(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024 년 1 월 18 일 (18.01.2024)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2024/014808 A1

(51) 국제특허분류:
C07K 16/28 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2023/009763

(22) 국제출원일: 2023 년 7 월 10 일 (10.07.2023)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2022-0084866 2022 년 7 월 11 일 (11.07.2022) KR
10-2022-0085847 2022 년 7 월 12 일 (12.07.2022) KR
10-2022-0097012 2022 년 8 월 3 일 (03.08.2022) KR

(71) 출원인: **주식회사 지뉴브 (GENUV INC.)** [KR/KR]; 04520 서울특별시 중구 청계천로 14, Seoul (KR).

(72) 발명자: **박흥록 (PARK, Heung Rok)**; 04520 서울특별시 중구 청계천로 14, Seoul (KR). **배동구 (BAE, Dong Goo)**; 04520 서울특별시 중구 청계천로 14, Seoul (KR). **신현수 (SHIN, Hyun Soo)**; 04520 서울특별시 중구 청계천로 14, Seoul (KR). **최은주 (CHOI, Eun Ju)**; 04520 서울특별시 중구 청계천로 14, Seoul (KR). **박수봉 (PARK, Soo Bong)**; 04520 서울특별시 중구 청계천로 14, Seoul (KR). **이광현 (LEE, Kwang Hyun)**; 04520 서울특별시 중구 청계천로 14, Seoul (KR). **김준명 (KIM, June Myoung)**; 04520 서울특별시 중구 청계천로 14, Seoul (KR).

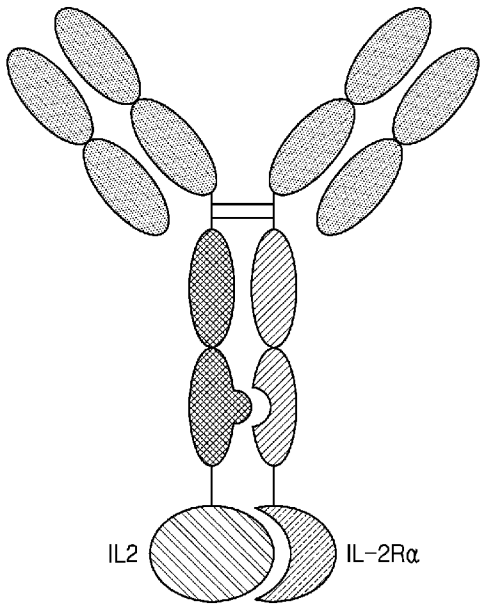
(74) 대리인: **리앤목 특허법인 (Y.P.LEE, MOCK & PARTNERS)**; 06292 서울특별시 강남구 언주로 30길 13 대림아크로텔 12층, Seoul (KR).

(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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

(54) **Title:** CYTOKINE FUSION PROTEIN

(54) **발명의 명칭:** 사이토카인 융합 단백질



(57) **Abstract:** The present invention relates to a cytokine fusion protein comprising an immune cell targeting domain and a cytokine action domain that can specifically induce the proliferation and/or activation of immune cells. Specifically, the present invention relates to a fusion protein that specifically delivers a cytokine (e.g., IL-2 or IL-15) to depleted immune cells (e.g., exhausted T cells) in a tumor to induce and increase the activation of immune cells. The fusion protein of the present invention can selectively deliver the cytokine that promote the proliferation or activation of immune cells to effector T cells in a tumor microenvironment, thereby inducing a strong immune-enhancing and anti-cancer response within the tumor, as well as significantly reducing systemic toxicity or side effects caused by the cytokine by means of a unique structure of the cytokine action domain.

(57) **요약서:** 본 발명은 면역세포 표적화 도메인 및 면역세포의 증식 및/또는 활성화를 특이적으로 유도할 수 있는 사이토카인 작용 도메인을 포함하는 사이토카인 융합 단백질에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 종양 내 탈진된 면역세포(예를 들어, exhausted T 세포)에 사이토카인(예를 들어, IL-2 또는 IL-15)을 특이적으로 전달하여 면역세포의 활성화를 유도 및 증대시키는 융합 단백질에 관한 것이다. 본 발명의 융합 단백질은 면역세포의 증식 또는 활성화를 촉진하는 사이토카인을 종양미세환경 내 효과기 T 세포 등에 선택적으로 전달할 수 있어 종양 내에서 강한 면역 증강 및 항암 반응을 유도할 수 있을 뿐 아니라, 사이토카인 작용 도메인의 독특한 구조를 통해 사이토카인으로 인한 전신 독성 내지 부작용을 현저히 감소시킬 수 있다.

WO 2024/014808 A1

[다음 쪽 계속]

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 사이토카인 융합 단백질

기술분야

[1] 본 발명은 면역세포 표적화 도메인 및 면역세포의 증식 및/또는 활성화를 특이적으로 유도할 수 있는 사이토카인 작용 도메인을 포함하는 사이토카인 융합 단백질에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 종양 내 탈진된 면역세포(예를 들어, exhausted T 세포)에 사이토카인(예를 들어, IL-2 또는 IL-15)을 특이적으로 전달하여 면역세포의 활성화를 유도 및 증대시키는 융합 단백질에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 이를 포함하는 벡터 및 숙주 세포에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 융합 단백질의 생산 방법, 및 상기 융합 단백질을 사용하여 포유동물에서 질병, 예를 들면 암을 치료하거나 면역반응을 증강시키기 위한 약학 조성물, 방법 및 그러한 용도에 관한 것이다.

배경기술

[2] 사이토카인은 면역계의 조절에 관여하는 세포 신호전달 분자이다. 예를 들어, IL-2는 T 세포의 증식과 활성화에 관여하는 필수 사이토카인이다. IL-2는 T 세포의 증식과 분화를 자극하고, 세포독성 T 림프구(CTL)의 생성을 유도하며, 말초 림프구를 세포독성 세포와 림포카인 활성화 킬러 세포(lymphokine-activated killer cell; LAK)로 분화시키고, NK 세포(natural killer cell)의 증식과 활성화를 자극한다.

[3] IL-2의 위와 같은 작용으로 인해 IL-2 면역요법이 전이성 암의 치료에 효과적일 것으로 기대되어 연구가 진행된 결과, 미국 FDA에서 인간 재조합 IL-2(Proleukin®, aldesleukin)가 전이성 신세포암과 전이성 흑색종 적응증에 승인되었다. 그러나 Proleukin은 모세혈관 누출 증후군(capillary leak syndrome; CLS) 같은 심각한 부작용을 일으켜서 투여대상 환자와 투여 가능한 양이 제한적이다. 또한 반감기가 2시간 이하로 짧아서 5일 연속으로 하루에 3회 IV 투여하는 사이클을 반복해야 하는 불편함이 있다.

[4] IL-2 수용체에는 고 친화도, 중간 친화도, 저 친화도의 세 가지 수용체가 있다. 고 친화도 수용체는 IL-2 수용체 알파(IL-2Rα; CD25), 베타(IL-2Rβ; CD122) 및 감마(IL-2Rγ; CD132)의 세 개의 서브유니트로 이루어진다. 중간 친화도 수용체는 IL-2Rβ와 IL-2Rγ로 이루어지며, 저 친화도 수용체는 IL-2Rα만으로 이루어져 있다. β와 γ 서브유니트로 이루어진 중간-친화도 수용체는 α, β, γ 서브유니트로 이루어진 고-친화도 수용체보다 IL-2와의 친화도가 약 100배 더 낮지만 IL-2와 결합 시 신호를 전달할 수 있다. α-서브유니트는 수용체에 고친화도 결합 능력을 부여하지만 신호의 전달에는 필수적이지 않다.

[5] 휴지기의 면역세포에는 중간 친화도의 IL-2 수용체(IL-2Rβγ)만이 발현되어 있다. 항원에 의해 휴지기의 T 세포가 활성화되면 IL-2Rα가 신속히 발현되고, IL-2가 IL-2Rα에 결합하면 IL-2Rβ와 IL-2Rγ가 관여하게 된다. 이 IL-2Rαβγ 복합체와 IL-2의 결합에 의해 신호 전달이 일어나 바이러스에 감염된 세포나 종양 세포를 사멸시킬 수 있는 세포독성 T 세포를 비롯한 효과기 T 세포(T_{eff})의 성장이 촉진된다.

[6] 또한 IL-2는 T 세포의 활성화-유도 세포사(activation-induced cell death; AICD)를 매개한다. AICD는 완전히 활성화된 T 세포가 프로그램된 세포 사멸을 겪게 되는 과정이며, 그로 인해 정상적인 자가-항원뿐만 아니라 종양 항원과 같이 지속적으로 존재하는 항원에 대한 면역 관용이 생기게 된다.

[7] IL-2는 또한 말초 $CD4^+CD25^+$ 조절 T 세포(T_{reg})의 유지에도 관여한다. 조절 T 세포에는 IL-2Rα가 항구적으로 발현되어 있다. 조절 T 세포는 세포독성 T 세포가 자가 항원이나 종양 세포를 공격하는 기능을 억제한다. 이러한 IL-2의 다면적인 작용 때문에 IL-2는 최적의 종양 억제 효과를 나타내기에 적합하지 않다.

[8] IL-2의 독성을 줄이면서 종양 억제 효과를 증진시키기 위해 다양한 시도가 있어 왔다. 일례로 IL-2가 IL-2Rα와 결합하는 것을 억제하는 전략이 시도되었는데, 이는 IL-2가 T_{reg} 세포의 고친화도 IL-2Rαβγ 수용체에 작용하기 보다는 T_{eff} 세포의 중간친화도 IL-2Rβγ에 작용할 수 있도록 하기 위한 것이다. 그 예로는 항-IL-2 모노클로날 항체와 IL-2의 조합(Kamimura et al., J Immunol 177, 306-14 (2006); Boyman et al., Science 311, 1924-27 (2006)), IL-2Rα와의 결합 부위에 돌연변이를 도입한 IL-2 변이체(WO2012/107417 등), IL-2Rα 결합 부위에 폴리에틸렌글리콜(PEG) 기를 도입한 IL-2(WO2012/065086)와 같은 것들이 있다.

[9] 그러나 현재까지 개발된 IL-2 변이체들은 여전히 항암제로서의 치료 지수(therapeutic index)가 좋지 않고, 독성을 나타내는 고용량으로 투여하더라도 항암 효과가 뚜렷하지 않다. 그 이유는 IL-2 변이체들이 T_{reg} 세포보다는 T_{eff} 세포에 선택적으로 작용하도록 만들어졌으나 주로 말초에서 그러한 작용을 나타내고 종양미세환경(tumor microenvironment; TME)에서의 그러한 작용은 충분치 못하기 때문인 것으로 생각된다.

[10] 이러한 단점을 극복하기 위하여 IL-2 변이체들을 종양 조직에서 작용할 수 있도록 하기 위한 연구가 진행되었는데, 종양관련항원(tumor associated antigen; TAA)-특이적 항체와 IL-2를 결합시켜 IL-2를 종양 조직으로 가져오는 전략이 시도되었다. 그러나 이러한 전략은 IL-2를 종양부위로 유도할 수는 있지만, 종양 내의 T_{eff} 세포에 IL-2를 효과적으로 제공하기는 어렵다. 다양한 종양 침윤 림프구(tumor infiltrated lymphocyte; TIL) 중 T_{eff} 세포에 선택적으로 IL-2를 제공할 수 있는 방법이 필요하다.

[11] IL-2 뿐만 아니라 다른 사이토카인들(예: IL-15)도 종양미세환경에서 면역활성 혹은 면역억제를 유도하는 중요한 매개체 역할을 할 수 있는데, 이러한 사이토카

인들은 면역세포에서 분비되는 물질로 대개 국소적으로 다양한 타겟에 작용하여 미세환경을 변화시키는 역할을 한다. 그러나 이들 사이토카인들도 국소적으로 짧게 작용하고 사라지는 특성이 있어 치료제로 개발하기에 어려움이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[12] 본 발명자들은 종양미세환경 내 탈진된 면역세포를 선택적으로 활성화시켜 항암 활성이 강화되면서도 외인성 사이토카인으로 인한 전신적인 부작용은 감소된 효과적인 사이토카인 치료제를 개발하고자 한다.

과제 해결 수단

[13] 본 발명은 면역세포 표적화 도메인 및 면역세포의 증식 및/또는 활성화를 특이적으로 유도할 수 있는 사이토카인 작용 도메인을 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다. 본 발명자들은 면역세포의 증식 또는 활성화를 촉진하는 사이토카인이 말초에 존재하는 다른 면역세포나 내피 세포 등에는 영향을 미치지 않으면서 TME 환경의 T_{eff} 세포에 선택적으로 전달될 수 있도록 하기 위해, 면역세포를 표적으로 하는 항체 도메인에 사이토카인 작용 도메인을 연결시켜 두 도메인이 종양 내 T_{eff} 세포에 "인-시스(in-cis)" 방식으로 작용하는 융합 단백질을 고안하였다.

[14] 본 발명은 하나 이상의 면역세포 항원 결합 도메인, 2개의 Fc 사슬로 이루어진 Fc 도메인, 및 사이토카인 작용 도메인을 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 본 발명의 일 측면에서, 상기 사이토카인 작용 도메인은 면역세포의 증식 또는 활성화를 촉진하는 사이토카인이거나 또는 이와 결합하는 도메인이다. 상기 사이토카인은 외부에서 주입하는 외인성 사이토카인이거나 내부에 존재하는 내인성 사이토카인을 이용할 수 있다. 이러한 사이토카인으로는 IL-2 수용체의 β-서브유니트(IL-2Rβ) 및 공통 γ 사슬 수용체(IL-2Rγ로도 지칭함)에 결합하여 IL-2Rβγ를 통한 신호전달 활성화를 유도할 수 있는 IL-2 폴리펩티드 및 IL-15 폴리펩티드를 사용할 수 있다.

[15] 일 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 면역세포 항원 결합 도메인, 2개의 Fc 사슬로 이루어진 Fc 도메인, 및 사이토카인 작용 도메인을 포함하고, 상기 사이토카인 작용 도메인은 인터류킨-2 수용체의 α-서브유니트(IL-2Rα) 폴리펩티드 및 IL-2 폴리펩티드를 포함하며, 상기 IL-2Rα 폴리펩티드 및 IL-2 폴리펩티드는 서로 간에 공유결합되어 있지 않으며 각각 상기 Fc 도메인의 서로 다른 Fc 사슬에 연결되어 있는 것인 융합 단백질을 제공한다.

[16] 이러한 구조의 본 발명의 융합 단백질은 IL-2가 IL-2Rα에 의해 선점되어 있기 때문에, 고-친화도 IL-2 수용체(또는 IL-2Rαβγ로 약칭한다)를 발현하는 조절 T 세포(T_{reg}), Foxp3-negative CD4 T 세포, 일부 선천성 림프구 세포나 다른 내피(endothelial) 세포들에 대한 결합력은 약화되는 반면, IL-2Rα 없이 IL-2Rβ 및 IL-2Rγ로 이루어진 중간-친화도 IL-2 수용체(또는 IL-2Rβγ로 약칭한다)를 발현하는 세포독성 CD8+ T 세포, 기억 T 세포, NK-T 세포 등의 T_{eff} 세포에는 특이적으

로 결합할 수 있어, 항암 효과의 증대와 함께 전신 독성 또는 부작용을 현저히 줄일 수 있다.

[17] 일 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 면역세포 항원 결합 도메인, 2개의 Fc 사슬로 이루어진 Fc 도메인, 및 사이토카인 작용 도메인을 포함하고, 상기 사이토카인 작용 도메인은 IL-2Rα 폴리펩티드 및 IL-2 폴리펩티드가 서로 공유결합되어 있는 복합체이며, 상기 복합체는 IL-2Rα 폴리펩티드 또는 IL-2 폴리펩티드를 통해 상기 Fc 도메인의 어느 한쪽 Fc 사슬에 결합되어 있는 것인 융합 단백질을 제공한다.

[18] 일 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 면역세포 항원 결합 도메인, 2개의 Fc 사슬로 이루어진 Fc 도메인, 및 사이토카인 작용 도메인을 포함하고, 상기 사이토카인 작용 도메인은 인터류킨-15 수용체의 α-서브유니트(IL-15Rα) 폴리펩티드 및 IL-15 폴리펩티드를 포함하며, 상기 IL-15Rα 폴리펩티드 및 IL-15 폴리펩티드는 각각 상기 Fc 도메인의 서로 다른 Fc 사슬에 연결되어 있는 것인 융합 단백질을 제공한다.

[19] 일 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 면역세포 항원 결합 도메인, 2개의 Fc 사슬로 이루어진 Fc 도메인, 및 사이토카인 작용 도메인을 포함하고, 상기 사이토카인 작용 도메인은 IL-15Rα 폴리펩티드 및 IL-15 폴리펩티드가 서로 공유결합되어 있는 복합체이며, 상기 복합체는 IL-15Rα 폴리펩티드 또는 IL-15 폴리펩티드를 통해 상기 Fc 도메인의 어느 한쪽 Fc 사슬에 결합되어 있는 것인 융합 단백질을 제공한다.

[20] 일 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 면역세포 항원 결합 도메인, 2개의 Fc 사슬로 이루어진 Fc 도메인, 및 사이토카인 작용 도메인을 포함하고, 상기 사이토카인 작용 도메인은 IL-2 폴리펩티드 및 IL-15 폴리펩티드를 포함하지 않고 IL-2Rα 폴리펩티드 또는 IL-15Rα 폴리펩티드만을 포함하여 내인성 IL-2 또는 IL-15와 결합하여 이들을 T_{eff} 세포에 유도할 수 있는 융합 단백질을 제공한다.

[21] 본 발명의 일 측면에서, 상기 IL-2Rα 폴리펩티드는 본 명세서에 첨부된 서열목록의 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 야생형 성숙 IL-2Rα 폴리펩티드 또는 그의 IL-2 결합 단편, 세포외(extracellular) 도메인 또는 스시(Sushi) 도메인, 또는 그의 변이체를 포함한다.

[22] 본 발명의 일 측면에서, 상기 IL-15Rα 폴리펩티드는 본 명세서에 첨부된 서열목록의 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 야생형 성숙 IL-15Rα 폴리펩티드 또는 그의 IL-15 결합 단편, 세포외(extracellular) 도메인 또는 스시(Sushi) 도메인, 또는 그의 변이체를 포함한다.

[23] 본 발명의 일 측면에서, 상기 IL-2Rα 및 IL-15Rα 폴리펩티드는 각각의 결합 리간드인 IL-2 폴리펩티드 및 IL-15 폴리펩티드에 대한 결합 친화력을 높이는 하나 이상의 아미노산 변형, 바람직하게는 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 예시적인 측면에서, 본 발명의 융합 단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열 번호를 기준으로 L2D, L2E, L2Q, M25L, M25I, N27A, N27T, N27I, N27Y, S39K, L42F, L42I,

L42A, L42V, L45R, N57E, I118R, H120A, H120D, H120K, H120Y, H120L, H120W, H120R 및 K153G 중 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 IL-2Rα 변이체를 포함한다. 바람직한 측면에서, 본 발명의 융합 단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열 번호를 기준으로 L42I 아미노산 치환을 포함하는 IL-2Rα 변이체를 포함한다.

[24] 본 발명의 일 측면에서, 상기 IL-2 폴리펩티드는 본 명세서에 첨부된 서열목록의 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 성숙 IL-2 폴리펩티드 또는 그의 C125S 변이체(서열번호 2) 또는 순환 치환된(circular permutated) 변이체를 포함한다. 본 발명의 일 측면에서, 상기 IL-15 폴리펩티드는 본 명세서에 첨부된 서열목록의 서열번호 6의 야생형 성숙 IL-15 폴리펩티드 또는 그의 순환 치환된 변이체를 포함한다. 본 발명의 일 측면에서, 상기 IL-2 폴리펩티드 또는 IL-15 폴리펩티드는 각각의 결합 수용체의 α-서브유니트에 대한 결합 친화력을 높이는 하나 이상의 아미노산 변형을 포함할 수 있다. 바람직한 측면에서, 본 발명의 융합 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열 번호를 기준으로 T37K의 아미노산 치환을 포함하는 IL-2 변이체를 포함한다.

[25] 본 발명의 일 측면에서, 상기 면역세포 항원 결합 도메인은 하나 이상의 T 세포 표적 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 Fab 분자 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다. 본 발명의 일 측면에서, 상기 면역세포 항원 결합 도메인은 종양미세환경 내의 T_{eff} 세포에서 발현되는 면역관문 단백질(예: PD-1(프로그램된 세포사멸-1) 단백질)에 특이적으로 결합하는 항체의 Fab 분자 또는 그의 항원 결합 단편이다. 본 발명의 일 측면에서, 상기 면역세포 항원 결합 도메인은 종양미세환경 내 T_{eff} 세포에의 결합 특이성을 부여할 수 있는 CD8+ 효과 T 세포의 표면 마커에 결합할 수 있는 성분, 항체 또는 그의 항원 결합 단편일 수 있다. 바람직한 측면에서, 본 발명의 상기 면역세포 항원 결합 도메인은 항-PD-1 항체의 Fab 분자 또는 그의 항원 결합 단편이다. 예시적인 측면에서, 본 발명의 면역세포 항원 결합 도메인은 펨브롤리주맙(pembrolizumab) 또는 니볼루맙(nivolumab) 항체의 Fab 분자 또는 그의 항원 결합 단편이거나, 또는 이들 항체 또는 항원 결합 단편과 동일한 에피토프에 결합하거나 또는 이들 항체 또는 항원 결합 단편과 경쟁하는 항체의 Fab 분자 또는 그의 항원 결합 단편이다. 바람직하게는, 본 발명의 융합 단백질은 본 명세서에 첨부된 서열목록의 서열번호 38, 40, 42 또는 44의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역의 상보성 결정영역(CDR) 1, CDR2 및 CDR3, 및 서열번호 39, 41, 43 또는 45의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 항-PD-1 항체의 Fab 분자 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 면역세포 항원 결합 도메인을 포함한다.

[26] 본 발명의 일 측면에서, 상기 면역세포 항원 결합 도메인은 2 이상의 상이한 T 세포 표적 항원 결합 도메인을 포함하는 다중특이적 결합 도메인일 수 있다. 본 발명의 일 측면에서, 본 발명 융합 단백질은 하나 이상의 종양 세포 표적 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 Fab 분자 또는 그의 항원 결합 단편을 추가의 항원 결합 도메인으로 포함할 수 있다.

[27] 본 발명의 일 측면에서, 상기 Fc 도메인은 제1 사슬과 제2 사슬이 서로 같은 동종이량체이거나 서로 다른 이종이량체일 수 있다. 본 발명의 일 측면에서, 상기 Fc 도메인은 인간 IgG 부류 Fc 도메인이다. 본 발명의 일 측면에서, 상기 Fc 도메인은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 하위부류 Fc 도메인이다. 본 발명의 일 측면에서, 상기 Fc 도메인이 IgG4 Fc 도메인인 경우 S228P의 아미노산 치환(Kabat 문헌의 EU 넘버링 시스템 기준)을 포함하는 것이 바람직하다. 본 발명의 일 측면에서, 상기 Fc 도메인은 CH2 도메인이 결여되고 CH3 도메인으로만 구성될 수 있다. 또한, 본 발명의 상기 Fc 도메인은 Fc 수용체에 대한 결합 또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 변형을 포함할 수 있다. 예시적인 측면에서, 이러한 Fc 도메인의 변형은 E233, L234, L235, G236, G237, N297, L328, P329 및 P331 중에서 선택된 하나 이상의 위치(Kabat 문헌의 EU 넘버링 시스템 기준)에서의 아미노산 변형을 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[28] 본 발명의 일 측면에서, 상기 Fc 도메인은 2개의 Fc 사슬 간의 이종이량체 형성을 촉진하기 위한 변형을 포함할 수 있다. 예시적인 측면에서, 이러한 Fc 도메인의 변형은 놉-인투-홀(knob-into-hole) 변형, 놉-인투-홀 다이설파이드(knob-into-hole disulfide) 변형 등을 포함할 수 있다. 바람직한 측면에서, 본 발명의 융합 단백질은 상기 놉-인투-홀(knob-into-hole) 변형 또는 놉-인투-홀 다이설파이드(knob-into-hole disulfide) 변형과 함께, 어느 한 Fc 사슬이 K360E의 아미노산 치환을 더 포함하고 다른 한 Fc 사슬이 Q347R의 아미노산 치환을 더 포함하거나, 또는 어느 한 Fc 사슬이 K360E 및 Q347E의 아미노산 치환을 더 포함하고 다른 한 Fc 사슬이 Q347R의 아미노산 치환 또는 K360R 및 Q347R의 아미노산 치환을 더 포함하는 Fc 도메인 변이체를 포함한다.

[29] 본 발명의 일 측면에서, 상기 면역세포 항원 결합 도메인 및 사이토카인 작용 도메인은 Fc 도메인에 직접 또는 링커를 통해 연결될 수 있다. 본 발명의 일 측면에서, 상기 면역세포 항원 결합 도메인이 Fc 도메인의 N-말단에, 사이토카인 작용 도메인이 Fc 도메인의 C-말단에 연결되거나, 또는 그 반대의 구조를 취할 수 있다. 본 발명의 일 측면에서, 상기 링커는 펩티드 링커가 바람직하지만 이로 제한되지 않는다.

[30] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 융합 단백질 또는 그의 각 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 또는 상기 벡터가 도입된 형질전환세포를 제공한다. 본 발명의 또 다른 측면은 상기 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공하며, 상기 숙주 세포를 배양하여 본 발명의 융합 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

[31] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 종양, 암, 전이성 종양, 전이성 암 또는 감염성 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 또 다른 측면은 종양, 암, 전이성 종양, 전이성 암 또는 감염성 질환의 예방, 개선 또는 치료가 필요한 개체에게 상기 융합 단백질

을 투여하여 종양, 암, 전이성 종양, 전이성 암 또는 감염성 질환을 예방, 개선 또는 치료하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[32] 본 발명에 따르면 종양미세환경에서 세포독성 효과 T 세포를 선택적으로 활성화시켜서 항암 활성이 강화되면서도 전신적인 부작용은 감소된 효과적인 항암 사이토카인 치료제를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[33] 도 1a 내지 1c는 IL-2와 IL-2Rα를 포함하는 본 발명의 일 실시 형태에 따른 융합 단백질의 구조를 개략적으로 나타낸 것이다.

[34] 도 2a 및 2b는 IL-2와 IL-2Rα의 복합체 또는 IL-15과 IL-15Rα의 복합체를 포함하는 본 발명의 일 실시 형태에 따른 융합 단백질의 구조를 개략적으로 나타낸 것이다.

[35] 도 3a 내지 3d는 IL-2 및 IL-15를 포함하지 않고 IL-2Rα 또는 IL-15Rα를 포함하는 본 발명의 일 실시 형태에 따른 융합 단백질의 구조를 개략적으로 나타낸 것이다.

[36] 도 4는 구조 기반 링커 디자인을 위해 본 발명의 일 실시 형태에 따른 융합 단백질이 hPD-1 및 IL-2Rβγ에의 결합 방식을 나타낸 결정 구조 분석 결과이다.

[37] 도 5는 본 발명의 일 실시 형태에 따른 융합 단백질 A를 확인한 SDS-PAGE 결과이다.

[38] 도 6a 및 6b는 본 발명의 일 실시 형태에 따른 융합 단백질 B, C 및 D를 확인한 SDS-PAGE 결과이다.

[39] 도 7은 본 발명의 일 실시 형태에 따른 융합 단백질의 IL-2Rα 단백질(도 7a) 및 IL-2Rβγ 단백질(도 7b)에 대한 선택적 결합 여부를 ELISA로 시험한 결과이다.

[40] 도 8은 본 발명의 일 실시 형태에 따른 융합 단백질의 PD-1 발현 여부 및 IL-2 수용체 발현 종류에 따른 IL-2 신호전달 반응성 차이를 나타낸 일련의 HEK-Blue 시험 결과 그래프이다.

[41] 도 9는 MC38 마우스 종양 모델에서 본 발명의 일 실시 형태에 따른 융합 단백질의 생체내 항암 효과 확인을 위한 동물 실험 스케쥴을 도시한 것이다.

[42] 도 10은 MC38 마우스 종양 모델에서 본 발명의 일 실시 형태에 따른 융합 단백질의 투여에 의한 시간에 따른 종양 크기 변화(도 10a), 생존율(도 10b) 및 체중 변화(도 10c)를 항-PD-1 항체 단독 투여 및 heterodimeric Fc-IL2/IL2Rα 단독 투여에 따른 결과와 비교한 그래프이다.

[43] 도 11은 MC38 마우스 종양 모델에서 본 발명의 일 실시 형태에 따른 융합 단백질의 투여에 의한 시간에 따른 종양 크기 변화(도 11a), 생존율(도 11b) 및 체중 변화(도 11c)를 항-PD-1 항체 및 heterodimeric Fc-IL2/IL2Rα의 병용 투여에 따른 결과와 비교한 그래프이다.

[44] 도 12는 본 발명의 일 실시 형태에 따른 융합 단백질의 장기 기억 면역 반응 확인을 위한 동물 실험 스케쥴을 도시한 것이다.

[45] 도 13은 장기 기억 면역 반응 실험에서 본 발명의 일 실시 형태에 따른 융합 단백질의 투여에 의한 시간에 따른 종양 크기 변화를 도시한 그래프이다.

[46] 도 14는 장기 기억 면역 반응 실험에서 본 발명의 일 실시 형태에 따른 융합 단백질의 투여에 의한 종양 크기 변화를 나타내는 동물 모델 사진이다.

[47] 도 15는 MC38 마우스 종양 모델에서 본 발명의 일 실시 형태에 따른 융합 단백질의 단회 투여에 의한 용량 의존적 항암 효과를 평가하기 위한 동물 실험 스케쥴을 도시한 것이다.

[48] 도 16은 MC38 마우스 종양 모델에서 본 발명의 일 실시 형태에 따른 융합 단백질의 단회 투여에 의한 시간에 따른 종양 크기 변화(도 16a) 및 체중 변화(도 16b)를 도시한 그래프이다.

[49] 도 17은 B16F10 마우스 흑색종 모델에서 본 발명의 일 실시 형태에 따른 융합 단백질의 투여에 의한 시간에 따른 종양 크기 변화(도 17a) 및 종양성장억제율(TGI %)(도 17b)을 도시한 그래프이다.

[50] 도 18은 Pan02 마우스 췌장암 모델에서 본 발명의 일 실시 형태에 따른 융합 단백질의 투여에 의한 시간에 따른 종양 크기 변화(도 18a), 생존율(도 18b) 및 체중 변화(도 18c)를 도시한 그래프이다.

[51] 도 19는 MC38 마우스 종양 모델에서 본 발명의 일 실시 형태에 따른 융합 단백질 A와 B의 단회 투여에 의한 시간에 따른 종양 크기 변화(도 19a) 및 종양성장억제율(TGI %)(도 19b)을 비교하여 도시한 그래프이다.

[52] 도 20은 본 발명의 일 실시 형태에 따른 융합 단백질의 항-PD-1 항체로의 사전 처리 유무에 따른 IL-2 신호전달 반응성 차이를 나타낸 HEK-Blue 시험 결과 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

[53] 본 발명에서, "단백질" 또는 "폴리펩티드"는 적어도 2개의 공유결합으로 부착된 아미노산으로서 올리고펩타이드를 포함하는 개념으로 해석된다. 본 발명에서 "A 단백질" 또는 "A 폴리펩티드"란 모체가 되는 A 단백질 또는 A 폴리펩티드의 전부 또는 일부, 이들의 유사체 및 돌연변이체를 포함하는 개념으로 해석될 수 있다. 또한, "돌연변이", "변형" 및 "변이체"는 아미노산 잔기의 치환, 삽입 및/또는 결실을 포함하는 의미로, 바람직하게, 본 발명의 돌연변이체는 아미노산 잔기의 치환을 포함할 수 있다. 아미노산 잔기의 치환은 모체가 되는 야생형 단백질에 존재하는 아미노산 잔기, 아미노산 잔기의 번호 및 치환된 아미노산 잔기의 순서로 표현할 수 있다.

[54] 본 발명에서 "융합 단백질"이란 둘 이상의 단백질이 서로 결합된 형태 또는 이를 포함하는 복합체를 포함하는 의미로 해석될 수 있다.

[55] 본 발명에서 용어 "프로그램된 세포사멸-1", "PD-1", "PD-1 단백질"은 상호교환적으로 사용되고, 변이체, 동형, 인간 PD-1의 종 상동체, 및 적어도 하나의 PD-1과의 공통적인 에피토프를 갖는 유사체를 포함한다.

[56] 본 발명에서 용어 "항체"는 전체 항체 및 임의의 "항원-결합 부분(portion)" 또는 이의 단일쇄를 포함한다. "항체"는 이황화 결합(disulfide bond)에 의해 상호-연결된 적어도 두 개의 중쇄 및 두 개의 경쇄를 포함하는 단백질, 또는 이의 항원-결합 부분을 지칭한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 세 개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인, CL로 구성된다. 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)은 추가로, 상보성 결정 영역(CDR)이라고 불리는 과변이성(hypervariability)의 영역으로 세분화될 수 있으며, 이는 보다 보존적인, 프레임워크 영역(framework regions)(FR)으로 불리는 영역 사이에 배치되어 있다. 각각의 VH 및 VL은 세 개의 CDR 및 네 개의 FR로 이루어지며, 아미노-말단에서 카복시-말단까지 다음의 순서로 배열된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다.

[57] 본 발명에서 "항체"는 다클론성, 단일클론성, 단일특이성, 다특이성, 비-특이성, 인간화, 단일-쇄, 키메릭, 합성의, 재조합, 잡종(hybrid), 돌연변이된, 및 그래프트(grafted) 항체를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 상기 용어 "항원-결합 부분"은 임의의 항체 단편을 포함하여 항원-결합 기능, 즉, 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 유지하는 모든 항체 단편을 포함한다. 전형적으로, 이러한 항원-결합 부분은 항원 결합 단편을 포함할 것이다.

[58] 본 발명의 용어 "항원 결합 도메인"은 표적하는 항원에 결합할 수 있는 임의의 도메인을 총칭하며, 펩티드, 단백질, 항체, 앱타머(aptamer), 화학 잔기 등을 포함한다. 본 발명의 융합 단백질이 항원 결합 도메인으로 항체를 포함하는 경우, 전체 항체 뿐 아니라 그의 항원-결합 부분, Fab 분자 또는 항원 결합 단편을 항원 결합 도메인으로 포함할 수 있다. 상기 용어 "Fab 분자"는 중쇄 및 경쇄에서 불변 영역과 가변 영역 각각 1개씩을 가지는 부위로, 힌지 영역을 일부 포함하거나 일부 변형될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어 "Fab 분자"는 Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fab'-SH 등을 포함하여 항체의 가능한 항원-결합 부위를 모두 포함하는 의미로 정의된다.

[59] 본 발명에서 항체의 "항원-결합 부분", "항원 인식 부위", "항원 결합 도메인", "항원 결합 단편" 및 "결합 단편"은 항체와 항원 사이의 특이적 결합의 원인인 아미노산을 포함하는 항체 분자의 일부를 지칭한다. 예를 들어, 항원이 큰 경우에, 항원-결합 단편은 단지 항원의 일부에만 결합할 수 있다. 항원 분자의 항원 결합 단편과의 특이적 상호작용의 원인이 되는 부분을 "에피토프" 또는 "항원 결정인자(antigenic determinant)"로 지칭한다. 본 발명에서 사용될 수 있는 "항원-결합 부분", "항원 인식 부위", "항원 결합 도메인", "항원 결합

단편" 및 "결합 단편"의 예에는 Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fab'-SH, Fd, Fv, scFv, $(scFv)_2$, scFv-Fc, $(scFv)_2$-Fc, dsFv, $(dsFv)_2$, dsFv-dsFv', VL, VH, 디아바디(diabody), ds-디아바디, 트리아바디(triabody), 테트라바디(tetrabody), 미니바디($(scFV\text{-}CH_3)_2$), 나노바디, 도메인 항체, 단일 도메인 항체(sdAb), 2가 도메인 항체, IgG델타CH2, 피노머(Fynomer), FynomAbs(fynomers fused to antibodies), 이중 친화성 재표적화(dual-affinity re-targeting: DART), AlbudAbs, BiTEs(bispecific T-cell engager), TandAbs(tandem diabodies), DAFs(dual acting Fab), two-in-one antibodies, SMIPs(small modular immunopharmaceuticals), 안티칼린(anticalins), FN3 모노바디, DARPins, Affibodies, Affilins, Affimers, Affitins, Alphabodies, Avimers, Im7, VLR, VNAR, Trimab, CrossMab, 트리덴트(TRIDENT), 바이 나노바디(binanobodies), 디-sdFv, DVD-Igs(dual variable domain immunoglobulin), CovX-bodies(peptide modified antibodies), 듀오바디 및 triomAbs 등이 있지만, 이로 제한되는 것은 아니다.

[60] 상기 항원 결합 단편은 항체 경쇄 가변 영역(VL) 및 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함할 수 있지만, 필수적으로 둘 다 포함해야 하는 것은 아니다. 예를 들어, 소위 Fd 항체 단편은 오직 VH 도메인으로만 구성되지만, 여전히 온전한 항체의 항원-결합 기능을 약간 유지한다.

[61]

[62] **융합 단백질**

[63] 본 발명의 융합 단백질은 하나 이상의 면역세포 항원 결합 도메인, 2개의 Fc 사슬로 이루어진 Fc 도메인, 및 사이토카인 작용 도메인을 포함한다. 본 발명에서 하나 이상의 면역세포 항원 결합 도메인은 항종양 작용을 갖는 CD8+ 효과 T 세포와 같은 원하는 표적 면역세포 상의 표면 마커에 결합하여 사이토카인 영역을 표적 세포에 전달시키는 융합 단백질의 구성 성분이다. 본 발명에서 면역세포 항원 결합 도메인은 바람직하게는 항-PD-1 항체 또는 그의 항원 결합 단편이다. 본 발명의 융합 단백질은 면역세포 항원 결합 도메인의 존재로 인해 사이토카인이 해당 표적을 발현하는 종양 침윤 림프구(tumor infiltrated lymphocyte)로 선택적으로 전달될 수 있도록 하여 말초 혈액의 NK 세포나 T 세포에는 영향을 최소화할 수 있다. 또한 상기 면역세포 항원 결합 도메인은 예를 들어 NKG2a, CD8a, FcRL6, CRTAM, LAG3, TIM3, CTLA4, TIGIT 등에 선택적으로 결합하는 성분, 항체 또는 그의 항원 결합 단편일 수 있다.

[64] 본 발명의 융합 단백질은 도 1a 및 도 1b에서와 같이 하나 또는 두 개의 Fab arm을 가질 수 있다. 또는 도 1c에서와 두 개의 Fab arm이 서로 다른 표적에 대한 것일 수 있다. 예를 들어, 면역세포 항원 결합 도메인이 하나의 항-PD-1 항체 또는 그의 항원 결합 단편인 경우, NKG2a, CD8a, FcRL6, CRTAM, LAG3, TIM3, CTLA4, 및 TIGIT로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표적에 대한 Fab arm

을 더 포함할 수 있다. 또는 본 발명의 융합 단백질은 종양 세포를 표적으로 하는 Fab arm을 항원 결합 도메인으로 추가로 포함할 수 있다.

[65] 본 발명의 일 구현예에서 사이토카인 작용 도메인은 T_{reg} 세포에 비해 세포독성 T_{eff} 세포를 우선적으로 활성화시킬 수 있도록 설계된다. 본 발명의 일 구현예에서, 사이토카인 작용 도메인은 탈진된 T_{eff} 세포에서 항구적으로 발현되는 IL-2Rβγ를 통한 신호전달 활성화 모이어티, 예를 들어 IL-2 폴리펩티드 또는 IL-15 폴리펩티드를 포함한다. 본 발명의 일 구현예에서, 사이토카인 작용 도메인은 또한 IL-2에 의한 말초혈의 면역 세포나 내피 세포에서 발현되는 고 친화도 IL-2 수용체(IL-2Rαβγ) 결합을 저해하기 위해 IL-2Rα를 IL-2와 함께 포함한다. IL-2Rα에 의해 미리 선점된 형태의 IL-2는 고 친화도 IL-2 수용체에 결합하지 못한다. 본 발명의 일 구현예에서, 사이토카인 작용 도메인은 IL-2 단백질과 IL-2Rα 단백질을 포함하며, IL-2와 IL-2Rα는 도 1a 내지 1c에서와 같이 두 개의 Fc 사슬에 각각 연결되어 있고 서로 간에 공유결합되어 있지 않다. IL-2와 IL-2Rα는 Fc 사슬에 링커를 통해 또는 직접 연결된다. 일 구현예에서, 링커는 펩티드 링커일 수 있으며, 예를 들어 (GGGX)n, (XGGG)nXGG, (GGGGX)n, (GX)n (X = A 또는 S, n = 1, 2, 3, 또는 4), SGGGSGGGSGGGSGG, GGGSGGGSGGGSGG 등일 수 있으나 이들로 제한되지 않는다. 일 구현예에서, 링커는 대략 5 내지 20개의 아미노산으로 이루어진 펩티드 링커일 수 있으나 이로 한정되지 않으며, 사이토카인 작용 도메인의 선점된 구조를 적합하게 유지하고 표적 세포에 사이토카인 작용 도메인을 전달하는 기능을 유지하는 한 임의의 구조 및 길이의 링커가 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 상기 펩티드 링커는 G, S, A, P, E, T, D 및 K로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 아미노산으로 이루어질 수 있다.

[66] 본 발명의 일 구현예에서 사이토카인 작용 도메인은 IL-15와 IL-15Rα를 포함할 수 있다. 도 2b는 사이토카인 작용 도메인이 IL-15와 IL-15Rα 복합체를 포함하는 경우의 예이다. 본 발명의 일 구현예에서 사이토카인 작용 도메인은 또한 공유결합된 IL-2/IL-2Rα 복합체(도 2a) 또는 공유결합된 IL-15/IL-15Rα 복합체(도 2b)를 포함할 수 있다.

[67] 본 발명의 일 구현예에서 사이토카인 작용 도메인은 IL-2 및 IL-15를 포함하지 않고 IL-2Rα 또는 IL-15Rα 단백질만을 포함할 수 있다(도 3a 내지 3d). 이 구현예에서 IL-2Rα 단백질은 내인성 IL-2에 결합하여 IL-2를 표적이 발현되어 있는 세포(예: PD-1 발현 T 세포)로 운반하되, IL-2Rα가 항시 발현되어 있는 T_{reg} 세포에 비하여 IL-2Rβ와 γ가 발현되어 있는 T_{eff} 세포를 우선적으로 증식 및 활성화시킨다. 이 구현예에서 IL-2Rα 또는 IL-15Rα는 두 Fc 사슬에 모두 결합되어 동종이량체(homodimer)를 형성할 수도 있고, 하나의 Fc 사슬에만 결합되어 이종이량체(heterodimer)를 형성할 수도 있다.

[68] 본 발명의 일 구현예에서 사이토카인 작용 도메인은 바람직하게는 그 자체로는 충분한 사이토카인 신호 전달을 할 수 없으나, 면역세포 항원 결합 도메인과

결합된 융합 단백질의 형태에서는 원하는 세포(표적을 발현하는 세포)에 선택적으로 표적화되어 세포를 활성화시킨다. 반면 사이토카인 수용체를 발현하나 표적을 발현하지 않는 세포는 활성화시키지 않거나 활성화 정도가 약하게 된다. 예를 들어, 본 발명의 일 구현예에서 IL-2와 IL-2Rα를 포함하는 사이토카인 작용 도메인은 PD-1이 발현되어 있지 않은 T-세포에서는 야생형 IL-2에 비하여 IL-2Rβγ 수용체에 대한 결합력이 약하고 IL-2Rα 수용체에 대한 결합력은 실질적으로 없다. 그러나, 항 PD-1 항체와 결합시킨 융합 단백질의 형태에서는 PD-1과 IL-2Rβγ 수용체가 동시에 발현되어 있는 세포독성 CD8+ T 세포에 표적화된 후 충분한 신호전달을 통해 세포의 증식 및 활성화를 자극하여 우수한 항암 활성을 나타낸다. 그러나 PD-1이 발현되어 있지 않은 세포에 대해서는 활성이 약하거나 거의 없어서 말초 혈액에서 사이토카인의 활성으로 인한 부작용, 예를 들면 모세혈관 누출 증후군, 과활성화된 NK 세포로 인한 전신 독성 등을 감소시킬 수 있다.

[69]

[70] **IL-2 단백질**

[71] 본 발명에서, "인터류킨-2", "IL-2", "IL-2 단백질", 또는 "IL-2 폴리펩티드"는 달리 언급되지 않는 한, 포유동물, 예를 들어 영장류(예: 인간) 및 설치류(예: 마우스 및 래트)를 포함하는 척추동물 유래의 IL-2를 포함한다. 이는 미가공(unprocessed)된 IL-2는 물론 세포에서 가공된(processing) 임의의 형태의 IL-2를 포함한다. 이 용어는 자연 발생된 변이체 또는 하기에서 정의된 "IL-2 돌연변이체"도 포함한다. 전장 인간 IL-2는 성숙된 자연 길이의 인간 IL-2를 의미하는 것으로서, 서열번호 1의 133개 아미노산을 갖는 분자이다. 미가공된 인간 IL-2는 성숙 IL-2 분자에는 없는 20개의 N-말단 아미노산을 더 포함한다.

[72] 용어 "IL-2 돌연변이체"는 전장 IL-2, 절단된 형태의 IL-2, 또는 IL-2가 다른 분자에 연결된 형태를 비롯한 다양한 형태의 IL-2 분자의 돌연변이 형태를 포함한다. IL-2 돌연변이체는 IL-2Rα 폴리펩티드와의 상호작용에 영향을 주거나 IL-2Rα 폴리펩티드에 대한 결합을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 변형을 포함할 수 있다. 이 돌연변이는 야생형 아미노산 잔기의 치환, 결실, 절단 또는 변형을 포함할 수 있다. IL-2Rα 폴리펩티드에 대한 결합을 증가시키는 아미노산 변형의 예로는 서열번호 1의 아미노산 서열 번호를 기준으로 T37K의 아미노산 치환을 들 수 있다.

[73] 본 발명에서 IL-2 단백질은 전장 인간 IL-2(서열번호 1)일 수 있다. 또한 예를 들어 부정확한 이황화결합의 생성을 방지하기 위하여 서열번호 1의 IL-2의 125번 위치의 cysteine을 serine으로 바꾼 돌연변이를 포함할 수 있다(C125S, 서열번호 2). 또한, 링커의 길이를 단축하기 위해 IL-2의 N-말단과 C-말단 위치를 바꾼 순환 치환된 형태(circular permutated form)일 수도 있다.

[74] 본 발명에서 "IL-2 폴리펩티드"는 서열번호 1의 인간 IL-2 서열과 서열 동일성이 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이

상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상인 아미노산 서열을 갖는 IL-2 단백질을 포함한다.

[75]

[76] **IL-2Rα 단백질**

[77] 본 발명에서, "IL-2Rα 단백질", "IL-2Rα 폴리펩티드", "IL-2Rα", "CD25", 또는 "인터류킨-2 수용체 α-서브유니트"는 달리 언급되지 않는 한, 포유동물, 예를 들어 영장류(예: 인간) 및 설치류(예: 마우스 및 래트)를 포함하는 척추동물 유래의 IL-2 수용체의 α-서브유니트를 의미한다. 이 용어는 미가공 IL-2Rα 뿐만 아니라 세포 내에서 가공된 임의의 형태의 IL-2Rα를 포함한다. 이 용어는 또한 자연 발생된 변이체 또는 하기에 정의된 "IL-2Rα의 돌연변이체"도 포함한다. 본 발명에서 기준이 되는 인간 IL-2Rα 폴리펩티드는 272개의 아미노산으로 이루어진 UniProt P01589의 22번 내지 272번 아미노산 서열을 갖는다(서열번호 3). 본 발명에서 "IL-2Rα 폴리펩티드"는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 IL-2Rα 폴리펩티드 또는 그의 IL-2 결합 단편, UniProt P01589의 22번 내지 240번 위치에 해당하는 세포외 도메인(서열번호 4) 또는 그 일부, 또는 스시(Sushi) 도메인일 수 있다. 본 발명의 용어 "IL-2Rα 폴리펩티드의 IL-2 결합 단편"이란 IL-2Rα 폴리펩티드의 세포외 도메인에서 C-말단부터 N-말단 방향으로 절단된(truncated) 임의의 길이의 단편으로서 그의 결합 리간드인 IL-2에 대한 결합 활성을 본래의 완전한 결합 활성에 비해 적어도 90% 이상 유지하는 단편을 의미한다.

[78] 본 발명에서 "IL-2Rα 돌연변이체"는 IL-2Rα의 세포외 도메인(서열번호 4), 절단된 형태의 IL-2Rα, 또는 IL-2Rα가 다른 분자에 연결된 형태를 비롯한 다양한 형태의 IL-2Rα 분자에서 IL-2와의 상호작용에 영향을 주는 하나 이상의 위치에서의 돌연변이를 포함하는 IL-2Rα 단백질을 의미한다. 이 돌연변이는 야생형 아미노산 잔기의 치환, 결실, 절단 또는 변형을 포함할 수 있다.

[79] 본 발명에서 "IL-2Rα 돌연변이체"는 IL-Rα와 IL-2의 친화도를 높임으로써 복합체를 안정화시키기 위하여 IL-Rα의 아미노산 서열에 돌연변이를 포함할 수 있다. 본 발명에서 IL-2Rα의 돌연변이의 위치는 서열번호 4의 서열을 기준으로 한다. 예를 들어 본 발명의 IL-2Rα 돌연변이체는 서열번호 4의 IL-2Rα의 세포외 도메인 또는 그의 절단된 형태에서 L2, M25, N27, S39, L42, L45, N57, I118, H120, 및 K153 중 하나 이상의 위치에 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 본 발명에서 IL-2Rα 돌연변이체는 L2D, L2E, L2Q, M25L, M25I, N27A, N27T, N27I, N27Y, S39K, L42F, L42I, L42A, L42V, L45R, N57E, I118R, H120A, H120D, H120K, H120Y, H120L, H120W, H120R 및 K153G 중 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 IL-2Rα 돌연변이체는 F121A, V122A 및 A114D 중 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다.

[80] 본 발명에서 예시적인 IL-2Rα 돌연변이체는 IL-2Rα의 세포외 도메인의 절단된 형태에서 L42I 아미노산 치환을 갖는 서열번호 5의 돌연변이체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[81]

[82] **IL-15/IL-15Rα**

[83] IL-15는 바이러스 감염 후 단핵 식세포를 비롯한 면역 세포에 의해 분비된다. IL-15는 NK 세포와 면역계의 다른 세포들의 증식을 유도하고 바이러스로 감염된 세포 및 암 세포의 사멸에 관여한다. IL-15는 중간 친화도 IL-2Rβγ 수용체에도 결합하지만, IL-15Rα 수용체에는 훨씬 더 높은 친화도로 결합한다. IL-15Rα는 IL-2βγ와 결합하여 기능성의 고-친화도 수용체 αβγ를 형성한다.

[84] 본 발명에서 "인터류킨-15", "IL-15", "IL-15 단백질", 또는 "IL-15 폴리펩티드"는 달리 언급되지 않는 한, 포유동물, 예를 들어 영장류(예: 인간) 및 설치류(예: 마우스 및 래트)를 포함하는 척추동물 유래의 IL-15를 포함한다. 본 발명에서 IL-15 폴리펩티드는 Uniprot P40933의 49번 내지 162번 아미노산 서열을 갖는 인간 IL-15 폴리펩티드(서열번호 6) 또는 IL-15의 활성을 적어도 일부분 유지하는 그의 변이체일 수 있다. 또한 IL-15 폴리펩티드는 IL-15Rα 폴리펩티드에 대한 결합을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하거나 또는 순환 치환된(circular permutated) 것일 수 있다.

[85] 본 발명에서 "IL-15Rα 단백질", "IL-15Rα 폴리펩티드", "IL-15Rα", "CD215", 또는 "인터류킨-15 수용체 α"는 달리 언급되지 않는 한, 포유동물, 예를 들어 영장류(예: 인간) 및 설치류(예: 마우스 및 래트)를 포함하는 척추동물 유래의 IL-15 수용체의 α-서브유니트를 의미한다. 본 발명에서 IL-15Rα 단백질은 인간 IL-15Rα 또는 IL-15Rα의 활성을 적어도 일부분 유지하는 절단된 형태 또는 돌연변이체일 수 있다. 본 발명에서 기준이 되는 인간 IL-15Rα 폴리펩티드는 UniProt Q13261의 31번 내지 267번 아미노산 서열을 갖는다(서열번호 7). 본 발명에서 IL-15Rα 폴리펩티드는 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 IL-15Rα 폴리펩티드 또는 그의 IL-15 결합 단편, 세포외(extracellular) 도메인(서열번호 8) 또는 스시(Sushi) 도메인일 수 있고, 결합 리간드 IL-15 폴리펩티드에 대한 결합을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 변형을 포함할 수 있다. 본 발명의 용어 "IL-15Rα 폴리펩티드의 IL-15 결합 단편"이란 IL-15Rα 폴리펩티드의 세포외 도메인에서 C-말단부터 N-말단 방향으로 절단된(truncated) 임의의 길이의 단편으로서 그의 결합 리간드인 IL-15에 대한 결합 활성을 본래의 완전한 결합 활성에 비해 적어도 90% 이상 유지하는 단편을 의미한다.

[86]

[87] **항-PD-1 항체 또는 그의 항원 결합 단편**

[88] 본 발명에서 항-PD-1 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 PD-1, 특히 세포 표면에 발현되어 있는 PD-1 폴리펩티드에 결합할 수 있는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 의미한다. 일부 구현예에서 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 KD 값 10^{-7}M 이하로 PD-1에 결합하고; 일부 구현예에서, KD 값 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} 또는 10^{-11}M 이하로 PD-1에 결합한다. 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원

결합 단편은 낮은 pH 환경에서도 KD 값 10^{-9}M 이하, 바람직하게는 KD 값 10^{-10}M 이하, 더욱 바람직하게는 KD 값 10^{-11}M 이하로 PD-1에 결합한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 pH 6.0에서 9 x 10^{-10}M 이하의 KD로 PD-1에 결합한다.

[89] 본 발명에서 항-PD-1 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 바람직하게는 중쇄 가변 영역은 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정영역 1(HCDR1), 서열번호 10 내지 15로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 16 내지 31로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 보존적 아미노산 치환 또는 3개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는 HCDR 변이체(들)을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 32 내지 35로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 보존적 아미노산 치환 또는 3개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는 LCDR 변이체(들)을 포함한다.

[90] 본 발명에서 항-PD-1 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 바람직하게는 중쇄 가변 영역은 서열번호 38, 40, 42 또는 44의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하거나, 또는 경쇄 가변 영역은 서열번호 39, 41, 43 또는 45의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.

[91] 소정의 VH 또는 VL 영역 내의 CDR 서열을 결정하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 카밧(Kabat) 넘버링 시스템, 초티아(Chothia) 넘버링 시스템, 마르틴(Martin) 넘버링 시스템, 겔판드(Gelfand) 넘버링 시스템 및 IMGT 넘버링 시스템 등을 포함한다(Dondelinger et al., *Front. Immunol.* (2018) **9**:2278 등 참조). 본 발명의 바람직한 구현예에 따른 항체 또는 그의 기능적 단편은 Kabat 넘버링 시스템에 따른 CDR 서열을 포함할 수 있지만 이로 제한되지 않는다. 서열번호 38 내지 45의 가변 영역 서열에서 공지의 CDR 결정 방법에 따라 정의될 수 있는 CDR 서열을 포함하는 항체 또는 그의 기능적 단편은 모두 본 발명의 범주내에 포함된다.

[92] 본 발명에서 항-PD-1 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 바람직하게는 중쇄 가변 영역은 서열번호 38, 40, 42 또는 44로 표시된 바와 같은 서열을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 1 내지 10개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는 변이체를 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 39, 41, 43 또는 45로 표시된 바와 같은 서열을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 1 내지 10개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는 변이체를 포함한다.

[93] 본 발명에서 항-PD-1 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 중쇄 가변 영역은 서열번호 38, 40, 42 또는 44의 아미노산 서열과 서열 동일성이 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상인 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[94] 본 발명에서 항-PD-1 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 경쇄 가변 영역은 서열번호 39, 41, 43 또는 45의 아미노산 서열과 서열 동일성이 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상인 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[95] "보존적 아미노산 치환"이란 아미노산 잔기가 유사한 화학적 특성(예: 전하 또는 소수성)을 갖는 측쇄(R 그룹)를 갖는 또 다른 아미노산 잔기에 의해 치환되는 것이다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 단백질의 기능적 특성을 실질적으로 변화시키지 않을 것이다. 2개 이상의 아미노산 서열이 보존적 치환에 의해 서로 상이한 경우에, 유사율 또는 유사도는 치환의 보존적 성질에 대해 보정되도록 상향으로 조정될 수 있다. 이러한 조정을 위한 수단은 당업자에게 익히 공지되어 있다. 예를 들면, 본원에 참조로 포함되어 있는 문헌(참조: Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331)을 참조한다. 유사한 화학적 특성을 갖는 측쇄를 갖는 아미노산 그룹의 예는 1) 염기성 측쇄: 라이신, 아르기닌, 및 히스티딘; 2) 산성 측쇄: 아스파테이트 및 글루타메이트; 3) 비전하 극성 측쇄: 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신 및 시스테인; 4) 비극성 측쇄: 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판 및 메티오닌; 5) 황-함유 측쇄: 시스테인 및 메티오닌; 6) 지방족 측쇄: 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신 및 프롤린; 7) 지방족-하이드록실 측쇄: 세린 및 트레오닌; 8) 아미드-함유 측쇄: 아스파라긴 및 글루타민; 및 9) 방향족 측쇄: 페닐알라닌, 티로신, 트립토판 및 히스티딘을 포함한다. 바람직한 보존적 아미노산 치환 그룹은 발린-류신-이소류신, 페닐알라닌-티로신, 라이신-아르기닌, 알라닌-발린, 글루타메이트-아스파테이트, 및 아스파라긴-글루타민이다. 대안적으로, 보존적 대체는 본원에 참조로 포함된 문헌(참조: Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443 45)에 개시된 PAM250 로그-가능성 매트릭스(log-likelihood matrix)에서 양의 값을 갖는 임의의 변화이다. "중간 정도 (moderately) 보존적" 대체는 PAM250 로그-가능성 매트릭스에서 비-음의 (nonnegative) 값을 갖는 임의의 변화이다. 본 발명에 있어서, 특정 서열로 한정된 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 범위는 해당 서열의 보존적 치환을 갖는 서열을 또한 포함하는 것으로 정의된다.

[96] 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 재조합 항체, 바람직하게는 뮤린(murine) 항체, 키메릭(chimeric) 항체, 인간화(humanized) 항체 또는 인간 항체일 수 있다.

[97] 일부 구현예에서, 키메릭 또는 인간화 항-PD-1 항체의 중쇄 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 또는 이들의 돌연변이체 서열(들)로부터 유래되고, 경쇄 불변 영역은 인간 카파, 람다 사슬 또는 이의 돌연변이체 서열(들)로부터

유래될 수 있다. 예를 들어, 중쇄 불변 영역이 S228P 돌연변이를 포함하는 인간 IgG4 중쇄 불변 영역(서열번호 46)이고/이거나 경쇄 불변영역이 인간 면역글로불린 카파 불변 영역 사슬(서열번호 47)일 수 있다.

[98] 항-PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 일부 구현예에서, 항체는 키메라 항체이고, 항체의 불변 영역(constant region)은 인간 항체의 불변영역 또는 그의 돌연변이체로부터 유래된다.

[99] 항-PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 일부 구현예에서, 항체는 인간화 항체이고, 항체의 경쇄 프레임워크 영역(FR; framework region) 및 중쇄 프레임워크 영역은 각각 인간 생식선(germline) 경쇄 및 중쇄 또는 이의 돌연변이체 서열(들)로부터 유래된다.

[100] 항-PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 일부 구현예에서, 항체는 인간 항체이고, 전체 서열이 인간 생식선 경쇄 및 중쇄 또는 이의 돌연변이체 서열(들)로부터 유래된다.

[101] 본 발명에서 항-PD-1 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 인간 PD-1(서열번호 48)에 결합하는 공지의 항-PD-1 항체에서 유래될 수도 있다. 예를 들어, 펨브롤리주맙(pembrolizumab, Keytruda®), 니볼루맙(nivolumab; Opdivo®), tislelizumab (BeiGene and Novartis), cemiplimab (Libtayo®, Regeneron), dostarlimab (Jemperli®, GSK), BCD-100, camrelizumab, genolimzumab, MED10680 (AMP-514), sasanlimab (PF-06801591), sintilimab (IBI-308), spartalizumab (PDR-001), 또는 STI-A1110, 또는 그의 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 이들과 동일한 에피토프에 결합하거나 이들과 경쟁할 수 있는 항체 또는 그의 항원 결합 단편일 수 있다.

[102]

[103] **다른 항원 결합 도메인**

[104] 항 PD-1 항체 이외의 다른 면역세포 항원 결합 도메인으로는, 예를 들어 NKG2a, CD8a, FcRL6, CRTAM (CD355), LAG3, TIM3, CTLA4, TIGIT 등에 선택적으로 결합하는 성분, 항체 또는 그의 항원 결합 단편일 수 있다.

[105] 그 예로는 BMS-986315 (anti-NKG2a, WO 2020/102501), monalizumab (anti-NKG2a); mAbs OKT8 또는 51.1 (항-CD8a 항체, 미국 특허 제10,428,155호, WO 2020/060924), WO 2019/023148 또는 미국 특허 제10,072,080호에 개시된 항-CD8a 항체; 문헌 [Shreeder et al. (2010) J. Immunol. 185:23] 및 [Shreeder et al. (2008) Eur. J. Immunol .38:3159] 또는 WO 2019/094743에 개시된 항-FcRL6 항체 1D8 또는 7B7; WO 2019/086878 또는 WO 2009/029883에 개시된 항-CRTAM 항체 5A11; relatlimab (BMS-986016, anti-LAG-3), US 2011/0150892 및 WO 2014/008218에 개시된 항-LAG-3 항체 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 또는 17E5, 또는 US 2011/007023에 개시된 항-LAG-3 항체 IMP731; ipilimumab 또는 tremelimumab (anti-CTLA-4); TSR-022, MBG453, 또는 LY3321367 (anti-TIM3); vibostolimab 또는 tiragolumab (anti-TIGIT) 등이 있으나 이에 한정되지는 않는다.

[106] 본 발명의 융합 단백질은 면역세포 항원 결합 도메인 이외에, 종양 세포를 표적으로 하는 항원 결합 도메인을 추가로 포함하여 이중특이성 작용 단백질로 구성될 수 있다.

[107]

[108] **Fc 영역**

[109] 본 발명에서, 용어 "Fc 도메인" 또는 "Fc 영역"은 항체의 중쇄 불변영역 중 CH2 및 CH3 도메인(또는, CH2, CH3 및 CH4 도메인)을 포함하는 C-말단 영역을 의미하며, 야생형(wild-type) Fc 영역 및 그의 변이체를 포괄하는 의미로 사용된다. IgG 중쇄의 Fc 영역의 경계는 조금씩 변경될 수 있지만 일반적으로 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 Cys226 또는 Pro230으로부터 중쇄의 C-말단에 이르는 영역, 또는 상기 영역에 힌지를 더 포함하는 영역을 의미할 수 있다. Fc 영역에서 아미노산 잔기의 번호는 인간 면역글로불린 중쇄 내의 잔기 번호를 정의하는 Kabat 문헌(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Ed., NIH Publication, 1991)의 EU 인덱스라고도 불리는 EU 넘버링 시스템에 따른다.

[110] 본 발명에서, 용어 "야생형 Fc 영역"은 자연에서 발견되는 면역글로불린의 Fc 영역의 아미노산 서열과 일치하는 아미노산 서열을 포함한다.

[111] 본 발명에서, 용어 "Fc 영역의 변이체"는 야생형 Fc 영역과 상이한 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 것으로서, "Fc 변이체"로 약칭할 수 있다.

[112] 본 발명에서, 상기 Fc 변이체는 모체가 되는 야생형 Fc 영역 서열과 약 80% 이상, 바람직하게는 약 90% 이상의 상동성을 가질 수 있다.

[113] 본 발명의 융합 단백질은 제1 Fc 사슬 및 제2 Fc 사슬의 두 개의 사슬로 이루어진 면역글로불린의 Fc 영역을 포함한다. 예를 들어, IgG의 Fc 도메인은 두 개의 사슬로 이루어진 이량체이며, 각 사슬은 CH2 및 CH3 IgG 중쇄 불변 영역을 포함한다.

[114] 본 발명에서 Fc 영역은 동종이량체(homodimer) 또는 이종이량체(heterodimer)일 수 있다. Fc 영역의 제1 사슬과 제2 사슬에 서로 다른 단백질 분자(예: IL-2와 IL-2Rα)가 연결되어 있는 구조에 있어서는, 원하는 융합 단백질 분자를 고수율로 수득하기 위하여 동일한 단백질 분자와 연결된 Fc 사슬 간에 결합이 형성되지 않고 상이한 단백질 분자와 연결된 Fc 사슬끼리 결합이 형성되도록 설계하는 것이 중요하다. 이에 따라 동일한 사슬 간의 반발력 및 상이한 사슬 간의 결합력을 향상시킬 수 있도록, Fc 영역에 변형을 도입한 Fc 이종이량체를 사용하는 것이 바람직하다.

[115] 본 발명에서 Fc 이종이량체는 서로 상이한 제1 Fc 사슬 및 제2 Fc 사슬로 이루어진다. 상기 제1 Fc 사슬 및 제2 Fc 사슬은 3차 구조를 형성할 수 있으며, 이들은 이황화 결합과 같은 공유 결합이나, 수소 결합, 이온 결합, 반데르발스 결합, 소수성 상호작용과 같은 비공유 상호작용에 의해 서로 상호 작용할 수 있다.

[116] 본 발명에서의 Fc 이종이량체는 상이한 두 사슬 간의 결합을 촉진하기 위하여 CH3 영역에 변이를 도입한 공지의 기술들을 사용할 수도 있다. 예를 들어, 놉-

인투-홀(knob-into-hole, KiH) 방식을 사용한 기술이 있다. 상기 KiH 방식에서는 CH3 도메인의 소수성 상호작용 영역에서 한쪽 사슬에서는 곁가지의 크기가 큰 아미노산을 곁가지의 크기가 작은 아미노산으로 치환하고, 다른 쪽 사슬에서는 작은 아미노산을 큰 아미노산으로 치환하는 변이를 이용한다. 예를 들어 WO 96/27011 또는 문헌[Ridgway, J.B., et al., Protein Eng 9 (1996) 617-621; Merchant, A.M., et al., Nat Biotechnol 16 (1998) 677-681] 등에 기재된 바와 같이 한 사슬의 T366(EU 넘버링 기준, 이하 동일)을 Y, W의 큰 잔기로 치환하고, 반대 사슬의 Y407, T394, T366 등을 T, A, S 등의 작은 잔기로 치환한 형태의 헤테로머 폴리펩티드를 사용할 수 있다. 본 발명의 한 실시태양에서, Fc의 CH3 도메인은 두 CH3 도메인 사이에 이황화 가교가 형성될 수 있도록 각 CH3의 해당 위치에 시스테인(C)을 도입하여 추가로 변형시킬 수 있다(KiHs-s).

[117] 예를 들어, 놉(knob) 사슬의 CH3 도메인에는 T366W 돌연변이를, 홀(hole) 사슬의 CH3 도메인에는 T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함할 수 있다(EU 넘버링 기준). 또한 놉 사슬의 CH3 도메인에 E356C 돌연변이 또는 S354C 돌연변이를 도입하고 홀 사슬의 CH3 도메인에 Y349C 돌연변이를 도입함으로써 CH3 도메인들 사이에 이황화 가교를 추가로 형성시킬 수 있다(Merchant, A.M., et al., Nature Biotech 16 (1998) 677-681). 예를 들어, 본 발명에서 사용되는 Fc 이종이량체는 KiHs-s를 사용할 수 있다.

[118] 또한 본 발명에서, 상기 놉 사슬 및 홀 사슬 중 어느 한 사슬이 K360E의 아미노산 치환을 더 포함하고, 다른 한 사슬이 Q347R의 아미노산 치환을 더 포함하거나, 또는 어느 한 사슬이 K360E 및 Q347E의 아미노산 치환을 더 포함하고, 다른 한 사슬이 Q347R의 아미노산 치환 또는 K360R 및 Q347R의 아미노산 치환을 더 포함할 수 있다.

[119] 본 발명에서 사용되는 바람직한 Fc 이종이량체는 T366에서의 아미노산 치환을 포함하는 제1 Fc 사슬 및 T366, L368 및 Y407 중 하나 이상에서의 아미노산 치환을 포함하는 제2 Fc 사슬을 포함하며, 상기 제1 및 제2 Fc 사슬 중 한 사슬은 K360에서의 아미노산 치환을 더 포함하고, 다른 사슬은 Q347에서의 아미노산 치환을 더 포함한다. 또한, 상기 제1 Fc 사슬 및 제2 Fc 사슬 중 K360에서의 아미노산 치환을 포함하는 사슬이 Q347에서의 아미노산 치환을 더 포함하고(하거나), Q347에서의 아미노산 치환을 포함하는 다른 사슬이 K360에서의 아미노산 치환을 더 포함할 수 있다.

[120] 바람직하게는 본 발명에서 Fc 이종이량체는,

[121] (A1) 상기 제1 Fc 사슬이 T366W 및 K360E의 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 FC 사슬이 T366S, L368A, Y407V 및 Q347R의 아미노산 치환을 포함하거나,

[122] (A2) 상기 제1 FC 사슬이 T366W 및 Q347R의 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 FC 사슬이 T366S, L368A, Y407V 및 K360E의 아미노산 치환을 포함하거나,

[123] (A3) 상기 제1 FC 사슬이 T366W, K360R 및 Q347R의 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 FC 사슬이 T366S, L368A, Y407V, K360E 및 Q347E의 아미노산 치환을 포함하거나, 또는

[124] (A4) 상기 제1 FC 사슬이 T366W, K360E 및 Q347E의 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 FC 사슬이 T366S, L368A, Y407V, K360R 및 Q347R의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[125] 또한, 본 발명에서 Fc 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 또는 이들의 돌연변이체 서열(들)로부터 유래된 것일 수 있으며, Fc 영역의 구조적 안정화 또는 Fc 수용체에 대한 결합 친화성을 변형시키기 위한 다른 돌연변이를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, Fc 영역이 IgG4에서 유래하는 경우 S228P 돌연변이를 더 포함할 수 있다. S228P 돌연변이는 두 IgG4 항체 사이에 Fab 영역에서 교환이 발생하는 Fab arm exchange를 감소시킨다. 예를 들어, Fc 영역이 IgG 유래인 경우 효과기(effector) 기능 감소를 위하여 (EU 넘버링 기준) E233, L234, L235, G236, G237, N297, L328, P329 및 P331 중에서 선택된 위치에 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 예를 들어, Fc 영역은 L234, L235 및 P329로 이루어진 군에서 선택된 위치에 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 또는 Fc 영역은 L234A 및 L235A의 아미노산 치환을 포함하거나, L234A, L235A 및 P329G의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에서 Fc 영역은 CH2 도메인이 결여된 것일 수 있다.

[126] 본 발명에서 사용되는 예시적 Fc 사슬의 아미노산 서열은 서열번호 49 및 50에 나타낸 바와 같다.

[127]

[128] **융합 단백질의 제조 방법**

[129] 본 발명의 융합 단백질은 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 숙주 세포에서 발현시켜 수득할 수 있다.

[130] 본 발명에서, 용어 "폴리뉴클레오티드"는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드로 이루어진 단리된 핵산 분자 또는 구조물, 예를 들어 mRNA, 플라스미드 DNA, 바이러스-유래 RNA를 의미한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 융합 단백질을 이루는 각 도메인의 야생형 서열을 본 발명의 융합 단백질에 따라 구성하거나 변경하여 생성될 수 있으며, 본 발명의 융합 단백질의 발현에 필요한 요소(예를 들어, 신호 펩타이드)를 더 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 융합 단백질의 전체 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 PCR 중합 반응에 의해 합성하여 사용할 수 있다.

[131] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 융합 단백질이 이종이량체 구조를 취하는 경우, 상기 발현 벡터는 IL-2가 연결된 제1 단량체 사슬의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 발현 벡터 및 IL-2Rα가 연결된 제2 단량체 사슬의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 발현 벡터를 포함할 수 있다. 본 발명의 예시적인 실시 양태에 있어서, 상기 제1 발현 벡터는 서열번호 51 및 57의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레

오티드 서열을 포함하고, 제2 발현 벡터는 서열번호 51 및 58의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[132] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 융합 단백질은 상기 제1 및 제2 발현 벡터를 각각 개별적으로 숙주 세포에서 발현시킨 후 수득된 단백질을 혼합하여 제조하거나, 또는 상기 제1 및 제2 발현 벡터를 동일 숙주 세포에서 함께 발현시켜 단일 세포에서 제조할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 융합 단백질은 단일 세포에서 제조된다.

[133]

[134] **치료적 투여 및 제형**

[135] 본 발명은 일 측면에서, 본 발명에 따른 융합 단백질 및 약학적으로 허용가능한 부형제, 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 상기 약학적 조성물은 예를 들어 종양, 암, 전이성 종양 또는 전이성 암의 치료에 면역요법제로 사용할 수 있다. 상기 약학적 조성물은 또한 감염성 질환의 치료를 위해 사용될 수 있다.

[136] 본 발명은 일 측면에서, 상기 약학적 조성물에 제2 치료제를 추가로 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 일 실시양태에서, 제2 치료제는 면역조절제, 세포성장억제제, 세포부착 억제제, 세포독성제, 세포사멸 활성제, 또는 세포사멸 유도제에 대한 세포의 감수성을 증가시키는 작용제이다. 특정한 실시양태에서, 상기 추가적인 치료제는 항암제, 예를 들어 미세소관붕괴제, 대사길항물질, 국소이성화효소 억제제, DNA 삽입제, 알킬화제, 호르몬 요법, 키나제 억제제, 수용체 길항물질, 종양세포 세포사멸 활성제, 또는 혈관형성 억제제일 수 있다.

[137] 본 발명에서 종양, 암, 전이성 종양 또는 전이성 암은 비-소세포 폐암, 소세포 폐암, 신세포 암, 신장암, 간암, 골암, 피부암, 결장암, 직장암, 난소암, 유방암, 췌장암, 위암종, 방광암, 식도암, 중피종, 흑색종, 두경부암, 갑상선암, 육종, 전립선암, 교모세포종, 자궁경부암, 흉선 암종, 백혈병, 림프종, 골수종, 균상 식육종, 메르켈 세포 암, 및 고전적 호지킨 림프종(CHL), 원발성 종격 거대 B-세포 림프종, T-세포/조직구-풍부 B-세포 림프종, 엡스타인-바르 바이러스(EBV)-양성 및 -음성 이식후 림프증식성 질환 (PTLD), 또는 EBV-연관 미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL), 형질모세포 림프종, 외부 NK/T-세포 림프종, 비인두 암종, 또는 인간 헤르페스 바이러스 8 (HHV8)-연관 원발성 삼출 림프종, 호지킨 림프종을 포함하는 다른 혈액암, 원발성 중추 신경계 (CNS) 림프종, 척추 종양, 뇌간신경교종을 포함하는 중추 신경계의 신생물일 수 있으며, 이로 제한되지 않는다.

[138] 본 발명에서 감염성 질환은 B형 간염, C형 간염의 바이러스 감염, 헤르페스 바이러스, 엡스타인-바르 바이러스, HIV, 시토메갈로바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 유형 I, 단순 헤르페스 바이러스 유형 2, 인간 유두종 바이러스, 아데노바이러스, 헤르페스 바이러스 전염과 연관된 카포시 웨스트 육종, 얇은 고리 바이러스(토르퀘테노바이러스), JC 바이러스 또는 BK 바이러스 감염을 포함하는 만성 바이러스 감염으로부터 선택되는 것일 수 있으며, 이로 제한되지 않는다.

[139] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 암의 조기 단계 또는 후기-단계 증상을 치료하는데 사용될 수 있다. 한 양태에서, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 전이암을 치료하는데 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 고체 종양 및 혈액암(blood cancer) 둘 모두의 종양 성장을 감소시키거나 억제하거나 수축시키는데 유용하다. 특정 양태에서, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 처리는 피험자에서 종양의 50% 이상의 감소, 60% 이상의 감소, 70% 이상의 감소, 80% 이상의 감소, 90% 이상의 감소를 야기한다. 특정 양태에서, 상기 약학적 조성물은 종양의 재발을 예방하는데 사용될 수 있다. 특정 양태에서, 상기 약학적 조성물은 암을 갖는 피험자에서 전체 생존을 연장하는데 유용하다. 일부 양태에서, 상기 약학적 조성물은 암을 앓고 있는 환자에서 장기간 생존을 유지하면서 화학요법 또는 방사선 요법으로 인한 독성을 감소시키는데 유용하다.

[140] 본 발명의 또 다른 양태에서, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 암의 치료에 유용한 당업자에게 공지된 임의의 다른 제제 또는 임의의 다른 요법과 함께 보조 요법으로 사용될 수 있다.

[141] 본 발명에 따르는 약학적 조성물은 적합한 담체, 부형제, 및 향상된 운반, 전달, 내성 등을 제공하도록 제형 내에 포함되는 다른 제제와 함께 투여될 수 있다. 다수의 적절한 제형은 모든 약제 화학자(pharmaceutical chemist)에게 공지된 처방집(참조: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA)에서 확인될 수 있다. 이들 제형은, 예를 들면, 분말, 페이스트, 연고, 젤리, 왁스, 오일, 액체, 액체(양이온 또는 음이온) 함유 소포(vesicle)(예: 리포펙틴(LIPOFECTIN쪠)), DNA 접합체, 무수 흡수 페이스트, 수중유 및 유중수 에멀젼, 에멀젼 카보왁스(다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜), 반고체 겔, 및 카보왁스를 함유하는 반고체 혼합물을 포함한다(참조: Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311).

[142] 융합 단백질의 용량은 투여될 피험자의 연령 및 체중, 표적 질환, 병태, 투여 경로 등에 따라 가변적일 수 있다. 본 발명의 융합 단백질은 한번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 적합하게 투여한다. 융합 단백질의 초기 후보 투여량은 질병의 유형 및 중증도에 따라, 1회 이상의 분리 투여에 의한 것이든 또는 연속 주입에 의한 것이든 간에, 약 1 μg/kg 내지 15 mg/kg (예를 들어 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg)일 수 있다. 전형적인 1일 투여량은 상기 언급한 인자들에 따라 약 1 μg/kg 내지 100 mg/kg 또는 그 이상의 범위일 수 있다. 수일 이상에 걸쳐 반복된 투여를 위해서는 환자의 상태에 따라 일반적으로는 원하는 정도의 질병 증상의 억제가 발생할 때까지 지속할 수 있다. 예시적인 투여량은 약 0.005 mg/kg 내지 약 10 mg/kg일 수 있다. 또다른 비제한적인 예에서, 용량은 또한 투여당 약 1 μg/kg, 약 5 μg/kg, 약 10 μg/kg, 약 50 μg/kg, 약 100 μg/kg, 약 200 μg/kg, 약 350 μg/kg, 약 500 μg/kg, 약 1 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 10 mg/kg, 약 50 mg/kg, 약 100 mg/kg, 약 200 mg/kg, 약 350 mg/kg, 약 500 mg/kg 내지 약 1000 mg/kg 이상 및 상기 중에서 추론할 수 있는 임의의 범위를 포함할 수 있다. 따라서, 약 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 5.0 mg/kg 또는

10 mg/kg(또는 이들의 임의의 조합)의 1회 이상의 용량을 상기 환자에게 투여할 수 있다. 상기와 같은 용량을 간헐적으로, 예를 들어 매주 또는 3주마다(예를 들어 상기 환자가 약 2 내지 약 20회, 또는 예를 들어 약 6회 용량의 상기 융합 단백질을 투여 받도록) 투여할 수 있다. 초기의 보다 높은 부하 용량에 이어서 하나 이상의 보다 낮은 용량을 투여할 수도 있다.

[143] 본 발명의 약학적 조성물은 다양한 전달 시스템, 예를 들면, 리포솜 내 캡슐화, 미세입자, 마이크로캡슐, 돌연변이 바이러스를 발현시킬 수 있는 재조합 세포, 수용체 매개된 엔도시토시스(endocytosis)로 투여될 수 있다(참조: 예를 들면, Wu et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432). 도입 방법은 피내, 경피, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 비강내, 경막외 및 경구 경로를 포함하지만, 이들에 제한되지 않는다. 상기 조성물은 임의의 통상적인 경로에 의해, 예를 들면, 주입 또는 볼루스 주사에 의해, 상피 또는 점막 피부 내층(lining)(예: 경구 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있으며, 다른 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신 또는 국소 투여일 수 있다.

[144] 본 발명의 약학적 조성물은 또한 소포, 특히 리포솜으로 전달될 수 있다(참조: 예를 들면, Langer (1990) Science 249:1527-1533). 본 발명의 융합 단백질을 전달하는 나노입자의 사용 또한 고려될 수 있다. 항체-접합된 나노입자는 치료 및 진단 용도 둘 모두를 위해 사용될 수 있다. 항체-접합된 나노입자 및 제조 방법 및 용도는 본원에 참조로 포함된 문헌(참조: Arruebo, M., et al. 2009, "Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications" in J. Nanomat. Volume 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi: 10.1155/2009/439389)에 상세히 기재되어 있다. 나노입자를 개발하고, 약학적 조성물에 함유된 항체에 접합시켜 종양 세포 또는 자가면역 조직 세포 또는 바이러스 감염된 세포를 표적화할 수 있다. 약물 전달을 위한 나노입자는 또한, 예를 들면, 각각 전문이 본원에 포함된, US 8257740 또는 US 8246995에 기재되어 있다.

[145] 특정 상황에서, 본 발명의 약학적 조성물은 제어된 방출 시스템으로 전달될 수 있다. 한 양태에서, 펌프가 사용될 수 있다. 또 다른 양태에서, 중합체성 물질이 사용될 수 있다. 또 다른 양태에서, 제어된 방출 시스템은 조성물의 표적 인근에 배치되어 전신 용량의 일부만을 필요로 하게 할 수 있다. 주사가능한 제제는 정맥내, 피하, 피내, 두개내, 복강내 및 근육내 주사, 점적 주입(drip infusion) 등을 위한 투여형을 포함할 수 있다. 이들 주사가능한 제제는 공식적으로 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 주사가능한 제제는, 예를 들면, 상기 기재된 항체 또는 이의 염을 멸균 수성 배지 또는 주사를 위해 통상적으로 사용되는 유성 배지 중에 용해시키거나 현탁시키거나 유화시킴으로써 제조될 수 있다. 주사용 수성 배지로서, 적절한 가용화제, 예를 들면, 알코올(예: 에탄올), 다가알코올(예: 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜), 비이온성 계면활성제[예: 폴리소르베이트 80, 수소화된 피마자유의 HCO-50(폴리옥시에틸렌(50mol) 첨가물)] 등과 함께 사용될 수 있는, 예를 들면, 생리식염수, 글루코스를 함유하는 등장성 용액 및 다른 보조제 등

이 있다. 유성 베지로서, 가용화제, 예를 들면, 벤질 벤조에이트, 벤질 알코올 등과 함께 사용될 수 있는, 예를 들면, 참깨유, 대두유 등이 이용될 수 있다. 이에 따라 제조된 주사액은 바람직하게는 적절한 앰플에 채워진다.

[146] 본 발명의 약학적 조성물은 표준 니들(standard needle) 및 시린지에 의해 피하로 또는 정맥내로 전달될 수 있다. 또한, 피하 전달에 대해, 펜 전달 장치(pen delivery device)가 본 발명의 약학적 조성물을 전달하는 데 손쉽게 사용된다. 이러한 펜 전달 장치는 재사용 가능하거나 일회용일 수 있다. 재사용가능한 펜 전달 장치는 일반적으로 약학적 조성물을 함유하는 교체가능한 카트리지를 이용한다. 카트리지 내의 모든 약학적 조성물이 투여되고 카트리지가 비게 되면, 빈 카트리지는 손쉽게 폐기되고 약학적 조성물을 함유하는 새로운 카트리지로 교체될 수 있다. 펜 전달 장치는 이후 재사용될 수 있다. 일회용 펜 전달 장치에서는, 교체가능한 카트리지가 없다. 그 대신, 일회용 펜 전달 장치는 상기 장치 내의 저장소에 수용된 약학적 조성물로 미리 충전된다. 상기 저장소에 약학적 조성물이 고갈되면, 전체 장치를 폐기한다. 다수의 재사용가능한 펜 및 자기주사기(autoinjector) 전달 장치는 본 발명의 약학적 조성물의 피하 전달에 사용된다.

[147] 유리하게는, 상기 기재된 경구 또는 비경구 사용을 위한 약학적 조성물은 활성 성분의 용량을 맞추기에 적합한 단위 용량의 투여형으로 제조된다. 이러한 단위 용량의 투여형은, 예를 들면, 정제, 알약, 캡슐, 주사액(앰플), 좌제 등을 포함한다. 함유된 융합 단백질의 양은 일반적으로 단위 용량; 특히 주사 형태의 투여형당 약 5 내지 약 500mg이며, 항체가 약 5 내지 약 100mg 및 다른 투여형에 대해 약 10 내지 약 250mg으로 함유되는 것이 바람직하다.

[148] 본 발명은 또한 종양, 암, 전이성 종양, 전이성 암 또는 감염성 질환의 예방, 개선 또는 치료가 필요한 개체에게 본 발명의 융합 단백질을 투여하는 것을 포하는, 상기 개체에서 종양, 암, 전이성 종양, 전이성 암 또는 감염성 질환을 예방, 개선 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[149]

[150] **실시예**

[151] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위해 예시로 제공된 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 권리범위 내에서 실시예에 대한 다양한 변형이 가능함은 당업자에게 자명하다.

[152] 본원에서 사용되는 분자 생물학적 시약은 제조사의 지시에 따라 사용하였다. 재조합 DNA 기술은 문헌[Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1991]에 기재된 바와 같이 표준 방법을 이용하여 실시하였다. 면역글로불린 분자 또는 항체 분자에 대해 특정된 아미노산 잔기의 번호는 문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Ed., NIH Publication, 1991]에 의한 EU 인덱스를 기준으로 N-말단으로부터의 아미노산 위치로 표시하였다.

[153]

[154] **실시예 1. 사이토카인 융합 단백질의 제조**

[155] **실시예 1.1 융합 단백질의 구조 설계**

[156] 종양 특이적 탈진된 효과기 T 세포(exhausted T_{eff})의 특이적 활성 증가를 위해서는 T_{eff} 세포의 증식 및/또는 활성화를 특이적으로 유도하는 사이토카인을 종양 내 T_{eff} 세포에 선택적으로 전달하는 것이 중요하다. 이를 위해, T_{eff} 세포의 증식 및/또는 활성화를 촉진하는 사이토카인과 T_{eff} 세포 표적화 도메인을 서로 연결시키고 T_{eff} 세포에 "인-시스(in-cis)"로 작용하도록 사이토카인 융합 단백질의 구조를 설계하였다. T_{eff} 세포의 증식 및/또는 활성화를 유도할 수 있는 사이토카인으로는 T_{eff} 세포에서 발현되는 인터류킨-2 수용체의 βγ-서브유니트(IL-2Rβγ)를 통해 신호를 전달하는 인터류킨-2(이하 IL-2 또는 IL2로 약칭한다) 및 인터류킨-15(이하 IL-15 또는 IL15로 약칭한다)를 고려하였으며, 일 실시태양으로 IL-2를 선택하였다. 이를 T_{eff} 세포 표적화 도메인으로서 항-PD-1 면역 항암 항체의 Fc에 연결시켜 2작용성 융합 단백질로 구성하였다.

[157] 혈액 속에 존재하는 면역 단백질인 IL-2 등의 사이토카인은 면역 세포를 비롯하여 다양한 세포에서 세포내 신호전달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 외인성 사이토카인으로 인한 독성 또는 부작용의 문제를 낮추면서 종양 내 T_{eff} 세포에만 특이적으로 작용하도록 선택성을 증가시키는 전략이 필요하다.

[158] 본 발명자들은 항-PD-1 항체의 제1 Fc 사슬의 C-말단에 IL-2를 연결시키는 한편, 제2 Fc 사슬의 C-말단에 IL-2 수용체의 α-서브유니트(IL-2Rα 또는 CD25)를 연결시켜, 항-PD-1 항체의 제1 및 제2 Fc 사슬 말단 각각에 연결된 IL-2 및 IL-2Rα 사이에 상호작용을 유도함으로써 IL-2가 IL-2Rα에 의해 선점되어 있는 형태를 구성하였다. 상기 IL-2 및 IL-2Rα 단백질들은 각각 항-PD-1 항체의 Fc 말단에만 연결되어 있을 뿐, IL-2와 IL-2Rα 서로 간에는 공유결합으로 연결되어 있지 않다(도 1 참조).

[159] 본 발명의 "인-시스" 융합 단백질의 예시적인 구조를 도 1 내지 도 3에 도시하였다. 도 2에서 보는 바와 같이, IL-2와 IL-2Rα를 링커를 통해 공유결합시켜 복합체를 형성한 후, 상기 사이토카인 복합체를 항-PD-1 항체의 Fc에 IL-2 및 IL-2Rα 중 어느 한 쪽을 통해 연결시키는 구조도 또한 가능하다. 또 다르게는, 외인성 사이토카인으로 인한 독성 또는 부작용 문제를 해결할 수 있는 방안으로 내인성 사이토카인을 이용할 수 있도록 IL-2Rα 또는 IL-15Rα만을 사이토카인 작용 도메인으로 항-PD-1 항체에 연결시키는 융합 단백질의 구조도 고안하였다.

[160] 본 발명자들이 설계한 구조에서는 IL-2가 IL-2Rα에 의해 선점되어 있기 때문에, IL-2 수용체의 α-서브유니트, β-서브유니트(IL-2Rβ 또는 CD122) 및 γ-서브유니트(IL-2Rγ 또는 CD132)가 모두 발현되어 있는 고-친화도 IL-2 수용체(또는 IL-2Rαβγ로 약칭한다)를 발현하는 조절 T 세포(T_{reg}), Foxp3-negative CD4 T 세포,

일부 선천성 림프구 세포나 다른 내피(endothelial) 세포들에 대한 결합력은 약화되는 반면, IL-2Rα 없이 IL-2Rβ 및 IL-2Rγ로 이루어진 중간-친화도 IL-2 수용체(또는 IL-2Rβγ로 약칭한다)를 발현하는 세포독성 CD8+ T 세포, 기억 T 세포, NK-T 세포 등의 T_{eff} 세포에는 보다 특이적으로 결합할 수 있다.

[161]

[162] **실시예 1.2 융합 단백질의 서열 구성 및 발현 벡터의 제작**

[163] **항-PD-1 결합 도메인**

[164] 항-PD-1 결합 도메인으로는 본 발명자들이 이전 연구에서 개발한 인간화 항-PD-1 항체 1G1-h70의 Fab 도메인을 사용하였다. 본 연구에서 사용된 항-PD-1 1G1-h70의 Fab 도메인 아미노산 서열은 다음과 같다.

[165] 경쇄 VL-CL (서열번호 51)

[166] DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQNIVHSQGDTYLEW
YLQKPGQSPQLLIYKVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (밑줄 부분은 경쇄 가변영역을 나타낸다.)

[167]

[168] 중쇄 VH-CH1 (서열번호 52)

[169] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQA
PGQGLEWIGMIHPNSDTTTYNEKFKNRVTMTRDTSISTAY
MELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAAWFAFWGQGTTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT
YTCNVDHKPSNTKVDKRV (밑줄 부분은 중쇄 가변영역을 나타낸다.)

[170]

[171] **링커 디자인**

[172] 항-PD-1 면역 항암 항체의 이량체 Fc 도메인의 각 사슬 말단에 연결된 형태로 IL-2/IL-2Rα 사이의 상호작용을 유지하면서, 상기 IL-2가 또한 세포 표면에 발현되어 있는 IL-2Rβγ에 결합하기 위한 구조 분석을 위해, 결정 구조 분석을 진행하여 Fc 도메인의 C-말단과 IL-2 및 IL-2Rα 각각의 N-말단 사이의 연결 부위에 적합한 길이를 결정하였다.

[173] 인간 PD-1(hPD-1)/1G1-h70의 Fab 도메인 결정 구조에 공지의 항-PD-1 항체인 키트루다(Keytruda)의 전체 결정 구조를 겹쳐 hPD-1에 항-PD-1 항체가 결합한 방식을 모사하였다. 항-PD-1 항체의 Fc 도메인의 C-말단을 IL-2 quaternary complex와 충돌하지 않으면서 IL-2 및 IL-2Rα 각각의 N-말단과 가장 가깝게 위치시킨 뒤 Fc 도메인의 C-말단에서 IL-2 및 IL-2Rα 각각의 N-말단까지 거리를 측정하였다. 그 결과, Fc 도메인의 C-말단과 IL-2 및 IL-2Rα 각각의 N-말단 사이의 연결 부위

의 길이를 각각 59.2A 및 53.6A으로 결정하였다(도 4). 이러한 구조 기반 모델링을 통해, 항-PD-1 항체의 Fc 말단에 각각 IL-2 및 IL-2Rα를 연결하기에 적절한 길이의 링커를 디자인하였다.

[174]

[175] **개선된 이종이량체(heterodimeric) Fc 영역**

[176] 본 발명의 융합 단백질의 제조 수율을 높이기 위해, IL-2가 연결된 Fc 사슬과 IL-2Rα가 연결된 Fc 사슬 사이의 이종이량체 결합이 동일한 서열을 갖는 Fc 사슬 간의 동종이량체 결합에 비해 우세하도록 항-PD-1 항체의 Fc 영역을 이종이량체 Fc로 제작하였다. 이를 위해, Fc 영역에 놉-인투-홀(knob-into-hole, KiH) 변이와 전하/소수성 아미노산 변이를 함께 도입하였다.

[177] 제1 Fc 사슬(서열번호 49)에는 T366W 및 Q347R의 아미노산 치환을 포함시키고, 제2 Fc 사슬(서열번호 50)에는 T366S, L368A, Y407V 및 K360E의 아미노산 치환을 포함시켰다. 이들 이종이량체 Fc 변이체는 이종이량체 융합 단백질의 제조 수율을 약 90% 이상으로 현저하게 향상시킬 수 있다.

[178]

[179] **IL-2Rα의 고친화도 변이체**

[180] IL-2와 IL-2Rα의 결합력을 강화하기 위해 고친화도 IL-2Rα 변이체를 사용하였다. IL-2Rα 단백질의 42번 위치의 류신 아미노산이 이소류신으로 치환된 IL-2Rα L42I 변이체(서열번호 5)는 야생형 IL-2Rα에 비해 보다 향상된 친화도(KD) 값으로 IL-2에 결합할 수 있다. 하기 표 1은 단백질간 상호작용을 실시간 관찰하는 SPR (surface plasmon resonance) Biacore 8K를 이용하여 측정한 결합 친화도와 Kinetics를 나타낸 것이다.

[181] [표1]

리간드	Steady state affinity K_D (M)	Binding k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
야생형 IL-2Rα	2.83E-8	1.95E+7	2.16E-1	1.11E-8
IL-2Rα L42I	1.98E-8	1.08E+7	4.70E-2	**4.36E-9**

[182]

[183] **발현 벡터의 제작**

[184] 발현 벡터는 인간 IgG4 불변영역(S228P)(서열번호 46 및 47)을 발현하는 pTRIOZ_hIgG4(S228P) (Invivogen)을 바탕으로 Fc 영역의 C-말단에 IL-2 C125S (서열번호 2) 혹은 CD25 L42I (서열번호 5) 유전자가 들어가도록 제작하였다. IL-2의 C125S 변이는 FDA 허가된 IL-2 제품인 Proleukin (aldesleukin)에서와 같이 *E. coli*에서의 시스테인 mispairing을 방지하기 위해 도입된 것으로 생물학적 활성에는 영향을 미치지 않는다(Wang A, et al., Site-specific mutagenesis of the human interleukin-2 gene: structure-function analysis of the cysteine residues, *Science*, 224:1431-1433, 1984 참조). 본원에서, 용어 "야생형 IL-2"는 천연 또는 재조합

인간 IL-2 뿐만 아니라 C125S 변이를 가진 IL-2 또는 aldesleukin, 또는 천연 인간 IL-2의 결합 특성을 변형시키지 않으면서 새로운 N-말단 및 C-말단을 가지도록 변형된 circular permutated form의 IL-2를 모두 포함한다. Circular permutated IL-2의 비제한적인 예로는 기존의 N-말단부(Ser4)와 C-말단부(Thr133)을 링커로 연결하고, 새로운 N-말단부(Ser75)와 C-말단부(Gln74)를 형성하도록 절단하여 IL-2 helix가 C-D-A-B의 순으로 연결된 것 등이 있다.

[185] 상기 발현 벡터의 중쇄와 경쇄 불변영역 앞에 각각의 가변영역을 생쥐 면역글로불린 신호 펩티드를 포함하여 제작하였다. 기본적으로 벡터 제조사의 지시사항에 따라 벡터를 제작하였다. 신호 펩티드와 항체의 VH 또는 VL 서열을 overlapping PCR로 연결하여 pTRIOZ_hIgG4(S228P) 벡터에 넣었다. VH 서열의 경우 Mlu I / Nhe I 제한효소를 이용하여 벡터를 잘라준 뒤 삽입하였으며, VL 서열의 경우 Asc I / BsiW I 제한효소를 이용하여 벡터를 잘라준 뒤 삽입하였다.

[186] 이때 제1 사슬 (Knob) 발현 벡터는 Fc 영역에서 T366W 및 Q347R 돌연변이를 유발하도록 뉴클레오티드 서열을 변경하여 제작하였으며, 제2 사슬 (Hole) 발현 벡터는 Fc 영역에서 T366S, L368A, Y407V 및 K360E 돌연변이를 유발하는 뉴클레오티드 서열을 PCR 기법을 이용하여 제작하였다.

[187] 제1 사슬 (Knob) 발현 벡터는 Avr II 제한효소를 이용하여 C-말단 부분을 잘라준 뒤, IL-2 C125S 유전자를 15개 길이의 아미노산 링커가 포함되게 PCR 기법을 이용하여 증폭 후 NEBuilder HiFi DNA Assembly Kit를 이용하여 제작하였다. 제2 사슬 (Hole) 발현 벡터는 Avr II 제한효소를 이용하여 C-말단 부분을 잘라준 뒤, CD25 L42I 유전자를 20개 아미노산 링커가 포함되게 PCR 기법을 이용하여 증폭 후 NEBuilder HiFi DNA Assembly Kit를 이용하여 제작하였다. 이때 사용한 프라이머는 아래 표와 같다.

[188]

	Primer	Sequence	Tm
IL-2 C125S	Forward	CCCTCTCCCCCGGCAAGTCAGGAGGTGGATCTGGTGGAG (SEQ ID NO. 53)	53
	Reverse	GCCCGAATTCGGCGGCCGCTTTATCAGGTCAGCGTAGAGATG (SEQ ID NO. 54)	54
CD25 L42I	Forward	*Tctccctgtctccgggtaaaggaggtggaggttctggtggaggtggatctggt ggaggaggttctggtggaggtggatctGAGCTGTGTGATGATGATC* (SEQ ID NO. 55)	59.9
	Reverse	gtcattggggaaacctgctcctaggTTTAGCCGGTACAGATCAG (SEQ ID NO. 56)	60.9

[189]

[190] 각 발현 벡터가 코딩하는 아미노산 서열은 다음과 같다.

[191] Light Chain: VL-CL (서열번호 51)

[192] DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQNIVHSQGDTYLEW YLQKPGQSPQLLIYKVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI

SRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[193]

[194] HeavyChain 1_Knob_with_IL2C125S: VH - CH1 - *Hinge* - CH2 - CH3 - *Linker* - **IL2C125S** (서열번호 57)

[195] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQA
PGQGLEWIGMIHPNSDTTTYNEKFKNRVTMTRDTSISTAY
MELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAAWFAFWGQGTTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT
YTCNVDHKPSNTKVDKRV*ESKYGPPCPPCP*APEFLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS
SIEKTISKAKGQPREP**R**VYTLPPSQEEMTKNQVSL**W**
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K*SGGGSGGGSGGGSGG***APTSSSTKKTQLQLEHLLLD**
LQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLE
EELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE
TTFMCEYADETATIVEFLNRWITF *S* QSIISTLT

[196]

[197] HeavyChain 2_Hole_with_CD25L42I: VH - CH1 - *Hinge* - CH2 - CH3 - *Linker* - **CD25L42I** (서열번호 58)

[198] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQA
PGQGLEWIGMIHPNSDTTTYNEKFKNRVTMTRDTSISTAY
MELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAAWFAFWGQGTTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT
YTCNVDHKPSNTKVDKRV*ESKYGPPCPPCP*APEFLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS
SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT**E**NQVSL**SCA**
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**
SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS***ELCDDDPPEIPHATFKAMAY**
KEGTMLNCECKRGFRRIKSGS *I* YMLCTGNSSHSSWDNQCQCT
SSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPG

HCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGP AESVCKMTHGKTRWTQPQLICTG

[199]

[200] **실시예 1.3 융합 단백질의 발현 및 정제(융합 단백질 A)**

[201] 실시예 1.2에 기재된 제1 사슬 (knob) 발현 벡터(IL2C125S가 연결된 제1 중쇄 및 경쇄 발현)와 제2 사슬 (hole) 발현 벡터(CD25L42I가 연결된 제2 중쇄 및 경쇄 발현)를 함께 ExpiCHO™ 세포에 트랜스펙션(Transfection)하여 일시적으로 각 단백질을 발현시켰다.

[202] 상기 트랜스펙션은 초기 세포 밀도 6 x 10^6 세포/mL 및 발현 벡터 농도 0.8 μg DNA/mL 조건에서 진행되었으며, 이 과정에서 ExpiCHO™ Expression Medium, OptiPRO™ SFM 및 ExpiFectamine™ 트랜스펙션 키트(Gibco)를 제조사 지침에 따라 사용하였다.

[203] 트랜스펙션 과정을 거친 세포들을 이산화탄소 인큐베이터에서 세포생존률 75%까지 배양한 후, 원심분리를 통해 각 단백질을 함유하는 세포 배양액과 세포로 분리하였다.

[204] 각각의 재조합 단백질을 포함하는 배양액에서 목표 단백질들을 분리하기 위해 HiTrap MabselectXtra (Cytiva) 컬럼을 이용한 친화도 크로마토그래피(affinity chromatography)를 실시하였다.

[205] 구체적으로 AKTA avant25 FPLC를 이용하여 정제하였으며, HiTrap MabselectXtra 컬럼을 PBS (3 mM Na_2HPO_4, 1.1 mM KH_2PO_4, 0.16 M NaCl, pH 7.2)로 평형시킨 후 원심분리를 통해 획득된 배양액을 0.22μm 여과 필터로 여과하여 투입하였다. 배양액과 반응을 마친 뒤, 컬럼을 PBS (5~10 CV), 50 mM NaOAc pH 5.2 (5~10 CV)로 순차적으로 세척 후, Elution buffer (0.1 M Glycine pH 3.0)를 이용하여 단백질을 용출하였다. 용출된 단백질에 최종농도가 50~100 mM이 되도록 3 M NaOAc pH 5.2 버퍼를 첨가한 뒤, 원심분리하여 같이 추출된 색소를 제거하였다. 색소 제거 후 Amicon tube (MWCO: 50 K)를 이용하여 농축하고 ABS (0.1 M NaOAc, 0.15 M NaCl, pH 5.2) 혹은 PBS로 버퍼 교체하였다.

[206] 융합 단백질의 생성을 확인하기 위해 6% 및 10% acrylamide-bisacrylamide (29:1) 젤에서 비환원 및 환원 조건의 SDS-PAGE를 각각 수행하였고, Coomassie Blue(InstantBlue Coomassie Protein Stain (Abcam, ab119211))로 염색하였다. 도 5는 정제된 융합 단백질(융합 단백질 A)을 확인한 SDS-PAGE 결과이다. 융합 단백질 A는 IL-2와 IL-2Rα가 항-PD-1 항체의 Fc 영역에 각각 연결되고 2 개의 항 PD-1 Fab arm을 갖는 형태(도 1a)의 이종이량체 구조이며 높은 수율로 제조될 수 있음을 확인하였다.

[207]

[208] **실시예 2. 다양한 융합 단백질 디자인 및 제조**

[209] **실시예 2.1 1개의 항 PD-1 Fab arm을 갖는 융합 단백질의 제조(융합 단백질 B, 도 1b)**

[210] 실시예 1에서와 동일한 방법으로 구조 설계 및 벡터의 제작을 진행하되, 실시예 1의 발현 벡터를 1차 벡터로 사용하였고, 이 때 중쇄 제1 사슬(Knob) 벡터에서 VH-CH1 부분을 PCR을 이용하여 제거하여 사용하였다. 융합 단백질 B에서 중쇄 제1 사슬(Knob) 벡터가 코딩하는 아미노산 서열은 다음과 같다.

[211]

[212] Fc_Knob_with_IL2C125S: *Hinge* - CH2 - CH3 - *Linker* - **IL2C125S** (서열번호 59)

[213] *KYGPPCPPCP*APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP**R**
VYTLPPSQEEMTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*SGGGSGGGSGGGSGG*
APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML
TFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHL
RPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF *S* QSIISTLT

[214]

[215] 최종 발현 벡터로는 pcDNA3.1로부터 3개의 MCS(multiple cloning sites)를 포함하도록 구성한 자체 제작 벡터인 pG3.1을 이용하였다. 각 MCS는 모두 같은 프로모터(CMV), 인핸서(CMV), 및 Poly A signal(BGH)을 갖고 있다. 3개의 MCS에 1차 벡터에서 클로닝된 경쇄, 중쇄 제1(Knob) 사슬, 및 중쇄 제2(Hole) 사슬 유전자를 각각 넣어 발현 벡터를 제작하였다. ExpiCHO™ 세포에 상기 발현 벡터를 트랜스펙션하여 실시예 1에서와 같은 방법으로 각 단백질을 발현시키고 실시예 1과 동일한 방법으로 목표 단백질을 분리, 정제하였다.

[216]

[217] **실시예 2.2 IL-2를 포함하지 않고 1개의 IL-2Rα 단백질을 포함하는 이종이량체 융합 단백질의 제조(융합 단백질 C, 도 3c)**

[218] 실시예 2.1에서와 동일한 방법으로 구조 설계, 벡터의 제작, 및 단백질의 발현 및 정제를 진행하되, 중쇄 제1 사슬(Knob) 벡터의 C-말단에 IL-2 C125S 유전자를 연결하지 않은 것을 사용하였다. 경쇄 및 중쇄 제2 사슬(Hole)은 실시예 1에서와 동일하고, 중쇄 제1 사슬(Knob)의 아미노산 서열은 다음과 같다.

[219]

[220] HeavyChain 1_Knob_without_IL2C125S: VH - CH1 - *Hinge* - CH2 - CH3 (서열번호 60)

[221] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQA
PGQGLEWIGMIHPNSDTTTYNEKFKNRVTMTRDTSISTAY
MELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAAWFAFWGQGTTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT

YTCNVDHKPSNTKVDKRV*ESKYGPPCPPCP*APEFLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS
SIEKTISKAKGQPREP**R**VYTLPPSQEEMTKNQVSL**W**
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[222]

[223] **실시예 2.3 IL-2를 포함하지 않고 2개의 IL-2Rα 단백질을 포함하는 동종이량체 융합 단백질의 제조(융합 단백질 D, 도 3a)**

[224] 실시예 1에서와 동일한 방법으로 구조 설계, 발현 벡터의 제작, 및 단백질의 발현 및 정제를 진행하되, 이종이량체 제조 수율 향상을 위한 Fc 영역의 변이 없이 Fc 영역의 C-말단에 CD25 L42I(서열번호 5) 유전자만 연결되도록 한 동종이량체 형태의 융합 단백질 D를 실시예 1의 발현 벡터를 이용하여 제작하였다. 융합 단백질 D의 경쇄 아미노산 서열은 실시예 1에서와 동일하고(서열번호 51), 중쇄 아미노산 서열은 다음과 같다.

[225]

[226] HeavyChain_with_CD25L42I: VH - CH1 - *Hinge* - CH2 - CH3 - *Linker* - **CD25L42I** (서열번호 61)

[227] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQA
PGQGLEWIGMIHPNSDTTTYNEKFKNRVTMTRDTSISTAY
MELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAAWFAFWGQGTTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT
YTCNVDHKPSNTKVDKRV*ESKYGPPCPPCP*APEFLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS
SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS***ELCDDDPPEIPHATFKAMAY**
KEGTMLNCECKRGFRRIKSGS *I* YMLCTGNSSHSSWDNQCQCT
SSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPG
HCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGP
AESVCKMTHGKTRWTQPQLICTG

[228]

[229] 실시예 2.1 내지 2.3에서 제조, 정제된 융합 단백질을 확인하기 위하여 4~15% TGX Precast gel (Biorad, BR4561086)에서 SDS-PAGE를 수행하였고 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[230]

[231] **실시예 3. IL-2 수용체 단백질에 대한 결합 선택성 분석**

[232] 본 발명의 융합 단백질의 IL-2/IL-2Rα 이종이량체 Fc 영역으로 인한 IL-2 수용체에의 결합 선택성을 확인하기 위해 IL-2Rα 및 IL-2Rβγ 각각에 대한 결합 ELISA를 수행하였다. 96-well plate(Thermofisher scientific)에 IL-2Rα-His (Acrobiosystems) 및 IL-2Rβγ-His (Acrobiosystems)를 100 ㎕/well 분주하고, sealing 후 4℃에서 밤새도록 코팅하였다. 차단 및 세척 후, 융합 단백질 A와 대조군 항체(Fc-IL2; 자체 제작)를 0 내지 1000 nM 농도로 희석하여 100 ㎕/well 분주하고 실온에서 2시간 인큐베이션하였다. 세척 후, 2차 항체(HRP-conjugated anti-His 항체)를 첨가하고 실온에서 30분간 차광하에 인큐베이션하였다. 세척 후, TMB 기질 용액(Abcam)을 첨가하였고 STOP 용액(Abcam)으로 발색 반응을 중지시켰다. 마이크로플레이트 리더기(ThermoFisher)를 이용하여 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

[233] 그 결과를 각각 도 7a 및 도 7b에 나타내었다. 융합 단백질 A는 IL-2Rα 단백질에 대한 결합력을 보이지 않은 반면(도 7a), IL-2Rβγ 단백질에 대해서는 야생형 IL-2에 비해 다소 약하지만 우수한 결합력을 보였다(도 7b). 이는 본 발명의 융합 단백질의 IL-2가 IL-2Rα에 의해 선점되어 있는 독특한 구조로 인하여 IL-2Rα에 비해 IL-2Rβγ에 대한 월등한 선택성을 나타냄을 보여준다.

[234]

[235] **실시예 4. PD-1 발현에 따른 IL-2 수용체 발현 세포에 대한 결합 선택성 분석**

[236] 본 발명의 융합 단백질이 항-PD-1 결합 도메인과 융합된 IL-2/IL-2Rα 복합체 구조를 가짐에 따라, 상기 항-PD-1 결합 도메인에 의해 종양미세환경(tumor microenvironment, TME)에 존재하는 탈진된 PD-1^{+}T$_{eff}$ 세포에서의 IL-2Rβγ 신호전달에 변화가 있는지를 분석하였다. 분석은 HEK-Blue™ reporter assay system (InvivoGen)을 이용하여 수행하였다.

[237] 먼저, IL-2Rβγ를 발현하는 HEK-Blue™ CD122/CD132 세포(InvivoGen)와 IL-2Rαβγ를 모두 발현하는 HEK-Blue™ IL-2 세포(InvivoGen) 각각에, pCMV3-hPD1 (HG10377-CF) 벡터를 트랜스펙션시켜 PD-1 발현 세포를 제작하였다. 대조군으로는 pCMV3-Empty 벡터(대조군 DNA)를 상기 두 세포에 각각 트랜스펙션시켜 사용하였다. 상기 트랜스펙션된 세포들을 96 well 플레이트에 50,000 세포/well의 농도로 분주하고 37℃, 5% CO_2 챔버에서 배양하였다. 그 다음 세포 배양 상등액을 제거한 후, 0 내지 20 nM 농도의 융합 단백질 A, 재조합 인간 IL-2(rIL2; Sigma), heterodimeric Fc-IL2(Fc-IL2; 자체 제작) 및 heterodimeric Fc-IL2/IL2Rα(heterodimeric Fc에 IL-2 및 IL-2Rα이 각각 연결되어 있는 구조, Fc-IL2/IL2Rα; 자체 제작)를 100 ㎕ DMEM 배지에 첨가하여 세포에 분주하고 37℃에서 8시간 배양하였다. 새로운 96 well 플레이트에 상기 세포 배양 상등액 20 ㎕/well을 첨가한 후, 비색계 분석법 시약인 QUANTI-Blue™ 용액(InvivoGen) 180 ㎕/well

로 처리하고 37℃인큐베이터에서 약 1 시간 이상 동안 차광하에 인큐베이션시켰다. 분비된 알칼리 포스파타제(SEAP, secreted embryonic alkaline phosphatase) 활성을 Microplate reader를 이용하여 620 내지 655 nm에서 OD를 측정하였다. 결과를 도 8에 도시하였다.

[238] 위의 절차를 2회 반복하여 평균값을 구하였다. PD-1 발현 여부 및 IL-2R 발현 유형에 따른 본 발명의 융합 단백질의 EC_{50} 값을 하기 표 2에 기재하였다.

[239] [표2]

EC_{50} (nM)		PD-1 발현	
		PD-1 (+)	PD-1 (-)
IL-2Rβγ	1차	0.01774	7.274
	2차	0.0392	12.16
	평균±표준편차	0.028±0.015	9.72±3.45
IL-2Rαβγ	1차	0.0348	0.9630
	2차	0.0578	3.075
	평균±표준편차	0.046±0.016	2.02±1.49

[240]

[241] 표 2에서 보는 바와 같이, 본 발명의 융합 단백질은 놀랍게도 PD-1이 발현된 IL-2Rβγ 세포에서 PD-1 발현이 없는 세포에 비해 약 340배 이상 높은 IL-2 반응성을 나타내었다(표 2 및 2차 결과를 도시한 도 8a 및 8b 참조). 한편, 본 발명의 융합 단백질은 PD-1 발현이 없는 IL-2Rβγ 세포에 대해서는 약한 IL-2 반응성을 나타내었는데(도 8b), 이는 실시예 3에서 IL-2Rβγ 단백질에 대한 결합력 시험(도 7b)에서도 확인된 바와 같이 본 발명의 융합 단백질이 no alpha but attenuated beta gamma affinity 특성을 가지는 것에서 기인한 것으로 생각된다. 이론에 구속되는 것은 아니지만, 이러한 attenuated beta gamma affinity로는 PD-1이 발현되어 있지 않은 IL-2Rβγ 발현 세포에서 충분한 intracellular signaling이 이루어지지 않는 것으로 보여진다. 그러나, PD-1이 함께 발현되어 있는 세포(예를 들어, TME의 PD-1$^+$ T_{eff} 세포)에서는 본 발명의 융합 단백질의 IL-2가 항-PD-1 결합 도메인의 도움을 받아 "인-시스" 구조로 함께 붙게 되면서 IL-2Rβγ에 강하게 결합할 수 있어("스위치-온" 효과) 현저한 수준으로 intracellular signaling을 일으킬 수 있는 것으로 이해된다.

[242] 본 발명의 융합 단백질이 갖는 no alpha but attenuated beta gamma affinity 특성은 IL-2Rβγ를 항구적으로 발현하지만 PD-1 발현율이 낮은 말초혈의 NK 세포 등에는 잘 결합하지 않을 것을 시사하는 것이므로, 종래 IL-2 단백질이 갖는 NK 세포

과활성으로 인한 전신 독성 내지 부작용의 감소 측면에서 매우 유리한 이점을 가진다.

[243] 또한, 본 발명의 융합 단백질은 IL-2Rαβγ 발현 세포에 대해서는 PD-1 발현이 있는 경우에도 IL-2에 대한 반응성 차이가 IL-2Rβγ 발현 세포에 비해 미미한 수준이었다(340배 vs 44배; 표 2 및 2차 결과를 도시한 도 8c 및 8d 참조). IL-2Rαβγ와 같이 여러가지 수용체 서브유니트들을 발현하도록 제작된 세포의 경우 서브유니트들의 발현 양상이 다양할 수 있어 어느 정도 IL-2Rβγ 수용체의 발현을 일부 수용할 수도 있다는 점을 고려하면, IL-2Rαβγ 발현 세포와 IL-2Rβγ 발현 세포 사이의 IL-2에 대한 실제 반응성 차이는 더욱 현저할 것이다. 이는 본 발명의 융합 단백질이 IL-2Rαβγ를 항구적으로 발현하는 T_{reg} 세포나 모세혈관 누출 증후군(vascular leak syndrome)을 야기하는 호산구(eosinophil) 및 다른 내피 세포들에 대한 IL-2 반응성이 상당히 낮음을 의미하는 것이므로, 외인성 IL-2 단백질의 출현으로 인하여 발생할 수 있는 전신 독성 내지 심각한 부작용의 문제를 해결하면서 TME에 존재하는 탈진된 T_{eff} 세포에 특이적으로 결합하여 뛰어난 면역 항암 반응을 유도할 수 있음을 보여주는 것이다.

[244]

[245] **실시예 5. 마우스 종양 모델에서의 생체내(in vivo) 항암 효능 평가**

[246] **실시예 5.1 항-PD-1 또는 Fc-IL2/IL2Rα 단독 투여 대비 항암 효능 시험**

[247] 본 발명의 융합 단백질이 종양 내 PD-1을 발현하는 T_{eff} 세포에 IL-2를 선택적으로 전달 및 활성화시켜 종양 성장을 억제하는 능력을 평가하기 위해, MC38 대장암 syngeneic 마우스 종양 모델을 이용하여 본 발명의 융합 단백질의 항암 효능 평가시험을 실시하였다. 실험 절차는 도 9에 요약되어 있다.

[248] MC38 암 세포를 DMEM (+10% FBS, 1% 스트렙토마이신-페니실린, 1% NEAA) 배지를 사용하여 37℃, 5% CO_2 챔버에서 배양하였다. Passage 9에 도달한 MC38 암 세포를 마우스에 이식용으로 사용하였다. 8주령 C57BL/6 암컷 마우스의 가운데 등과 오른쪽 옆구리 사이(오른쪽 등 부분)에 1 x 10^6 MC38 암 세포를 1ml 인슐린 주사기로 피하 주사하여 주입하였다. 이때 마우스는 이소플루란을 사용하여 마취 상태를 유지하였다. MC38 암 세포를 피하 주사한 마우스를 7일간 경과 관찰하였다. 모든 마우스는 오리엔트바이오에서 구매하였으며 specific-pathogen-free condition 동물시설(SPF 시설)에서 사육하였다.

[249] 7일 후, 종양 크기를 측정하고 100 mm^3 크기(±30)에 도달한 마우스를 따로 분류하여 실험에 사용하였다. 총 28마리의 MC38 암 세포가 이식된 마우스를 확보하여 4 그룹으로 나누었다. 각 그룹은 본 발명의 융합 단백질 A 처리 그룹, 융합 단백질 A와 동일한 항-PD-1 결합 도메인을 갖는 항체 처리 그룹, heterodimeric Fc-IL2/IL2Rα 처리 그룹, 그리고 대조군으로서 PBS 처리 그룹으로 구성되었다. 각 시험물질을 같은 용량(140 pmole)으로 100 $\mu\ell$ DPBS에 혼합하여 7일째 되는 날부터 1주일에 2회(BIW), 총 4회 마우스 꼬리 정맥에 주사하였다(PBS 처리 그룹은

100 ㎕ DPBS만 정맥 주사하였다). 7일째 되는 날부터 1주일에 2회 종양 크기 및 체중을 측정하여 기록하였다. 종양 크기가 2000 mm^3에 도달할 경우 안락사를 진행하였다.

[250] 도 10은 각 그룹의 시간에 따른 종양 크기 변화(도 10a), 마우스 생존 기간(도 10b) 및 마우스 체중 변화(도 10c)를 측정하여 나타낸 것이다. 도 10a 및 10b에서 보는 바와 같이, 본 발명의 융합 단백질은 항-PD-1 결합 항체 단독 또는 Fc-IL-2/IL-R2α 단독에 비해 현저히 우수한 종양 성장 억제 활성 및 마우스 생존 기간의 연장을 나타내었다. 본 발명의 융합 단백질은 98%에 이르는 높은 종양성장억제율(TGI)을 달성하였으며, 총 7마리의 마우스 중 6마리가 종양이 없는(tumor-free) 상태를 유지한 것으로 확인되었다. 한편 본 발명의 융합 단백질 투여로 인한 마우스의 체중 감소는 관찰되지 않았다(도 10c).

[251]

[252] **실시예 5.2 항-PD-1 및 Fc-IL2/IL2Rα 병용 투여 대비 항암 효능 시험**

[253] 본 발명의 융합 단백질이 그의 독특한 융합 구조로 인하여 개선된 항암 효능을 나타내는지를 상기 실시예 5.1에서 사용된 동일 마우스 종양 모델을 이용하여 평가하였다. 상기 실시예 5.1에 기재된 절차에 따라 실험을 실시하되, 총 21마리의 MC38 암 세포가 이식된 마우스를 확보하여 본 발명의 융합 단백질 A 처리 그룹, 융합 단백질 A와 동일한 항-PD-1 결합 도메인을 갖는 항체 및 heterodimeric Fc-IL2/IL2Rα를 병용 투여하는 병용 처리 그룹, 그리고 대조군으로서 PBS 처리 그룹의 3 그룹으로 나누어 수행하였다. 결과를 도 11에 나타내었다.

[254] 놀랍게도 본 발명의 융합 단백질은 동일한 항-PD-1 결합 도메인을 포함하는 항-PD-1 항체를 Fc-IL2/IL2Rα과 병용 투여한 그룹에 비해 월등히 우수한 종양 성장 억제 및 제거 효과를 발휘하며(도 11a), 마우스 생존 기간을 현저히 연장시키는 것으로 확인되었다(도 11b). 이러한 결과는 본 발명의 융합 단백질이 종양 내 PD-1을 발현하는 T_{eff} 세포에 IL-2를 효과적으로 전달하여 T_{eff} 세포의 증식 및 활성화를 유도할 수 있으며 그에 따라 우수한 항암 효능을 발휘함을 보여주는 것이다.

[255]

[256] **실시예 5.3 장기 기억 면역 반응 시험**

[257] 본 발명의 융합 단백질이 장기 기억 면역을 형성시켜 투여 중단 후에도 장기적인 효과를 나타낼 수 있는지를 확인하기 위하여 MC38 암 세포 이식(1차 이식) 후 본 발명의 융합 단백질 투여에 의해 종양이 없는 상태(tumor-free)가 된 C57BL/6 마우스를 확보하여 장기 기억 면역 반응 시험을 실시하였다. 이를 위하여, 실시예 5.1에 기재된 절차에 따르되, 융합 단백질 A 75~280 pmole을 주 1회(QW) 또는 주 2회(BIW)의 빈도로 총 1 내지 4회 투여한 후 1차 이식 후 60일째까지 종양이 없는 상태로 유지된 마우스(tumor-free mouse) 총 26마리를 실험에 사용하였다(75 pmole BIW 4회: 6마리, 140 pmole BIW 4회: 6마리, 150 pmole BIW 4회: 5마리, 280 pmole BIW 4회: 4마리, 150 pmole QW 1회: 2마리, 150 pmole QW 2회: 3마리).

[258] MC38 1차 이식 후 67일째 되는 날 상기 26 마리의 마우스를 두 군으로 나누어 1 x 10^6 개의 MC38 암세포(14 마리) 또는 B16F10 흑색종 세포(12마리)를 오른쪽 등 부분에 피하 주사로 이식하고(2차 이식, 2nd challenge) 종양 성장을 관찰하였다. 대조군으로서 MC38 1차 이식과 융합 단백질 투여를 진행하지 않은 마우스(na¡ve) 14 마리를 두 군으로 나누어 위와 동일한 방법으로 MC38 또는 B16F10 암세포를 이식하였다. 1차 이식 후 85일째 되는 날까지 종양 크기 변화를 관찰하였다. 실험 절차는 도 12에 요약되어 있다.

[259] MC38 1차 이식 및 융합 단백질 A 투여 후 MC38 암세포를 2차 이식한 마우스 14마리는 모두 관찰 종료시까지 종양이 없는 상태로 유지된 반면, 다른 군의 마우스에서는 종양 성장이 관찰되었다(도 13 및 14). 이 중 B16F10 흑색종 세포를 2차 이식한 마우스의 경우, 융합 단백질 A의 추가 투여가 없음에도 불구하고 na¡ve 마우스에 비하여 종양 성장이 억제되는 것이 관찰되었다(도 13). 이러한 결과는 본 발명의 융합 단백질이 종양 특이적 장기 면역 반응을 유도하여 투약 중단 후에도 장기간 동안 동일 암종에 대한 억제 효과(후천적 면역 반응)를 유지하며, 다른 암종에 대한 (종양 비특이적) 항암 효과(선천적 면역 반응)도 일부 유지함을 의미한다.

[260]

[261] **실시예 5.4 단회 투여에 의한 용량 의존적 항암 효과 평가**

[262] 본 발명의 융합 단백질의 항암 효과가 용량 의존적으로 변화하는 지 여부를 확인하기 위하여 MC38 대장암 syngeneic 마우스 종양 모델을 이용하여 실험하였다.

[263] 실시예 5.1에서와 동일한 방법으로 실험을 진행하되, 이식 후 7일째 되는 날 종양 크기 100 mm^3±30을 기준으로 하여 마우스를 총 7개 군으로 나누고(군당 5 또는 6마리) 각 군에 융합 단백질 A를 0(PBS), 50, 150, 300, 600, 1200, 및 3000 pmole의 용량으로 단회 투여하였다. 1주일에 2회 종양 크기 및 체중을 측정하여 기록하고 종양 크기가 2000 mm^3에 도달할 경우 안락사를 진행하였다. 실험 절차는 도 15에 요약되어 있다.

[264] 도 16a에서 보는 바와 같이, 본 발명의 융합 단백질 A는 0 내지 150 pmole 구간에서 용량에 비례하여 종양 억제 효능이 증가되었으며, 300 pmole 이상의 용량에서는 모든 용량에서 TGI가 99~100%가 되었다. 따라서 단회 투여시 MC38에 대한 항암 효과의 포화가 일어나는 용량은 150 내지 300 pmole인 것으로 판단된다. 체중 변화에 있어서는 3000 pmole에서 투여후 10일째에 체중이 감소하는 현상이 보였으나 다시 회복되었고 그 이외의 모든 용량에서는 체중 감소가 관찰되지 않았다(도 16b) (도면에서 * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$; PBS 대조군에 대비한 Tukey 사후검정을 이용한 다중 비교(각 그룹 대비), 이원 분산분석(two-way ANOVA)).

[265]

[266] **실시예 5.5 B16F10 흑색종 syngeneic 모델에서의 항암 효과 평가**

[267] 실시예 5.1에서와 동일한 방법으로 실험을 진행하되, MC38 암세포 대신 7.5x 10^5 B16F10 세포를 이식한 9주령 C57BL/6J 마우스에서 융합 단백질의 효능을 평가하였다.

[268] 이식한 지 7일째 되는 날 종양 크기가 평균 96 mm^3에 도달하였을 때 마우스를 세 그룹으로 나누고, 각 군에 PBS (10 마리), 융합 단백질 A 300 pmole (5 마리), 융합 단백질 A 600 pmole (5 마리)를 단회 투여하였다. 1주일에 2회 종양 크기 및 체중을 측정하여 기록하였다.

[269] 도 17은 각 그룹의 시간에 따른 종양 크기 변화(도 17a) 및 종양성장억제율(TGI %)(도 17b)을 나타낸 것이다. 도 17a 및 17b에서 보는 바와 같이, 융합 단백질 A 처리군은 PBS 처리 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 종양성장억제 효과를 나타내었다(투약 후 13일째 기준 PBS 처리군 대비 TGI 70.2% (300 pmole) 및 89.2% (600 pmole); 도면에서 * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$, Tukey 사후검정을 이용한 이원 분산분석).

[270]

[271] **실시예 5.6 Pan02 췌장암 syngeneic 모델에서의 항암 효과 평가**

[272] 실시예 5.1에서와 동일한 방법으로 실험을 진행하되, MC38 암세포 대신 3x 10^6 Pan02 암세포를 이식한 마우스에서 융합 단백질의 효능을 평가하였다.

[273] 이식한 지 7일째 되는 날 종양 크기가 평균 71 mm^3에 도달하였을 때 마우스를 본 발명의 융합 단백질 A 처리 그룹(5 마리)과 PBS 처리 그룹(5 마리)의 두 그룹으로 나누어 투여를 진행하였다. 융합 단백질 A를 100 $\mu\ell$ DPBS에 혼합하여 마우스당 75 pmole씩 1주일에 2회(BIW)의 빈도로 총 4회 마우스 꼬리 정맥에 주사하였다(PBS 처리 그룹은 100 $\mu\ell$ DPBS만 정맥 주사하였다). 이식한 지 7일째 되는 날부터 40일째 되는 날까지 1주일에 2회 종양 크기 및 체중을 측정하여 기록하였다.

[274] 도 18은 각 그룹의 시간에 따른 종양 크기 변화(도 18a), 마우스 생존 기간(도 18b) 및 마우스 체중 변화(도 18c)를 측정하여 나타낸 것이다. 융합 단백질 A는 3회차 투여시부터 시작하여 관찰 종료일까지 5 마리의 마우스 모두 종양이 없는 상태(tumor-free)로 유지되는 우수한 항-종양 활성을 나타내었으며(도 18a; TGI 100%, 투약후 17일차 *** $p<0.001$, 투약후 21~28일차 **** $p<0.0001$; PBS 대조군에 대비한 Tukey 사후검정을 이용한 이원 분산분석), 관찰 종료일까지 모든 마우스가 생존하였다(도 18b). 체중 변화에 있어서는 융합 단백질 A의 투여 1회차에 체중 감소가 일시적으로 관찰되었으나 그 이후 다시 회복되어 더 이상의 체중 감소는 관찰되지 않았다(도 18c).

[275]

[276] **실시예 5.7 항-PD-1 Fab arm의 개수에 따른 항암 효과의 비교 평가**

[277] 본 발명의 융합 단백질이 항-PD-1 Fab arm의 개수에 따라 항암 효과가 어떻게 변화하는 지를 확인하기 위하여 MC38 대장암 syngeneic 마우스 종양 모델을 이용하여 실험하였다. 실시예 5.1과 동일한 방법으로 실험하되, MC38 암세포를 이식한 지 7일째 되는 날 융합 단백질 A(2개의 PD-1 Fab arm)와 융합 단백질 B(1개의 PD-1 Fab arm)를 450 pmole의 용량으로 1회 투여하고(군당 5마리씩), 대조군으로서 7 마리의 마우스에 PBS를 투여하였다.

[278] 투약 후 17일째 되는 날까지 주 2회 종양 크기와 체중을 측정하여 기록하였다. 도 19는 각 그룹의 시간에 따른 종양 크기 변화(도 19a) 및 종양성장억제율(TGI %)(도 19b)을 나타낸 것이다. 도 19a 및 19b에서 보는 바와 같이, 융합 단백질 A 처리군과 융합 단백질 B 처리군은 PBS 처리 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 종양성장억제 효과를 나타내었다(투약 후 17일째 기준 PBS 처리군 대비 TGI 100% (융합 단백질 A) 및 76% (융합 단백질 B); 도면에서 * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$, Dunnett 사후 검정을 이용한 이원 분산분석).

[279]

[280] **실시예 6. pH에 따른 항원 결합력 비교 평가**

[281] 혈액(대략 pH 7.4)과 종양미세환경(tumor microenvironment)(대략 pH 5.6~6.8)은 pH 차이가 있다고 알려져 있다. 따라서 종양미세환경의 약산성 pH에서의 항체 결합력이 면역항암 항체의 치료적 효능에 중요한 영향을 미친다. 본 발명자들의 이전 연구에서, 본 발명의 융합 단백질에 항-PD-1 결합 도메인으로 사용된 1G1-h70은 종양미세환경의 낮은 pH(6.0)에서 대표적인 항-PD-1 항체 의약품인 키트루다 및 옵디보에 비하여 인간 PD-1에 대해 훨씬 강한 결합 친화도를 나타내는 것으로 확인된 바 있다(PCT/KR2022/001714). 따라서 본 발명의 융합 단백질 A가 종양미세환경 내에서 우수한 결합 친화도를 유지하는 지를 확인하기 위하여 SPR(Biacore 8K, Cytiva) 분석을 통해 인간 PD-1에 대한 결합 동역학(Kinetics)을 측정하였다. 비교를 위한 대조군으로는 항 인간 PD-1 항체 키트루다(Keytruda, MSD)와 옵디보(Opdivo, BMS)를 인체용 의약품으로 신원약품에서 구입하여 사용하였다.

[282] CM5 칩(Cytiva)에 1 μg/ml 농도의 인간 PD-1 (Acrobiosystems, Cat#PD1-H5221)을 제조사의 지침에 따라 아민 커플링 키트(Cytiva)를 사용하여 고정시켰다. 7개 농도(0-100 nM)의 대조군 항체(키트루다, 옵디보)와 1G1-h70 및 융합 단백질 A를 유속 30 μL/분으로 180초 동안 회합(association)하고 1200초 동안 해리(dissociation)하여 CM5 칩으로 흘려주었다. 각 농도 사이클마다 각각의 실험 후 pH 1.5의 글리신(glycine)으로 칩을 재생성하였다. 이때 러닝 버퍼는 pH 7.4 또는 pH 6.0의 HBS-EP+ 버퍼(0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl, 0.03 M EDTA and 0.5% v/v Surfactant P20)를 사용하였으며, 실험 단백질들은 러닝 버퍼에서 희석되었다.

[283] Biacore 평가 소프트웨어 버전 3.0에서 1:1 결합 모델을 이용하여 분석을 수행하였고, 그 결과의 동역학 상수(ka 및 kd) 및 친화도(KD) 값을 하기 표 3에 기재하였다.

[284] [표3]

	pH 7.4			pH 6.0		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Keytruda	7.43E+5	3.61E-4	4.86E-10	1.04E+6	7.75E-4	7.42E-10
Opdivo	5.63E+5	3.65E-4	6.48E-10	6.60E+5	5.12E-4	7.75E-10
1G1-h70	1.48E+5	3.51E-5	2.37E-10	2.86E+5	1.38E-5	**4.81E-11**
융합 단백질 A	1.37E+5	7.27E-5	5.30E-10	4.86E+5	2.31E-5	**4.76E-11**

[285]

[286] 표 3에서 보는 바와 같이, 본 발명의 융합 단백질 A 및 1G1-h70 항체는 pH 7.4(혈액)에서 키트루다 및 옵디보와 유사한 수준의 결합 친화도(KD)를 나타내나, pH 6.0(종양미세환경)에서는 키트루다 및 옵디보에 비하여 약 15 내지 16배 더 강한 결합 친화도를 나타냈다. 따라서, 본 발명의 융합 단백질이 항-PD-1 항체 1G1-h70이 갖는 종양 미세환경의 낮은 pH에서의 우수한 결합 친화도를 유지하는 것이 확인되었다.

[287]

[288] **실시예 7. PD-1 매개된 IL-2 신호전달 확인 분석**

[289] 본 발명의 융합 단백질이 PD-1 매개된 IL-2 신호전달을 나타내는지를 검증하기 위해 항-PD-1 항체로의 사전 처리 유무에 따른 IL-2 신호전달 활성을 HEK-Blue™ reporter assay system (InvivoGen)을 이용하여 분석하였다.

[290] IL-2Rβγ를 발현하는 HEK-Blue™ CD122/CD132 세포(InvivoGen)에 pCMV3-hPD1 벡터 또는 pCMV3-Empty 벡터(대조군)를 트랜스펙션시켰다. 상기 트랜스펙션된 세포들을 96 well 플레이트에 대략 50,000 세포/well의 농도로 분주하고 37℃, 5% CO_2 챔버에서 배양하였다. 그 다음 세포 배양 상등액을 제거한 후, 1 μM의 항-PD-1 항체(상기 실시예 6에서 사용된 1G1-h70 항체) 또는 대조군 동형 (인간 IgG4) 항체를 각 웰당 20 μL씩 추가하고 40분간 인큐베이션하였다. 이후, 1 nM 농도의 재조합 인간 IL-2(rhIL-2) 또는 융합 단백질 A를 처리하고 37℃에서 8시간 배양하였다. 새로운 96 well 플레이트에 상기 세포 배양 상등액 20 ㎕/well을 첨가한 후, 비색계 분석법 시약인 QUANTI-Blue™ 용액(InvivoGen) 180 ㎕/well로 처리하고 37℃ 인큐베이터에서 약 1 시간 이상 동안 차광하에 인큐베이션시켰다. 반응 시작한 후 30분 간격으로 Microplate reader를 이용하여 620 nm에서 OD를 측정하였다. 결과를 도 20에 도시하였다.

[291] 도 20에서 보는 바와 같이, 본 발명의 융합 단백질은 PD-1을 발현하지 않는 세포($PD\text{-}1^{-}CD122^{+}CD132^{+}$ 세포)에서는 IL-2 보다 더 약한 신호전달 반응성을 나타낸 반면(attenuated IL-2Rβγ 결합 특성), PD-1을 발현하는 세포($PD\text{-}1^{+}CD122^{+}CD132^{+}$ 세포)에서는 IL-2에 비해 월등히 뛰어난 반응성을 나타내는 것으로부터,

본 발명의 융합 단백질이 PD-1 발현 세포에 특이적이고 선택적으로 작용하는 것을 알 수 있다. 또한, 본 발명의 융합 단백질을 처리하기 이전에 항-PD-1 항체로 사전 처리하여 세포의 PD-1을 사전 블로킹한 경우에는 본 발명의 융합 단백질의 IL-2 반응성이 완전히 중화되는 것이 확인되었다. 이는 본 발명의 융합 단백질이 나타내는 IL-2 신호전달은 PD-1에 의해 매개되는 것임을 시사한다.

[292]

[293] 이상으로 본 발명의 명확한 이해를 위하여 예시적인 특정 실시양태를 상세히 기술하였지만, 상기 설명 및 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 본 발명의 권리범위는 첨부된 청구범위와 그의 등가물에 의하여 정의된다. 본원에 인용된 모든 특허 및 과학 문헌의 개시내용은 명백히 전체로 참고로 인용된다.

[294]

[295] 서열 리스트

[296] [표4]

서열 번호	설명	서열
1	Human IL-2 (UniProt P 60568 position 21-153)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKL TRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLN LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
2	Human IL-2 (C125S)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKL TRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLN LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
3	Human IL-2 Rα (UniProt P01589 position 22-272)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFR RIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTT KQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCR EPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALH RGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPG EEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATME TSIFTTEYQVAVAGCVFLLISVLLLSGLTWQRRQRK SRRTI
4	Human IL-2Rα extracellular domain (UniP	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFR RIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTT KQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCR EPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALH

	rot P01589 position 22-240)	RGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ
5	Human IL-2 Rα mutant (UniProt P01589 position 22-186, L42I)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGS**I**YMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTG
6	Human IL-15(UniProt P40933 position 49-162)	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
7	Human IL-15Rα(UniProt Q13261 position 31-267)	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL
8	Human IL-15Rα extracellular domain (UniProt Q13261 position 31-205)	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTT
9	HCDR1 amino acids	GYWMH
10	HCDR2 amino acids	MIHPNSDTTTYNEKFKN
11	HCDR2 amino acids	MIHPNSDTTVYNEKFKN
12	HCDR2 amino acids	MIHPNSDTTIYNEKFKN
13	HCDR2 amino acids	MIHPNSDTTTYNWKFKN

14	HCDR2 a mino acids	MIHPNSDTTVYNWKFKN
15	HCDR2 a mino acids	MIHPNSDTTIYNWKFKN
16	HCDR3 a mino acids	TDQAAWFAF
17	HCDR3 a mino acids	TDQEAWFAF
18	HCDR3 a mino acids	TDQAAWAAF
19	HCDR3 a mino acids	TDQAAWMAF
20	HCDR3 a mino acids	TDQAAWHAF
21	HCDR3 a mino acids	TDQAAWFGF
22	HCDR3 a mino acids	TDQEAWAAF
23	HCDR3 a mino acids	TDQEAWMAF
24	HCDR3 a mino acids	TDQEAWHAF
25	HCDR3 a mino acids	TDQEAWFGF
26	HCDR3 a mino acids	TDQAAWAGF
27	HCDR3 a mino acids	TDQAAWMGF
28	HCDR3 a mino acids	TDQAAWHGF
29	HCDR3 a mino acids	TDQEAWAGF

30	HCDR3 a mino acids	TDQEAWMGF
31	HCDR3 a mino acids	TDQEAWHGF
32	LCDR1 a mino acids	RSSQNIVHSNGDTYLE
33	LCDR1 a mino acids	RSSQNIVHSQGDTYLE
34	LCDR1 a mino acids	RSSQNIVRSNGDTYLE
35	LCDR1 a mino acids	RSSQNIVRSQGDTYLE
36	LCDR2 a mino acids	KVSKRFS
37	LCDR3 a mino acids	FQGSHVPWT
38	HCVR am ino acids	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTGYWM H WVKQRPGQGLEWIGMIHPNSDTTTYNEKFKNRA TLTVDKSSGTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTGTDQAA WFAFWGQGTLVTVSA
39	LCVR am ino acids	DIVLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIVHSNGDTY LEWYLQKPGQSPKLLIYKVSKRFSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPWTFGGGTK LEIK
40	Humanized ant ibody, 1G1-h61 VH amino acids	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM HWVRQAPGQGLEWMGMIHPNSDTTTYNEKFKNR VTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGTDQA AWFAFWGQGTTVTVSS
41	Humanized ant ibody, 1G1-h61 VL amino acids	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQNIVHSNGDTY LEWYLQKPGQSPKLLIYKVSKRFSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGGTK VEIK

42	Humanized antibody, 1G1-h68 VH amino acids	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLEWIGMIHPNSDTTTYNEKFKNRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCTGTDQAAWFAFWGQGTTVTVSS
43	Humanized antibody, 1G1-h68 VL amino acids	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQNIVHSNGDTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKVEIK
44	Humanized antibody, 1G1-h70 VH amino acids	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLEWIGMIHPNSDTTTYNEKFKNRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAAWFAFWGQGTTVTVSS
45	Humanized antibody, 1G1-h70 VL amino acids	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQNIVHSQGDTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKVEIK
46	Human IgG4 (S228P) constant region, heavy chain amino acids	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
47	Human IgG4 constant region, kappa chain amino acids	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
48	Human PD-1 protein, full amino acids	*MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGW*FLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKE

		DPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTE YATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGH CSWPL (이텔릭체 부분은 신호서열을 나타낸다. 밑줄 부분은 세포외 도메인 부분을 나타낸다.)
49	Fc mutant c hain 1 IgG 4 216~447 S228P/Q34 7R/ T366W	ESKYGPPCP**P**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP**R**VYTLPPSQEEMTK NQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
50	Fc mutant c hain 2 IgG 4 216~447 S228P/ K360 E/ T366S/ L3 68A/ Y407V	ESKYGPPCP**P**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT**E** NQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFL**V**SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
51	Humanized an ti-PD-1, VL-C L amino acids	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQNIVHSQGDTY LEWYLQKPGQSPQLLIYKVSKRFSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC(밑줄 부분은 가변영역을 나타낸다.)
52	Humanized an ti-PD-1, VH-C H1 amino acids	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM HWVRQAPGQGLEWIGMIHPNSDTTTYNEKFKNRV TMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAA WFAFWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRV(밑줄 부분은 가변영역을 나타낸다.)
53	Forward primer	CCCTCTCCCCCGGCAAGTCAGGAGGTGGATCTGG TGGAG

54	Reverse Primer	GCCCGAATTCGGCGGCCGCTTTATCAGGTCAGCG TAGAGATG
55	Forward primer	*Tctccctgtctccgggtaaaggaggtggaggttctggtggaggtggatctggtg gaggaggttctggtggaggtggatctGAGCTGTGTGATGATGAT C*
56	Reverse Primer	gtcattggggaaacctgctcctaggTTTAGCCGGTACAGATCA G
57	Humanized anti-PD-1, IgG 4 heavy chain 1, knob Fc with IL-2 C125S	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM HWVRQAPGQGLEWIGMIHPNSDTTTYNEKFKNRV TMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAA WFAFWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRV*ESKYGPPCPPCP*APEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP**R**VYTLPPS QEEMTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*SGGGSGGGSGG GSGG***APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKG SETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF *S* QSIISTLT
58	Humanized anti-PD-1, IgG 4 Heavy chain 2, hole Fc with CD25 L42I	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM HWVRQAPGQGLEWIGMIHPNSDTTTYNEKFKNRV TMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAA WFAFWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRV*ESKYGPPCPPCP*APEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMT**E**NQVSL**SCA**VKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SRLTVDKSRWQEGNVFS

		CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSG GGGSGGGGS***ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGT MLNCECKRGFRRIKSGS *I* YMLCTGNSSHSSWDN QCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVV GQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKT RWTQPQLICTG
59	Fc_Knob_wit h_IL-2C125S	*KYGPPCPPCP*APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREP**R**VYTLPPSQEEMTKN QVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK*SGGGSGGGSGGGSGG***APTS SSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLN LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITF *S* QSIISTLT
60	Humanized an ti-PD-1, IgG4 heavy chain 1, knob Fc witho ut IL-2 C125S	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM HWVRQAPGQGLEWIGMIHPNSDTTTYNEKFKNRV TMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAA WFAFWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRV*ESKYGPPCPPCP*APEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP**R**VYTLPPS QEEMTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
61	Humanized an ti-PD-1, IgG4 heavy chain w ith CD25 L42I	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM HWVRQAPGQGLEWIGMIHPNSDTTTYNEKFKNRV TMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAA WFAFWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT

		KVDKRV*ESKYGPPCPPCP*APEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSG GGGSGGGGS***ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGT MLNCECKRGFRRIKSGS *I* YMLCTGNSSHSSWDN QCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVV GQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKT RWTQPQLICTG

청구범위

[청구항 1] 하나 이상의 면역세포 항원 결합 도메인, 2개의 Fc 사슬로 이루어진 Fc 도메인, 및 사이토카인 작용 도메인을 포함하고, 상기 사이토카인 작용 도메인은 인터류킨-2 수용체의 α-서브유니트(IL-2Rα) 폴리펩티드 또는 인터류킨-15 수용체의 α-서브유니트(IL-15Rα) 폴리펩티드를 포함하는 것인 융합 단백질.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 사이토카인 작용 도메인이 IL-2Rα 폴리펩티드 및 IL-2 폴리펩티드를 포함하고, 상기 IL-2Rα 폴리펩티드 및 IL-2 폴리펩티드는 서로 간에 공유결합되어 있지 않으며 각각 상기 Fc 도메인의 서로 다른 Fc 사슬에 연결되어 있는 것인 융합 단백질.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 사이토카인 작용 도메인이 IL-2Rα 폴리펩티드 및 IL-2 폴리펩티드를 포함하는 복합체이고, 상기 복합체 내 IL-2Rα 폴리펩티드 및 IL-2 폴리펩티드는 서로 공유결합되어 있으며, 상기 복합체는 IL-2Rα 폴리펩티드 또는 IL-2 폴리펩티드를 통해 상기 Fc 도메인의 어느 한쪽 Fc 사슬에 연결되어 있는 것인 융합 단백질.

[청구항 4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2Rα 폴리펩티드가 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 IL-2Rα 폴리펩티드 또는 그의 IL-2 결합 단편, 세포외(extracellular) 도메인 또는 스시(Sushi) 도메인이고, 결합 리간드 IL-2 폴리펩티드에 대한 결합을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 변형을 포함할 수 있는 것인 융합 단백질.

[청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 IL-2Rα 폴리펩티드가 서열번호 3의 아미노산 서열 번호를 기준으로 L2D, L2E, L2Q, M25L, M25I, N27A, N27T, N27I, N27Y, S39K, L42F, L42I, L42A, L42V, L45R, N57E, I118R, H120A, H120D, H120K, H120Y, H120L, H120W, H120R 및 K153G 중 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 융합 단백질.

[청구항 6] 제4항에 있어서, 상기 IL-2Rα 폴리펩티드가 서열번호 3의 아미노산 서열 번호를 기준으로 L42I의 아미노산 치환을 포함하거나 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 것인 융합 단백질.

[청구항 7] 제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 IL-2 폴리펩티드가 서열번호 1의 아미노산 서열 번호를 기준으로 C125S의 아미노산 치환 또는 IL-2Rα 폴리펩티드에 대한 결합을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하거나 또는 순환 치환된(circular permutated) 것인 융합 단백질.

[청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 IL-2 폴리펩티드가 서열번호 1의 아미노산 서열 번호를 기준으로 T37K의 아미노산 치환을 포함하는 것인 융합 단백질.

[청구항 9] 제1항에 있어서, 사이토카인 작용 도메인이 IL-15Rα 폴리펩티드 및 IL-15 폴리펩티드를 포함하고, 상기 IL-15Rα 폴리펩티드 및 IL-15 폴리펩티드는

각각 상기 Fc 도메인의 서로 다른 Fc 사슬에 연결되어 있는 것인 융합 단백질.

[청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 사이토카인 작용 도메인이 IL-15Rα 폴리펩티드 및 IL-15 폴리펩티드를 포함하는 복합체이고, 상기 복합체 내 IL-15Rα 폴리펩티드 및 IL-15 폴리펩티드는 서로 공유결합되어 있으며, 상기 복합체는 IL-15Rα 폴리펩티드 또는 IL-15 폴리펩티드를 통해 상기 Fc 도메인의 어느 한쪽 Fc 사슬에 연결되어 있는 것인 융합 단백질.

[청구항 11] 제1항, 제9항 및 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-15Rα 폴리펩티드가 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 IL-15Rα 폴리펩티드 또는 그의 IL-15 결합 단편, 세포외(extracellular) 도메인 또는 스시(Sushi) 도메인이고, 결합 리간드 IL-15 폴리펩티드에 대한 결합을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 변형을 포함할 수 있는 것인 융합 단백질.

[청구항 12] 제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 IL-15 폴리펩티드가 IL-15Rα 폴리펩티드에 대한 결합을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하거나 또는 순환 치환된(circular permutated) 것인 융합 단백질.

[청구항 13] 제1항에 있어서, 상기 면역세포 항원 결합 도메인이 하나 이상의 T 세포 표적 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 Fab 분자 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 것인 융합 단백질.

[청구항 14] 제13항에 있어서, 하나 이상의 종양 세포 표적 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 Fab 분자 또는 그의 항원 결합 단편을 추가로 포함하는 것인 융합 단백질.

[청구항 15] 제13항에 있어서, 상기 면역세포 항원 결합 도메인이 PD-1(프로그램된 세포사멸-1) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 Fab 분자 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 것인 융합 단백질.

[청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 면역세포 항원 결합 도메인이 펨브롤리주맙(pembrolizumab) 또는 니볼루맙(nivolumab) 항체의 Fab 분자 또는 그의 항원 결합 단편이거나, 또는 이들 항체 또는 항원 결합 단편과 동일한 에피토프에 결합하거나 또는 이들 항체 또는 항원 결합 단편과 경쟁하는 항체의 Fab 분자 또는 그의 항원 결합 단편인 융합 단백질.

[청구항 17] 제15항에 있어서, 상기 면역세포 항원 결합 도메인이,
서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1),
서열번호 10 내지 15로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2,
서열번호 16 내지 31로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3,
서열번호 32 내지 35로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1),

서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및
서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3
을 포함하는 항-PD-1 항체의 Fab 분자 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 것인 융합 단백질.

[청구항 18] 제15항에 있어서, 상기 면역세포 항원 결합 도메인이 서열번호 38, 40, 42 또는 44의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역의 상보성 결정영역(CDR) 1, CDR2 및 CDR3, 및 서열번호 39, 41, 43 또는 45의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 항-PD-1 항체의 Fab 분자 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 것인 융합 단백질.

[청구항 19] 제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 면역세포 항원 결합 도메인이 서열번호 38, 40, 42 또는 44의 아미노산 서열과 서열 동일성이 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 39, 41, 43 또는 45의 아미노산 서열과 서열 동일성이 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상인 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-PD-1 항체의 Fab 분자 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 것인 융합 단백질.

[청구항 20] 제1항에 있어서, 상기 Fc 도메인이 IgG 부류 Fc 도메인 또는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 하위부류 Fc 도메인이고, IgG4 Fc 도메인인 경우 S228P의 아미노산 치환(Kabat 문헌의 EU 넘버링 시스템 기준)을 포함할 수 있는 것인 융합 단백질.

[청구항 21] 제1항에 있어서, 상기 Fc 도메인이 Fc 수용체에 대한 결합 또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하거나 또는 CH2 도메인이 결여된 것인 융합 단백질.

[청구항 22] 제21항에 있어서, 상기 Fc 도메인이 E233, L234, L235, G236, G237, N297, L328, P329 및 P331 중에서 선택된 하나 이상의 위치(Kabat 문헌의 EU 넘버링 시스템 기준)에서의 아미노산 변형을 포함하는 것인 융합 단백질.

[청구항 23] 제1항에 있어서, 상기 Fc 도메인이 2개의 Fc 사슬 간의 이종이량체 형성을 촉진하는 변형을 포함하는 것인 융합 단백질.

[청구항 24] 제23항에 있어서, 상기 변형이 Fc 도메인의 어느 한 Fc 사슬에서 놉(knob) 변형을 포함하고 다른 한 Fc 사슬에서 홀(hole) 변형을 포함하는 놉-인투-홀(knob-into-hole) 변형인 융합 단백질.

[청구항 25] 제24항에 있어서, 상기 놉 변형이 카밧(Kabat)의 EU 넘버링 시스템 기준으로 T366W의 아미노산 치환을 포함하고, 상기 홀 변형이 T366S, L368A 및 Y407V의 아미노산 치환을 포함하는 것인 융합 단백질.

[청구항 26] 제25항에 있어서, 상기 Fc 도메인의 놉 사슬이 S354C의 아미노산 치환을 더 포함하고, 홀 사슬이 Y349C의 아미노산 치환을 더 포함하는 것인 융합 단백질.

[청구항 27] 제24항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 Fc 도메인의 어느 한 Fc 사슬이 K360E의 아미노산 치환을 더 포함하고, 다른 한 Fc 사슬이 Q347R의 아미노산 치환을 더 포함하거나, 또는
상기 Fc 도메인의 어느 한 Fc 사슬이 K360E 및 Q347E의 아미노산 치환을 더 포함하고, 다른 한 Fc 사슬이 Q347R의 아미노산 치환 또는 K360R 및 Q347R의 아미노산 치환을 더 포함하는 것인 융합 단백질.

[청구항 28] 제1항에 있어서, 상기 사이토카인 작용 도메인이 링커를 통해 Fc 도메인에 결합되어 있는 것인 융합 단백질.

[청구항 29] 제28항에 있어서, 상기 링커가 펩타이드 링커인 융합 단백질.

[청구항 30] 제29항에 있어서, 상기 링커가 일반식 (GX)n, (GGGX)n, (XGGG)nXGG 또는 (GGGGX)n의 펩타이드이고, 여기서 X는 A 또는 S이며, n은 1 내지 4의 자연수인 융합 단백질.

[청구항 31] 제13항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단편이 scFv, $(scFv)_2$, Bis-scFv, dsFv, $(dsFv)_2$, Fv, dsFv-dsFv', 디아바디(diabody), ds-디아바디, 트리아바디(triabody), 테트라바디(tetrabody), 나노바디, 도메인 항체, 단일 도메인 항체(sdAb) 또는 2가 도메인 항체인 융합 단백질.

[청구항 32] 제1항 내지 제3항, 제9항 및 제10항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

[청구항 33] 제32항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

[청구항 34] 제32항의 폴리뉴클레오티드 또는 이를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

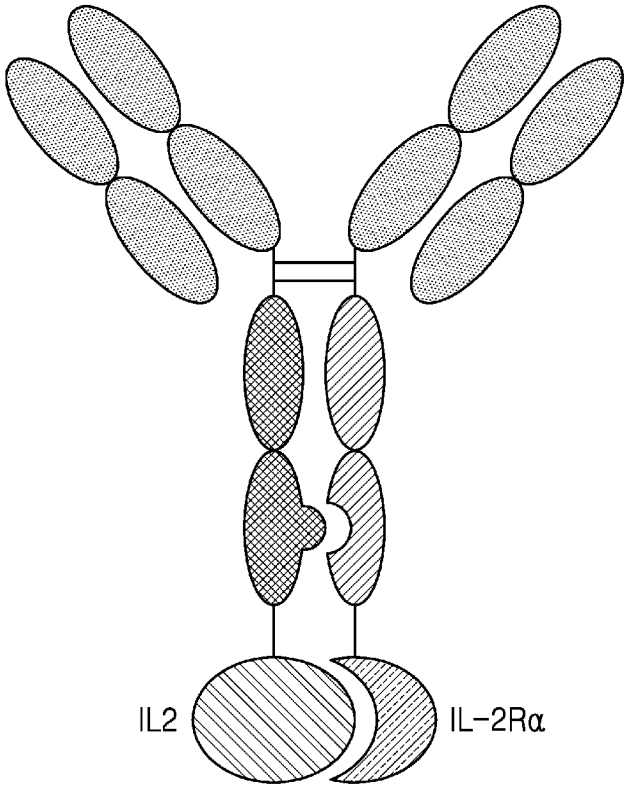
[청구항 35] 제1항 내지 제3항, 제9항 및 제10항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제3항, 제9항 및 제10항 중 어느 한 항의 융합 단백질의 생산 방법.

[청구항 36] 제35항에 있어서, 상기 발현 벡터가,
서열번호 51의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 서열번호 57의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 발현 벡터, 및
서열번호 51의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 서열번호 58의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 발현 벡터를 포함하는 것인 융합 단백질의 생산 방법.

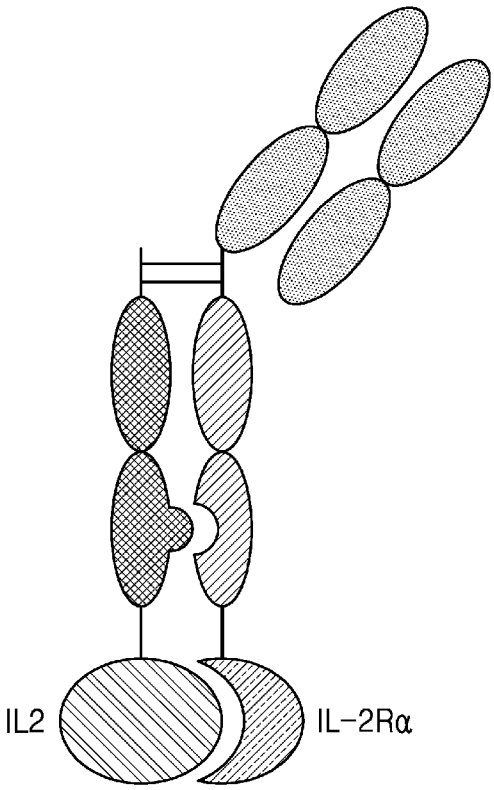
[청구항 37] 제36항에 있어서, 상기 제1 발현 벡터 및 제2 발현 벡터를 숙주 세포에서 동시에 발현시켜 융합 단백질을 수득하는 것인 융합 단백질의 생산 방법.

[청구항 38] 제1항 내지 제3항, 제9항 및 제10항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는, 종양, 암, 전이성 종양, 전이성 암 또는 감염성 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

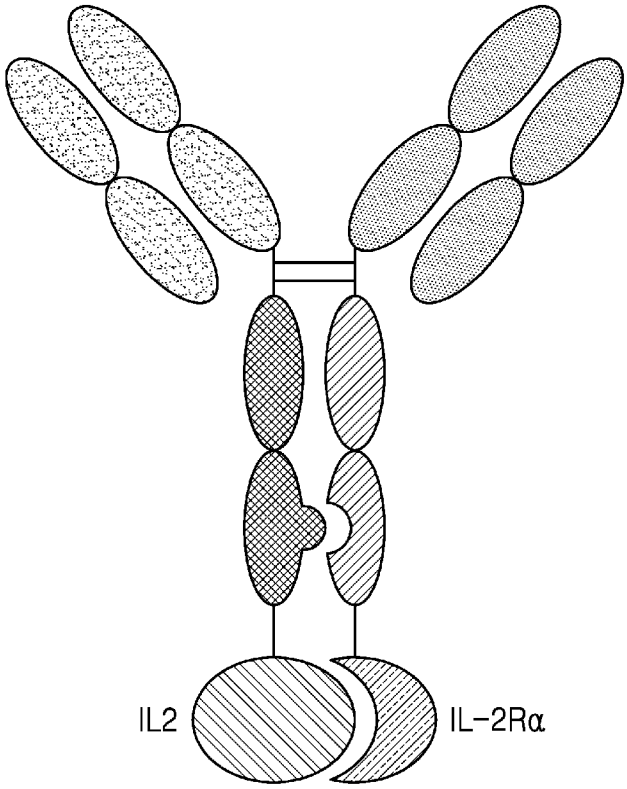
[도1a]



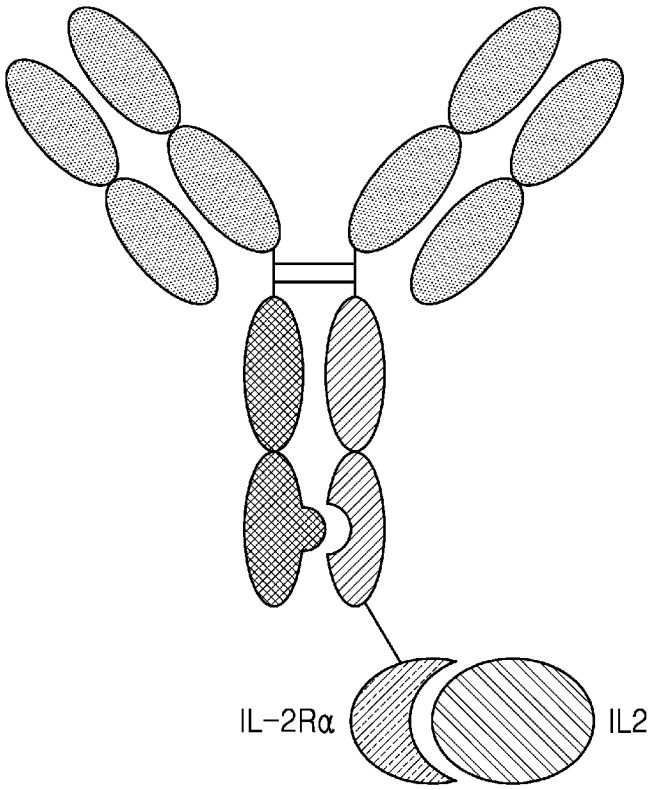
[도1b]



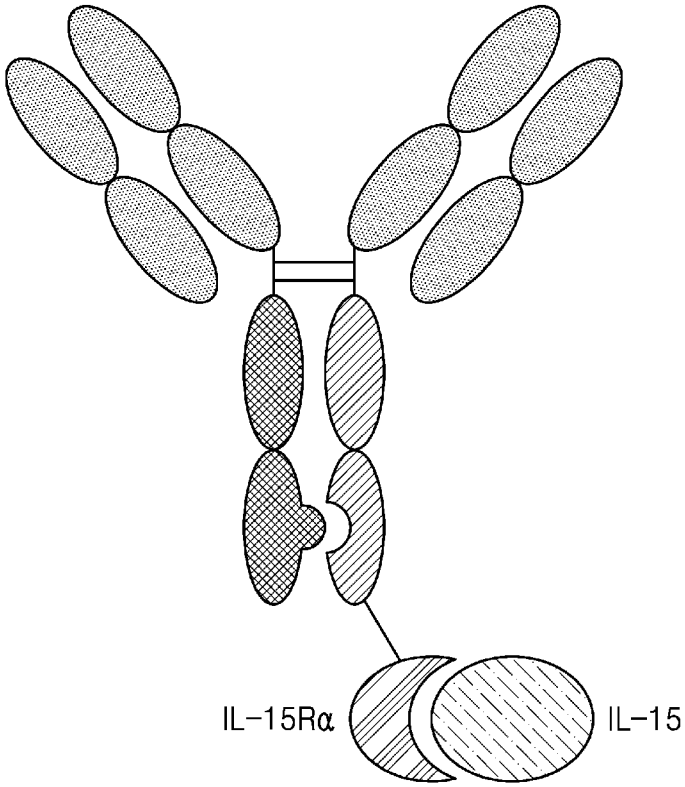
[도1c]



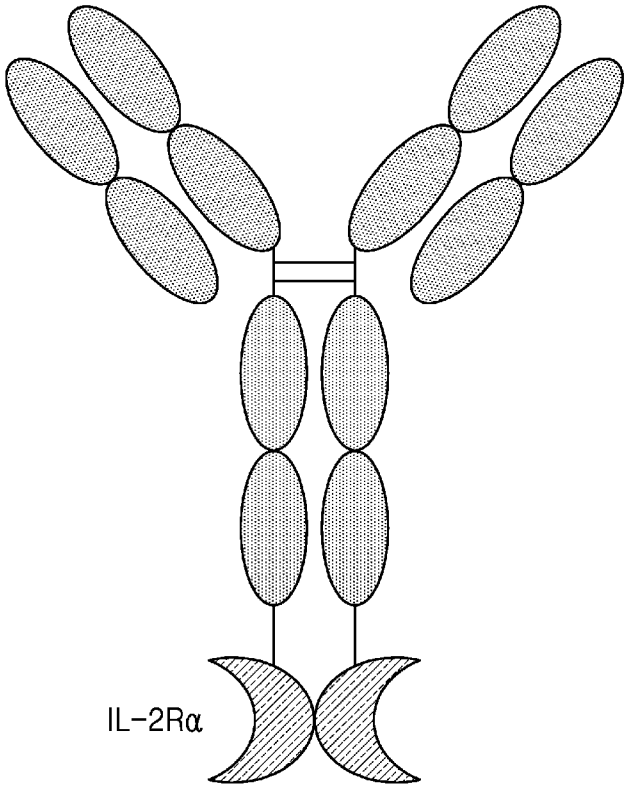
[도2a]



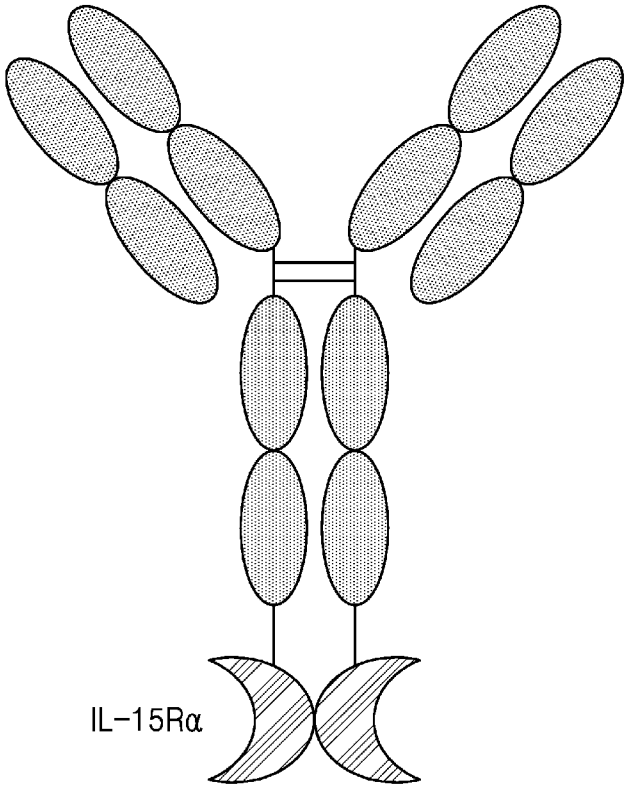
[도2b]



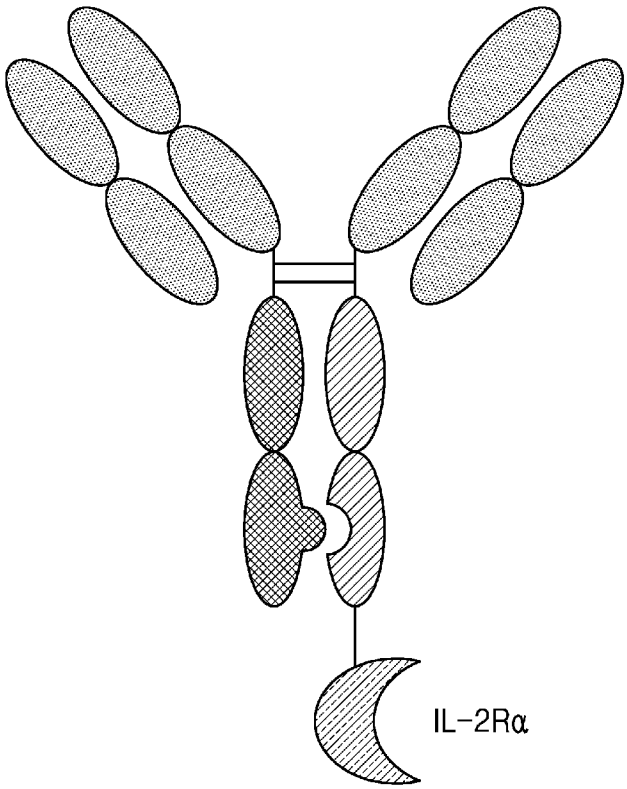
[도3a]



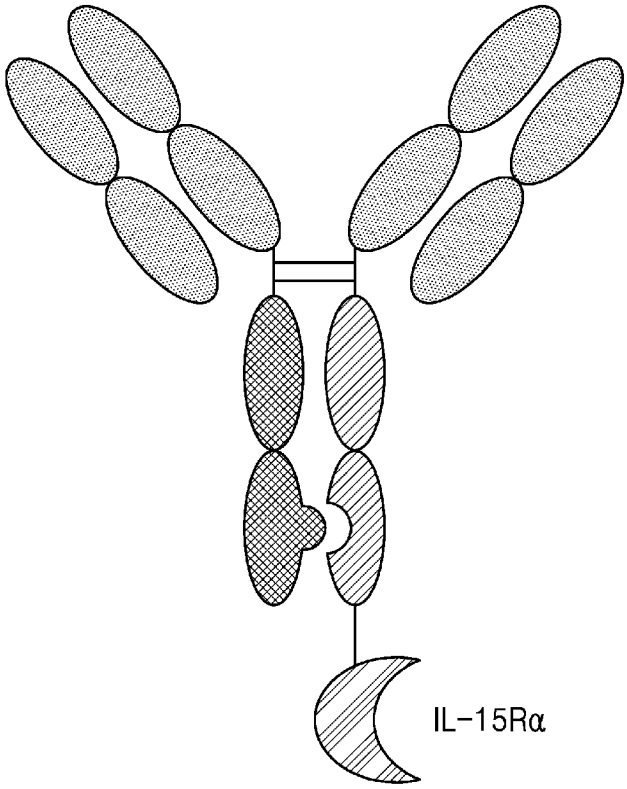
[도3b]



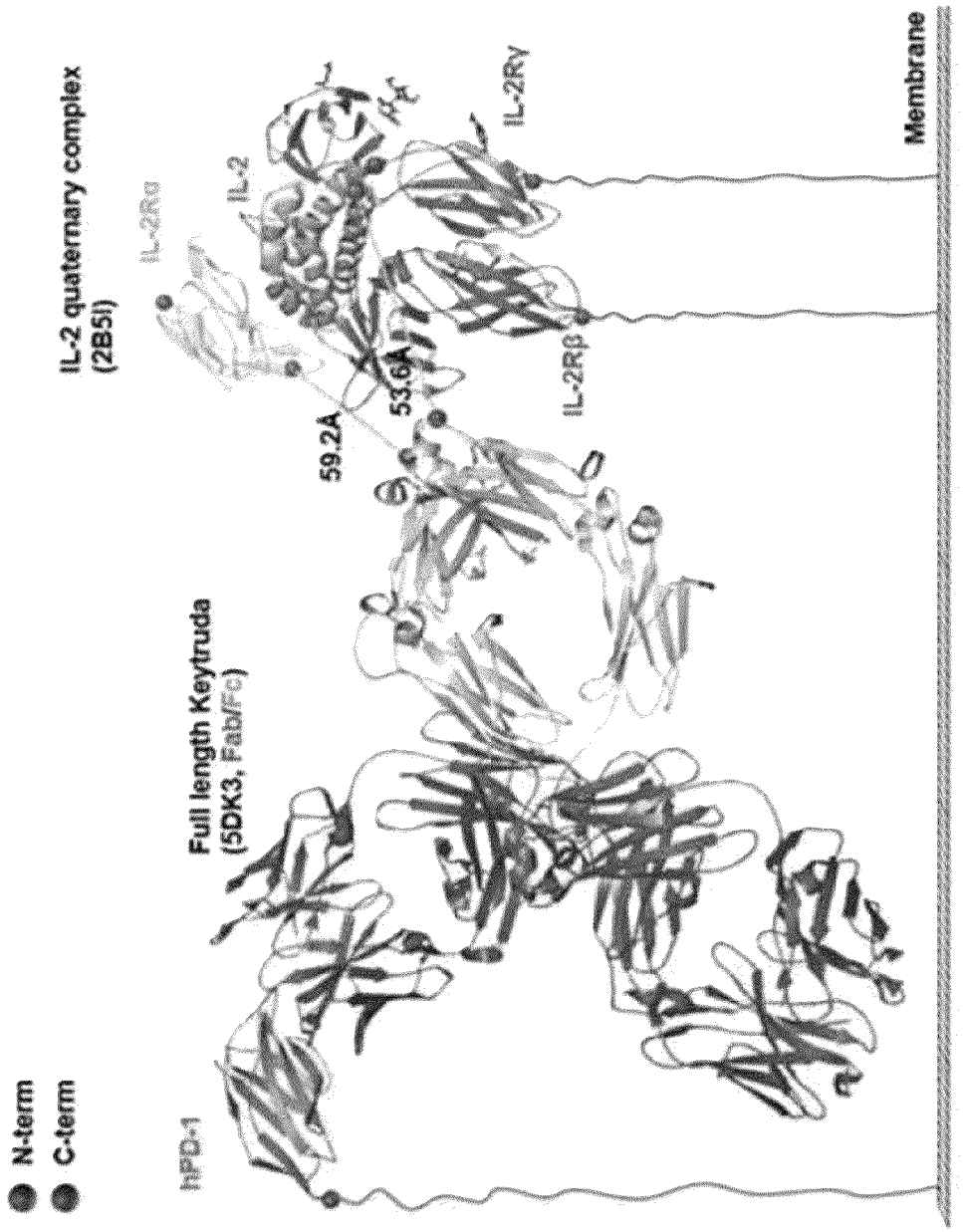
[도3c]



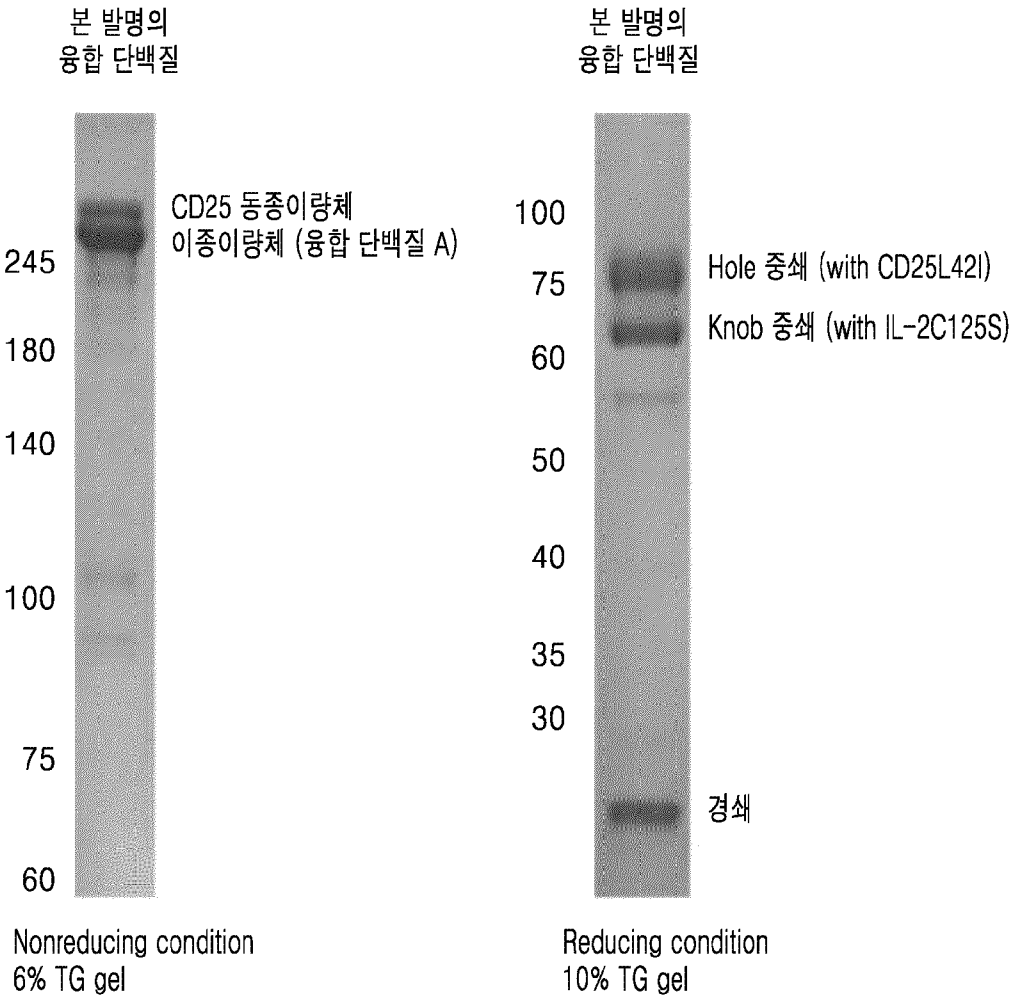
[도3d]



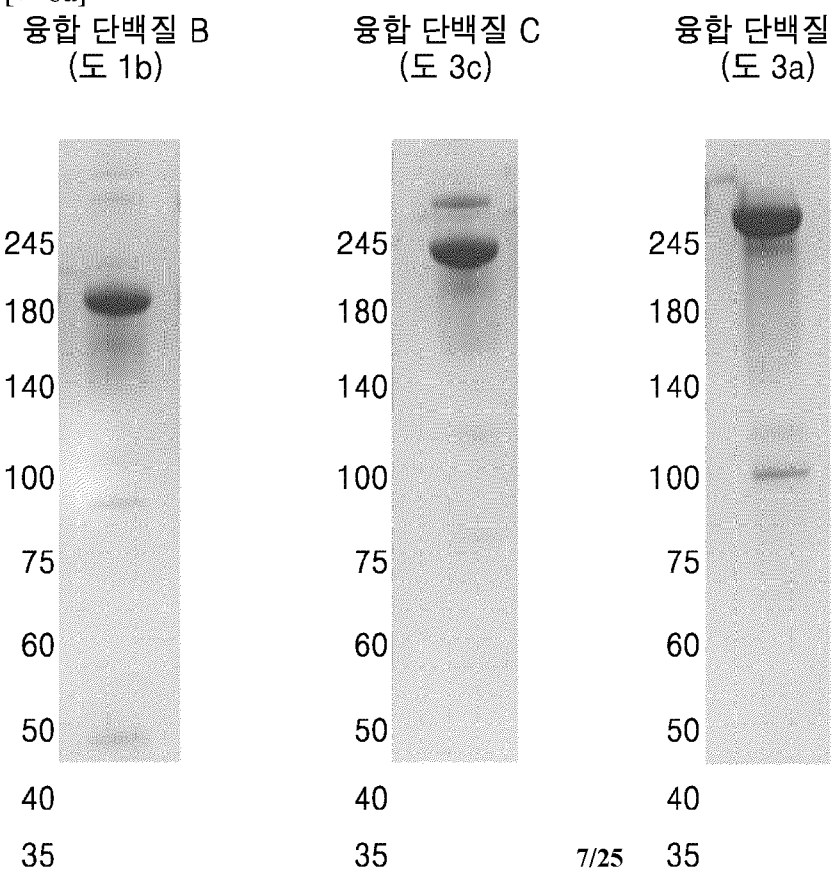
[도4]


IL-2 quaternary complex
(2B5I)
IL-2Rα
IL-2
IL-2Rγ
Membrane
59.2Å
53.6Å
IL-2Rβ
Full length Keytruda
(5DK3, Fab/Fc)
hPD-1
N-term
C-term

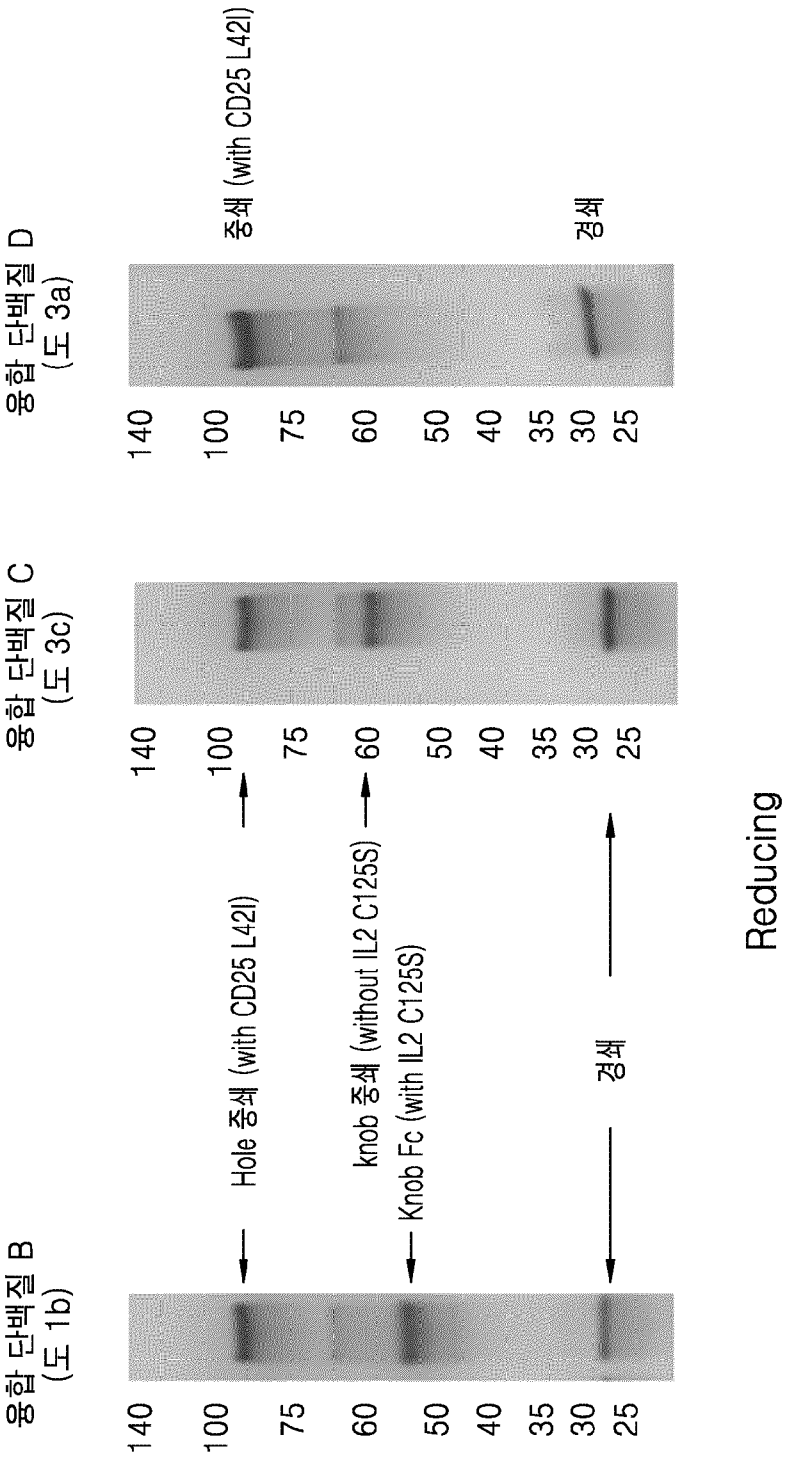
[도5]


본 발명의
융합 단백질
CD25 동종이량체
이종이량체 (융합 단백질 A)
245
180
140
100
75
60
Nonreducing condition
6% TG gel
본 발명의
융합 단백질
100
75
60
50
40
35
30
Hole 중쇄 (with CD25L42I)
Knob 중쇄 (with IL-2C125S)
경쇄
Reducing condition
10% TG gel

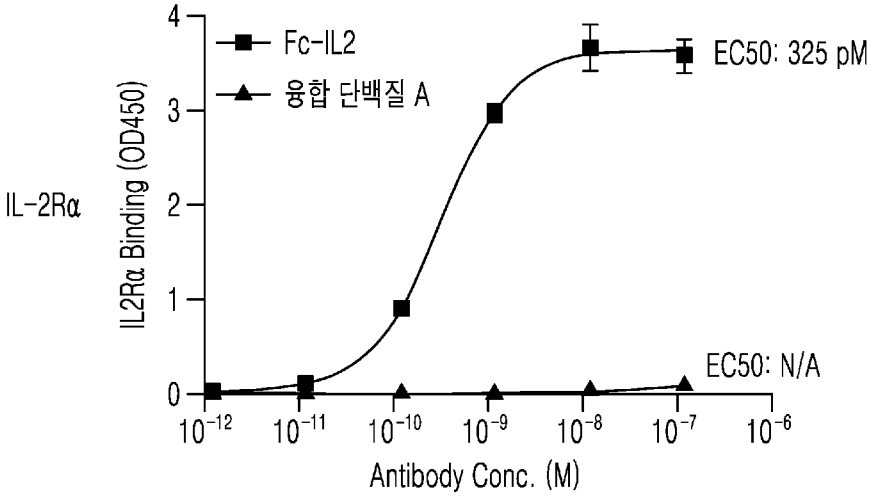
[도6a]


융합 단백질 B
(도 1b)
융합 단백질 C
(도 3c)
융합 단백질 D
(도 3a)
245
180
140
100
75
60
50
40
35

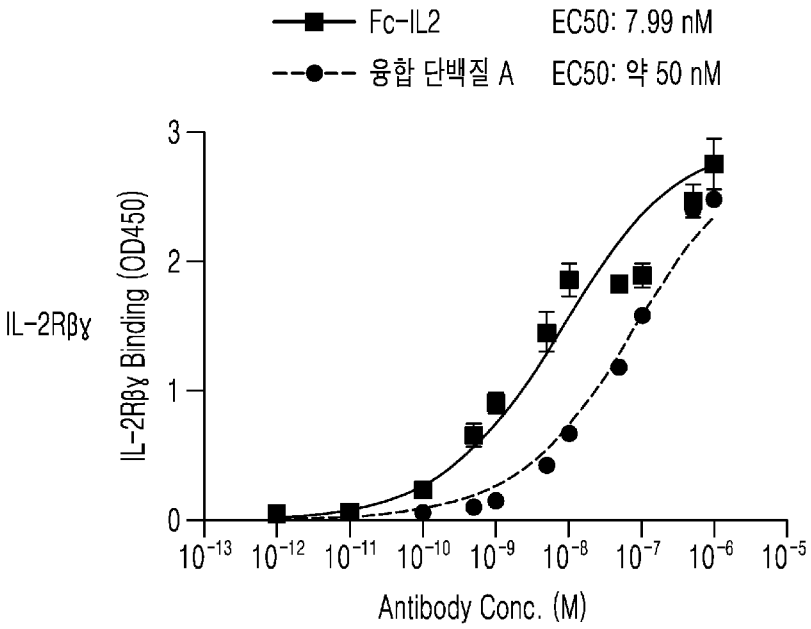
[도6b]


융합 단백질 B
(도 1b)
융합 단백질 C
(도 3c)
융합 단백질 D
(도 3a)
140
100
75
60
50
40
35
30
25
Hole 중쇄 (with CD25 L42I)
Knob Fc (with IL2 C125S)
knob 중쇄 (without IL2 C125S)
중쇄 (with CD25 L42I)
경쇄
경쇄
Reducing

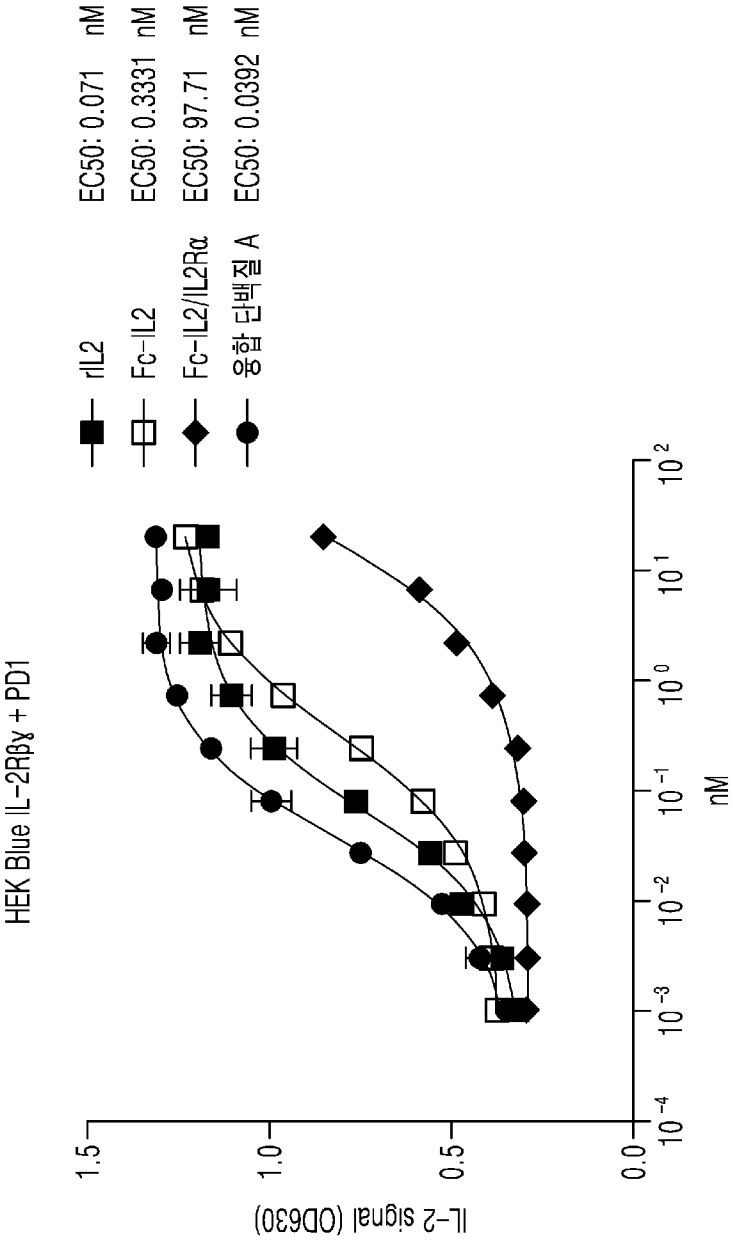
[도7a]


IL-2Rα
IL2Rα Binding (OD450)
Fc-IL2
융합 단백질 A
EC50: 325 pM
EC50: N/A
Antibody Conc. (M)

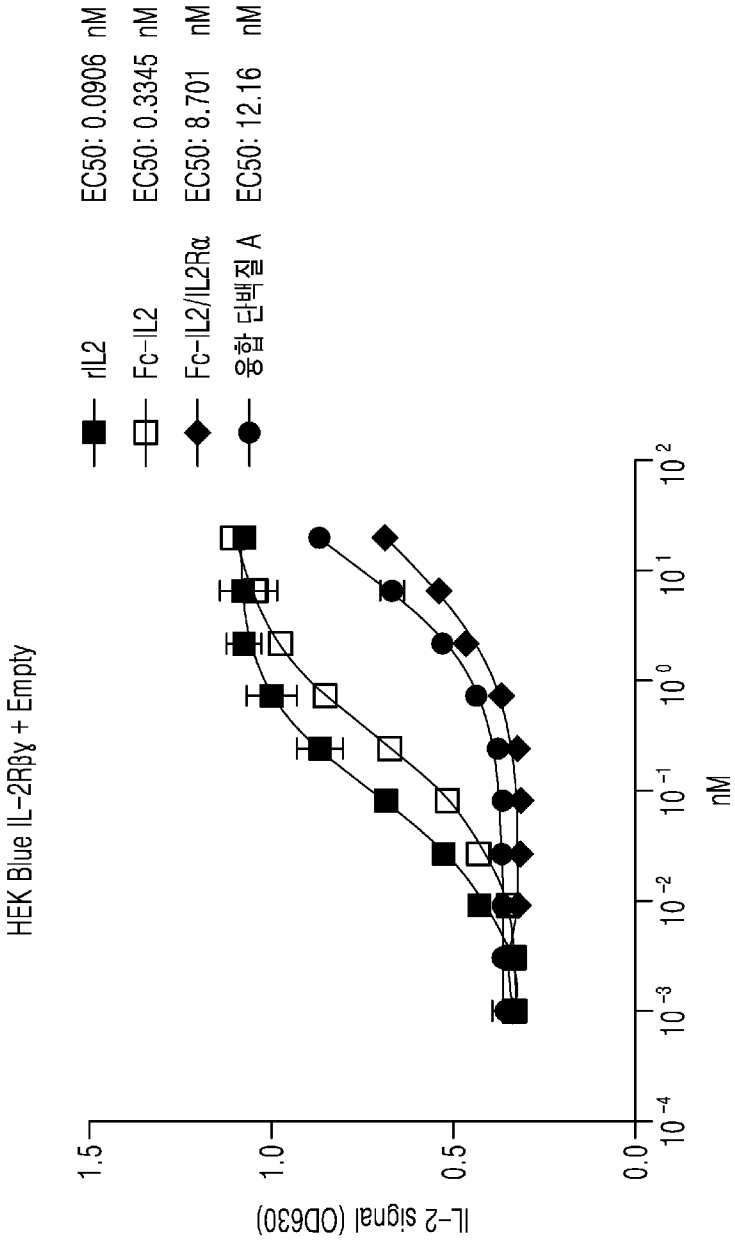
[도7b]


IL-2Rβγ
IL-2Rβγ Binding (OD450)
Fc-IL2 EC50: 7.99 nM
융합 단백질 A EC50: 약 50 nM
Antibody Conc. (M)

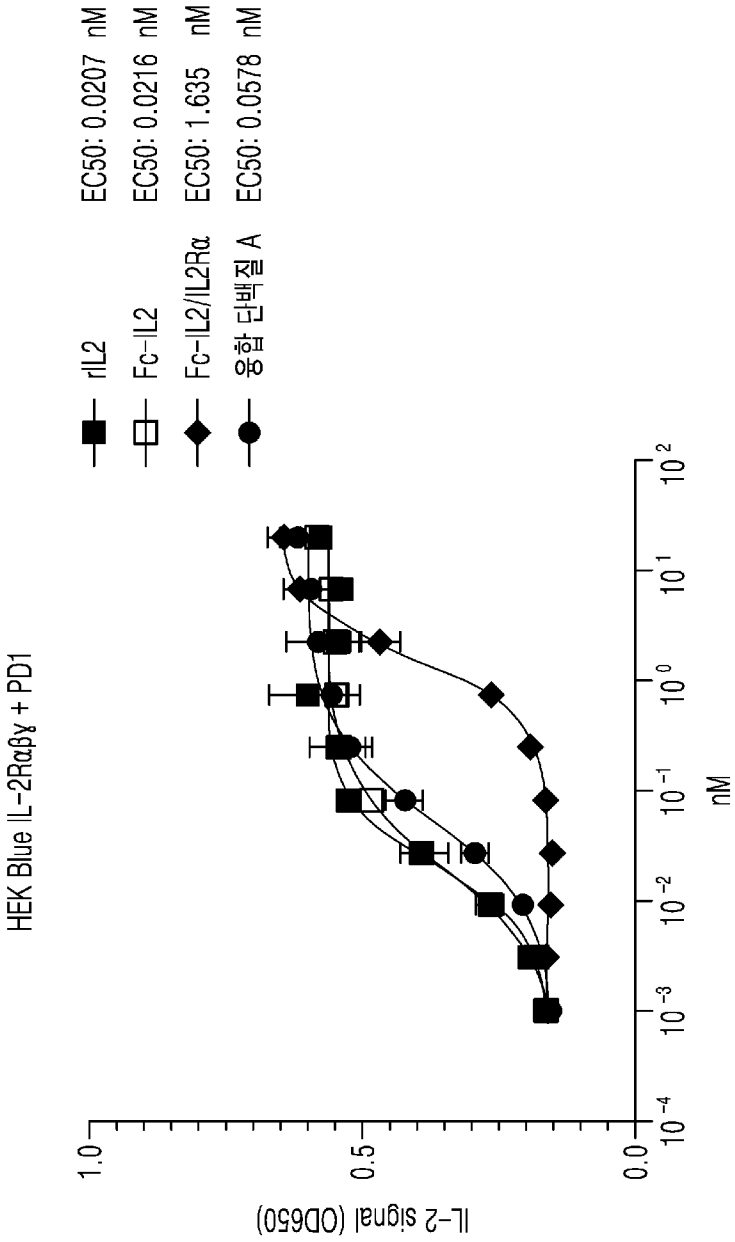
[도8a]


HEK Blue IL-2Rβγ + PD1
IL-2 signal (OD630)
1.5
1.0
0.5
0.0
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
nM
rIL2 EC50: 0.071 nM
Fc-IL2 EC50: 0.3331 nM
Fc-IL2/IL2Rα EC50: 97.71 nM
융합 단백질 A EC50: 0.0392 nM

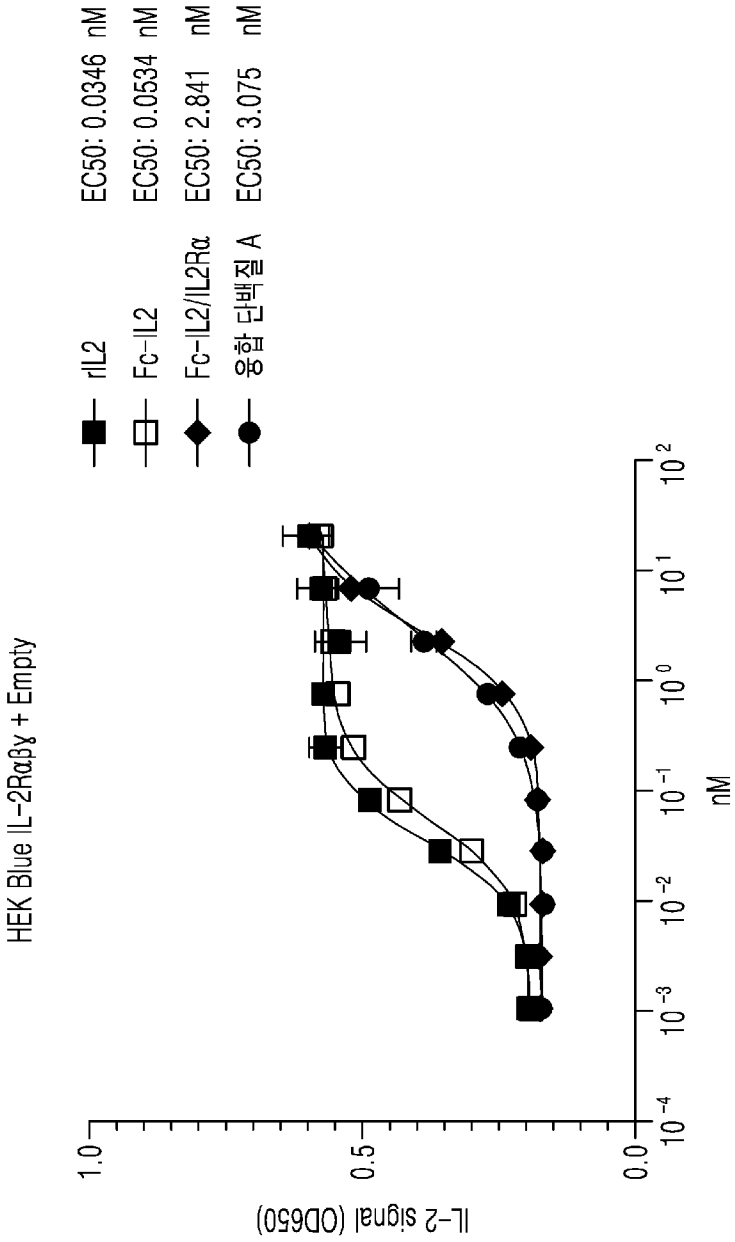
[도8b]


HEK Blue IL-2Rβγ + Empty
IL-2 signal (OD630)
1.5
1.0
0.5
0.0
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
nM
rIL2 EC50: 0.0906 nM
Fc-IL2 EC50: 0.3345 nM
Fc-IL2/IL2Rα EC50: 8.701 nM
융합 단백질 A EC50: 12.16 nM

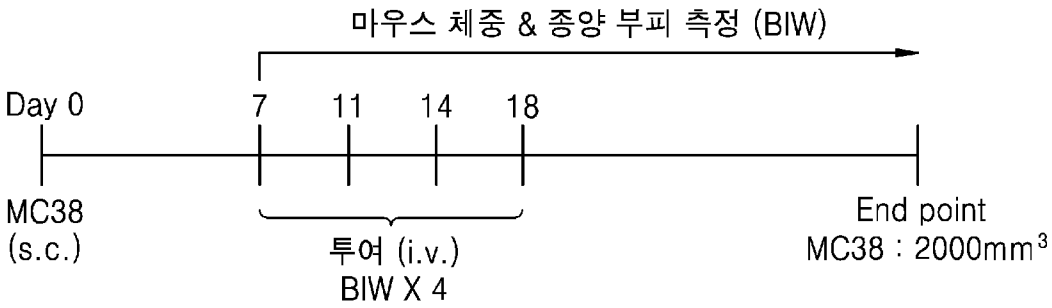
[도8c]


HEK Blue IL-2Rαβγ + PD1
IL-2 signal (OD650)
1.0
0.5
0.0
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
nM
rIL2 EC50: 0.0207 nM
Fc-IL2 EC50: 0.0216 nM
Fc-IL2/IL2Rα EC50: 1.635 nM
융합 단백질 A EC50: 0.0578 nM

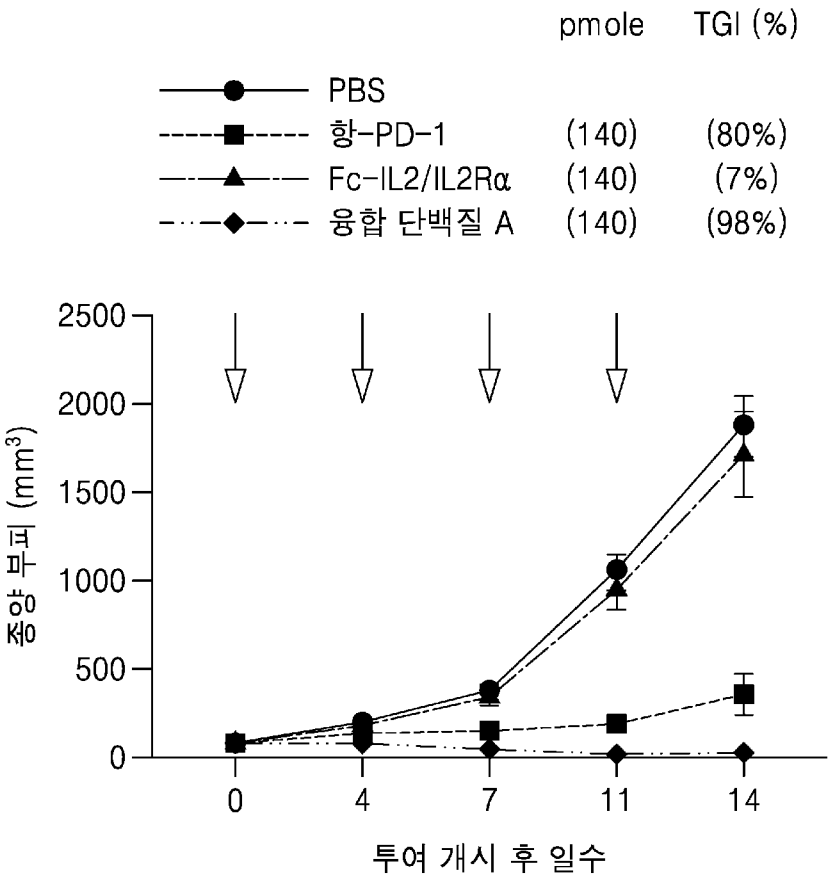
[도8d]


rIL2 EC50: 0.0346 nM
Fc-IL2 EC50: 0.0534 nM
Fc-IL2/IL2Rα EC50: 2.841 nM
융합 단백질 A EC50: 3.075 nM
HEK Blue IL-2Rαβγ + Empty
IL-2 signal (OD650)
1.0
0.5
0.0
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
nM

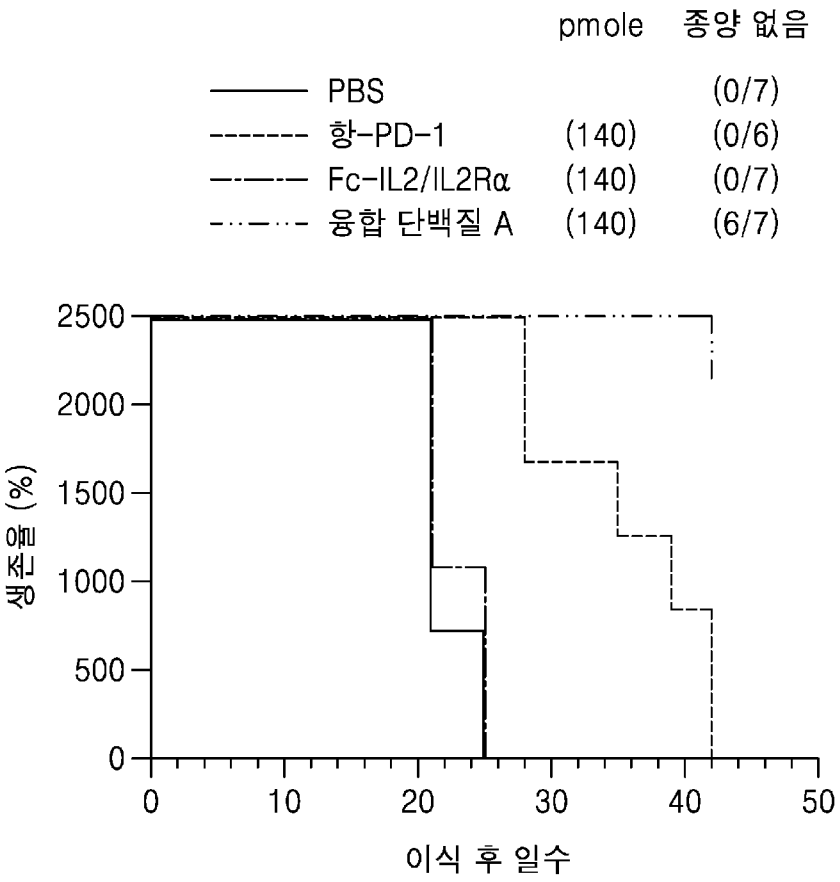
[도9]


마우스 체중 & 종양 부피 측정 (BIW)
Day 0
7
11
14
18
MC38
(s.c.)
투여 (i.v.)
BIW X 4
End point
MC38 : 2000mm3

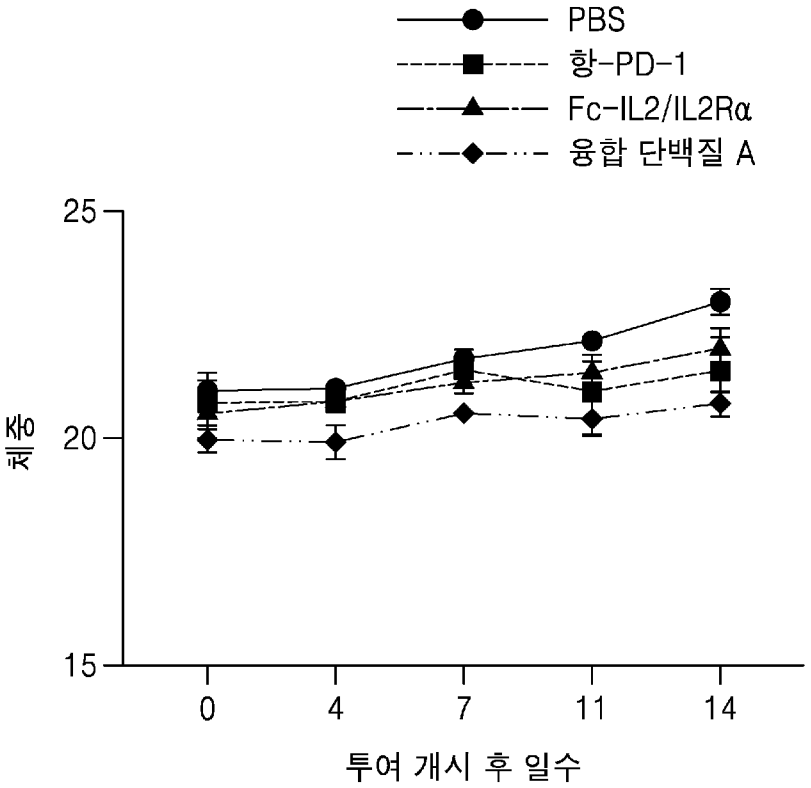
[도10a]


pmole
TGI (%)
PBS
항-PD-1 (140) (80%)
Fc-IL2/IL2Rα (140) (7%)
융합 단백질 A (140) (98%)
종양 부피 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
4
7
11
14
투여 개시 후 일수

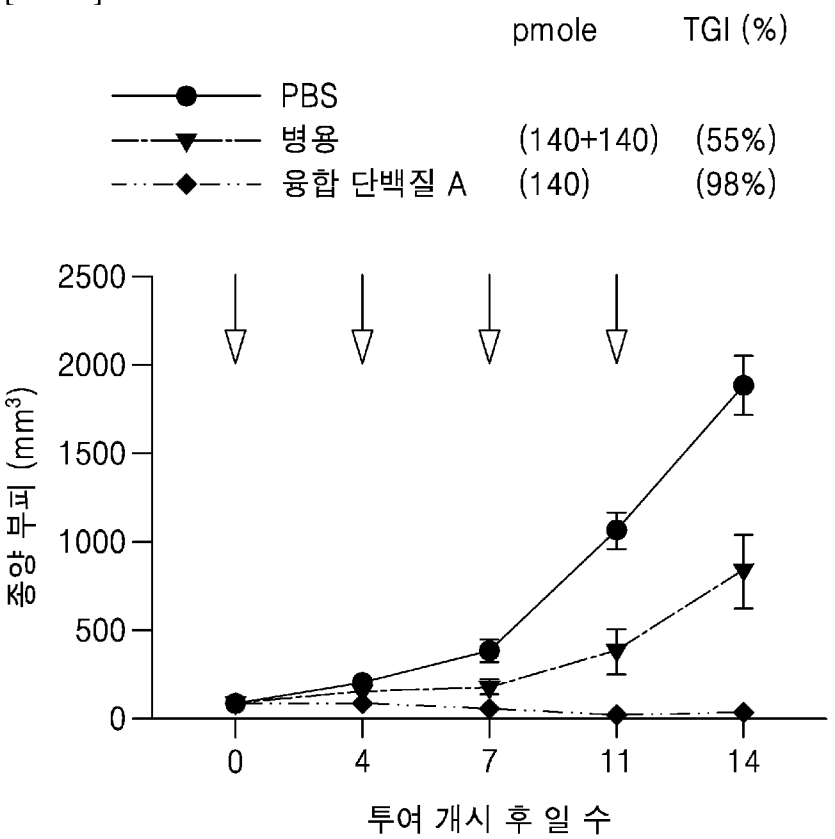
[도10b]


pmole
종양 없음
PBS (0/7)
항-PD-1 (140) (0/6)
Fc-IL2/IL2Rα (140) (0/7)
융합 단백질 A (140) (6/7)
생존율 (%)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
이식 후 일수

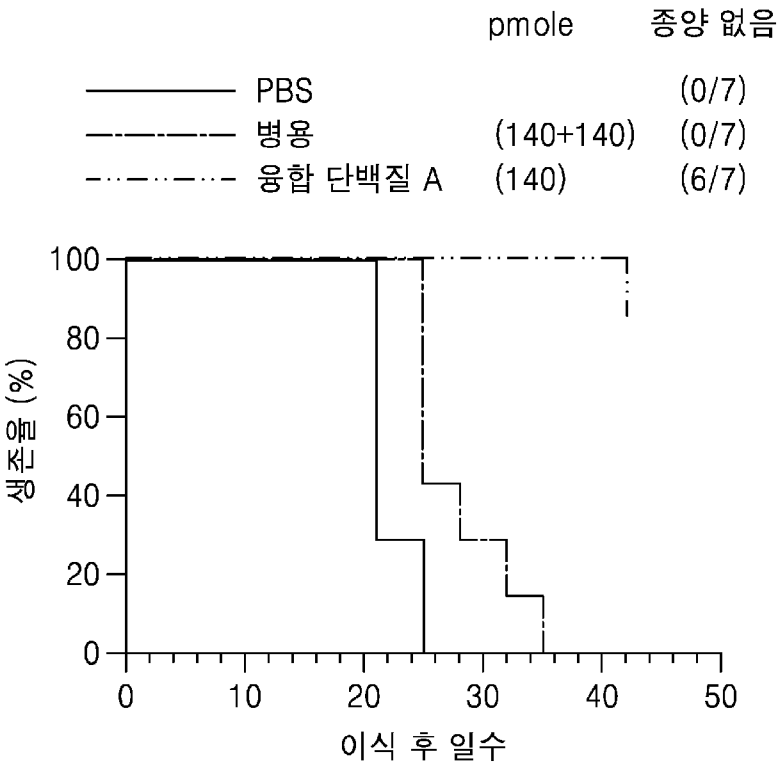
[도10c]


PBS
항-PD-1
Fc-IL2/IL2Rα
융합 단백질 A
25
20
15
체중
0
4
7
11
14
투여 개시 후 일수

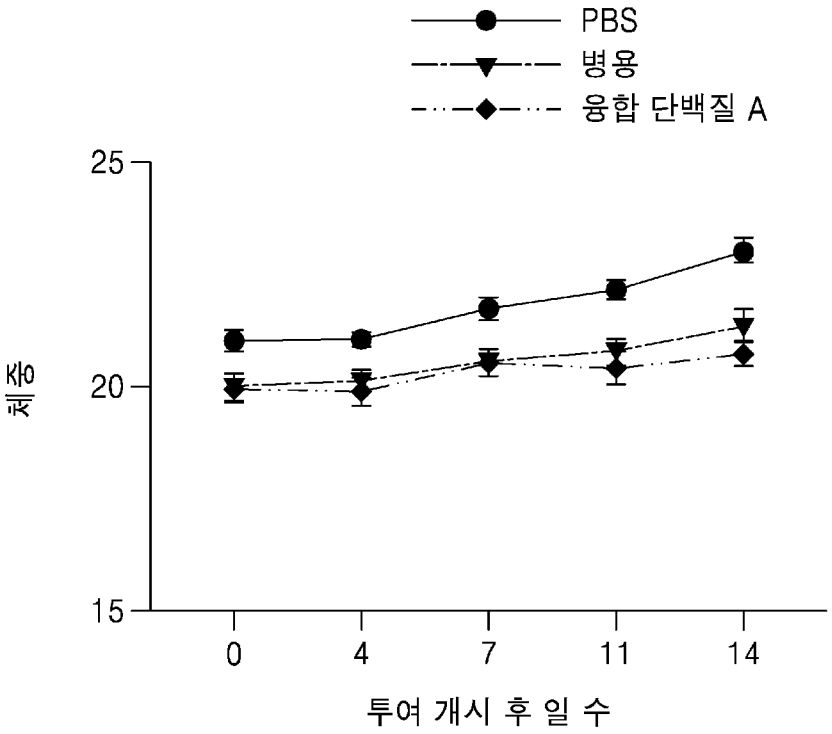
[도11a]


pmole TGI (%)
PBS
병용 (140+140) (55%)
융합 단백질 A (140) (98%)
2500
2000
1500
1000
500
0
종양 부피 (mm3)
0
4
7
11
14
투여 개시 후 일 수

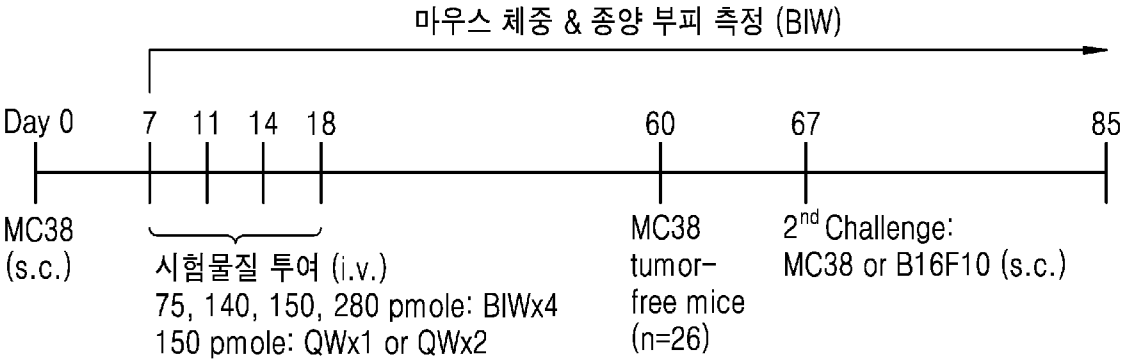
[도11b]


pmole
종양 없음
PBS
(0/7)
병용
(140+140)
(0/7)
융합 단백질 A
(140)
(6/7)
100
80
60
40
20
0
생존율 (%)
0
10
20
30
40
50
이식 후 일수

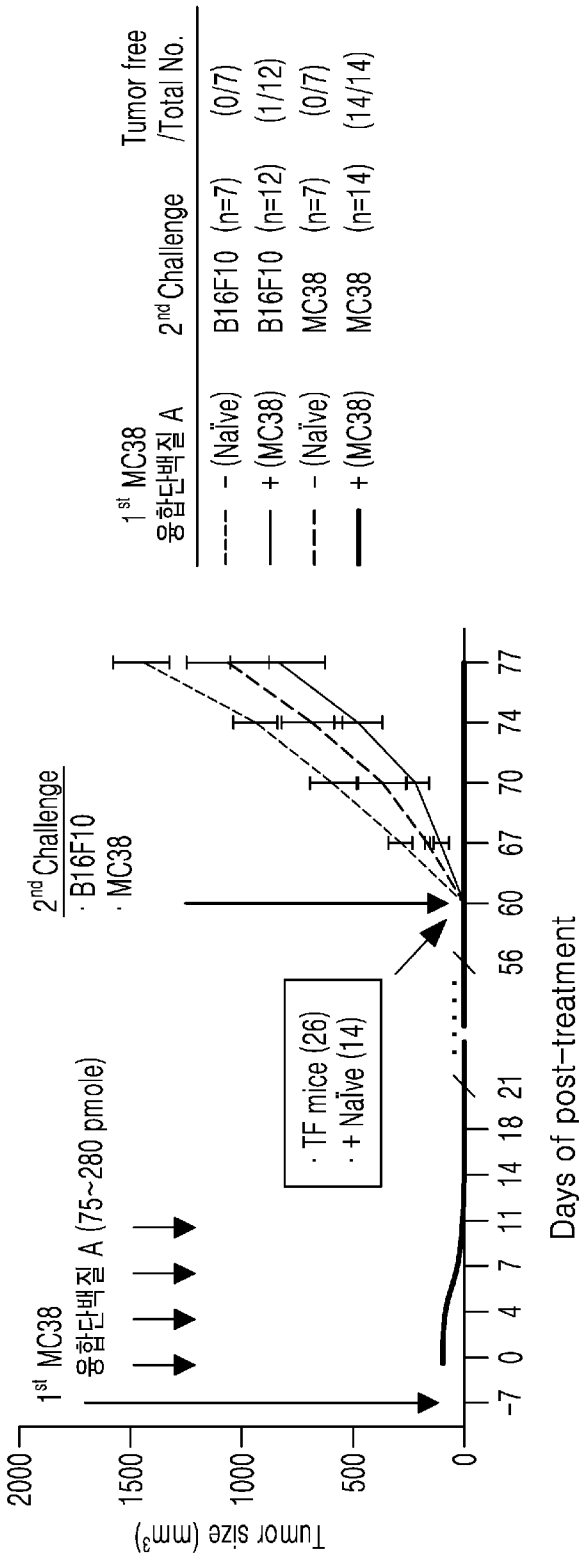
[도11c]


PBS
병용
융합 단백질 A
25
20
15
체중
0
4
7
11
14
투여 개시 후 일 수

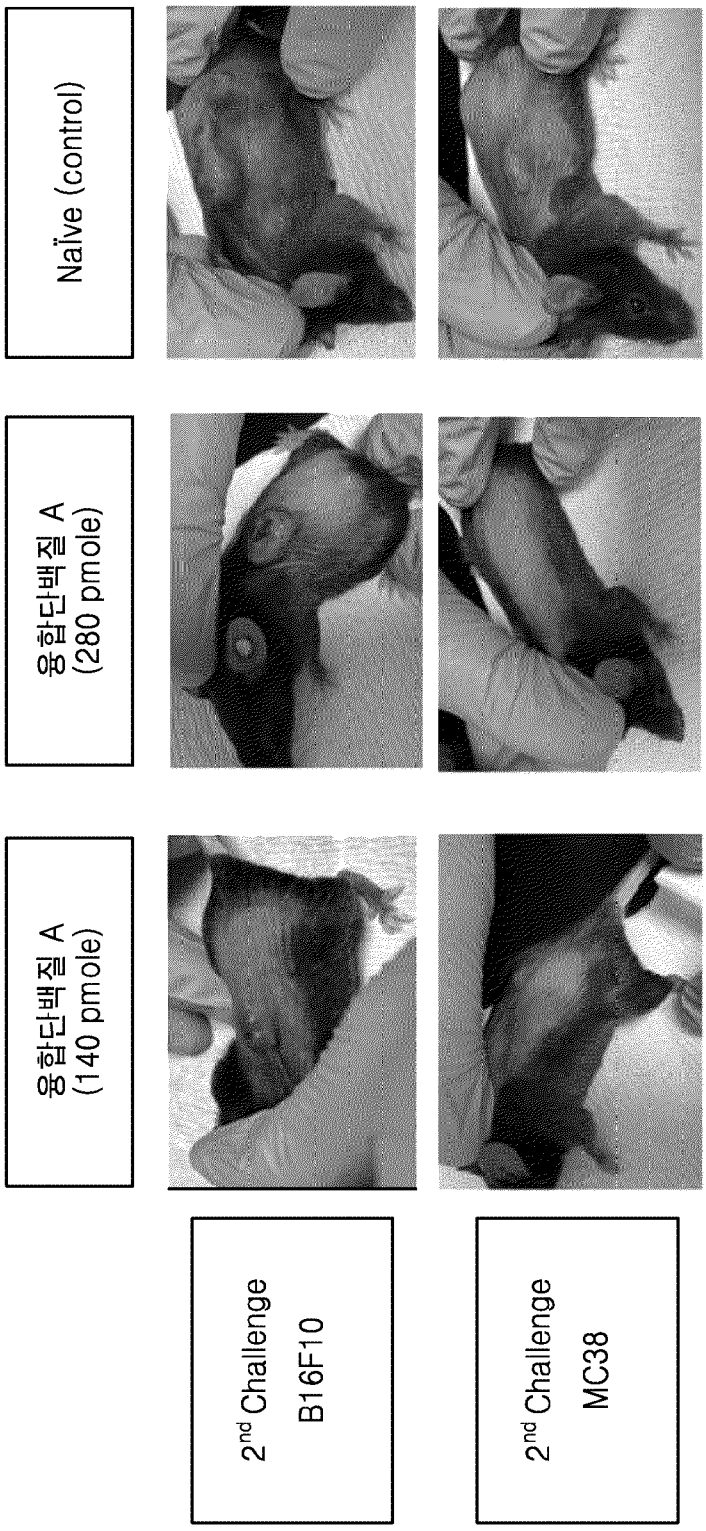
[도12]


마우스 체중 & 종양 부피 측정 (BIW)
Day 0
7
11
14
18
60
67
85
MC38
(s.c.)
시험물질 투여 (i.v.)
75, 140, 150, 280 pmole: BIWx4
150 pmole: QWx1 or QWx2
MC38
tumor-
free mice
(n=26)
2nd Challenge:
MC38 or B16F10 (s.c.)

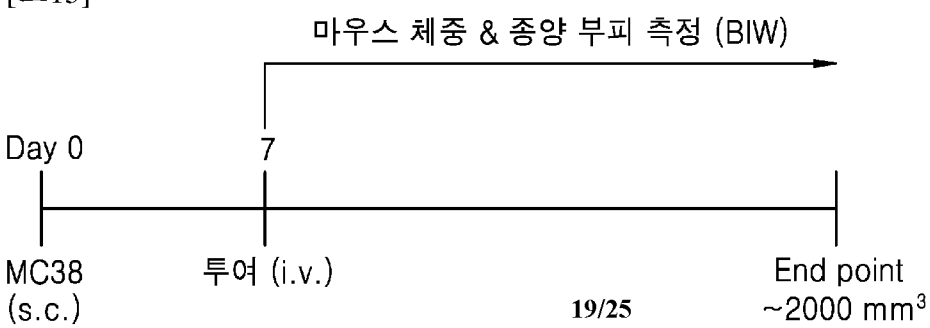
[도13]


1st MC38
융합단백질 A
2nd Challenge
2nd Challenge
· B16F10
· MC38
· TF mice (26)
· + Naïve (14)
Tumor size (mm3)
Days of post-treatment
2000
1500
1000
500
0
-7 0 4 7 11 14 18 21 56 60 67 70 74 77
1st MC38
융합단백질 A
2nd Challenge
Tumor free
/Total No.
---- - (Naïve) B16F10 (n=7) (0/7)
—— + (MC38) B16F10 (n=12) (1/12)
- - - - (Naïve) MC38 (n=7) (0/7)
—— + (MC38) MC38 (n=14) (14/14)

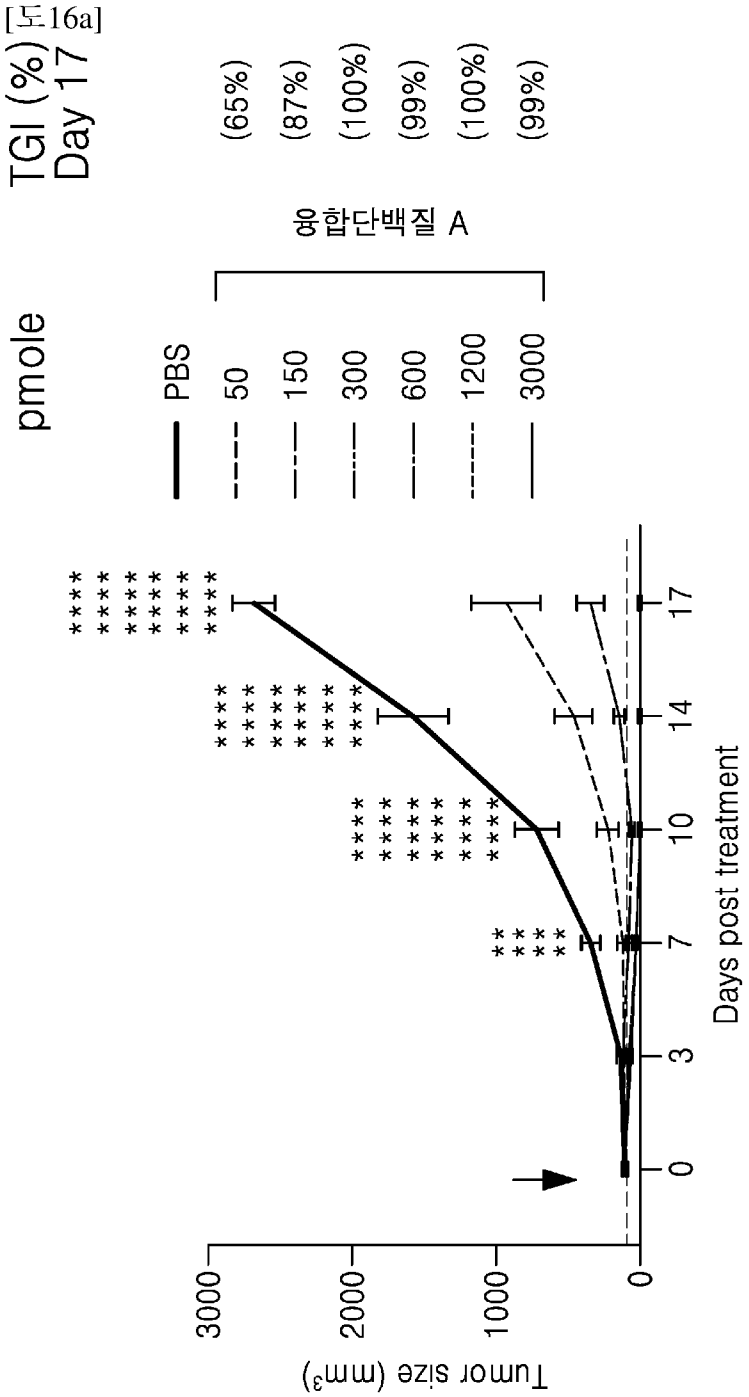
[도14]


Naïve (control)
융합단백질 A (280 pmole)
융합단백질 A (140 pmole)
2nd Challenge B16F10
2nd Challenge MC38

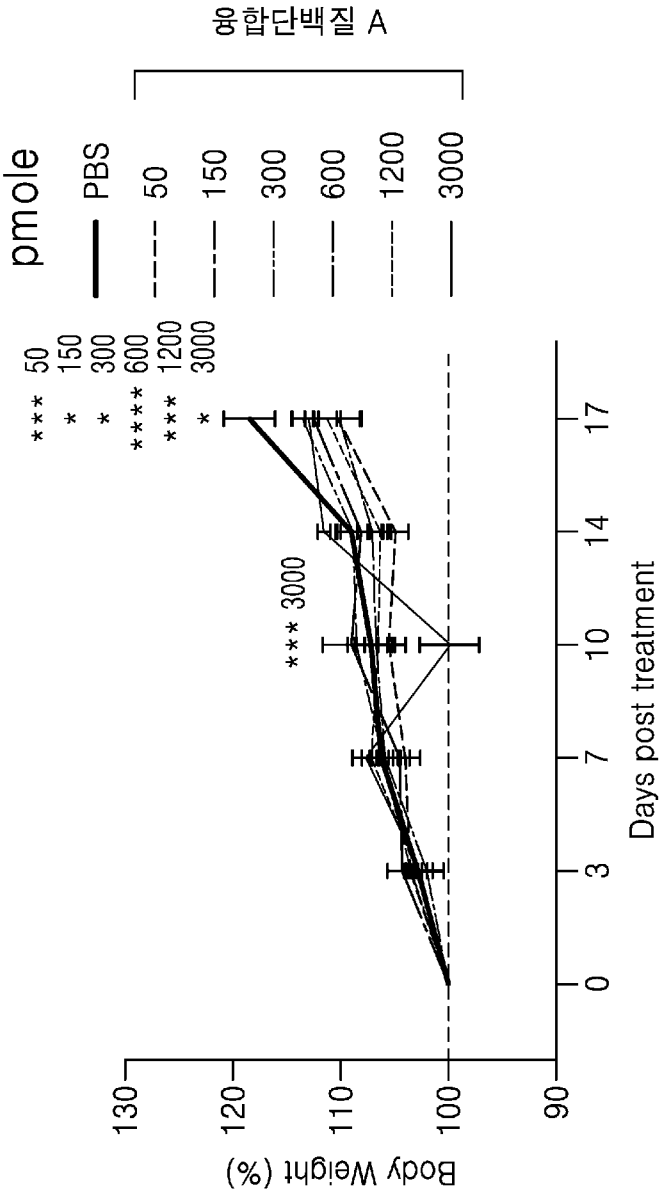
[도15]


마우스 체중 & 종양 부피 측정 (BIW)
Day 0
7
MC38 (s.c.)
투여 (i.v.)
End point ~2000 mm3

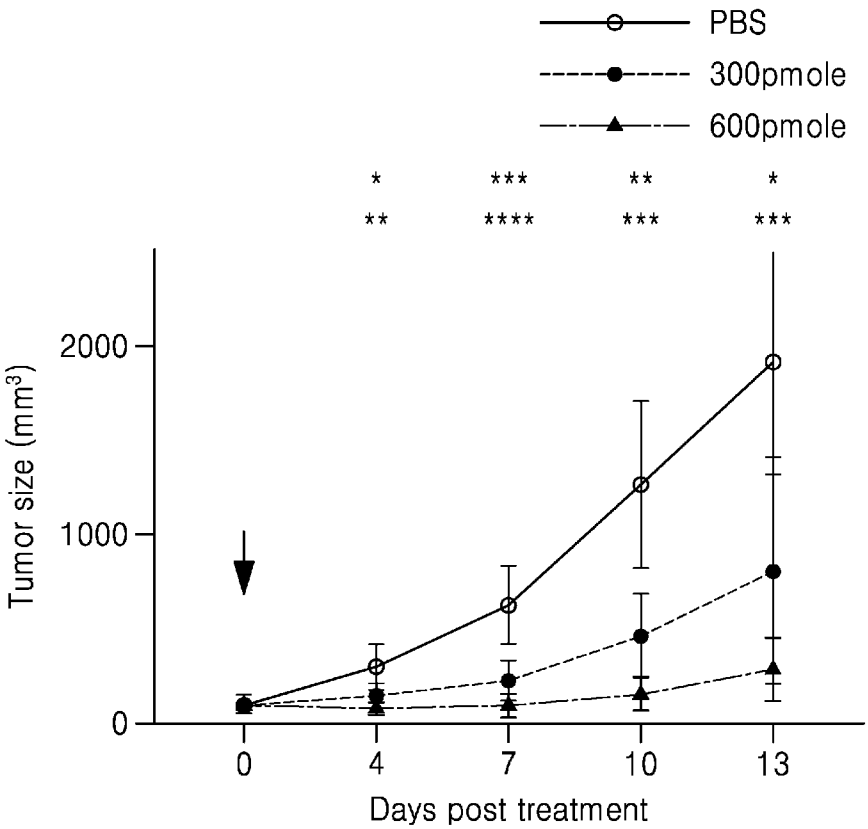
[도16a]


TGI (%)
Day 17
(65%)
(87%)
(100%)
(99%)
(100%)
(99%)
융합단백질 A
pmole
PBS
50
150
300
600
1200
3000
Tumor size (mm³)
Days post treatment

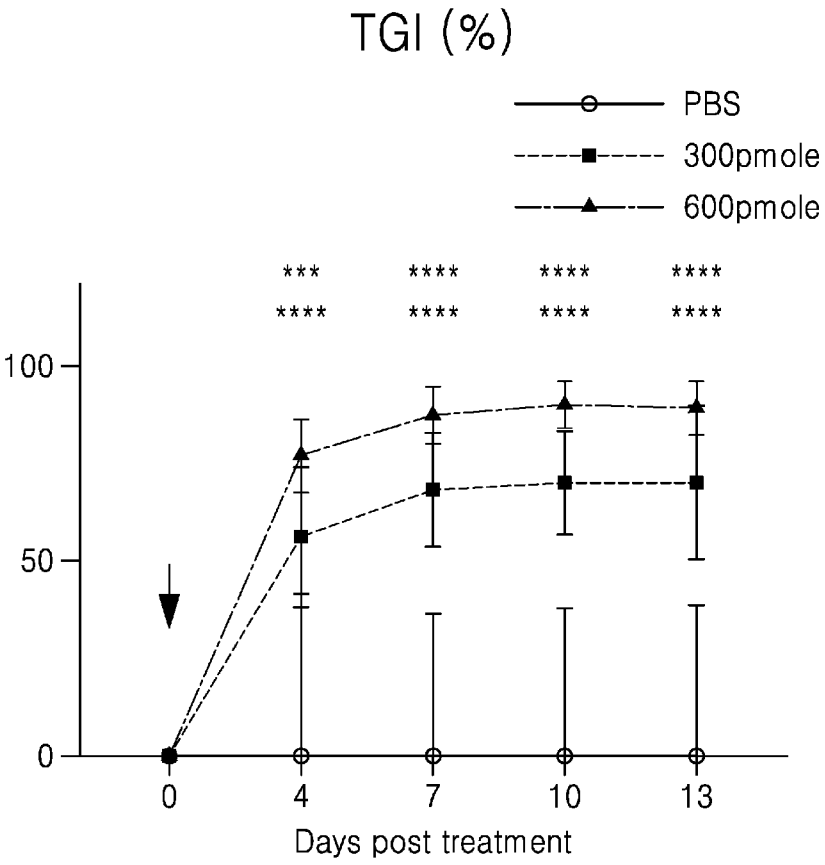
[도16b]


융합단백질 A
pmole
PBS
50
150
300
600
1200
3000
*** 50
* 150
* 300
**** 600
*** 1200
* 3000
*** 3000
Body Weight (%)
130
120
110
100
90
0
3
7
10
14
17
Days post treatment

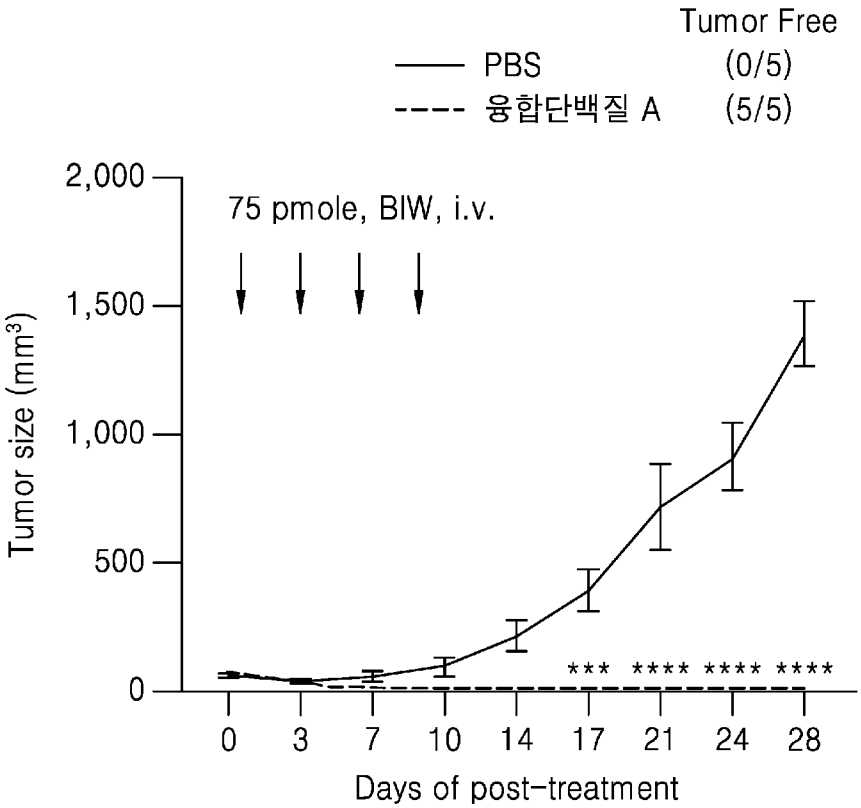
[도17a]


PBS
300pmole
600pmole
* ** *** **** ** *** * ***
2000
1000
0
Tumor size (mm3)
0 4 7 10 13
Days post treatment

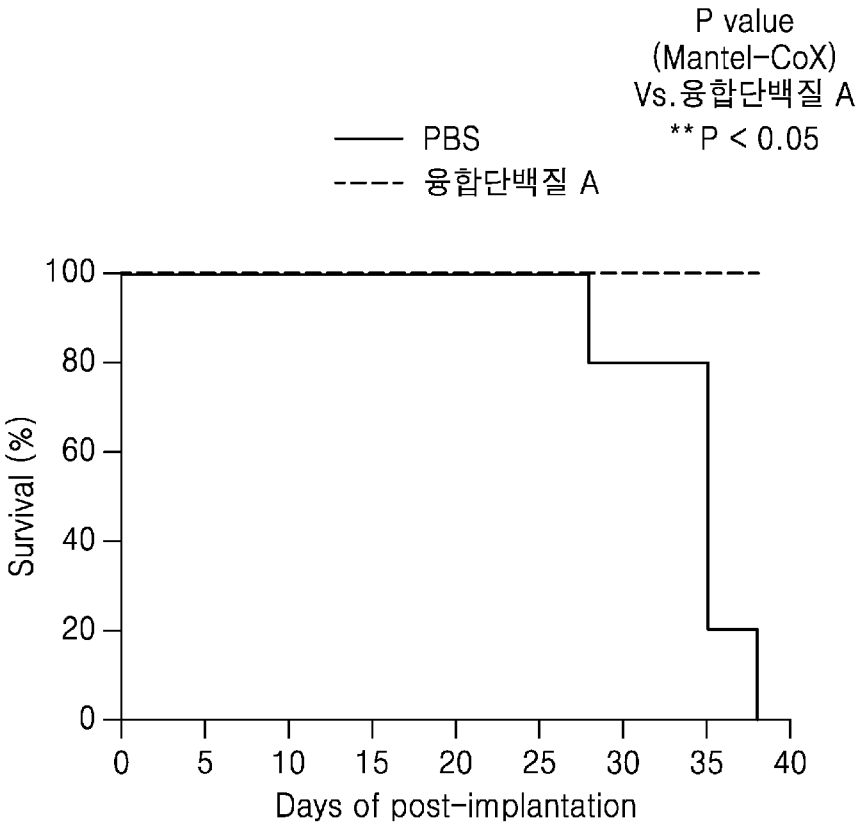
[도17b]


TGI (%)
PBS
300pmole
600pmole
*** **** **** **** **** **** **** ****
100
50
0
0 4 7 10 13
Days post treatment

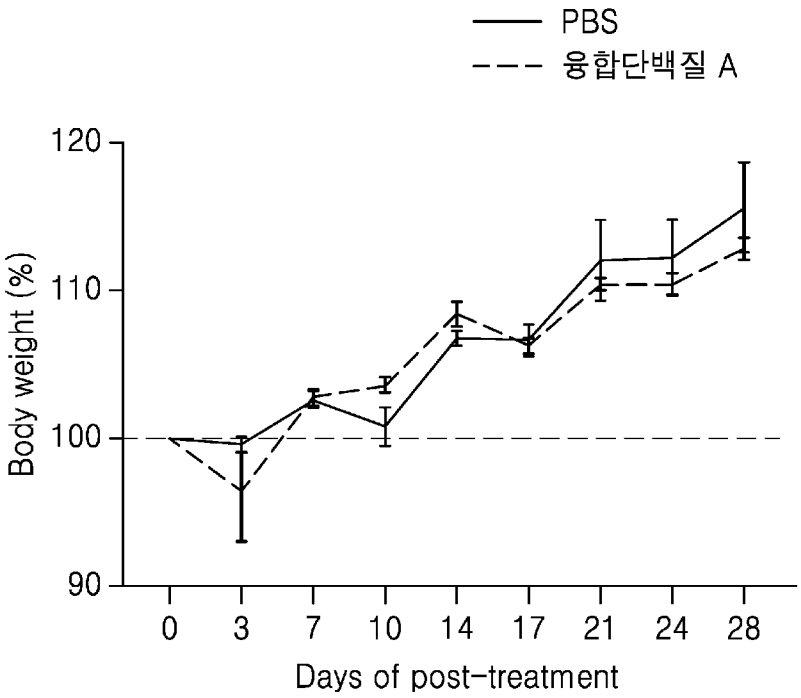
[도18a]


Tumor Free
PBS (0/5)
융합단백질 A (5/5)
75 pmole, BIW, i.v.
Tumor size (mm³)
2,000
1,500
1,000
500
0
*** **** **** ****
0 3 7 10 14 17 21 24 28
Days of post-treatment

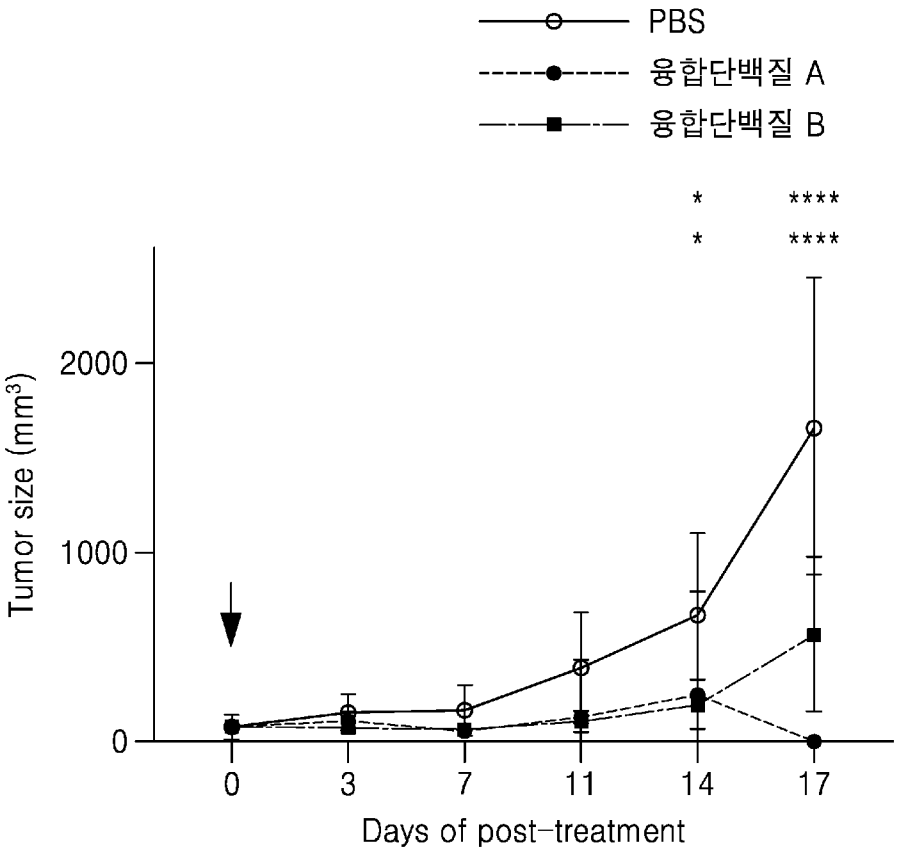
[도18b]


P value
(Mantel-CoX)
Vs.융합단백질 A
**P < 0.05
PBS
융합단백질 A
Survival (%)
100
80
60
40
20
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40
Days of post-implantation

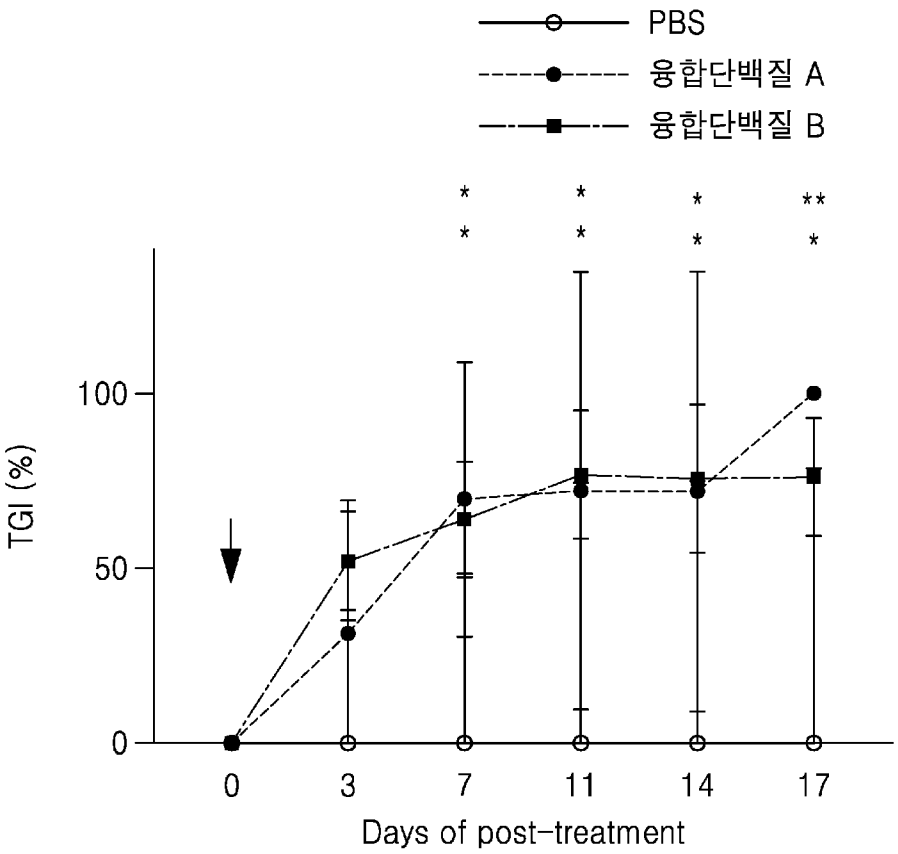
[도18c]


PBS
융합단백질 A
120
110
100
90
Body weight (%)
0
3
7
10
14
17
21
24
28
Days of post-treatment

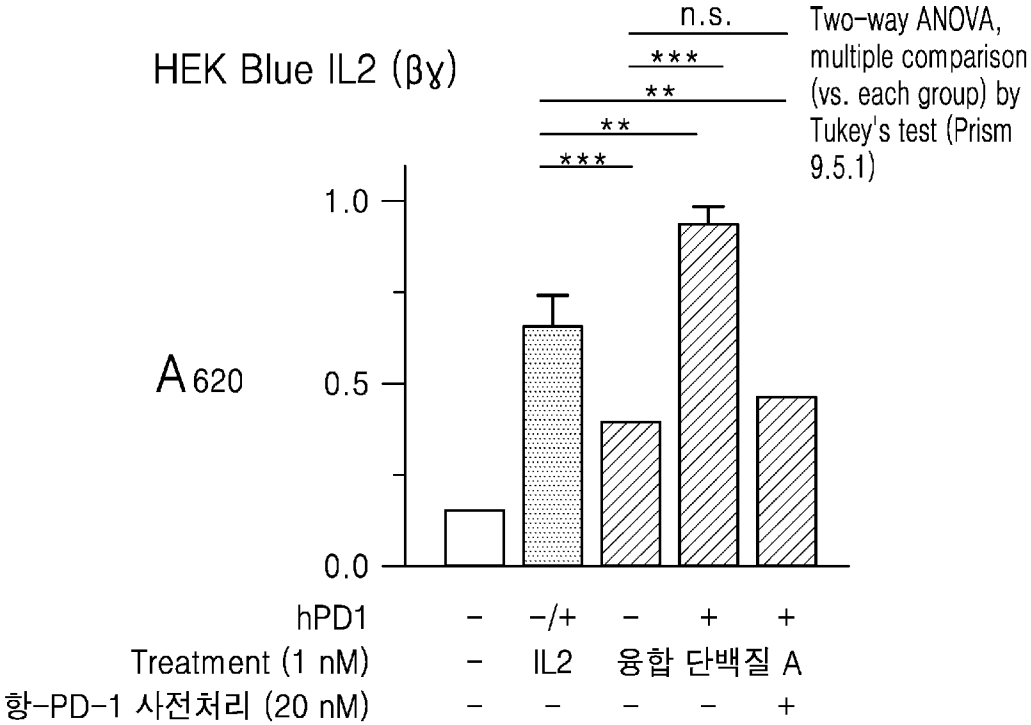
[도19a]


PBS
융합단백질 A
융합단백질 B
*
****
*
****
2000
1000
0
Tumor size (mm3)
0
3
7
11
14
17
Days of post-treatment

[도19b]


PBS
융합단백질 A
융합단백질 B
TGI (%)
100
50
0
0
3
7
11
14
17
Days of post-treatment

[도20]


HEK Blue IL2 (βɣ)
n.s.
***
**
**
***
Two-way ANOVA, multiple comparison (vs. each group) by Tukey's test (Prism 9.5.1)
A620
1.0
0.5
0.0
hPD1 - -/+ - + +
Treatment (1 nM) - IL2 융합 단백질 A
항-PD-1 사전처리 (20 nM) - - - - +

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/009763

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(2006.01)i; **C07K 14/55**(2006.01)i; **C07K 14/54**(2006.01)i; **C07K 14/715**(2006.01)i; **C12N 15/62**(2006.01)i; **A61P 35/00**(2006.01)i; **A61K 39/00**(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/28(2006.01); A61K 38/00(2006.01); A61K 38/20(2006.01); A61K 47/55(2017.01); A61K 47/64(2017.01); C07K 14/54(2006.01); C07K 14/55(2006.01); C12N 15/63(2006.01)

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: Fc 도메인(Fc domain), IL-2Rα, IL-15Rα, PD-1, 융합 단백질(fusion protein), 암(cancer)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	KR 10-2019-0060821 A (XENCOR INC.) 03 June 2019 (2019-06-03)	
X	See abstract; paragraphs [0006], [0026], [0065], [0075]-[0077], [0079]-[0080], [0103], [0139]-[0141], [0327], [0344] and [0390]; claims 1, 3, 5 and 56; and figures 64c and 64j.	1,9-16,20-30,32-35,38
Y		2-8
A		17-19,36-37
	KR 10-2022-0012256 A (PROVIVA THERAPEUTICS (HONG KONG) LIMITED) 03 February 2022 (2022-02-03)	
Y	See paragraph [0103]; and claims 1, 3, 9, 11 and 41-43.	2-8
	KR 10-2022-0032569 A (PROVIVA THERAPEUTICS (HONG KONG) LIMITED) 15 March 2022 (2022-03-15)	
Y	See paragraphs [0142] and [0171]-[0172]; and claims 1 and 3-13.	2-8

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"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	Date of mailing of the international search report
12 October 2023	**12 October 2023**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020-057646 A1 (INNOVENT BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.) 26 March 2020 (2020-03-26) See entire document.	1-30,32-38
A	WO 2018-044105 A1 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION et al.) 08 March 2018 (2018-03-08) See entire document.	1-30,32-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/009763

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/009763

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☑ Claims Nos.: **31**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The invention of group 1: parts of claim 1, claims 2-8, 13-30 and 32-38 pertain to a fusion protein comprising one or more immune cell antigen binding domains, an Fc domain consisting of two Fc chains, and a cytokine action domain, wherein the cytokine action domain includes a-subunit of the interleukin-2 receptor (IL-2R a) polypeptide.
The invention of group 2: parts of claim 1, claims 9-30 and 32-38 pertain to a fusion protein comprising one or more immune cell antigen binding domains, an Fc domain consisting of two Fc chains, and a cytokine action domain, wherein the cytokine action domain includes a-subunit of the interleukin-15 receptor (IL-15R a) polypeptide.

The technical feature shared by the inventions of group 1 and group 2 pertains to a fusion protein comprising immune cell antigen binding domains, an Fc domain and a cytokine action domain, but this technical feature corresponds to a technology found in the cited document (KR 10-2019-0060821 A) disclosed in the International Search Report.

Therefore, these claims have no common special technical feature which makes a contribution over the prior art under PCT Rule 13.2, and thus lack unity of invention.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/009763

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☑ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2023/009763

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2019-0060821 A	03 June 2019	CN 110214147 A	06 September 2019
		CN 110214148 A	06 September 2019
		EP 3526240 A1	21 August 2019
		EP 3526241 A1	21 August 2019
		JP 2019-533443 A	21 November 2019
		JP 2019-533444 A	21 November 2019
		JP 2022-180450 A	06 December 2022
		JP 2023-106405 A	01 August 2023
		JP 7142630 B2	27 September 2022
		JP 7273453 B2	15 May 2023
		KR 10-2019-0065346 A	11 June 2019
		KR 10-2562519 B1	02 August 2023
		US 10501543 B2	10 December 2019
		US 10550185 B2	04 February 2020
		US 11584794 B2	21 February 2023
		US 2018-0118805 A1	03 May 2018
		US 2018-0118828 A1	03 May 2018
		US 2020-0040083 A1	06 February 2020
		US 2020-0123259 A1	23 April 2020
		US 2022-0195048 A1	23 June 2022
		US 2023-0220081 A1	13 July 2023
		WO 2018-071918 A1	19 April 2018
		WO 2018-071919 A1	19 April 2018
KR 10-2022-0012256 A	03 February 2022	CN 113874390 A	31 December 2021
		EP 3976638 A1	06 April 2022
		JP 2022-533254 A	21 July 2022
		US 2022-0227837 A1	21 July 2022
		WO 2020-242884 A1	03 December 2020
KR 10-2022-0032569 A	15 March 2022	CN 114450297 A	06 May 2022
		EP 3997115 A1	18 May 2022
		JP 2022-541002 A	21 September 2022
		US 2022-0324933 A1	13 October 2022
		WO 2021-011353 A1	21 January 2021
WO 2020-057646 A1	26 March 2020	CN 112105633 A	18 December 2020
		EP 3854806 A1	28 July 2021
		JP 2022-500002 A	04 January 2022
		US 2021-0221863 A1	22 July 2021
WO 2018-044105 A1	08 March 2018	CN 110088124 A	02 August 2019
		EP 3508495 A1	10 July 2019
		EP 3508495 B1	24 November 2021
		JP 2019-530657 A	24 October 2019
		JP 6911105 B2	28 July 2021
		KR 10-1928981 B1	13 December 2018
		KR 10-2018-0026279 A	12 March 2018
		US 10800825 B2	13 October 2020
		US 11459367 B2	04 October 2022
		US 2019-0218267 A1	18 July 2019
		US 2020-0399336 A1	24 December 2020

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/009763

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 16/28(2006.01)i; **C07K 14/55**(2006.01)i; **C07K 14/54**(2006.01)i; **C07K 14/715**(2006.01)i; **C12N 15/62**(2006.01)i; **A61P 35/00**(2006.01)i; **A61K 39/00**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 16/28(2006.01); A61K 38/00(2006.01); A61K 38/20(2006.01); A61K 47/55(2017.01); A61K 47/64(2017.01); C07K 14/54(2006.01); C07K 14/55(2006.01); C12N 15/63(2006.01)

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: Fc 도메인(Fc domain), IL-2Rα, IL-15Rα, PD-1, 융합 단백질(fusion protein), 암(cancer)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2019-0060821 A (젠코어 인코포레이티드) 2019.06.03 요약; 단락 [0006], [0026], [0065], [0075]-[0077], [0079]-[0080], [0103], [0139]-[0141], [0327], [0344], [0390]; 청구항 1, 3, 5, 56; 도면 64c, 64j 참조.	1,9-16,20-30,32-35,38
Y		2-8
A		17-19,36-37
Y	KR 10-2022-0012256 A (프로비바 테라퓨틱스 (홍콩) 리미티드) 2022.02.03 단락 [0103]; 청구항 1, 3, 9, 11, 41-43 참조.	2-8
Y	KR 10-2022-0032569 A (프로비바 테라퓨틱스 (홍콩) 리미티드) 2022.03.15 단락 [0142], [0171]-[0172]; 청구항 1, 3-13 참조.	2-8
A	WO 2020-057646 A1 (INNOVENT BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.) 2020.03.26 전체 문헌 참조.	1-30,32-38

☑ 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 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2023년10월12일(12.10.2023)	**2023년10월12일(12.10.2023)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관
대한민국 특허청 **(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)**	**김태운**
팩스 번호 **+82-42-481-8578**	전화번호 **+82-42-481-3326**

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2022년 7월)

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/009763

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2018-044105 A1 (고려대학교 산학협력단 등) 2018.03.08 전체 문헌 참조.	1-30,32-38

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/009763

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. ☑ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

   b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

      ☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/009763

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☑ 청구항: **31**
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

제1군 발명: 청구항 1의 일부 및 청구항 2-8, 13-30, 32-38은 하나 이상의 면역세포 항원 결합 도메인, 2개의 Fc 사슬로 이루어진 Fc 도메인, 및 사이토카인 작용 도메인을 포함하고, 상기 사이토카인 작용 도메인은 인터류킨-2 수용체의 α-서브유니트(IL-2Rα) 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질에 관한 것입니다.
제2군 발명: 청구항 1의 일부 및 청구항 9-30, 32-38은 하나 이상의 면역세포 항원 결합 도메인, 2개의 Fc 사슬로 이루어진 Fc 도메인, 및 사이토카인 작용 도메인을 포함하고, 상기 사이토카인 작용 도메인은 인터류킨-15 수용체의 α-서브유니트(IL-15Rα) 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질에 관한 것입니다.

상기 제1 발명 내지 제2 발명의 공통적 기술적 특징은 면역세포 항원 결합 도메인, Fc 도메인, 사이토카인 작용 도메인을 포함하는 융합 단백질이라는 점이나, 이러한 기술적 특징은 국제조사보고서에 기재된 인용문헌 (KR 10-2019-0060821 A)에 공지된 기술에 해당합니다.

따라서 이들 청구항 간에는 PCT 규칙 13.2에서 규정된 선행기술에 대하여 기여한 공통되는 특별한 기술적 특징이 없으므로 발명의 단일성이 없습니다.

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/009763

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☑ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2023/009763

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2019-0060821 A	2019/06/03	CN 110214147 A	2019/09/06
		CN 110214148 A	2019/09/06
		EP 3526240 A1	2019/08/21
		EP 3526241 A1	2019/08/21
		JP 2019-533443 A	2019/11/21
		JP 2019-533444 A	2019/11/21
		JP 2022-180450 A	2022/12/06
		JP 2023-106405 A	2023/08/01
		JP 7142630 B2	2022/09/27
		JP 7273453 B2	2023/05/15
		KR 10-2019-0065346 A	2019/06/11
		KR 10-2562519 B1	2023/08/02
		US 10501543 B2	2019/12/10
		US 10550185 B2	2020/02/04
		US 11584794 B2	2023/02/21
		US 2018-0118805 A1	2018/05/03
		US 2018-0118828 A1	2018/05/03
		US 2020-0040083 A1	2020/02/06
		US 2020-0123259 A1	2020/04/23
		US 2022-0195048 A1	2022/06/23
		US 2023-0220081 A1	2023/07/13
		WO 2018-071918 A1	2018/04/19
		WO 2018-071919 A1	2018/04/19
KR 10-2022-0012256 A	2022/02/03	CN 113874390 A	2021/12/31
		EP 3976638 A1	2022/04/06
		JP 2022-533254 A	2022/07/21
		US 2022-0227837 A1	2022/07/21
		WO 2020-242884 A1	2020/12/03
KR 10-2022-0032569 A	2022/03/15	CN 114450297 A	2022/05/06
		EP 3997115 A1	2022/05/18
		JP 2022-541002 A	2022/09/21
		US 2022-0324933 A1	2022/10/13
		WO 2021-011353 A1	2021/01/21
WO 2020-057646 A1	2020/03/26	CN 112105633 A	2020/12/18
		EP 3854806 A1	2021/07/28
		JP 2022-500002 A	2022/01/04
		US 2021-0221863 A1	2021/07/22
WO 2018-044105 A1	2018/03/08	CN 110088124 A	2019/08/02
		EP 3508495 A1	2019/07/10
		EP 3508495 B1	2021/11/24
		JP 2019-530657 A	2019/10/24
		JP 6911105 B2	2021/07/28
		KR 10-1928981 B1	2018/12/13
		KR 10-2018-0026279 A	2018/03/12
		US 10800825 B2	2020/10/13
		US 11459367 B2	2022/10/04
		US 2019-0218267 A1	2019/07/18
		US 2020-0399336 A1	2020/12/24