

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2021년 1월 14일 (14.01.2021)



(10) 국제공개번호

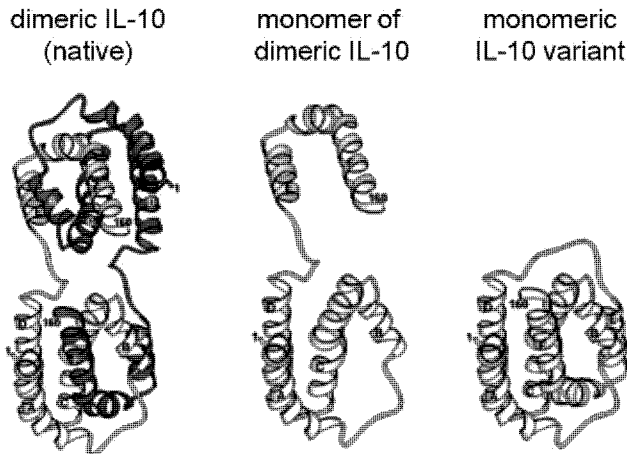
WO 2021/006605 A1

- (51) 국제특허분류: *C07K 14/54* (2006.01) *A61K 47/68* (2017.01)
A61K 38/00 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)
PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/008871
- (22) 국제출원일: 2020년 7월 7일 (07.07.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2019-0082149 2019년 7월 8일 (08.07.2019) KR
- (71) 출원인: 주식회사 프로젠 (PROGEN CO., LTD.) [KR/KR]; 06591 서울시 서초구 반포대로 222, 1309호, Seoul (KR). 주식회사 제넥신 (GENEXINE, INC.) [KR/KR]; 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로 700, B동 4층, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 신은주 (SHIN, Eunju); 16862 경기도 용인시 수지구 수지로68, 106동 702호, Gyeonggi-do (KR). 남은주 (NAM, Eunju); 05501 서울시 송파구 올림픽로 99, 122동 1404호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 한윤호 (HAN, Yunho); 06160 서울시 강남구 테헤란로69길 13, 명지빌딩 4층 선정국제특허법률사무소, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,

공개:
 — 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
 — 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: NOVEL IL-10 VARIANT PROTEIN AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 신규 IL-10 변이체 단백질 및 그의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a novel IL-10 variant protein and provides, by forming a monomer, a novel monomeric IL-10 protein with a high production yield and an inhibited immune activation .

(57) 요약서: 본 발명은 신규 IL-10 변이체 단백질에 관한 것으로서, 단량체를 형성함으로써 생산수율이 높고, 면역 활성화 작용이 억제된 신규 단량체성 IL-10 단백질을 제공한다.



WO 2021/006605 A1

명세서

발명의 명칭: 신규 IL-10 변이체 단백질 및 그의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 변이체 단백질에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 생산성과 면역억제능력이 향상된 신규 IL-10 변이체 단백질 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 인터류킨 10(이하, "IL-10"라 지칭함)은 사이토카인 합성 저해 인자(cytokine synthesis inhibitory factor, CSIF)라고 불리우는 약 37 kDa의 비공유 결합된 동종이량체로 발현되는 항-염증성 사이토카인이다. IL-10은 면역관용의 유도과 유지에 중요한 역할을 하며, 이러한 우세한 항-염증 특성은 오랜 기간 동안 알려져 왔다. IL-10은 TNF α , IL-1, IL-6, 및 IL-12 뿐만 아니라 IL-2 및 INF γ 와 같은 Th1 사이토카인과 같은 염증-촉진성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)의 분비를 억제하고 대식세포, B 세포 및 T 세포의 분화 및 증식을 조절한다(Glocker *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.* 1246: 102-107, 2011; Moore *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683-765 (2001); Waal Malefyt *et al.*, *J. Exp. Med.* 174: 915-924, 1991), Williams *et al.*, *Immunol.* 113: 281-292, 2004). 또한, 이는 항원 제시의 강력한 억제제로서, MHC II 발현뿐만 아니라 공동자극 인자 CD80 및 CD86의 상향조절을 억제한다(Mosser & Yhang, *Immunol. Rev.* 226: 205-218, 2008). 이러한 특성 때문에 IL-10은 염증성 장질환이나 건선과 같은 면역 질환 등의 치료제로 사용하려는 연구가 진행되어 왔다.
- [3] 그러나, IL-10은 면역자극 활성화라는 정 반대의 작용도 갖는 이중특성을 갖는 것으로 알려지고 있다. 이와 관련하여 구체적으로 IL-10은 B 세포 활성화를 자극하고, B 세포의 생존을 연장하며, B 세포의 클래스 전환(class switching)에 기여할 수 있다. 또한 NK 세포 증식과 사이토카인 생성을 자극할 수 있으며 CD8+ T 세포의 특정 부분 집단의 증식을 촉진하는 성장인자 역할을 할 수 있다(Mosser & Yhang, *Immunol. Rev.* 226: 205-218, 2009; Cai *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 29: 2658-2665, 1999; Santin *et al.*, *J. Virol.* 74: 4729-4737, 2000; Rowbottom *et al.*, *Immunol.* 160: 3188-3193, 1998). 중요하게도, 인간에서 고용량의(각각 20 및 25 $\mu\text{g/kg}$) IL-10은 INF γ 의 생산을 증가시킬 수 있는 것으로 보고된 바 있다(Lauw *et al.*, *J. Immunol.*, 165: 2783-2789, 2000; Tilg *et al.*, *Gut* 50: 191-195, 2002).
- [4] 이에, IL-10 단백질의 87번째 아미노산인 이소류신이 면역 활성화에 관련이 되어 있으며, 이를 알라닌으로 치환시킬 경우 면역 활성화 작용이 억제될 수 있음이 보고된 바 있다(Ding *et al.*, *J. Exp. Med.* 191(2): 213--223, 2000). 그러나, 상기 변이체 IL-10의 경우 야생형에 비해 IL-10R1과의 친화성이 매우 약한 것으로 확인되어, 동등한 면역 억제 활성을 위해서는 고용량의 투여가 필요한 단점이 있다.

- [5] 한편, IL-10 단백질은 구조적 특성 때문에 재조합 단백질로 생산 시 다량의 불용성 응집체가 생성이 되며, 이는 생산성에 있어서 큰 문제점을 야기한다. 이에, IL-10의 2차 구조상 네 번째 및 다섯 번째 알파나선 사이에 6 a.a.의 링커 펩타이드를 도입함으로써 이량체를 형성하지 않는 단량체성 IL-10이 개발된 바 있으나(Josephson *et al.*, *J. Biol. Chem.* 275(18): 13552-13557, 2000), 체내 반감기가 짧고 활성이 매우 낮기 때문에 이를 치료제로 사용하는데 걸림돌이 되고 있다. 이러한, 낮은 체내 안정성을 극복하기 위해 IgA의 Fc 도메인에 융합단백질의 형태로 발현시키는 시도가 이루어졌으나(Westerhof *et al.*, *PLOS ONE*, 7(10): e46460, 2012), IL-10 활성의 회복은 제한적으로 이루어졌다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 상술한 문제점을 포함하여 여러 가지 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 보다 효율적이고 체내 안정성 및 안전성이 확보되는 새로운 IL-10 변이체 단백질을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나, 본 발명의 보호범위가 상기 목적으로 제한되는 것은 아니다.

과제 해결 수단

- [7] 본 발명의 일 관점에 따르면, 인간 Interleukin-10(이하, IL-10) 단백질의 성숙형 형태(mature form) 기준으로 116번째 아미노산인 아스파라긴 및 117번째 아미노산인 라이신 사이에 6 내지 12 aa의 길이를 갖는 스페이스 펩타이드가 삽입된 단량체성 IL-10 변이체 단백질이 제공된다.
- [8] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 인간 IL-10 단백질의 성숙형 형태(mature form) 기준으로 116번째 아미노산인 아스파라긴 및 117번째 아미노산인 라이신 사이에 6 내지 12 a.a.의 길이를 갖는 스페이스 펩타이드가 삽입된 단량체성 IL-10 변이체 단백질을 포함하는 융합단백질이 제공된다.
- [9] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 단량체성 IL-10 변이체 단백질 또는 상기 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 제공된다.
- [10] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터가 제공된다.
- [11] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 단량체성 IL-10 변이체 단백질 또는 상기 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 면역억제제가 제공된다.
- [12] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 단량체성 IL-10 변이체 단백질 또는 상기 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 면역 질환 치료제가 제공된다.
- [13] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 치료적으로 유효한 양의 상기 단량체성 IL-10 변이체 단백질 또는 상기 융합단백질을 면역억제를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 상기 개체의 면역억제 방법이 제공된다.

발명의 효과

- [14] 본 발명의 일 실시예에 따른 단량체성 IL-10 변이체 단백질은 IL-10 단백질의

이중 특성 중 하나인 면역 활성화 작용을 억제할 뿐만 아니라 단량체 형태로 발현되면서도 생산 효율이 증진되고, 다른 생리활성 단백질과 융합단백질 형태로 발현되더라도 그 활성이 그대로 유지되는 등 기존 IL-10 변이체 단백질에 비교하여 우수한 특성을 나타내기 때문에, 새로운 면역 억제제 및/또는 면역 질환 치료제로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [15] 도 1은 IL-10 이량체(좌측), 상기 IL-10 이량체의 단량체(중앙) 및 본 발명의 일 실시예에 따라 스페이서 펩타이드가 삽입되어 안정적인 단량체 구조를 갖는 IL-10 단량체(우측)의 3차원 구조를 도시한 구조도이다.
- [16] 도 2a는 이량체성 IL-10 변이체 단백질을 Fc 단백질에 연결하여 구축한 융합단백질의 생산과정에서의 비환원 및 환원 조건에서 SDS-PAGE 결과를 나타내는 사진이고 도 2b는 최종 정제된 상기 이량체성 IL-10 변이체 융합단백질 순도를 SEC-HPLC 분석으로 분석한 결과를 나타내는 크로마토그램이며, 도 2c는 본 발명의 실시예 1 및 2에 따른 단량체성 IL-10 변이체 단백질을 Fc 단백질에 연결한 융합단백질의 정제과정에서의 SDS-PAGE 분석을 수행한 결과를 나타내는 사진이고, 도 2d는 최종 정제된 상기 실시예 1(상단) 및 2(하단)의 단량체성 IL-10 변이체 융합단백질의 순도를 SEC-HPLC 분석으로 분석한 결과를 나타내는 일련의 크로마토그램이며, 도 2e는 본 발명의 비교예 2의 단량체성 IL-10 변이체 융합단백질의 비환원 및 환원 조건에서의 SDS-PAGE 분석결과를 나타내는 사진이고, 도 2f는 최종 정제된 상기 비교예 2의 단량체성 IL-10 변이체 융합단백질의 순도를 SEC-HPLC 분석으로 분석한 결과를 나타내는 크로마토그램이다.
- [17] 도 3a는 본 발명의 실시예 3에 따른 융합단백질(PG-075-8)을 일시적으로 형질감염된 세포에서 발현시킨 후 protein A를 이용하여 정제하는 공정 중 단백질 발현정도를 확인하기 위한 비-환원조건(좌측) 및 환원조건(우측)에서의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타내는 사진이고 도 3b는 상기 융합단백질(PG075-8)을 일시적으로 형질감염된 세포에서 발현시킨 후 protein A를 이용하여 정제하는 공정 중 10번째(A10) 내지 12번째 분획(A12)에 대하여 SEC-HPLC 분석을 통해 순도를 확인한 결과를 나타내는 크로마토그램이며, 도 3c는 본 발명의 비교예 3에 따른 융합단백질(PG075-9)을 일시적으로 형질감염된 세포에서 발현시킨 후 protein A를 이용하여 정제하는 공정 중 단백질 발현정도를 확인하기 위한 비-환원조건(우측) 및 환원조건(좌측)에서의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타내는 사진이고, 도 3d는 상기 융합단백질(PG075-9)을 일시적으로 형질감염된 세포에서 발현시킨 후 protein A를 이용하여 정제하는 공정 중 11번째(A11) 및 12번째 분획(A12)에 대하여 SEC-HPLC 분석을 통해 순도를 확인한 결과를 나타내는 크로마토그램이며, 도 3e는 본 발명의 상기 실시예 3의 융합단백질(PG075-8)을 생산하도록 제조된

안정화 세포주(stable cell line)으로부터 상기 융합단백질의 정제공정에 따른 단백질의 발현 정도를 확인하기 위한 비-환원조건(좌측) 및 환원조건(우측)에서의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타내는 사진이고, 도 3f는 상기 안정화 세포주에서 최종 정제된 융합단백질(PG075-8)의 순도를 확인하기 위한 SEC-HPLC 분석결과를 나타내는 크로마토그램이다.

- [18] 도 4a는 본 발명의 비교예 1 및 2 그리고 실시예 1 및 2의 IL-10 융합단백질의 CD4⁺ T 세포의 증식에 미치는 영향을 FACS 분석으로 조사한 결과를 나타내는 일련의 히스토그램이고, 도 4b는 상기 도 4a의 결과를 정량화 한 그래프이며, 도 4c는 본 발명의 비교예 1 및 2 그리고 실시예 1 및 2의 IL-10 융합단백질의 CD8⁺ T 세포의 증식에 미치는 영향을 FACS 분석으로 조사한 결과를 나타내는 일련의 히스토그램이고, 도 4d는 상기 도 4c의 결과를 정량화한 그래프이다.
- [19] 도 5a는 대조군인 rhIL-10 및 본 발명의 비교예 1 및 2 그리고 실시예 1 및 2의 IL-10 변이체 융합단백질의 처리 농도에 따른 골수유래 비만세포의 증식능에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타내는 그래프이고, 도 5b는 대조군인 rhIL-10와 본 발명의 비교예 1 및 실시예 1의 IL-10 변이체 융합단백질의 처리 농도를 상승시킨 후 골수유래 비만세포의 증식에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [20] 도 6a는 비교예 1의 이량체성 IL-10 변이체 융합단백질의 농도에 따른 비만세포에서의 TNF- α 분비의 변화를 분석한 결과를 나타내는 그래프이고, 도 6b는 본 발명의 실시예 1 및 2 그리고 비교예 2의 단량체성 IL-10 변이체 융합단백질의 농도에 따른 비만세포에서의 TNF- α 분비의 변화를 분석한 결과를 나타내는 그래프이며, 도 6c는 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질 PG075-8 및 비교예로서 이량체성 IL-10 변이체 단백질(IL-10M-1; Fc-IL-10Vm)의 비만세포에서의 TNF- α 분비 억제능을 분석한 결과를 나타낸 그래프이고, 도 6d는 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질 PG075-8의 처리농도에 따른 대식세포에서의 TNF- α 분비 억제능을 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [21] 도 7은 본 발명의 비교예 1의 이량체성 IL-10 변이체 융합단백질(좌측) 및 실시예 1의 단량체성 IL-10 변이체 융합단백질(우측)의 처리 농도에 따른 IL-10R1과의 친화도 BLI 분석으로 확인한 결과를 나타내는 일련의 센소그램이다.
- [22] 도 8a는 비교예로 Fc ϵ RI α -Fc의 마우스 IgE와의 친화도를 BLI 분석으로 분석한 결과를 나타내는 센소그램이고, 도 8b는 본 발명의 실시예 3의 융합단백질 PG075-8(Fc ϵ RI α -Fc-IL-10Vm;하단)의 마우스 IgE와의 친화도를 BLI 분석으로 분석한 결과를 나타내는 센소그램이며 도 8c는 본 발명의 실시예 3의 융합단백질 Fc ϵ RI α -Fc-IL-10Vm(PG075-8)의 인간 IgE와의 친화도를 BLI 분석으로 분석한 결과를 나타내는 센소그램이다.
- [23] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질을 실험동물(랫트)에 다양한 경로(정맥주사, 복강주사, 근육주사, 및 피하주사)로 투여한 이후 최대 330시간

까지 혈청 내 남아 있는 융합단백질의 양을 정량함으로써 약물 동태학 분석을 수행한 결과를 나타내는 그래프이다.

[24] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질 PG075-8을 실험동물에 투여 시 백혈구(A), 적혈구(B) 및 혈소판(C)의 수의 변화가 나타나는지 여부를 조사한 혈액독성 분석 결과를 나타내는 일련의 그래프이다.

[25] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질 PG075-8이 실제 동물에서 알러지 증상을 감소시킬 지 여부를 조사한 것으로서, OVA로 감작된 마우스에 대하여 OVA 경구 투여로 음식물 알러지를 유발시킨 후 본 발명의 일 실시예에 따른 PG075-8 및 비교예로 IgE TRAP 투여 시 설사증상의 변화(A), 실험 종료 후 희생된 마우스로부터 측정된 유리 IgE 농도(B), 총 IgE 농도(C) 및 알러지 인자로서 혈중 비만세포 내의 탈과립 효소(MCPT-1, mast cell protease-1)의 농도(D)를 측정된 결과를 나타내는 일련의 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[26] 본 발명의 일 관점에 따르면, 인간 Interleukin-10(이하, IL-10) 단백질의 성숙형 형태(mature form)를 기준으로 116번째 아미노산인 아스파라긴 및 117번째 아미노산인 라이신 사이에 6 내지 12 a.a.의 길이를 갖는 스페이스 펩타이드가 삽입된 단량체성 IL-10 변이체 단백질이 제공된다.

[27] 상기 인간 IL-10 단백질의 성숙형 형태는 UniProtKB P22301에 기재된 19-178번째 아미노산 서열(서열번호 46)로부터 유래된 것일 수 있다.

[28] 상기 단량체성 IL-10 변이체 단백질에 있어서, 상기 스페이스 펩타이드는 7 내지 11 a.a., 8 내지 10 a.a. 또는 9 a.a.의 길이를 가질 수 있으며, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12 a.a.의 길이를 가질 수 있다. 본 발명의 구체적인 태양에서, 상기 스페이스 펩타이드는 GGSGSGGS(서열번호 4), (GGSGG)_n(단위체: 서열번호 5, n은 1 또는 2의 정수), (G₄S)_n(단위체: 서열번호 12, n은 1 또는 2의 정수), (GGS)_n(n은 2 내지 4의 정수), (GS)_n(n은 3 내지 6의 정수), 또는 (GSSGGS)_n(단위체: 서열번호 13, n은 1 내지 2의 정수)의 아미노산 서열을 갖는 스페이스 펩타이드일 수 있으며, 상기 스페이스 펩타이드를 구성하는 아미노산은 면역원성을 유발하지 않는다면 다른 종류의 아미노산으로 치환될 수 있고 바람직하게는 9 a.a.의 길이를 가질 수 있다.

[29] 본 문서에서 사용되는 용어 "스페이스 펩타이드(spacer peptide)"는 특정 단백질 내부에 삽입되어 해당 단백질의 구조 및/또는 기능을 변화시키는 역할을 수행하는 펩타이드를 의미한다. 이런 의미에서 다른 융합 파트너를 연결하는 링커 펩타이드와 구분이 되나, 통상적인 링커 펩타이드가 스페이스 펩타이드로 사용될 수 있다.

[30] 본 발명의 일 실시예에 따른 단량체성 IL-10 변이체 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[31] 상기 단량체성 IL-10 변이체 단백질은 인간 IL-10 단백질의 성숙형 형태를

기준으로 87번째 아미노산인 이소류신이 알라닌으로 치환된 단량체성 IL-10 변이체 단백질 일 수 있으며, 구체적으로는 서열번호 39의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

- [32] 상기 단량체성 IL-10 단백질은 단량체성 IL-10을 형성하는 구조를 나타낸다면 서열번호 1 또는 서열번호 39의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상 동일한 것일 수 있으며 포유동물 유래 단백질은 모두 포함될 수 있다.
- [33] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 인간 IL-10 단백질의 성숙형 형태(mature form)를 기준으로 116번째 아미노산인 아스파라긴 및 117번째 아미노산인 라이신 사이에 6 내지 12 aa의 길이를 갖는 스페이서 펩타이드가 삽입된 단량체성 IL-10 변이체 단백질을 포함하는 융합단백질이 제공된다.
- [34] 본 발명에서 사용되는 용어 "융합단백질"은 둘 이상의 단백질 또는 단백질 내 특정 기능을 담당하는 도메인이 각각의 단백질 또는 도메인이 본연의 기능을 담당하도록 연결된 재조합 단백질(recombinant protein)을 의미한다. 상기 둘 이상의 단백질 또는 도메인 사이에는 통상적으로 유연한 구조를 갖는 링커 펩타이드(linker peptide)가 삽입될 수 있다. 상기 링커 펩타이드는 AAGSGGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 2), GSGG(서열번호 3), GSGGSGG(서열번호 4), GGGSGG(서열번호 5), $(G_4S)_n$ (단위체: 서열번호 12, n은 1 내지 10의 정수), $(GGS)_n$ (n은 1 내지 10의 정수), $(GS)_n$ (n은 1 내지 10의 정수), $(GSSGGS)_n$ (단위체: 서열번호 13, n은 1 내지 10의 정수), KESGSVSSEQLAQFRSLD(서열번호 14), EGKSSGSGSESKST(서열번호 15), GSAGSAAGSGEF(서열번호 16), $(EAAAK)_n$ (단위체: 서열번호 17, n은 1 내지 10의 정수), CRRRRRREAEAC(서열번호 18), $A(EAAAK)_4ALEA(EAAAK)_4A$ (서열번호 19), GGGGGGGG(서열번호 20), GGGGGG(서열번호 21), AEAAAKEAAAAKA(서열번호 22), PAPAP(서열번호 23), $(Ala-Pro)_n$ (n은 1 내지 10의 정수), VSQTSKLTRAETVFPDV(서열번호 24), PLGLWA(서열번호 25), TRHRQPRGWE(서열번호 26), AGNRVRRSVG(서열번호 27), RRRRRRRR(서열번호 28), GFLG(서열번호 29), GSSGSGSSGSGGGDEADGSRGSQKAGVDE(서열번호 30), GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCP(서열번호 31), GGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 34), GGGGSGGGGSGGGGSEKEKEEQEERTHTCPPCP(서열번호 35), RNTGRGGEEKKGSKEKEEQEERETKTPECP(서열번호 36), GGGGSGGGGSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCP(서열번호 37), GSGGGSGTLVTVSSESKYGPPCPPCP(서열번호 38), EPKSSDKTHTCPPCP(서열번호 40), EPKSCDKTHTCPPCP(서열번호 41), THTCPPCP(서열번호 42), GGGGSGGGGSGGGGSAKNTTAPATTRNTRGGEEKKKEKEEQEERTHTCP

PCP(서열번호 43), AGSGGGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 44), 및 GGGSGGSTHTCPPCP(서열번호 45) 등이 포함될 수 있다.

- [35] 상기 융합단백질은 다른 기능을 담당하는 하나 이상의 융합 파트너 단백질(partner protein)을 포함할 수 있는데, 이러한 융합 파트너 단백질은 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 상기 항체의 항원-결합 단편, 상기 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 유사체, 항체의 Fc 영역, 항체 Fc 영역 수용체, 상기 항체 Fc 영역 수용체, 또는 이의 Fc 영역 결합 세포외 도메인, 이량체화 도메인, 사이토카인, 또는 면역조절 펩타이드일 수 있다.
- [36] 상기 융합단백질에 있어서, 상기 항체의 항원결합 단편은 Fab, F(ab')₂, Fab', scFv, diabody, triabody, sdAb(single domain antibody), V_{NAR} 또는 V_HH일 수 있고, 상기 항체 유사체는 affibody, affilin, affimer, affitin, alphabody, anticalin, avimer, DARPin, Fynomer, Kunitz domain peptide, monobody, repebody, VLR, 또는 nanoCLAMP일 수 있다. 상기 항체의 Fc 도메인은 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM의 Fc일 수 있고 상기 Ig 서브클래스 중 둘 이상의 도메인(힌지, CH2, 및 CH3 도메인 등)들이 혼합된 하이브리드 Fc(hyFc)일 수 있으며, 상기 IgG는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4일 수 있고, 특히, Fc 감마 수용체(FcγRc) 및 보체(C1q)에 대한 친화도가 낮도록, Fc의 효과기(effector) 기능인 항체-의존성 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 또는 보체-의존성 세포독성(complement-dependent cytotoxicity, CDC)을 담당하는 기능기 부분에 변이가 유도된 변이체 Fc 및/또는 신생아 Fc 수용체(neonatal Fc receptor, FcRn)에 대한 선택적 친화도가 높아서 혈중반감기가 증가될 수 있도록 변이된 변이체 Fc일 수 있다. 이 중, 상기 하이브리드 Fc(hyFc)는 대한민국 특허 제897938호, 제1380732호, 제1380729호 등에 기재된 것을 사용할 수 있고, 상기 변이체 Fc는 국제특허출원 PCT/KR2020/006346에 기재된 변형 면역글로불린 Fc 단백질(NTIG)일 수 있다. 더욱 구체적으로 상기 Fc 영역은 서열번호 6 내지 9로 기재되는 아미노산 서열 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 상기 'NTIG'는 서열번호 6 및 7로 구성되는 균으로부터 선택되는 하이브리드 Fc(hyFc) 단백질의 18번째 및 196번째 아미노산이 다른 아미노산으로 변이가 되어 ADCC 및 CDC와 같은 효과기 기능이 없으면서도 FcRn에 대한 선택적 친화도가 증가하여 혈중 반감기가 개선된 변형 Fc 도메인 단백질을 의미한다. 이러한, 상기 NTIG는 서열번호 8 및 9로 구성되는 균으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [37] 상기 이량체화 도메인은 항체의 힌지 도메인, LIM/double zinc-finger motif, RAG1 도메인, HAT dimerization domain, TRFH dimerization domain, Stat3 dimerization, 또는 LFB1/HNF1 dimerization domain일 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다. 상기 사이토카인은 IL-4, IL-6, IL-α, 또는 TGF-β일 수 있고, 상기 면역조절 펩타이드는 PD-L1, 또는 CTLA-4(CD152)일 수 있다. 특히, 상기 Fc 도메인이 융합 파트너 단백질일 경우 힌지부분에 존재하는 시스테인기 사이에

생성되는 분자간 이황화 결합에 의해 이량체를 형성할 수 있다. 상기 융합 파트너 단백질은 본 발명의 일 실시예에 따른 단량체성 IL-10 변이체 단백질의 N-말단 또는 C-말단 어느 곳에도 연결될 수 있다. 아울러, 이 경우 상술한 다양한 링커 펩타이드를 통해 연결될 수 있다.

- [38] 본 문서에서 사용되는 용어 "항체"는 이뮤노글로불린(immunoglobulin) 분자로서 2 개의 동일한 중쇄 및 2 개의 동일한 경쇄가 결합하여 생성되는 이중 사량체 단백질로 상기 경쇄의 가변지역(V_L) 및 상기 중쇄의 가변영역(V_H)에 의해 구성되는 항원 인식부위(antigen-binding site)를 통해 항원 특이적 결합을 하며, 이를 통해 항원-특이적 체액성 면역반응(humoral immune response)을 유발한다.
- [39] 본 문서에서 사용되는 용어 "항체의 항원-결합 단편(antigen-binding fragment of antibody)"은 항체에서 유래한 항원 결합능을 가지고 있는 단편으로서 항체를 단백질 절단효소로 절단하여 생성된 단편은 물론 제조법 방식에 생성된 단일쇄 단편을 모두 포함하는데 이에 Fab, $F(ab')_2$, scFv, diabody, triabody, sdAb, 및 V_H 가 포함된다.
- [40] 본 문서에서 사용되는 용어 "Fab"는 항원-결합 항체단편(fragment antigen-binding)으로서 항체 분자를 단백질 분해효소인 파파인으로 절단하여 생성되는 단편으로 $VH-CH1$ 및 $VL-CL$ 의 두 펩타이드의 이량체로, 파파인에 의해 생성된 다른 단편은 Fc(fragment crystallizable)라 지칭한다.
- [41] 본 문서에서 사용되는 용어 " $F(ab')_2$ "는 항체를 단백질 분해효소인 펩신으로 절단하여 생성되는 단편 중 항원결합 부위를 포함하는 단편으로 상기 Fab 두 개가 이황화결합으로 연결된 4량체의 형태를 나타낸다. 펩신에 의해 생성된 다른 단편은 pFc'으로 지칭한다.
- [42] 본 문서에서 사용되는 용어 "Fab'"는 상기 $F(ab')_2$ 를 약한 환원조건에서 분리시킴으로써 생성되는 Fab와 구조가 유사한 분자이다.
- [43] 본 문서에서 사용되는 용어 "scFv"는 "single chain variable fragment"의 약어로서 실제 항체의 단편은 아니나, 항체의 중쇄 가변영역(V_H)과 경쇄 가변영역(V_L)을 약 25 a.a. 크기의 링커 펩타이드로 연결하여 제조한 일종의 융합단백질로서 고유의 항체 단편이 아님에도 불구하고 항원 결합능을 지닌 것으로 알려지고 있다(Glockshuber *et al.*, *Biochem.* 29(6): 1362-1367, 1990).
- [44] 본 문서에서 사용되는 용어 "diabody" 및 "triabody"는 각각 두 개 및 세 개의 scFv가 링커에 의해 연결된 형태의 항체 단편을 의미한다.
- [45] 본 문서에서 사용되는 용어 "sdAb(single domain antibody)"는 나노바디(nanobody)로도 불리우는 항체의 단일 가변영역 단편으로 구성된 항체 단편이다. 주로 중쇄로부터 유래한 sdAb가 사용되나, 경쇄로부터 유래한 단일 가변영역 단편 역시 항원에 대하여 특이적 결합이 되는 것으로 보고되고 있다. 중쇄 및 경쇄로 이루어진 통상의 항체와 달리 단일쇄의 이량체로만 구성되는 상어 항체의 가변영역 단편으로 이루어진 V_{NAR} 및 낙타류 항체의 가변영역 단편으로 이루어진 V_HH 도 sdAb에 포함된다.

- [46] 본 문서에서 사용되는 "항체 유사체(antibody mimetic)"는 두 개의 중쇄 및 두 개의 경쇄가 이종사합체의 4차구조를 형성하여 기능을 발휘하는 통상의 전장 항체와 달리, monobody, 가변 림프구 수용체(VLR) 등과 같이 비항체 유래의 단백질 스캐폴드로부터 제조되는 항체와 유사한 기능 즉, 항원 결합능을 갖는 단백질을 포함하는 개념이다. 이러한 항체 유사체로는 단백질 A의 Z domain 유래의 Affibody(Nygren, P. A., *FEBS J.* 275(11): 2668-2676, 2008), Gamma-B crystallin 또는 Ubiquitin 유래의 Affilin(Ebersbach *et al.*, *J. Mol. Biol.* 372(1): 172-185, 2007), Cystatin 유래의 Affimer(Johnson *et al.*, *Anal. Chem.* 84(15): 6553-6560, 2012), Sac7d 유래의 Affitin(Krehebrink *et al.*, *J. Mol. Biol.* 383 (5): 1058-1068, 2008), Triple helix coiled coil 단백질 유래의 Alphabody(Desmet *et al.*, *Nat. Commun.* 5: 5237, 2014), lipocalin 유래의 Anticalin(Skerra *et al.*, *FEBS J.* 275(11): 2677-2683, 2008), 다양한 막 수용체의 도메인 유래의 Avimer(Silverman *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 23(12): 1556-1561, 2005), Ankyrin repeat motif 유래의 DARPin(Stumpp *et al.*, *Drug Discov. Today.* 13(15-16): 695-701, 2008), Fyn 단백질의 SH3 도메인 유래의 Fynomer(Grabulovski *et al.*, *J. Biol. Chem.* 282(5): 3196-3204, 2007), 다양한 단백질 저해제의 Kunitz 도메인 유래의 Kunitz domain peptide(Nixon and Wood, *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 9(2): 261-268, 2006), 피브로넥틴의 10번째 제3형 도메인 유래의 monobody(Koide and Koide, *Methods Mol. Biol.* 352: 95-109, 2007), 탄수화물 결합 모듈 32-2 유래의 nanoCLAMP(Suderman *et al.*, *Protein Exp. Purif.* 134: 114-124, 2017), 떡장어 유래의 가변 림프구 수용체(variable lymphocyte receptor, VLR)(Boehm *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 30: 203-220, 2012), 및 상기 VLR을 기반으로 항원 친화성을 향상시키도록 조작된 repebody(Lee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109: 3299-3304, 2012) 등이 포함된다.
- [47] 상기 융합단백질에 있어서, 상기 항체 Fc 영역 수용체는 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인일 수 있다.
- [48] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 단량체성 IL-10 변이체 단백질 또는 상기 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 제공된다.
- [49] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제조합 벡터가 제공된다.
- [50] 상기 제조합 벡터에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 조절서열에 작동가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트 형태로 포함될 수 있다.
- [51] 본 문서에서 사용되는 용어 "작동 가능하게 연결된(operably linked to)"이란 목적으로 하는 핵산서열(예컨대, 시험관내 전사/번역 시스템에서 또는 숙주세포에서)이 그의 발현이 이루어질 수 있도록 하는 방식으로 상기 조절서열에 연결되어 있다는 것을 의미한다.
- [52] 상기 "조절서열"이란 용어는 프로모터, 인핸서 및 다른 조절 요소(예, 폴리아데닐화 신호)를 포함하는 의미이다. 조절서열에는 많은 숙주세포에서

목적으로 하는 핵산이 항상적으로 발현될 수 있도록 지시하는 것, 특정한 조직세포에서만 목적으로 하는 핵산이 발현될 수 있도록 지시하는 것(예, 조직특이적 조절서열), 그리고 특정 신호에 의해 발현이 유도되도록 지시하는 것(예, 유도성 조절서열)이 포함된다. 발현벡터의 설계는 형질전환될 숙주세포의 선택 및 원하는 단백질 발현의 수준 등과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다는 것은 당업자라면 이해할 수 있다. 본 발명의 발현벡터는 숙주 세포에 도입되어 상기 융합 단백질을 발현할 수 있다. 상기 진핵세포 및 원핵세포에서 발현을 가능하게 하는 조절서열들은 당업자에게 잘 알려져 있다. 상술한 바와 같이, 이들은 보통 전사개시를 담당하는 조절서열들 및, 선택적으로 전사물의 전사종결 및 안정화를 담당하는 폴리-A 신호를 포함한다. 추가적인 조절서열들은 전사조절인자 외에도 번역 증진인자 및/또는 천연-조합 또는 이중성 프로모터 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어 포유류 숙주 세포에서 발현을 가능하게 하는 가능한 조절서열들은 CMV-HSV 티미딘 키나아제 프로모터, SV40, RSV-프로모터(로우스 육종 바이러스), 인간 신장 요소 1 α -프로모터, 글루코코르티코이드-유도성 MMTV-프로모터(몰로니 마우스 종양 바이러스), 메탈로티오네인-유도성 또는 테트라사이클린-유도성 프로모터 또는, CMV 증폭제 또는 SV40-증폭제와 같은 증폭제를 포함한다. 신경 세포 내 발현을 위해, 신경미세섬유-프로모터(neurofilament-promoter), PGDF-프로모터, NSE-프로모터, PrP-프로모터 또는 thy-1-프로모터들이 사용될 수 있다는 것이 고려되고 있다. 상기 프로모터들은 당 분야에 알려져 있으며, 문헌(Charron, *J. Biol. Chem.* 270: 25739-25745, 1995)에 기술되어 있다. 원핵세포내 발현을 위해, lac-프로모터, tac-프로모터 또는 trp 프로모터를 포함하는 다수의 프로모터들이 개시되어 있다. 전사를 개시할 수 있는 인자들 외에, 상기 조절서열들은 본 발명의 일 실시예에 따른 폴리뉴클레오타이드의 하류(downstream)에 SV40-폴리-A 부위 또는 TK-폴리-A 부위와 같은 전사 종결 신호를 포함할 수도 있다. 본 문서에서, 적당한 발현 벡터들은 당 분야에 알려져 있으며, 그 예로는 오카야마-베르그(Okayama-Berg) cDNA 발현 벡터 pcDV1(Parmacia), pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3(Invitrogene), pSPORT1(GIBCO BRL), pGX-27(특허 제1442254호), pX(Pagano *et al.*, *Science* 255: 1144-1147, 1992), 효모 2-혼성(two-hybrid) 벡터, 가령 pEG202 및 dpJG4-5(Gyuris *et al.*, *Cell* 75: 791-803, 1995) 또는 원핵 발현 벡터, 가령 람다 gt11 또는 pGEX(Amersham Pharmacia)가 있다. 본 발명의 핵산 분자들 외에, 벡터는 분비 신호를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함할 수 있다. 상기 분비신호들은 당업자에게 잘 알려져 있다. 그리고, 사용된 발현 시스템에 따라, 융합단백질을 세포 구획으로 이끌 수 있는 리더서열(leader sequence)이 본 발명의 일 실시예에 따른 폴리뉴클레오타이드의 코딩 서열에 조합되며, 바람직하게는 해독된 단백질 또는 이의 단백질을 세포질 주변 또는 세포외 매질로 직접 분비할 수 있는 리더서열이다.

- [53] 또한, 본 발명의 벡터는 예를 들면, 표준 재조합 DNA 기술에 의하여 제조될 수 있으며, 표준 재조합 DNA 기술에는 예를 들면, 평활말단 및 접착말단 라이게이션, 적절한 말단을 제공하기 위한 제한 효소 처리, 부적합한 결합을 방지하기 위하여 알칼리 포스테이즈 처리에 의한 인산기 제거 및 T4 DNA 라이게이즈에 의한 효소적 연결 등이 포함된다. 화학적 합성 또는 유전자 재조합 기술에 의하여 얻어진 신호 펩타이드를 코딩하는 DNA, 본 발명의 변이체 IL-10 단백질 또는 이를 포함하는 융합단백질을 암호화하는 DNA를 적절한 조절서열이 포함되어 있는 벡터에 재조합함으로써 본 발명의 벡터가 제조될 수 있다. 상기 조절 서열이 포함되어 있는 벡터는 상업적으로 구입 또는 제조할 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 pBispecific 벡터를 백본으로 사용하였다.
- [54] 상기 발현벡터는 분비 신호서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 분비 신호서열은 세포내에서 발현되는 재조합 단백질의 세포 밖으로의 분비를 유도하며, tPA(tissue plasminogen activator) 신호서열, HSV gDs(단순포진 바이러스 당단백질 Ds) 신호서열 또는 성장호르몬 신호서열일 수 있다.
- [55] 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 발현벡터는 숙주세포에서 상기 단백질을 발현하도록 할 수 있는 발현벡터일 수 있으며, 상기 발현벡터는 플라스미드 벡터, 바이러스 벡터, 코스미드 벡터, 파지미드 벡터, 인공 인간 염색체 등 어떠한 형태를 나타내더라도 무방하다.
- [56] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 단량체성 IL-10 변이체 단백질 또는 상기 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 면역억제용 조성물이 제공된다.
- [57] 아울러, 상기 면역억제용 조성물은, 공지의 면역억제제 성분(면역억제의 효능을 가지는 cytokine, Decoy receptor, 면역세포의 활성화, 분화 등에 관여하는 ligand 및 이에 대한 항체, 면역세포의 활성 저해를 줄 수 있는 항체 등)을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 공지의 면역억제제로는 글루코코르티코이드, 세포증식 억제제(cytostatic agent), 항-CD20 항체, 항-CD3 항체, 항-IL-2 항체, 이뮤노필린 저해제(immunophilin inhibitor), 인터페론 β , 오이포이드(oipoid), TNF α 결합 단백질, 마코페놀레이트(mycophenolate), 핑골리모드(fingolimod) 또는 미리오신(myriocin)일 수 있다. 상기 글루코코르티코이드는 프레드니손(prednisone), 덱사메타손(dexamethasone), 또는 하이드로코르티손(hydrocortisone)일 수 있고, 상기 세포증식 억제제는 나이트로젠 머스타드(nitrogen mustard), 니트로소우레아(nitrosourea), 백금계 착물(platinum coordination complex), 폴산 유사체(folic acid analogue), 아자티오프린(azathioprine), 머캅토피린(mercaptopurine), 플르우로우라실(flourouracil), 메토티렉세이트(methotrexate), 닥티노마이신(dactinomycin), 안트라사이클린(anthracycline), 미토마이신 C(mitomycin C), 블레오마이신(bleomycin), 또는 미트라마이신(mithramycin)일 수 있다. 상기 이뮤노필린 저해제는 시클로스포린(ciclosporin),

타크롤리무스(tacrolimus), 시롤리무스(sirolimus), 또는 에베롤리무스(everolimus)일 수 있다.

- [58] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 단량체성 IL-10 변이체 단백질 또는 상기 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 면역 질환 치료용 약학적 조성물이 제공된다.
- [59] 상기 약학적 조성물에 있어서, 상기 면역 질환은 제1형 당뇨병, 원형 탈모증(alopecia areata), 항-인산지질 항체 증후군(antiphospholipid antibody syndrome), 류마티스성 관절염, 건선 또는 건선성 관절염, 다발성 경화증(multiple sclerosis), 전신 홍반 루푸스(systemic lupus erythematosus), 염증성 장질환(inflammatory bowel disease), 애디슨병(Addison's disease), 그레이브병(Graves' disease), 쇼그렌 증후군(Sjögren's syndrome), 길랑-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 중증 근무력증(Myasthenia gravis), 염증성 근육병(inflammatory myopathy), 자가면역성 혈관염(autoimmune vasculitis), 자가면역성 간염(autoimmune hepatitis), 출혈성 빈혈(hemolytic anemia), 특발성 혈소판감소성 자반(idiopathic thrombocytopenic purpura), 일차성 담즙성 간경화증(primary biliary cirrhosis), 피부경화증(scleroderma), 백반증(vitiligo), 악성 빈혈(pernicious anemia), 알러지성 질환, 또는 만성 소화장애(celiac disease)일 수 있다.
- [60] 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있고, 상기 담체 외에 약학적으로 허용가능한 보조제, 부형제 또는 희석제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [61] 본 문서에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용 가능한"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [62] 또한, 본 발명에 일 실시예에 따른 약학적 조성물은 포유동물에 투여시, 활성 성분의 신속한 방출, 또는 지속 또는 지연된 방출이 가능하도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말 형태를 포함한다.
- [63] 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물은 다양한 경로로 투여될 수 있으며, 예를 들면, 경구, 비경구, 예를 들면 좌제, 경피, 정맥, 복강, 근육내, 병변내, 비강, 척추관내 투여로 투여될 수 있으며, 또한 서방형 또는 연속적 또는 반복적

방출을 위한 이식장치를 사용하여 투여될 수 있다. 투여횟수는 원하는 범위 내에서 하루에 1회, 또는 수회로 나누어 투여할 수 있으며, 투여 기간도 특별히 한정되지 않는다.

- [64] 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물은 일반적으로 사용되는 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 또한 본 발명에 따른 조성물은 그 투여방법이나 제형에 따라 필요한 경우, 현탁제, 용해보조제, 안정화제, 등장화제, 보존제, 흡착방지제, 계면활성화제, 희석제, 부형제, pH 조정제, 무통화제, 완충제, 산화방지제 등을 적절히 포함할 수 있다. 상기에 예시된 것들을 비롯하여 본 발명에 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 최신판]에 상세히 기재되어 있다.
- [65] 상기 조성물의 환자에 대한 투여량은 환자의 신장, 체표면적, 연령, 투여되는 특정 화합물, 성별, 투여 시간 및 경로, 일반적인 건강, 및 동시에 투여되는 다른 약물들을 포함하는 많은 요소들에 따라 다르다. 약학적으로 활성인 단백질은 100 ng/체중(kg) - 10 mg/체중(kg)의 양으로 투여될 수 있고, 더 바람직하게는 1 내지 500 μ g/kg(체중)으로 투여될 수 있으며, 가장 바람직하게는 5 내지 50 μ g/kg(체중)으로 투여될 수 있는데, 상기 요소들을 고려하여 투여량이 조절될 수 있다.
- [66] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 치료적으로 유효한 양의 상기 단량체성 IL-10 변이체 단백질 또는 상기 융합단백질을 면역억제를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 상기 개체의 면역억제 방법이 제공된다.
- [67] 상기 방법에 있어서, 상기 면역억제를 필요로 하는 개체는 인간 또는 인간을 제외한 포유동물일 수 있고, 장기이식을 받은 환자 또는 면역 질환에 걸린 개체로 면역억제가 필요한 환자일 수 있다.
- [68] 아울러 본 발명의 단량체성 IL-10 단백질 또는 이를 포함하는 융합단백질은 치료적으로 유효한 양으로 투여된다.
- [69] 본 문서에서 사용되는 용어 "치료적으로 유효한 양(therapeutically effective amount)"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 0.1 mg/kg 내지 1 g/kg, 더 바람직하게는 1 mg/kg 내지 500 mg/kg일 수 있으나, 유효 투여량은 환자의 나이, 성별 및 상태에 따라 적절히 조절될 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[70] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예 및 실험예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예 및 실험예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속한 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[71] **실시예: 단량체성 인간 IL-10 변이체의 제조**

[72] 본 발명자들은 다양한 단량체성 인간 IL-10 변이체를 고안하였다. 구체적으로, IL-10 단백질의 구조를 분석하고, 이량체성 IL-10 단백질이 형성될 때 IL-10의 N 말단과 다른 IL-10의 C 말단이 pair를 이룸에 착안하여 한 분자의 IL-10의 N 말단과 C 말단이 pair를 이룰 수 있도록 하기 위한 최소한의 linker 길이를 고안하였다. 한 분자의 IL-10 단백질의 N 말단 부분과 C 말단 부분이 결합하기 위해서는 17.3Å의 직선 거리가 필요하며, 이를 위해서는 N 말단 부분과 C 말단 부분 사이에 최소한 7 aa 이상의 linker 길이가 필요한 것으로 예상되었다. 이때 한 분자간 N 말단 부분과 C 말단 부분이 결합하여야 하기 때문에 너무 긴 linker는 오히려 말단 간의 결합에 방해 요소로 작용할 수 있을 것으로 예상되어 9 aa를 최적의 링커 길이로 구성하였고, 최대 12 aa linker 길이의 스페이서 펩타이드까지 포함되도록 디자인 가능할 것으로 예상되었다.

[73] 구체적으로, 본 발명자들은 하기 표 1과 같은 구성을 갖는 인간 IL-10 변이체 단백질 서열을 결정하고 Type II 제한효소인 *Bsa* I과 T4 ligase를 사용하여 NTIG Fc 서브-벡터, IL-10Vm 서브-벡터 및 골격 벡터(pBispecific Backbone; Genexine, Inc.)를 한 튜브에서 반응시킴으로써 벡터 컨스트럭트를 제조하였다.

[74] [표1]

본 발명의 일실시예에 따라 제조된 융합단백질의 구조

실시예	명칭	구조	linker	spacer
비교예 1	IL-10M	NTIG-linker 1-IL-10V	AAGSGGGGGSGGG GSGGGGS(서열번호 2)	n.a.
실시예 1	IL-10M-1	NTIG-linker 1-IL-10Vm (spacer)	AAGSGGGGGSGGG GSGGGGS(서열번호 2)	GGSGGSGGS (서열번호 4)
실시예 2	IL-10M-2	NTIG-linker 1-IL-10Vm (spacer)	GGSGG (서열번호 3)	GGSGGSGGS (서열번호 4)
비교예 2	IL-10M-3	NTIG-linker 1-IL-10Vm (spacer)	GGSGG (서열번호 3)	GGGSGG (서열번호 5)

[75] 상기 표 1에 기재된 것과 같이, 본 발명의 일 실시예에서는 IL-10 단백질의

N-말단에 Fc 도메인이 연결하였으며, 이를 통해 이량체가 형성되고 융합단백질의 분리 정제 단계를 용이하게 할 수 있는 형태로 IL-10 변이체 단백질을 고안하였다. 여기에 사용된 Fc 단백질은 IgG1의 힌지 부분과 IgD 및 IgG4의 하이브리드 단백질인 CH2 및 CH3 부분으로 구성된 Fc 변이체(서열번호 8 및 9)로 국제특허출원 PCT/KR2020/006346에 기재되어 있는 것과 동일한 것을 사용하였으며, 본 문서에서는 상기 Fc 변이체를 편의상 "NTIG"로 명명하였다. 상기 PCT 출원을 본 문서에 참조로 삽입하는 바이다. 상기 Fc 변이체 단백질과 본 발명의 일 실시예에 따른 IL-10 변이체 단백질 사이에는 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열로 구성되는 링커 펩타이드(linker 1)을 삽입하도록 고안하였다. 비교예 1에서 사용된 IL-10 단백질은 야생형 인간 IL-10 단백질의 87번째 아미노산인 이소류신을 알라닌으로 치환함으로써 면역 활성화 증진 작용을 억제한 변이체 단백질(서열번호 10)로 실시예 2 내지 3 역시 동일하게 87번째 아미노산의 치환을 포함하고 있다. 한편, 실시예 1 및 2 그리고 비교예 2에서 사용된 IL-10 단백질(서열번호 1 및 11)은 116번째 아미노산인 아스파라긴(N)과 117번째 아미노산인 라이신(K) 사이에 펩타이드가 삽입된 것으로서, 상기 펩타이드로는 서열번호 4 또는 5로 구성되는 아미노산 서열을 갖는 스페이서 펩타이드를 사용하였으며, 특히 비교예 2의 서열번호 5로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 링커 펩타이드를 포함하는 IL-10 단백질(서열번호 11)은 Josephson 등이 고안한 단량체성 IL-10 단백질과 동일한 구조를 갖는 단량체성 IL-10을 포함한다(Josephson *et al.*, *J. Biol. Chem.* 275(18): 13552-13557, 2000). 상기와 같이 고안된 각각의 융합단백질의 구성요소들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드들을 PCR 증폭 및 올리고뉴클레오타이드 합성을 통해 제조한 후, 이를 Bsa I 제한효소와 T4 ligase를 이용하여 NTIG sub-vector 및, IL-10Vm sub-vector 및 골격벡터(pBispecific vector, Genexine, Inc.)에 서브클로닝한 후, 한 tube에서 반응시켜 최종 벡터 컨스트럭트를 제조하였다. 상기와 같이 제조된 벡터 컨스트럭트들을 Thermo Fisher사의 ExpiCHO kit를 이용하여 일시적 발현을 수행하였다. 구체적으로 ExpiCHO-S cell에 상기와 같이 제조된 벡터 컨스트럭트와 키트 내에 포함되어 있는 ExpiFectamine 시약을 혼합한 후 8% CO₂ 및 37°C의 조건을 갖춘 배양기에서 1일간 배양 후 온도를 32°C로 낮춰서 7일차까지 배양을 진행하였다.

- [76] 그런 다음 Protein A 포획 정제를 수행하였고, 비환원 및 환원 조건에서의 SDS-PAGE 분석을 통해서 후보물질이 정제되었는지 확인하였으며, 후보 물질의 pI 값을 고려한 제형화 완충액으로 제형화를 수행하였다. 제형화가 완료된 물질을 Nano drop을 이용하여 정량하고 SEC-HPLC를 이용해 최종 순도를 확인하였다. 도 2a 및 도 2b는 IL-10M의 배양 및 정제물의 SDS-PAGE 및 SEC-HPLC를 이용한 순도를 나타낸 것이다. 도 2c 및 도 2d는 IL-10M-1, IL-10M-2 정제물에 대한 SDS-PAGE 및 SEC-HPLC를 이용한 순도를 나타낸 것이다. 도 2e 및 도 2f는 IL-10M-3의 배양 및 정제물의 SDS-PAGE 및 SEC-HPLC를 이용한

순도를 나타낸 것이다.

[77] [표2]

본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질의 생산 결과

실시예	단백질 농도(mg/ml)	부피(ml)	전체 단백질 양(mg)	순도 (%)
비교예 1	5.0	3	15.2	57.5
실시예 1	4.3	6.2	26.66	82.7
실시예 2	3.64	6.2	22.56	78.1
비교예 2	18.5	3	55.64	70.5

[78] 그 결과, 표 2 및 도 2a 내지 2f에서 나타난 바와 같이, 비단량체성 IL-10을 생산할 경우(비교예 1) 단백질 생산량이 적고, 가장 낮은 순도를 보였으며, 단량체성 IL-10을 생산할 경우(실시예 1 및 2 및 비교예 2) 단백질 함량 및 순도가 대폭 증가하는 것으로 나타났다. 한편, 비교예 2의 경우 단백질 함량은 가장 높았으나, 순도 면에서는 본원발명의 실시예 1의 단백질이 가장 높은 82.7%의 순도를 나타내었다.

[79] 실시예 3: FcεRIα-Fc-IL-10Vm의 제조

[80] 3-1: 일시적 발현(transient expression)

[81] 본 발명자들은 IgE와 특이적으로 결합하는 수용체인 FcεRIα와 상기 실시예 1 및 비교예 2의 단량체성 IL-10 변이체 단백질(IL-10Vm)이 Fc 단백질로 연결된 융합단백질을 고안하였다.

[82] 구체적으로, 본 발명자들은 하기 표 3과 같은 구성을 갖는 융합단백질을 각각 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 올리고뉴클레오타이드 합성 및 PCR을 이용하여 제조한 후, 상기 실시예 1의 방법과 동일하게 FcεRIα sub-vector, NTIG Fc sub-vector 및, IL-10Vm sub-vector 및 골격벡터(pBispecific vector, Genexine, Inc.)에 서브클로닝한 후, 한 tube에서 반응시켜 최종 벡터 컨스트럭트를 제조하였다.

[83] [표3]

구성요소	실시예 3 (서열번호)	비교예 3 (서열번호)
신호서열	32	32
FcεRIα	33	33
링커 1	31	31
Fc	8	8
링커 2	2	3
IL-10Vm	1	11

- [84] 본 발명자들은 상기 융합단백질인 실시예 3의 FcεRIα-Fc-IL-10Vm을 "PG075-8"로 명명하였고, 비교예 3의 FcεRIα-Fc-IL-10Vm을 "PG075-9"로 명명하였다. 상기와 같이 제조된 벡터 컨스트럭트들을 Thermo Fisher사의 ExpiCHO kit를 이용하여 일시적 발현을 수행하였다. 구체적으로 ExpiCHO-S cell에 상기와 같이 제조된 벡터 컨스트럭트와 키트 내에 포함되어 있는 ExpiFectamine 시약을 혼합한 후 8% CO₂ 및 37°C의 조건을 갖춘 배양기에서 1일간 배양 후 온도를 32°C로 낮춰서 7일차까지 250 mL 규모의 배양을 진행하였다.
- [85] 그런 다음 Protein A 포획 정제를 수행하였고, 비환원 및 환원 조건에서의 SDS-PAGE 분석을 통해서 후보물질이 정제되었는지 확인하였으며, 후보 물질의 pI 값을 고려한 제형화 완충액으로 제형화를 수행하였다. 제형화가 완료된 물질을 Nano drop을 이용하여 정량하고 SEC-HPLC를 이용해 최종 순도를 확인하였다. 도 3a 및 3b는 각각 실시예 3의 FcεRIα-Fc-IL-10M(PG075-8)의 배양 및 정제물의 SDS-PAGE 및 SEC-HPLC를 이용한 순도를 나타낸 것이다. 도 3c 및 3d는 각각 비교예 3의 FcεRIα-Fc-IL-10M(PG075-9)의 배양 및 정제물에 대한 SDS-PAGE 및 SEC-HPLC를 이용한 순도를 나타낸 것이다.
- [86] 상기 도 3a 내지 3d에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 IL-10Vm 단백질은 실시예 1의 단량체성 IL-10 변이체를 API(active pharmaceutical ingredient)인 FcεRIα와 연결된 형태의 융합단백질을 발현할 경우, 생산수율 및 순도가 매우 높게 나타나는 것으로 확인된 반면, 비교예 2의 종래의 단량체성 IL-10 변이체 단백질을 적용한 경우에는 단백질 수율 및 순도가 현저하게 떨어지는 것을 확인하였다. 이에 본 발명자들은 실제 API로서 활성 단백질이 IL-10Vm 단백질과 함께 연결된 형태의 융합단백질을 생산하기 위한 안정적 세포주의 확립 및 실험실 규모의 단백질 생산에는 본 발명의 실시예 1의 IL-10Vm 단백질을 사용하였다.

[87] **3-2: 안정적 세포주의 구축 및 생산**

- [88] 이에, 본 발명자들은 상기 실시예 3-1에서 구축한 융합단백질을 암호화하는 유전자 컨스트럭트를 pAD15 발현벡터(WO2015/009052A)에 삽입한 후, CHO DG44(from Dr. Chasin, Columbia University, USA)세포에 Neon- transfection system을 이용하여 형질감염시켰다. 1차 스크리닝 과정으로 HT(5-hydroxytryptamine)가 없는 10% dFBS(Gibco, USA, 30067-334), MEMα(Gibco, 12561, USA, Cat No. 12561-049), HT+(Gibco, USA, 11067-030) 배지를 사용하여 HT 선별을 수행하였다. 이후, DHFR(dihydrofolate reductase)-시스템을 이용하여 발현 유전자를 증폭시키기 위해, HT 선별된 클론들을 이용하여 메토타렉세이트(MTX) 증폭을 수행하였다. 높은 생산성의 클론을 확보하기 위해 플레이트 상에서 미니 풀의 형태로 MTX 증폭을 수행하였으며 증폭이 확인된 1종에 대해 선별한 후, LDC(Limiting Dilution Cloning; 96 wells, 30 plates)를 진행하여 최종 세포주를 확보하였다.

- [89] 최종 확보된 세포주를 hyCellCHO 배지에서 700 ml 배지 배양 수행하였으며 배양 5일차에 수득된 배양액에 대해 Protein A 정제를 수행하여 정제된 단백질을 확인하였으며, 정제된 단백질은 SDS-PAGE 및 SEC-HPLC를 통해 양 및 순도를 분석하였다.
- [90] 그 결과, 도 3e 및 3f에서 확인되는 바와 같이, 확립된 안정적 세포주로부터 본 발명의 일 실시예에 따른 융합 단백질이 정상적으로 발현이 됨을 알 수 있었다.
- [91] **실험예 1: 혼합 림프구 반응 분석**
- [92] 본 발명자들은 상기 실시예에서 제조된 융합단백질의 면역 억제 활성을 확인하기 위해, 다수의 공여자로부터 제공된 전혈을 이용하여 혼합 림프구 반응을 분석하였다.
- [93] 이를 위해 구체적으로 본 발명자들은 10명의 공여자로부터 제공된 전혈을 Ficoll 구배 원심분리하여 말초혈액 단핵구를 분리하였다. 상기 분리된 단핵구의 수를 계수한 후, 이들을 혼합하고, 바이알 당(1 mL)당 5×10^6 세포로 세포 스타크를 만들었다.
- [94] 그런 다음, 상기 공여자로부터 받은 세포와 수용자의 세포를 녹인 후 세포수를 계수한 후 1×10^6 cells/ml의 농도로 재현탁하였다. 수용자 세포를 반응 세포 및 자극 세포로 나눈 후, 수용자의 자극 세포와 공여자 세포에 대하여 3,000 rad의 감마선을 조사하여 자극하였다. 그런 다음 cell trace violet(V450)으로 수용자의 반응세포를 염색하고 cell trace red(APC)로 수용자의 자극세포 및 공여자 세포를 염색하였다. 1×10^5 cell의 반응세포와 1×10^5 cell의 수용자의 반응세포를 10% FBS가 보충된 RPMI 배지 200 μ l에 첨가한 후 혼합하였다. 상기 혼합된 세포를 37°C 및 5% CO₂의 조건에서 6일간 배양하였다. 이 때, 비교예 1 및 2 그리고 실시예 1 및 2의 융합단백질을 0.5 μ M의 농도로 처리하였다. 상기 배양이 종료된 후, FACS 분석을 수행하였다. FACS 분석에 사용된 항체는 BV650-결합 항-CD3 항체, PE(phycoerythrin)-결합 항-PD1-항체, PE-TR-결합 항-CD-14 항체, PE-TR-결합 항-CD19 항체, PerCp-결합 항-CD4 항체, Cy5.5-결합 CD4 항체, APC(allophycocyanine)-결합 항-CD8 항체, H7-결합 항-CD8 항체를 사용하였다.
- [95] 상기 FACS 분석 결과, 수용자 반응 세포와 수용자 자극 세포를 반응시킨 경우(autologous, 이후 'Auto'로 약칭함)에는 수용자 CD4⁺T 세포와 CD8⁺T 세포의 증식이 나타나지 않지만, 수용자 반응 세포와 공여자 자극 세포를 반응시킨 경우(allogenic, 이후 "Allo"로 약칭함)에는 수용자 CD4⁺T 세포와 CD8⁺T 세포의 증식이 확인되었다(도 4a 내지 4d). 도 4a 내지 4d에서 나타난 바와 같이, 큰 차이는 나지 않았으나, 비교예 1의 이량체성 IL-10 융합단백질의 경우 CD4⁺ 증식 억제능이 가장 강력하게 나타난 반면, 비교예 2의 종래의 단량체성 IL-10을 포함하는 융합단백질의 경우 음성대조군과 차이가 나타나지 않았다. 반면, 본원발명의 실시예 1 및 2에 따른 단량체성 IL-10을 포함하는 융합단백질은 상기 비교예 2에 비해서 더 우수한 면역억제능을 나타냈다. 마찬가지로, CD8⁺T 세포 증식 억제능 역시 비교예 1의 이량체성 IL-10 융합단백질이 가장 높게 나타났고,

본 발명의 실시예 1 및 2에 따른 단량체성 IL-10 융합단백질은 비교예 1보다는 CD8+ T 세포 증식 억제능이 낮게 나타났으나, 비교예 2보다는 CD8+ T 세포 증식 억제능이 높은 것으로 확인되었다.

[96] **실험예 2: 비만세포 증식 분석**

[97] 본 발명자들은 본 발명의 단량체성 IL-10 융합단백질의 면역 자극 활성을 조사하고자 하였다.

[98] 구체적으로, 10% FBS, 1% 항생제, rmSCF 20 ng/ml 및 rmIL-3 10 ng/ml을 포함하는 RPMI 배지가 담겨진 96웰 플레이트에 골수유래 비만세포(BMMC)를 5×10^3 cells/100 μ l/well이 되도록 분주하고, 재조합 인간 IL-10와 비교예 1 및 2 그리고 실시예 1 및 2의 IL-10 융합단백질을 농도에 맞게 희석한 다음, 상기 96웰 플레이트에 100 μ l씩 처리하고, 37°C 및 5% CO₂ 조건에서 4일 동안 배양하였다. 이어, 상기 비만세포의 증식 정도를 측정하기 위해 96웰 플레이트에 MTS 시약을 20 μ l씩 분주한 후 상기 96웰 플레이트를 37°C의 온도 조건에서 CO₂ 배양기에 넣고 2시간 동안 반응시킨 다음, microplate 판독기를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[99] [표4]

농도 (pM)	0	0.5	2.9	14	72	360	2000
rhIL-10	1	1.01	1.06	1.21	1.37	1.55	1.63
비교예 1	1	1.00	1.00	0.98	1.05	1.20	1.26
실시예 1	1	1.06	1.03	1.02	1.03	1.02	1.00
실시예 2	1	1.00	1.00	1.01	0.97	1.02	1.01
비교예 2	1	0.99	1.03	1.18	1.20	1.25	1.40

[100] 그 결과, 도 5a 및 상기 표 4에서 확인되는 바와 같이, 양성 대조군인 rhIL-10의 비만세포 증식능이 가장 강하였고, 비교예 1 및 2의 IL-10 융합단백질의 경우, rhIL-10 보다는 낮았으나, 어느 정도 비만세포 증식능을 가지는 것으로 확인되었다. 반면, 본원발명의 실시예 1 및 2의 IL-10 융합단백질은 비만세포 증식능이 거의 나타나지 않았다. 이는 본 발명의 IL-10 변이체 단백질이 IL-10의 이중 활성화 중 면역 활성화 특성이 완전히 억제된 단백질임을 보여주는 결과이다. 그러나, 상기 실험결과의 경우 본 발명의 실시예 1 및 2의 융합단백질이 아무런 활성이 없는 형태로 발현된 결과라고 해석될 수 있으므로, 본 발명자들은 rhIL-10, 실시예 1 및 비교예 1의 융합단백질 만을 대상으로 처리 농도를 더 높여서 동일한 분석을 수행하였다.

[101] [표5]

농도 (nM)	0	0.004	0.02	0.04	0.16	0.63	2.5	10	40	100
rhIL-10	1	1	1	1.19	1.42	1.58	1.71	1.79	1.78	1.78
비교예 1	1	0.99	0.99	0.97	1	1.19	1.35	1.36	1.35	1.35
실시예 1	1	0.97	0.97	0.99	1.01	1.01	1	1.06	1.02	1.2

[102] 그 결과 상기 표 5 및 도 5b에서 나타난 바와 같이, 본원발명의 실시예 1의 융합단백질은 100 nM이라는 매우 높은 농도에서만 제한적인 비만세포 증식능을 나타내었다. 그러나, 상기 농도는 체내 투여시 사용되는 투여량 대비 현저하게 높은 농도이기 때문에, 체내 투여시 비만세포 자극과 같은 면역기능 자극 효과는 거의 없을 것으로 기대가 된다. **실험예 3: 면역 억제 활성 분석**

[103] 상기 비만세포 증식능 분석에 이어서, IL-10 융합단백질의 비만세포에서의 TNF- α 분비능 감소에 미치는 영향 즉, 면역 억제 활성을 조사하였다.

[104] **3-1: 비만세포에서의 TNF- α 분비 억제능 분석**

[105] 이를 위해, 구체적으로, 10% FBS, 1% 항생제, rmSCF 20 ng/ml 및 rmIL-3 10 ng/ml을 포함하는 RPMI 배지가 담겨진 96웰 플레이트에 골수유래 비만세포(BMMC)를 1×10^4 cells/50 μ l/well이 되도록 분주하고, 재조합 인간 IL-10와 비교예 1, 2 그리고 실시예 1, 2의 IL-10 융합단백질을 농도에 맞게 희석한 다음, 항-DNP IgE를 3 μ g/mL로 희석한 후 96웰 플레이트에 50 μ l씩 첨가하고, 37°C 및 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 이어, DNP-BSA(Antigen)을 400 ng/mL이 되도록 희석하여 96웰 플레이트에 50 μ l씩 첨가한 후, 37°C 및 5% CO₂ 조건에서 밤새 반응시켰다. 그런 다음 4°C에서 1,500 rpm의 속도로 5분간 원심분리를 한 후, 새로운 96웰 플레이트에 회수된 상등액 150 μ l를 분주한 후 TNF- α ELISA 키트(Biolegend, USA)를 이용하여 TNF α 의 농도를 측정하였다.

[106] [표6]

농도 (n)	0	0.31	1.25	5	20
비교예 1	0%	27%	37%	51%	51%

[107] [표7]

농도 (n)	0	1.56	6	25	100
실시예 1	0%	6.3%	27%	43%	45%
실시예 3	0%	58%	65%	80%	83%
실시예 2	0%	21%	33.6%	39%	46%
비교예 2	0%	13%	31%	45%	49%

- [108] 그 결과, 상기 표 6 및 7 그리고 도 6a 내지 6c에서 확인되는 바와 같이, 비교예 1(IL-10M)의 경우 농도의존적인 TNF- α 억제 활성을 나타내었다. 이때, 본 발명의 실시예 1의 IL-10M-1 및 실시예 2의 IL-10M-2와 비교예 2의 IL-10M-3의 경우 비교예 1과 유사하게 농도의존적인 TNF- α 분비 감소능을 나타내었으나, 그 농도가 비교예 1 대비 5 배 정도 더 높은 농도에서 동등한 활성을 나타냈다. 더구나, 본 발명의 일 실시예에 따른 PG075-8의 경우 더 낮은 농도에서도 매우 우수한 TNF- α 분비 억제능을 나타내, IgE의 효과적인 차단이 가능함을 확인할 수 있었다. 상기 결과를 종합하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 IL-10 변이체 단백질은 이량체형 IL-10 변이체 단백질에 비해 면역 억제 활성은 낮게 나타났으나, IL-10의 이중 특성 중 하나인 면역 활성 증진 작용의 억제에 있어서 가장 효과적이었고, 생산량 및 순도의 측면에서 가장 유리한 IL-10 변이체 단백질임을 알 수 있었다.
- [109] 특히 본 발명의 일 실시예에 따른 IL-10 변이체 단백질은 유사하게 단량체 형태로 발현되는 비교예 2의 IL-10 변이체 단백질과 비교하여 농도 의존적인 TNF- α 분비 자극 활성을 나타내었고, Fc ϵ RI α 가 융합된 융합단백질로 사용될 경우(실시예 3)에도 알러지 반응 억제 활성에 현저한 효과가 있음을 확인하였다.
- [110] **3-2: 대식세포에서의 LPS 유도 TNF- α 분비 억제능 분석**
- [111] 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에 따른 PG075-8 단백질의 비만세포에서의 TNF- α 분비능 억제능을 확인한 데 이어, TNF- α 매개 염증반응에 밀접하게 관련된 면역세포인 대식세포에서도 역시 TNF- α 분비를 억제할 수 있는지 조사하였다.
- [112] 이를 위해 구체적으로, RAW264.7 세포를 5×10^5 cells/mL 농도로 준비한 후 96 웰 플레이트에 $100 \mu\text{L}$ 씩 분주한 후, 37°C , 5% CO_2 배양기에서 12시간 동안 배양하였다. 그런 다음 본 발명의 일 실시예에 따른 PG075-8을 순차적으로 희석한 후 상기 배양중인 RAW264.7 세포에 처리하였다. 이 때, LPS(400 ng/mL)를 96 웰 플레이트에 $100 \mu\text{L}$ 씩 처리함으로써 TNF- α 발현을 유도하였다. 그런 다음, 37°C , 5% CO_2 배양기에서 12시간 동안 배양하고, 상층액 $150 \mu\text{L}$ 를 분리한 후 상층액에 포함된 TNF- α 발현량을 상기 실험예 3-1과 동일한 방법으로 측정하였다(표 8 및 도 6d).

[113] [표8]

본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질(PG075-8)의 대식세포에서의 TNF- α 분비 억제율

	농도 (nM)									IC ₅₀ (nM)
	0.019	0.096	0.48	2.4	12	60	100	300	1507	
TNF- α 분비 억제율 (%)	7%	13%	10%	14%	22%	31%	38%	40%	42%	10.42

[114] 그 결과, 표 8 및 도 6d에서 확인되는 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 PG075-8 융합단백질은 농도의존적으로 대식세포에서의 TNF- α 의 발현을 억제하였다. **실험예 4: IL-10 수용체와의 친화도 분석**

[115] 본 발명자들은 상기 실험예 1 내지 3의 실험결과를 바탕으로, 비교예 1 및 실시예 1의 융합단백질의 IL-10 수용체 1(IL-10R1)과의 친화도를 생물층 간섭계 분석(bio-layer interferometry, BLI) 분석을 통해서 분석하였다. 이때 대조군으로는 Fc ϵ RI α 가 연결되지 않고, 하이브리드 Fc 영역에 야생형 IL-10의 87번째 아미노산인 이소류신이 알라닌으로 치환되어, 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 면역 활성화 기능이 억제된 이량체성 IL-10 변이체 단백질(IL-10V)이 연결된 융합단백질(IL-10V) 및 상기 IL-10V의 융합단백질에서 IL-10 변이체 단백질의 116번째 아미노산인 아스파라긴(N)과 117번째 아미노산인 라이신(K) 사이에 스페이스 펩타이드(GGSGGSGGS, 서열번호 4)가 삽입된 단량체성 IL-10 변이체 단백질(IL-10Vm, 서열번호 1)이 연결된 융합단백질(Fc-IL-10Vm)이 사용되었다. 상기 NTIG-IL-10Vm은 Fc ϵ RI α 이 연결되지 않은 점을 제외하면 본 발명의 일 실시예에 따른 PG075-8과 동일하다.

[116] 이를 위해 우선 본 발명자들은 Dip and Read™ Amine Reactive 2nd Generation(AR2G) Reagent Kit(forteBio, Cat No. 18-5092)를 이용하여 96웰 플레이트에 IL-10R His-tag 단백질을 부착시켰다. 구체적으로, 96웰 플레이트에 D.W. 200 μ l를 분주한 후, 상기 키트에 포함된 amine biosensor를 씻아 10분 동안 수화시켰다. 이어, D.W. 200 μ l를 추가로 분주한 후, 필요한 시료 양의 1/20로 EDC:NHS를 1:1로 혼합한 후, D.W.에 희석하여 96웰 플레이트에 200 μ l씩 분주하였다. 이어, IL-10R His-tag 단백질을 10 mM acetate pH 5.0 용액에 10 μ g/ml이 되도록 희석한 후 상기 96웰 플레이트에 200 μ l씩 첨가하였다. 이후, 1 M 에탄올아민을 200 μ l씩 96웰 플레이트에 첨가한 후, Biosensor 플레이트와 샘플 플레이트를 Octet -2 기기에 넣고 측정하였다. 측정이 끝난 후 샘플 플레이트에 1x Kinetics 완충액을 200 μ l를 첨가한 후, 기저값(baseline)을 정하였다. 이후, 상기 실시예에서 제조된 NTIG-IL-10 융합단백질을 다양한 농도(0, 62.5, 125, 250, 5000

및 1,000 nM)로 1x Kinetic 완충액에 희석한 후 샘플 플레이트에 200 μ l로 분주한 후, Octet[®] K2 기기로 BLI 분석을 수행하여 결합 친화도를 측정하였다.

[117] [표9]

파라미터	비교예 1	실시예 1	실시예 3(PG075-8)
K _D (nM)	11.1±0.9	29.2±8.85	< 0.001
K _{on} (1/Ms)	71100±6670	20550±2312	11,500±980
K _{dis} (1/s)	0.0008	0.0006	< 1.0E-07
R ²	0.97	0.97	0.98

[118] 그 결과, 도 7 및 표 9에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질(NTIG-IL-10Vm)은 K_d 값은 29.2 nM로 비교예 1의 단량체성 IL-10 융합단백질(NTIG-IL-10V)의 K_d 값(11.1 nM)의 약 세 배 정도로 나타났다. 따라서, IL-10R과의 친화력은 비교예 1의 단량체성 IL-10 융합단백질에 비해 다소 떨어지는 것으로 나타났다. 종래 연구결과도 단량체성 IL-10의 경우 이량체성 IL-10 단백질에 비해 IL-10R과의 친화성이 떨어지는 것으로 나타났기 때문에, 충분히 예상할 수 있는 바이다. 반면, 본 발명의 실시예 1의 융합단백질(FcεRIα-Fc-IL-10Vm, PG075-8)은 K_D 값이 0.001 nM 미만으로 나타나, IL-10R과의 친화도가 더 높은 것으로 나타났다. 이는 API인 FcεRIα와 연결되었음에도 불구하고 단량체성 IL-10 변이체가 IL-10R에 충분한 결합능이 있음을 보여주는 결과이다.

[119] **실�험예 5: IgE 결합능 분석**

[120] 본 발명자들은 실시예 3에서 제조된 융합단백질(FcεRIα-Fc-IL-10Vm)의 마우스 IgE 및 인간 IgE와의 친화도를 생물층 간섭계(BLI) 분석을 통해서 분석하였다.

[121] 이를 위해 우선 본 발명자들은 Dip and Read[™] Amine Reactive 2nd Generation(AR2G) Reagent Kit(forteBio, Cat No. 18-5092)를 이용하여 96 플레이트에 대조군으로 IL-10Vm이 없는 FcεRIα-Fc 단백질 및 실시예 3에서 제조된 융합단백질을 부착시켰다. 구체적으로, 96웰 플레이트에 D.W. 200 μ l를 분주한 후, 상기 키트에 포함된 amine biosensor를 씻어 10분 동안 수화시켰다. 이어, D.W. 200 μ l를 추가로 분주한 후, 필요한 시료 양의 1/20로 EDC:NHS를 1:1로 혼합한 후, D.W.에 희석하여 96웰 플레이트에 200 μ l 씩 분주하였다. 이어, FcεRIα-Fc 단백질 및 FcεRIα-Fc-IL-10Vm 융합단백질을 10 mM acetate pH 5.0 용액에 10 μ g/ml이 되도록 희석한 후 상기 96웰 플레이트에 200 μ l씩 첨가하였다. 이후, 1 M 에탄올아민을 200 μ l 씩 96웰 플레이트에 첨가한 후, Biosensor 플레이트와 샘플 플레이트를 Octet[®] K2 기기에 넣고 측정하였다. 측정이 끝난 후 샘플 플레이트에 1x Kinetics 완충액을 200 μ l를 첨가한 후, 기저값(baseline)을 정하였다. 이후, 상기 실시예에서 항-DNP 마우스 IgE(Sigma)를 다양한 농도(50 pM 내지 3.125 nM)로 1x Kinetic 완충액에 희석한 후 샘플 플레이트에 200 μ l로

분주한 후, Octet[®] K2 기기로 BLI 분석을 수행함으로써 결합 친화도를 측정하였다.

[122] [표10]

	FcεRIα-Fc			PG075-8 (FcεRIα-Fc-IL-10Vm)		
	1차	2차	3차	1차	2차	3차
평균 K _D (nM)	0.364	0.478	0.940	0.224	0.282	0.346
	평균: 0.594			평균: 0.284		
평균 K _{on} (1/Ms)	1.23x10 ⁵	1.49x 10 ⁵	1.66x10 ⁵	1.52x10 ⁵	1.44x10 ⁵	1.39x10 ⁵
평균 K _{dis} (1/s)	4.48x10 ⁻⁵	7.10x10 ⁻⁵	1.56x10 ⁻⁴	3.40x10 ⁻⁵	4.06x10 ⁻⁵	4.82x10 ⁻⁵
평균 R ²	0.996	0.999	0.997	0.999	0.999	0.999

[123] 그 결과, 도 8a 및 표 10에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 실시예에 따른 융합단백질(FcεRIα-Fc-IL-10Vm, PG075-8)의 K_D 값은 0.284 nM로 대조군인 FcεRIα-Fc 융합단백질보다 다소 낮은 것으로 나타났는데, 이 정도의 차이는 유의한 차이는 아니므로, IL-10 단백질의 부가에 의해 IgE와의 결합능이 떨어지지 않음을 확인할 수 있었다. 상기 결과와 함께, 본 발명에서 사용한 인간 FcεRIα와 인간 IgE의 결합도를 측정하기 위하여, 본 발명자들은 실시예 3의 융합단백질(PG075-8)과 인간 IgE와의 결합 친화도를 상술한 방법을 이용하여 분석하였다.

[124] [표11]

	PG075-8(FcεRIα-Fc-IL-10Vm)
평균 K _D (nM)	0.346
평균 K _{on} (1/Ms)	2.19x10 ⁵
평균 K _{dis} (1/s)	7.59x10 ⁻⁵
평균 R ²	0.9955

[125] 그 결과, 도 8b 및 표 11에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질은 인간 IgE와도 상기 마우스 IgE와 유사한 정도의 친화도를 나타냈다.

[126] **실례 6: 약물 동태학(pharmacokinetics) 분석**

[127] 본 발명자들은 본 발명의 융합단백질이 체내 투여시 안정성이 얼마나 되는지 확인하기 위해, 약물 동태학 분석을 수행하였다.

[128] 구체적으로, 각 그룹당 3두의 SD 랫트를 대상으로 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질(PG075-8)을 1 mg/Kg의 투여량으로 정맥 주사, 복강주사, 근육주사 및 피하주사로 각각 1.0 mL/kg, 1.0 mL/kg, 0.4 mL/kg 및 1.0 mL/kg의 부피로 투여한 후, 정맥주사의 경우 0분, 5분, 1시간, 5시간, 10시간, 24시간, 48시간,

72시간, 120시간, 168시간, 240시간 및 336시간 동안 그리고 다른 투여방법(복강주사, 근육주사, 및 피하주사)의 경우에는 5분 후 측정을 제외하고는 상기 정맥주사와 동일한 시간대에 혈청을 채취해서 인간 IgG4 Fc ELISA 를 이용하여 상기 융합단백질을 정량하였다.

[129] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질은 투여경로와 무관하게 시간의 경과에 따라서 완만한 감소양상을 나타냈는데, 이는 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질이 체내에서 상당 기간 안정적으로 유지가 됨을 보여주는 것이다.

[130] 실험예 7: 혈액독성 분석

[131] 종래의 재조합 IL-10은 투여농도를 높이거나, 반복투여시 혈액내 헤모글로빈 농도가 감소함으로써 빈혈 증상이 나타나고, 혈소판 농도가 감소함에 따라 혈소판 감소증(thromocytopenia)이 나타나는 부작용이 보고된 바 있다(Tilg *et al.*, *J. Immunol.* 164(4): 2204-2209, 2002; Fedorak *et al.*, *Gastroenterology* 119(6): 1473-1482, 2000). 이에 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질이 그러한 부작용을 나타낼 지 여부에 대하여 조사하였다.

[132] 이를 위해 구체적으로, 본 발명자들은 자성 ICR 마우스를 대상으로 그룹당 3마리씩 구성 후 각 그룹별로 PG075-8를 0, 50, 150 및 300 mg/kg 용량으로 투여하고, 약물 투여 후 11일차에 혈액을 채취하고, 혈구분석기(XN-V, SYSMEX, JAPAN)를 이용하여 감별 백혈구수(white blood cell differential count), 총적혈구수(total RBC), 및 혈소판수(total platelet)을 분석하였다. 그 결과 도 10에서 나타나는 바와 같이, PG075-8 투여 시 혈구 세포 등의 수에는 영향이 전혀 없었다.

[133] 실험예 8: 음식물 알러지에 대한 효능 실험

[134] 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질 PG075-8이 실제 알러지 질환에 대하여 효과를 나타낼 수 있을지 확인하기 위해, 알러지 유발원인 난백 알부민(OVA)로 감작시킨 실험동물을 대상으로 OVA 경구 투여시 발생하는 알러지 증상인 설사 증상이 얼마나 개선이 되는지 여부를 조사하였다.

[135] 구체적으로, Balb/c 마우스(코아텍)들에 대하여 OVA(ovalbumin) 50 µg 및 알룸(Alum) 1 mg을 섞은 용액을 14일 간격으로 2회 복강 투여하여 감작(sensitization)시켰다. 이어, 28, 30, 32, 34, 36일째 총 5회에 걸쳐 2일 간격으로 OVA 50 mg을 경구 투여하여 장에 음식물 알러지를 유발하였다. 그 과정에서 31일째에 각 그룹을 구성하는 약물을 투여해주었다. 제1그룹(대조군)에는 인산완충액(PBS)을, 제2그룹에는 IgE_{TRAP}(5 mg/kg)을, 제3그룹에는 본 발명의 일 실시예에 따른 PG075-8(7.3 mg/kg)을 각각 물수를 맞추어 계산한 후 투여하였다. 총 5회에 걸쳐 OVA를 경구 투여하면서 설사 발생 여부를 확인하였으며, 37일째 마우스를 부검하여 각 그룹에 속한 마우스에 대하여 소장 내 비만세포의 수, 혈중 IgE 농도 및 혈중 비만세포의 탈과립 효소 농도(MCPT-1, Mast cell protease-1)를 분석하였다. 그 결과, 도 11에서 확인되는 바와 같이, 본 발명의 일

실시예에 따른 PG075-8을 투여한 군에 속한 마우스에서 대조군 및 IgE_{TRAP} 투여군 마우스에 비하여 식품 알러지가 완화되는 효과를 확인할 수 있었다.

- [136] 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 IL-10Vm과 다른 융합파트너로서 FcεRIα를 적용한 융합단백질은 상기 면역세포들의 활성화와 그들의 기능 특히 항-염증성 사이토카인의 분비, 항원제시능 등을 억제함으로써, 과활성화된 면역기능에 기인한 다양한 면역관련 질환들 예컨대, 아토피성 질환, 음식 알러지, 만성 자발성 두드러기(chronic spontaneous urticaria), 천식 등의 알러지 질환의 치료에 사용될 수 있다.

- [137] 본 발명은 상술한 실시예 및 실험예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

산업상 이용가능성

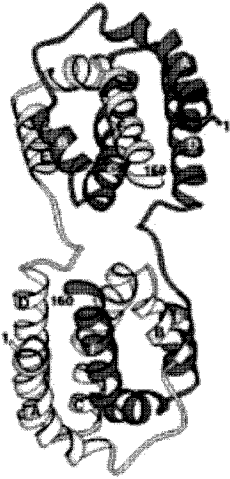
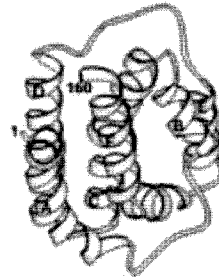
- [138] 본 발명의 일 실시예에 따른 단량체성 IL-10 변이체 단백질과 이를 포함하는 융합단백질은 면역관련 질환의 치료제 개발에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

청구범위

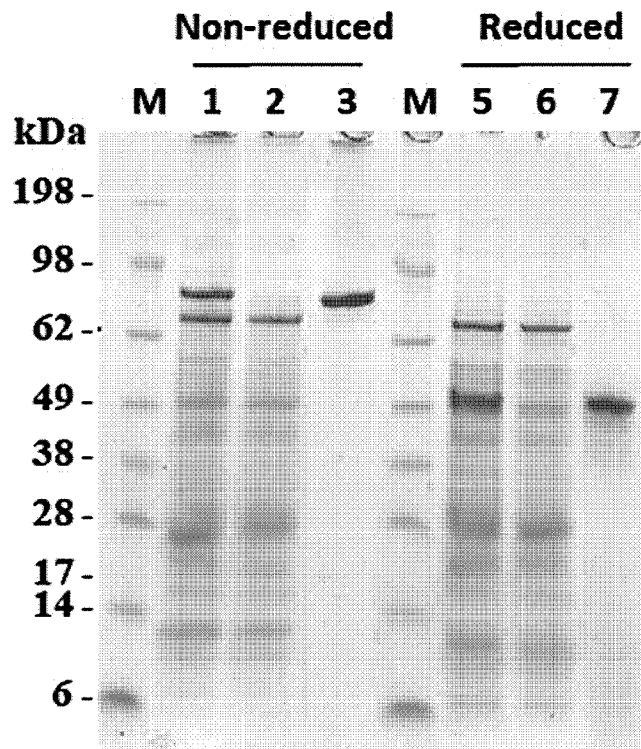
- [청구항 1] 인간 Interleukin-10(이하, IL-10) 단백질의 성숙형 형태(mature form) 기준으로 116번째 아미노산인 아스파라긴 및 117번째 아미노산인 라이신 사이에 6 내지 12 a.a.의 길이를 갖는 스페이스 펩타이드가 삽입된 단량체성 IL-10 변이체 단백질.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
서열번호 1 또는 39로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는, 단량체성 IL-10 변이체 단백질.
- [청구항 3] 인간 IL-10 단백질의 성숙형 형태(mature form) 기준으로 116번째 아미노산인 아스파라긴 및 117번째 아미노산인 라이신 사이에 6 내지 12 a.a.의 길이를 갖는 스페이스 펩타이드가 삽입된 단량체성 IL-10 변이체 단백질을 포함하는 융합단백질.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 단량체성 IL-10 변이체 단백질은 서열번호 1 또는 39로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는, 융합단백질.
- [청구항 5] 제3항에 있어서,
다른 기능을 담당하는 하나 이상의 융합 파트너 단백질(partner protein)을 포함하는, 융합단백질.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 융합 파트너 단백질은 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 상기 항체의 항원-결합 단편, 상기 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 유사체, 항체의 Fc 영역, 항체 Fc 영역 수용체, 상기 항체 Fc 영역 수용체의 Fc 영역 결합 세포외 도메인, 이량체화 도메인, 사이토카인, 또는 면역조절 펩타이드인, 융합단백질.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 항체 Fc 영역은 서열번호 6 내지 9중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는, 융합단백질.
- [청구항 8] 제6항에 있어서,
상기 항체 Fc 영역 수용체는 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛, 또는 이의 세포외 도메인인, 융합단백질.
- [청구항 9] 제6항에 있어서,
상기 항체의 항원-결합 단편은 ab, F(ab')₂, Fab', scFv, diabody, triabody, sdAb(single domain antibody), V_{NAR} 또는 V_HH인, 융합단백질.
- [청구항 10] 제6항에 있어서,
상기 항체 유사체는 affibody, affilin, affimer, affitin, alphabody, anticalin, avimer, DARPin, Fynomer, Kunitz domain peptide, monobody, rebody, VLR, 또는 nanoCLAMP인, 융합단백질.

- [청구항 11] 제6항에 있어서,
상기 항체의 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD 또는 IgM의 Fc 영역 또는 상기 Ig 서브클래스 중 둘 이상의 항체 Fc 영역 내의 도메인들이 혼합된 하이브리드 Fc인, 융합단백질.
- [청구항 12] 제6항에 있어서,
상기 이량체화 도메인은 항체의 힌지 도메인, LIM/double zinc-finger motif, RAG1 도메인, HAT dimerization domain, TRFH dimerization domain, Stat3 dimerization, 또는 LFB1/HNF1 dimerization domain인, 융합단백질.
- [청구항 13] 제6항에 있어서,
상기 사이토카인은 IL-4, IL-6, IL-1 α , 또는 TGF- β 인, 융합단백질.
- [청구항 14] 제6항에 있어서,
상기 면역조절 펩타이드는 PD-L1 또는 CTLA-4(CD152)인, 융합단백질.
- [청구항 15] 제1항 또는 제2항의 단량체성 IL-10 변이체 단백질 또는 제3항 내지 제14항 중 어느 한 항의 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드.
- [청구항 16] 제15항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.
- [청구항 17] 제1항 또는 제2항의 단량체성 IL-10 변이체 단백질 또는 제3항 내지 제14항 중 어느 한 항의 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 면역억제용 약학적 조성물.
- [청구항 18] 제1항 또는 제2항의 단량체성 IL-10 변이체 단백질 또는 제3항 내지 제14항 중 어느 한 항의 융합단백질을 유효성분으로 포함하는, 면역질환 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 19] 제18항에 있어서,
상기 면역질환은 제1형 당뇨병, 원형 탈모증(alopecia areata), 항-인산지질 항체 증후군(antiphospholipid antibody syndrome), 류마티스성 관절염, 건선 또는 건선성 관절염, 다발성 경화증(multiple sclerosis), 전신 홍반 루푸스(systemic lupus erythematosus), 염증성 장질환(inflammatory bowel disease), 애디슨병(Addison's disease), 그레이브병(Graves' disease), 쇼그렌 증후군(Sjögren's syndrome), 길랑-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 중증 근무력증(Myasthenia gravis), 염증성 근육병(inflammatory myopathy), 자가면역성 혈관염(autoimmune vasculitis), 자가면역성 간염(autoimmune hepatitis), 출혈성 빈혈(hemolytic anemia), 특발성 혈소판감소성 자반(idiopathic thrombocytopenic purpura), 일차성 담즙성 간경화증(primary biliary cirrhosis), 피부경화증(scleroderma), 백반증(vitiligo), 악성 빈혈(pernicious anemia), 알러지성 질환 및 만성 소화장애(celiac disease)로 구성되는 군으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

[도1]

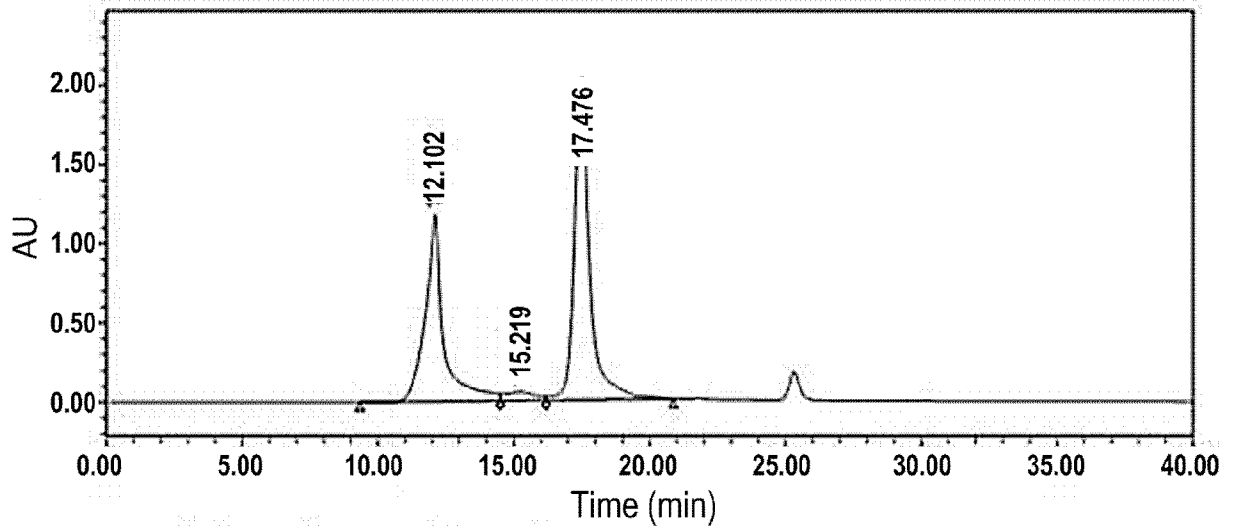
dimeric IL-10
(native)monomer of
dimeric IL-10monomeric
IL-10 variant

[도2a]



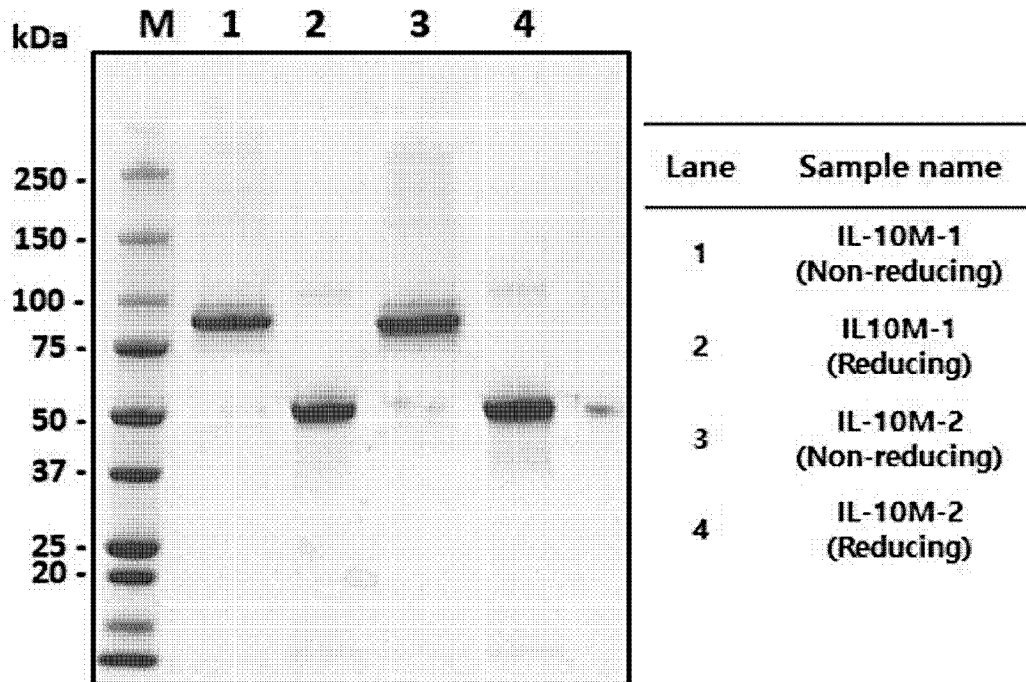
Lane	Sample name
1,5	Input
2,6	Flow-through
3,7	IL-10M

[도2b]

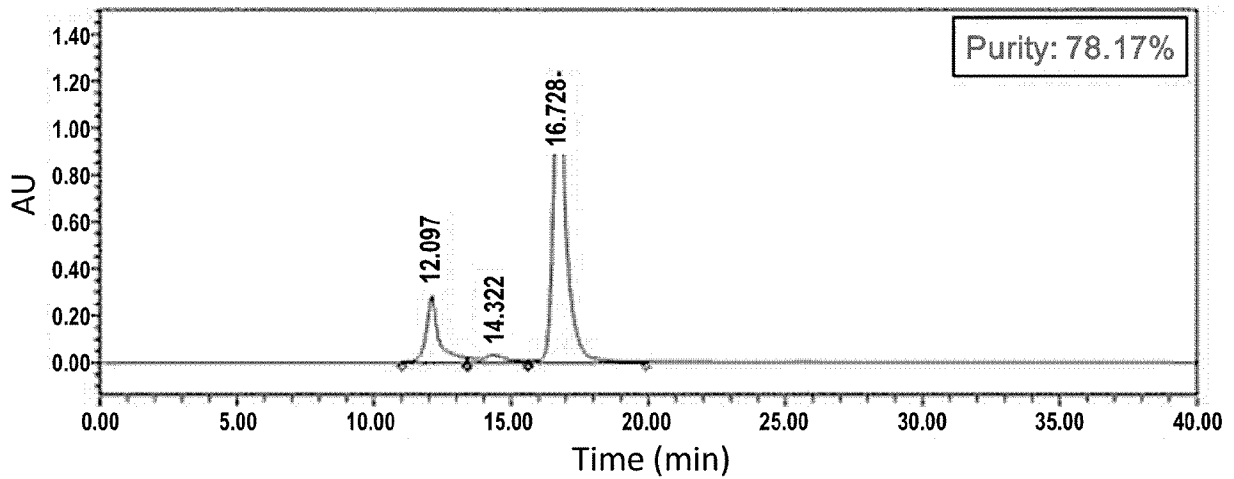
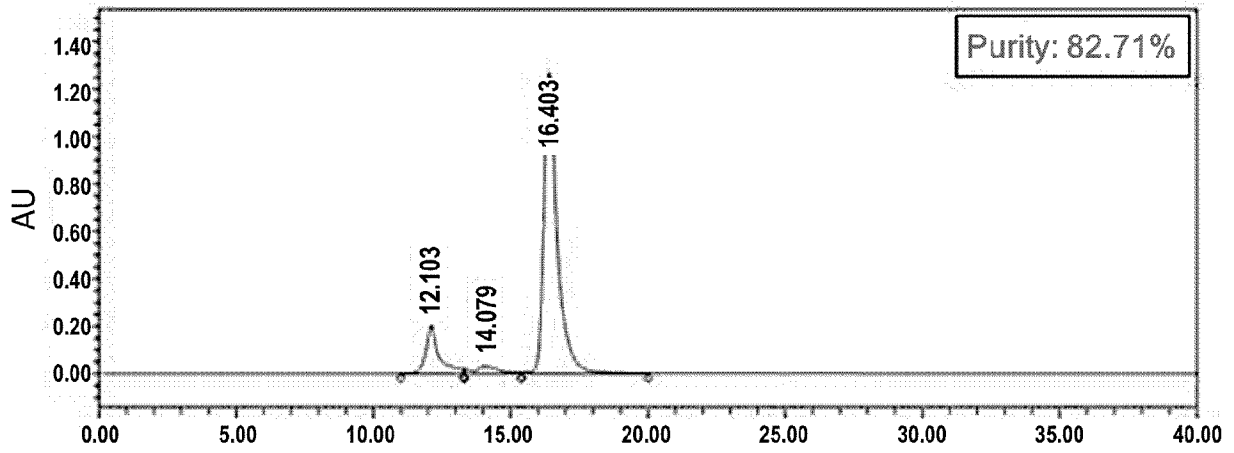


	RT	Area	% Area	Height
1	12.102	55387239	39.61	1180692
2	15.219	3991822	2.85	51616
3	17.475	80464851	57.54	2031422

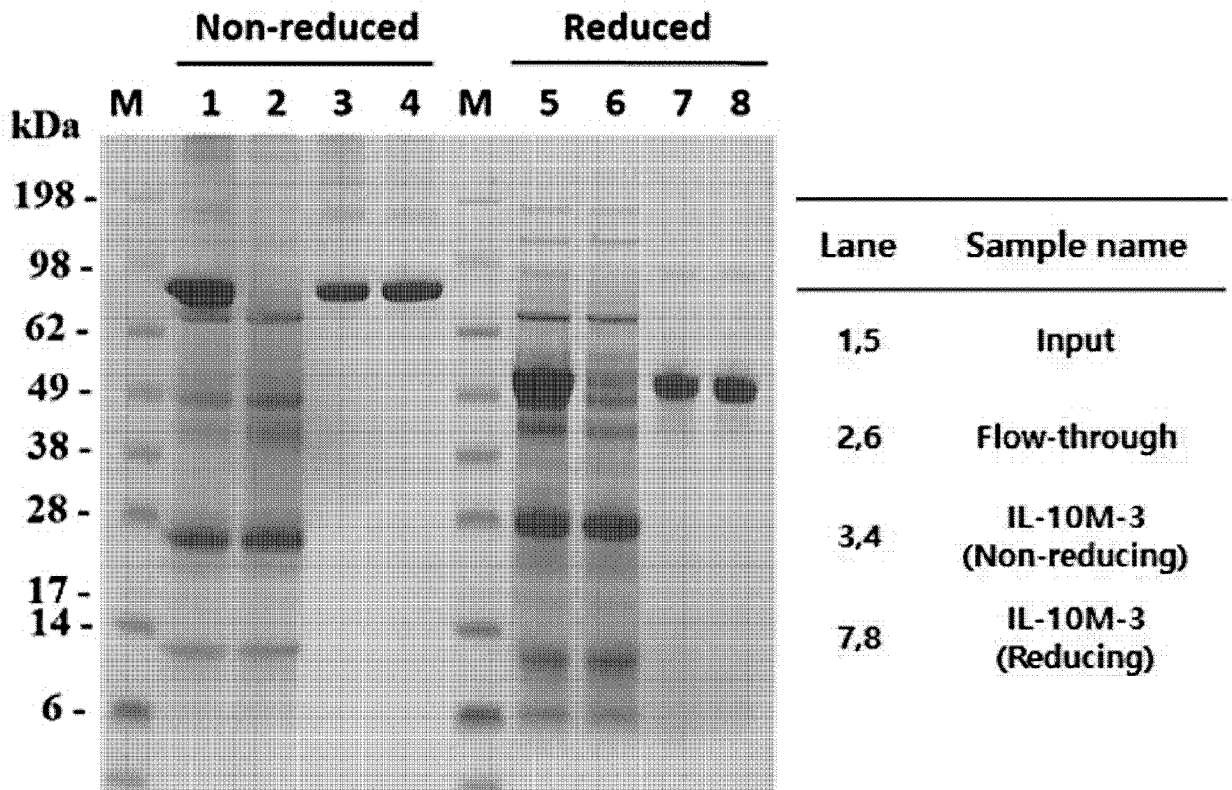
[도2c]



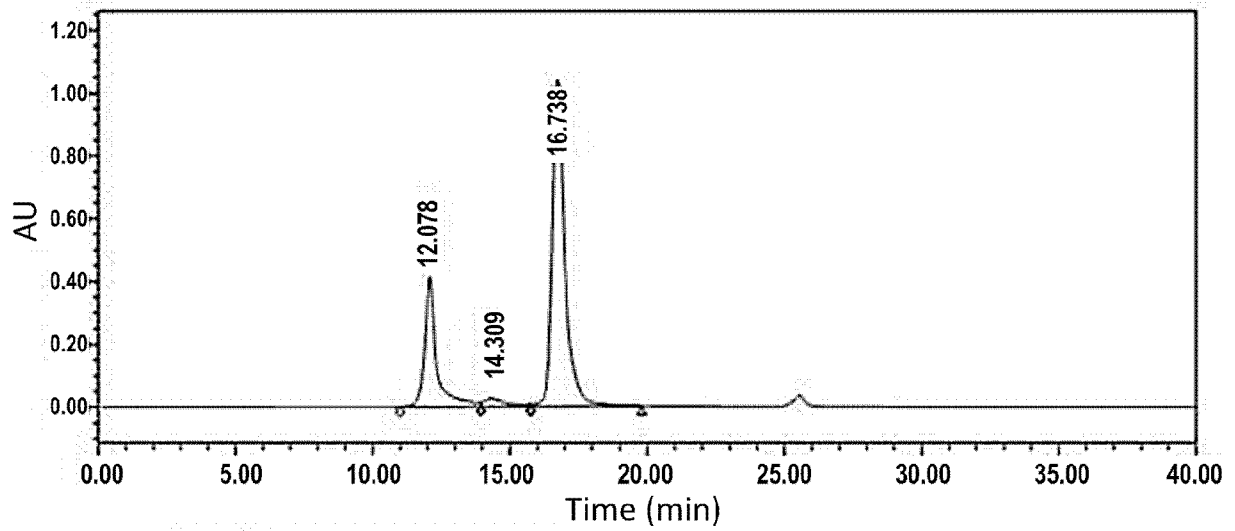
[도2d]



[도2e]

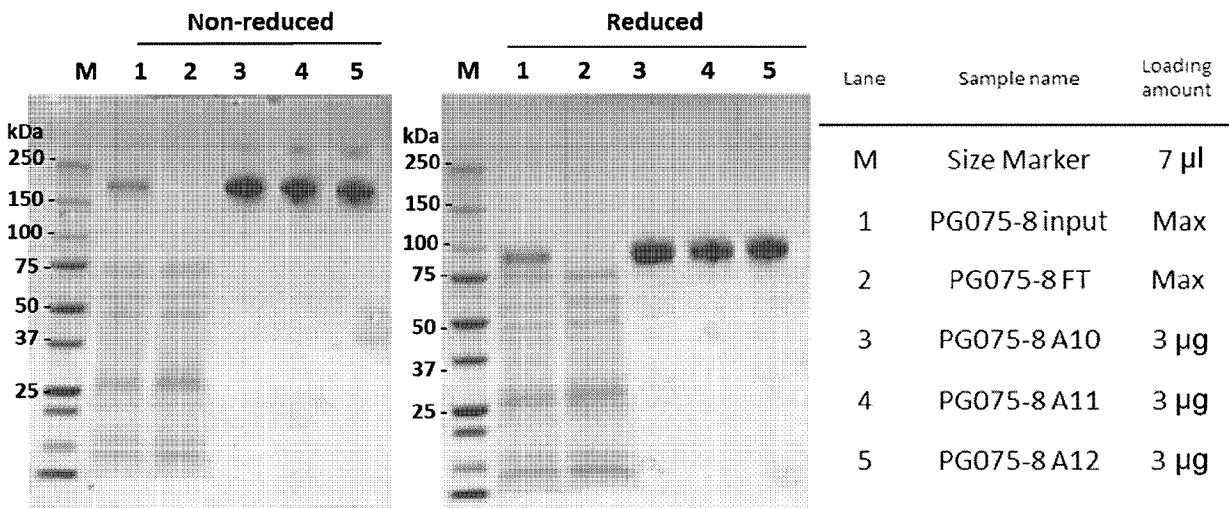


[도2f]

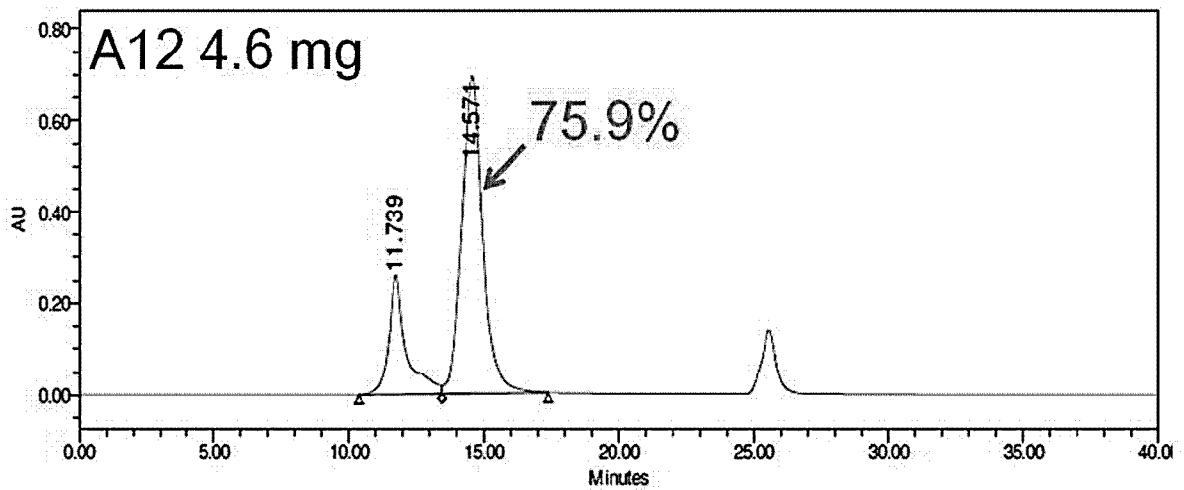
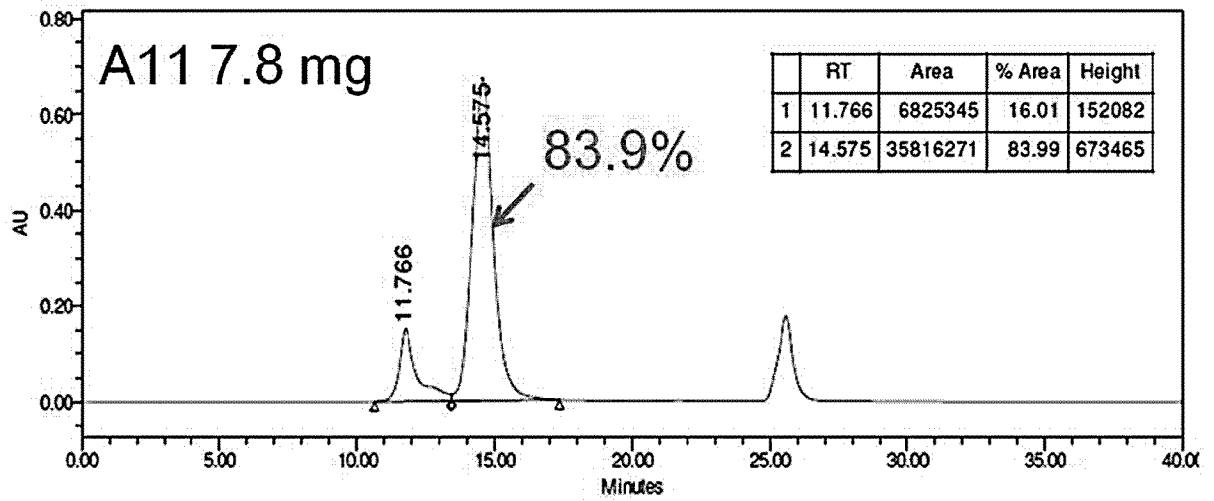
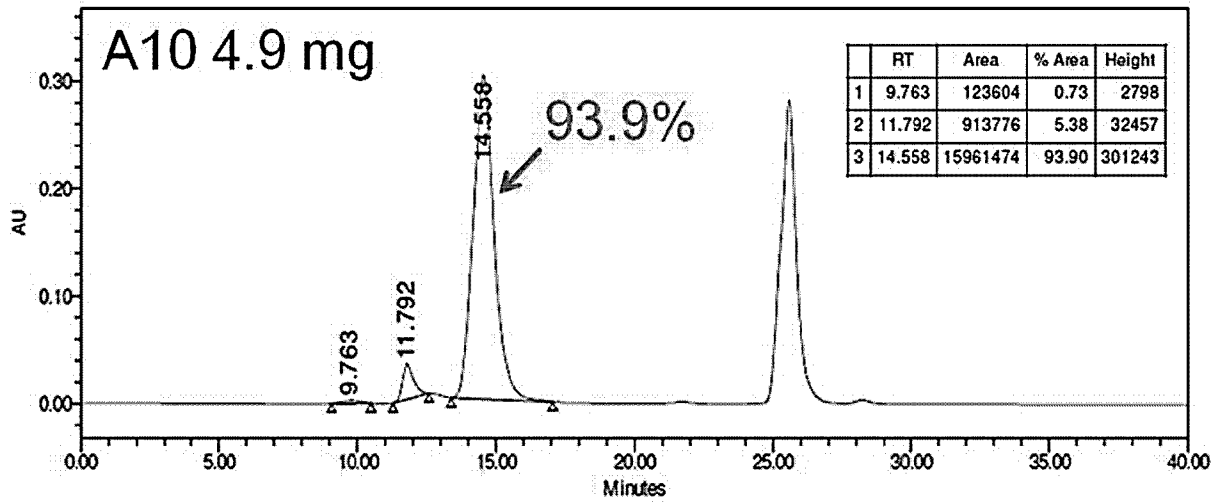


	RT	Area	% Area	Height
1	12.078	12369086	26.19	413439
2	14.309	1537350	3.25	25888
3	16.738	33329199	70.56	1038510

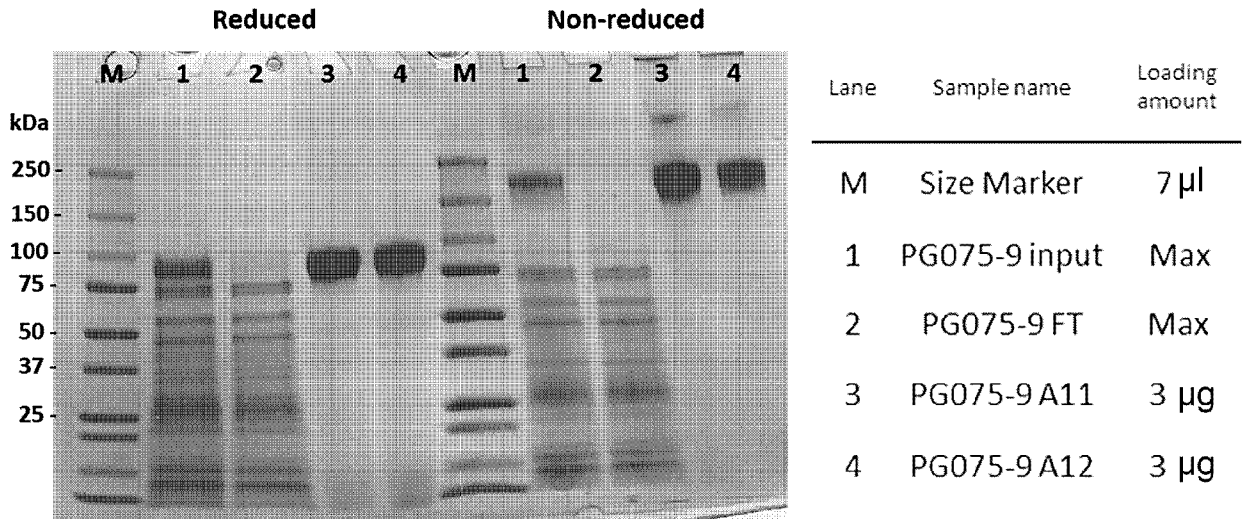
[도3a]



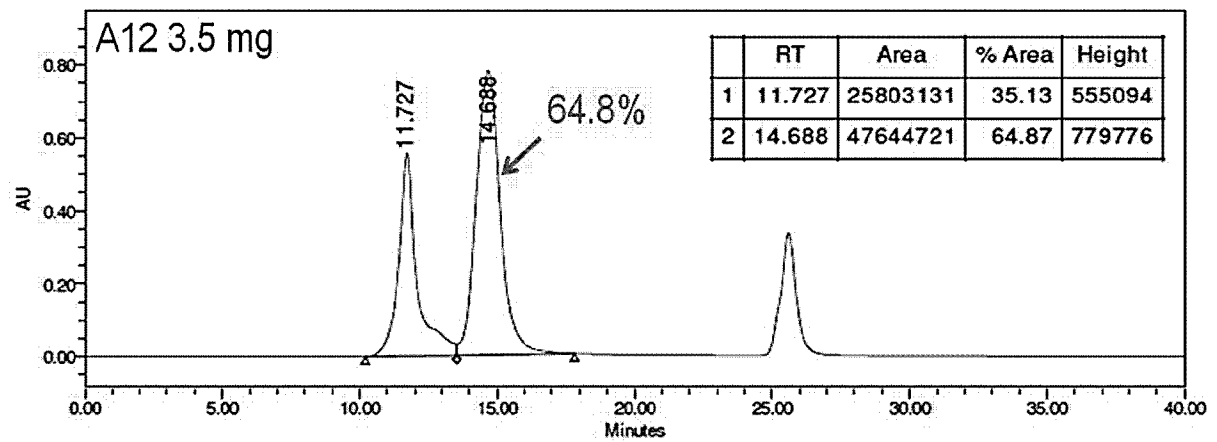
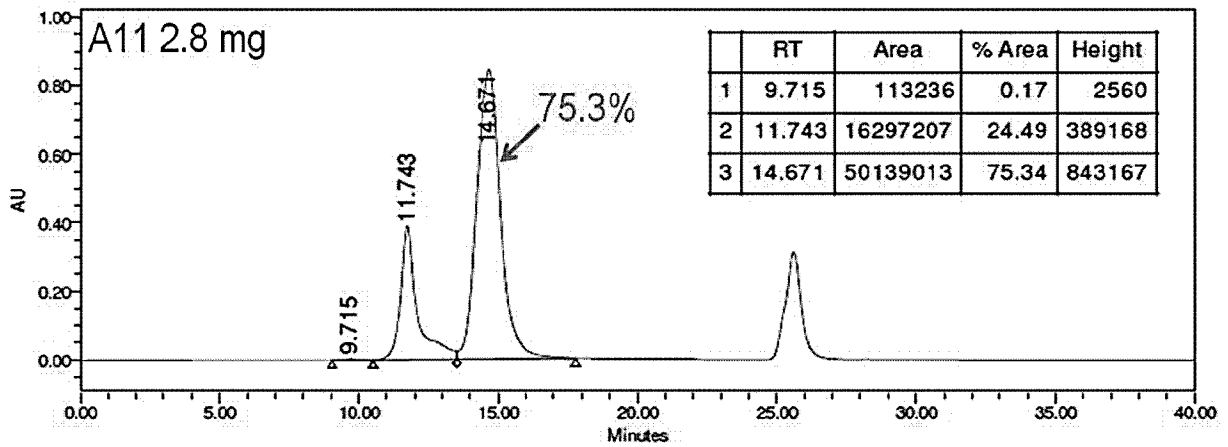
[도3b]



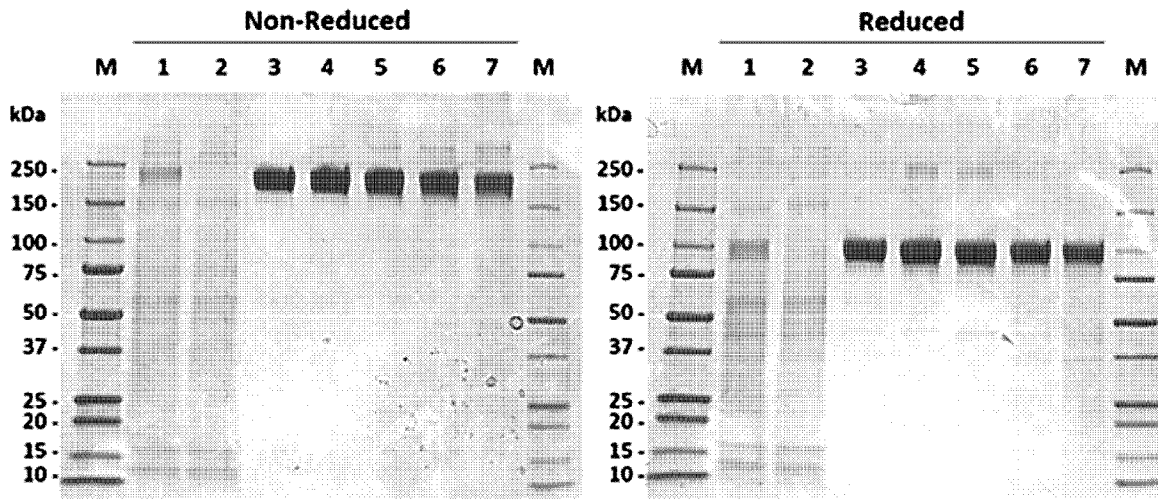
[도3c]



[도3d]

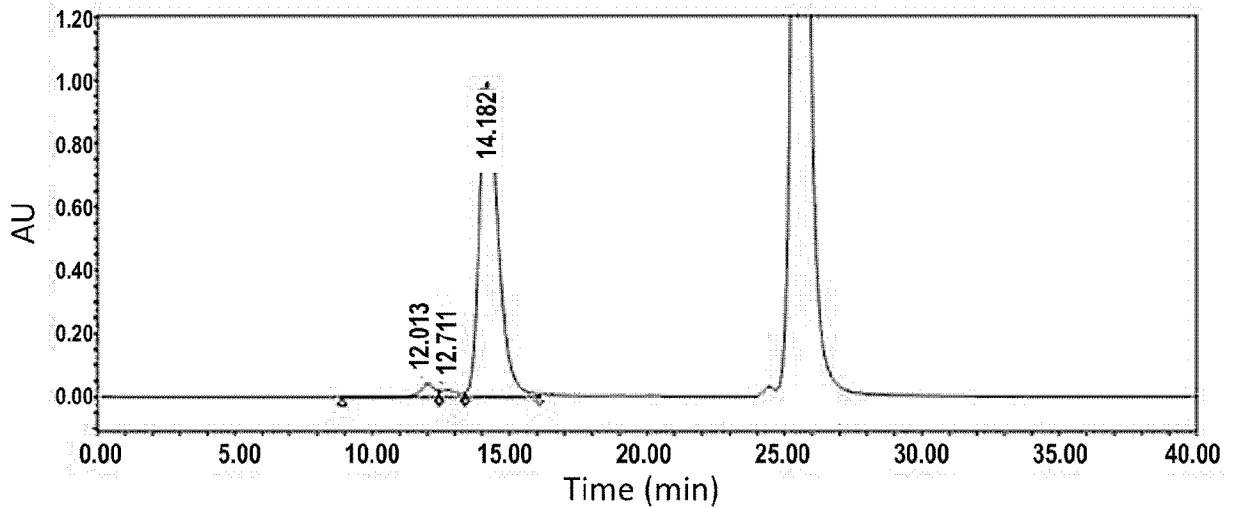


[도3e]



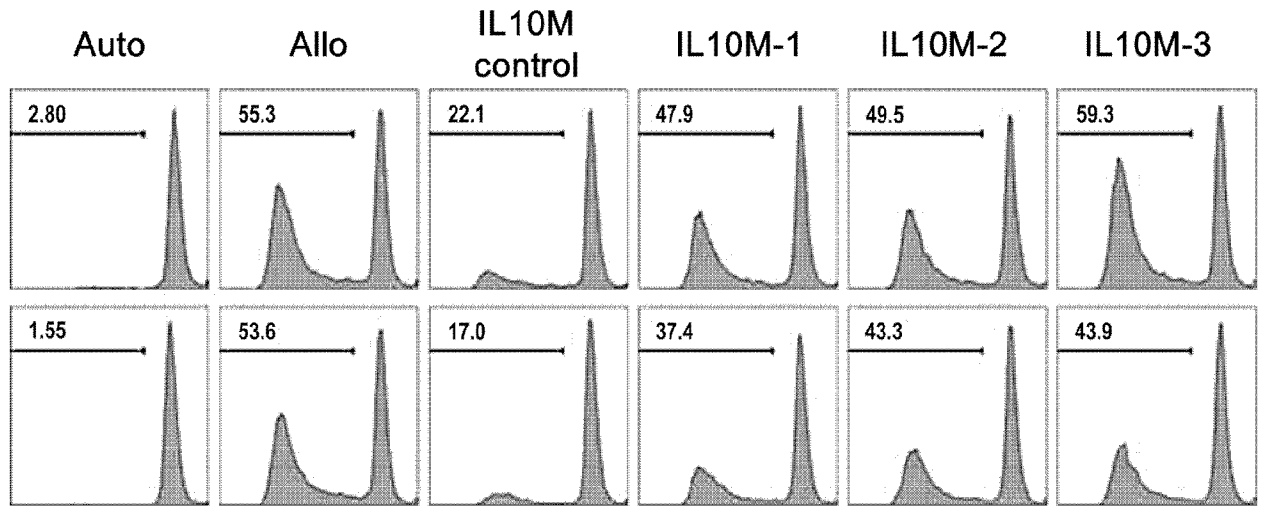
Lane	Sample name
1	Input
2	Flow-through
3-7	PG075-8

[도3f]

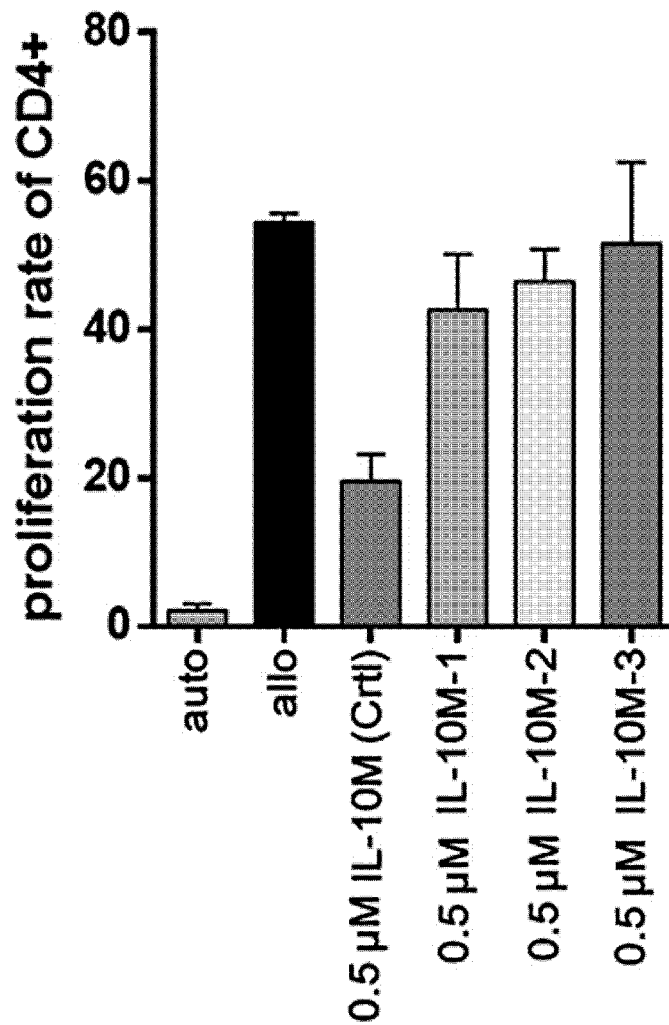


	RT	Area	% Area	Height
1	12.013	1411181	2.84	41838
2	12.711	920978	1.85	20933
3	14.182	47407945	95.31	994449

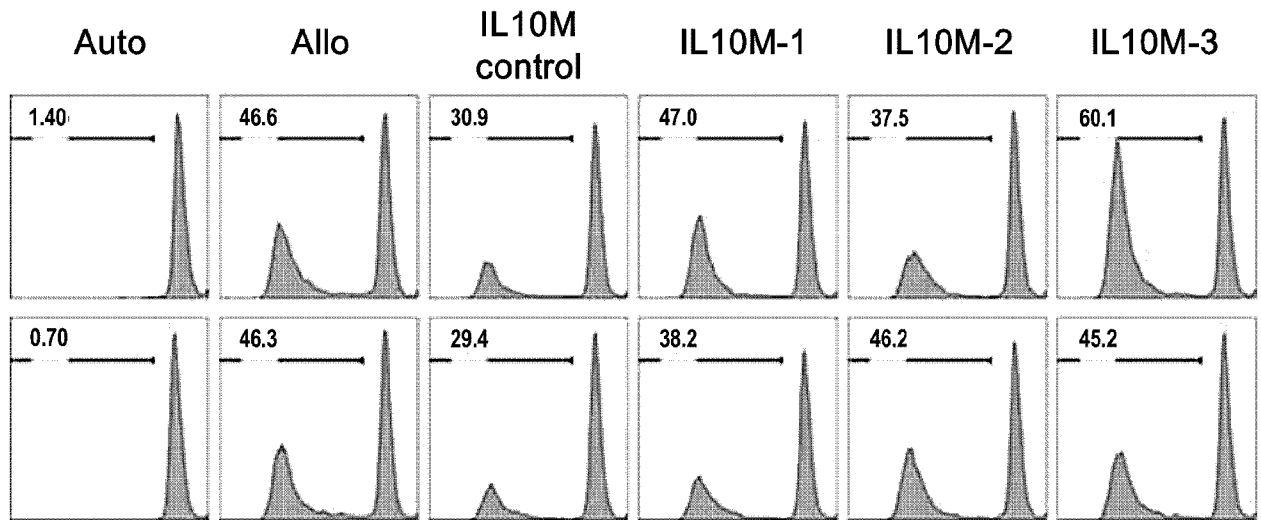
[도4a]



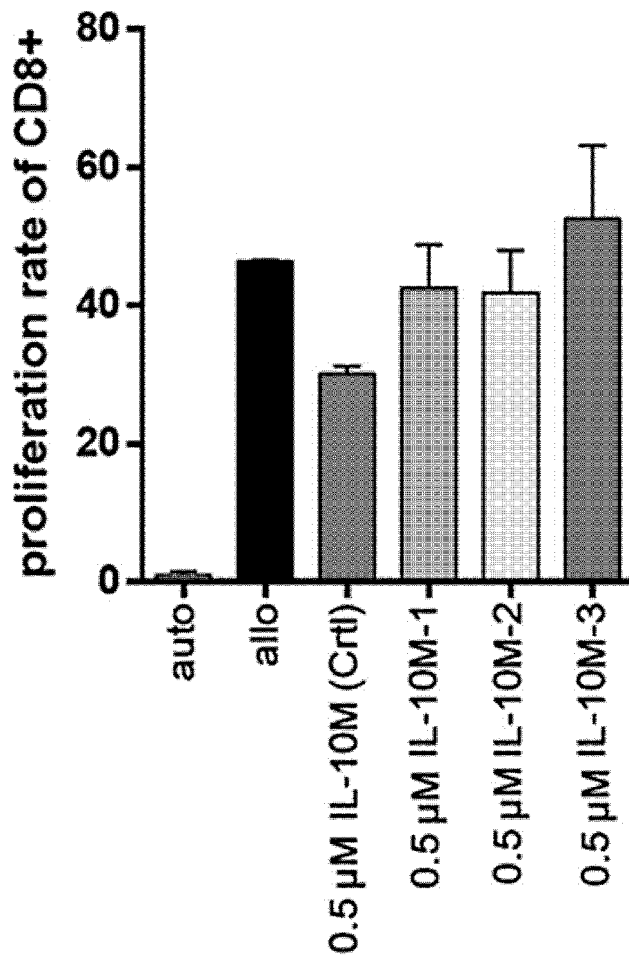
[도4b]



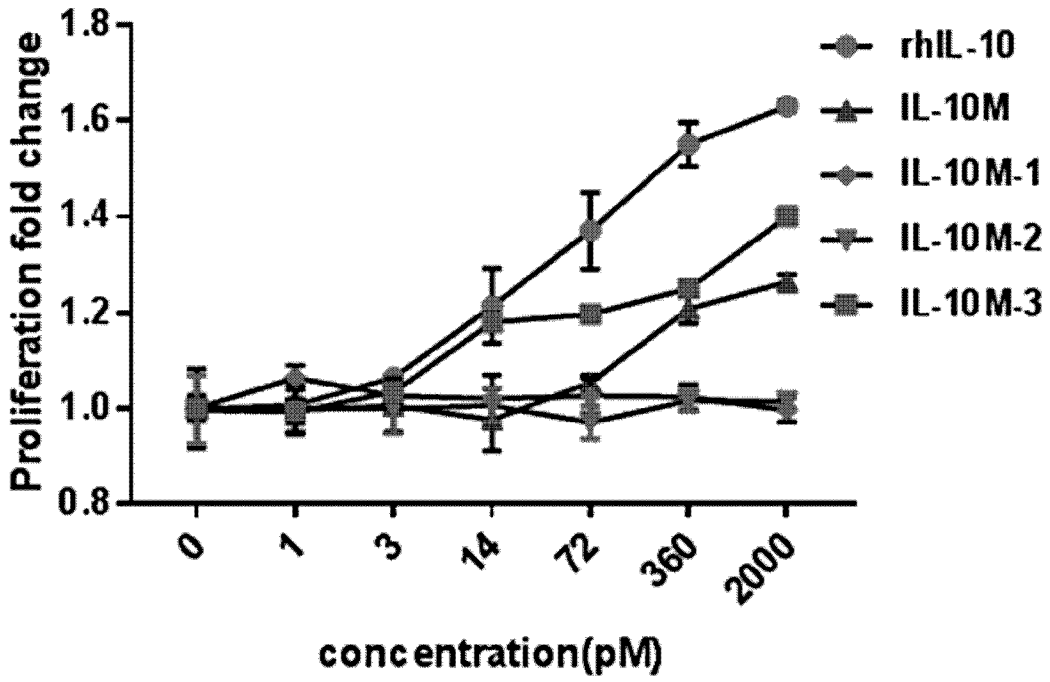
[도4c]



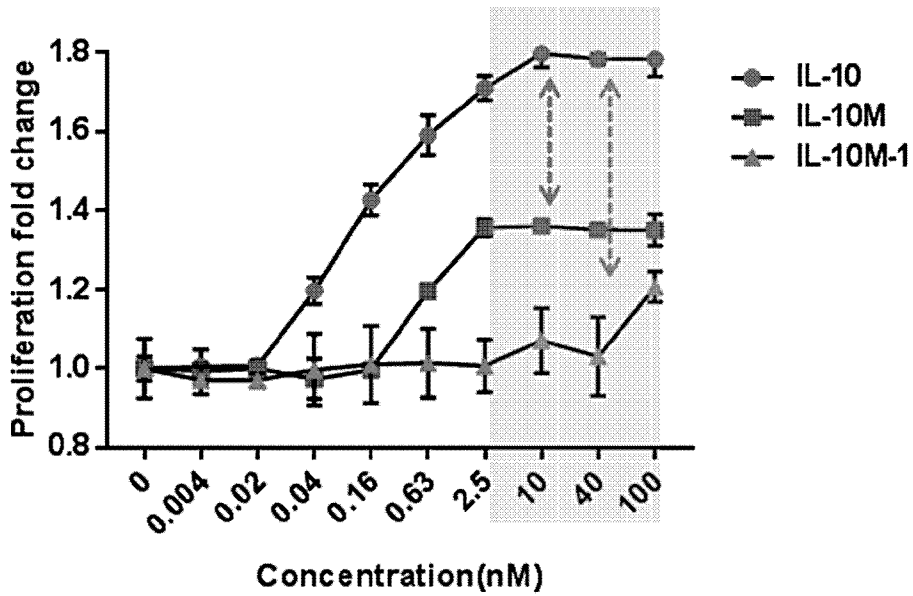
[도4d]



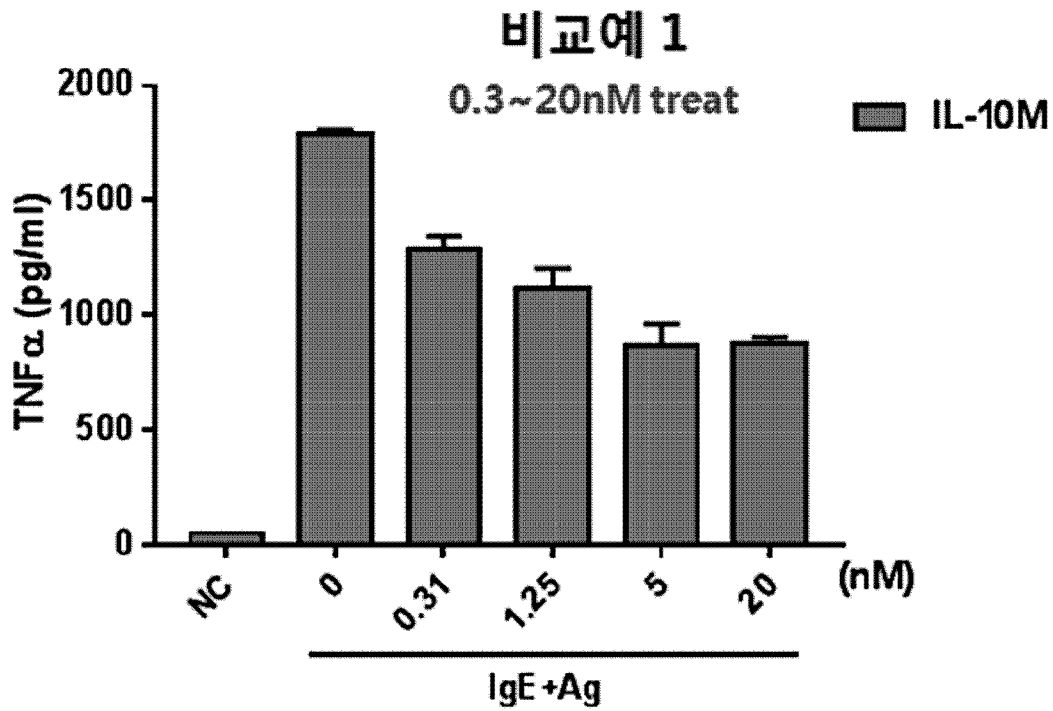
[도5a]



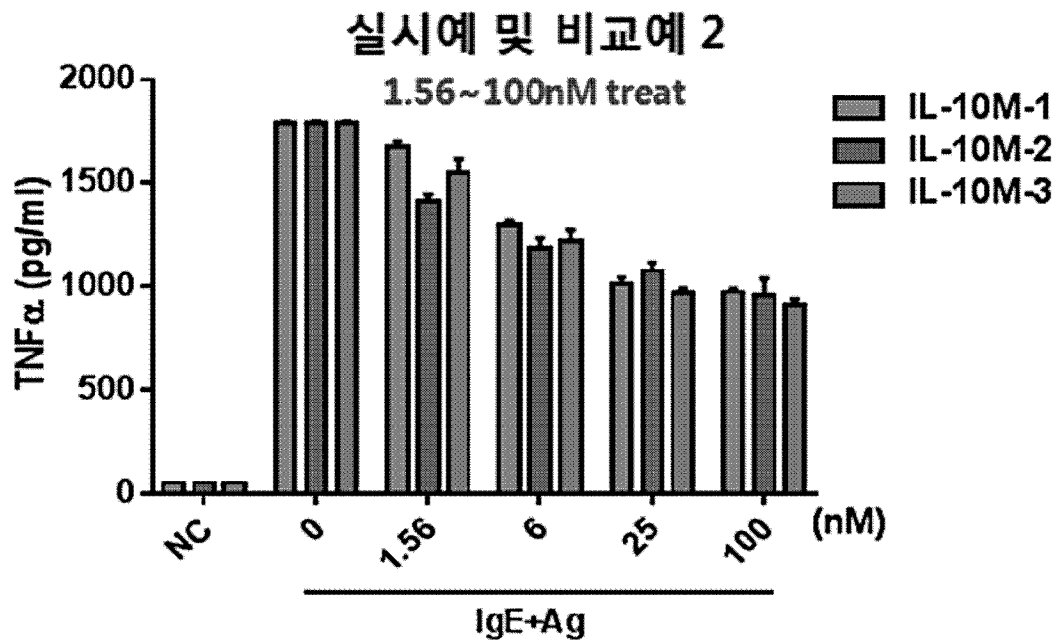
[도5b]



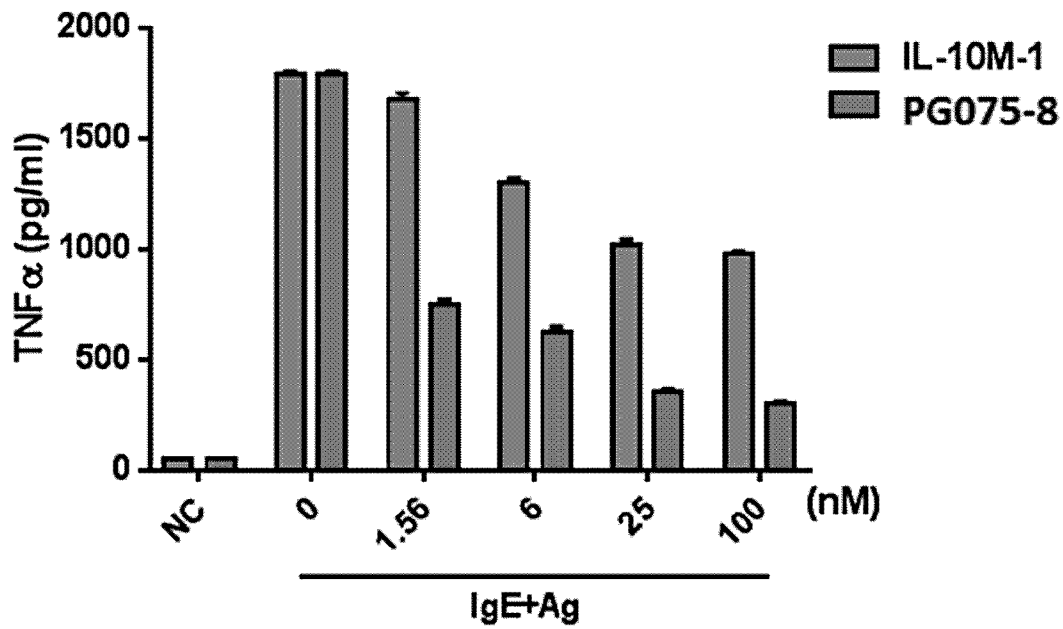
[도6a]



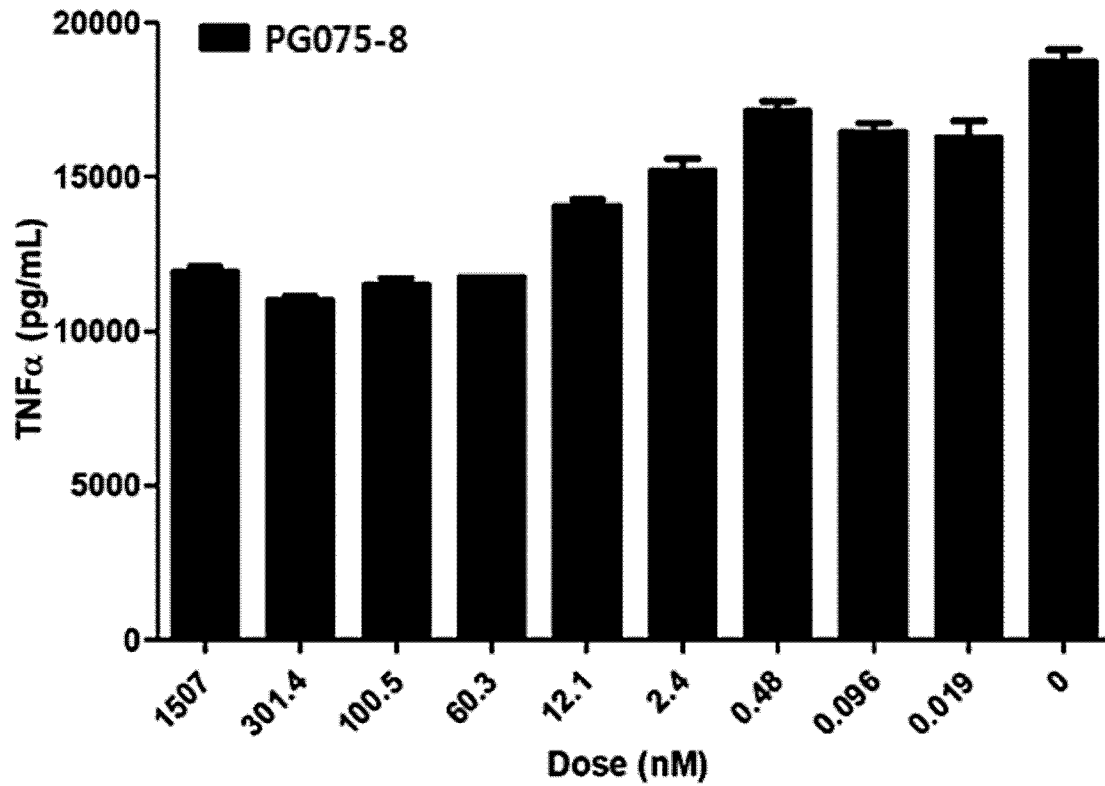
[도6b]



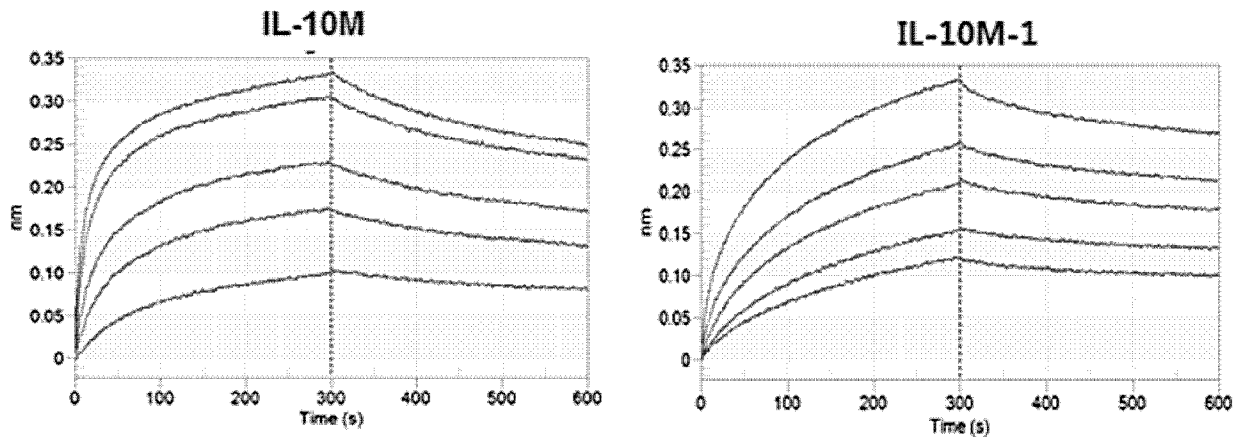
[도6c]



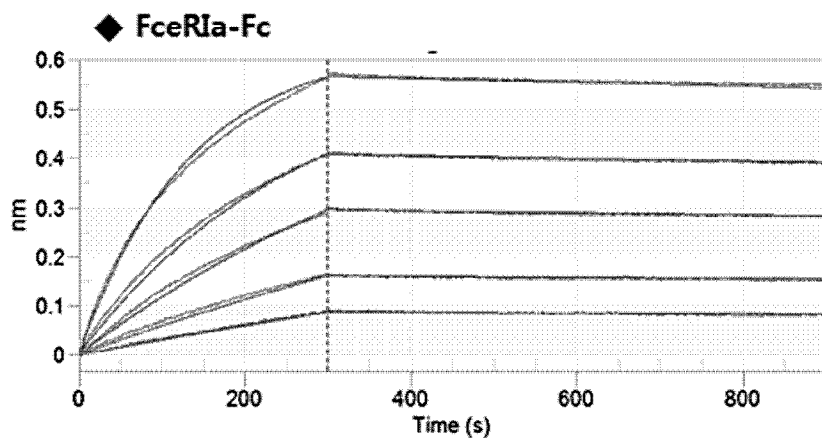
[도6d]



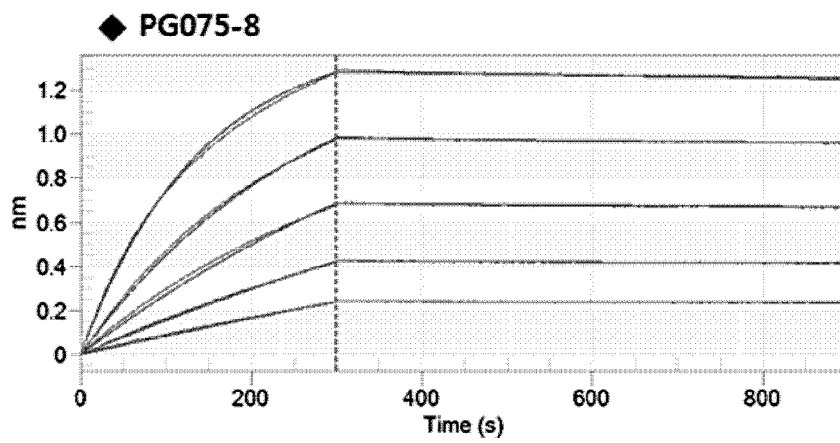
[도7]



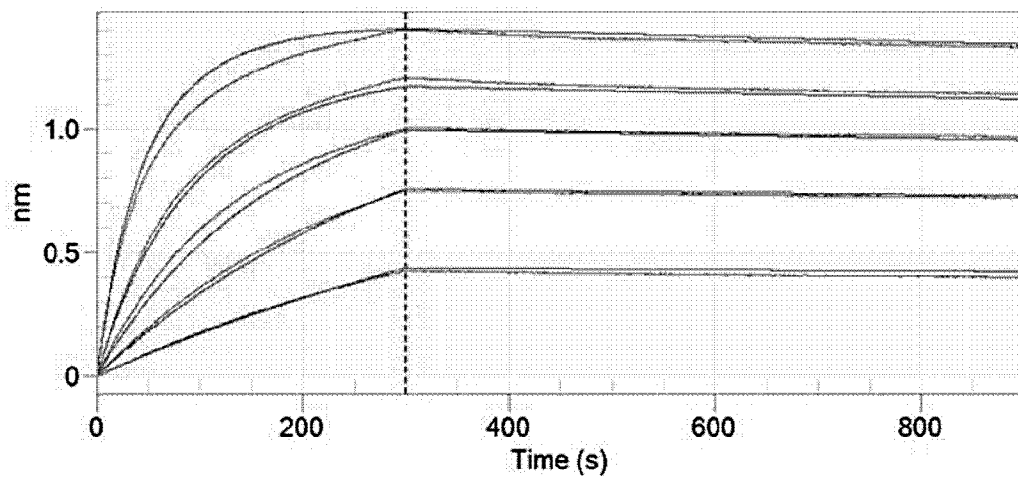
[도8a]



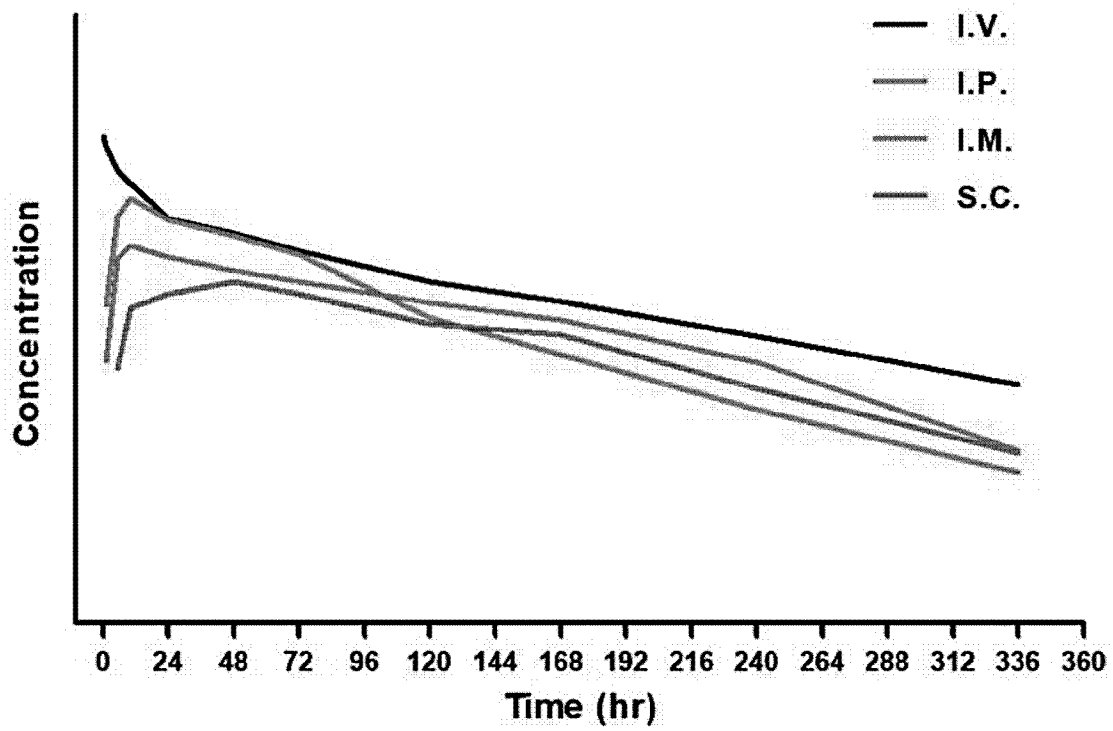
[도8b]



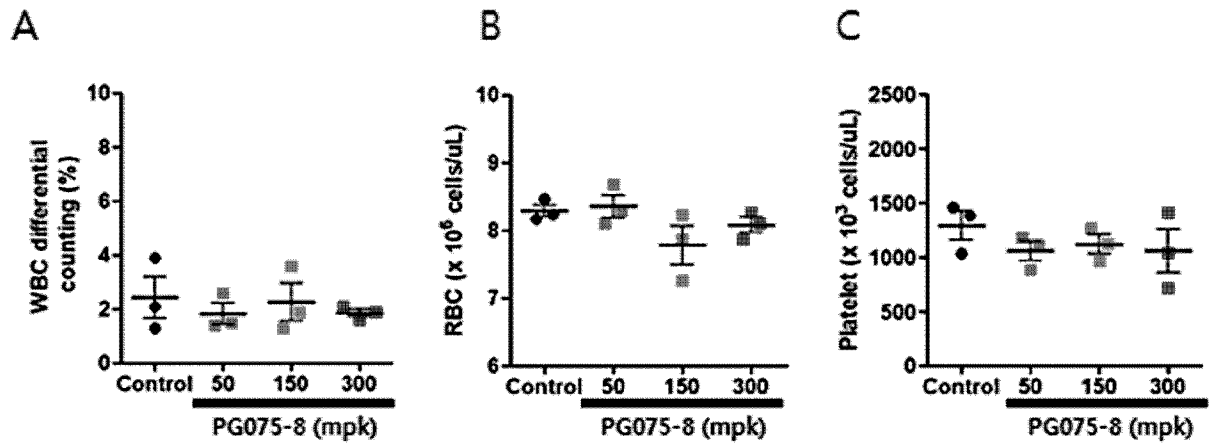
[도8c]



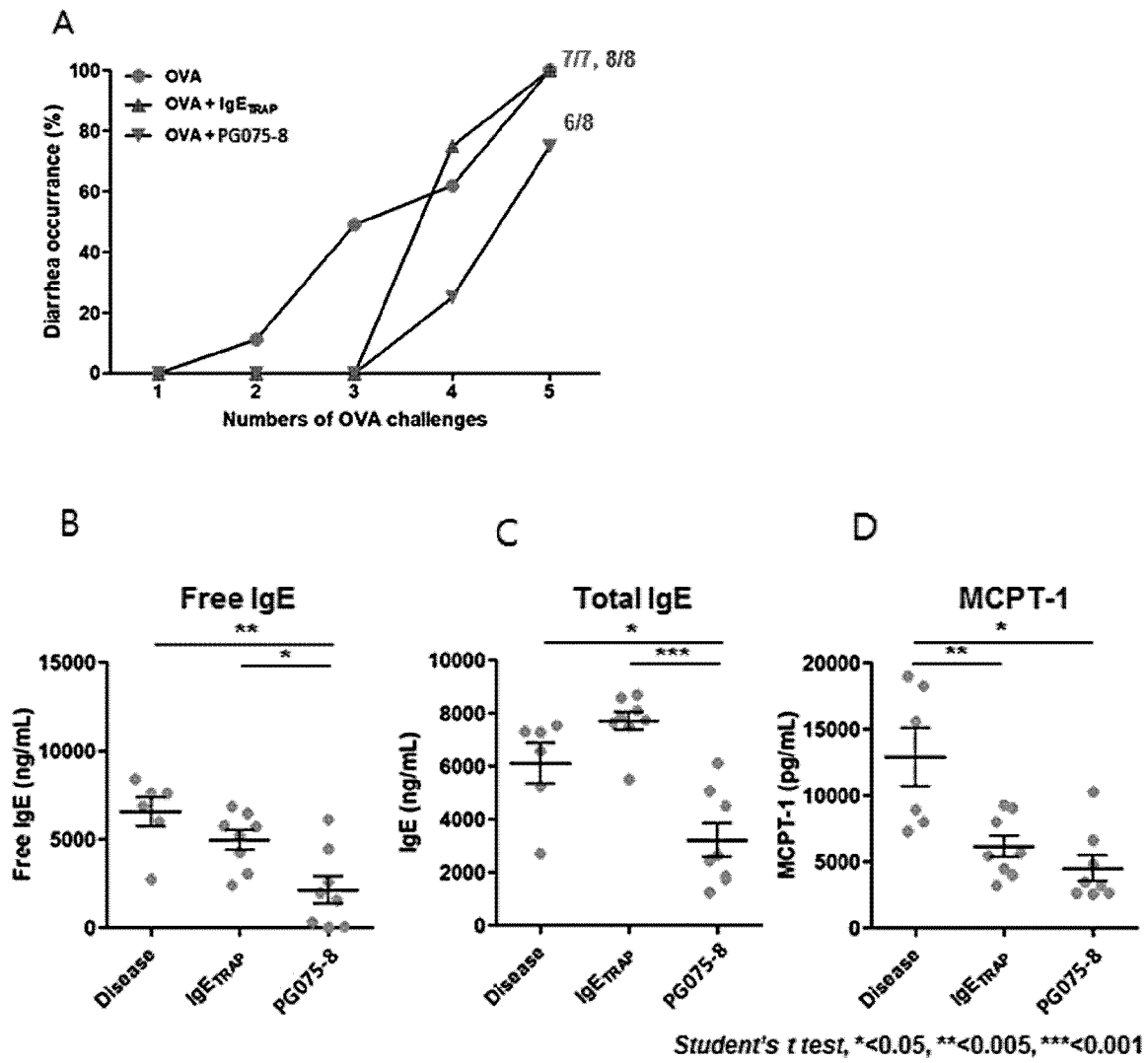
[도9]



[도10]



[도11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/008871

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 14/54(2006.01)i; A61K 38/00(2006.01)i; A61K 47/68(2017.01)i; A61P 37/00(2006.01)j		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 14/54; A61K 38/20; C07K 16/40; A61K 38/00; A61K 47/68; A61P 37/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 인터루킨-10(interleukin-10; IL-10), 성숙형 형태(mature form), 아스파라긴(asparagine), 라이신(lysine), 스페이서 펩타이드(spacer peptide), 단량체(monomer)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014-0044674 A1 (ROCHE GLYCART AG) 13 February 2014. See claims 1-15 and 35-63; paragraphs [0006], [0011] and [0023]; and sequence identifier nos. 5-6 and 15-18.	1-19
X	US 2017-0158747 A1 (NOVARTIS AG) 08 June 2017. See abstract; claims 1-10 and 26-36; paragraphs [0002]-[0003]; and sequence identifier nos. 4, 10, 14, 21, 30 and 32.	1-19
X	WO 2012-045334 A1 (SYNTHON BV et al.) 12 April 2012. See claims 1-20; pages 3-4, 10 and 13; and figure 2.	1-19
X	NCBI. GenBank Accession No. ILK3_A. Chain A, Engineered Human Interleukin-10 Monomer Complexed To 9d7 Fab Fragment. 10 October 2012. See entire document.	1-16
A	JOSEPHSON, K. et al. Design and Analysis of an Engineered Human Interleukin-10 Monomer. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 2000, vol. 275, no. 18, pp. 13552-13557. See entire document.	1-19
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 October 2020		Date of mailing of the international search report 19 October 2020
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon, Republic of Korea 35208		Authorized officer
Facsimile No. +82-42-481-8578		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/008871

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)				
US	2014-0044674	A1	13 February 2014	AR	092050	A1	18 March 2015				
				AU	2013-301656	A1	15 January 2015				
				BR	112015002085	A2	19 December 2017				
				CA	2876285	A1	13 February 2014				
				CL	2014003605	A1	06 April 2015				
				CN	104540848	A	22 April 2015				
				CN	104540848	B	31 May 2019				
				CO	7151522	A2	29 December 2014				
				CR	20140565	A	12 February 2015				
				EA	201500208	A1	30 July 2015				
				EP	2882774	A1	17 June 2015				
				EP	2882774	B1	03 October 2018				
				HK	1209439	A1	01 April 2016				
				IL	236809	A	31 March 2015				
				JP	2015-530983	A	29 October 2015				
				JP	2019-033755	A	07 March 2019				
				KR	10-2015-0038012	A	08 April 2015				
				MA	20150232	A1	31 July 2015				
				MX	2015001675	A	10 April 2015				
				PE	20150645	A1	11 May 2015				
				PH	12015500284	A1	27 April 2015				
				SG	11201408526	A	30 March 2015				
				TW	201418283	A	16 May 2014				
				US	10040843	B2	07 August 2018				
				US	2016-0340413	A1	24 November 2016				
				US	9346872	B2	24 May 2016				
				WO	2014-023673	A1	13 February 2014				
				ZA	201409304	B	27 September 2017				
				<hr/>							
				US	2017-0158747	A1	08 June 2017	AR	106908	A1	28 February 2018
AU	2016-362777	A1	07 June 2018								
AU	2016-362777	B2	30 January 2020								
BR	112018010937	A2	04 December 2018								
CA	3006477	A1	08 June 2017								
CL	2018001427	A1	27 July 2018								
CN	108602870	A	28 September 2018								
CO	2018005678	A2	12 June 2018								
CU	20180047	A7	05 July 2018								
EA	201891341	A1	30 November 2018								
EP	3383891	A1	10 October 2018								
JP	2019-505173	A	28 February 2019								
KR	10-2018-0081622	A	16 July 2018								
MX	2018006778	A	01 August 2018								
PE	20181358	A1	22 August 2018								
PH	12018501160	A1	21 January 2019								
RU	2018124307	A	14 January 2020								
SG	11201804259	A	28 June 2018								
TW	201726716	A	01 August 2017								
US	10144768	B2	04 December 2018								
US	2019-0241636	A1	08 August 2019								
UY	37003	A	30 June 2017								

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/008871

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2017-093947 A1 08 June 2017			

WO 2012-045334	A1	12 April 2012	None

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
C07K 14/54(2006.01)i, A61K 38/00(2006.01)i, A61K 47/68(2017.01)i, A61P 37/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C07K 14/54; A61K 38/20; C07K 16/40; A61K 38/00; A61K 47/68; A61P 37/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 인터루킨-10(interleukin-10; IL-10), 성숙형 형태(mature form), 아스파라긴(asparagine), 라이신(lysine), 스페이서 펩타이드(spacer peptide), 단량체(monomer)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2014-0044674 A1 (ROCHE GLYCART AG) 2014.02.13 청구항 1-15, 35-63; 단락 [0006], [0011], [0023]; 서열번호 5-6, 15-18	1-19
X	US 2017-0158747 A1 (NOVARTIS AG) 2017.06.08 요약; 청구항 1-10, 26-36; 단락 [0002]-[0003]; 서열번호 4, 10, 14, 21,30, 32	1-19
X	WO 2012-045334 A1 (SYNTHON BV 등) 2012.04.12 청구항 1-20; 페이지 3-4, 10, 13; 도면 2	1-19
X	NCBI, GenBank Accession No. ILK3_A, `Chain A, Engineered Human Interleukin-10 Monomer Complexed To 9d7 Fab Fragment`, 2012.10.10 전체 문헌	1-16
A	JOSEPHSON, K. 등, `Design and Analysis of an Engineered Human Interleukin-10 Monomer`, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2000, 275권, 18호, 페이지 13552-13557 전체 문헌	1-19

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

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
 “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
 “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
 “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2020년 10월 19일 (19.10.2020)	국제조사보고서 발송일 2020년 10월 19일 (19.10.2020)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373
---	------------------------------------



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일		
US 2014-0044674 A1	2014/02/13	AR 092050 A1	2015/03/18		
		AU 2013-301656 A1	2015/01/15		
		BR 112015002085 A2	2017/12/19		
		CA 2876285 A1	2014/02/13		
		CL 2014003605 A1	2015/04/06		
		CN 104540848 A	2015/04/22		
		CN 104540848 B	2019/05/31		
		CO 7151522 A2	2014/12/29		
		CR 20140565 A	2015/02/12		
		EA 201500208 A1	2015/07/30		
		EP 2882774 A1	2015/06/17		
		EP 2882774 B1	2018/10/03		
		HK 1209439 A1	2016/04/01		
		IL 236809 A	2015/03/31		
		JP 2015-530983 A	2015/10/29		
		JP 2019-033755 A	2019/03/07		
		KR 10-2015-0038012 A	2015/04/08		
		MA 20150232 A1	2015/07/31		
		MX 2015001675 A	2015/04/10		
		PE 20150645 A1	2015/05/11		
		PH 12015500284 A1	2015/04/27		
		SG 11201408526 A	2015/03/30		
		TW 201418283 A	2014/05/16		
		US 10040843 B2	2018/08/07		
		US 2016-0340413 A1	2016/11/24		
		US 9346872 B2	2016/05/24		
		WO 2014-023673 A1	2014/02/13		
		ZA 201409304 B	2017/09/27		
		US 2017-0158747 A1	2017/06/08	AR 106908 A1	2018/02/28
				AU 2016-362777 A1	2018/06/07
				AU 2016-362777 B2	2020/01/30
				BR 112018010937 A2	2018/12/04
CA 3006477 A1	2017/06/08				
CL 2018001427 A1	2018/07/27				
CN 108602870 A	2018/09/28				
CO 2018005678 A2	2018/06/12				
CU 20180047 A7	2018/07/05				
EA 201891341 A1	2018/11/30				
EP 3383891 A1	2018/10/10				
JP 2019-505173 A	2019/02/28				
KR 10-2018-0081622 A	2018/07/16				
MX 2018006778 A	2018/08/01				
PE 20181358 A1	2018/08/22				
PH 12018501160 A1	2019/01/21				
RU 2018124307 A	2020/01/14				
SG 11201804259 A	2018/06/28				
TW 201726716 A	2017/08/01				
US 10144768 B2	2018/12/04				

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 2019-0241636 A1 UY 37003 A WO 2017-093947 A1	2019/08/08 2017/06/30 2017/06/08
WO 2012-045334 A1	2012/04/12	없음	