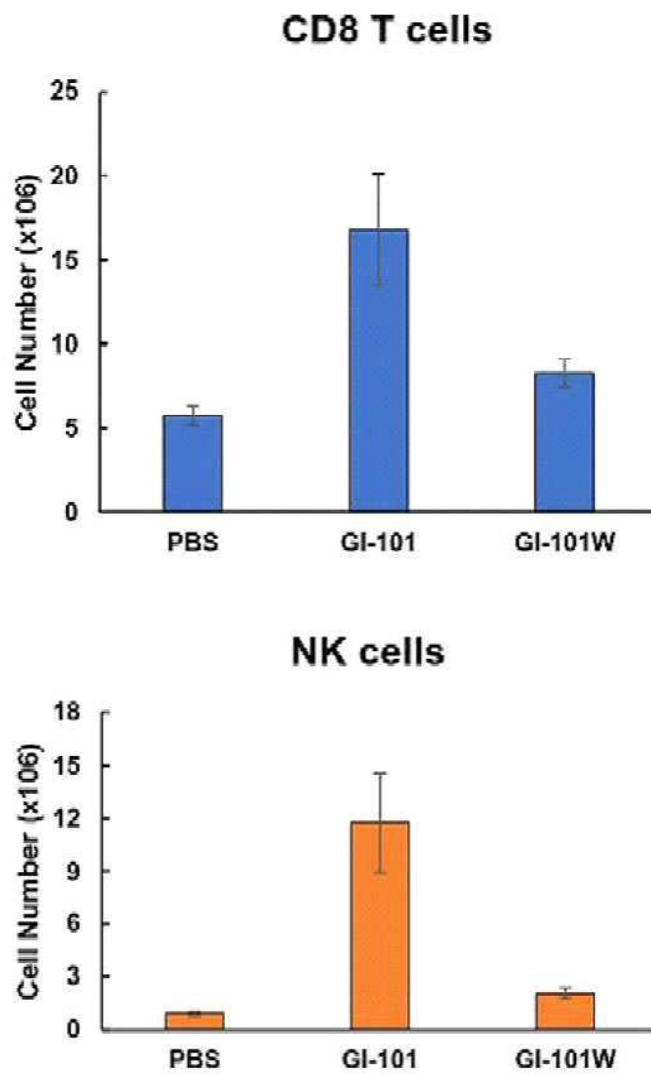
도면37



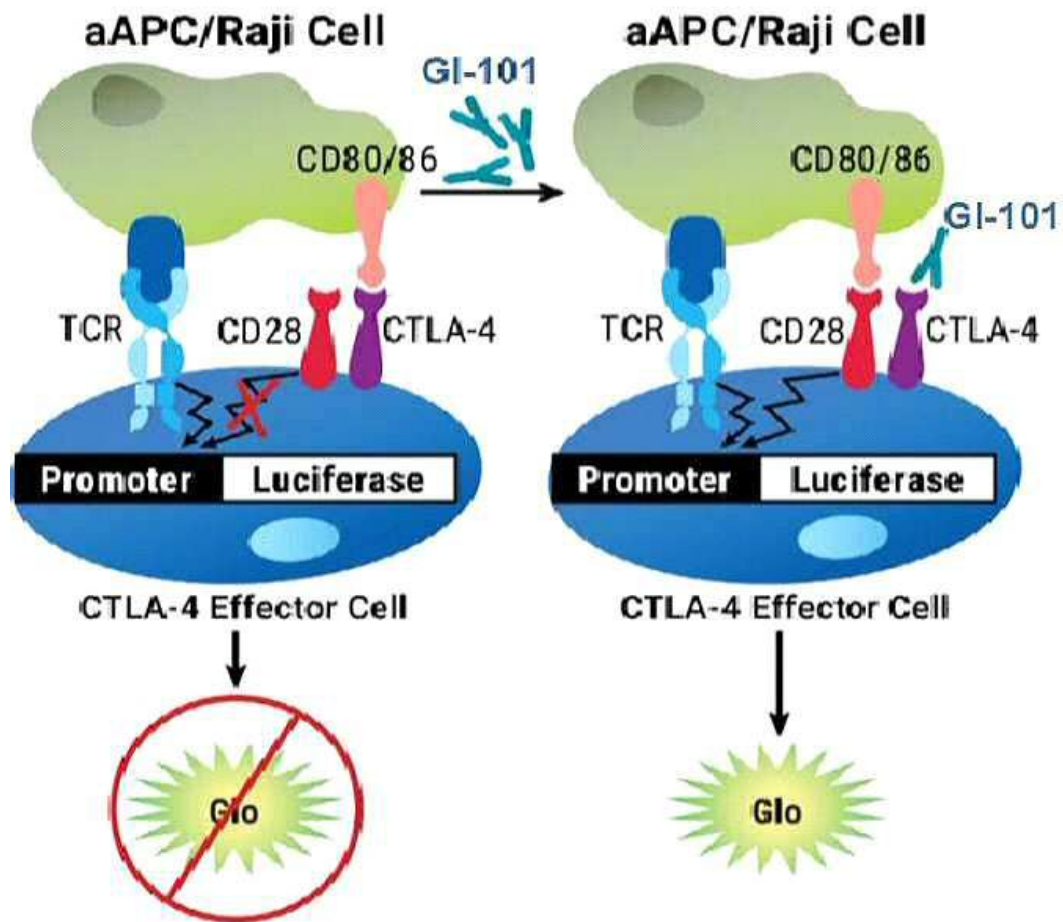
도면38



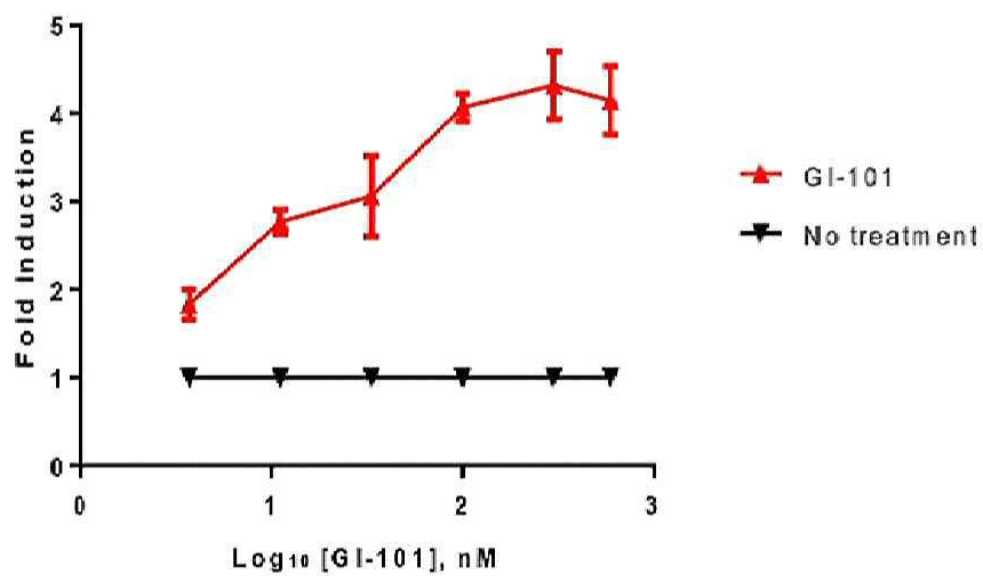
도면39



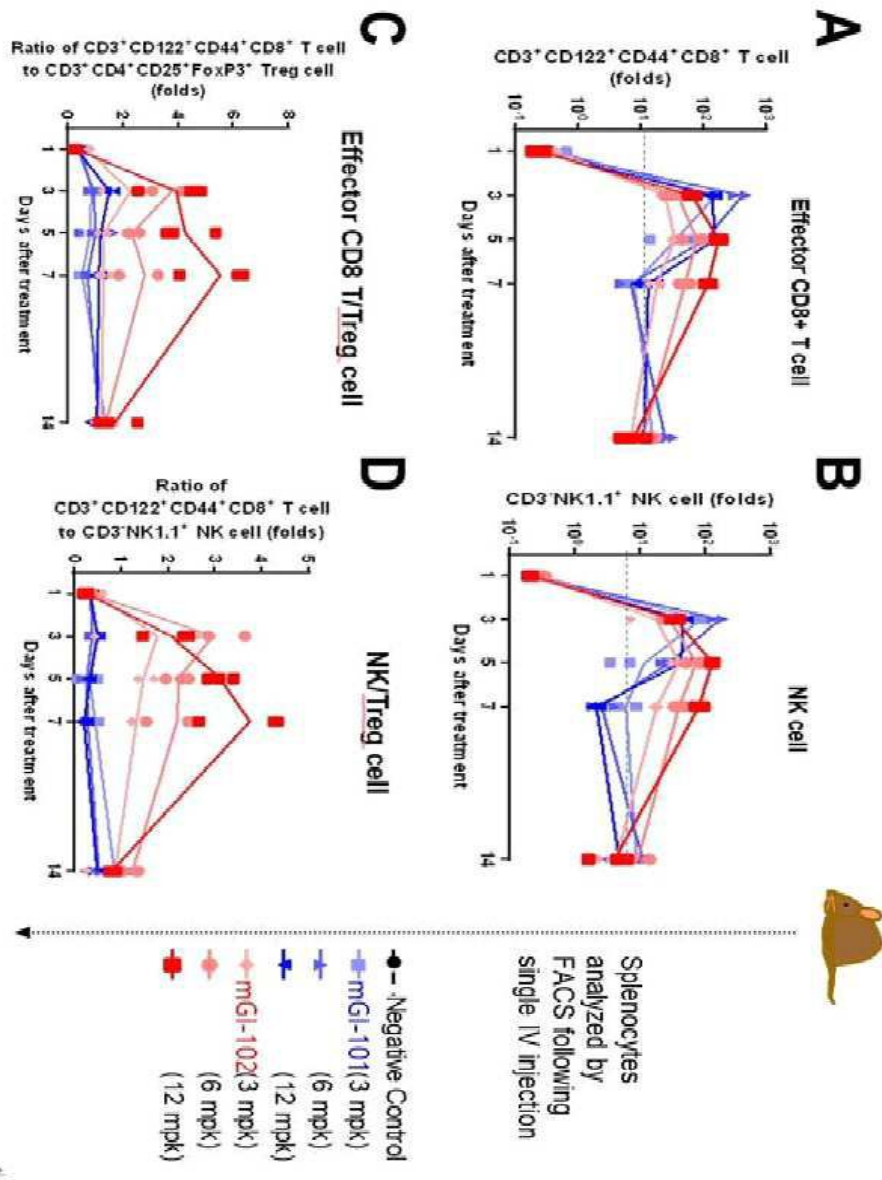
도면40



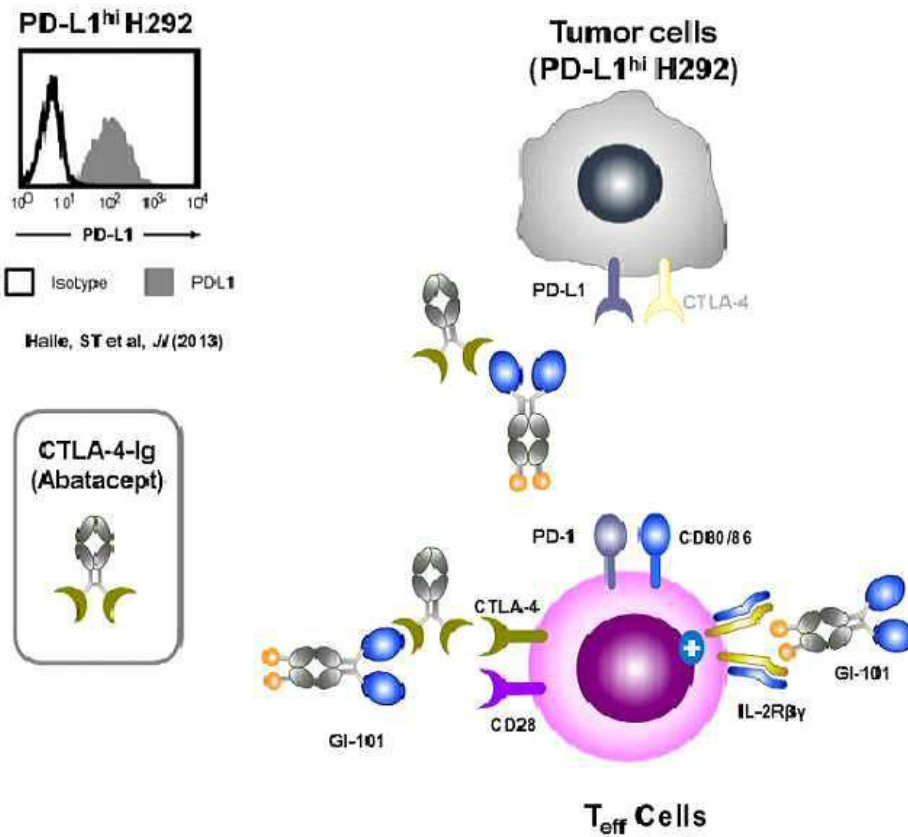
도면41



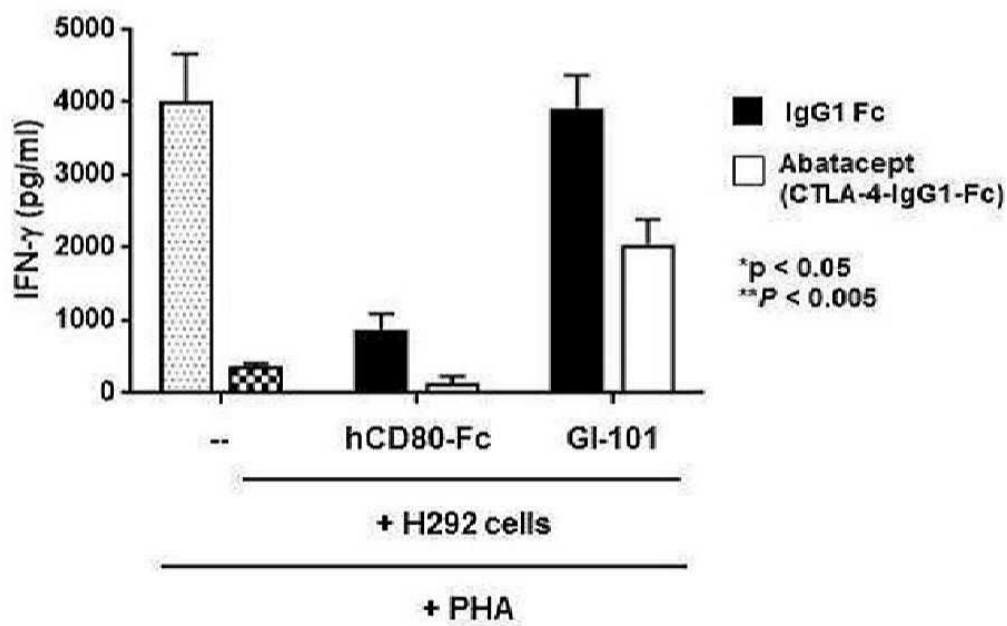
도면42



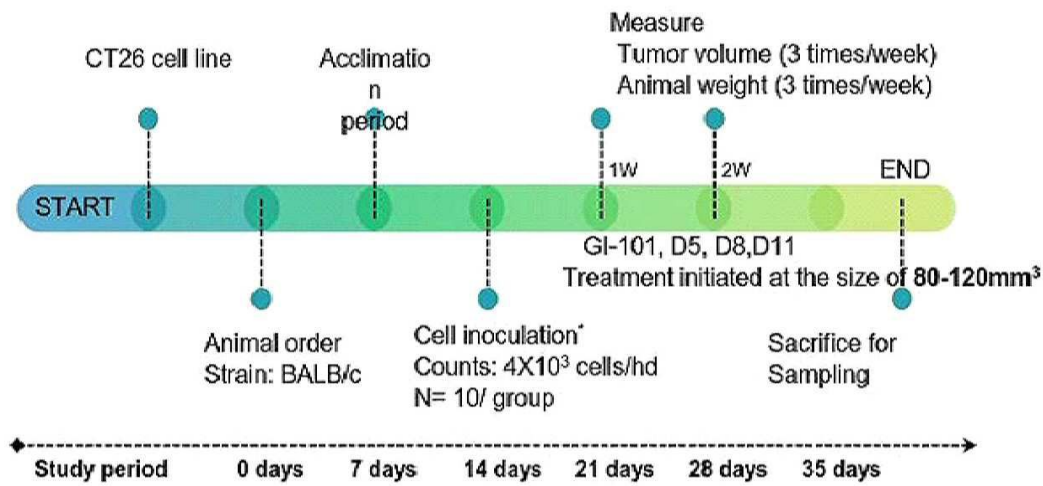
도면43



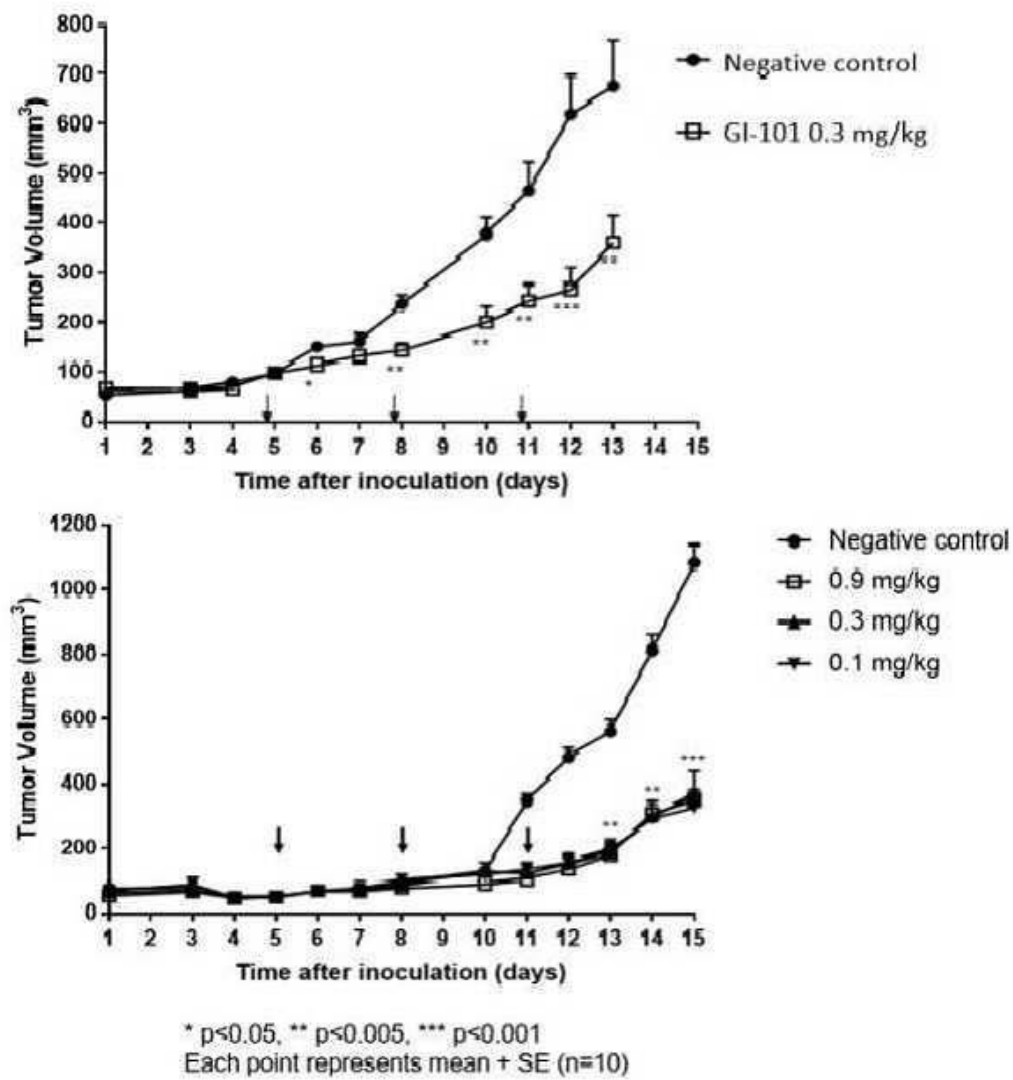
도면44



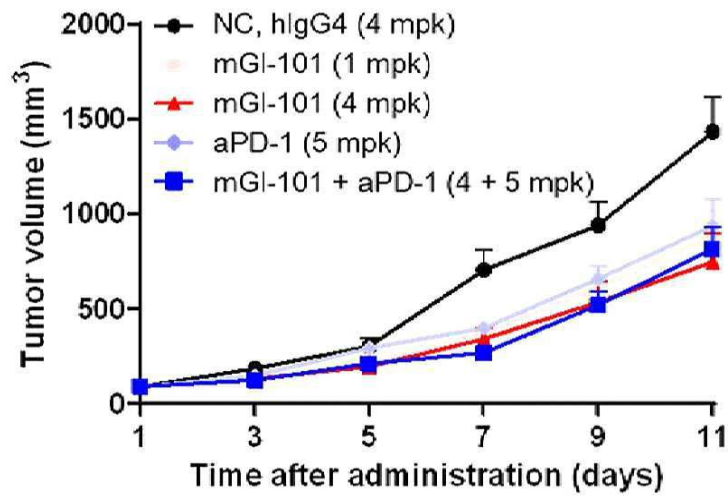
도면45



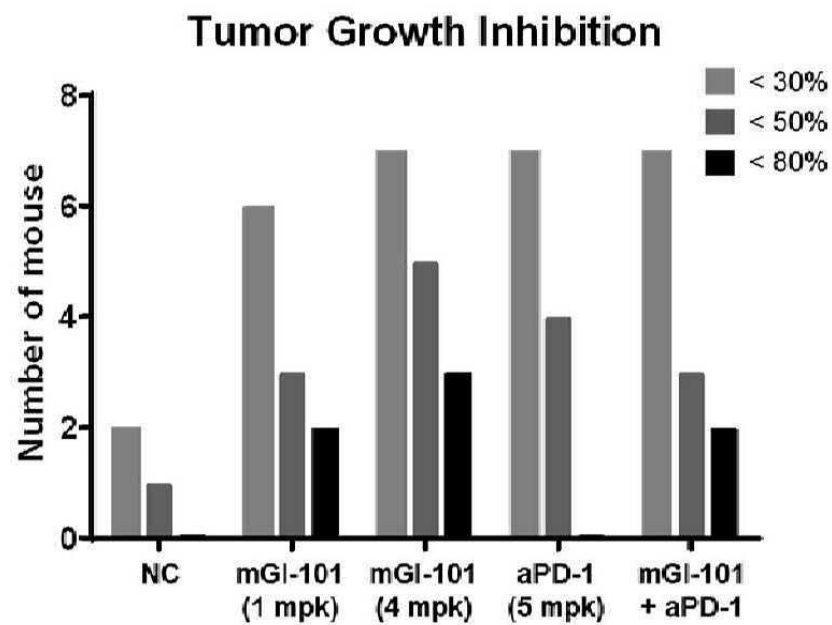
도면46



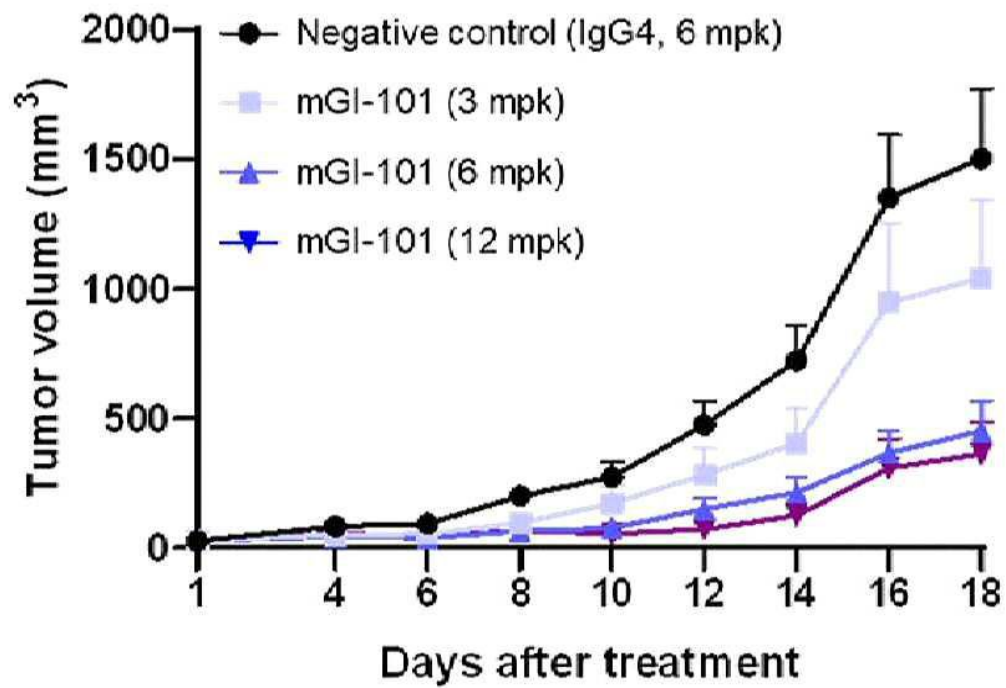
도면47



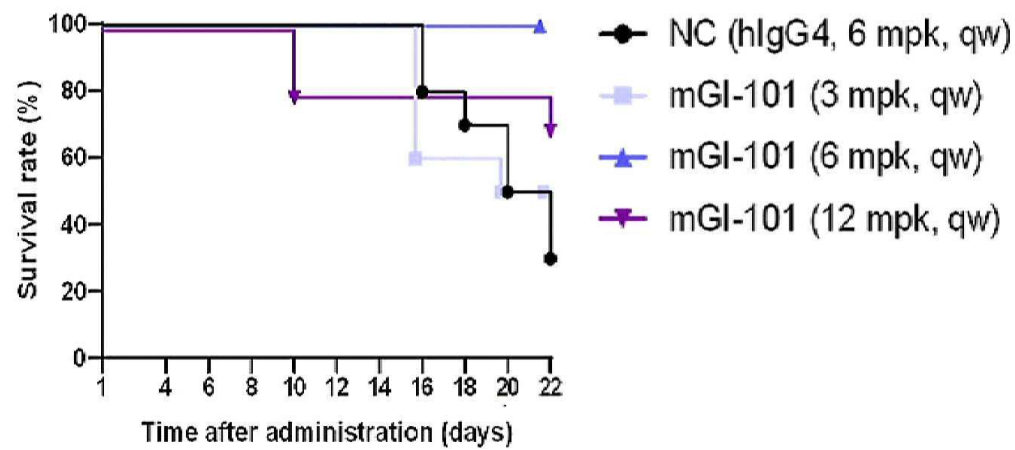
도면48



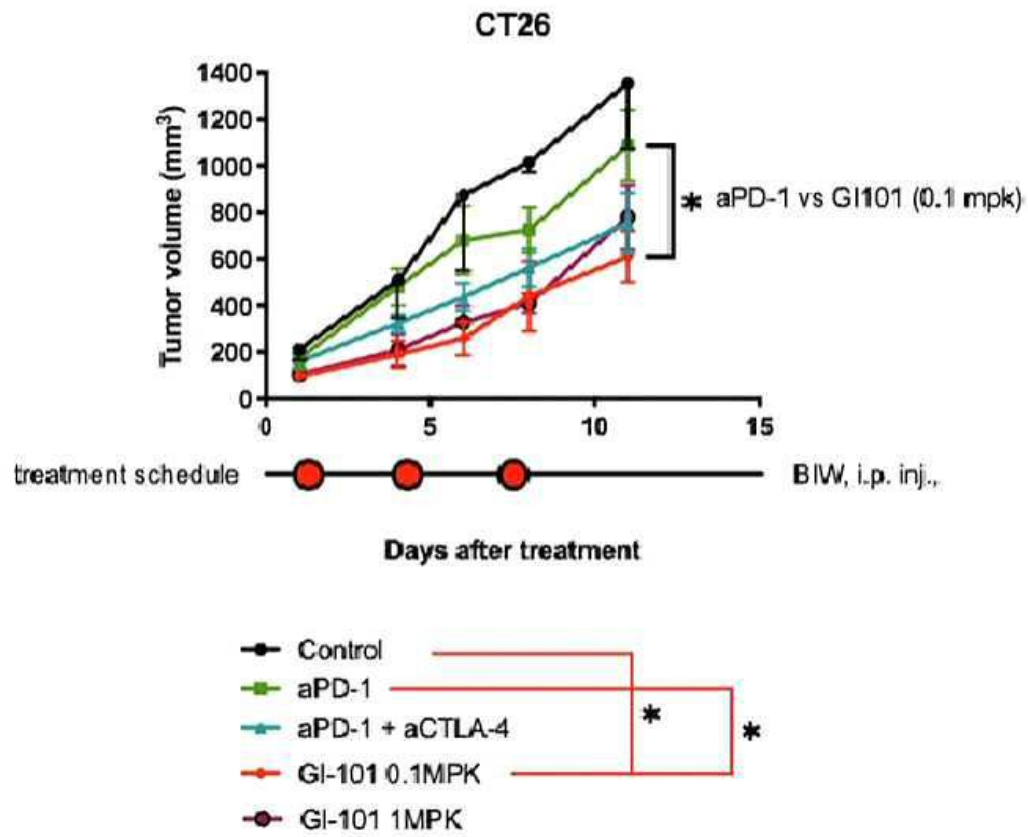
도면49



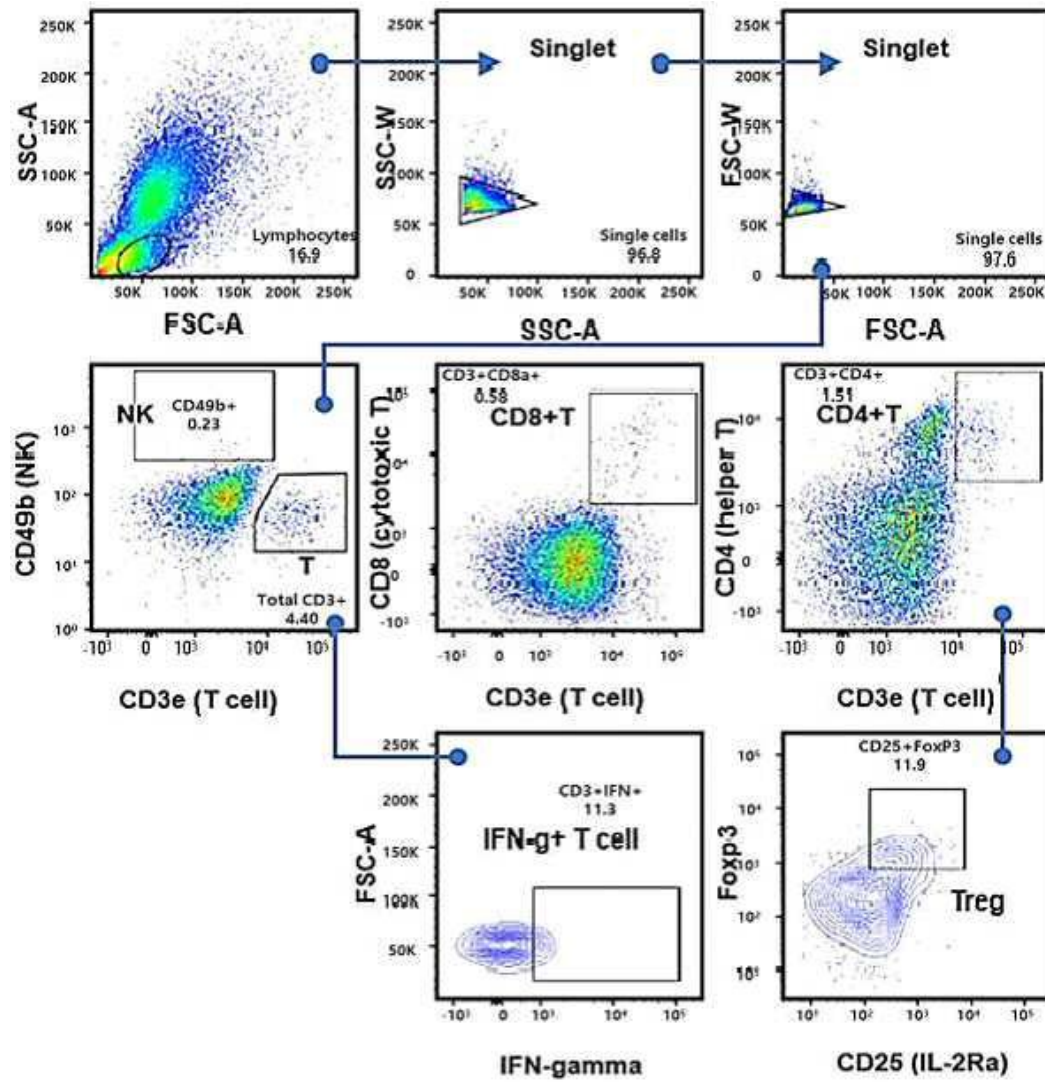
도면50



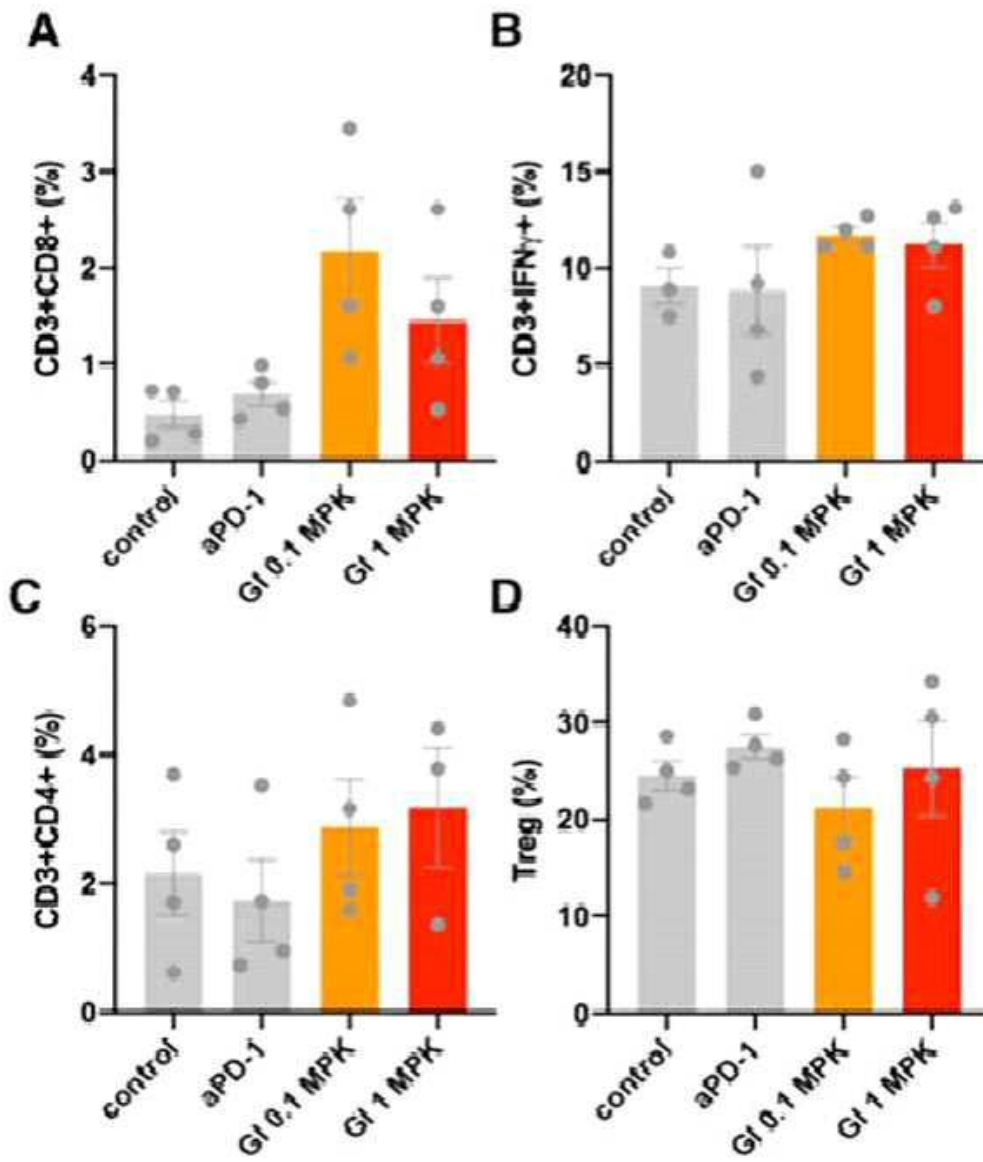
도면51



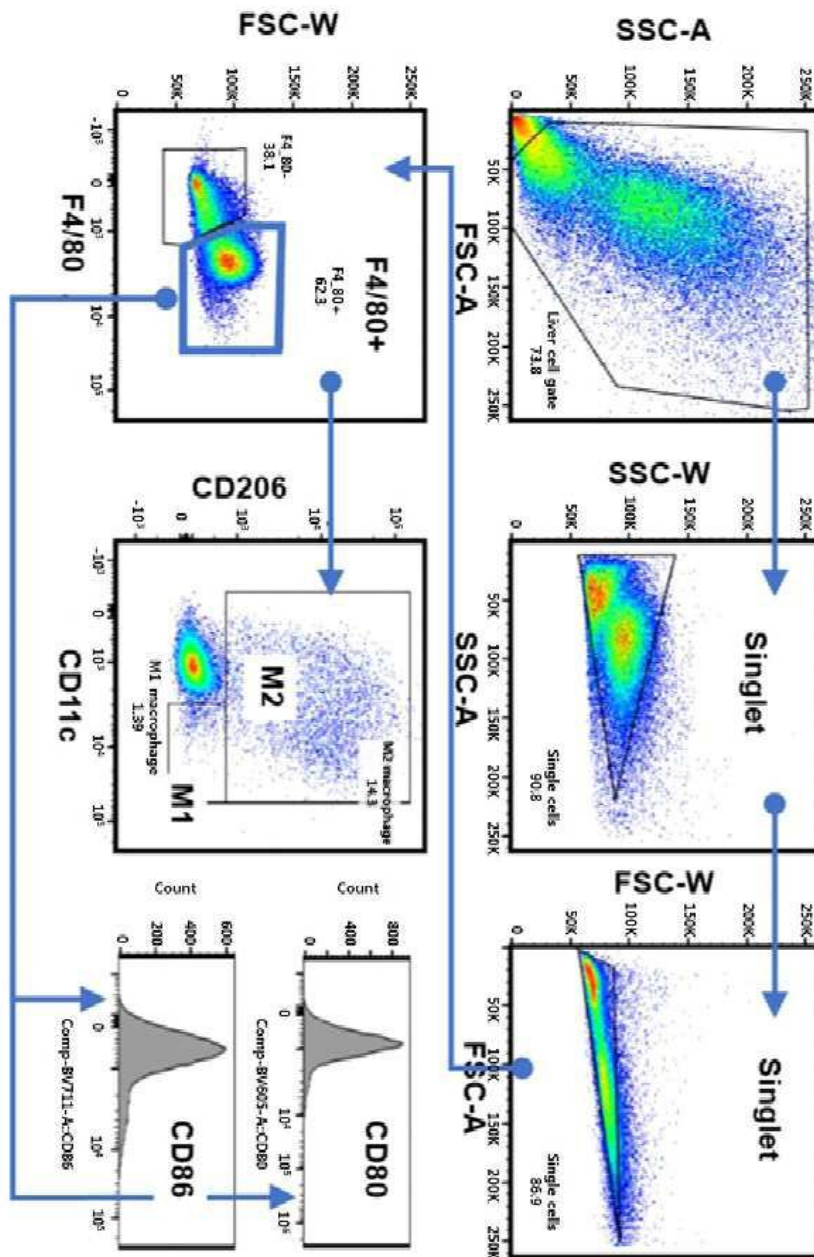
도면52



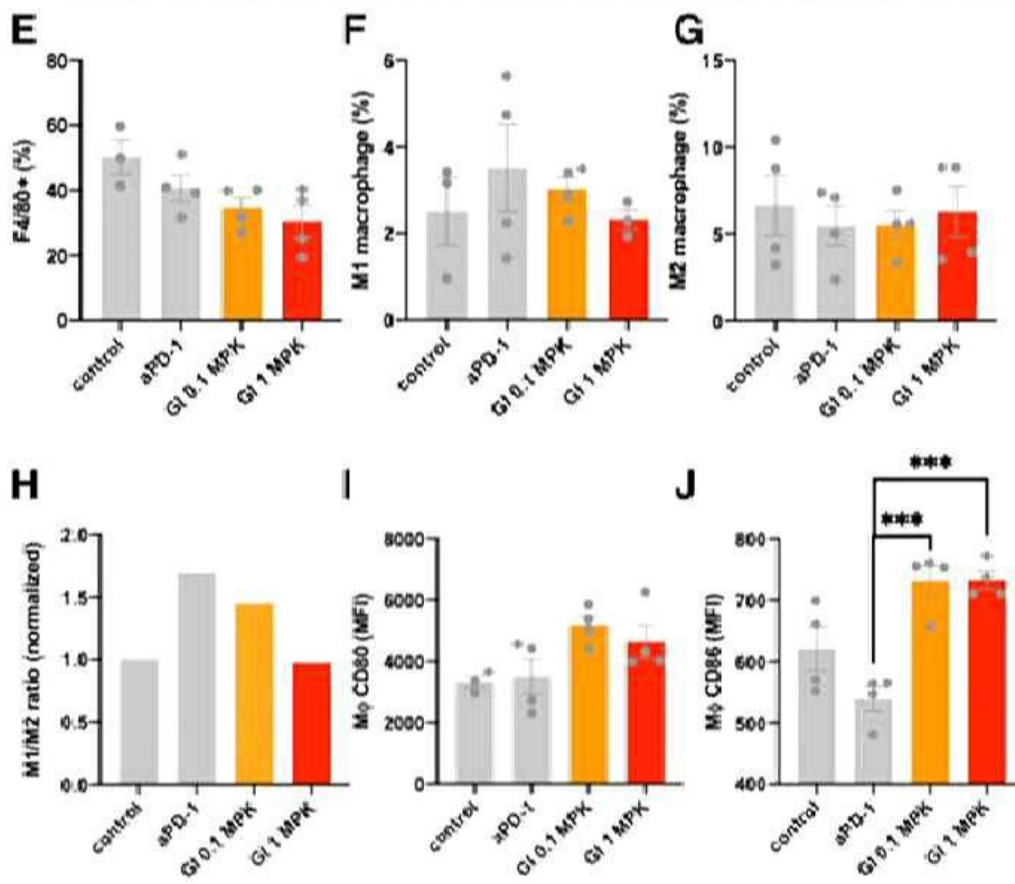
도면53



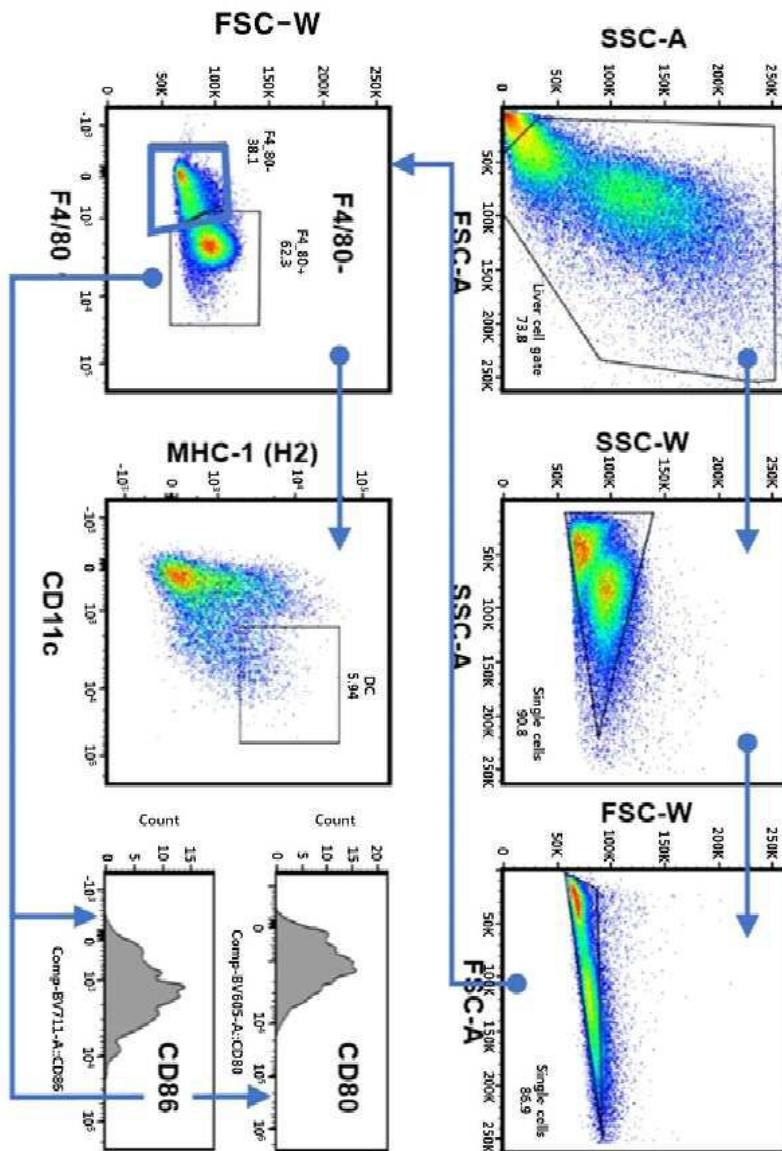
도면54



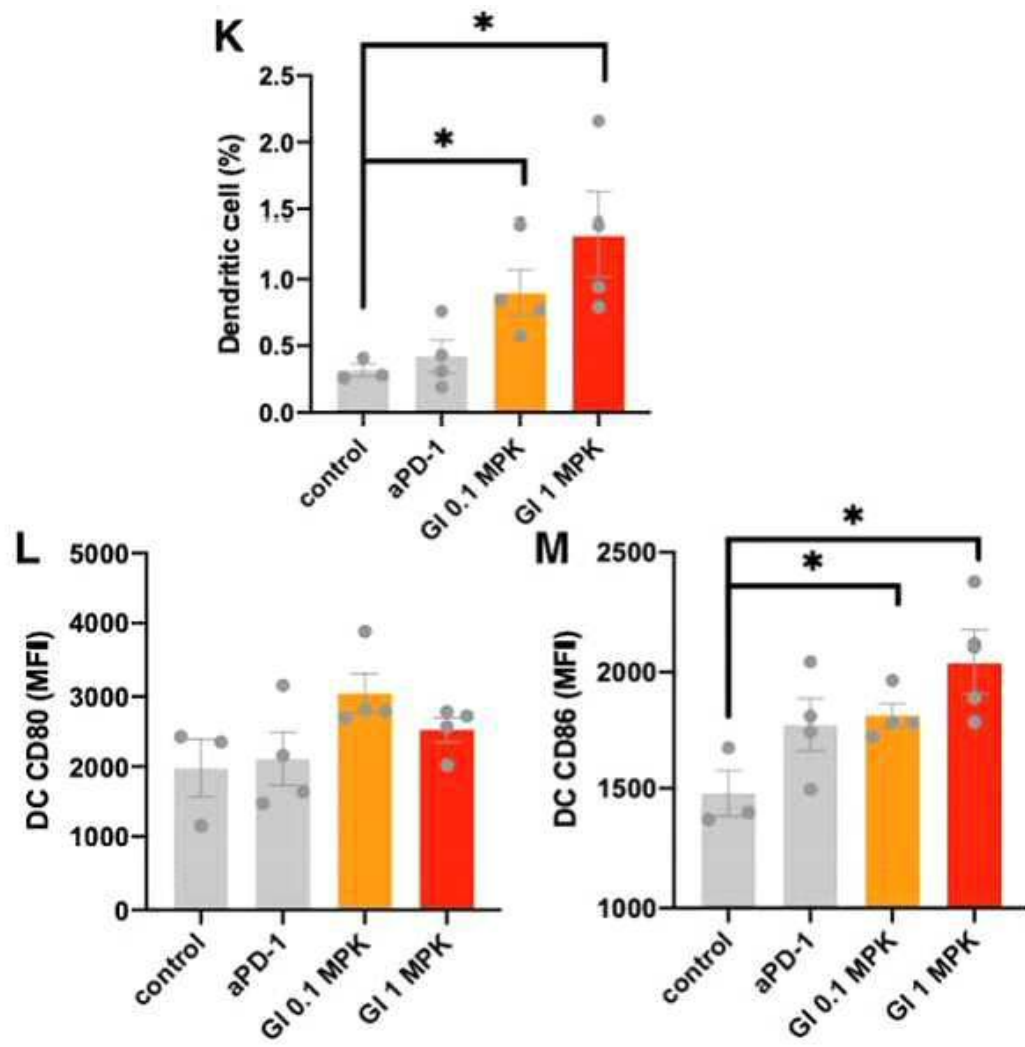
도면55



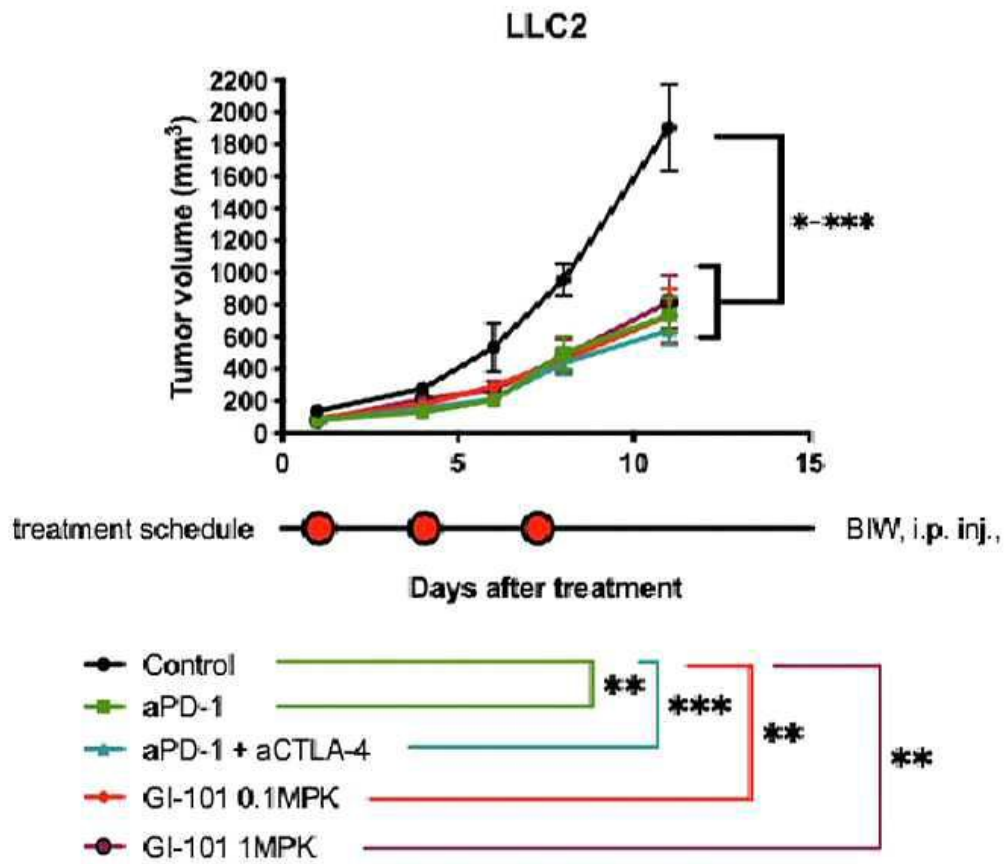
도면56



도면57

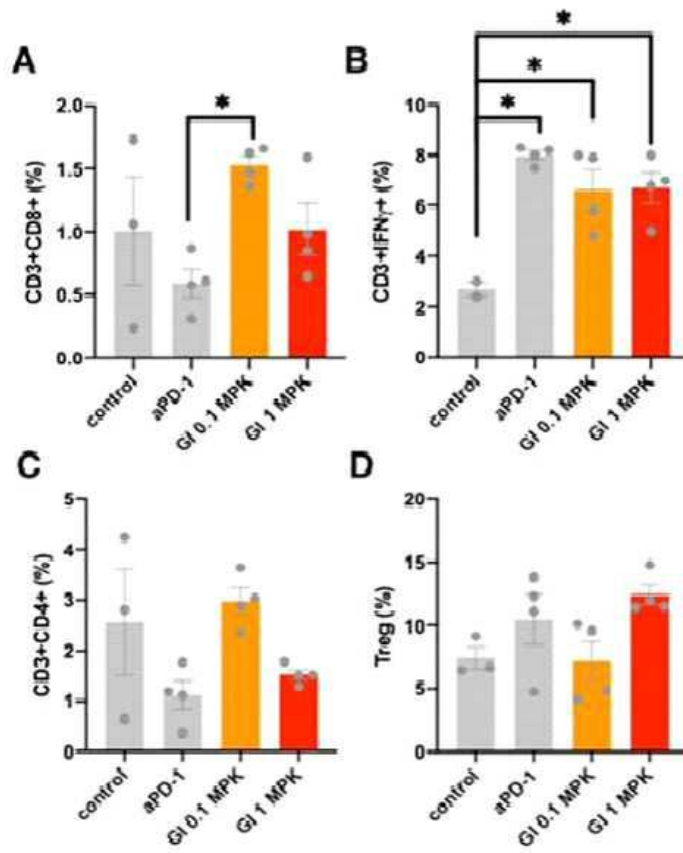


도면58

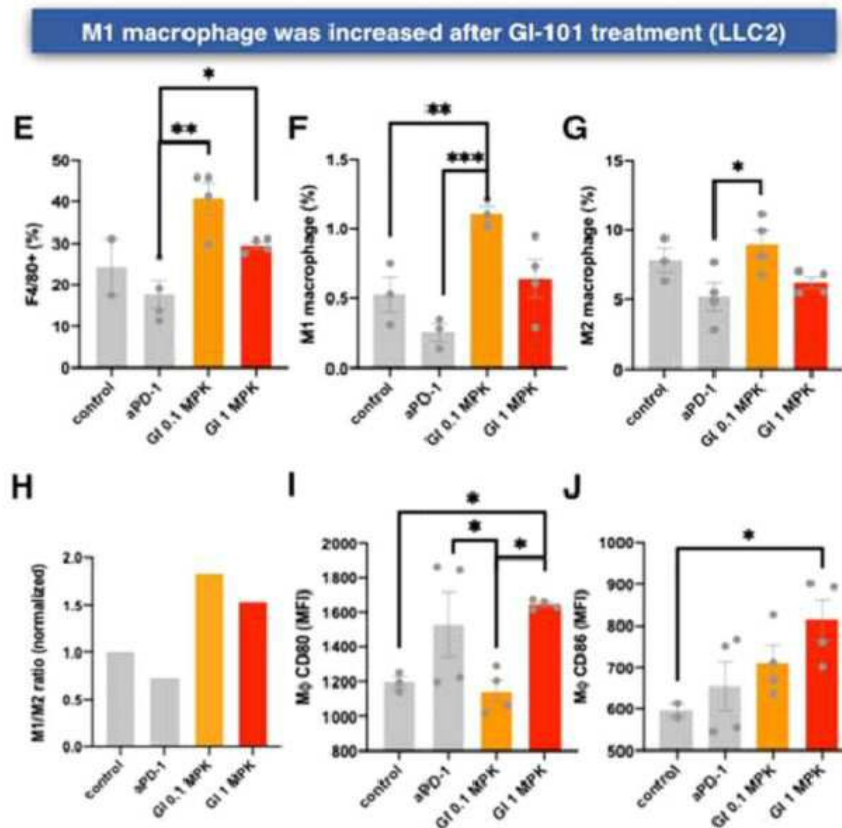


도면59

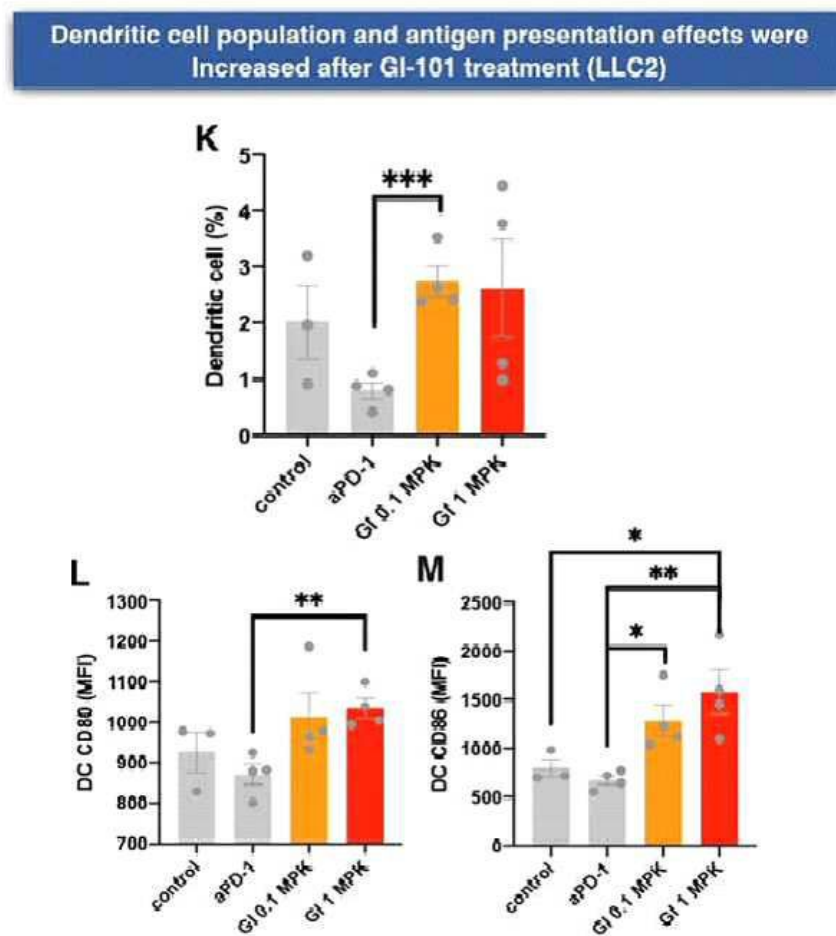
IFN-gamma expressing T cell was increased after GI-101 treatment
But, not increased regulatory T cell population in tumor



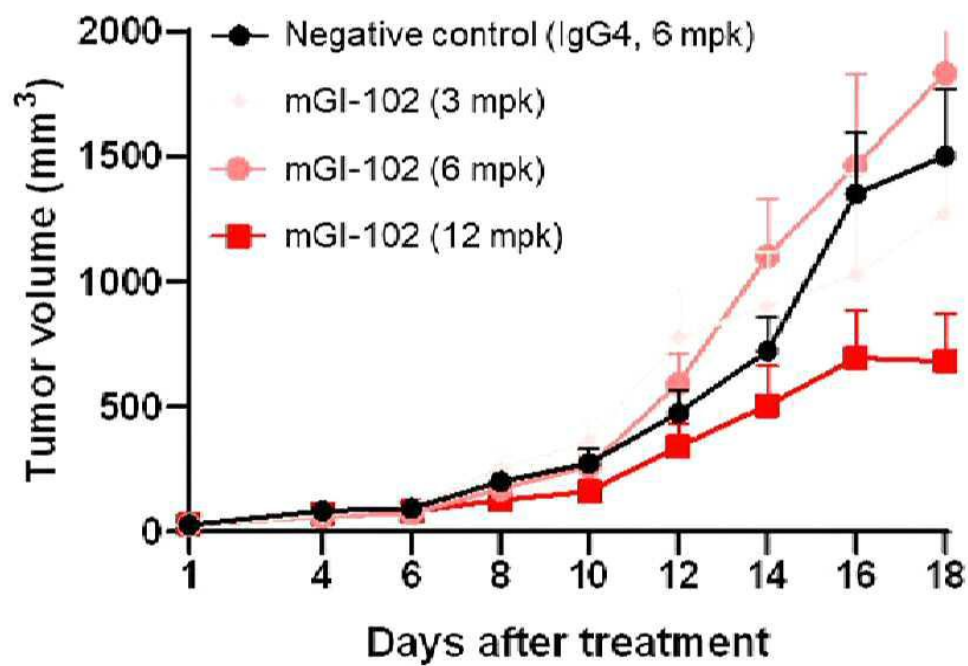
도면60



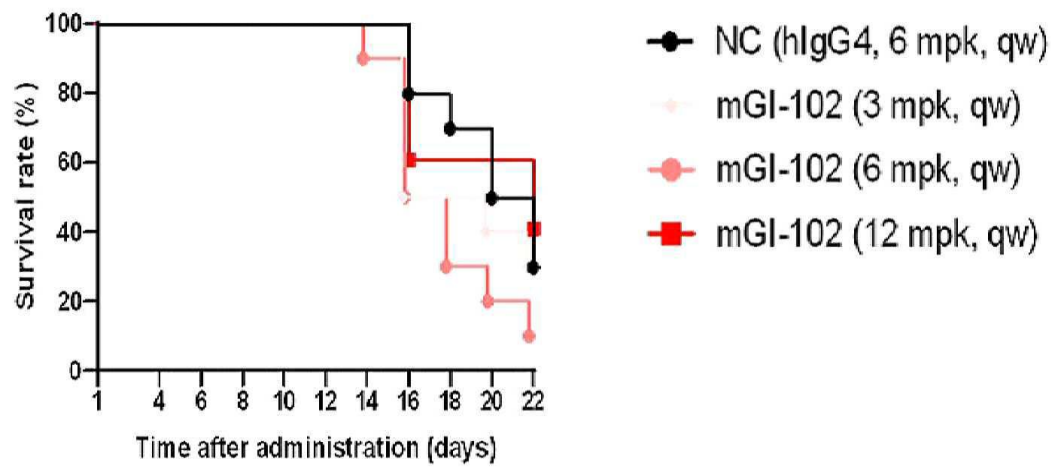
도면61



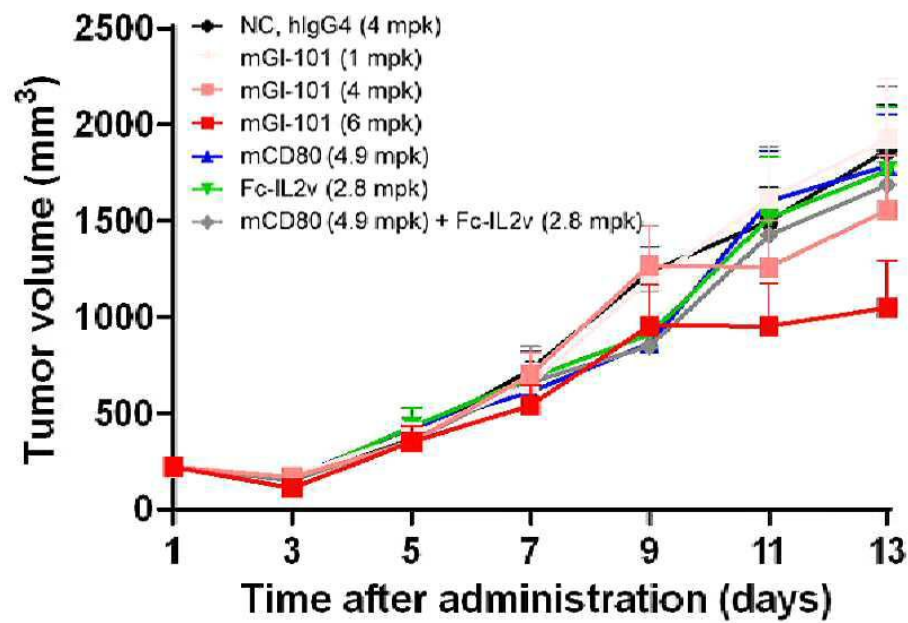
도면62



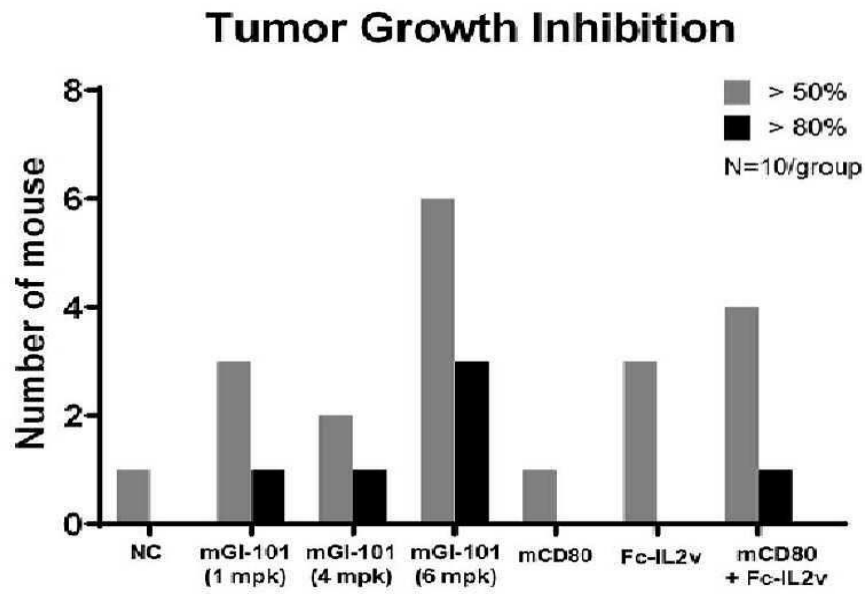
도면63



도면64



도면65



도면66

A 2-Week Intravenous Dose Toxicity Study of GI-101 in Cynomolgus Monkeys

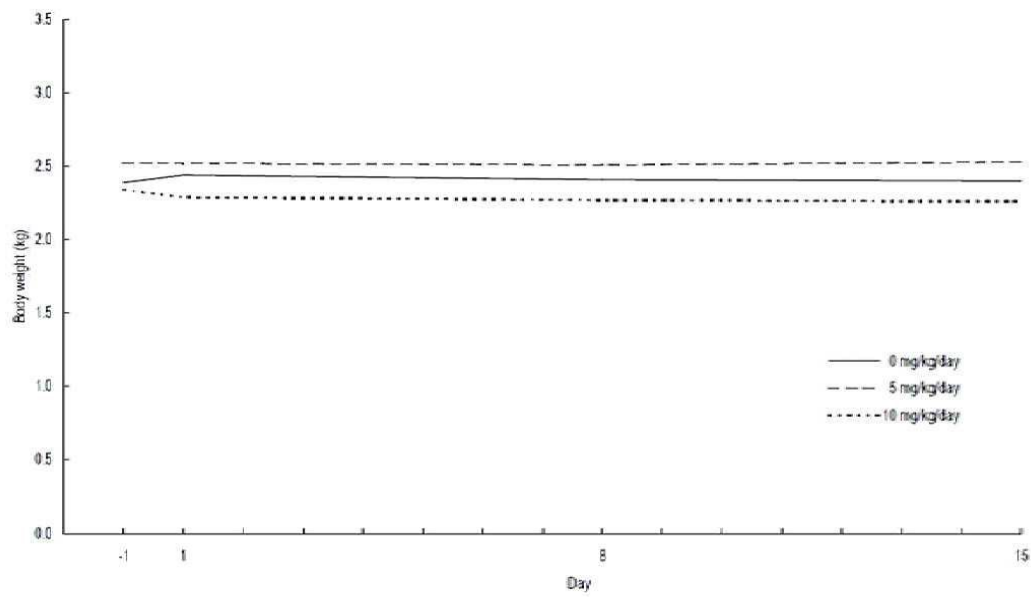
Table 1 Clinical observations

Sex: Male

Group	Animal No.	Day														Day of necropsy	
		-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14
0 mg/kg/day	CJ1M01	am	Pre	0.5h	am	am	am	am	am	Pre	0.5h	am	am	am	am	am	am
	CJ1M02	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	CJ1M03	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
5 mg/kg/day	CJ2M01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	CJ2M02	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	CJ2M03	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
10 mg/kg/day	CJ3M01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	CJ3M02	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	CJ3M03	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

General Footnote: Pre: Pre-dosing 0.5 h, 0.5 hours post-dosing
NA: No clinical or fecal abnormalities

도면67



도면68

Sex: Male		0 mg/kg/day	5 mg/kg/day	10 mg/kg/day
Day(s) Relative to Start Date				
-1	Mean	2.39	2.52	2.34
	S.D.	0.10	0.31	0.16
	N	3	3	3
1	Mean	2.44	2.52	2.29
	S.D.	0.07	0.31	0.16
	N	3	3	3
8	Mean	2.41	2.51	2.27
	S.D.	0.12	0.34	0.08
	N	3	3	3
15	Mean	2.40	2.53	2.26
	S.D.	0.12	0.34	0.11
	N	3	3	3

Statistical Test: Generalised Anova/Ancova Test Transformation: Identity (No Transformation)

A 2-Week Intravenous Dose Toxicity Study of GI-101 in Cynomolgus Monkeys

[illegible]

도면 70

Sex: Male			0 mg/kg/day	5 mg/kg/day	10 mg/kg/day
Day(s) Relative to Start Date					
%Retic. (%)	-2	Mean	0.75	1.40	0.93
		S.D.	0.07	0.52	0.30
		N	3	3	3
	15	Mean	1.67	3.10 d ^a	3.14 d ^a
		S.D.	0.61	0.55	0.32
		N	3	3	3
#Retic (10 ⁹ /L)	-2	Mean	44.0	81.9	55.1
		S.D.	7.0	28.4	19.7
		N	3	3	3
	15	Mean	91.5	171.6 d ^a	161.5 d ^a
		S.D.	33.6	32.3	17.2
		N	3	3	3
PLT (10 ³ μL)	-2	Mean	404	380	380
		S.D.	25	90	28
		N	3	3	3
	15	Mean	501	522	601
		S.D.	29	135	85
		N	3	3	3

도면71

Sex: Male			0 mg/kg/day	5 mg/kg/day	10 mg/kg/day
Day(s) Relative to Start Date					
WBC (10 ³ /μL)	-2	Mean	10.59	8.18	8.29
		S.D.	1.63	1.43	2.11
		N	3	3	3
	15	Mean	8.09	12.08	16.52
		S.D.	0.25	0.74	6.81
		N	3	3	3
%Neut (%)	-2	Mean	38.1	23.1	23.6
		S.D.	23.2	3.2	13.1
		N	3	3	3
	15	Mean	35.9	14.5	22.4
		S.D.	14.3	2.1	14.2
		N	3	3	3
%Lymph (%)	-2	Mean	57.7	71.6	69.8
		S.D.	21.7	2.8	13.7
		N	3	3	3
	15	Mean	59.6	81.2	69.5
		S.D.	13.1	1.4	15.0
		N	3	3	3

도면72

Sex: Male			0 mg/kg/day	5 mg/kg/day	10 mg/kg/day
Day(s) Relative to Start Date					
#Neut (10 ³ /μL)	-2	Mean	4.24	1.86	1.77
		S.D.	3.09	0.22	0.52
		N	3	3	3
	15	Mean	2.93	1.76	3.11
		S.D.	1.26	0.35	0.63
		N	3	3	3
#Lymph (10 ³ /μL)	-2	Mean	5.92	5.87	5.98
		S.D.	1.78	1.24	2.54
		N	3	3	3
	15	Mean	4.80	9.80	12.05
		S.D.	0.94	0.48	6.47
		N	3	3	3
#Mono (10 ³ /μL)	-2	Mean	0.36	0.37	0.45
		S.D.	0.10	0.09	0.08
		N	3	3	3
	15	Mean	0.32	0.33	0.77 d ^b
		S.D.	0.11	0.06	0.26
		N	3	3	3

도면73

Sex: Male			0 mg/kg/day	5 mg/kg/day	10 mg/kg/day
Day(s) Relative to Start Date					
AST (U/L)	-2	Mean	36	45	30
		S.D.	19	21	7
		N	3	3	3
	15	Mean	24	34	33
		S.D.	5	5	8
		N	3	3	3
ALT (U/L)	-2	Mean	58	72	34
		S.D.	51	71	8
		N	3	3	3
	15	Mean	34	52	36
		S.D.	6	44	5
		N	3	3	3
ALP (U/L)	-2	Mean	1511	1658	1972
		S.D.	542	258	357
		N	3	3	3
	15	Mean	1395	1444	1565
		S.D.	365	346	235
		N	3	3	3

도면74

Sex: Male			0 mg/kg/day	5 mg/kg/day	10 mg/kg/day
Day(s) Relative to Start Date					
LD (U/L)	-2	Mean	255	289	292
		S.D.	6	57	47
		N	3	3	3
	15	Mean	236	304	361 dd ^a
		S.D.	15	47	38
		N	3	3	3
CK (U/L)	-2	Mean	132	140	182
		S.D.	23	4	61
		N	3	3	3
	15	Mean	120	128	140
		S.D.	31	19	23
		N	3	3	3
GLU (mg/dL)	-2	Mean	98	91	112
		S.D.	17	4	15
		N	3	3	3
	15	Mean	87	88	104
		S.D.	9	17	5
		N	3	3	3

도면75

Sex: Male			0 mg/kg/day	5 mg/kg/day	10 mg/kg/day
Day(s) Relative to Start Date					
BIL (mg/dL)	-2	Mean	0.10	0.15 ^{a†}	0.10
		S.D.	0.02	0.03	0.01
		N	3	3	3
	15	Mean	0.11	0.15	0.10
		S.D.	0.04	0.03	0.03
		N	3	3	3
UN (mg/dL)	-2	Mean	19.1	15.4	18.8
		S.D.	7.2	2.3	4.5
		N	3	3	3
	15	Mean	16.2	13.9	14.2
		S.D.	5.6	0.7	2.4
		N	3	3	3
CRE (mg/dL)	-2	Mean	0.73	0.69	0.73
		S.D.	0.07	0.17	0.10
		N	3	3	3
	15	Mean	0.72	0.66	0.65
		S.D.	0.06	0.13	0.11
		N	3	3	3

도면76

Sex: Male			0 mg/kg/day	5 mg/kg/day	10 mg/kg/day
Day(s) Relative to Start Date					
CHO (mg/dL)	-2	Mean	109	162	147
		S.D.	23	59	47
		N	3	3	3
	15	Mean	108	159	143
		S.D.	24	46	34
		N	3	3	3
TG (mg/dL)	-2	Mean	44	27	40
		S.D.	24	12	2
		N	3	3	3
	15	Mean	35	29	34
		S.D.	2	14	14
		N	3	3	3
PL (mg/dL)	-2	Mean	180	236	220
		S.D.	48	43	65
		N	3	3	3
	15	Mean	164	216	196
		S.D.	31	52	40
		N	3	3	3

도면77

Sex: Male			0 mg/kg/day	5 mg/kg/day	10 mg/kg/day
Day(s) Relative to Start Date					
IP (mg/dL)	-2	Mean	5.16	5.14	5.00
		S.D.	1.16	0.91	0.90
		N	3	3	3
	15	Mean	5.52	5.94	5.66
		S.D.	0.61	0.61	0.94
		N	3	3	3
CA (mg/dL)	-2	Mean	9.63	9.82	9.79
		S.D.	0.59	0.55	0.19
		N	3	3	3
	15	Mean	9.45	9.48	9.31
		S.D.	0.57	0.25	0.03
		N	3	3	3
NA (mEq/L)	-2	Mean	152.8	154.5	153.9
		S.D.	2.4	4.2	2.5
		N	3	3	3
	15	Mean	151.8	153.5	153.4
		S.D.	3.3	2.0	3.3
		N	3	3	3

도면78

Sex: Male			0 mg/kg/day	5 mg/kg/day	10 mg/kg/day
Day(s) Relative to Start Date					
K (mEq/L)	-2	Mean	4.28	4.17	3.90
		S.D.	0.69	0.29	0.40
		N	3	3	3
	15	Mean	3.99	4.09	3.85
		S.D.	0.50	0.18	0.14
		N	3	3	3
CL (mEq/L)	-2	Mean	112.3	111.1	110.7
		S.D.	2.2	3.9	2.6
		N	3	3	3
	15	Mean	111.5	109.6	110.2
		S.D.	0.7	3.7	2.8
		N	3	3	3
TP (g/dL)	-2	Mean	7.20	7.36	7.53
		S.D.	0.59	0.42	0.22
		N	3	3	3
	15	Mean	6.99	7.22	7.30
		S.D.	0.62	0.37	0.11
		N	3	3	3

도면79

Sex: Male			0 mg/kg/day	5 mg/kg/day	10 mg/kg/day
Day(s) Relative to Start Date					
ALB (g/dL)	-2	Mean	4.18	4.11	4.14
		S.D.	0.34	0.46	0.19
		N	3	3	3
	15	Mean	4.09	3.98	3.88
		S.D.	0.36	0.47	0.17
		N	3	3	3
A/G	-2	Mean	1.39	1.27	1.22
		S.D.	0.06	0.19	0.04
		N	3	3	3
	15	Mean	1.41	1.24	1.13
		S.D.	0.04	0.22	0.07
		N	3	3	3

도면80

[illegible]

도면81

Sex: Male		Interleukin-5 (pg/mL)						Interleukin-8 (pg/mL)						Interleukin-10 (pg/mL)						Interleukin-12 (pg/mL)					
Group	Animal No.	Pretest	Day 3	Day 8	Day 15	Pretest	Day 3	Day 8	Day 15	Pretest	Day 3	Day 8	Day 15	Pretest	Day 3	Day 8	Day 15	Pretest	Day 3	Day 8	Day 15	Pretest	Day 3	Day 8	Day 15
0 mg/day	C11M01	BLQ	2.95	BLQ	3.34	4047.41	4861.65	7884.37	6733.89	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	C11M02	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	3418.18	1382.07	6035.41	4496.95	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	C11M03	BLQ	2.78	BLQ	BLQ	809.60	905.96	972.78	981.31	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Mean		N.C.	2.87	N.C.	N.C.	2758.40	2383.23	4967.52	3954.05	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
S.D.		N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	1716.78	2159.54	3582.23	2903.93	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
N		0	2	0	1	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5 mg/day	C12M01	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	4800.40	3355.74	5986.48	5511.93	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	C12M02	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	2633.61	2388.95	4773.15	5266.00	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	C12M03	BLQ	2.91	BLQ	BLQ	7462.97	6571.61	9663.74	8892.13	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Mean		N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	4972.33	4105.43	6809.46	6556.69	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
S.D.		N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	2429.25	2189.79	2544.64	2026.29	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
N		0	1	0	0	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
10 mg/day	C13M01	BLQ	5.26	BLQ	BLQ	6312.98	2753.66	7101.75	8973.45	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	C13M02	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	7136.73	2722.78	9685.51	9298.79	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	C13M03	BLQ	2.41	BLQ	BLQ	5832.12	4900.91	8873.95	9812.62	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Mean		N.C.	3.84	N.C.	N.C.	7053.94	3459.12	8653.74	9361.62	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
S.D.		N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	1240.98	1249.73	1454.44	423.10	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
N		0	2	0	0	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

General Footnote: Day 8: Prior to dosing

BLQ: Below the lower limit of quantification (12 pg/mL for Interleukin-10, 2.6 pg/mL for the others)

When plasma concentrations were BLQ in 1 of the 3 animals, the mean of the 2 remaining animals was calculated.

The mean was regarded as N.C. when plasma concentrations in 2 of the 3 animals were BLQ.

N.C.: Not calculated

1 (a) - Test: Dunnett's Test (p < 0.05)

도면82

Sex	Week	Group	Animal No.	T cell					Ratio in lymphocytes (%)														
				CD4 T cell	Regulatory T cell				NK cell	CD8 T cell				Regulatory T cell									
					D3	D8	D15	Pre		D3	D8	D15	Pre	D3	D8	D15	Pre	D3	D8	D15			
♀	day 0	CA1M01	482	57.1	57.0	53.3	28.0	34.9	34.6	32.9	Pre	15.1	15.3	16.0	13.5	1.3	1.5	1.6	38.4	33.5	34.4	37.1	
		CA1M02	634	68.5	67.3	55.2	27.3	29.6	25.4	19.0	35.7	31.7	35.6	39.4	0.8	0.9	0.8	0.7	18.3	10.9	20.3	30.5	
		CA1M03	554	70.8	61.2	51.6	27.5	38.7	29.9	22.3	22.5	26.9	26.3	24.8	1.3	1.7	1.3	1.5	31.7	16.6	29.0	35.5	
	day 10	Mean	580	65.5	61.8	53.4	27.6	34.4	30.0	24.7	24.4	24.6	26.0	22.9	1.1	1.4	1.2	1.3	29.5	20.3	27.9	34.4	
		S.D.	10.3	7.3	5.2	1.8	0.4	4.6	4.6	7.3	10.4	8.4	9.8	8.6	0.3	0.4	0.4	0.5	10.2	11.8	7.1	3.4	
		N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
	day 15	CA2M01	626	66.7	60.8	59.7	25.0	55.3	22.7	17.1	32.2	25.1	32.2	35.4	1.0	4.4	2.0	2.0	26.0	4.4	28.2	29.6	
		CA2M02	527	75.9	55.3	51.9	22.7	41.0	24.3	19.4	24.8	28.2	25.6	25.6	0.8	3.5	2.6	1.6	27.2	6.3	28.9	34.4	
		CA2M03	610	78.0	62.9	59.3	17.2	31.0	16.2	17.2	38.0	39.4	40.8	36.4	0.8	3.5	2.5	2.6	19.0	6.9	17.8	21.3	
	♂	day 0	Mean	588	60.2	59.7	57.0	21.6	42.4	21.1	17.9	31.7	29.9	32.9	32.5	0.9	3.5	2.5	2.1	24.1	5.9	29.0	28.4
S.D.			5.3	5.7	3.9	4.4	4.0	12.2	4.3	1.3	6.6	7.5	7.6	6.0	0.1	0.5	0.3	0.5	4.4	1.3	6.2	6.6	
N			3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
day 10		CA3M01	693	80.8	73.6	69.8	15.2	32.7	18.3	18.0	43.8	44.8	45.4	44.1	0.8	4.8	1.3	1.0	2.5	17.1	6.5	14.1	15.1
		CA3M02	652	86.4	65.4	66.0	18.4	28.4	13.7	16.6	39.0	40.8	42.1	37.3	0.6	2.8	1.6	1.9	16.0	3.8	14.8	15.3	
		CA3M03	702	89.7	76.8	74.0	19.2	46.7	23.8	28.2	44.5	33.8	44.9	37.5	1.0	7.5	4.6	5.9	17.5	3.0	10.6	16.5	
day 15		Mean	682	85.6	71.9	69.9	17.5	35.9	18.6	20.9	42.6	39.1	44.1	39.6	0.8	4.8	3.1	3.4	16.9	4.4	13.2	15.6	
		S.D.	2.7	4.5	5.9	4.0	2.1	9.6	5.1	6.3	3.1	8.4	1.8	3.9	0.2	2.5	1.5	2.2	0.8	1.8	2.3	0.8	
		N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
General Footnote: Pre: Pre-test; D3, D8 and D15: Days 3, 8 (prior to dosing) and 15																							
[d = Test Current 2 Sided p < 0.05]																							
2 [sd = Test Current 2 Sided p < 0.01]																							

도면83

Sex: Male													
Group	Animal No.	Lymphocytes (10 ³ /μL)		Absolute count (10 ³ /μL)									
				T cell		CD4 T cell		CD8 T cell		Regulatory T cell		NK cell	
		Pre	D15	Pre	D15	Pre	D15	Pre	D15	Pre	D15	Pre	D15
0 mg/kg/day	CJ1M01	7.40	5.60	3.64	2.98	2.07	1.84	1.12	0.76	0.10	0.09	2.84	2.08
	CJ1M02	6.42	5.03	4.46	2.78	1.75	0.96	2.29	1.53	0.05	0.04	1.17	1.53
	CJ1M03	3.94	3.77	2.18	1.95	1.08	0.84	0.89	0.93	0.05	0.06	1.25	1.34
	Mean	5.92	4.80	3.43	2.57	1.63	1.21	1.43	1.07	0.07	0.06	1.75	1.65
	S.D.	1.78	0.94	1.15	0.55	0.51	0.55	0.75	0.40	0.03	0.03	0.94	0.38
5 mg/kg/day	CJ2M01	5.01	9.42	3.14	5.62	1.25	1.61	1.61	3.33	0.05	0.19	1.30	2.79
	CJ2M02	7.29	10.34	3.84	5.37	1.65	2.01	1.81	2.65	0.06	0.17	1.98	3.56
	CJ2M03	5.32	9.63	3.25	5.71	0.92	1.66	2.02	3.51	0.04	0.25	1.01	2.05
	Mean	5.87	9.80	3.41	5.57	1.27	1.76	1.81	3.16	0.05	0.20	1.43	2.80
	S.D.	1.24	0.48	0.38	0.18	0.37	0.22	0.21	0.45	0.01	0.04	0.50	0.76
10 mg/kg/day	CJ3M01	8.38	13.41	5.81	9.36	1.27	2.41	3.67	5.91	0.07	0.34	1.43	2.02
	CJ3M02	6.25	17.73	4.08	11.70	1.15	2.94	2.44	6.61	0.04	0.34	1.00	2.71
	CJ3M03	3.32	5.01	2.33	3.71	0.64	1.41	1.49	1.68	0.03	0.30	0.58	0.83
	Mean	5.98	12.05	4.07	8.26	1.02	2.25	2.53	4.80	0.05	0.33	1.00	1.85
	S.D.	2.54	6.47	1.74	4.11	0.33	0.78	1.09	2.55	0.02	0.02	0.43	0.95
General Footnote: Pre: Pretest		D15: Day 15											
1 [d - Test: Dunnett 2 Sided p < 0.05]		2 [dd - Test: Dunnett 2 Sided p < 0.01]											

도면84

Sex: Male																	
Group	Animal No.	Ratio to baseline (pretest, %)															
		T cell				CD4 T cell				CD8 T cell				Regulatory T cell			
		Pre	D3	D8	D15	Pre	D3	D8	D15	Pre	D3	D8	D15	Pre	D3	D8	D15
0 mg/kg/day	CJ1M01	1.00	1.16	1.16	1.08	1.00	1.25	1.24	1.18	1.00	1.01	1.06	0.89	1.00	1.15	1.15	1.23
	CJ1M02	1.00	0.99	0.97	0.80	1.00	1.06	0.93	0.70	1.00	0.89	1.00	0.85	1.00	1.13	1.00	0.88
	CJ1M03	1.00	1.28	1.10	0.93	1.00	1.41	1.09	0.81	1.00	1.20	1.17	1.10	1.00	1.31	1.00	1.15
	Mean	1.00	1.14	1.08	0.94	1.00	1.25	1.09	0.90	1.00	1.03	1.08	0.95	1.00	1.20	1.05	1.09
	S.D.	0.00	0.15	0.10	0.14	0.00	0.17	0.16	0.25	0.00	0.16	0.09	0.13	0.00	0.10	0.09	0.18
5 mg/kg/day	CJ2M01	1.00	1.38	0.97	0.95	1.00	2.21	0.91	0.68	1.00	0.78	1.00	1.10	1.00	4.40	2.00	2.00
	CJ2M02	1.00	1.44	1.05	0.98	1.00	1.81	1.07	0.85	1.00	1.14	1.03	1.03	1.00	4.50	3.25	2.00
	CJ2M03	1.00	1.28	1.03	0.97	1.00	1.80	0.94	1.00	1.00	1.04	1.07	0.96	1.00	4.38	3.13	3.25
	Mean	1.00	1.37	1.02	0.97	1.00	1.94	0.97	0.84	1.00	0.99	1.03	1.03	1.00	4.43	2.79	2.42
	S.D.	0.00	0.08	0.04	0.02	0.00	0.23	0.09	0.16	0.00	0.19	0.04	0.07	0.00	0.06	0.69	0.72
10 mg/kg/day	CJ3M01	1.00	1.17	1.06	1.01	1.00	2.15	1.20	1.18	1.00	0.79	1.04	1.01	1.00	5.13	3.75	3.13
	CJ3M02	1.00	1.33	1.00	1.01	1.00	1.54	0.74	0.90	1.00	1.25	1.08	0.96	1.00	4.67	2.67	3.17
	CJ3M03	1.00	1.28	1.09	1.05	1.00	2.43	1.24	1.47	1.00	0.75	1.00	0.84	1.00	7.60	4.60	5.90
	Mean	1.00	1.26	1.05	1.02	1.00	2.04	1.06	1.18	1.00	0.93	1.04	0.94	1.00	5.80	3.67	4.07
	S.D.	0.00	0.08	0.05	0.02	0.00	0.46	0.28	0.29	0.00	0.28	0.04	0.09	0.00	1.58	0.97	1.59
General Footnote: Pre: Pretest		D3, D8 and D15: Days 3, 8 (prior to dosing) and 15															
1 [d - Test: Dunnett 2 Sided p < 0.05]		2 [dd - Test: Dunnett 2 Sided p < 0.01]															

도면85

Sec 14a

Group	Animal No	Ratio in each cell type (%)																			
		K67+T cell		K67+CD4 T cell		K67+CD8 T cell		K67+Treg		K67+ICOS+Treg		ICOS+Treg		K67+NK cell							
0	CJ1M01	Pre	03	08	015	Pre	03	08	015	Pre	03	08	015	Pre	03	08	015	Pre	03	08	015
	CJ1M02	9.6	7.6	9.1	10.3	9.3	5.8	7.7	7.9	6.3	5.8	7.2	9.2	30.6	23.4	23.9	23.2	28.5	20.7	20.3	21.1
	CJ1M03	10.9	8.2	7.6	10.0	7.5	7.1	7.3	10.7	11.7	7.3	6.5	7.5	14.7	16.8	28.0	24.4	13.8	13.5	24.7	20.3
mg/kg/day	CJ1M01	10.1	7.2	12.6	16.8	7.5	5.3	7.2	15.1	12.3	8.2	17.2	16.6	34.5	24.1	28.7	46.8	29.4	20.1	25.5	38.2
	CJ1M02	10.1	7.2	12.6	16.8	7.5	5.3	7.2	15.1	12.3	8.2	17.2	16.6	34.5	24.1	28.7	46.8	29.4	20.1	25.5	38.2
	CJ1M03	10.1	7.2	12.6	16.8	7.5	5.3	7.2	15.1	12.3	8.2	17.2	16.6	34.5	24.1	28.7	46.8	29.4	20.1	25.5	38.2
	Mean	10.2	7.7	9.8	12.4	8.1	6.1	7.4	11.2	10.1	7.1	10.3	11.1	26.6	21.4	26.9	31.5	23.9	18.1	23.5	28.5
	S.D.	0.7	0.5	2.6	3.8	1.0	0.9	0.3	3.6	3.3	1.2	6.0	4.8	10.5	4.0	2.6	13.3	8.8	3.9	2.8	10.1
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
5	CJ2M01	10.4	16.9	40.5	30.5	9.6	13.3	16.2	15.2	10.2	21.5	53.3	34.4	40.4	41.9	68.9	62.0	35.5	33.1	51.5	45.2
	CJ2M02	6.6	14.6	36.8	24.6	5.4	13.7	22.7	11.5	5.2	19.3	46.4	26.4	29.2	39.2	63.0	43.4	25.0	32.0	55.4	30.8
	CJ2M03	9.9	13.4	48.9	31.6	11.7	11.7	28.6	17.2	8.1	13.4	54.6	36.3	39.4	28.2	61.7	49.8	32.3	22.8	40.4	25.3
mg/kg/day	CJ2M01	10.4	16.9	40.5	30.5	9.6	13.3	16.2	15.2	10.2	21.5	53.3	34.4	40.4	41.9	68.9	62.0	35.5	33.1	51.5	45.2
	CJ2M02	6.6	14.6	36.8	24.6	5.4	13.7	22.7	11.5	5.2	19.3	46.4	26.4	29.2	39.2	63.0	43.4	25.0	32.0	55.4	30.8
	CJ2M03	9.9	13.4	48.9	31.6	11.7	11.7	28.6	17.2	8.1	13.4	54.6	36.3	39.4	28.2	61.7	49.8	32.3	22.8	40.4	25.3
	Mean	10.2	15.4	40.4	28.9	8.3	12.8	18.3	14.1	8.5	17.9	50.8	33.7	39.7	40.3	54.5	51.4	33.7	24.9	49.1	33.8
	S.D.	0.7	0.5	2.6	3.8	1.0	0.9	0.3	3.6	3.3	1.2	6.0	4.8	10.5	4.0	2.6	13.3	8.8	3.9	2.8	10.1
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
10	CJ3M01	11.4	20.8	51.0	32.9	12.3	16.8	32.8	18.4	9.6	23.7	56.5	36.9	41.9	39.2	68.8	54.5	31.6	28.1	51.3	22.0
	CJ3M02	9.1	21.7	57.2	29.5	8.9	23.1	36.7	13.3	7.5	17.9	63.2	32.5	35.3	51.8	68.3	47.4	32.4	38.1	54.5	31.2
	CJ3M03	9.8	23.0	54.6	32.3	10.6	23.6	28.0	20.4	8.3	19.4	65.3	37.1	38.7	49.3	66.5	61.4	35.5	29.2	42.5	36.6
mg/kg/day	CJ3M01	11.4	20.8	51.0	32.9	12.3	16.8	32.8	18.4	9.6	23.7	56.5	36.9	41.9	39.2	68.8	54.5	31.6	28.1	51.3	22.0
	CJ3M02	9.1	21.7	57.2	29.5	8.9	23.1	36.7	13.3	7.5	17.9	63.2	32.5	35.3	51.8	68.3	47.4	32.4	38.1	54.5	31.2
	CJ3M03	9.8	23.0	54.6	32.3	10.6	23.6	28.0	20.4	8.3	19.4	65.3	37.1	38.7	49.3	66.5	61.4	35.5	29.2	42.5	36.6
	Mean	10.1	21.8	54.3	31.6	10.6	21.2	32.2	17.4	8.5	20.3	61.7	35.5	38.6	45.4	67.9	54.4	35.2	32.1	49.4	29.9
	S.D.	1.2	1.1	3.1	1.8	1.7	3.8	3.9	3.7	1.1	3.0	4.6	2.6	3.3	6.3	12	7.0	2.6	5.4	6.2	7.4
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

도면86

Sex: Male		Absolute count in each cell type (10 ³ /μL)													
		K67 + T cell		K67 + CD4 T cell		K67 + CD8 T cell		K67 + Treg		K67 + ICOS ⁺ Treg		ICOS ⁺ Treg		K67 + NK cell	
		Pre	D15	Pre	D15	Pre	D15	Pre	D15	Pre	D15	Pre	D15	Pre	D15
0	Animal No.														
	Cd3M01	0.35	0.31	0.19	0.15	0.07	0.07	0.03	0.02	0.03	0.02	0.05	0.03	0.20	0.20
	Cd3M02	0.49	0.28	0.13	0.10	0.27	0.11	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.24	0.13
	Cd3M03	0.22	0.33	0.08	0.13	0.11	0.15	0.02	0.03	0.01	0.02	0.02	0.03	0.19	0.34
	Mean	0.36	0.31	0.13	0.13	0.15	0.11	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.21	0.22
	S.D.	0.14	0.03	0.06	0.03	0.11	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.03	0.11
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	5	Cd3M01	0.33	1.71	0.12	0.24	0.16	1.15	0.02	0.12	0.02	0.09	0.02	0.10	0.11
	Cd3M02	0.25	1.32	0.09	0.23	0.09	0.75	0.02	0.07	0.02	0.05	0.03	0.07	0.23	1.06
	Cd3M03	0.32	1.80	0.11	0.29	0.16	1.27	0.02	0.12	0.01	0.06	0.02	0.07	0.08	0.93
5	Animal No.														
	Cd3M01	0.33	1.71	0.12	0.24	0.16	1.15	0.02	0.12	0.02	0.09	0.02	0.10	0.11	1.26
	Cd3M02	0.25	1.32	0.09	0.23	0.09	0.75	0.02	0.07	0.02	0.05	0.03	0.07	0.23	1.06
	Cd3M03	0.32	1.80	0.11	0.29	0.16	1.27	0.02	0.12	0.01	0.06	0.02	0.07	0.08	0.93
	Mean	0.36	0.31	0.13	0.13	0.15	0.11	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.21	0.22
	S.D.	0.14	0.03	0.06	0.03	0.11	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.03	0.11
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	10	Cd3M01	0.66	3.08	0.16	0.44	0.36	2.18	0.03	0.19	0.03	0.07	0.04	0.09	0.48
	Cd3M02	0.37	3.45	0.10	0.39	0.18	2.15	0.01	0.16	0.01	0.11	0.02	0.15	0.13	1.19
	Cd3M03	0.23	1.20	0.07	0.29	0.12	0.70	0.01	0.18	0.01	0.11	0.02	0.15	0.06	0.42
10	Animal No.														
	Cd3M01	0.66	3.08	0.16	0.44	0.36	2.18	0.03	0.19	0.03	0.07	0.04	0.09	0.09	0.48
	Cd3M02	0.37	3.45	0.10	0.39	0.18	2.15	0.01	0.16	0.01	0.11	0.02	0.15	0.13	1.19
	Cd3M03	0.23	1.20	0.07	0.29	0.12	0.70	0.01	0.18	0.01	0.11	0.02	0.15	0.06	0.42
	Mean	0.42	2.58	0.11	0.37	0.22	1.58	0.02	0.18	0.02	0.10	0.03	0.13	0.09	0.70
	S.D.	0.22	1.21	0.05	0.06	0.12	0.85	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.03	0.04	0.43
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	15	Cd3M01	0.66	3.08	0.16	0.44	0.36	2.18	0.03	0.19	0.03	0.07	0.04	0.09	0.48
	Cd3M02	0.37	3.45	0.10	0.39	0.18	2.15	0.01	0.16	0.01	0.11	0.02	0.15	0.13	1.19
	Cd3M03	0.23	1.20	0.07	0.29	0.12	0.70	0.01	0.18	0.01	0.11	0.02	0.15	0.06	0.42
General Exclusion: Pre-Postest		D15 Day 15 Treg Regulatory T cell													
1 g - Test: Dunnett 2 Sides p < 0.05		2 g - Test: Dunnett 2 Sides p < 0.01													

도면87

Sex	Week	Ratio to baseline (percent, %)																												
		K67 + T cell			K67 + CD4 T cell			K67 + CD8 T cell			K67 + Trng			K67 + ICOS + Trng			ICOS + Trng			K67 + NK cell										
		Pre	D3	D8 D15	Pre	D3	D8 D15	Pre	D3	D8 D15	Pre	D3	D8 D15	Pre	D3	D8 D15	Pre	D3	D8 D15	Pre	D3	D8 D15								
♀	Group																													
	mg/kg/day																													
Mean	100	0.75	0.97	1.22	100	0.76	0.92	1.43	100	0.74	1.03	1.15	100	0.67	1.17	1.26	100	0.80	1.12	1.17	100	0.74	0.96	0.97	100	1.40	1.62	1.14		
S.D.	0.00	0.04	0.28	0.29	0.00	0.17	0.08	0.58	0.00	0.16	0.43	0.45	0.00	0.24	0.63	0.46	0.00	0.17	0.58	0.38	0.00	0.02	0.39	0.24	0.00	1.17	1.12	0.65		
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
♂	Group																													
	mg/kg/day																													
Mean	100	1.54	4.47	3.28	100	1.54	2.78	1.73	100	1.21	6.96	4.44	100	1.03	1.84	1.43	100	0.98	1.64	1.09	100	0.84	1.29	0.92	100	2.75	6.06	5.68		
S.D.	0.00	0.44	0.86	0.41	0.00	0.80	1.29	0.35	0.00	0.46	1.86	1.05	0.00	0.31	0.35	0.15	0.00	0.29	0.51	0.27	0.00	0.11	0.23	0.19	0.00	1.04	0.87	0.47		
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
mg/kg/day	C12M01	100	1.82	4.47	2.89	100	1.37	3.27	1.50	100	2.41	6.89	3.84	100	0.94	1.64	1.30	100	0.76	1.36	0.59	100	0.63	1.10	0.53	100	2.10	7.03	4.40	
		C12M02	100	2.38	6.29	3.24	100	2.60	4.01	1.49	100	2.39	8.43	4.33	100	1.47	1.93	1.34	100	1.18	1.68	0.96	100	0.97	1.39	0.91	100	2.69	4.55	3.46
		C12M03	100	2.35	5.57	3.30	100	2.23	2.64	1.92	100	2.34	7.87	4.47	100	1.17	1.72	1.59	100	0.82	1.20	1.03	100	0.67	0.91	0.90	100	3.02	7.18	4.74
	Mean	100	2.18	5.44	3.14	100	2.07	3.11	1.64	100	2.40	7.40	4.21	100	1.19	1.78	1.41	100	0.92	1.41	0.86	100	0.76	1.13	0.78	100	2.60	6.25	4.07	
	S.D.	0.00	0.32	0.92	0.22	0.00	0.63	0.78	0.25	0.00	0.07	1.33	0.33	0.00	0.27	0.15	0.16	0.00	0.23	0.24	0.24	0.00	0.19	0.24	0.22	0.00	0.47	1.48	0.64	
	n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	

General Formula: Pre: Post: 03 D8 and D15 Days 3, 8 (prior to strong) and 15

[6] - Test Duration 2 Sides p < 0.05

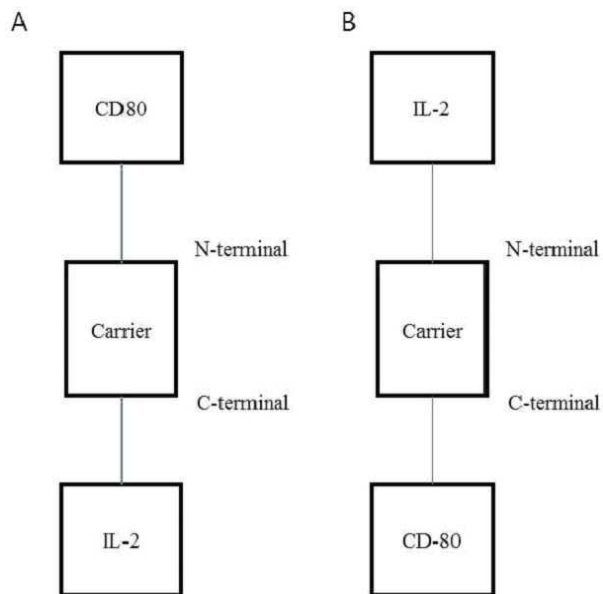
2 [6d] - Test Duration 2 Sides p < 0.01

도면88

Day(s): 15 Relative to Start Date

Sex: Male		0 mg/kg/day	5 mg/kg/day	10 mg/kg/day
Liver (g)	Mean	41.5	42.7	42.1
	S.D.	0.9	7.1	5.6
	N	3	3	3
Liver (%)	Mean	1.73	1.68	1.86
	S.D.	0.09	0.10	0.18
	N	3	3	3
Spleen (g)	Mean	1.727	3.358	3.886 ^{d†}
	S.D.	0.520	0.758	1.087
	N	3	3	3
Spleen (%)	Mean	0.072	0.132	0.171 ^{d†}
	S.D.	0.023	0.025	0.040
	N	3	3	3
Pancreas (g)	Mean	4.27	4.27	3.24
	S.D.	0.54	1.20	0.38
	N	3	3	3

도면89



서열 목록

- <110> GI Innovation, Inc.
- <120> FUSION PROTEIN COMPRISING IL-2 PROTEIN AND CD80 PROTEIN AND USE THEREOF
- <130> FPD201907-0081
- <150> KR 10-2018-0110698
- <151> 2018-09-17
- <150> KR 10-2019-0001867

<151> 2019-01-07
 <150> US 62/832013
 <151> 2019-04-10
 <150> KR 10-2019-0053436
 <151> 2019-05-08
 <160> 37
 <170> KopatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> signal peptide (TPA)
 <400> 1

Met Asp Ala Met Leu Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Ser His Ala
 20 25

<210> 2
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hB7-1:35-242
 <400> 2

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15

Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp

20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn

35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn

50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr

65 70 75 80

Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
85 90 95

Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
100 105 110

Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
115 120 125

Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
130 135 140

Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
145 150 155 160

Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr

165 170 175

Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
180 185 190

Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
195 200 205

<210> 3

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hinge

<400> 3

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

<210> 4

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> immunoglobulin fc

<400> 4

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30
Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
35 40 45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60
Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95
Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
115 120 125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
210 215
<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 6

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIL-2M

<400> 6

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro Lys

35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 7

<211> 617

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> fusion protein comprising variants of IL-2 and fragments of CD80

<400> 7

Met Asp Ala Met Leu Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly

1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Ser His Ala Val Ile His Val Thr Lys Glu

20 25 30

Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu

35 40 45

Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val

50 55 60

Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn

65 70 75 80

Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala

85 90 95

Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr

100 105 110

Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser

115 120 125

Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro

130 135 140

Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro

145 150 155 160

Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile

165 170 175

Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser

180 185 190

Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu

195 200 205

Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr

210 215 220

Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Ser Lys Tyr Gly
 245 250 255
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 260 265 270
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg
 275 280 285

 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 290 295 300
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 305 310 315 320
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 325 330 335
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 340 345 350
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr

 355 360 365
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 370 375 380
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 385 390 395 400
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 405 410 415
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 420 425 430

 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 435 440 445
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala
 450 455 460
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly
 465 470 475 480
 Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu

485 490 495
Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile

500 505 510
Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe

515 520 525
Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu

530 535 540
Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys

545 550 555 560
Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile

565 570 575

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

580 585 590
Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe

595 600 605
Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr

610 615

<210> 8

<211> 1857

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotides coding fusion protein (GI101)

<400> 8

atggatgcta tgctgagagg cctgtgttgc gtgctgtctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg 60

tctccttctc acgtgtgat ccacgtgacc aaagaagtga aagaggtcgc cacactgtcc 120

tcgcgccaca acgtttcagt ggaagaactg gccagacca ggatctactg gcagaaagaa 180

aagaaaaatgg tgctgaccat gatgtccggc gacatgaaca tctggcctga gtacaagaac 240

cggaccatct tcgacatcac caacaacctg tccatctgta ttctggccct gaggccttct 300

gatgagggca cctatgagtg cgtggtgctg aagtacgaga aggacgcctt caagcgcgag 360

cacctggctg aagtgacact gtccgtgaag gccgacttcc ccacaccttc catctccgac 420

ttcgagatcc ctacctcaa catccggcgg atcatctgtt ctacctctgg cggctttcct 480

gagcctcacc tgccttggct ggaaaacggc gaggaactga acgccatcaa caccaccgtg 540
tctcaggacc ccgaaaccga gctgtacgct gtgtcctcca agctggactt caacatgacc 600
accaaccaca gcttcatgtg cctgattaag tacggccacc tgagagtga ccagaccttc 660
aactggaaca ccaccaagga agagcacttc cctgacaatg gatctggcgg cggaggttct 720
ggcggaggtg gaagcggagg cggaggatct gctgagtcta agtatggccc tccttgcct 780
ccatgtcctg ctccagaagc tgctggcgga cctctgtgt tctgtttcc tccaaagcct 840
aaggaccagc tcatgatctc tcggacaccc gaagtacct gcgtggtggt ggatgtgtct 900

caagaggacc ctgaggtgca gttcaattgg tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc 960
aagaccaagc ctagagagga acagtccaac tccacctaca gagtgggtgc cgtgctgacc 1020
gtgctgcacc aggattggct gaacggcaaa gactacaagt gcaagggtgc caacaagggc 1080
ctgccttcca gcatcgaata gaccatctcc aaggctaagg gccagcctag ggaaccccag 1140
gtttacacc tgcctccaag ccaagaggaa atgaccaaga accaggtgct cctgacctgc 1200
ctggtcaagg gcttctaccc ttccgacatt gccgtggaat gggagtcca tggccagcct 1260
gagaacaact acaagaccac acctcctgtg ctggactcgg acggtcctt ctttctgtac 1320

tctcgctga ccgtggacaa gtctagatgg caagagggca acgtgttctc ctgctctgtg 1380
ctgcacgagg cctgcacaa tcaactaccc cagaagtccc tgtctctgtc tcttggaggt 1440
ggtggcggtt ctgcccctac cagtcctct accaagaaaa ccagctcca gttggagcat 1500
ctgctgctgg acctccagat gattctgaac gggatcaaca actataagaa cccaagctg 1560
accgccatgc tgaccgctaa gttctacatg cccaagaagg ccaccgagct gaagcacctc 1620
cagtgcctgg aagaagaact gaagccctg gaagaggtgc tgaatctggc ccagtccaag 1680
aacttcacc tgaggccacg ggacctgatc agcaacatca acgtgatcgt gctggaactg 1740

aagggtccg agacaacctt tatgtgcgag tacgccgacg agacagccac catcgtggaa 1800
tttctgaacc ggtggatcac cttctgccag agcatcatct ccacactgac ctgatga 1857

<210> 9

<211> 592

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> fusion protein (GI101)

<400> 9

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys

1 5 10 15

Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp

20					25					30						
Gln	Lys	Glu	Lys	Lys	Met	Val	Leu	Thr	Met	Met	Ser	Gly	Asp	Met	Asn	
35					40					45						
Ile	Trp	Pro	Glu	Tyr	Lys	Asn	Arg	Thr	Ile	Phe	Asp	Ile	Thr	Asn	Asn	
50					55					60						
Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Leu	Ala	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Glu	Gly	Thr	Tyr	
65					70					75					80	
Glu	Cys	Val	Val	Leu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asp	Ala	Phe	Lys	Arg	Glu	His	
85					90					95						
Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr	Pro	Ser	
100					105					110						
Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro	Thr	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile	Ile	Cys	
115					120					125						
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu	Glu	Asn	
130					135					140						
Gly	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu	
145					150					155					160	
Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met	Thr	Thr	
165					170					175						
Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg	Val	Asn	
180					185					190						
Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro	Asp	Asn	
195					200					205						
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
210					215					220						
Ser	Ala	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	
225					230					235					240	
Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
245					250					255						
Asp	Gln	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
260					265					270						

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 290 295 300
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320

 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 325 330 335
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 355 360 365
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

 385 390 395 400
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430
 Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser
 450 455 460

 Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu
 465 470 475 480
 Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
 485 490 495
 Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
 500 505 510
 Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
 515 520 525

Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu

530

535

540

Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr

545

550

555

560

Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe

565

570

575

Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr

580

585

590

<210> 10

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> hIL-2

<400> 10

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1

5

10

15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20

25

30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

35

40

45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

50

55

60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

65

70

75

80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

85

90

95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100

105

110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile

115

120

125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 11

<211> 288

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD80

<400> 11

Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr

1 5 10 15

Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys

20 25 30

Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu

35 40 45

Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile

50 55 60

Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp

65 70 75 80

Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr

85 90 95

Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly

100 105 110

Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg

115 120 125

Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr

130 135 140

Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile

145 150 155 160

Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu

165 170 175

Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp

180 185 190

Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met

195 200 205
 Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg
 210 215 220
 Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro
 225 230 235 240
 Asp Asn Leu Leu Pro Ser Trp Ala Ile Thr Leu Ile Ser Val Asn Gly
 245 250 255
 Ile Phe Val Ile Cys Cys Leu Thr Tyr Cys Phe Ala Pro Arg Cys Arg
 260 265 270

Glu Arg Arg Arg Asn Glu Arg Leu Arg Arg Glu Ser Val Arg Pro Val
 275 280 285

<210> 12
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> modified Fc
 <400> 12

Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 1 5 10 15
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 20 25 30
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

35 40 45
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 50 55 60
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 65 70 75 80
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 85 90 95
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 100 105 110

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys

115 120 125
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 130 135 140
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 145 150 155 160
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 165 170 175
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser

180 185 190
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 195 200 205

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

210 215

<210> 13

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mCD80

<400> 13

Met Ala Cys Asn Cys Gln Leu Met Gln Asp Thr Pro Leu Leu Lys Phe

1 5 10 15

Pro Cys Pro Arg Leu Ile Leu Leu Phe Val Leu Leu Ile Arg Leu Ser

20 25 30
 Gln Val Ser Ser Asp Val Asp Glu Gln Leu Ser Lys Ser Val Lys Asp

35 40 45

Lys Val Leu Leu Pro Cys Arg Tyr Asn Ser Pro His Glu Asp Glu Ser

50 55 60

Glu Asp Arg Ile Tyr Trp Gln Lys His Asp Lys Val Val Leu Ser Val

65 70 75 80

Ile Ala Gly Lys Leu Lys Val Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Leu

85 90 95

Tyr Asp Asn Thr Thr Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly Leu Val Leu Ser

100 105 110
 Asp Arg Gly Thr Tyr Ser Cys Val Val Gln Lys Lys Glu Arg Gly Thr
 115 120 125
 Tyr Glu Val Lys His Leu Ala Leu Val Lys Leu Ser Ile Lys Ala Asp
 130 135 140
 Phe Ser Thr Pro Asn Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ala Asp Thr
 145 150 155 160
 Lys Arg Ile Thr Cys Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro Arg Phe

165 170 175
 Ser Trp Leu Glu Asn Gly Arg Glu Leu Pro Gly Ile Asn Thr Thr Ile
 180 185 190
 Ser Gln Asp Pro Glu Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Gln Leu Asp
 195 200 205
 Phe Asn Thr Thr Arg Asn His Thr Ile Lys Cys Leu Ile Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Asp Ala His Val Ser Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys Pro Pro Glu Asp
 225 230 235 240

Pro Pro Asp Ser Lys Asn Thr Leu Val Leu Phe Gly Ala Gly Phe Gly
 245 250 255
 Ala Val Ile Thr Val Val Val Ile Val Val Ile Ile Lys Cys Phe Cys
 260 265 270
 Lys His Arg Ser Cys Phe Arg Arg Asn Glu Ala Ser Arg Glu Thr Asn
 275 280 285
 Asn Ser Leu Thr Phe Gly Pro Glu Glu Ala Leu Ala Glu Gln Thr Val
 290 295 300
 Phe Leu

305

<210>

14

<211> 1848

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotides coding fusion protein (mGI101)

<400> 14

atggatgcta tgctgagagg cctgtgttgc gtgctgtctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg	60
tctccttctc acgctgtgga cgagcagctc tccaagtccg tgaaggataa ggtcctgctg	120
ccttggccgtt acaactctcc tcacgaggac gagtctgagg accggatcta ctggcagaaa	180
cacgacaagg tgggtgctgc cgtgatcgcc ggaaagctga aagtgtggcc tgagtacaag	240
aacaggaccc tgtacgacaa caccacctac agcctgatca tcttgggcct cgtgctgagc	300
gatagaggca cctattcttg cgtgggtgcag aagaaagagc ggggcaccta cgaagtgaag	360
cacctggctc tggtaagct gtccatcaag gccgacttca gcaccctaa catcaccgag	420
tctggcaacc ctccgccga caccaagaga atcacctgtt tcgcctctgg cggcttcctt	480
aagcctcggc tctcttggct ggaaaacggc agagagctgc ccggcatcaa taccaccatt	540
tctcaggacc cagagtccga gctgtacacc atctccagcc agctcgactt taacaccacc	600
agaaaccaca ccatcaagt cctgattaag tacggcgacg cccacgtgtc cgaggacttt	660
acttgggaga aacctctga ggacctcct gactctggat ctggcggcgg aggttctggc	720
ggagggtgaa gcgaggcgg aggatctgct gagtctaagt atggccctcc ttgtctcca	780
tgctctgctc cagaagctgc tggcggaccc tctgtgttcc tgtttcctcc aaagcctaag	840
gaccagctca tgatctctcg gaccctgaa gtgacctgcg tgggtggtgga tgtgtctcaa	900
gaggaccctg aggtgcagtt caattggtac gtggacggcg tggaaagtga caacgccaag	960
accaagccta gagaggaaca gttcaactcc acctatagag tgggttccgt gctgaccgtg	1020
ctgcaccagg attggctgaa cggcaaagag tacaagtga aggtgtccaa caagggcctg	1080
ccttcagca tcgaaaagac catcagcaag gctaagggcc agcctaggga accccaggtt	1140
tacacctgc ctccaagcca agaggaaatg accaagaacc aggtgtccct gacctgctg	1200
gtcaagggtc tctacccttc cgacattgcc gtggaatggg agtccaatgg ccagcctgag	1260
aacaactaca agaccacacc tctgtgtctg gactccgacg gctccttctt tctgtactct	1320
cgctgaccg tggacaagtc taggtggcaa gagggcaacg tgttctctg ctctgtgctg	1380
cacgaggctc tgcacaacca ctacaccag aagtcctgt ctctgtctct tggaggtggt	1440
ggcggttctg cccctacctc cagctctacc aagaaaacc agctccagtt ggagcatctg	1500
ctgctggacc tccagatgat cctgaatggc atcaacaatt acaagaacc caagctgacc	1560
gccatgctga ccgctaagtt ctacatgccc aagaaggcca ccgagctgaa gcacttgacg	1620
tgcttggag aggaactgaa gcccctggaa gaagtgtga atctggcca gtccaagaac	1680
ttccacctga ggcttaggga cctgatctcc aacatcaacg tgatcgtgct ggaactgaaa	1740
ggctccgaga caaccttcat gtgcgagtac gccgacgaga cagccacat cgtggaattt	1800

ctgaaccggt ggatcacctt ctgccagagc atcatctcca cactgacc

1848

<210> 15

<211> 616

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> fusion protein (mGI101)

<400

> 15

Met Asp Ala Met Leu Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly

1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Ser His Ala Val Asp Glu Gln Leu Ser Lys

20 25 30

Ser Val Lys Asp Lys Val Leu Leu Pro Cys Arg Tyr Asn Ser Pro His

35 40 45

Glu Asp Glu Ser Glu Asp Arg Ile Tyr Trp Gln Lys His Asp Lys Val

50 55 60

Val Leu Ser Val Ile Ala Gly Lys Leu Lys Val Trp Pro Glu Tyr Lys

65 70 75 80

Asn Arg Thr Leu Tyr Asp Asn Thr Thr Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly

85 90 95

Leu Val Leu Ser Asp Arg Gly Thr Tyr Ser Cys Val Val Gln Lys Lys

100 105 110

Glu Arg Gly Thr Tyr Glu Val Lys His Leu Ala Leu Val Lys Leu Ser

115 120 125

Ile Lys Ala Asp Phe Ser Thr Pro Asn Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro

130 135 140

Ser Ala Asp Thr Lys Arg Ile Thr Cys Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro

145 150 155 160

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

165 170 175

Asn Thr Thr Ile Ser Gln Asp Pro Glu Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser

180 185 190

Ser Gln Leu Asp Phe Asn Thr Thr Arg Asn His Thr Ile Lys Cys Leu

195 200 205
 Ile Lys Tyr Gly Asp Ala His Val Ser Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys

 210 215 220
 Pro Pro Glu Asp Pro Pro Asp Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro

 245 250 255
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val

 260 265 270
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr
 275 280 285

 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 290 295 300
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 305 310 315 320
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

 325 330 335
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

 340 345 350
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

 355 360 365
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 370 375 380
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 385 390 395 400
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

 405 410 415
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

 420 425 430

 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 435 440 445

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu
 450 455 460
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly Gly
 465 470 475 480
 Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 485 490 495
 Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn

500 505 510
 Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr
 515 520 525
 Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu
 530 535 540
 Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn
 545 550 555 560
 Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val
 565 570 575

Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp
 580 585 590
 Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys
 595 600 605
 Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 610 615

<210> 16

<211> 1437

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotides coding fusion protein (GI101C1)

<400> 16

atggatgcta tgctgagagg cctgtgttgc gtgctgctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg 60

tctccttctc acgtgtgat ccacgtgacc aaagaagtga aagaggtcgc cacactgtcc 120

tgcggccaca acgtttcagt ggaagaactg gccagacca ggatctactg gcagaaagaa 180

aagaaaatgg tgctgaccat gatgtccggc gacatgaaca tctggcctga gtacaagaac 240

cggaccatct tcgacatcac caacaacctg tccatcgtga ttctggccct gaggccttct 300
 gatgagggca cctatgagtg cgtggtgctg aagtacgaga aggacgcctt caagcgcgag 360
 cacctggctg aagtgcact gtccgtgaag gccgacttcc ccacaccttc catctccgac 420
 ttcgagatcc ctacctccaa catccggcgg atcatctgtt ctacctctgg cggcttttct 480

gagcctcacc tgtcttggtt ggaaaacggc gaggaactga acgcatcaa caccaccgtg 540
 tctcaggacc ccgaaaccga gctgtacgtt gtgtcctcca agctggactt caacatgacc 600
 accaaccaca gcttcatgtg cctgattaag tacggccacc tgagagtga ccagaccttc 660
 aactggaaca ccaccaagca agagcacttc cctgacaatg gatctggcgg cggaggttct 720
 ggccggaggtg gaagcggagg cggaggatct gctgagtcta agtatggccc tccttgcctt 780
 ccatgtcctg ctccagaagc tgctggcgga cctctgtgtt tcctgtttcc tccaaagcct 840
 aaggaccagc tcatgatctc tcggacaccc gaagtgcctt gcgtggtggt ggatgtgtct 900

caagaggacc ctgagggtgca gttcaattgg tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc 960
 aagaccaagc ctagagagga acagtccaac tccacctaca gagggtgtc cgtgctgacc 1020
 gtgctgcacc aggattggct gaacggcaaa gactacaagt gcaagggtgc caacaagggc 1080
 ctgccttcca gcatcgaata gaccatctcc aaggctaagg gccagcctag ggaaccccag 1140
 gtttacacc tgcctccaag ccaagaggaa atgaccaaga accagggtgc cctgacctgc 1200
 ctggtcaagg gcttctacc ttccgacatt gccgtggaat gggagtccaa tggccagcct 1260
 gagaacaact acaagaccac acctcctgtg ctggactccg acggctcctt ctttctgtac 1320

tctcgctga ccgtggacaa gtctaggtgg caagagggca acgtgttctc ctgctctgtg 1380
 ctgcacgagg cctgcacaa tcactacacc cagaagtcct tgtctctgtc cctgggc 1437

<210> 17

<211> 454

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> fusion protein (GI101C1)

<400> 17

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys

1 5 10 15

Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp

20 25 30

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

35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser

 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175

 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 210 215 220
 Ser Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

 245 250 255
 Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe

290 295 300
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320

 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 325 330 335
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 355 360 365
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

 385 390 395 400
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430
 Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 450
 <210> 18
 <211> 1176

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotides coding fusion protein (GI101C2)

<400> 18

atggatgcta tgetgagagg cctgtgttgc gtgctgctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg	60
tctccatctc acgccgctga gtctaagtac ggccctcctt gtcctccatg tctgtctcca	120
gaagctgctg gcggaccctc tgtgttctctg tttctccaa agcctaagga ccagctcatg	180
atctctcgga ccctgaagt gacctgcgtg gtggtggatg tgtctcaaga ggaccctgag	240

gtgcagtcca attggtacgt ggacggcgtg gaagtgcaca acgccaagac caagcctaga 300

gaggaacagt tcaactccac ctacagagtg gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggat 360

tggtgaacg gcaaagagta caagtgaag gtgtccaaca agggcctgcc ttccagcatc 420

gaaaagacca tctccaaggc taagggccag cctagggaac cccaggttta caccctgcct 480

ccaagccaag aggaaatgac caagaaccag gtgtccctga cctgcctggt caagggttc 540

tacccttcg acattgccgt ggaatgggag tccaatggcc agcctgagaa caactacaag 600

accacacctc ctgtgctgga ctccgacggc tccttctttc tgtactctcg cctgaccgtg 660

gacaagtcta ggtggcaaga gggcaacgtg ttctctgct ctgtgctgca cgaggccctg 720

cacaatcact acaccagaa gtcctgtct ctgtctcttg gcggaggcgg aggatctgct 780

cctacctcca gtcaccacaa gaaaaccag ctccagttgg agcatctgct gctggacctc 840

cagatgatcc tgaatggcat caacaattac aagaaccca agctgaccgc catgctgacc 900

gctaagtctt acatgccaa gaaggccacc gagctgaagc acctccagt cctggaagag 960

gaactgaagc cctggaaga agtgtgta ctggcccagt ccaagaactt ccacctgagg 1020

cctagggacc tgatctccaa catcaacgtg atcgtgctgg aactgaaagg ctccgagaca 1080

accttcatgt gcgagtacgc cgacgagaca gccaccatcg tggaatttct gaaccgtggt 1140

atcaccttct gccagtccat catctccaca ctgacc 1176

<210> 19

<211> 367

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> fusion protein (GI101C2)

<400> 19

Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

1 5 10 15

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

20 25 30

Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

35 40 45

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

50 55 60

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

65					70					75					80				
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp				
					85					90					95				
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro				
					100					105					110				
Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu				
					115					120					125				
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn				
					130					135					140				
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile				
145					150					155					160				
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr				
					165					170					175				
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg				
					180					185					190				
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys				
					195					200					205				
Ser	Val	Leu	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu				
210					215					220									
Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser				
225					230					235					240				
Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln				
					245					250					255				
Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys	Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Ala				
					260					265					270				
Met	Leu	Thr	Ala	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys				
					275					280					285				
His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu				
290					295					300									
Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile				
305					310					315					320				

Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr

325 330 335
Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu

340 345 350
Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr

355 360 365

<210> 20

<211> 1434

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotides coding fusion protein (mGI101C1)

<400> 20

atggatgcta tgctgagagg cctgtgttgc gtgctgctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg 60

tctccttctc acgtgtgga cgagcagctc tccaagtccg tgaaggataa ggtcctgctg 120

ccttgccggt acaactctcc tcacaggac gagtctgagg accggatcta ctggcagaaa 180

cacgacaagg tgggtctgtc cgtgatcgcc ggaaagtga aagtgtggcc tgagtacaag 240

aacaggaccc tgtacgaca caccacctac agcctgatca tcttgggcct cgtgctgagc 300

gatagaggca cctattcttg cgtggtgcag aagaaagagc ggggcaccta cgaagtgaag 360

cacctggctc tggtaagct gtccatcaag gccgacttca gcaccctaa catcaccgag 420

tctggcaacc ctccgccga caccaagaga atcacctgtt tcgcctctgg cggcttcctt 480

aagcctcgggt tctcttggtt ggaaaacggc agagagctgc ccggcatcaa taccaccatt 540

tctcaggacc cagagtccga gctgtacacc atctccagcc agctcgactt taacaccacc 600

agaaaccaca ccatcaagtg cctgattaag tacggcgacg cccacgtgtc cgaggacttt 660

acttgggaga aacctctga ggacctctct gactctggat ctggcggcgg aggttctggc 720

ggagggtggaa gcgaggcggg aggatctgct gactctaagt atggccctcc ttgtctcca 780

tgtctgtctc cagaagctgc tggcggaccc tctgtgttcc tgtttctcc aaagcctaag 840

gaccagctca tgatctctcg gacctctgaa gtgacctgcg tgggtgtgga tgtgtctcaa 900

gaggacctg aggtgcagtt caattggtac gtggacggcg tggaagtga caacccaag 960

accaagccta gagaggaaca gttcaactcc acctatagag tgggtgtccgt gctgaccgtg 1020

ctgcaccagg attggctgaa cggcaaagag tacaagtga aggtgtccaa caaggcctg 1080

ccttcagca tcgaaaagac catcagcaag gctaagggcc agcctaggga accccaggtt 1140

tacacctgc ctccaagcca agaggaaatg accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg 1200
gtcaagggt tctacccttc cgacattgcc gtggaatggg agtccaatgg ccagcctgag 1260
aacaactaca agaccacacc tctgtgctg gactccgacg gctccttctt tctgtactct 1320

cgcctgaccg tggacaagtc taggtggcaa gagggcaacg tgttctcctg ctctgtgctg 1380
cacgaggtc tgcacaacca ctacaccag aagtcctgt ctctgtccct gggc 1434

<210> 21

<211> 478

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> fusion protein (mGI101C1)

<400> 21

Met Asp Ala Met Leu Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly

1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Ser His Ala Val Asp Glu Gln Leu Ser Lys

20 25 30

Ser Val Lys Asp Lys Val Leu Leu Pro Cys Arg Tyr Asn Ser Pro His

35 40 45

Glu Asp Glu Ser Glu Asp Arg Ile Tyr Trp Gln Lys His Asp Lys Val

50 55 60

Val Leu Ser Val Ile Ala Gly Lys Leu Lys Val Trp Pro Glu Tyr Lys

65 70 75 80

Asn Arg Thr Leu Tyr Asp Asn Thr Thr Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly

85 90 95

Leu Val Leu Ser Asp Arg Gly Thr Tyr Ser Cys Val Val Gln Lys Lys

100 105 110

Glu Arg Gly Thr Tyr Glu Val Lys His Leu Ala Leu Val Lys Leu Ser

115 120 125

Ile Lys Ala Asp Phe Ser Thr Pro Asn Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro

130 135 140

Ser Ala Asp Thr Lys Arg Ile Thr Cys Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro

145 150 155 160

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

165										170					175				
Asn	Thr	Thr	Ile	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu	Ser	Glu	Leu	Tyr	Thr	Ile	Ser				
180					185					190									
Ser	Gln	Leu	Asp	Phe	Asn	Thr	Thr	Arg	Asn	His	Thr	Ile	Lys	Cys	Leu				
195					200					205									
Ile	Lys	Tyr	Gly	Asp	Ala	His	Val	Ser	Glu	Asp	Phe	Thr	Trp	Glu	Lys				
210					215					220									
Pro	Pro	Glu	Asp	Pro	Pro	Asp	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly				
225					230					235					240				
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro				
245					250					255									
Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val				
260					265					270									
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Gln	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr				
275					280					285									
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu				
290					295					300									
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys				
305					310					315					320				
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser				
325					330					335									
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys				
340					345					350									
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile				
355					360					365									
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro				
370					375					380									
Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu				
385					390					395					400				
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn				
405					410					415									

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 420 425 430
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 435 440 445
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu
 450 455 460

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 465 470 475

<210> 22

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variants of IL-2 (3M, M45)

<400> 22

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys

35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 23

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variants of IL-2 (3M, M61)

<400> 23

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro Lys

35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Arg Glu Leu Lys

50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 24

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variants of IL-2 (3M, M72)

<400> 24

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro Lys

35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 25

<211> 1851

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotides coding fusion protein (GI102-M45)

<400> 25

atggatgcta tgctgagagg cctgtgttgc gtgctgctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg 60

tctccttctc acgtgtgat ccacgtgacc aaagaagtga aagaggtcgc cacactgtcc 120

tgcgccaca acgtttcagt ggaagaactg gccagacca ggatctactg gcagaaagaa 180

aagaaaatgg tgctgacat gatgtccggc gacatgaaca tctggcctga gtacaagaac 240

cggaccatct tcgacatcac caacaactg tccatcgtga ttctggccct gaggccttct 300

gatgagggca cctatgagtg cgtggtgctg aagtacgaga aggacgcctt caagcgcgag 360

cacctggctg aagtgacact gtccgtgaag gccgactttc ccacaccttc catctccgac 420

ttcgagatcc ctacctcaa catccggcgg atcatctgtt ctacctctgg cggttttct 480

gagcctcacc tgtcttggtt ggaaaacggc gaggaactga acgcatcaa caccaccgtg 540

tctcaggacc ccgaaaccga gctgtacgct gtgtcctcca agctggactt caacatgacc 600
 accaaccaca gtttcatgtg cctgattaag tacggccacc tgagagtga ccagaccttc 660
 aactggaaca ccaccaagca agagcacttc cctgacaatg gatctggcgg cggaggttct 720
 ggcggagggtg gaagcggagg cggaggatct gctgagtccta agtatggccc tccttgcct 780
 ccatgtcctg ctccagaagc tgctggcgga ccctctgtgt tcctgtttcc tccaaagcct 840
 aaggaccagc tcatgatctc tcggacaccc gaagtgcct gcgtggtggt ggatgtgtct 900

caagaggacc ctgagggtga gttcaattgg tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc 960
 aagaccaagc ctagagagga acagttcaac tccacctaca gagtgggtgc cgtgctgacc 1020
 gtgctgcacc aggtattggt gaacggcaaa gagtacaagt gcaagggtgc caacaagggc 1080
 ctgccttcca gcatcgaaaa gaccatctcc aaggctaagg gccagcctag ggaaccccag 1140
 gtttacacc tgcctcaag ccaagaggaa atgaccaaga accagggtgc cctgacctgc 1200
 ctggtcaagg gcttctaccc ttccgacatt gccgtggaat gggagtccaa tggccagcct 1260
 gagaacaact acaagaccac acctcctgtg ctggactccg acggctcctt ctttctgtac 1320

tctcgctga ccgtggacaa gtctagatgg caagaggga acgtgttctc ctgctctgtg 1380
 ctgcacgagg ccctgcacaa tctactaccc cagaagtcct tgtctctgtc tcttgagggt 1440
 ggtggcggtt ctgcccctac cagctcctct accaagaaaa ccagctcca gttggagcat 1500
 ctgctgctgg acctccagat gattctgaac gggatcaaca actataagaa cccaagctg 1560
 accgcatgc tgaccgctaa gttcgccatg cccaagaagg ccaccgagct gaagcacctc 1620
 cagtgcctgg aagaagaact gaagccctg gaagagggtgc tgaatctggc ccagtccaag 1680
 aacttcacc tgaggccacg ggacctgatc agcaacatca acgtgatcgt gctggaactg 1740

aagggtccg agacaacctt tatgtgcgag tacgccgacg agacagccac catcgtggaa 1800
 tttctgaacc ggtggatcac cttctgccag agcatcatct ccacactgac c 1851

<210> 26

<211> 592

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> fusion protein (GI102-M45)

<400> 26

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys

1 5 10 15

Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp

20					25					30						
Gln	Lys	Glu	Lys	Lys	Met	Val	Leu	Thr	Met	Met	Ser	Gly	Asp	Met	Asn	
35					40					45						
Ile	Trp	Pro	Glu	Tyr	Lys	Asn	Arg	Thr	Ile	Phe	Asp	Ile	Thr	Asn	Asn	
50					55					60						
Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Leu	Ala	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Glu	Gly	Thr	Tyr	
65					70					75					80	
Glu	Cys	Val	Val	Leu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asp	Ala	Phe	Lys	Arg	Glu	His	
85					90					95						
Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr	Pro	Ser	
100					105					110						
Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro	Thr	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile	Ile	Cys	
115					120					125						
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu	Glu	Asn	
130					135					140						
Gly	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu	
145					150					155					160	
Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met	Thr	Thr	
165					170					175						
Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg	Val	Asn	
180					185					190						
Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro	Asp	Asn	
195					200					205						
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
210					215					220						
Ser	Ala	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	
225					230					235					240	
Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
245					250					255						
Asp	Gln	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
260					265					270						

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
325 330 335

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser
450 455 460

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu
465 470 475 480

Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
485 490 495

Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
500 505 510

Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
515 520 525

Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu

530 535 540
 Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr
 545 550 555 560
 Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
 565 570 575
 Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 580 585 590

<210> 27
 <211> 1851
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> nucleotides coding fusion protein (GI102-M61)
 <400> 27

atggatgcta tgctgagagg cctgtgttgc gtgctgctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg 60
 tctccttctc acgtgtgat ccacgtgacc aaagaagtga aagaggtcgc cacactgtcc 120
 tgcggccaca acgtttcagt ggaagaactg gccagacca ggatctactg gcagaaagaa 180
 aagaaaatgg tgctgacct gatgtccggc gacatgaaca tctggcctga gtacaagaac 240
 cggaccatct tcgacatcac caacaacctg tccatcgtga ttctggccct gaggccttct 300
 gatgagggca cctatgagtg cgtgggtgctg aagtacgaga aggacgcctt caagcgcgag 360

 cacctggctg aagtacact gtccgtgaag gccgacttcc ccacaccttc catctccgac 420
 ttcgagatcc ctacctcaa catccggcgg atcatctgtt ctacctctgg cggctttcct 480
 gagcctcacc tgtcttggtt ggaaaacggc gaggaactga acgcatcaa caccaccgtg 540
 tctcaggacc ccgaaaccga gctgtacgt gtgtcctcca agctggactt caacatgacc 600
 accaaccaca gttcatgtg cctgattaag tacggccacc tgagagtga ccagaccttc 660
 aactggaaca ccaccaagca agagcacttc cctgacaatg gatctggcgg cggaggttct 720
 ggccggaggtg gaagcggagg cggaggatct gctgagtcta agtatggccc tccttgtcct 780

 ccatgtcctg ctccagaagc tgctggcggc ccctctgtgt tcctgtttcc tccaaagcct 840
 aaggaccagc tcatgatctc tcggacacc gaagtgaact gcgtggtggt ggatgtgtct 900
 caagaggacc ctgaggtgca gttcaattgg tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc 960
 aagaccaagc ctagagagga acagttcaac tccacctaca gattggtgtc cgtgctgacc 1020

gtgctgcacc aggattggct gaacggcaaa gagtacaagt gcaaggtgtc caacaagggc 1080
ctgccttcca gcatcgaaaa gaccatctcc aaggctaagg gccagcctag ggaaccccag 1140
gtttacacc tgcctccaag ccaagaggaa atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc 1200

ctggtcaagg gcttctaccc ttccgacatt gccgtggaat gggagtccaa tggccagcct 1260
gagaacaact acaagaccac acctcctgtg ctggactccg acggctcctt ctttctgtac 1320
tctcgctga ccgtggacaa gtctagatgg caagagggca acgtgttctc ctgctctgtg 1380
ctgcacgagg cctgcacaa tcaactacacc cagaagtccc tgtctctgtc tcttgaggt 1440
ggtggcggtt ctgcccctac cagctcctct accaagaaaa ccagctcca gtggagcat 1500
ctgctgctgg acctccagat gattctgaac gggatcaaca actataagaa cccaagctg 1560
accgccatgc tgaccgctaa gttctacatg cccaagaagg ccaccgagct gaagcacctc 1620

cagtgcctgg aaagggaaact gaagcccctg gaagaggtgc tgaatctggc ccagtccaag 1680
aacttcacc tgaggccacg ggacctgatc agcaacatca acgtgatcgt gctggaactg 1740
aagggtccg agacaacctt tatgtgcgag tacgccgacg agacagccac catcgtggaa 1800
tttctgaacc ggtggatcac cttctgccag agcatcatct ccacactgac c 1851

<210> 28

<211> 592

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> fusion protein (GI102-M61)

<400> 28

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys

1	5	10	15
Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp			
20	25	30	
Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn			
35	40	45	
Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn			
50	55	60	
Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr			
65	70	75	80

Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His

85	90	95	
Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser			
100	105	110	
Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys			
115	120	125	
Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn			
130	135	140	
Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu			
145	150	155	160
Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr			
165	170	175	
Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn			
180	185	190	
Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn			
195	200	205	
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
210	215	220	
Ser Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro			
225	230	235	240
Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys			
245	250	255	
Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val			
260	265	270	
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp			
275	280	285	
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe			
290	295	300	
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp			
305	310	315	320
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu			
325	330	335	
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg			

340 345 350
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 355 360 365

 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430
 Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser
 450 455 460
 Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu
 465 470 475 480
 Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
 485 490 495
 Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
 500 505 510

 Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Arg Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
 515 520 525
 Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
 530 535 540
 Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr
 545 550 555 560
 Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
 565 570 575
 Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr

 580 585 590

<210> 29

<211> 1857

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotides coding fusion protein (GI102-M72)

<400> 29

atggatgcta tgctgagagg cctgtgttgc gtgctgctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg 60

tctccttctc acgtgtgat ccacgtgacc aaagaagtga aagaggctgc cacactgtcc 120

tgcggccaca acgtttcagt ggaagaactg gccagacca ggatctactg gcagaaagaa 180

aagaaaatgg tgctgacat gatgtccggc gacatgaaca tctggcctga gtacaagaac 240

cggaccatct tcgacatcac caacaacctg tccatcgtga ttctggccct gaggccttct 300

gatgagggca cctatgagtg cgtggtgctg aagtacgaga aggacgcctt caagcgcgag 360

cacctggctg aagtgacact gtccgtgaag gccgacttcc ccacaccttc catctccgac 420

ttcgagatcc ctacctcaa catcggcggg atcatctgtt ctacctctgg cggcttttct 480

gagcctcacc tgctttggct ggaaaacggc gaggaactga acgccatcaa caccaccgtg 540

tctcaggacc ccgaaaccga gctgtacgt gtgtcctcca agctggactt caacatgacc 600

accaaccaca gttcatgtg cctgattaag tacggccacc tgagagtga ccagaccttc 660

aactggaaca ccaccaagca agagcacttc cctgacaatg gatctggcgg cggaggttct 720

ggcggagggtg gaagcggagg cggaggatct gctgagtcta agtatggccc tccttgtcct 780

ccatgtcctg ctccagaagc tgctggcggg cctctgtgtt tcctgtttcc tccaaagcct 840

aaggaccagc tcatgatctc tcggacaccc gaagtacat gcgtgggtgt ggatgtgtct 900

caagaggacc ctgagggtgca gttcaattgg tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc 960

aagaccaagc ctagagagga acagttaac tccacctaca gattgggtgc cgtgctgacc 1020

gtgctgcacc aggattggct gaacggcaaa gattacaagt gcaagggtgc caacaagggc 1080

ctgccttcca gcatcgaata gaccatctcc aaggctaagg gccagcctag ggaaccccag 1140

gtttacacc tgctccaag ccaagaggaa atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc 1200

ctggtcaagg gttctaccc ttccgacatt gccgtggaat gggagtccaa tggccagcct 1260

gagaacaact acaagaccac acctcctgtg ctggactccg acggtcctt ctttctgtac 1320

tctcgctga ccgtggacaa gtctagatgg caagagggca acgtgttctc ctgctctgtg 1380

ctgcacgagg cctgcacaa tcaactaccc cagaagtcct tgtctctgtc tcttgaggt 1440

ggtggcgggt ctgcccctac cagtcctct accaagaaaa ccagctcca gttggagcat 1500

ctgtgctgg acctccagat gattctgaac gggatcaaca actataagaa cccaagctg 1560
accgcatgc tgaccgctaa gttctacatg cccaagaagg ccaccgagct gaagcacctc 1620
cagtgcctgg aagaagaact gaagcccctg gaagaggtgc tgaatggggc ccagtccaag 1680
aacttcacc tgaggccacg ggacctgatc agcaacatca acgtgatcgt gctggaactg 1740
aagggtccg agacaacctt tatgtgcgag tacgccgacg agacagccac catcgtggaa 1800
tttctgaacc ggtggatcac cttctgccag agcatcatct ccacactgac ctgatga 1857

<210> 30

<211> 592

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> fusion protein (GI102-M72)

<400> 30

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys

1 5 10 15

Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp

20 25 30

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

35 40 45

Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn

50 55 60

Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr

65 70 75 80

Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His

85 90 95

Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser

100 105 110

Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys

115 120 125

Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn

130 135 140

Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu

145 150 155 160

Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 210 215 220
 Ser Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255
 Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 290 295 300
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 325 330 335
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 355 360 365
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

405	410	415	
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser			
420	425	430	
Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser			
435	440	445	
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser			
450	455	460	
Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu			
465	470	475	480
Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr			
485	490	495	
Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu			
500	505	510	
Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val			
515	520	525	
Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu			
530	535	540	
Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr			
545	550	555	560
Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe			
565	570	575	
Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr			
580	585	590	
<210>	31		
<211>	1851		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	nucleotides coding fusion protein (GI101w)		
<400>	31		
atggatgcta tgctgagagg cctgtgttc gtgctgtgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg			60
tctccttctc acgtgtgat ccacgtgacc aaagaagtg aagaggtcgc cacactgtcc			120

tgcggccaca acgtttcagt ggaagaactg gcccagacca ggatctactg gcagaaagaa 180
 aagaaaatgg tgctgacat gatgtccggc gacatgaaca tctggcctga gtacaagaac 240
 cggaccatct tcgacatcac caacaacctg tccatcgtga ttctggccct gaggccttct 300
 gatgagggca cciatgagtg cgtgggtgctg aagtacgaga aggacgcctt caagcgcgag 360
 cacctggctg aagtacact gtccgtgaag gccgactttc ccacaccttc catctccgac 420
 ttcgagatcc ctacctcaa catccggcgg atcatctgtt ctacctctgg cggctttcct 480
 gagcctcacc tgicttggtt ggaaaacggc gaggaactga acgcatcaa caccaccgtg 540

 tctcaggacc ccgaaaccga gctgtacgt gtgtcctcca agctggactt caacatgacc 600
 accaaccaca gcttcatgtg cctgattaag tacggccacc tgagagtga ccagaccttc 660
 aactggaaca ccaccaagca agagcacttc cctgacaatg gatctggcgg cggaggttct 720
 ggccggaggtg gaagcggagg cggaggatct gctgagtcta agtatggccc tcttgtcct 780
 ccatgtcctg ctccagaagc tgctggcggg ccctctgtgt tctgtttcc tccaaagcct 840
 aaggaccagc tcatgatctc tcggacacc gaagtacct gcgtgggtgt ggatgtgtct 900
 caagaggacc ctgaggtgca gtccaattgg tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc 960

 aagaccaagc ctagagagga acagtcaac tccacctaca gagtgggtgc cgtgctgacc 1020
 gtgtgcacc aggattggct gaacggcaaa gactacaagt gcaagggtgc caacaagggc 1080
 ctgccttcca gcatcgaata gaccatctcc aaggctaagg gccagcctag ggaaccccag 1140
 gtttacacc tgctccaag ccaagaggaa atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc 1200
 ctggtcaagg gcttctaccc ttccgacatt gccgtggaat gggagtcca tggccagcct 1260
 gagaacaact acaagaccac acctcctgtg ctggactccg acggctcctt ctttctgtac 1320
 tctcgctga ccgtggacaa gtctagatgg caagagggca acgtgttctc ctgctctgtg 1380

 ctgcacgagg cctgcacaa tcactacacc cagaagtccc tgtctctgtc tcttgagggt 1440
 ggtggcgggt ctgcccctac cagctcctct accaagaaaa ccagctcca gttggagcat 1500
 ctgctgctgg acctccagat gattctgaac gggatcaaca actataagaa cccaagctg 1560
 acccgcatgc tgaccttta gttctacatg cccaagaagg ccaccgagct gaagcacctc 1620
 cagtgcctgg aagaagaact gaagccctg gaagaggtgc tgaatctggc ccagtccaag 1680
 aacttcacc tgaggccag ggacctgatc agcaacatca acgtgatcgt gctggaactg 1740
 aagggtccg agacaacctt tatgtgcgag tacgccgacg agacagccac catcgtggaa 1800

 tttctgaacc ggtggatcac cttctgccag agcatcatct ccacactgac c 1851

<210> 32

<211> 592

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> fusion protein (GI101w)

<400> 32

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys

1 5 10 15

Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp

20 25 30

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

35 40 45

Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn

50 55 60

Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr

65 70 75 80

Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His

85 90 95

Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser

100 105 110

Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys

115 120 125

Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn

130 135 140

Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu

145 150 155 160

Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr

165 170 175

Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn

180 185 190

Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn

195 200 205

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

210 215 220

Ser Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240
Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255
Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
290 295 300
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
325 330 335
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
355 360 365
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430
Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser
450 455 460
Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu

465 470 475 480
 Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
 485 490 495
 Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
 500 505 510
 Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
 515 520 525
 Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
 530 535 540

Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr
 545 550 555 560
 Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
 565 570 575
 Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 580 585 590

<210> 33
 <211> 1848
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotides coding fusion protein (mGI102-M61)

<400> 33
 atggatgcta tgctgagagg cctgtgttgc gtgctgctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg 60
 tctccttctc acgctgtgga cgagcagctc tccaagtccg tgaaggataa ggtcctgctg 120
 ccttgccggt acaactctcc tcacgaggac gagtctgagg accggatcta ctggcagaaa 180
 caccgacaagg tgggtgctgtc cgtgatcgcc ggaaagtga aagtgtggcc tgagtacaag 240
 aacaggaccc tgiacgacaa caccacctac agcctgatca tcctgggcct cgtgctgagc 300
 gatagaggca cctattcttg cgtggtgcag aagaaagagc ggggcaccta cgaagtgaag 360
 cacctggctc tggtaagct gtccatcaag gccgacttca gcaccctaa catcaccgag 420

 tctggcaacc cticcgcga caccaagaga atcacctgtt tcgcctctgg cggttcctt 480
 aagcctcggt tctcttggt ggaaaacggc agagagctgc ccggcatcaa taccaccatt 540
 tctcaggacc cagagtccga gctgtacacc atctccagcc agctcgactt taacaccacc 600
 agaaaccaca ccatcaagtg cctgattaag tacggcgacg cccacgtgtc cgaggacttt 660

acttgggaga aacctcctga ggacctcct gactctggat ctggcggcgg aggttctggc 720
ggaggtggaa gcggaggcgg aggatctgct gactctaagt atggccctcc ttgtcctcca 780
tgtctgctc cagaagctgc tggcggaccc tctgtgttcc tgtttcctcc aaagcctaag 840

gaccagctca tgatctctcg gaccttgaa gtgacctgcg tggagggtgga tgtgtctcaa 900
gaggacctg aggtgcagtt caattggtac gtggacggcg tggaaagtga caacgccaag 960
accaagccta gagaggaaca gttcaactcc acctatagag tgggtgccgt gctgacctg 1020
ctgcaccagg attggctgaa cggcaaagag tacaagtga aggtgtccaa caagggcctg 1080
ccttcagca tcgaaaagac catcagcaag gctaagggcc agcctaggga accccaggtt 1140
tacacctgc ctccaagcca agaggaaatg accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg 1200
gtcaagggt tctaccttc cgacattgcc gtggaatggg agtccaatgg ccagcctgag 1260

aacaactaca agaccacacc tctgtgctg gactccgacg gtcctttctt tctgtactct 1320
cgctgaccg tggacaagtc taggtggcaa gagggcaacg tgttctcctg ctctgtgctg 1380
cacgaggctc tgcacaacca ctacaccag aagtcctgt ctctgtctct tggaggtggt 1440
ggcggttctg cccctacctc cagctctacc aagaaaacce agtccagtt ggagcatctg 1500
ctgctggacc tccagatgat cctgaatggc atcaacaatt acaagaacce caagtgacc 1560
gccatgctga ccgctaagtt ctacatgcc aagaaggcca ccgagctgaa gcacttgag 1620
tgctggaaa gggaactgaa gccctggaa gaagtgtga atctggcca gtccaagaac 1680

ttccacctga ggcctaggga cctgatctcc aacatcaacg tgatcgtgct ggaactgaaa 1740
ggctccgaga caaccttcac gtgcgagtac gccgacgaga cagccacat cgtggaattt 1800
ctgaaccggt ggatcacctt ctgccagagc atcatctcca cactgacc 1848

<210> 34

<211> 616

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> fusion protein (mGI102-M61)

<400> 34

Met Asp Ala Met Leu Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly

1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Ser His Ala Val Asp Glu Gln Leu Ser Lys

20 25 30

Ser Val Lys Asp Lys Val Leu Leu Pro Cys Arg Tyr Asn Ser Pro His

35 40 45
 Glu Asp Glu Ser Glu Asp Arg Ile Tyr Trp Gln Lys His Asp Lys Val
 50 55 60
 Val Leu Ser Val Ile Ala Gly Lys Leu Lys Val Trp Pro Glu Tyr Lys
 65 70 75 80
 Asn Arg Thr Leu Tyr Asp Asn Thr Thr Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly
 85 90 95

 Leu Val Leu Ser Asp Arg Gly Thr Tyr Ser Cys Val Val Gln Lys Lys
 100 105 110
 Glu Arg Gly Thr Tyr Glu Val Lys His Leu Ala Leu Val Lys Leu Ser
 115 120 125
 Ile Lys Ala Asp Phe Ser Thr Pro Asn Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro
 130 135 140
 Ser Ala Asp Thr Lys Arg Ile Thr Cys Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro
 145 150 155 160
 Lys Pro Arg Phe Ser Trp Leu Glu Asn Gly Arg Glu Leu Pro Gly Ile

 165 170 175
 Asn Thr Thr Ile Ser Gln Asp Pro Glu Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser
 180 185 190
 Ser Gln Leu Asp Phe Asn Thr Thr Arg Asn His Thr Ile Lys Cys Leu
 195 200 205
 Ile Lys Tyr Gly Asp Ala His Val Ser Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys
 210 215 220
 Pro Pro Glu Asp Pro Pro Asp Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 225 230 235 240

 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 245 250 255
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 260 265 270
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr
 275 280 285
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

290 295 300
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

 305 310 315 320
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

 325 330 335
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

 340 345 350
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

 355 360 365
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

 370 375 380

 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 385 390 395 400
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

 405 410 415
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

 420 425 430
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

 435 440 445
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu

 450 455 460
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly Gly
 465 470 475 480
 Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln

 485 490 495
 Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn

 500 505 510
 Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr

 515 520 525

 Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Arg

 530 535 540

Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn
545 550 555 560
Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val
565 570 575
Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp
580 585 590
Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys
595 600 605
Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
610 615
<210> 35
<211> 153
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> wild type hIL-2
<400> 35
Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15
Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30
Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
35 40 45
Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
50 55 60
Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65 70 75 80
Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85 90 95
Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100 105 110
Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe

130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr

145 150

<210> 36

<211> 158

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2 with signal sequence

<400> 36

Met Asp Ala Met Leu Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly

1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Ser His Ala Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr

20 25 30

Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met

35 40 45

Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met

50 55 60

Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His

65 70 75 80

Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn

85 90 95

Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser

100 105 110

Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe

115 120 125

Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn

130 135 140

Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr

145 150 155

<210> 37

<211> 474

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence coding IL-2 with signal sequence

<400> 37

atggatgcta tgctgagagg cctgtgttgc gtgctgctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg	60
tctccttctc acgtgcccc taccagctcc tctaccaaga aaaccagct ccagttggag	120
catctgctgc tggacctcca gatgattctg aacgggatca acaactataa gaacccaag	180
ctgaccgcga tgctgacctt taagtcttac atgccaaga aggccaccga gctgaagcac	240
ctccagtgcc tggaagaaga actgaagccc ctggaagagg tgctgaatct ggcccagtec	300
aagaacttcc acctgaggcc acgggacctg atcagcaaca tcaacgtgat cgtgctggaa	360
ctgaagggct ccgagacaac ctttatgtgc gactacgccg acgagacagc caccatcgtg	420
gaatttctga accggtggat caccttctgc cagagcatca tctccacact gacc	474