

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2021년 6월 3일 (03.06.2021)



(10) 국제공개번호

WO 2021/107635 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 5/0783 (2010.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01) A61K 38/20 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 35/17 (2014.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/016949

(22) 국제출원일: 2020년 11월 26일 (26.11.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2019-0154631 2019년 11월 27일 (27.11.2019) KR
10-2020-0015802 2020년 2월 10일 (10.02.2020) KR

(71) 출원인: 주식회사 지아이셀 (GI CELL, INC.) [KR/KR];
13201 경기도 성남시 중원구 갈마치로288번길 14, 비동
1553호, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 장명호 (JANG, Myung Ho); 03770 서울시 서
대문구 북아현로 1길, 50, 101동902호, Seoul (KR). 홍
천표 (HONG, Chun-Pyo); 13643 경기도 성남시 수정구
위례순환로 220, 5512동 101호, Gyeonggi-do (KR). 양정
윤 (YANG, Zung Yoon); 22009 인천시 연수구 컨벤시
아대로252번길, 70, 1303동 602호, Incheon (KR). 고영준
(KOH, Young Jun); 06800 서울시 서초구 현릉로 8길 58,
109동 501호, Seoul (KR). 이준섭 (LEE, Jun Sub); 12795
경기도 광주시 오포읍 양촌길 103-17, 101호, Gyeong-
gi-do (KR). 최영주 (CHOI, Young Joo); 18479 경기도
화성시 동탄기흥로 479-12, 802동 803호, Gyeonggi-do
(KR).

(74) 대리인: 류종우 등 (RYU, Jong Woo et al.); 06160 서울
시 강남구 테헤란로69길 13, 명지빌딩 4층 선정국제특
허법률사무소, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국
내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU,
ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,
MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,
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 역
내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,
LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유
럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

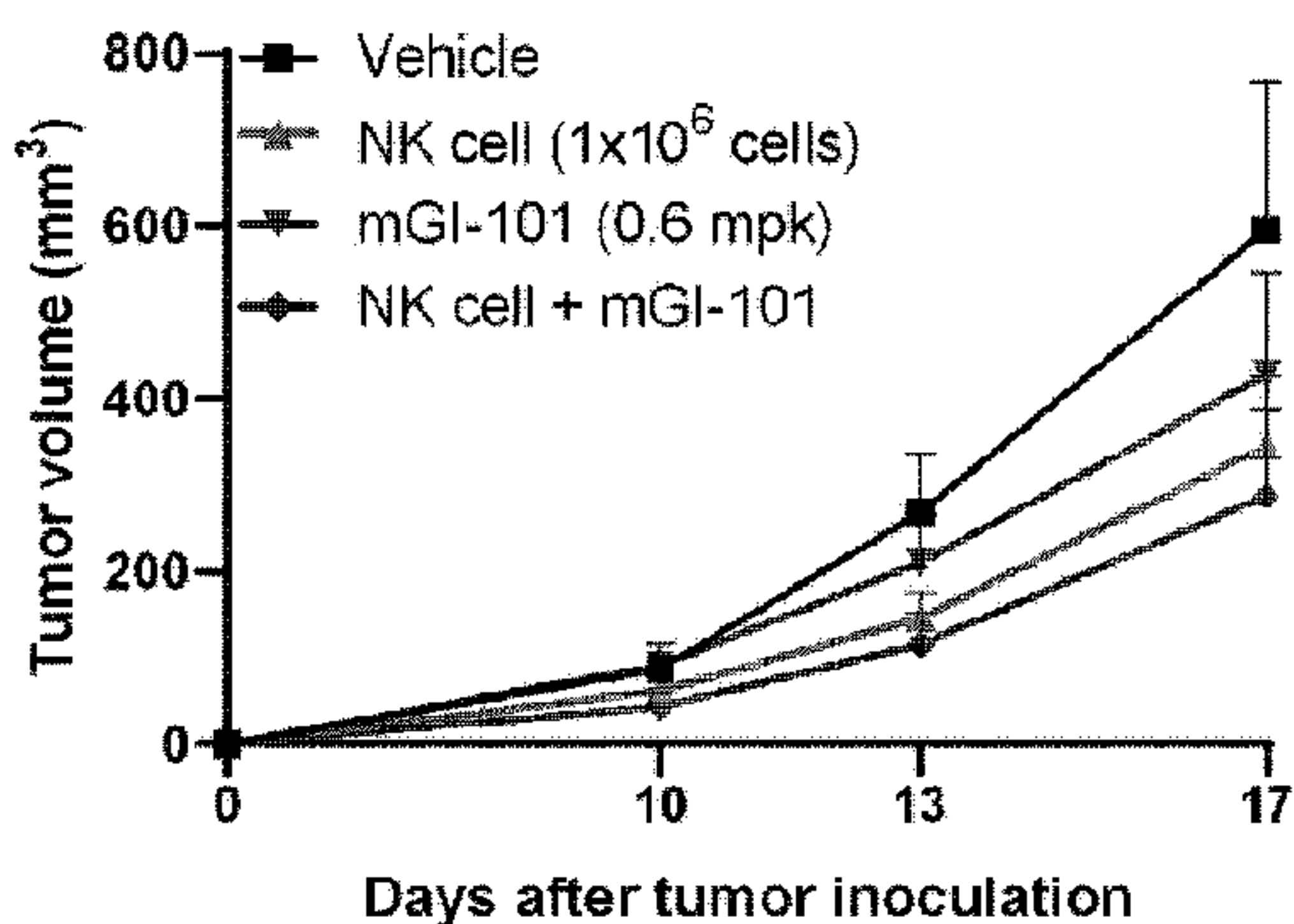
공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수
하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: COMPOSITION FOR ANTICANCER TREATMENT, COMPRISING NK CELLS AND FUSION PROTEIN WHICH
COMPRISES IL-2 PROTEIN AND CD80 PROTEIN

(54) 발명의 명칭: IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 및 NK 세포를 포함하는 항암 치료용 조성물

[도29]



(57) Abstract: Provided is an anticancer agent, comprising, as active ingredients, NK cells and a fusion protein which comprises an IL-2 protein and a CD80 protein. In one specific embodiment, a fusion protein comprising a CD80 fragment, an immunoglobulin Fc and an IL-2 variant can activate immunocytes such as natural killer cells. In addition, since cancer can be effectively inhibited when co-administering with natural killer cells, the pharmaceutical composition increases the immune activity in the body so as to be effectively usable for cancer, thereby having high industrial applicability.

(57) 요약서: IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 및 NK 세포를 유효성분으로 포함하는 항암제를 제공한다. 일 구체예인 CD80 단편, 면역글로불린 Fc 및 IL-2 변이체를 포함하는 융합단백질은 자연살해세포와 같은 면역세포를 활성화시킬 수 있다. 또한, 자연살해세포를 병용 투여할 경우 암을 효과적으로 억제할 수 있어, 상기 약학 조성물은 체내의 면역활성을 증가시켜 암에 효과적으로 활용될 수 있어 산업적 활용 가능성이 높다.

WO 2021/107635 A1

명세서

발명의 명칭: IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 및 NK 세포를 포함하는 항암 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 CD80 단백질 및 IL-2 변이체를 포함하는 융합단백질 및 NK 세포를 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] IL-2(Interleukin 2)는 T 세포 성장 인자(T-cell growth factors, TCGF)로도 불리며, 림프구 생성, 생존 및 항상성에서 중심 역할을 하는 구형의 당단백질이다. IL-2의 단백질 크기는 15.5 kDa 내지 16 kDa이며, 133개 아미노산으로 이루어져 있다. IL-2는 개별적 3개의 서브유닛으로 구성된 IL-2 수용체(IL-2 receptor)에 결합함으로써 각종 면역 작용을 매개한다. 또한, IL-2는 활성화된 T 세포 중 특히, CD4+ 헬퍼 T 세포(helper T cell)에 의해 주로 합성된다. IL-2는 T 세포의 증식 및 분화를 자극하고, 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte, CTL)의 생성 및 말초혈 림프구의 세포독성 세포 및 림포카인-활성화 살해 세포(lymphokine activated killer cell, LAK cell)로의 분화를 유도한다.
- [3] 한편, CD80은 B7-1로 알려져 있으며, 리간드와 결합하여 공동자극 반응(costimulatory responses) 및 공동억제 반응(coinhibitory responses)을 전달하여 면역 조절에 관여하는 막 단백질(membrane-bound proteins) 중 B7 패밀리의 하나이다. CD80은 T 세포, B 세포, 수지상세포 및 단핵구(monocyte)의 표면에 발현하는 막관통 단백질이다. CD80은 CD28, CTLA4 (CD152) 및 PD-L1에 결합하는 것으로 알려져 있다. CD80, CD86, CTLA4 및 CD28은 공동자극-공동억제 시스템에 관여한다. 예를 들어, T 세포의 활성을 조절하고, 증식, 분화 및 생존에 관여한다.
- [4] 또한, 자연살해세포(natural killer cell, 이하 NK 세포)는 암세포를 제거하여 항암 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Loris Zamai *et.al.*, *J. Immunol.*, 178:4011-4016, 2007). NK 세포의 활성화는 다양한 활성화 및 억제 수용체 신호전달 균형에 의하여 조절된다. NK 세포의 항암 활성 또한 그 표면에 존재하는 다양한 면역수용체(immune receptor)를 통해 암세포를 구분하여 이루어지는 것으로 알려져 있다. 정상 세포는 MHC(major histocompatibility complex) Class I이 세포에 존재하므로 NK 세포의 억제 수용체의 의해 인식되어 공격을 받지 않으나, 암세포 또는 감염된 일부 세포는 MHC Class I이 감소하거나 또는 NK 세포 활성화 수용체에 대한 리간드(ligand)를 가지는 이유로 NK 세포에 의하여 제거된다. NK 세포는 암세포 외에도 암 줄기세포(cancer stem cell)를 제거할 수 있어 암의 발생, 증식, 전이를 억제할 뿐 아니라 완치 후 암의 재발을 저감시킬 수 있는 치료제의 개발원으로 각광받고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 이에 본 발명자들은 안전하고 효과적인 IL-2를 개발하기 위해 연구한 결과, IL-2 단백질과 CD80 단백질을 한 분자 내에 포함하는 신규한 융합단백질 이량체와 자연살해세포의 병용 투여시 항암 효과에 뛰어난 것을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [6] 상기 목적 달성을 위해, 본 발명의 일 측면은, IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 이량체 및 자연살해세포를 유효성분으로 포함하는 항암제를 제공한다.

발명의 효과

- [7] IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질은 면역세포를 활성화시킬 수 있을 뿐 아니라 자연살해세포와 병용 투여할 경우, 시너지 효과가 나타남을 확인하였다. 따라서, 상기 병용 투여 요법은 암 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [8] 도 1은 본 발명에서 사용된 융합단백질의 일 제조예를 도식화한 것이다.
- [9] 도 2는 수득한 융합단백질(GI-101)을 SDS-PAGE로 확인한 것이다.
- [10] 도 3은 수득한 융합단백질(GI-101)을 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로 분석한 것이다.
- [11] 도 4는 수득한 Fc-IL2v2 융합단백질을 SDS-PAGE로 확인한 것이다.
- [12] 도 5는 수득한 Fc-IL2v2 융합단백질을 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로 분석한 것이다.
- [13] 도 6은 수득한 hCD80-Fc 융합단백질을 SDS-PAGE로 확인한 것이다.
- [14] 도 7은 수득한 hCD80-Fc 융합단백질을 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로 분석한 것이다.
- [15] 도 8은 자연살해세포 없이 K562 세포주의 단독 배양시(E/T ratio = 0/1), GI-101 또는 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리에 따른 암세포 생존 능력을 확인한 결과를 나타낸 것이다. 여기에서, E는 effector cell로 자연살해세포(NK cell)를 나타내고, T는 target cell로 K562 암세포주를 나타낸다.
- [16] 도 9는 자연살해세포 없이 MDA-MB-231 세포주의 단독 배양시(E/T ratio = 0/1), GI-101 또는 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리에 따른 암세포 생존 능력을 확인한 결과를 나타낸 것이다. 여기에서, E는 effector cell로 NK 세포를 나타내고, T는 target cell로 MDA-MB-231 암세포주를 나타낸다.
- [17] 도 10은 자연살해세포 없이 HCT-116 세포주의 단독 배양시(E/T ratio = 0/1), GI-101 또는 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리에 따른 암세포 생존 능력을 확인한 결과를 나타낸 것이다. 여기에서, E는 effector cell로 NK 세포를 나타내고, T는 target cell로 HCT-116 암세포주를 나타낸다.

- [18] 도 11은 자연살해세포 없이 A549 세포주의 단독 배양시($E/T \text{ ratio} = 0/1$), GI-101 또는 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리에 따른 암세포 생존 능력을 확인한 결과를 나타낸 것이다. 여기에서, E는 effector cell로 NK 세포를 나타내고, T는 target cell로 A549 암세포주를 나타낸다.
- [19] 도 12는 K562 세포주(target cell)와 자연살해세포(effector cell)를 $E/T \text{ ratio} = 1/3$ 으로 공배양시 병용물질 GI-101 또는 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리에 따른 암세포 생존 능력을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [20] 여기에서, Y축=0은 최초 파종 시점의 암세포의 생존 신호(Red signal)의 범위를 0점으로 한 것이다. Y축>0인 경우 파종 시점 이후 암세포의 생존 신호가 잡히는 범위가 증가된 경우로, 세포 증가속도가 사멸속도보다 빠름(세포 증가속도>사멸속도)을 나타낸다. 즉, 암세포의 숫자가 증가한 것으로 볼 수 있다. 다만, 증가량의 값이 낮을수록 암세포의 증식을 억제한 것으로 간주한다. 한편, 음수값은 최초 파종 시점에서 확인되는 생존 암세포 대비 측정되는 생존 암세포 면적이 작아질 경우 음수값으로 나타내며, 세포 증가속도가 사멸속도보다 느림(세포 증가속도<사멸속도)을 나타낸다. 즉, 최초 파종시 측정되는 면적보다 작아지는 경우 음수값으로 나타낸다. 따라서, 음수값이 클수록 암세포의 증식 억제뿐만 아니라 사멸까지도 연계될 수 있음을 암시한다.
- [21] 도 13은 K562 세포주와 자연살해세포를 $E/T \text{ ratio} = 1/1$ 로 공배양시 병용물질 GI-101 또는 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리에 따른 암세포 생존 능력을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [22] 도 14는 K562 세포주와 자연살해세포를 $E/T \text{ ratio} = 3/1$ 로 공배양시 병용물질 GI-101 또는 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리에 따른 암세포 생존 능력을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [23] 도 15는 K562 세포주와 자연살해세포를 $E/T \text{ ratio} = 10/1$ 로 공배양시 병용물질 GI-101 또는 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리에 따른 암세포 생존 능력을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [24] 도 16은 MDA-MB231 세포주(target cell)와 자연살해세포(effector cell)를 $E/T \text{ ratio} = 1/3$ 으로 공배양시 병용물질 GI-101 또는 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리에 따른 암세포 생존 능력을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [25] 도 17은 MDA-MB231 세포주와 자연살해세포를 $E/T \text{ ratio} = 1/1$ 로 공배양시 병용물질 GI-101 또는 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리에 따른 암세포 생존 능력을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [26] 도 18은 MDA-MB231 세포주와 자연살해세포를 $E/T \text{ ratio} = 3/1$ 로 공배양시 병용물질 GI-101 또는 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리에 따른 암세포 생존 능력을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [27] 도 19는 MDA-MB231 세포주와 자연살해세포를 $E/T \text{ ratio} = 10/1$ 로 공배양시 병용물질 GI-101 또는 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리에 따른 암세포 생존 능력을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

- [28] 도 20은 HCT-116 세포주(target cell)와 자연살해세포(effector cell)를 E/T ratio = 1/3으로 공배양시 병용물질 GI-101 또는 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리에 따른 암세포 생존 능력을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [29] 도 21은 HCT-116 세포주와 자연살해세포를 E/T ratio = 1/1로 공배양시 병용물질 GI-101 또는 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리에 따른 암세포 생존 능력을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [30] 도 22는 HCT-116 세포주와 자연살해세포를 E/T ratio = 3/1로 공배양시 병용물질 GI-101 또는 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리에 따른 암세포 생존 능력을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [31] 도 23은 HCT-116 세포주와 자연살해세포를 E/T ratio = 10/1로 공배양시 병용물질 GI-101 또는 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리에 따른 암세포 생존 능력을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [32] 도 24는 A549 세포주(target cell)와 자연살해세포(effector cell)를 E/T ratio = 1/3으로 공배양시 병용물질 GI-101 또는 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리에 따른 암세포 생존 능력을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [33] 도 25는 A549 세포주와 자연살해세포를 E/T ratio = 1/1로 공배양시 병용물질 GI-101 또는 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리에 따른 암세포 생존 능력을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [34] 도 26은 A549 세포주와 자연살해세포를 E/T ratio = 3/1로 공배양시 병용물질 GI-101 또는 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리에 따른 암세포 생존 능력을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [35] 도 27은 A549 세포주와 자연살해세포를 E/T ratio = 10/1로 공배양시 병용물질 GI-101 또는 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리에 따른 암세포 생존 능력을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [36] 도 28은 CT26 이식 발암종 마우스 모델을 대상으로 mGI-101 및/또는 NK 세포의 병용 투여 일정을 나타낸 모식도이다.
- [37] 도 29는 CT26 이식 발암종 마우스 모델에서 NK 세포 및 mGI-101 병용 투여에 따른 종양 성장 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [38] 도 30은 CT26 이식 발암종 마우스 모델에서 NK 세포 및 mGI-101 병용 투여에 따른 종양 성장 억제율을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [39] 도 31은 CT26 이식 발암종 마우스 모델에서 각 처리군(Vehicle, NK cell, mGI-101, NK cell + mGI-101)의 개별 실험 동물의 종양 성장 정도를 측정하여 나타낸 것이다.
- [40] 도 32는 CT26 이식 발암종 마우스 모델에서 대조군(Vehicle)의 개별 실험 동물의 종양 성장 정도를 측정하여 나타낸 것이다.
- [41] 도 33은 CT26 이식 발암종 마우스 모델에서 자연살해세포(NK cell) 처리군의 개별 실험 동물의 종양 성장 정도를 측정하여 나타낸 것이다.
- [42] 도 34는 CT26 이식 발암종 마우스 모델에서 mGI-101 처리군의 개별 실험

동물의 종양 성장 정도를 측정하여 나타낸 것이다.

- [43] 도 35는 CT26 이식 발암종 마우스 모델에서 자연살해세포와 mGI-101 병용 처리군의 개별 실험 동물의 종양 성장 정도를 측정하여 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [44] 본 발명의 일 측면은, IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 및 NK 세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [45] 본 발명의 또 다른 측면은, IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 및 NK 세포를 유효성분으로 포함하는 암 질환 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [46] **자연살해세포**
- [47] 본 명세서에서 사용한 용어, "NK 세포"는 자연살해세포(natural killer cell, 이하 NK 세포)를 의미하며, 선천적 면역세포 중 하나로 다양한 대식세포(macrophage), T 세포(T cell)와 직접적으로 상호작용하거나 또는 사이토카인(cytokine)을 생성함으로써 면역반응 조절에 관여하며, 이를 통하여 자가면역 질환 등에 중요한 역할을 하는 세포이다. 본 발명에 있어서, NK 세포는 비장 또는 골수에서 분리될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 구체적으로, 상기 NK 세포는 자가 또는 타가에서 수득한 세포일 수 있다.
- [48] 또한, 상기 NK 세포는 포유동물 또는 인간에서 유래하는 것일 수 있다. 바람직하게는 NK 세포 치료를 받고자 하는 개체에서 수득한 것일 수 있다. 이때, 상기 NK 세포는 개체의 혈액에서 직접 분리하여 사용하거나, 개체에서 수득한 미성숙 NK 세포 또는 줄기세포를 분화시켜 사용할 수 있다.
- [49] 또한, 상기 자연살해세포는 i) PBMC(peripheral blood mononuclear cell)로부터 CD3를 발현하지 않는 세포를 분리하는 단계; ii) 상기 단계에서 분리된 CD3를 발현하지 않는 세포로부터 CD56을 발현하는 세포를 분리하는 단계; 및 iii) IL-2 또는 이의 변이체 및 CD80 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 이량체 존재 하에 상기 분리된 세포를 배양하는 단계를 통해 수득된 것일 수 있다.
- [50] 또한, 상기 자연살해세포는 i) PBMC로부터 CD3를 발현하지 않는 세포를 분리하는 단계; 및 ii) IL-2 또는 이의 변이체 및 CD80 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 이량체 존재 하에 상기 분리된 세포를 배양하는 단계를 통해 수득된 것일 수 있다.
- [51] 또한, 상기 자연살해세포는 i) PBMC로부터 CD56을 발현하는 세포를 분리하는 단계; 및 ii) IL-2 또는 이의 변이체 및 CD80 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 이량체 존재 하에 상기 분리된 세포를 배양하는 단계를 통해 수득된 것일 수 있다.
- [52] **IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질**
- [53] 본 명세서에서 사용하는 용어, "IL-2" 또는 "인터루킨-2"는 달리 언급되지 않는 한, 포유동물, 예를 들어, 영장류(예, 인간) 및 설치류(예, 마우스 및 래트)를

포함하여 임의의 척추동물 공급원으로부터 수득한 임의의 야생형 IL-2를 의미한다. 상기 IL-2는 동물 세포에서 수득된 것일 수도 있으나, IL-2를 생산할 수 있는 재조합 세포로부터 수득된 것도 포함한다. 또한, 상기 IL-2는 야생형 IL-2 또는 이의 변이체일 수 있다.

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

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

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

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

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

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

IL-2의 변이체는 서열번호 35의 아미노산 서열에서 58번째, 62번째, 65번째, 81번째 또는 92번째 아미노산 중 적어도 어느 하나가 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다. 이들은 각각 서열번호 10의 아미노산 서열의 38번째, 42번째, 45번째, 61번째 및 72번째 아미노산 잔기에 각각 해당한다. 일 구체예에 따르면, IL-2 활성이 유지되는 한, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 혹은 10개의 아미노산이 치환될 수 있다. 또 다른 구체예에 따르면, 1개에서 5개까지의 아미노산이 치환될 수 있다.

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

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

서열에서 42번째, 45번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 45번째, 61번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다.

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

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

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

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

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

- [67] 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 45번째 아미노산인 티로신은 티로신을 제외한 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 45번째 아미노산인 티로신은 알라닌으로 치환(Y45A)될 수 있다.
- [68] 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 61번째 아미노산인 글루탐산은 글루탐산을 제외한 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 61번째 아미노산인 글루탐산은 아르기닌으로 치환(E61A)될 수 있다.
- [69] 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 72번째 아미노산인 루신은 루신을 제외한 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 72번째 아미노산인 루신은 글리신으로 치환(L72G)될 수 있다.
- [70] 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 R38A, F42A, Y45A, E61R 및 L72G로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 치환이 일어난 것일 수 있다.
- [71] 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A, Y45A, E61R 및 L72G로 구성된 군에서 선택되는 위치에서 두 군데, 세 군데, 네 군데 또는 다섯 군데의 위치에서 아미노산 치환이 일어날 수 있다.
- [72] 또한, 상기 IL-2 변이체는 두 군데의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 R38A 및 F42A로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A 및 Y45A로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A 및 E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A 및 Y45A로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A 및 E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다.
- [73] 나아가, 상기 IL-2 변이체는 세 군데의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A 및 Y45A로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A 및 E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, Y45A, E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, Y45A 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로

상기 IL-2 변이체는 F42A, Y45A 및 E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A, Y45A 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 Y45A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다.

- [74] 또한, 상기 IL-2 변이체는 네 군데의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A, Y45A 및 E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A, Y45A 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, Y45A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A, Y45A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다.
- [75] 나아가 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A, Y45A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다.
- [76] 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 일 구체예는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 하기 (a) 내지 (d) 조합 중 선택되는 어느 하나의 조합의 치환이 일어난 것일 수 있다:
- [77] (a) R38A/F42A;
- [78] (b) R38A/F42A/Y45A;
- [79] (c) R38A/F42A/E61R; 또는
- [80] (d) R38A/F42A/L72G.
- [81] 이때, IL-2가 서열번호 35의 아미노산 서열을 가질 경우, 서열번호 10과 상보적으로 대응되는 위치에 아미노산 치환을 가질 수 있다. 또한, IL-2가 서열번호 35의 아미노산 서열의 단편인 경우에도, 서열번호 10과 상보적으로 대응되는 위치의 아미노산이 치환될 수 있다.
- [82] 구체적으로, 상기 IL-2의 변이체는 서열번호 6, 22, 23 또는 24의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [83] 또한, 상기 IL-2 변이체는 생체 내에서 낮은 독성을 가지는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다. 이때, 상기 생체 내에서 낮은 독성이란, IL-2가 IL-2 수용체의 알파 체인(IL-2R α)과 결합하여 유발되는 부작용일 수 있다. 상기 IL-2와 IL-2R α 결합에 의한 부작용을 개선시키기 위해서 다양한 IL-2 변이체가 개발되었으며, 이러한 IL-2 변이체는 미국특허 제5,229,109호 및 대한민국특허 제10-1667096호에 개시된 것들을 사용할 수 있다. 특히, 본 출원에서 기술되는 IL-2의 변이체는 IL-2 수용체의 알파 체인(IL-2R α)과 결합력이 낮아 생체내 독성이 야생형 IL-2에 비해 낮다.
- [84] 본 명세서에서 사용하는 용어, "CD80"은 "B7-1"로도 불리며, 수지상세포, 활성화된 B 세포 및 단핵구에 존재하는 막단백질이다. CD80은 T 세포의

활성화와 생존에 필수적인 공자극 신호를 제공한다. CD80은 T 세포 표면에 존재하는 서로 다른 두 단백질인 CD28 및 CTLA-4에 대한 리간드로 알려져 있다. CD80은 288개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 구체적으로 서열번호 11의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 또한, 본 명세서에서 "CD80 단백질"은 전장 CD80 또는 CD80 단편을 의미한다.

[85] 본 명세서에서 사용하는 용어, "CD80 단편"이란, CD80의 절단형을 의미한다. 또한, 상기 CD80 단편은 CD80의 세포외도메인일 수 있다. CD80 단편의 일 구체예로는 CD80의 신호서열인 N-말단으로부터 1번째 내지 34번째의 아미노산이 제외된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 35번째 내지 288번째의 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 또한, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 35번째 내지 242번째 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 또한, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 35번째 내지 232번째 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 또한, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 35번째 내지 139번째 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 또한, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 142번째 내지 242번째 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 상기 일 실시예로 CD80 단편은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

[86] 또한, 상기 IL-2 단백질 및 상기 CD80 단백질은 링커 혹은 캐리어(carrier)에 의해 결합된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 또는 이의 변이체 및 상기 CD80(B7-1) 또는 이의 단편은 링커 혹은 캐리어에 의해 결합된 것일 수 있다. 본 명세서에서 링커와 캐리어는 호환적으로 사용되기도 한다.

[87] 상기 링커는 두 개의 단백질을 연결시켜준다. 링커의 일 구체예로는 1개 내지 50개의 아미노산, 알부민 또는 이의 단편, 또는 면역글로불린의 Fc 도메인 등을 포함할 수 있다. 이때, 상기 면역글로불린의 Fc 도메인은 면역글로불린의 중쇄 불변 영역 2(CH2) 및 중쇄 불변 영역 3(CH3)을 포함하며, 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 및 경쇄 불변 영역 1(CH1)을 포함하지 않는 단백질을 의미한다. 상기 면역글로불린은 IgG, IgA, IgE, IgD 또는 IgM일 수 있으며, 바람직하게는 IgG4일 수 있다. 이때, 야생형 면역글로불린 G4의 Fc 도메인은 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

[88] 또한, 상기 면역글로불린의 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인 뿐만 아니라, Fc 도메인 변이체일 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용하는 용어 "Fc 도메인 변이체"는 야생형 Fc 도메인의 당쇄 형태(glycosylation pattern)와 다르거나, 야생형 Fc 도메인에 비해 증가된 당쇄, 야생형 Fc 도메인에 비해 감소한 당쇄, 또는 당쇄가 제거된(deglycosylated) 형태일 수 있다. 또한 무당쇄(aglycosylated) Fc 도메인도 포함된다. Fc 도메인 혹은 변이체는 배양조건 혹은 호스트의 유전자 조작을 통해 함량이 조절된 시알산(sialic acid), 푸코실화(fucosylation), 당화(glycosylation)를 갖도록 한 것일 수 있다.

- [89] 또한, 화학적 방법, 효소적 방법 및 미생물을 사용한 유전공학적 엔지니어링 방법 등과 같이 통상적인 방법으로 면역글로불린의 Fc 도메인의 당쇄를 변형시킬 수 있다. 또한, 상기 Fc 도메인 변이체는 면역글로불린 IgG, IgA, IgE, IgD 또는 IgM의 Fc 영역이 혼합된 형태일 수 있다. 또한, 상기 Fc 도메인 변이체는 상기 Fc 도메인의 일부 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 형태일 수 있다. 상기 Fc 도메인 변이체의 일 구체예로는 서열번호 12의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [90] 융합단백질은 Fc 도메인을 링커(혹은 캐리어)로 하여 이의 N-말단과 C-말단에 각각 CD80과 IL-2 단백질이 연결되거나 혹은 IL-2와 CD80이 연결된 구조를 가질 수 있다(도 1). Fc 도메인의 N-말단 혹은 C-말단과 CD80 혹은 IL-2의 연결은 임의적으로 링커 펩타이드에 의해 이루어질 수 있다.
- [91] 구체적으로, 상기 융합단백질은 하기 구조식 (I) 또는 (II)로 이루어진 것일 수 있다:
- [92] N'-X-[링커(1)]_n-Fc 도메인-[링커(2)]_m-Y-C' (I)
- [93] N'-Y-[링커(1)]_n-Fc 도메인-[링커(2)]_m-X-C' (II)
- [94] 이때, 상기 구조식 (I) 및 (II)에 있어서,
- [95] 상기 N'은 융합단백질의 N-말단이고,
- [96] 상기 C'는 융합단백질의 C-말단이며,
- [97] 상기 X는 CD80 단백질이고,
- [98] 상기 Y는 IL-2 단백질이며,
- [99] 상기 링커(1) 및 링커(2)는 펩타이드 링커이고,
- [100] 상기 n 및 m은 각각 독립적으로, 0 또는 1이다.
- [101] 바람직하게는, 상기 융합단백질은 구조식 (I)로 이루어진 것일 수 있다. 상기 IL-2 단백질은 상술한 바와 같다. 또한, 상기 CD80 단백질은 상술한 바와 같다. 일 구체예에 따르면, IL-2 단백질은 야생형 IL-2와 비교하여 하나에서 다섯개까지의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체일 수 있다. CD80 단백질은 야생형 CD80의 N-말단 혹은 C-말단으로부터 연속적으로 약 34개까지의 아미노산 잔기가 결실된(truncated) 단편일 수 있다. 혹은 CD80 단백질은 T-세포 표면 수용체(T cell surface receptors) CTLA-4와 CD28에 결합하는 활성을 갖는 세포외 면역글로불린-유사 도메인일 수 있다.
- [102] 구체적으로, 상기 융합단백질은 서열번호 9, 26, 28 또는 30의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 또 다른 구체예에 따르면, 융합단백질은 서열번호 9, 26, 28 또는 30의 아미노산 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 혹은 100%의 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이때, 동일성은, 예를 들어, 퍼센트 상동성, NCBI(National Center of Biotechnology Information)의 BlastN software과 같은 상동성 비교 소프트웨어를 통해 결정될 수 있다.
- [103] 상기 CD80 단백질과 Fc 도메인의 사이에는 펩타이드 링커(1)가 포함될 수

있다. 상기 펩타이드 링커(1)은 5개 내지 80개의 연속된 아미노산, 20개 내지 60개의 연속된 아미노산, 또는 25개 내지 50개의 연속된 아미노산, 또는 30개 내지 40개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 일 구체예로 펩타이드 링커(1)은 30개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 또한, 펩타이드 링커(1)은 적어도 하나의 시스테인을 포함할 수 있다. 구체적으로, 하나, 두 개 또는 세 개의 시스테인을 포함할 수 있다. 또한, 상기 펩타이드 링커(1)은 면역글로불린의 힌지에서 유래된 것일 수 있다. 한 구체예에서는, 상기 펩타이드 링커(1)이 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커일 수 있다.

[104] 상기 펩타이드 링커(2)는 1개 내지 50개의 연속된 아미노산, 또는 3개 내지 30개의 연속된 아미노산, 또는 5개 내지 15개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 일 구체예로 상기 펩타이드 링커(2)는 $(G4S)_n$ (이때, n 은 1 내지 10의 정수)일 수 있다. 이때, $(G4S)_n$ 에서 n 은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10일 수 있다. 일 실시예로, 상기 펩타이드 링커(2)가 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커일 수 있다.

[105] 본 발명의 다른 측면은, 상기 IL-2 단백질 및 상기 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 두 개가 결합된 이량체 및 NK 세포를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 IL-2 또는 이의 변이체 및 CD80 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질은 상술한 바와 같다.

[106] 이때, 이량체를 구성하는 융합단백질 간의 결합은 링커 내에 존재하는 시스테인에 의해 이황화 결합에 의해 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이량체를 구성하는 융합단백질은 동일한 것일 수도 있으나, 서로 상이한 융합단백질일 수 있다. 바람직하게는, 상기 이량체는 동형이량체(homodimer)인 것일 수 있다. 상기 이량체를 구성하는 융합단백질의 일 실시예는 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 단백질일 수 있다.

[107] 본 발명에 있어서, 상기 암은 위암, 간암, 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 자궁경부암, 갑상선암, 후두암, 급성 골수성 백혈병, 뇌종양, 신경모세포종, 망막 모세포종, 두경부암, 침샘암 및 림프종으로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

[108] 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 암 치료용 또는 예방용 약학 조성물에서 그 유효성분은 항암 치료 효과를 나타낼 수 있는 한, 용도, 제형, 배합 목적 등에 따라 임의의 양(유효량)으로 포함될 수 있는데, 통상적인 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001 중량% 내지 20.0 중량% 범위 내에서 결정될 것이다. 여기서 "유효량"이란 항암 치료 효과를 유도할 수 있는 유효성분의 양을 말한다. 이러한 유효량은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 실험적으로 결정될 수 있다.

[109] 본 명세서에서 사용하는 용어, "치료"는 치료학적 처리 및 예방적 처리를 모두 포함하는 의미로 사용될 수 있다. 이때, 예방은 개체의 병리학적 상태 또는

질환을 완화시키거나 감소시키는 의미로 사용될 수 있다. 일 구체예에서, 용어 "치료"는 인간을 포함한 포유류에서 질환을 치료하기 위한 적용이나 어떠한 형태의 투약을 모두 포함한다. 또한, 상기 용어는 질환 또는 질환의 진행을 억제하거나 늦추는 것을 포함하며; 손상되거나, 결손된 기능을 회복시키거나, 수리하여, 질환을 부분적이거나 완전하게 완화시키거나; 또는 비효율적인 프로세스를 자극하거나; 심각한 질환을 완화하는 의미를 포함한다.

- [110] 본 명세서에서 사용하는 용어, "효능(efficacy)"은 1년, 5년, 또는 10년과 같이 일정 기간에 걸쳐 생존 또는 질병이 없는 상태에서 생존(disease-free survival)과 같은 하나 이상의 파라미터에 의해 결정될 수 있다. 뿐만 아니라, 상기 파라미터는 개체에서 적어도 하나의 종양의 크기가 억제되는 것을 포함할 수 있다.
- [111] 생체이용률과 같은 약동학적 파라미터(Pharmacokinetic parameters) 및 클리어런스율(clearance rate)과 같은 기본적인 파라미터(underlying parameters)도 효능에 영향을 줄 수 있다. 따라서, "향상된 효능(예를 들어, 효능의 개선)"은 향상된 약동학적 파라미터 및 향상된 효능에 기인할 수 있으며, 시험 동물 또는 인간 대상체에서 클리어런스율 및 종양 성장을 비교하거나, 생존, 재발을 또는 질병이 없는 상태에서 생존과 같은 파라미터를 비교하여 측정될 수 있다.
- [112] 여기서 "치료학적으로 유효한 양" 또는 "약학적으로 유효한 양"이란 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 화합물 또는 조성물의 양으로서, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미한다. 상기 유효량의 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 일 구체예에서 치료학적으로 유효한 양은 암을 치료하는데 효과적인 약물의 양을 의미한다.
- [113] 이때, 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 환자에게 전달하기에 적절한 비-독성 물질이면 어떠한 담체라도 가능하다. 증류수, 알코올, 지방, 왁스 및 비활성 고체가 담체로 포함될 수 있다. 약물학적으로 허용되는 애쥬번트(완충제, 분산제) 또한 약학 조성물에 포함될 수 있다.
- [114] 구체적으로, 상기 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하여 당업계에 공지된 통상의 방법으로 투여 경로에 따라 비경구용 제형으로 제조될 수 있다. 여기서 "약제학적으로 허용되는" 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적용 가능한 이상의 독성을 지니지 않는다는 의미이다.
- [115] 상기 약학적 조성물이 비경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 주사제, 경피 투여제, 비강 흡입제 및 좌제의

형태로 제제화될 수 있다. 주사제로 제제화할 경우 적합한 담체로서는 멸균수, 에탄올, 글리세롤이나 프로필렌 글리콜 등의 폴리올 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline)나 주사용 멸균수, 5% 텍스트로스 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 약제학적 조성물의 제제화와 관련하여서는 당업계에 공지되어 있으며, 구체적으로 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)] 등을 참조할 수 있다. 상기 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주된다.

- [116] 상기 약학적 조성물 중 이량체의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 성별, 연령, 환자의 중증도, 투여 경로에 따라 1일 0.01 ug/kg 내지 10 g/kg 범위, 또는 0.01 mg/kg 내지 1 g/kg 범위일 수 있다. 투여는 1일 1회 또는 수회로 나누어 이루어질 수 있다. 이러한 투여량은 어떠한 측면으로든 본원 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 아니된다. 또한, 상기 약학적 조성물 중 NK 세포는 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{13}$ 세포, $1 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^{11}$ 세포로 투여될 수 있으나, 약리 효과를 나타내는 범위에서 적절히 조절될 수 있다.
- [117] 상기 약학적 조성물이 적용(처방)될 수 있는 대상은 포유동물 및 사람이며, 특히 사람인 경우가 바람직하다. 본원의 약학 조성물은 유효성분 이외에, 항암 활성의 상승, 보강을 위하여 이미 안전성이 검증되고 항암 치료 효과를 갖는 것으로 공지된 임의의 화합물이나 천연 추출물을 추가로 포함할 수 있다.
- [118] 본 발명의 또 다른 측면은, 암을 치료하기 위한 IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 이량체 및 NK 세포의 용도를 제공한다.
- [119] 본 발명의 또 다른 측면은, 암의 치료 효과를 향상시키기 위한 IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 이량체 및 NK 세포의 용도를 제공한다.
- [120] 본 발명의 또 다른 측면은, 암 치료용 약제를 제조하기 위한 IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 이량체 및 NK 세포의 용도를 제공한다.
- [121] 본 발명의 또 다른 측면은, IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 또는 상기 융합단백질 2개가 결합된 융합단백질 이량체 및 NK 세포를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암을 치료하는 방법, 및/또는 치료 효과를 향상시키는 방법을 제공한다.
- [122] 이때, 상기 융합단백질 이량체와 NK 세포는 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 이때, 투여 순서는 융합단백질 이량체가 먼저 투여된 후, NK 세포가 투여될 수 있으며, NK 세포가 먼저 투여된 후, 융합단백질 이량체가 투여될 수 있다.
- [123] 상기 개체는 암을 앓고 있는 개체일 수 있다. 또한 상기 개체는 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다. 상기 IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 또는 상기 융합단백질 2개가 결합된 융합단백질 이량체는 상술한 바와 같다.
- [124] 상기 융합단백질 또는 융합단백질 이량체 및 NK 세포의 투여경로, 투여량 및 투여횟수는 환자의 상태 및 부작용의 유무에 따라 다양한 방법 및 양으로 대상에게 투여될 수 있고, 최적의 투여방법, 투여량 및 투여횟수는 통상의

기술자가 적절한 범위로 선택할 수 있다. 또한, 상기 융합단백질 또는 융합단백질 이량체는 치료하고자 하는 질환에 대하여 치료 효과가 공지된 다른 약물 또는 생리학적 활성물질과 병용하여 투여되거나, 다른 약물과의 조합 제제 형태로 제형화될 수 있다.

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

발명의 실시를 위한 형태

- [126] 이하, 본원 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본원 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본원 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.
- [127] **I. IL-2 및 CD80을 포함하는 융합단백질 이량체의 준비**
- [128] **제조예 1. hCD80-Fc-IL-2 변이체(2M) 이량체의 제조: GI-101**
- [129] 인간 CD80 단편, Fc 도메인 및 IL-2 변이체를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), CD80 단편(서열번호 2), 링커가 결합된 Ig 힌지(서열번호 3), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 두 개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(2M)(R38A, F42A)(서열번호 6)를 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 8)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 폴리뉴클레오티드를 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 9의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37°C, 125 RPM, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질 이량체를 "GI-101"로 명명하였다.
- [130] 정제는 MabSelect SuRe protein A resin이 포함된 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 25 mM Tris, 25 mM NaCl, pH 7.4의 조건에서 융합단백질을 결합시켰다. 그 후, 100 mM NaCl, pH 3의 100 mM의 아세트산으로 용출하였다. pH 9의 20%의 1 M Tris-HCl를 수거용 튜브에 넣은 후, 융합단백질을 수거하였다. 수거된 융합단백질을 16시간 동안 PBS 버퍼로 투석하여 바꾸어 주었다.

- [131] 그 후, TSKgel G3000SWXL column(TOSOH Bioscience)을 사용하여 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)를 이용하여 시간에 따른 280 nm 파장에서의 흡광도를 측정하여 고농도 융합단백질을 확보하였다. 이때, 분리 정제된 융합단백질은 환원(R) 또는 비-환원(NR) 조건하에서 SDS-PAGE를 실행하고, 코마시블루(coomassie blue)로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 2). NanoDrop을 사용하여 검출시 2.78 mg/ml의 농도로 융합단백질이 포함된 것을 확인하였다. 또한, 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 분석한 결과는 도 3에 나타난 바와 같다.
- [132] **제조예 2. Fc-IL-2 변이체(2M) 이량체의 제조: Fc-IL-2v2**
- [133] Fc 도메인 및 IL-2 변이체를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), Ig 힌지(서열번호 38), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 두 개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(2M)(R38A, F42A)(서열번호 6)를 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 45)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 폴리뉴클레오티드 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 44의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37°C, 125 RPM, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질 이량체를 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질 이량체를 "Fc-IL2v2"로 명명하였다.
- [134] 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 분리 정제된 융합단백질은 환원(R) 또는 비환원(NR) 조건 하에서 SDS-PAGE를 수행하고, 코마시블루로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 4). 그 결과, 상기 융합단백질은 이량체를 형성함을 확인하였다. 또한, 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 분석한 결과는 도 5에 나타난 바와 같다.
- [135] **제조예 3. hCD80-Fc 이량체의 제조: hCD80-Fc**
- [136] 인간 CD80 단편 및 Fc 도메인을 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), CD80 단편(서열번호 2), 링커가 결합된 Ig 힌지(서열번호 3) 및 Fc 도메인(서열번호 4)을 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 39)를 ThermoFisher Scientific사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 폴리뉴클레오티드를 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 40의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37°C, 125 RPM, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질 이량체를 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질 이량체를 "hCD80-Fc"로 명명하였다.
- [137] 정제는 MabSelect SuRe protein A resin이 포함된 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 25 mM Tris, 25 mM NaCl, pH 7.4의 조건에서 융합단백질을

결합시켰다. 그 후, 100 mM NaCl, pH 3의 100 mM의 아세트산으로 용출하였다. pH 9의 20%의 1 M Tris-HCl를 수거용 튜브에 넣은 후, 융합단백질을 수거하였다. 수거된 융합단백질을 16시간 동안 PBS 버퍼로 투석하여 바꾸어 주었다.

- [138] 그 후, TSKgel G3000SWXL column(TOSOH Bioscience)을 사용하여 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)를 이용하여 시간에 따른 280 nm 파장에서의 흡광도를 측정하여 고농도 융합단백질을 확보하였다. 이때, 분리 정제된 융합단백질은 환원(R) 또는 비환원(NR) 조건 하에서 SDS-PAGE를 수행하고, 코마시블루(coomassie blue)로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 6). 그 결과, 상기 융합단백질은 이량체를 형성함을 확인하였다. 또한, 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 분석한 결과는 도 7에 나타낸 바와 같다.

- [139] **제조예 4. mCD80-Fc-IL-2 변이체(2M)의 제조: mGI-101**

- [140] 제조예 1과 같은 방법으로 마우스 유래의 CD80 및 IL-2를 가지는 마우스 형의 GI-101을 제조하였다. 구체적으로, 마우스 CD80, Fc 도메인 및 IL-2 변이체를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), mCD80 단편(서열번호 13), 링커가 결합된 Ig 힌지(서열번호 3), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 두 개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(2M)(R38A, F42A)(서열번호 6)를 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 14)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 폴리뉴클레오티드를 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 47의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37°C, 125 RPM, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질 이량체를 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질 이량체를 "mGI101"로 명명하였다.

- [141] **II. NK 세포의 준비 및 배양**

- [142] **준비예 1. 말초혈액단핵세포(PBMC) 유래 CD3(-)CD56(+) 자연살해세포의 분리**

- [143] CD3(-) 세포를 수득하기 위해, PBMC(peripheral blood mononuclear cell, Zen-Bio. Inc, NC 27709, USA, Cat#: SER-PBMC-200-F)를 ADAM-MC2 자동 세포 계수기(NanoEnTek, (주)코스모진텍 구입)를 이용하여 세포수를 측정하였다. 상기 PBMC를 새로운 튜브로 옮긴 후 300×g, 4°C 온도에서 5분간 원심분리하였다. PBS에 0.5%(v/v) BSA(bovine serum albumin)와 2 mM 농도의 EDTA가 포함된 MACS 버퍼(pH 7.2)를 제조하였다. 원심분리가 끝난 후, 1×10⁷ 세포수 당 80 μl의 MACs 버퍼와 20 μl의 CD3 자성비드(Miltenyi biotech, 130-050-101)를 처리하여 세포 펠렛을 현탁한 후, 4°C 온도에서 15분간 반응시켰다. 세척을 위해, 10 ml MACs 버퍼를 넣고 300×g, 4°C 온도에서 10분간 원심분리한 후, 0.5 ml의 MACs 버퍼에 세포 펠렛을 재현탁하였다.

- [144] LD 컬럼(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany, Cat#: 130-042-901)에 먼저

2 ml의 MACs 버퍼를 흘려준 후, 상기 세포 현탁액을 흘려주었다. 그 후, LD 컬럼을 통과하여 나오는 CD3(-) 세포를 수득하였다. 이때, LD 컬럼 내에 남아있는 세포가 충분히 분리될 수 있도록 2 ml의 MACs 버퍼를 3회 흘려주어 CD3(-) 세포를 수득하였다. 수득한 CD3(-) 세포를 세포 계수기를 이용하여 세포수를 측정한 후, 새로운 튜브에 담아 300×g, 4°C 온도에서 5분간 원심분리하였다. 그 후, 상층액을 제거한 후, 1×10^7 개의 세포수 당 80 μ l의 MACs 버퍼와 20 μ l의 CD56 자성비드(Miltenyi biotech, Cat#: 130-050-401)를 넣고 4°C 온도에서 15분간 반응시켰다. 세척을 위해, 10 ml의 MACs 버퍼를 넣어 300×g, 4°C 온도에서 10분 동안 원심분리한 후, 0.5 ml의 MACs 버퍼에 세포 펠렛을 재현탁하였다.

[145] LS 컬럼(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany, Cat#: 130-042-901)에 먼저 3 ml의 MACs 버퍼를 흘려준 후, 상기 세포 현탁액을 흘려주었다. 이때, LS 컬럼 내에 남아있는 세포가 충분히 분리될 수 있도록 2 ml의 MACs 버퍼를 3회 흘려주었다. 그 후, LS 컬럼을 자성 스탠드(Magnet stand)에서 분리한 후, 5 ml의 MACs 버퍼를 넣고 피스톤으로 압력을 주어 CD3(-)CD56(+) 자연살해세포를 수득하였다. 상기 수득한 CD3(-)CD56(+) 자연살해세포를 새로운 튜브에 담아 300×g, 4°C 온도에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 배양배지에 현탁시켜 세포 계수기를 이용하여 세포수를 측정하였다.

[146] 준비예 2. CD3-CD56+ 자연살해세포의 배양 및 수득

[147] NK Cell Activation/Expansion Kit(Cat#: 130-112-968)(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) 내 포함되어 있는 100 μ l의 CD335 (NKp46)-Biotin 및 100 μ l의 CD2-Biotin을 1.5 mL 마이크로 튜브에 넣고 섞어주었다. 그 후, 500 μ l의 Anti-Biotin MACSiBead Particles를 넣고 섞어주었다. 그 후, 300 μ l의 MACs 버퍼를 넣고 Microtube Rotator를 이용하여 2시간 동안 2°C~8°C에서 섞어주었다.

[148] 그 후, 1×10^6 세포수 당 5 μ l의 NK activation Beads를 새로운 튜브에 옮겨주었다. 그 후, PBS 1 mL을 넣어주고 300×g로 5분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후, 상층액을 제거하고, 사용할 RPMI1640 배지에 5% human AB serum(Cat#:H4522)(Sigma, St. Louis, Missouri, US)이 첨가된 배양배지를 1×10^6 세포수 당 5 μ l 기준으로 추가하여 비드(bead)를 풀어주었다. 상기 준비예 1에서 분리된 CD3-CD56+ 자연살해세포에 접종하였다.

[149] 그 후, 24-웰 플레이트에 상기 CD3-CD56+ 자연살해세포를 파종하고, RPMI1640 배지에 5% human AB serum(Cat#:H4522)(Sigma, St. Louis, Missouri, US) 및 rhIL-2(500 IU/mL)가 첨가된 배양배지를 추가하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에 배양하였다. 이후 2일 간격으로 세포수를 확인하여, 세포가 배양 용기의 80% 이상 차지(Confluency)하는 경우 12-웰 플레이트, 6-웰플레이트, 25T 플라스크 순으로 계대 배양하였으며, 최종적으로 21일 차에 모든 세포를 수득하였다.

[150] 준비예 3. 마우스 유래 자연살해세포의 배양 및 수득

[151] 준비예 3.1. 마우스 비장세포 및 골수 준비

[152] 마우스 유래 자연살해세포를 수득하고자, 우선 마우스 비장세포 및 골수를 준비하였다. 구체적으로, 6주령 암컷 Balb/c(오리엔트바이오)에서 비장과 대퇴골을 적출하고, 최대한 지방과 근육을 제거하였으며, 대퇴골은 부러지지 않게 주의하였다. 적출한 대퇴골은 70% 에탄올에 넣었다가 5 ml의 PBS가 담겨 있는 50 ml의 튜브에 넣고, 비장은 바로 5 ml의 PBS가 담겨있는 50 ml의 튜브로 옮긴 후 얼음에서 보관하였다. 5 ml의 FACS buffer A가 담겨있는 50 ml의 튜브에 70 μ m의 스트레이너를 겹쳐서 비장용과 골수용을 각각 준비하였다. FACS buffer A는 하기의 표 1에 기재된 바와 같이 구성되어 있다.

[153] [표1]

조성			부피	최종 농도
제품		제조사		
FACS buffer A	FBS	Hyclone	15 ml	3%
	EDTA	Welgene	10 ml	10 mM
	HEPES	Welgene	10 ml	20 mM
	PolymyxinB	Merk	300 ml	10 g/ml
	Penicillin/Streptomycin	Biolegend	5 ml	10,000 U/ml penicillin / 10,000 g/ml Streptomycin
	100 mM sodium pyruvate	Gibco	5 ml	1 mM
	PBS	Sigma	to 500 ml	

[154] 시린지(syringe) 막대기를 이용하여 조직을 으갠 후에 그 위에 5 ml의 FACS buffer A를 첨가하여 세포를 수집하였다. 그 다음, 4°C에서 1,300 rpm으로 5분 동안 원심분리하고, 상층액을 제거하였다. 비장은 적혈구를 제거하기 위해 3 ml의 ACK lysis buffer로 풀어준 후, 3분 동안 얼음에서 배양하였다. 3분 후에 총 부피가 20 ml가 되도록 FACS buffer A를 첨가하였다. 이를 볼텍싱하고 나서, 4°C에서 1,300 rpm으로 5분 동안 원심분리하고, 상층액을 제거하였다. 펠렛(Pellet)의 색상이 분홍빛이 될 때까지 위와 같은 과정을 반복하여 적혈구를 제거하고, 10 ml의 FACS buffer A로 풀어주고 세포를 계수하였다.

[155] 골수용 70 μ m 스트레이너 위에 대퇴골 뼈 양쪽 부분을 자르고 10 ml의 FACS buffer A로 채워진 주사기에 1 ml 바늘을 이용하여 뼈 구멍에 넣고 왔다 갔다 하면서 FACS buffer A를 흘려준 후 자른 조직 부분에도 FACS buffer A를 흘려주면서 세포를 수집하였다. 세포 수집 후, 4°C에서 1,300 rpm으로 5분 동안 원심분리한 다음 상층액을 제거하고, 10 ml의 FACS buffer A로 풀어준 후 세포를 계수하였다.

[156] 준비예 3.2. 마우스 NK 세포 분리 및 배양

[157] 상기 준비예 3.1에서 6주령 암컷 Balb/c(오리엔트바이오) 마우스로부터 분리한 비장과 골수에서 NK cell isolation Kit, mouse(#130-115-818)를 사용하여 NK 세포를 분리하였다. 분리 후, 4°C에서 300×g로 원심분리하고 상층액을 제거하였다.

[158] 10^7 개의 세포 당 40 μ l의 MACS 버퍼를 첨가(비장의 경우 600 μ l, 골수의 경우 200 μ l)하여 세포 펠렛을 풀어주고, 10^7 개의 세포 당 40 μ l의 NK 세포 콕테일을 첨가(비장의 경우 150 μ l, 골수의 경우 50 μ l)하였다. 단, 이 경우에 5×10^7 개 이상의 세포는 응집 현상이 나타나므로 나누어서 섞어주었다. 그 다음, 4°C에서 300×g로 원심분리하고 상층액을 제거하였다.

[159] 10^7 개의 세포 당 2 ml의 세척 buffer를 첨가(비장의 경우 30 ml, 골수의 경우 10 ml)하여 세척하고, 4°C에서 300×g로 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 그 다음, 10^7 개의 세포 당 80 μ l의 MACS buffer를 추가(비장의 경우 1.2 ml, 골수의 경우 400 μ l)한 후에, 10^7 개의 세포 당 20 μ l의 항-바이오틴 마이크로비드를 추가(비장의 경우 300 μ l, 골수의 경우 100 μ l)하여 섞고 냉장고에서 10분 동안 배양하였다.

[160] 항-바이오틴 마이크로비드와 섞은 세포 500 μ l를 MS column에 흘려주고 column을 통과한 상층액을 수득하였다. 같은 과정을 되풀이하여, column을 통과한 상층액을 수득하고, 이를 4°C에서 300×g로 원심분리하고 상층액을 제거하였다. GC-RPMI 배지(1×)에 풀어서 세포를 계수하였다(비장: 6.95×10^5 /ml 생존률 59%, 골수: 1.58×10^6 /ml 생존률 64%). GC-RPMI 배지의 조성은 하기의 표 2에 기재된 바와 같다.

[161] [표2]

조성				최종 농도
	제품	제조사	Cat.#	
GC-RPMI I	RPMI 1640	Welgene	LM 011-01	
	Pen-Strep	Welgene	LS 202-02	1×
	Gentamicin	Gibco	15750-060	50 μ g/ml
	Sodium pyruvate	Welgene	LS 013-01	1 mM
	2-Mercaptoethanol	Gibco	21985-023	55 μ M
	NEAA	Gibco	11140050	2 mM
	L-Glutamine	Gibco	25030149	2 mM
	FBS	Hyclone	SH30084.03	10%

[162] 60 mm 배양 용기에 비장과 골수에서 분리한 NK 세포 3.5×10^5 개씩

파종(seeding)한 후, rmIL-2를 50 ng/ml씩 처리하여 14일 동안 배양을 진행하였다.

[163] **III. 암세포 준비 및 발암종 마우스 모델 구축**

[164] 준비예 4. 인간 유래 암종 세포주 및 이의 배양 배지의 준비

[165] 하기 표 3을 참고하여 각 암세포주에 적합한 배양액을 사용하였다.

[166] [표3]

암세포주	유래 생물(organism)	질환	제조사	배양액 조건
K562	Homo sapiens, Human	만성골수성 백혈병	ATCC	RPMI1640 + 10% FBS
MDA-M B-231	Homo sapiens, Human	유방암	한국세포주 은행	High glucose RPMI1640 + 10% FBS
HCT-116	Homo sapiens, Human	대장암	ATCC	McCoy's 5A + 10% FBS
A549	Homo sapiens, Human	폐암	ATCC	RPMI1640 + 10% FBS

[167] 구체적으로, 암세포주 2×10^6 개의 세포를 각 배양액 8 mL에 풀어 25T 플라스크에 배양하였다. 세포 회수시, 부착형(adherent) 타입의 세포의 경우 트립신-EDTA(Trypsin-EDTA, 0.25%)를 1 mL 처리 후 2분 동안 5% CO₂에서 반응시켰다. 그 후, 배양액 5 mL을 추가하여 플라스크로부터 떨어진 세포를 회수하고 300×g에 5분간 원심분리하였다.

[168] 하기 표 4에 암세포주에 대한 구체적인 배양액 조성물을 나타내었다.

[169] [표4]

조성					부피 (volume)	최종 농도
제품			제조사	Cat.#		
RPMI1640 (10% FBS)	기본 성분	RPMI 1640 Medium(1×), liquid	Welgene	LM011-01	500 mL	
		FBS	Hyclone TM	SV30207.02	50 mL	10%
		Penicillin-Streptomycin Solutions(×100)	Welgene	LS 202-02	0.5 mL	1×
High glucose RPMI1640 (10% FBS)	기본 성분	High-glucose RPMI 1640 Medium	ATCC	30-2001	500 mL	
		FBS	Hyclone TM	SV30207.02	50 mL	10%
		Penicillin-Streptomycin Solutions(×100)	Welgene	LS 202-02	0.5 mL	1×
McCoy's (10% FBS)	기본 성분	McCoy`s 5A(ATCC)	ATCC	30-2007	500 mL	
		FBS	Hyclone TM	SV30207.02	50 mL	10%
		Penicillin-Streptomycin Solutions(×100)	Welgene	LS 202-02	0.5 mL	1×

[170] 준비예 5. 마우스 유래 암종 세포주 및 이의 배양 배지의 준비

[171] 생쥐(*Mus musculus*) 결장 암종(colon carcinoma) 세포인 CT26.WT를 ATCC(American Type Culture Collection, USA)로부터 구입하였다(표 5). 실험에 사용할 암종 세포는 해동하여 세포 배양용 플라스크에 넣고 37℃, 5% CO₂ 배양기(MCO-170M, Panasonic, Japan)에서 배양하였다. 세포주 이식일에 배양된 세포를 원심분리 튜브에 넣은 후 수집한 다음, 125×g로 5분 동안 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 그 다음, PBS를 첨가하여 세포 부유액(5×10⁷ cells/mL)을 제조하고 9마리 분량으로 분주하여 투여 전까지 얼음에서 보관하였다.

[172] [표5]

	유래 생물(Organism)	질환	제조사	최종 농도
CT26	Mus musculus, mouse	결장 암종 (colon carcinoma)	ATCC	5×10 ⁵

[173] 암종 세포를 배양하는 배지는 100 mL 당 소 태아 혈청(fetal bovine serum, FBS; 16000-044, Thermofisher scientific, USA), 페니실린-스트렙토마이신(10,000

units/ml의 penicillin 및 10,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 streptomycin; 15140122, Thermofisher scientific, USA) 및 RPMI1640(A1049101, Thermofisher scientific, USA)을 하기 표 6과 같은 조성으로 혼합하여 사용하였다.

[174] [표6]

조성				부피 (volume)	최종 농도
제품		제조사	Cat.#		
암세포 배양 배지	FBS	Thermofisher scientific	16000-044	10 ml	10%
	Penicillin & Streptomycin	Thermofisher scientific	15140122	1 ml	10,000 U/ml penicillin & 10,000 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin
	RPMI 1640	Thermofisher scientific	A1049101	To 100 ml	

- [175] 준비예 6. 발암종 마우스 모델의 준비
- [176] 준비예 6.1. 실험 대상 마우스 검역 및 순화 과정
- [177] 암컷의 12주령 BALB/c 마우스 36마리를 오리엔트바이오로부터 구입하였다. 마우스들은 동물실로 반입하여 5일 동안 순화시킨 후에 실험에 사용하였다. 마우스 반입시에 동물의 외관 검사를 실시하고, 체중을 측정하였다. 5일 동안의 순화 기간 중에 매일 1회 일반 증상을 관찰하고, 순화 기간 종료일에는 체중을 측정한 후에, 일반 증상 및 체중 변화를 확인하여 마우스의 건강 상태를 평가하였고, 이상이 있는 마우스는 CO₂ 가스 마취 하에서 안락사시켰다.
- [178] 실험 대상 마우스의 정보는 하기 표 7에 정리하여 나타내었다.

[179] [표7]

	기원 종 (strain of origin)	구입처	연령	성별
마우스	Balb/c	오리엔트바이오	12주령	암컷

- [180] 준비예 6.2. 암종 세포주의 이식
- [181] 종양 성장 억제 모델에 대하여는, 검역 및 순화 기간 종료 후 익일에 체중을 측정한 후, 건강한 동물에 대하여 준비된 CT26 세포 부유액(5×10^5 cells/0.1 ml)을 분주하고, 일회용 주사기에 충전하여 마우스의 우측 등 부위의 피하에 0.1 ml/head씩 투여하여 이식하였다. 세포주의 이식 후 생착 및 성장 기간 동안 매일 1회 일반 증상을 관찰하였다.
- [182] 준비예 6.3. 종양 성장 억제 마우스 모델의 군 분리

[183] CT26 세포를 이식하고 일정 기간 경과 후에 건강 상태에 이상이 없는 마우스에 대해 종양의 부피 및 체중을 측정하여, 각 군의 평균이 50 mm³에 도달하도록 군 당 9마리씩, 총 4군으로 군 분리하였다.

[184] **IV. NK 세포 및 융합단백질 이량체의 항암 활성 확인: *In vitro***

[185] 실시예 1. 다양한 암종에 대한 NK 세포 및/또는 융합단백질 이량체의 암세포 성장 억제 효과 확인

[186] 96-웰 플레이트에 사용할 플레이트 디자인을 참고하여 0.01% poly-L-ornithine solution(Cat#. P4957)(Sigma aldrich, US)를 각 웰에 50 μ l씩 분주하여 코팅하였다. 그 후, 상온에서 1시간 동안 방치하였다. 1시간 후, 분주된 0.01% poly-L-ornithine solution를 제거하고 상온에서 1시간 동안 완전히 건조시켰다. 4×10^5 cells/mL로 준비된 암세포(Target cell)에 2 μ l의 CellTracker™ Deep Red Dye(Cat# C34565)(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 넣고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 60분간 반응시켜주었다.

[187] 반응 후, 300 $\times$ g로 5분 동안 원심분리하였다. 상층액 제거 후 4×10^5 cells/mL가 되도록 RPMI1640 + 5%hABS 배양액에 풀어주었다. 코팅이 완료된 96-웰 플레이트에 준비된 암세포를 각 웰에 50 μ l씩 분주하였다. 그 후, Incucyte® Live-Cell Analysis system(Satorius, Germany) 기기에 준비된 플레이트를 넣은 후 10분간 안정시켜주었다. RPMI1640 + 5%hABS에 하기 표 8을 참고하여 시험물질이 포함된 배양액을 준비하였다.

[188] [표8]

시험물질명	control	GI-101	CD80-Fc+Fc-IL2v2
시험물질 농도	0 nM	100 nM	CD80-Fc: 100 nM, Fc-IL2v2: 100 nM

[189] 자연살해세포(Effector cell)를 4×10^5 cells/mL가 되도록 RPMI1640 + 5%hABS 배양액에 풀어 준비하였다. 암세포가 분주된 플레이트에 준비예 1 내지 준비예 2에서 제조된 자연살해세포를 하기 표 9를 참고하여 각 웰에 넣은 후 Incucyte® CytoTox(250 nM)가 처리된 배양액 100 μ l를 넣어주었다.

[190] [표9]

E/T ratio	0/1	1/3	1/1	3/1	10/1
NK 세포수	-	6.7×10^3	2×10^4	6×10^4	2×10^5
암세포수	2×10^4	2×10^4	2×10^4	2×10^4	2×10^4

[191] 그 후, Incucyte® Live-Cell Analysis system에 넣고 30분 간격으로 3일간 분석을 진행하였다.

[192] 실시예 1.1. 타겟 암세포 단독 존재 환경에서 융합단백질 이량체의 단독 효능 확인

[193] 상기 실시예 1에 기재된 바와 같이 NK 세포 없이 타겟 암세포 단독 존재

환경(표 9 참조, E/T ratio=0/1)에서 다양한 암종별 세포주(K562, MDA-MB-231, HCT-116 및 A549 세포주)의 단독 배양시 각 시험물질 GI-101과 CD80-Fc+Fc-IL2v2는 암세포의 생존 능력에 큰 영향을 주지 않는 것으로 관찰되었다(도 8 내지 도 11).

[194] 실시예 1.2. K562(Lymphoblast) 세포에 대한 NK 세포 및 융합단백질 이량체의 암세포 증식 억제 효과

[195] 백혈병(Leukemia) 암세포주인 K562 세포주에서 자연살해세포의 암세포 살상 능력을 확인하였다. 구체적으로, 타겟 세포(target cell, T)로서 K562 세포주와 이펙터 세포(effector cell, E)로서 자연살해세포(effector cell)를 각각 E/T ratio = 1/3, 1/1, 3/1 및 10/1로 하여 공배양할 시, 병용물질로서 시험물질인 GI-101 또는 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리에 따른 암세포 생존 능력을 확인하였다.

[196] 그 결과, K562 세포주에 대한 자연살해세포의 암세포 살상시 병용물질로서 IL2-Fc-CD80 융합단백질 형태인 GI-101의 처리가 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리보다 암세포 생존 능력을 저하시켜주는 것으로 관찰되었다(도 12 내지 도 15).

[197] 실시예 1.3. MDA-MB231 세포에 대한 NK 세포 및 융합단백질 이량체의 암세포 증식 억제 효과

[198] 유방암 세포주(Breast cancer)인 MDA-MB-231 세포주에서 자연살해세포의 암세포 살상 능력을 확인하였다. 구체적으로, 타겟 세포(target cell, T)로서 MDA-MB-231 세포주와 이펙터 세포(effector cell, E)로서 자연살해세포(effector cell)를 각각 E/T ratio = 1/3, 1/1, 3/1 및 10/1로 하여 공배양할 시, 병용물질로서 시험물질인 GI-101 또는 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리에 따른 암세포 생존 능력을 확인하였다.

[199] 그 결과, MDA-MB-231 세포주에 대한 자연살해세포의 암세포 살상시 병용물질로서 IL2-Fc-CD80 융합단백질 형태인 GI-101의 처리가 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리보다 암세포 생존 능력을 저하시켜주는 것으로 관찰되었다(도 16 내지 도 19).

[200] 실시예 1.4. HCT-116 세포에 대한 NK 세포 및 융합단백질 이량체의 암세포 증식 억제 효과

[201] 대장암 세포주(Colon cancer)인 HCT-116 세포주에서 자연살해세포의 암세포 살상 능력을 확인하였다. 구체적으로, 타겟 세포(target cell, T)로서 HCT-116 세포주와 이펙터 세포(effector cell, E)로서 자연살해세포(effector cell)를 각각 E/T ratio = 1/3, 1/1, 3/1 및 10/1로 하여 공배양할 시, 병용물질로서 시험물질인 GI-101 또는 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리에 따른 암세포 생존 능력을 확인하였다.

[202] 그 결과, HCT-116 세포주에 대한 자연살해세포의 암세포 살상시 병용물질로서 IL2-Fc-CD80 융합단백질 형태인 GI-101의 처리가 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리보다 암세포 생존 능력을 저하시켜주는 것으로 관찰되었다(도 20 내지 도 23).

[203] 실시예 1.5. A549 세포에 대한 NK 세포 및 융합단백질 이량체의 암세포 증식 억제 효과

[204] 폐암 세포주(lung cancer)인 A549 세포주에서 자연살해세포의 암세포 살상 능력을 확인하였다. 구체적으로, 타겟 세포(target cell, T)로서 A549 세포주와 이펙터 세포(effector cell, E)로서 자연살해세포(effector cell)를 각각 E/T ratio = 1/3, 1/1, 3/1 및 10/1로 하여 공배양할 시, 병용물질로서 시험물질인 GI-101 또는 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리에 따른 암세포 생존 능력을 확인하였다.

[205] 그 결과, A549 세포주에 대한 자연살해세포의 암세포 살상시 병용물질로서 IL2-Fc-CD80 융합단백질 형태인 GI-101의 처리가 CD80-Fc+Fc-IL2v2 처리보다 암세포 생존 능력을 저해시켜주는 것으로 관찰되었다(도 24 내지 도 27).

[206] **V. 발암종 마우스 모델에서 NK 세포 및 융합단백질 이량체의 암세포 살해능 확인: *In vivo***

[207] **실시예 2. mGI-101과 NK 세포 투여**

[208] 제조예 4에서 수득한 mGI-101은 복강 경로로, 준비예 3에서 제조한 마우스 유래 NK 세포는 정맥 경로로 발암종 마우스 모델에 투여하였으며, 투여는 일회용 주사기(31G, 1 mL)를 이용하여 투여일(종양 이식 후 6일, 10일, 13일)에 1회씩 총 3회 투여를 진행하였다. 종양 성장 억제 모델에 대하여는 하기 표 10에 기재된 바와 같이, 4개 군의 투여 세포 및 투여 용량을 상이하게 하였다(도 28).

[209] [표10]

군	투여 세포	hIgG4 또는 mGI-101 투여 용량 (mg/kg)	NK cell 세포수
G1 (대조군)	hIgG4	4	0
G2	hIgG4 + NK cell	4	1×10 ⁶
G3	mGI101 단독	0.6	0
G4	mGI101 + NK cell	0.6	1×10 ⁶

[210] **실시예 3. 발암종 마우스 모델의 종양 부피 측정**

[211] 일주일에 2회씩, 캘리퍼스(Digital caliper, mitutoyo, Japan)를 사용하여 종양의 장축(maximum length, L)과 단축(perpendicular width, W)을 측정하고, 하기 [수학식 1]에 대입하여 종양의 부피(tumor volume, TV)를 계산하였다.

[212] **[수학식 1]**

[213] $TV (\text{mm}^3) = W \times W \times L \times 0.5$

[214] 종양 성장 억제율은 하기[수학식 2]에 대입하여 계산하였다.

[215] **[수학식 2]**

[216] 종양 성장 억제율(Tumor growth inhibition, %) = $(1 - (Ti - T0) / (Vi - V0)) \times 100$

[217] Ti = 실험군의 투여 전 종양의 부피

[218] T0 = 실험군의 투여 후 종양의 부피

[219] Vi = 대조군의 투여 전 종양의 부피

- [220] V0 = 대조군의 투여 후 종양의 부피
- [221] 각 개체의 투여 전의 종양의 부피는 군 분리시 측정된 값으로 설정하였다.
- [222] 실시예 4. CT26 이식 발암종 마우스 모델에서 종양 성장 억제 효과 확인
- [223] 실시예 4.1. 종양 부피 측정
- [224] 건강한 Balb/c 생쥐에 대하여 준비된 CT26 대장암 세포 부유액(5×10^5 cells/0.1 mL)로 분주하고 조제한 용액을 일회용 주사기에 충전하여 동물의 우측 등 부위의 피하에 0.1 mL/head씩 투여하여 이식하였다. 종양 이식 후, 표 10에 표기된 약물을 각각 투여하였다. 그 후, 10일차, 13일차 및 17일차에 종양의 크기를 측정하였다. 대조군(Vehicle)에 비하여 자연살해세포(NK cell) 또는 mGI-101 단독 처리군의 종양 성장이 저해되었다. 대조군에 비해 자연살해세포와 mGI-101 병용 처리군의 종양 성장이 저해되었다. 자연살해세포 또는 mGI-101 단독 처리군에 비해 자연살해세포와 mGI-101 병용 처리군의 종양 성장이 저해되었다(도 29).
- [225] 실시예 4.2. 종양 성장 억제율 분석
- [226] 약물 처리 1일차(종양 이식 후, 10일차) 대비 실험 종료 시점(종양 이식 후, 17일차)에 종양성장 억제율을 계산하였다. 대조군(Vehicle)은 종양 성장 억제율 30% 이상 3마리, 50% 이상 3마리, 80% 이상 2마리였다. 자연살해세포 처리군은 종양 성장 억제율 30% 이상 6마리, 50% 이상 5마리, 80% 이상 2마리였다. mGI-101 처리군은 종양 성장 억제율 30% 이상 5마리, 50% 이상 5마리, 80% 이상 1마리였다. 자연살해세포와 mGI-101 병용 처리군은 종양 성장 억제율 30% 이상 7마리, 50% 이상 6마리, 80% 이상 3마리였다(도 30). 도 30에서 검은색 막대는 종양 성장 억제율 30% 이상을 나타낸 것이며, 옅은 회색 막대는 종양성장 억제율 50% 이상을 나타낸 것이며, 진한 회색 막대는 종양성장 억제율 80% 이상을 나타낸 것이다.
- [227] 실시예 4.3. 개별 실험 동물의 종양 부피 측정
- [228] 각 처리군의 개별 실험 동물의 종양 성장을 확인하였다. 구체적으로, 대조군(Vehicle), 자연살해세포(NK cell), mGI-101, 및 자연살해세포 + mGI-101 처리군에서 개별 실험 동물의 종양 성장을 확인하여 도 31에 나타내었다. 도 31에서 점선은 종양 크기 500 mm³를 나타내며, 실선은 종양 크기 250 mm³를 나타낸다.
- [229] 보다 구체적으로, 대조군의 개별 실험 동물의 종양 성장 정도를 확인하여 도 32에 나타내었고, 자연살해세포 처리군의 개별 실험 동물의 종양 성장 정도를 확인하여 도 33에 나타내었다. 또한, mGI-101 처리군의 개별 실험 동물의 종양 성장 정도를 확인하여 도 34에 나타내었고, 자연살해세포와 mGI-101 병용 처리군의 개별 실험 동물의 종양 성장 정도를 확인하여 도 35에 나타내었다.

청구범위

- [청구항 1] IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 및 NK 세포를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 IL-2 단백질 및 상기 CD80 단백질은 링커에 의해 결합된 것인, 암 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 IL-2 단백질은 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 것인, 암 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 IL-2 단백질은 IL-2 변이체인 것인, 암 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째, 45번째, 61번째 및 72번째 위치의 아미노산 중 적어도 하나가 치환된 것인, 암 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제4항에 있어서,
상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 R38A, F42A, Y45A, E61R 및 L72G로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 치환이 일어난 것인, 암 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제4항에 있어서,
상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 하기 (a) 내지 (d) 조합 중 선택되는 어느 하나의 조합의 치환이 일어난 것인, 암 치료용 약학적 조성물:
(a) R38A/F42A
(b) R38A/F42A/Y45A
(c) R38A/F42A/E61R
(d) R38A/F42A/L72G.
- [청구항 8] 제4항에 있어서,
상기 IL-2 변이체는 서열번호 6, 22, 23 또는 24의 아미노산 서열을 갖는 것인, 암 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 CD80은 서열번호 11의 아미노산 서열을 갖는 것인, 암 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 CD80 단백질은 CD80의 단편인 것인, 암 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 CD80의 단편은 서열번호 11의 아미노산 서열 중 35번째 내지

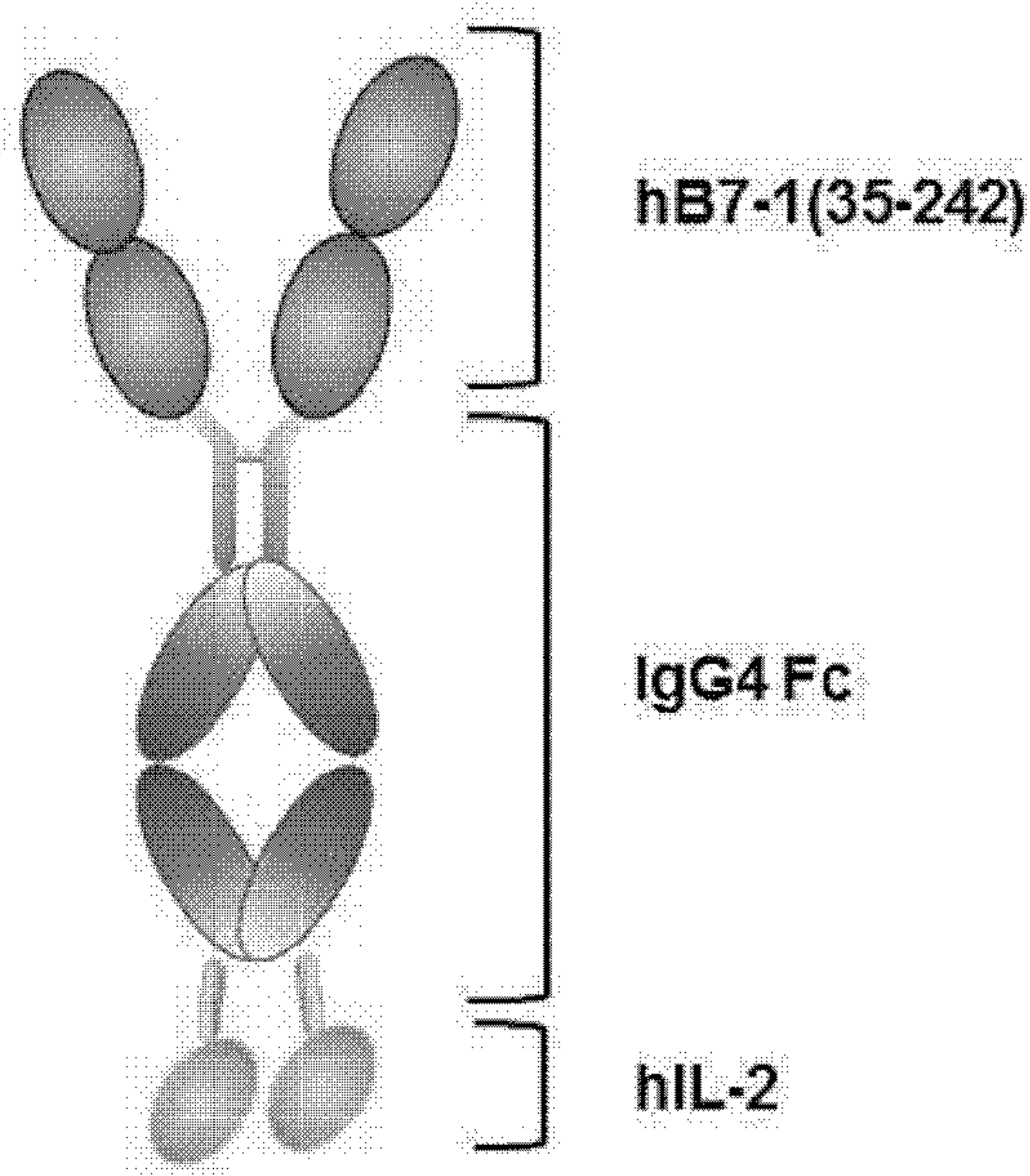
- 242번째의 아미노산으로 이루어진 것인, 암 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 12] 제2항에 있어서,
상기 링커는 알부민 또는 면역글로불린의 Fc 도메인인 것인, 암 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 Fc 도메인은 야생형 또는 변이체인 것인, 암 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 14] 제12항에 있어서,
상기 Fc 도메인은 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 것인, 암 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 15] 제13항에 있어서,
상기 Fc 도메인의 변이체는 서열번호 12의 아미노산 서열을 갖는 것인, 암 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 16] 제1항에 있어서,
상기 융합단백질은 하기 구조식 (I) 또는 (II)로 이루어진 것인, 암 치료용 약학적 조성물:

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

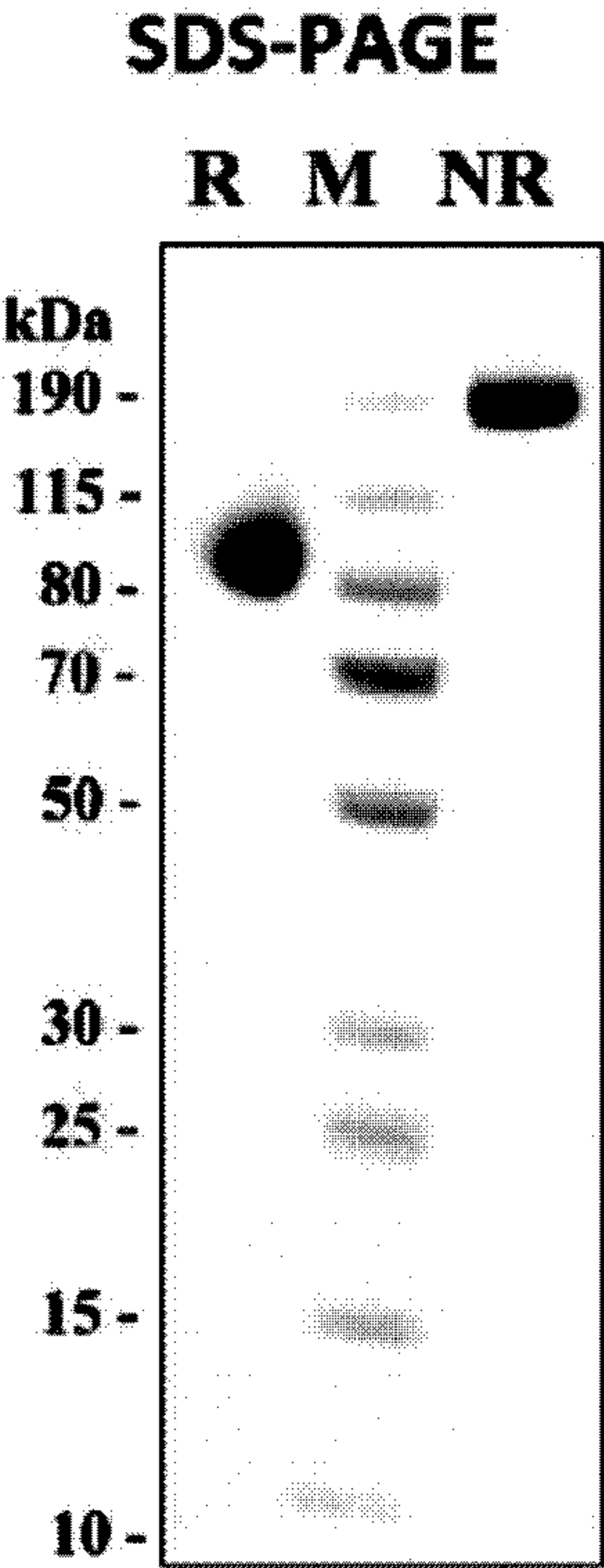
$$\text{N'-Y-[링커(1)]n-Fc 도메인-[링커(2)]m-X-C' (II)}$$
 이때, 상기 구조식 (I) 및 (II)에 있어서,
 상기 N'은 융합단백질의 N-말단이고,
 상기 C'는 융합단백질의 C-말단이며,
 상기 X는 CD80 단백질이고,
 상기 Y는 IL-2 단백질이며,
 상기 링커(1) 및 링커(2)는 펩타이드 링커이고,
 상기 n 및 m은 각각 독립적으로, 0 또는 1이다.
- [청구항 17] 제16항에 있어서,
상기 링커(1)이 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커인 것인, 암 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 18] 제16항에 있어서,
상기 링커(2)가 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커인 것인, 암 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 19] 제16항에 있어서,
상기 융합단백질은 구조식 (I)로 이루어진 것인, 암 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 20] 제1항에 있어서,
상기 융합단백질은 서열번호 9, 26, 28 또는 30의 아미노산 서열에 대해 85% 혹은 그 이상의 서열동일성을 갖는 것인, 암 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 21] 제1항에 있어서,
상기 융합단백질은 이량체인 것을 특징으로 하는, 암 치료용 약학적 조성물.

[청구항 22] 제1항에 있어서,
상기 암은 위암, 간암, 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암,
자궁경부암, 갑상선암, 후두암, 급성 골수성 백혈병, 뇌종양,
신경모세포종, 망막 모세포종, 두경부암, 침샘암 및 림프종으로 구성된
군에서 선택되는 어느 하나인, 암 치료용 약학적 조성물.

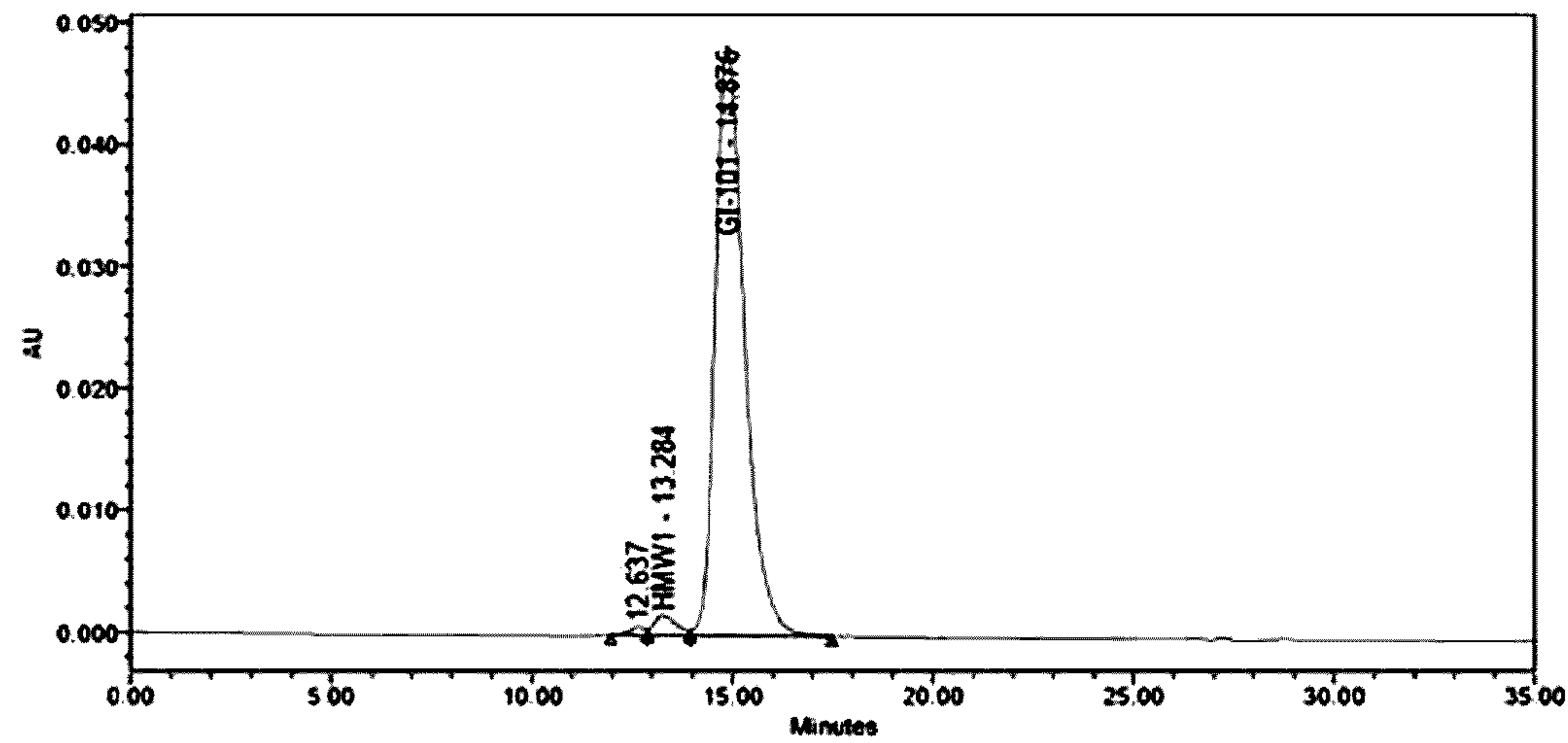
[도1]



[도2]

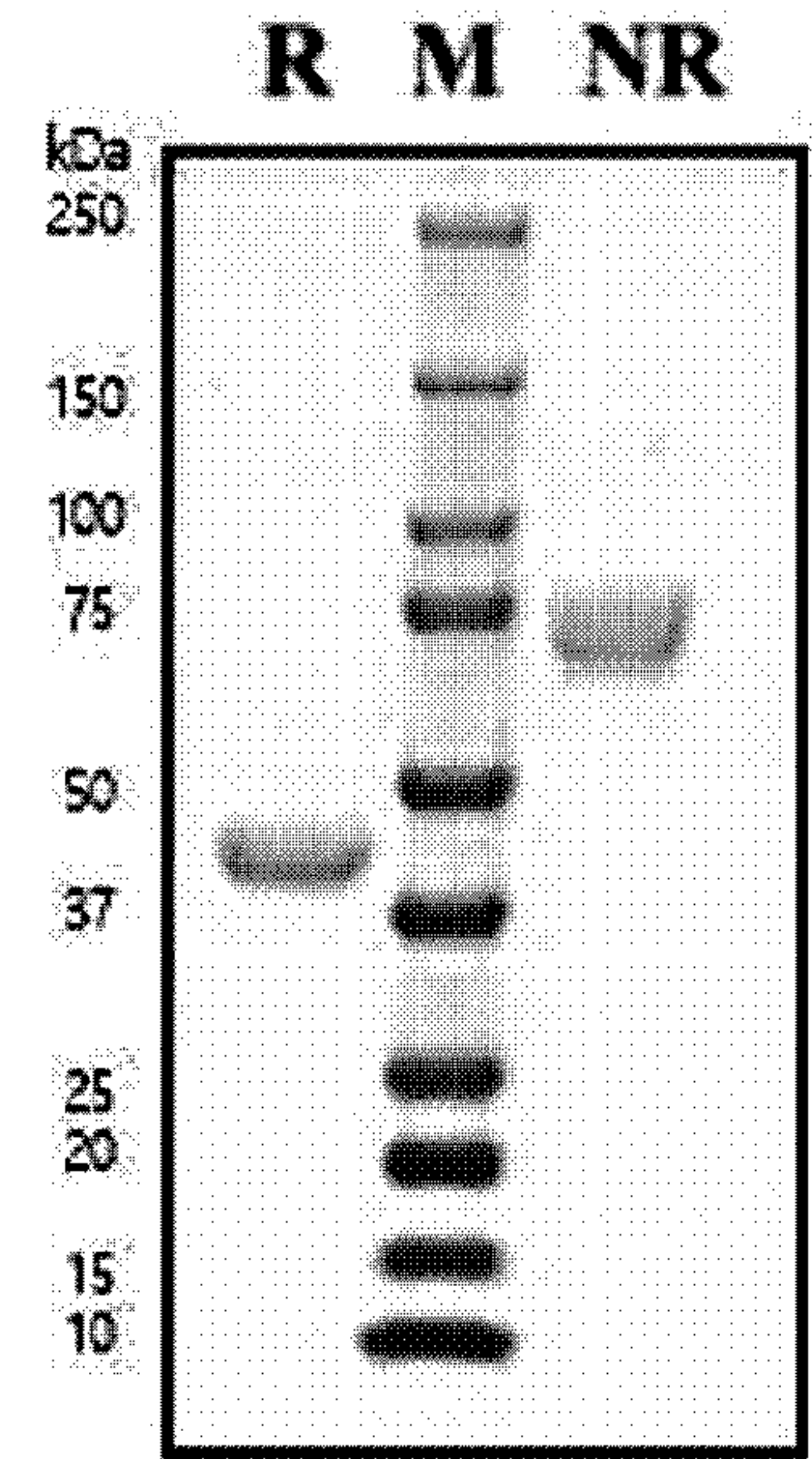


[도3]

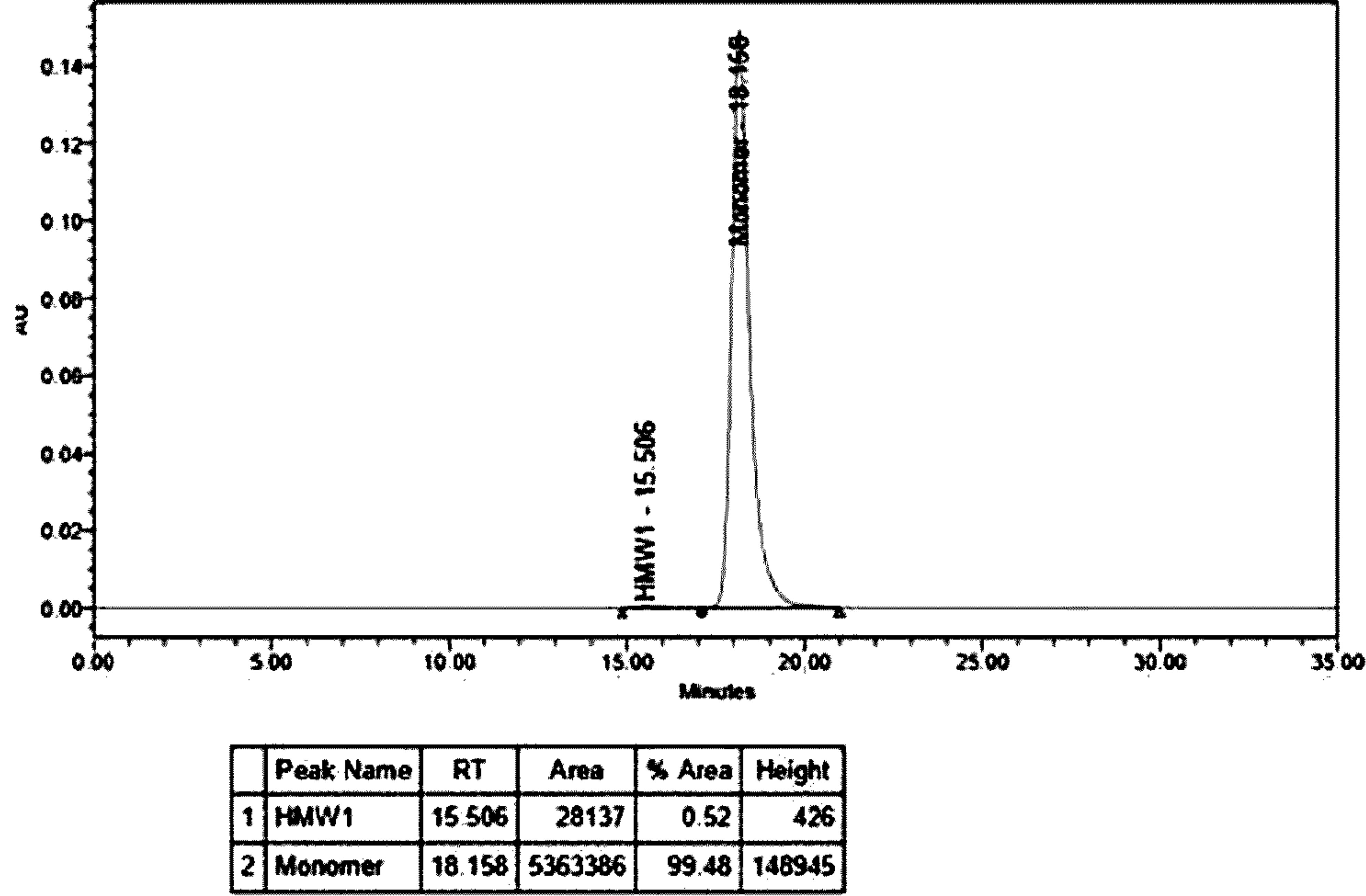


	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1		12.637	16974	0.68	646
2	HMW1	13.284	60001	2.39	1575
3	HMW2	13.710			
4	GI-101	14.876	2434297	96.93	48462

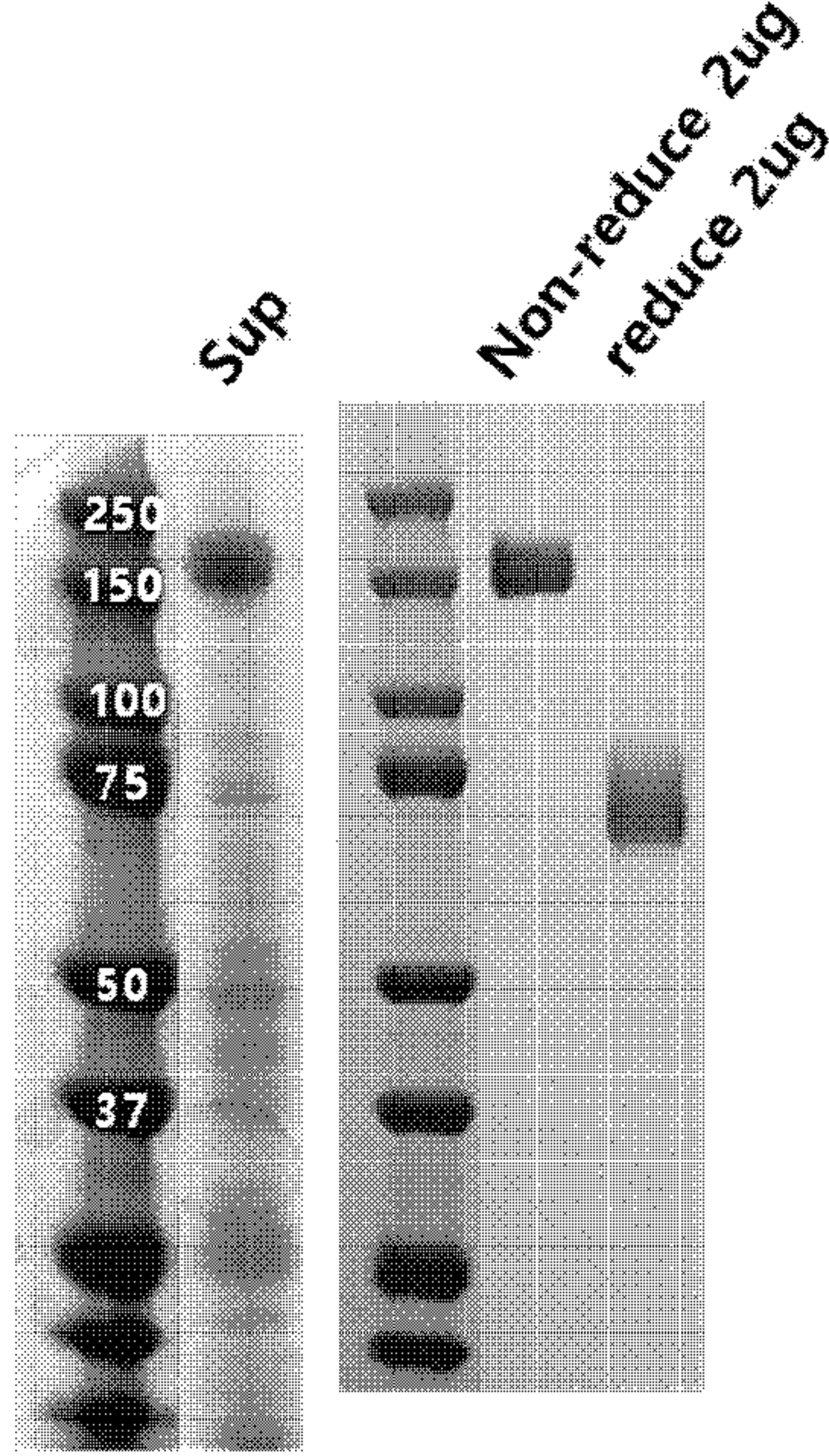
[도4]



[도5]

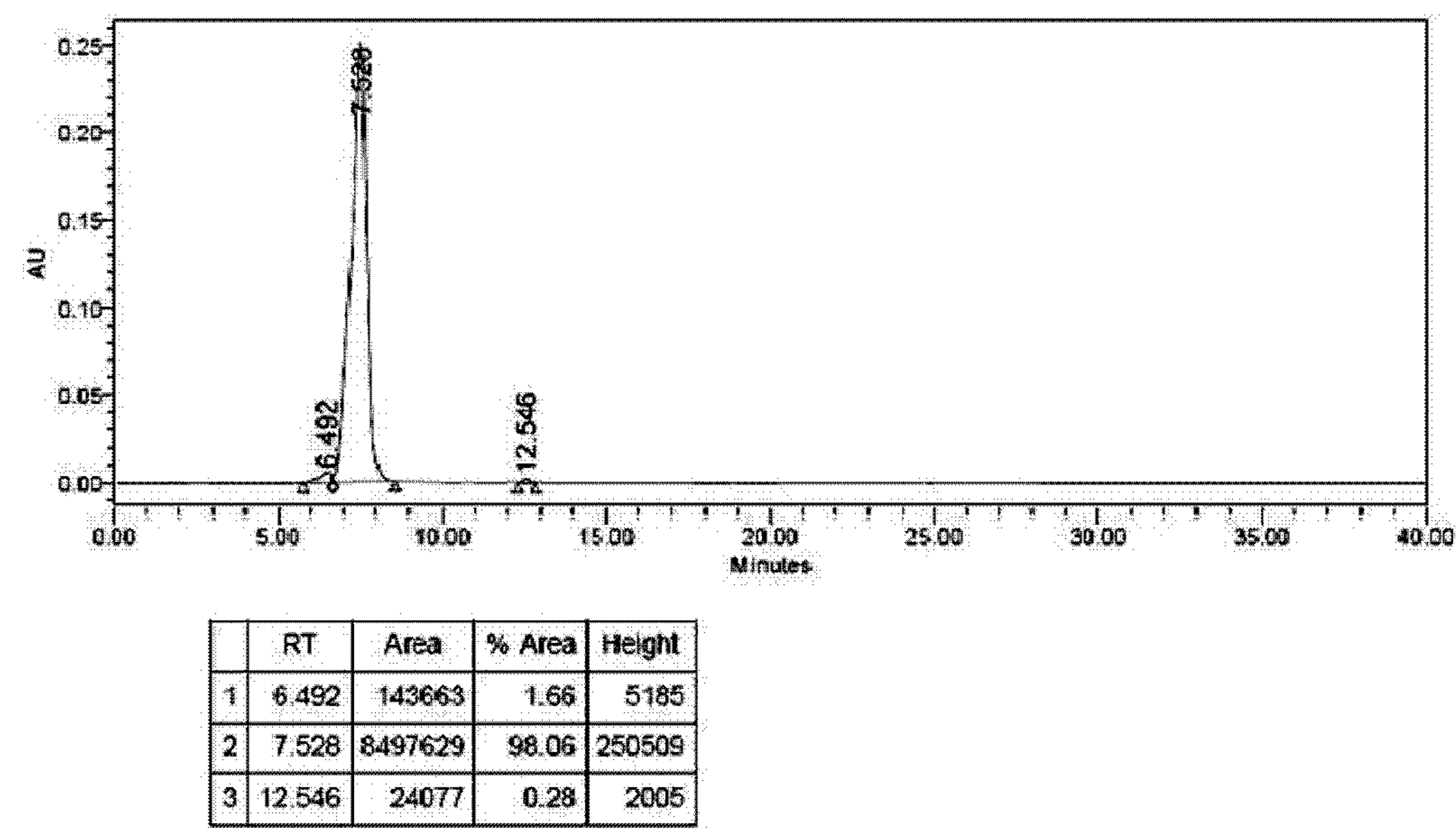


[도6]

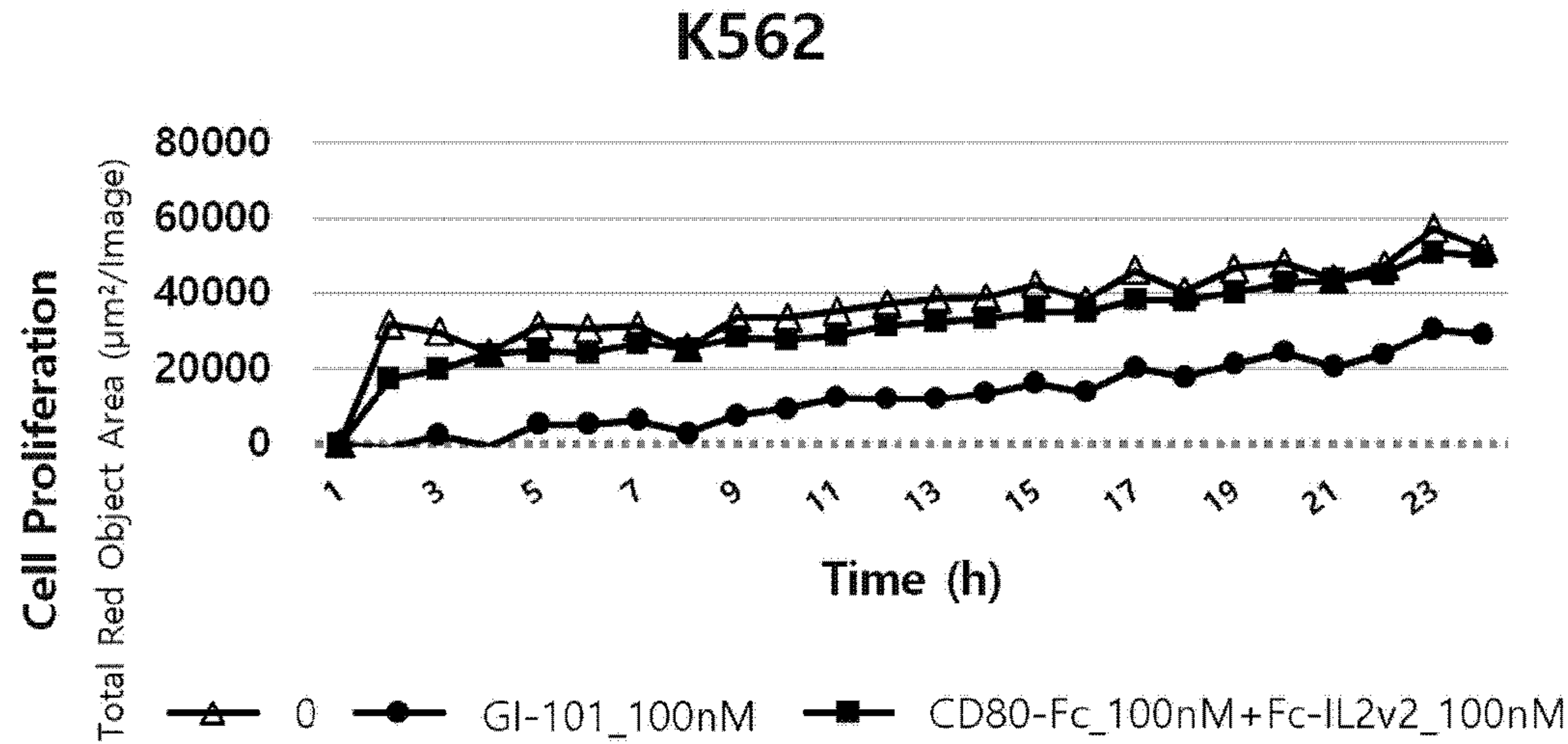


Expected size
(kDa)
monomer: 50.5
Dimer : 101

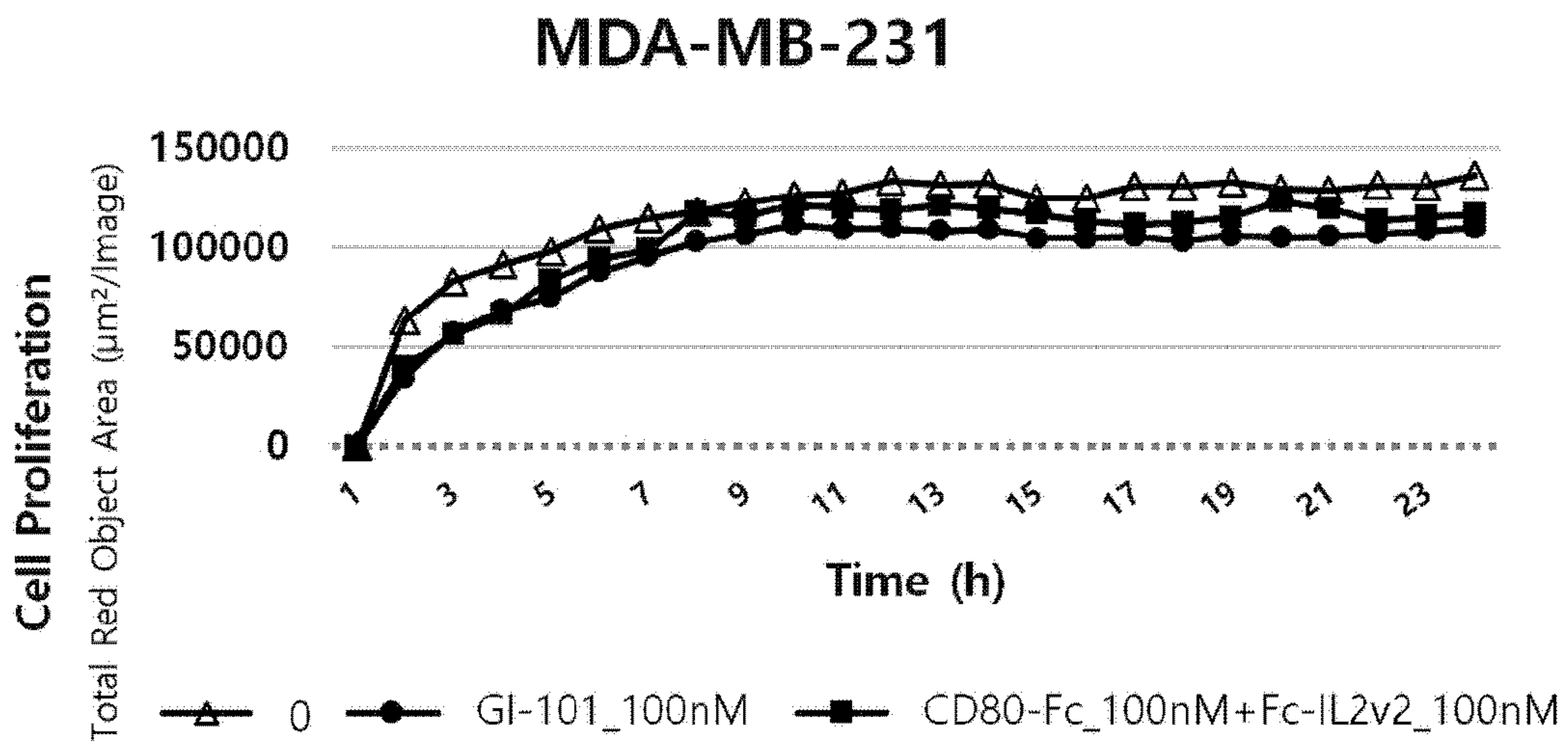
[도7]



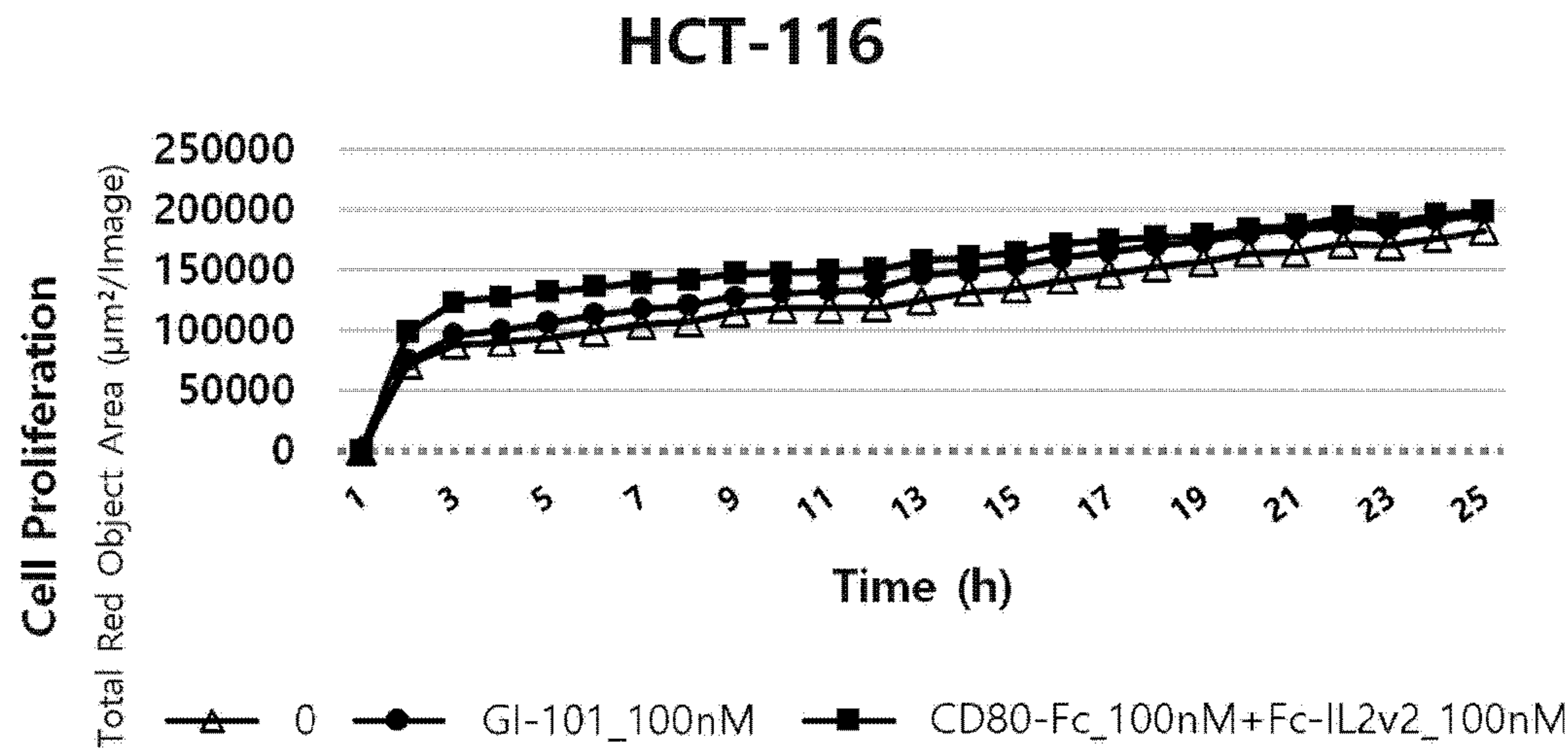
[도8]



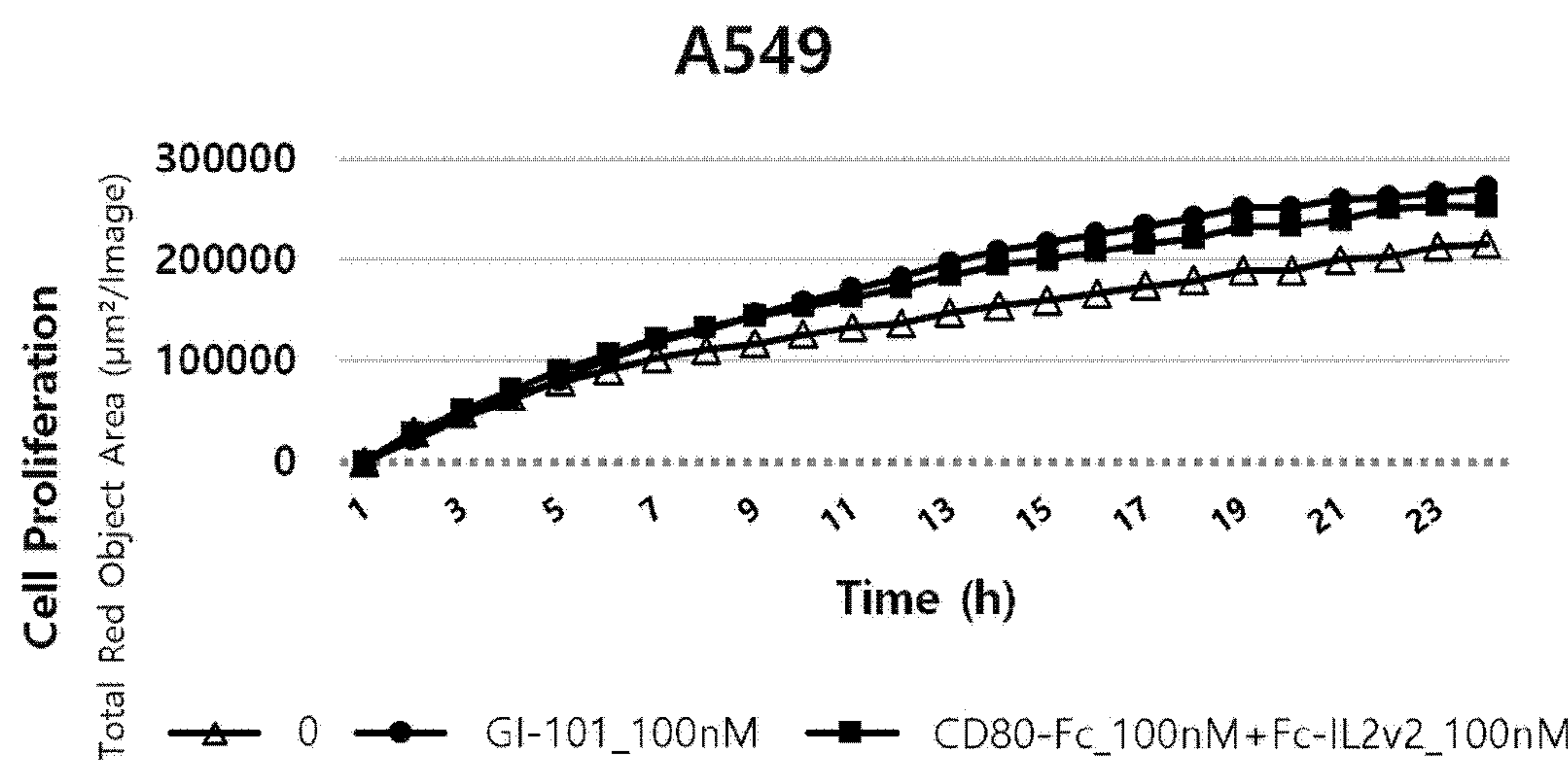
[도9]



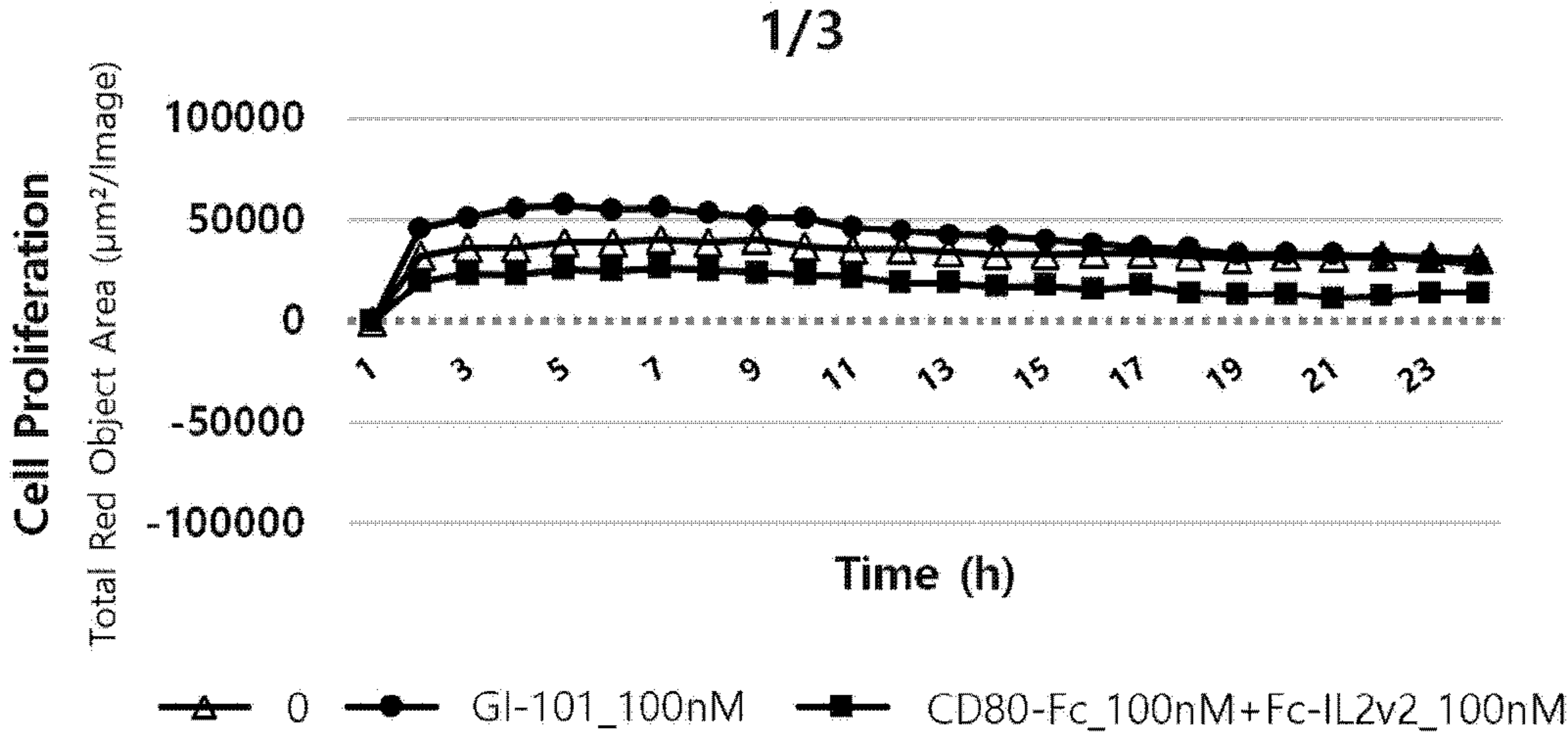
[도10]



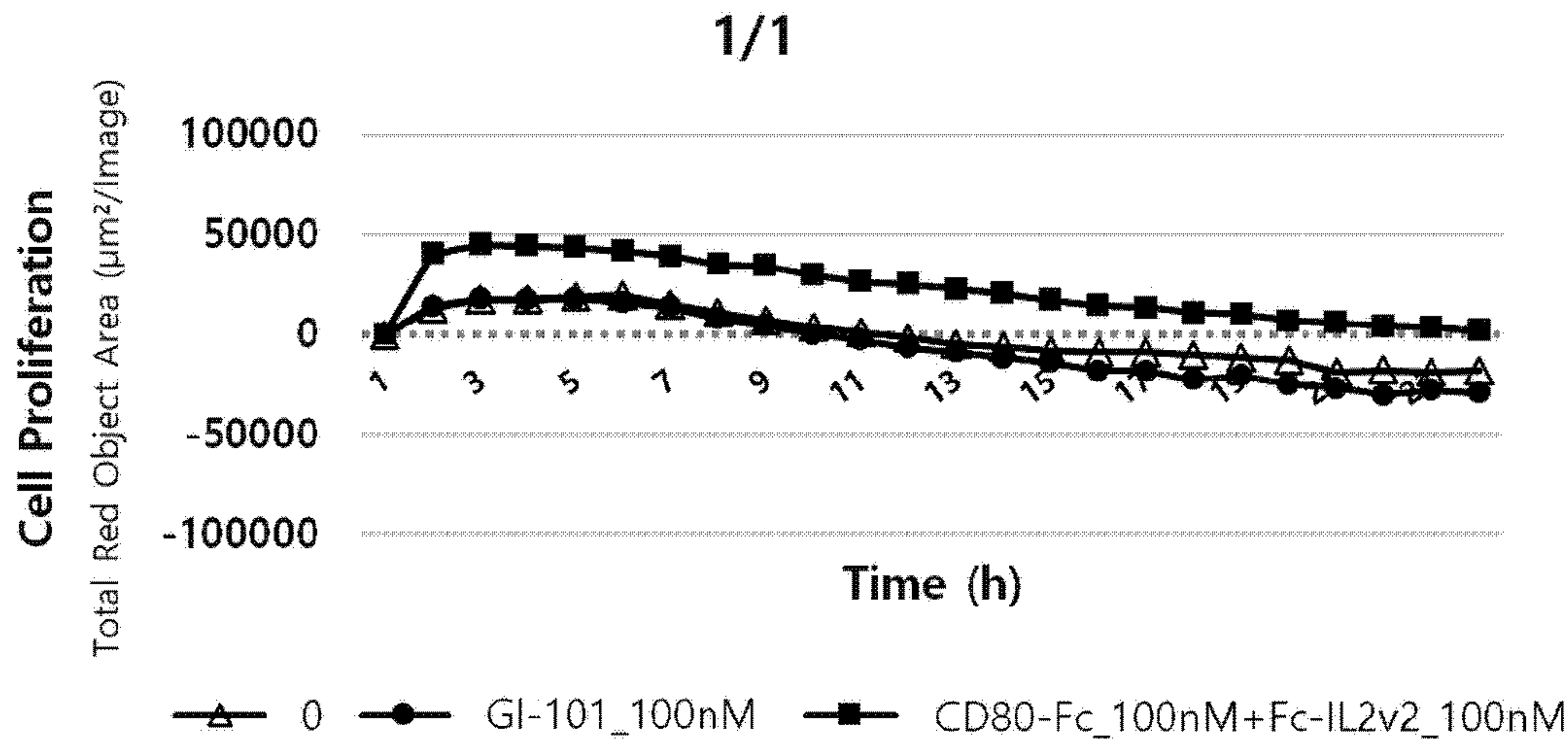
[도11]



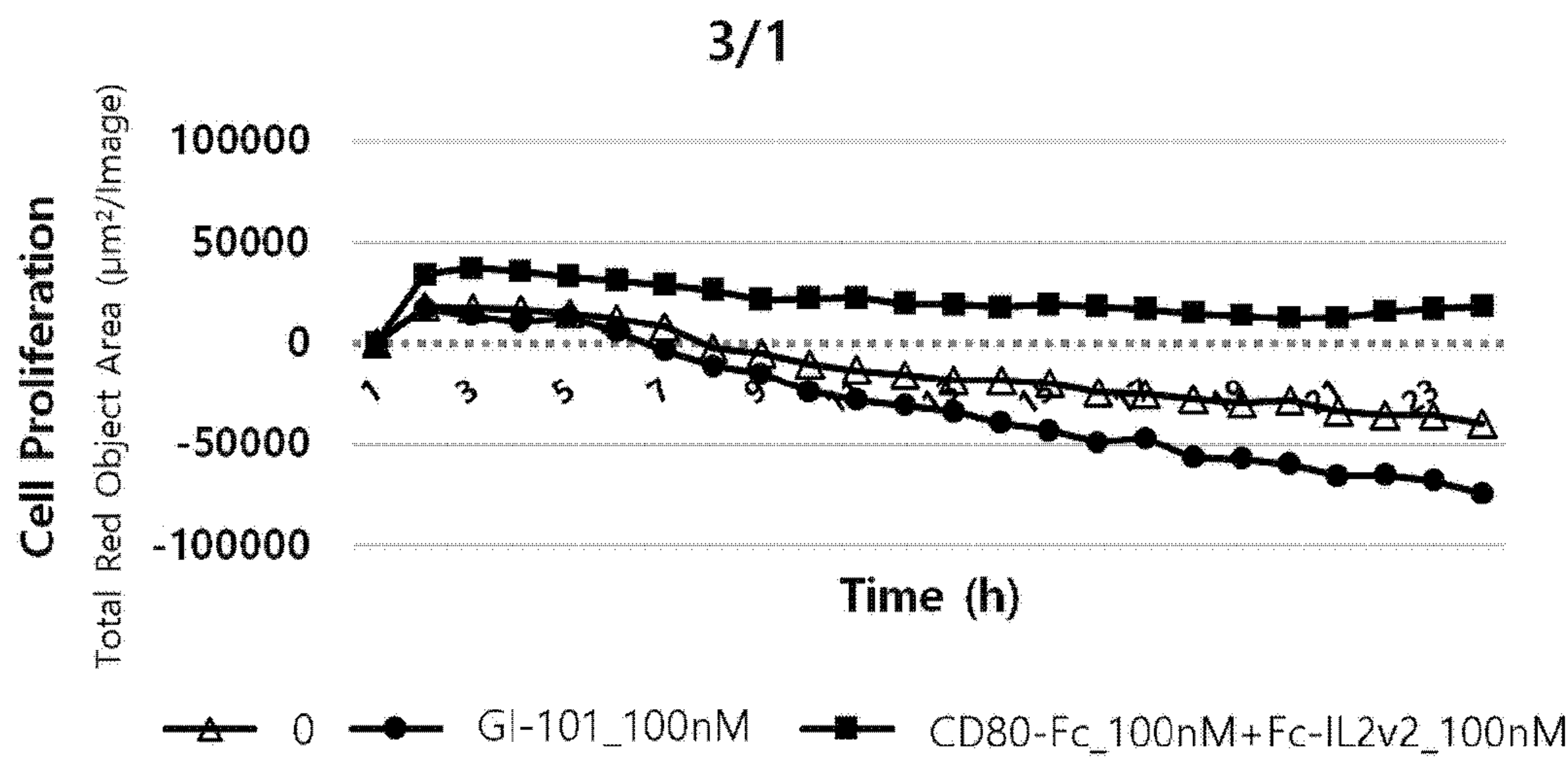
[도12]



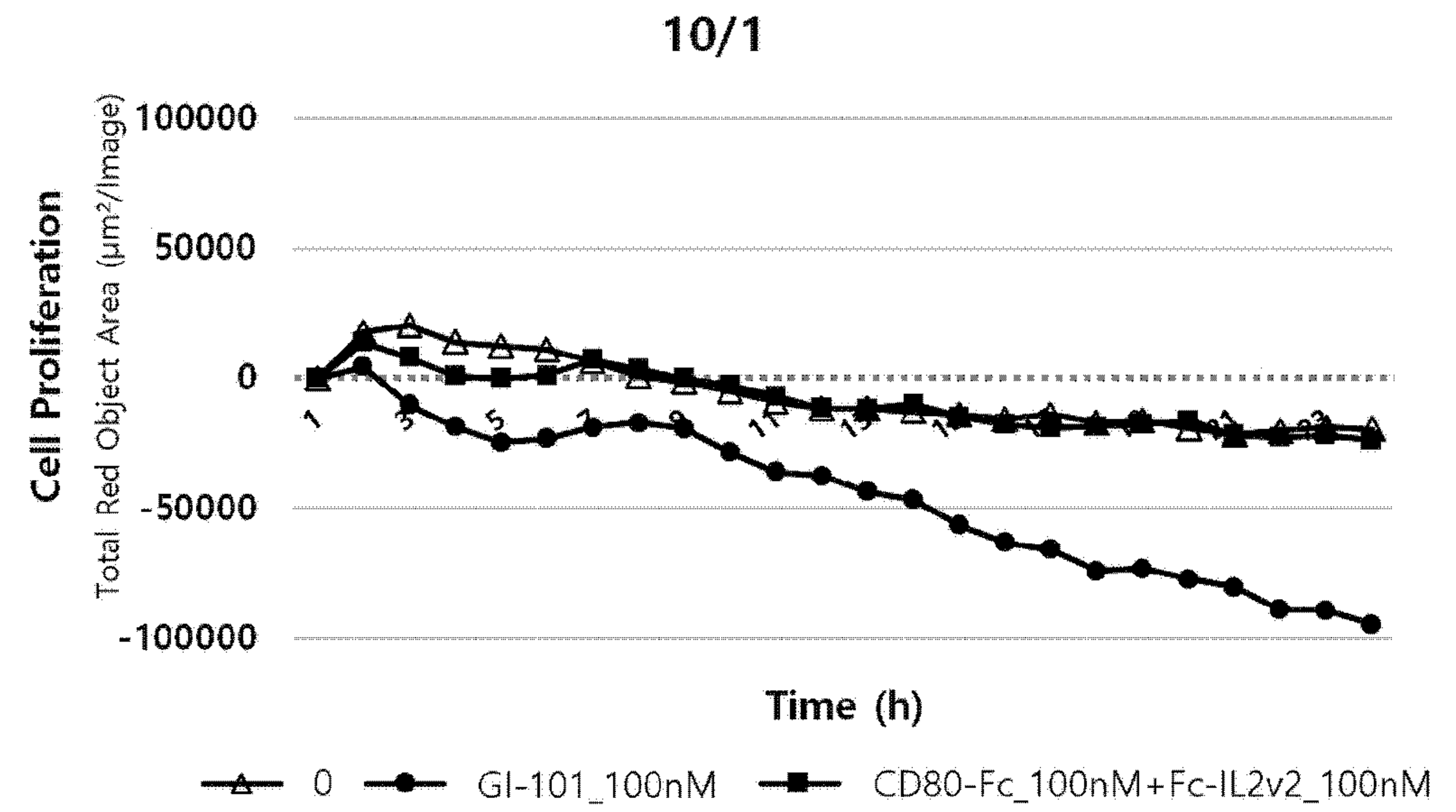
[도13]



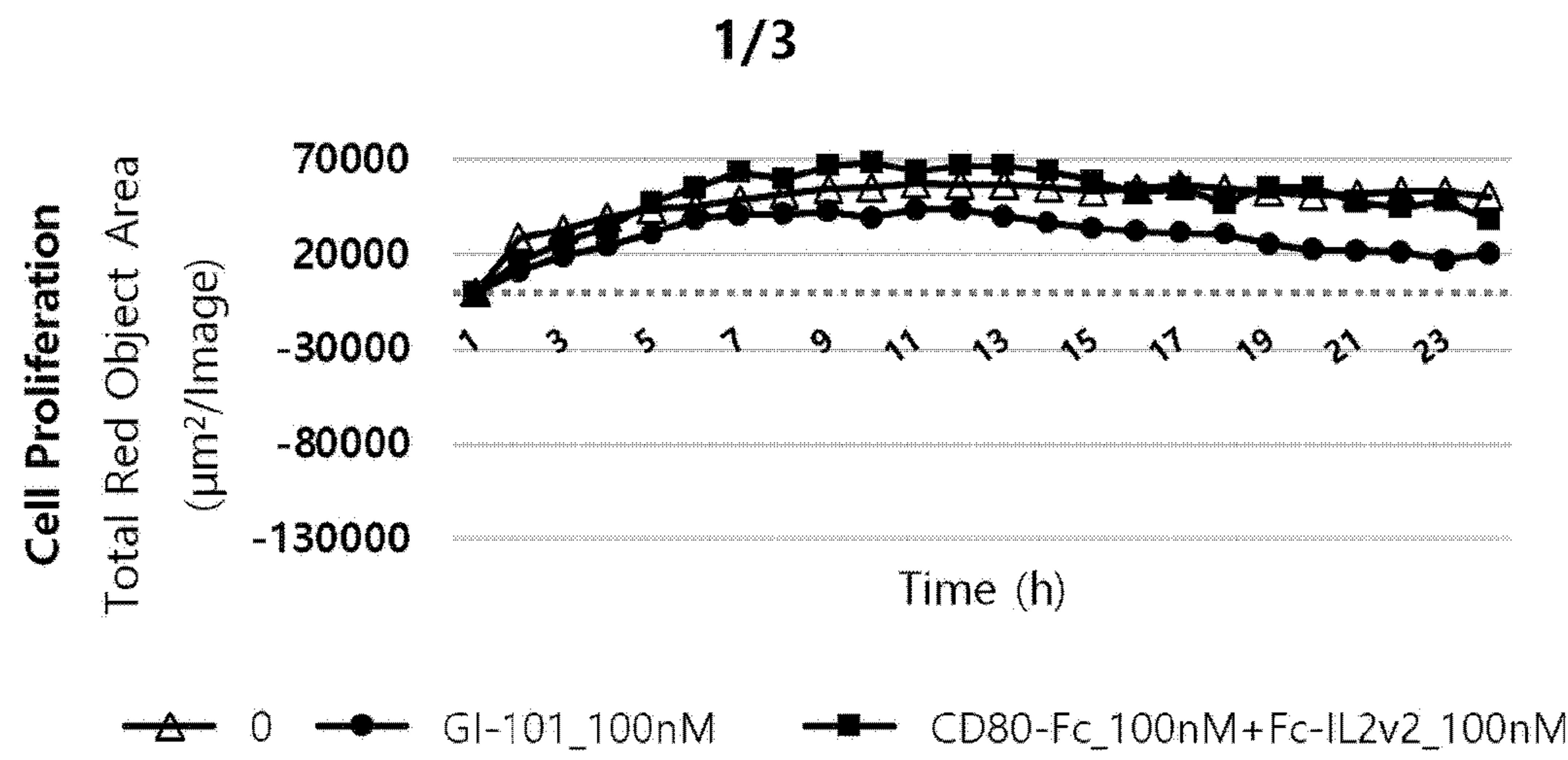
[도14]



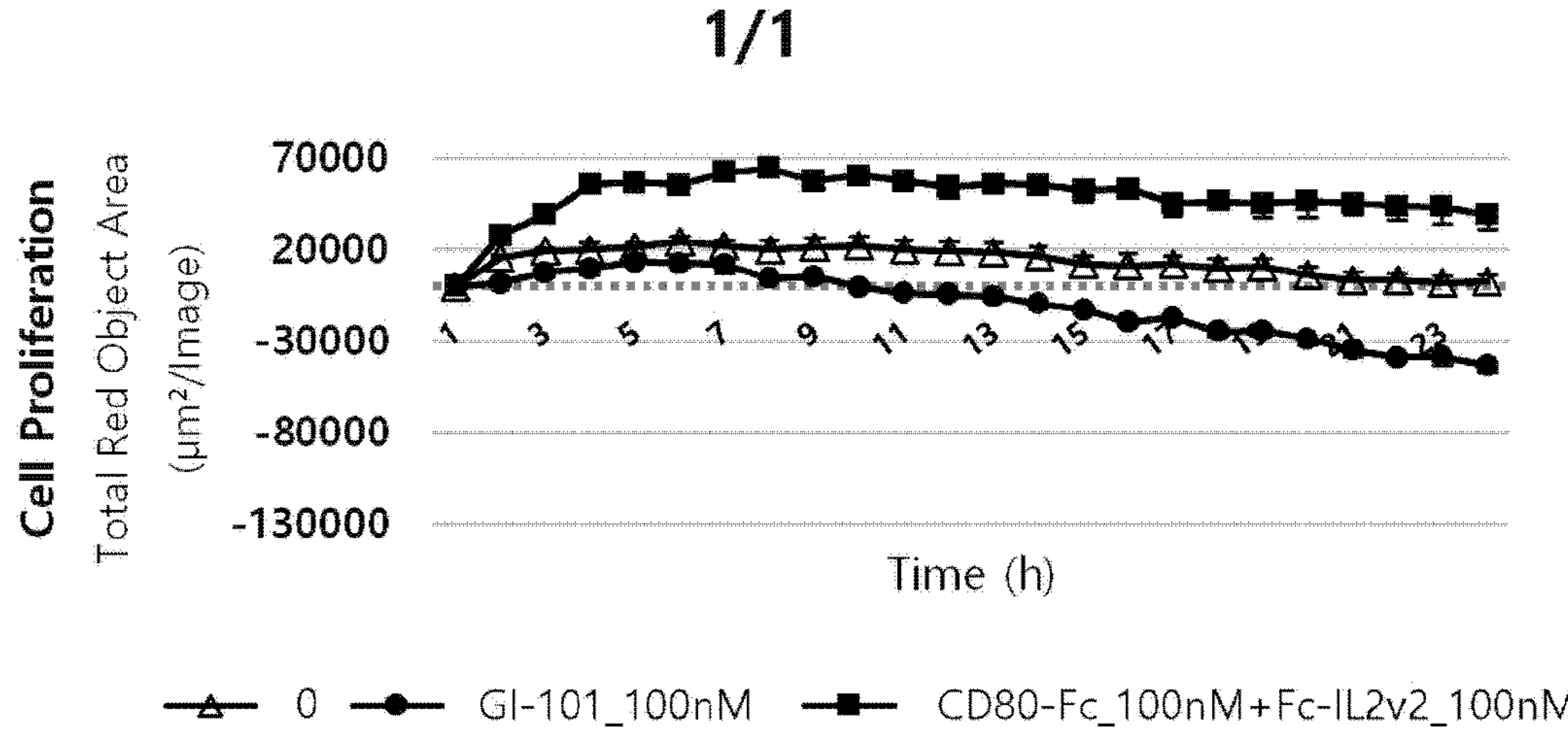
[도15]



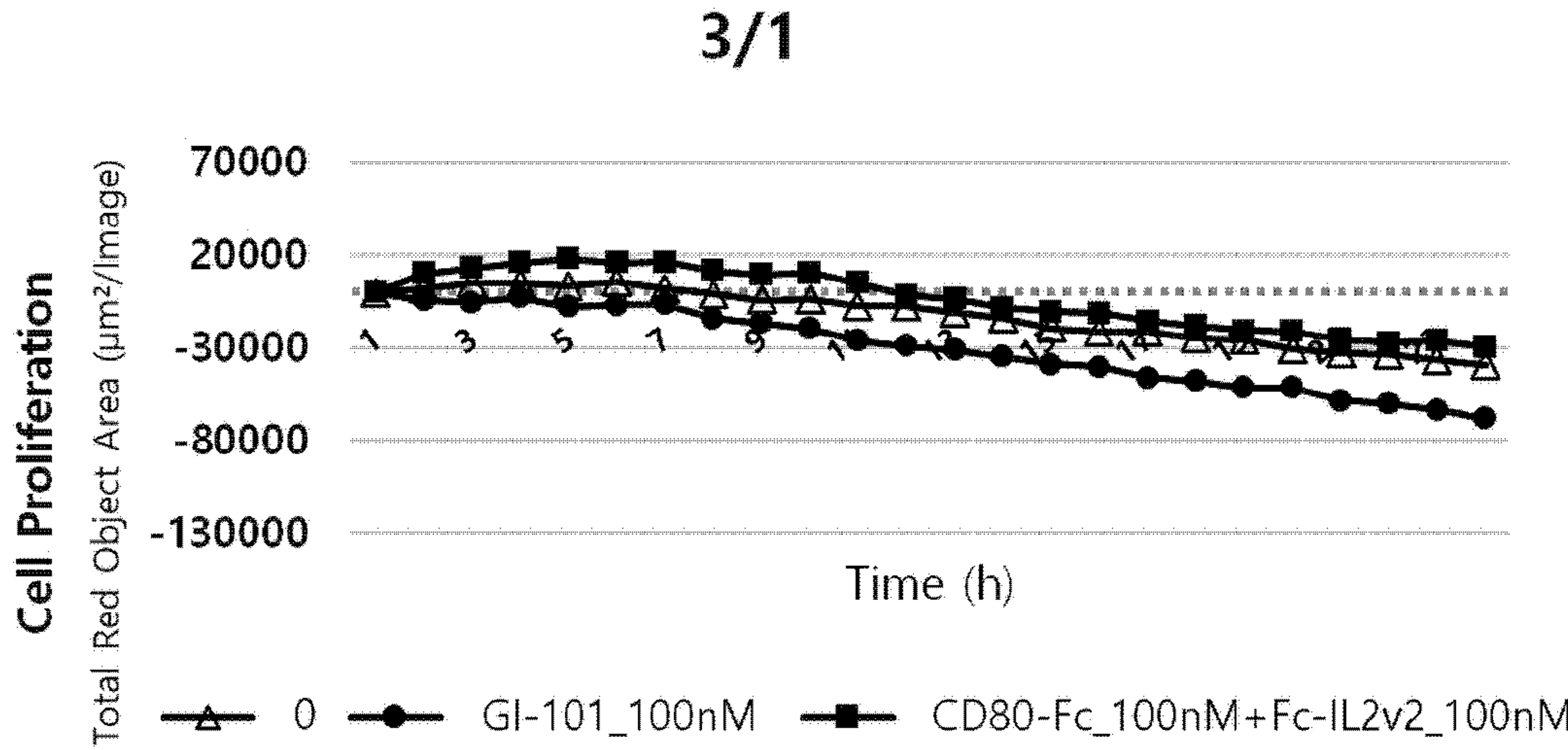
[도16]



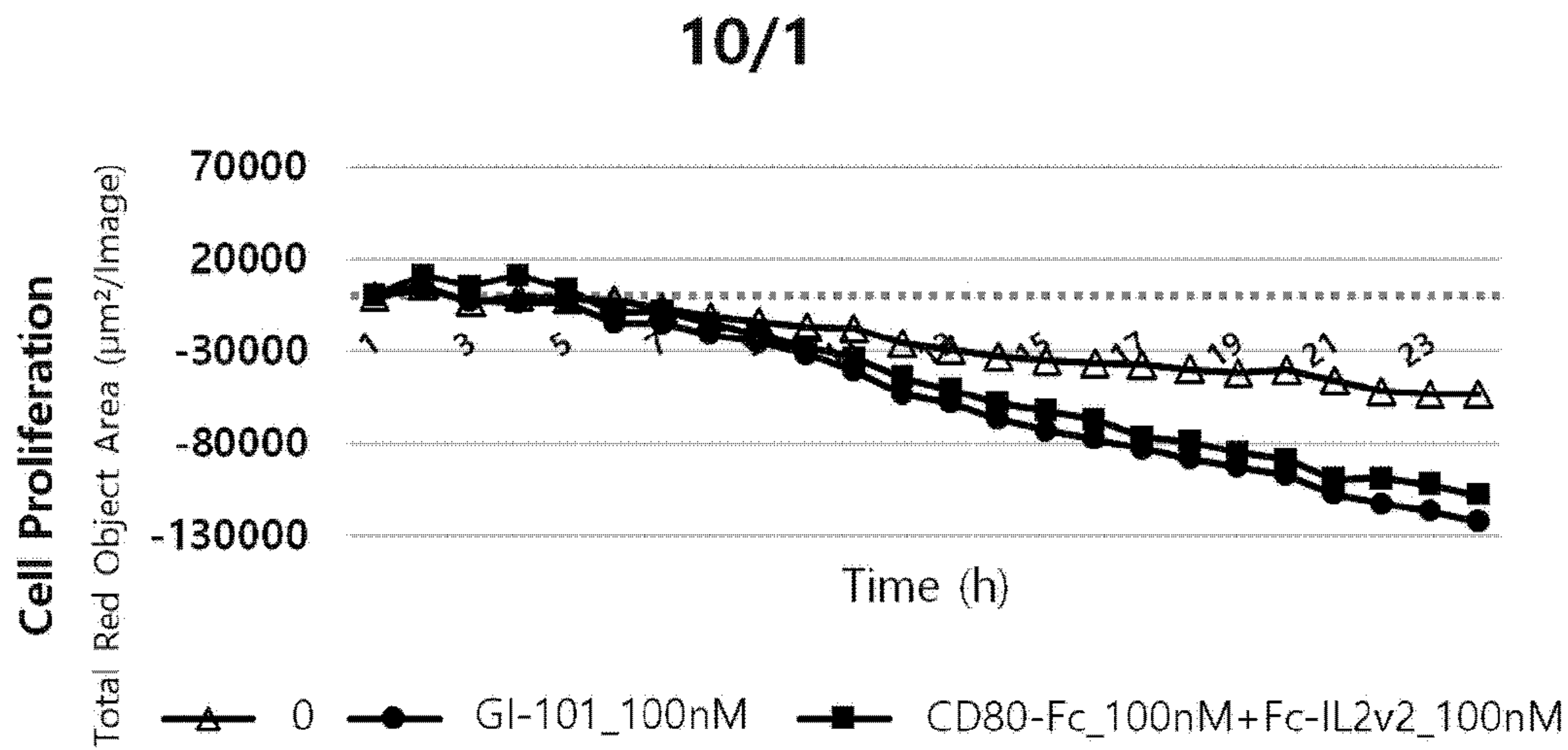
[도17]



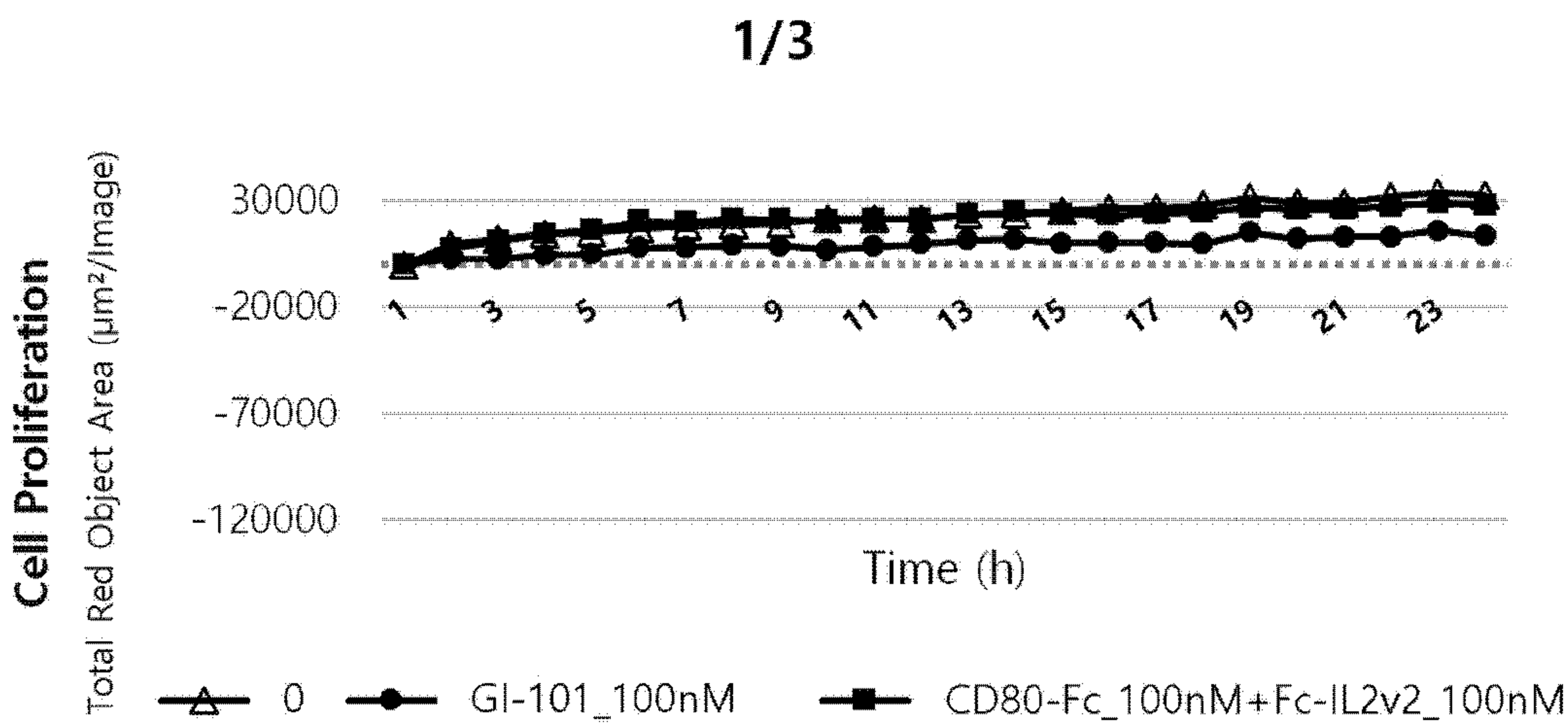
[도18]



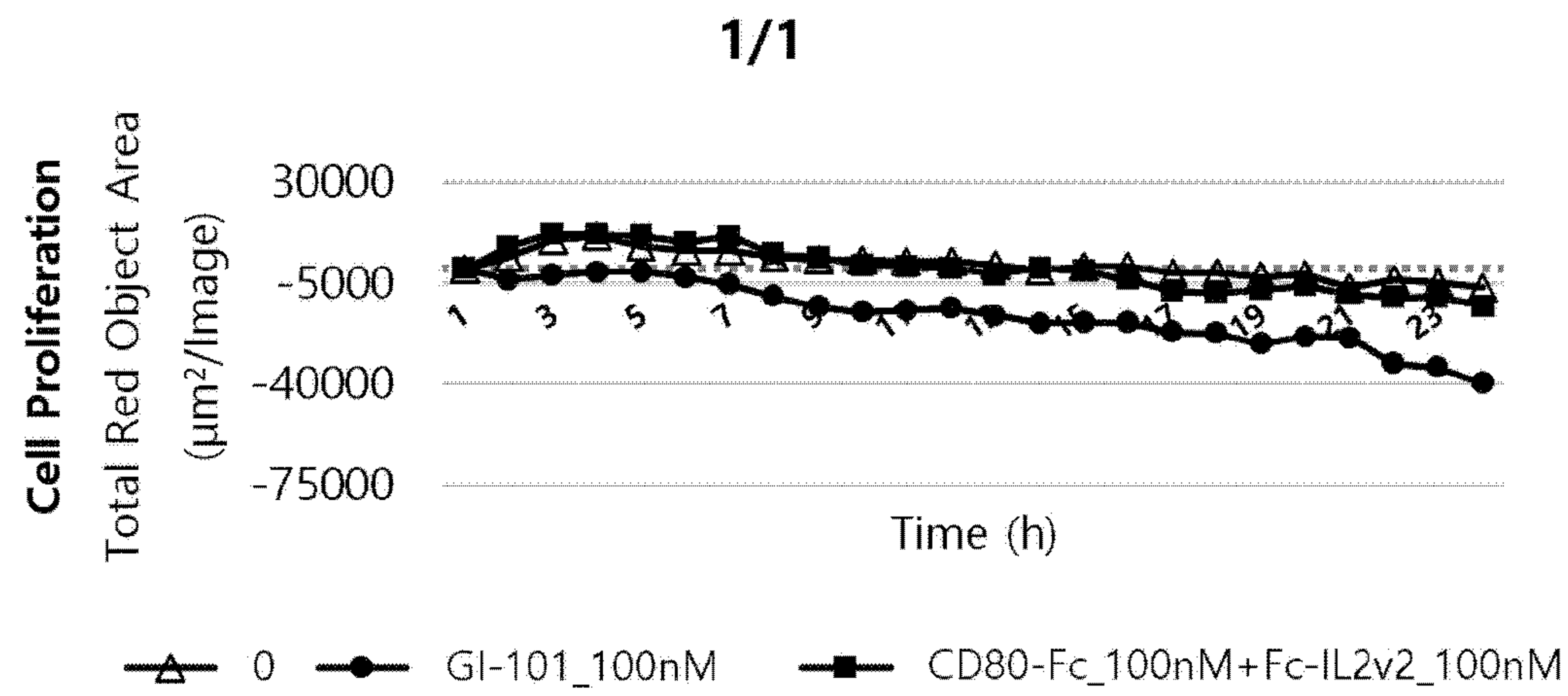
[도19]



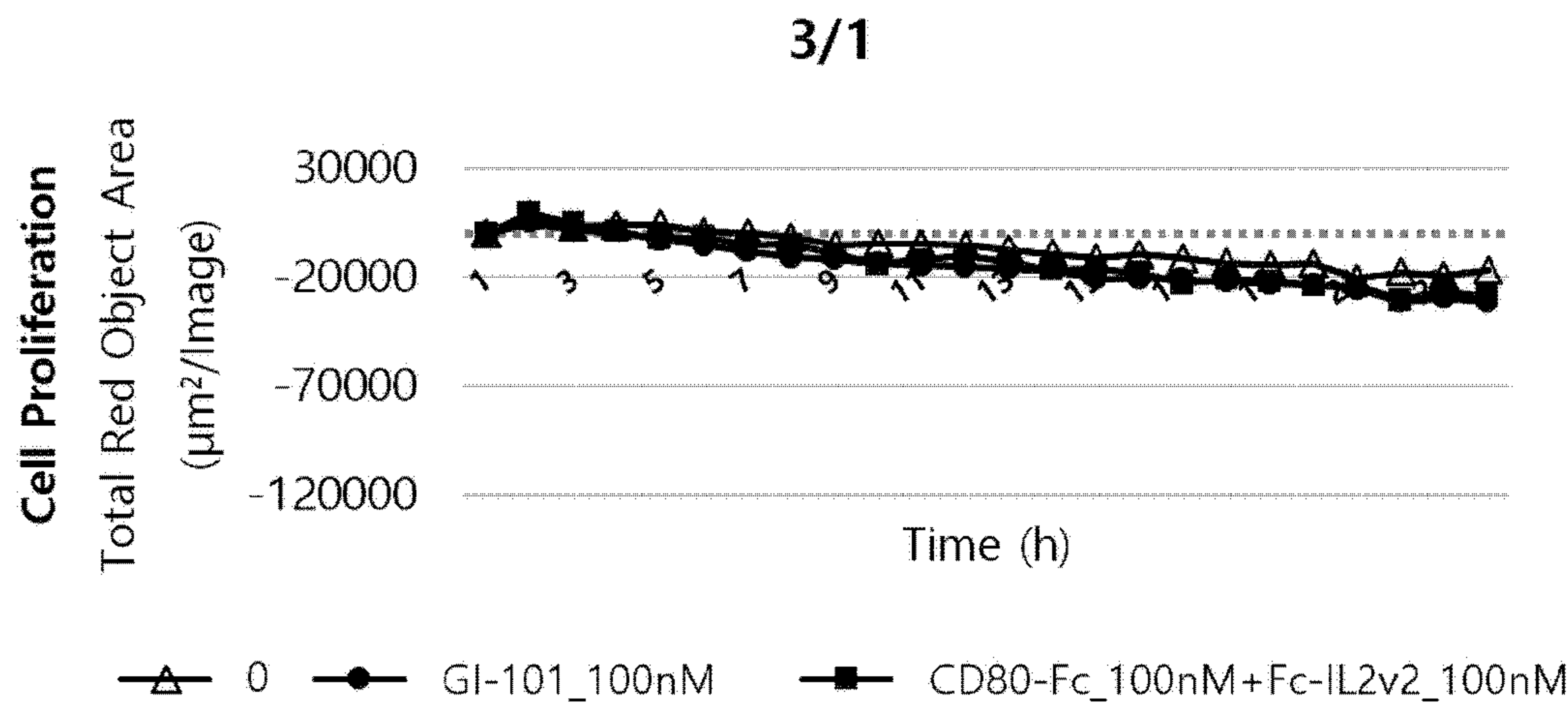
[도20]



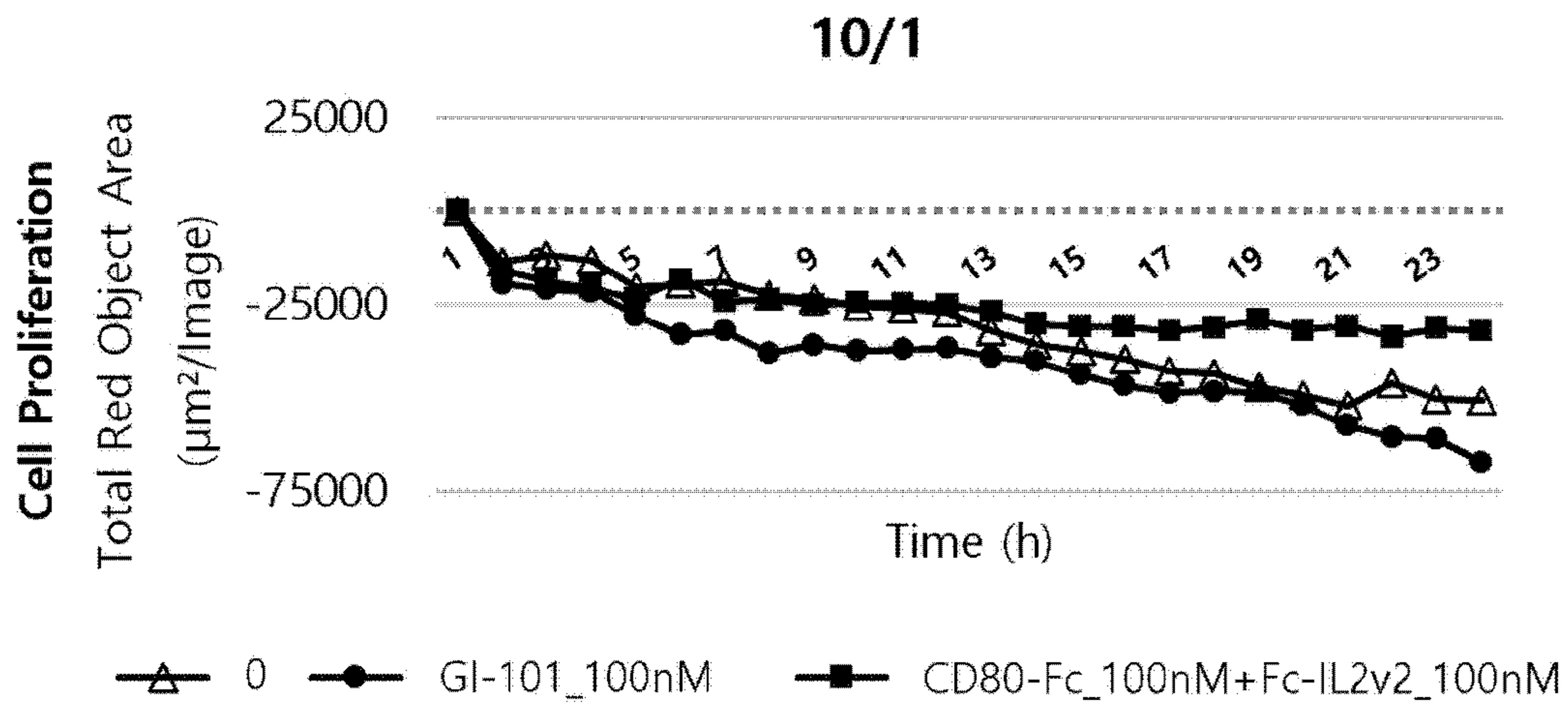
[도21]



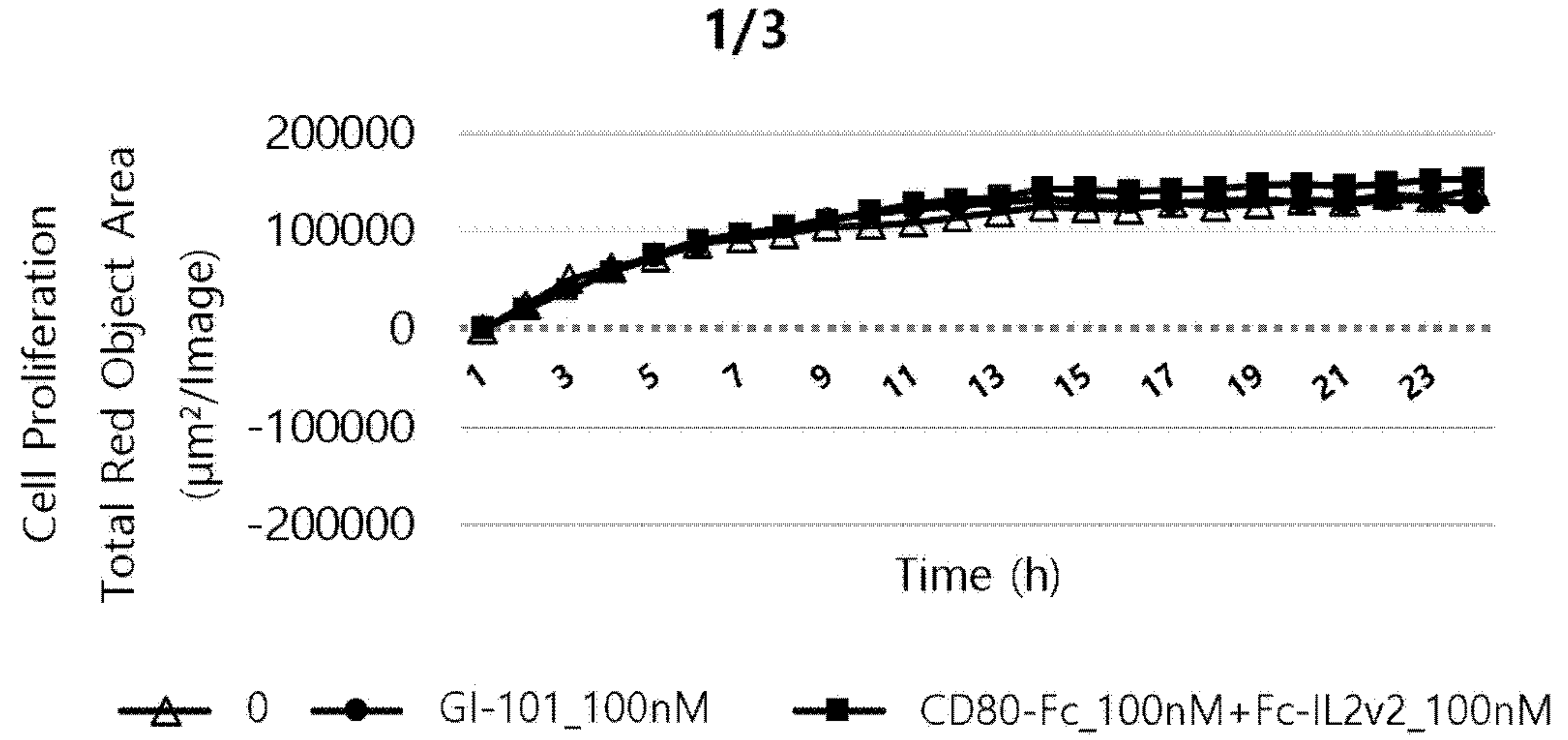
[도22]



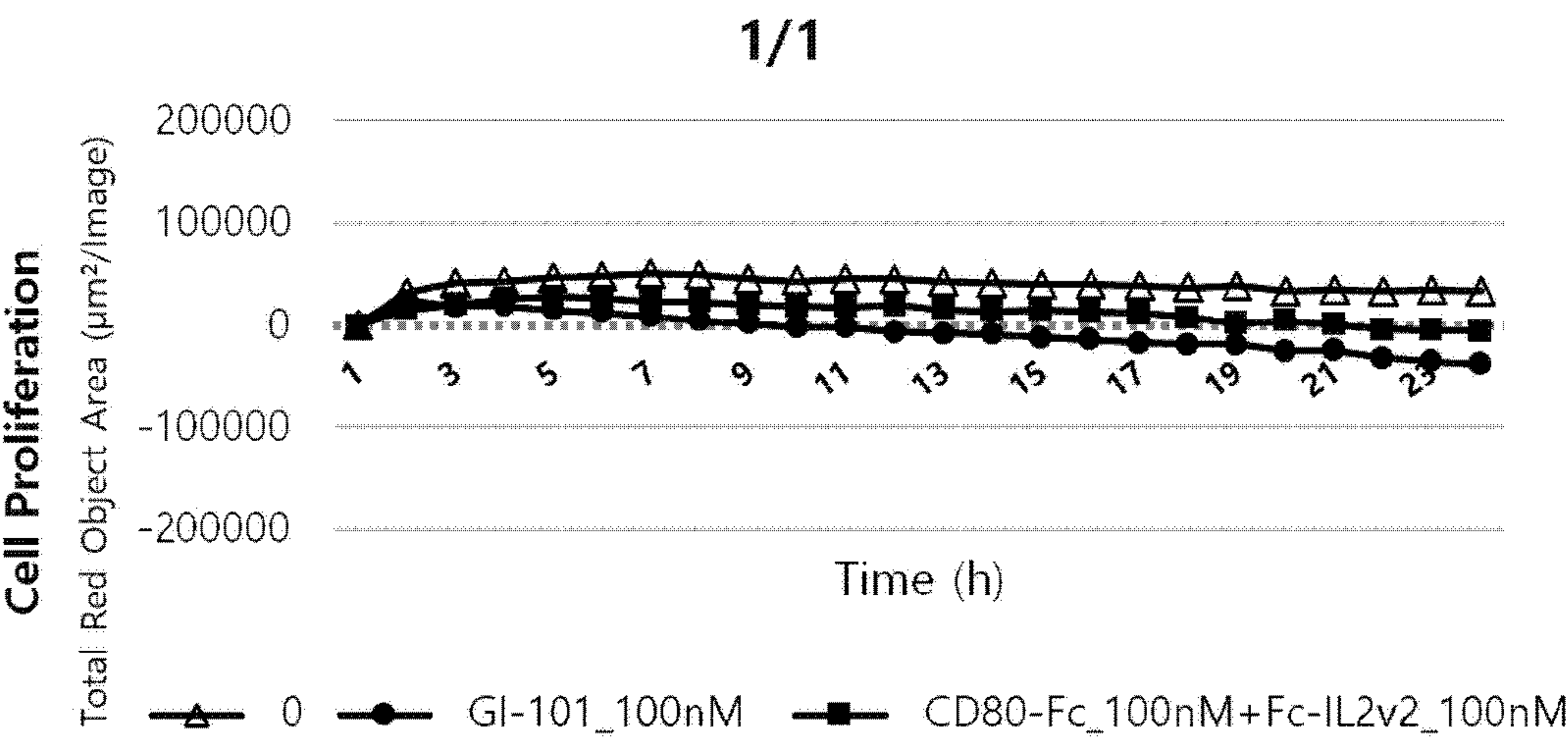
[도23]



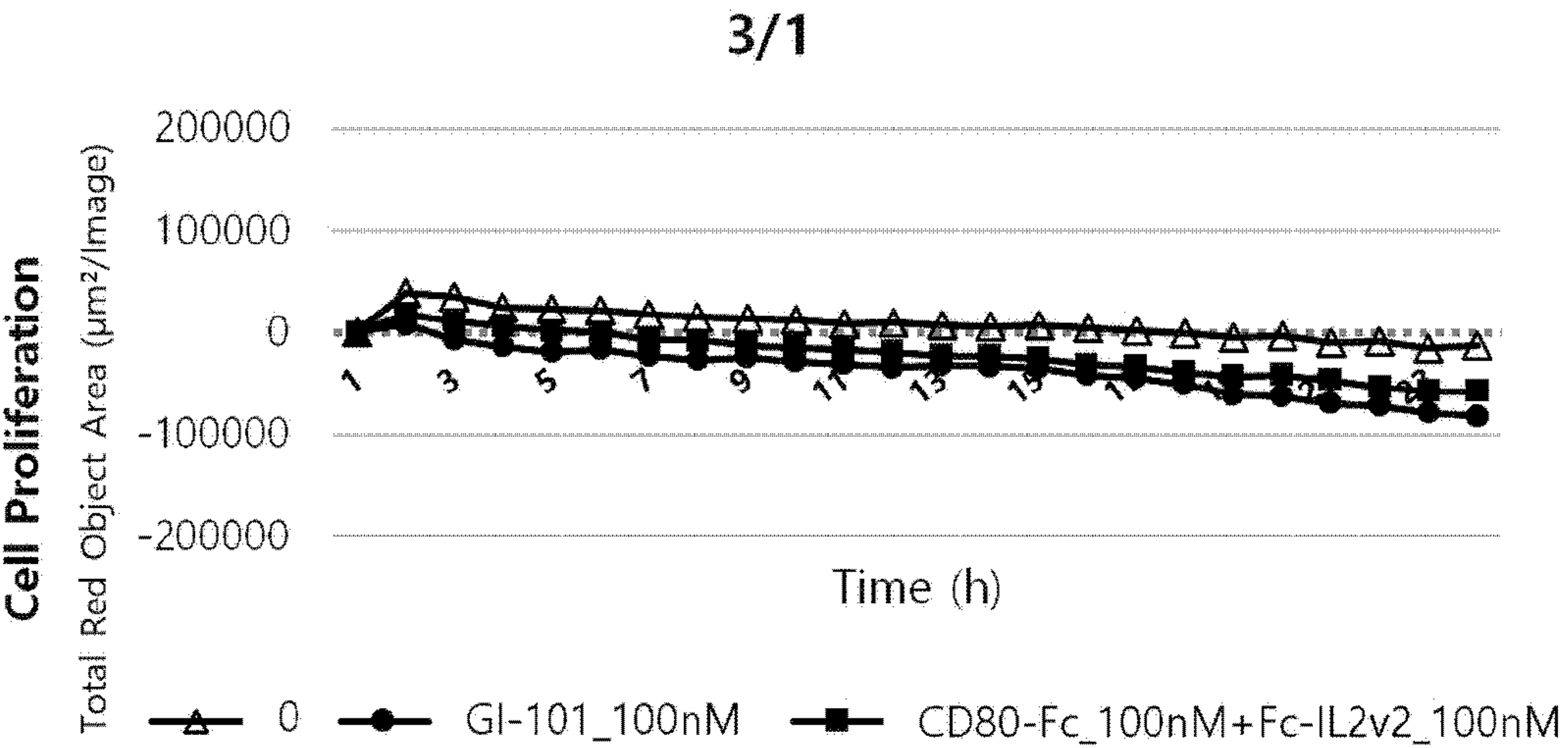
[도24]



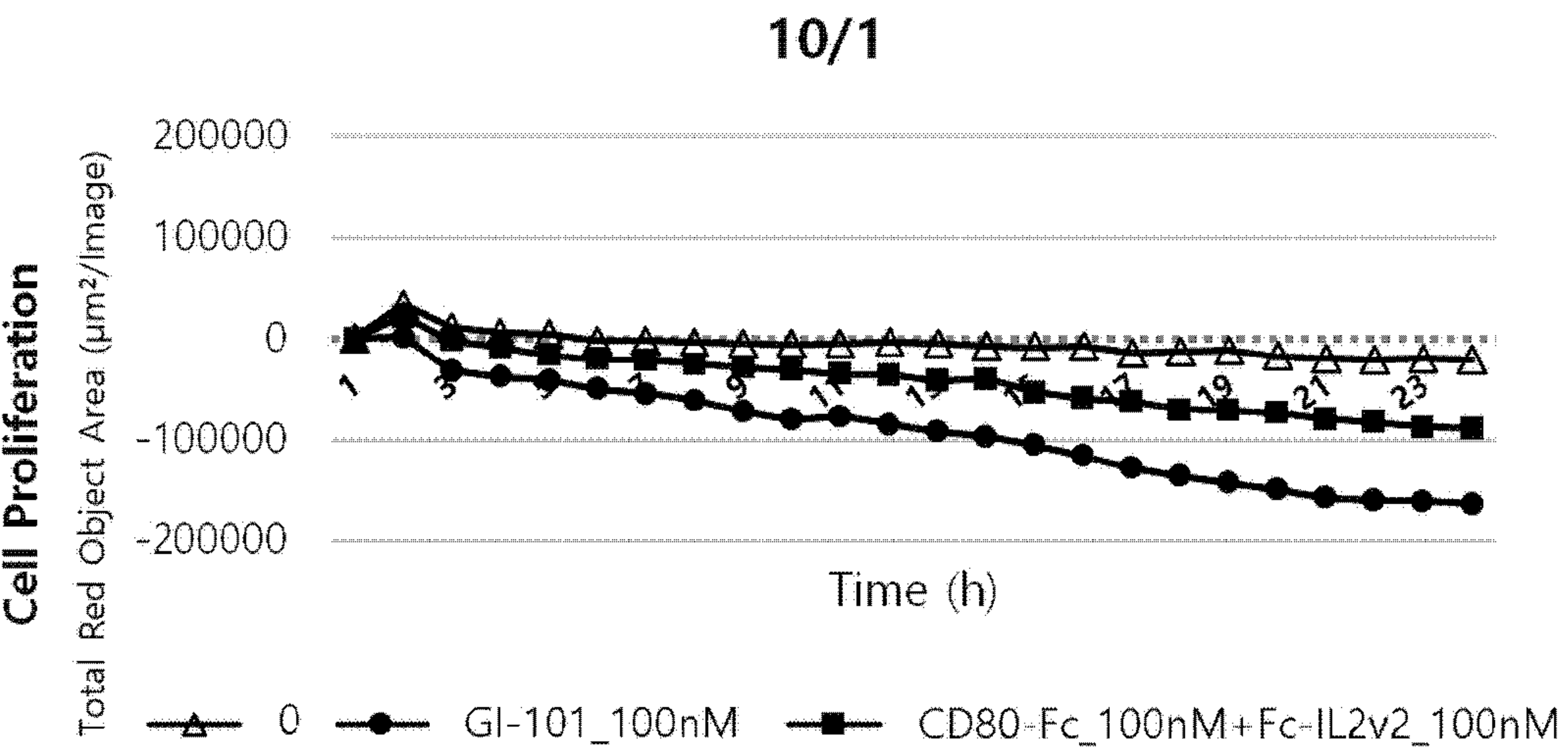
[도25]



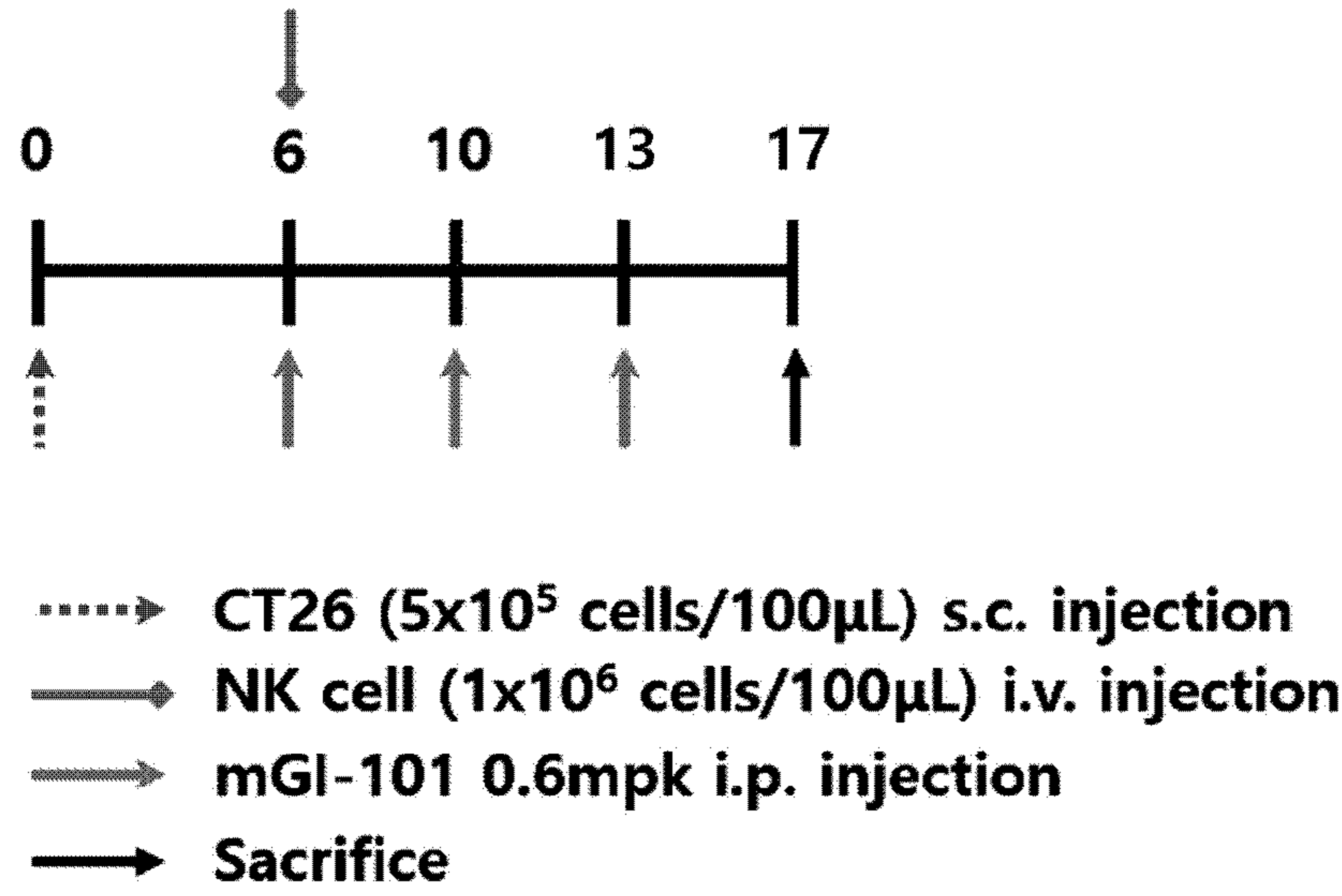
[도26]



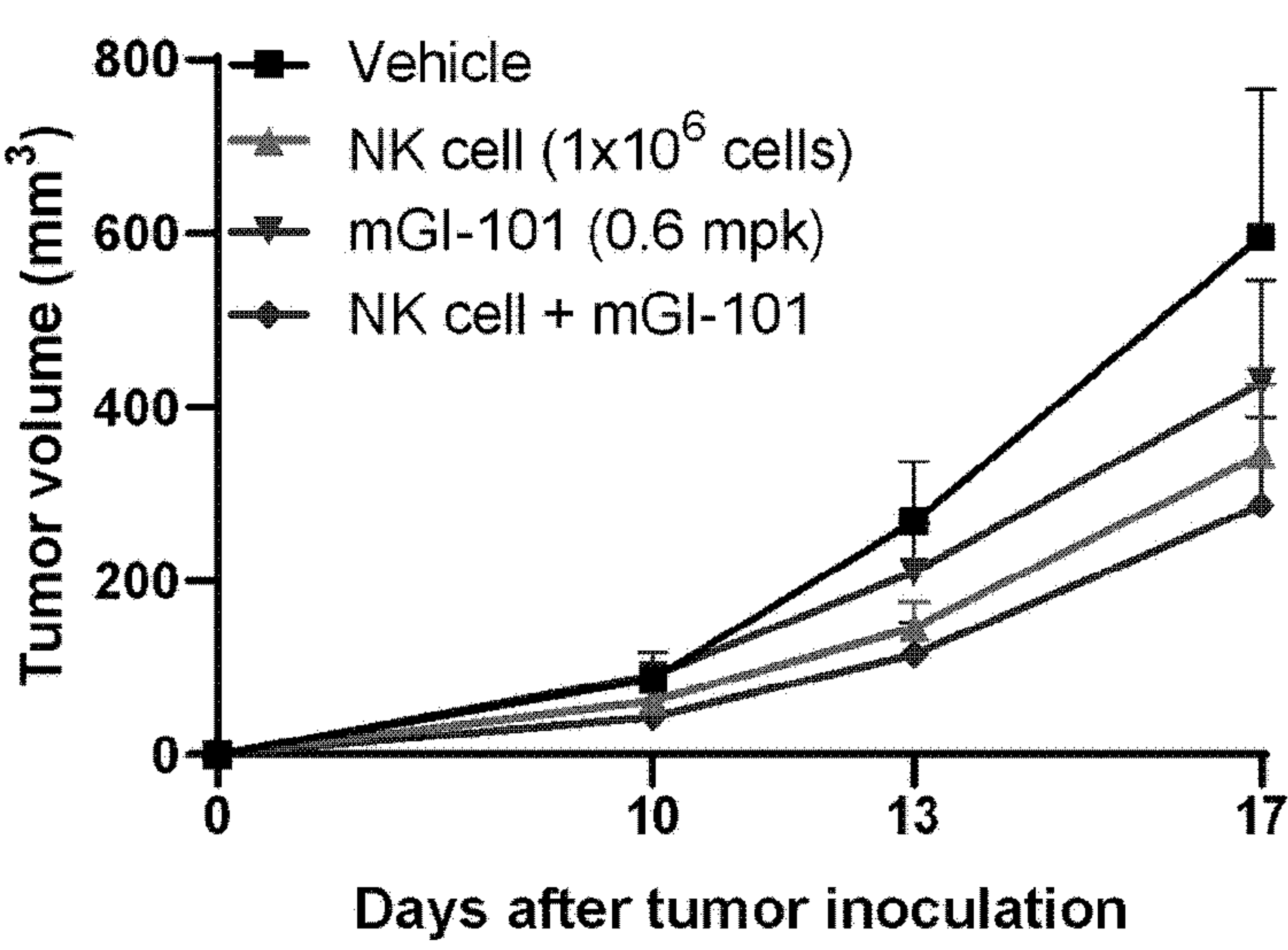
[도27]



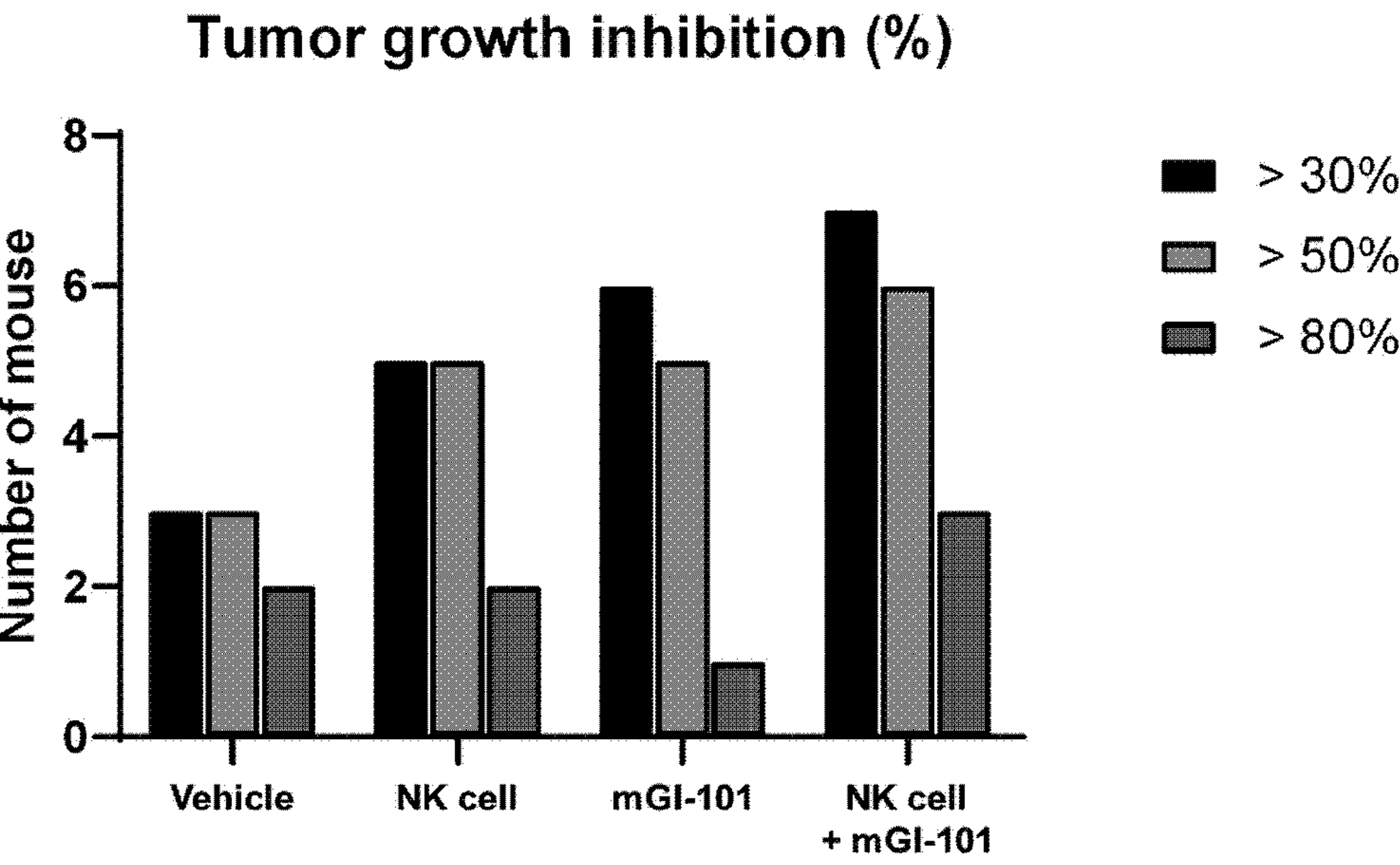
[도28]



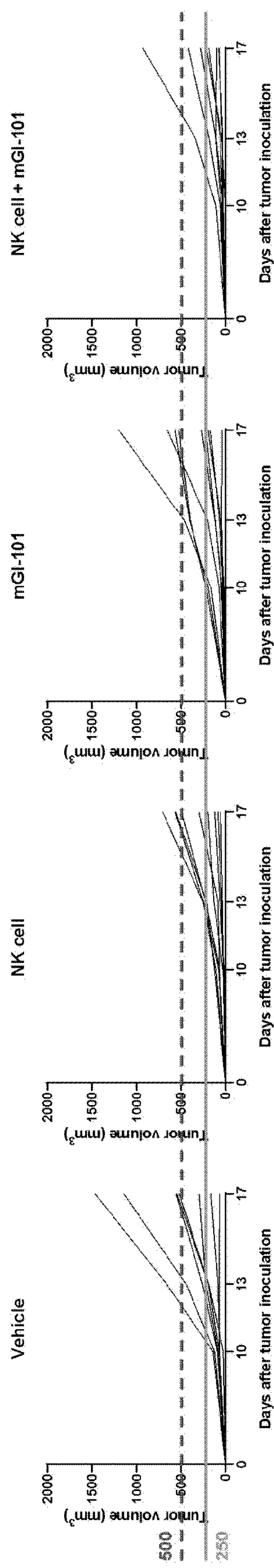
[도29]



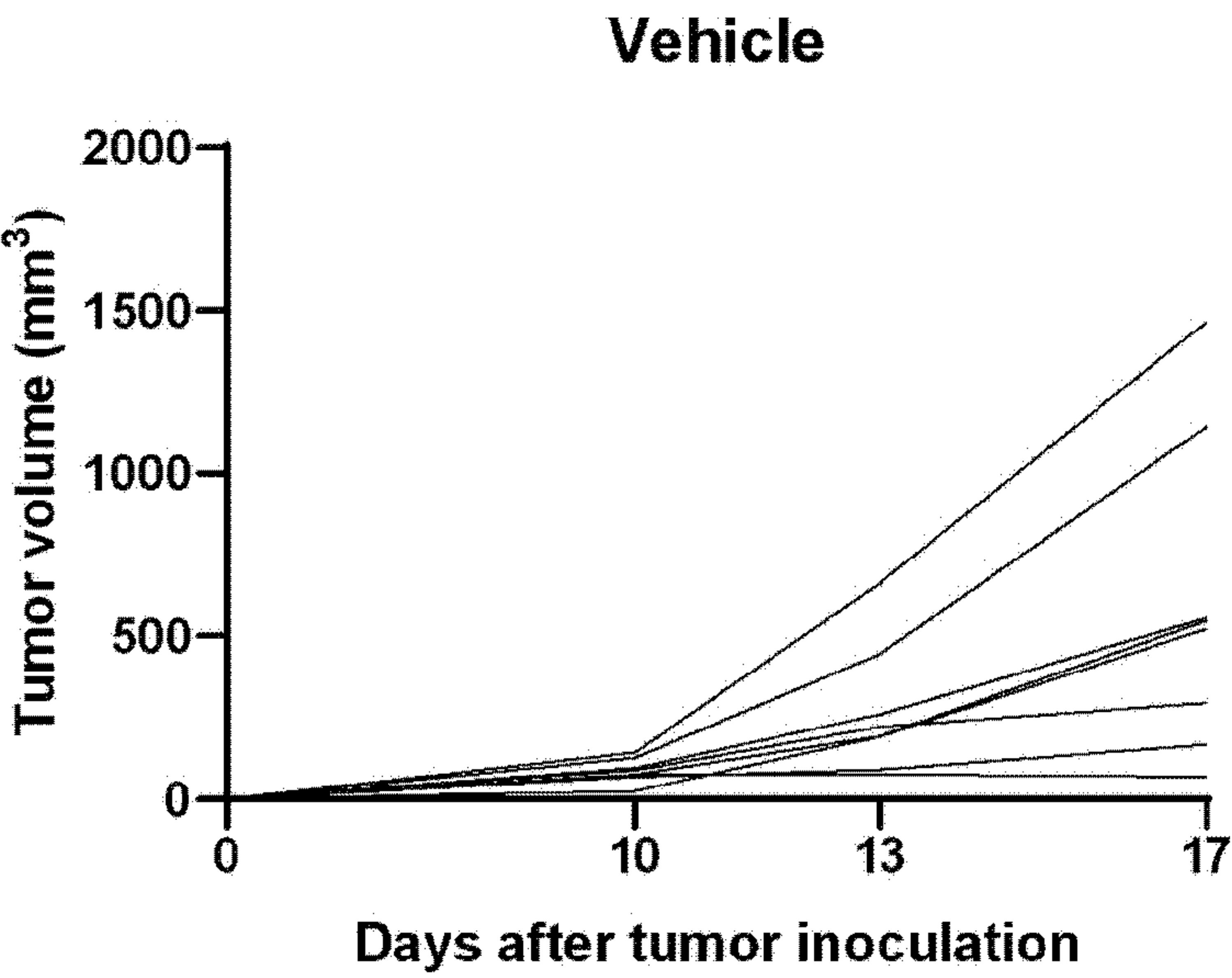
[도30]



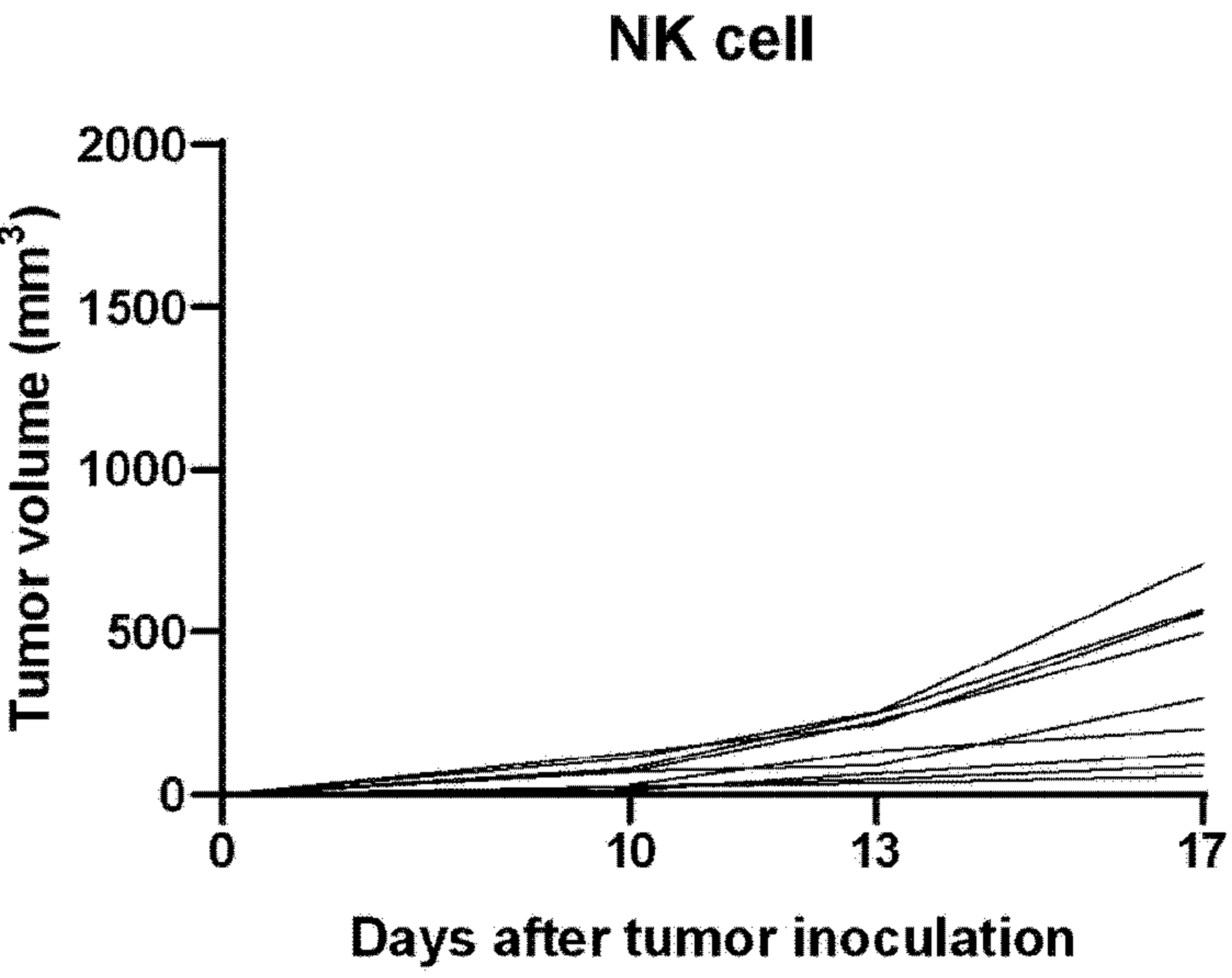
[도31]



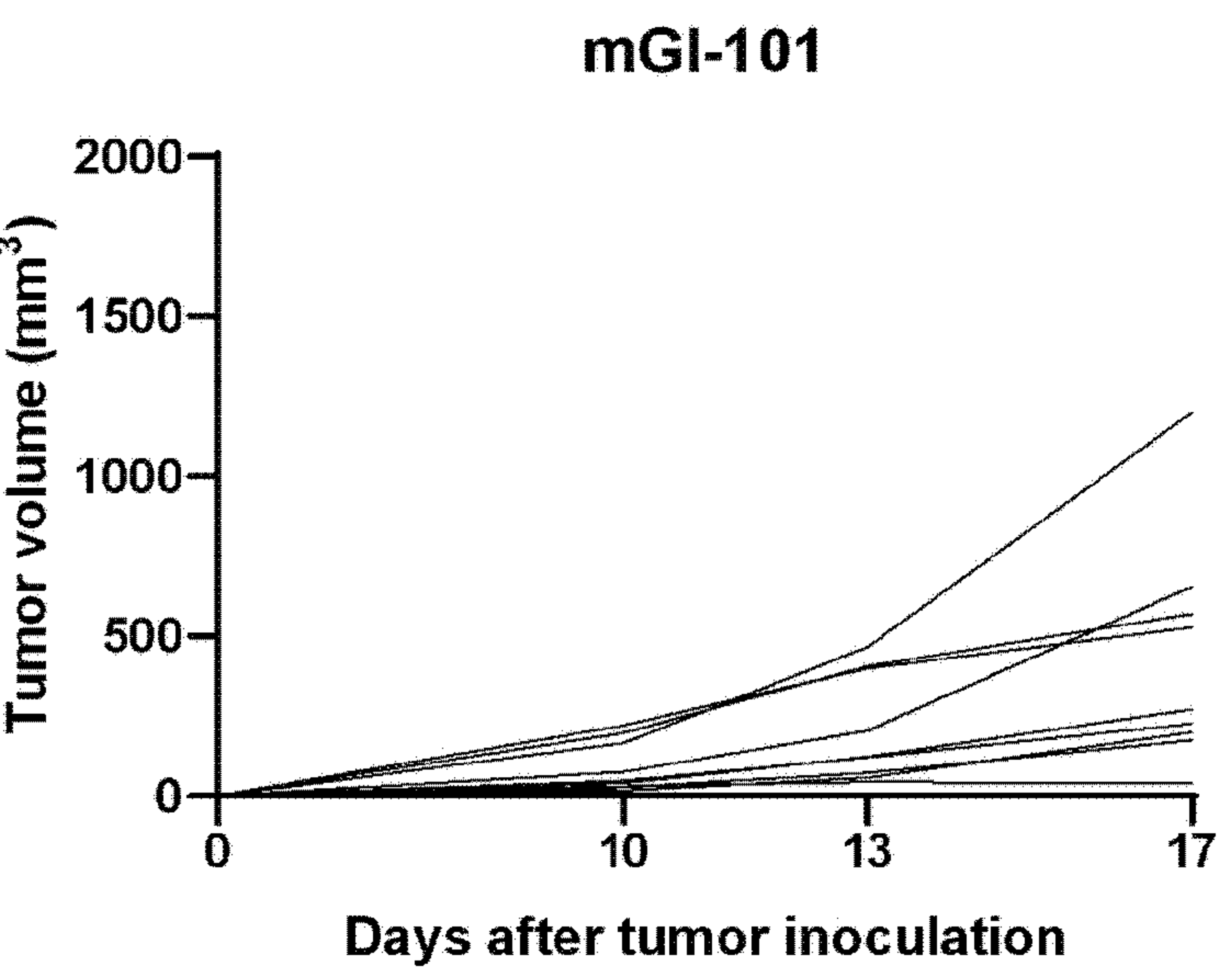
[도32]



[도33]

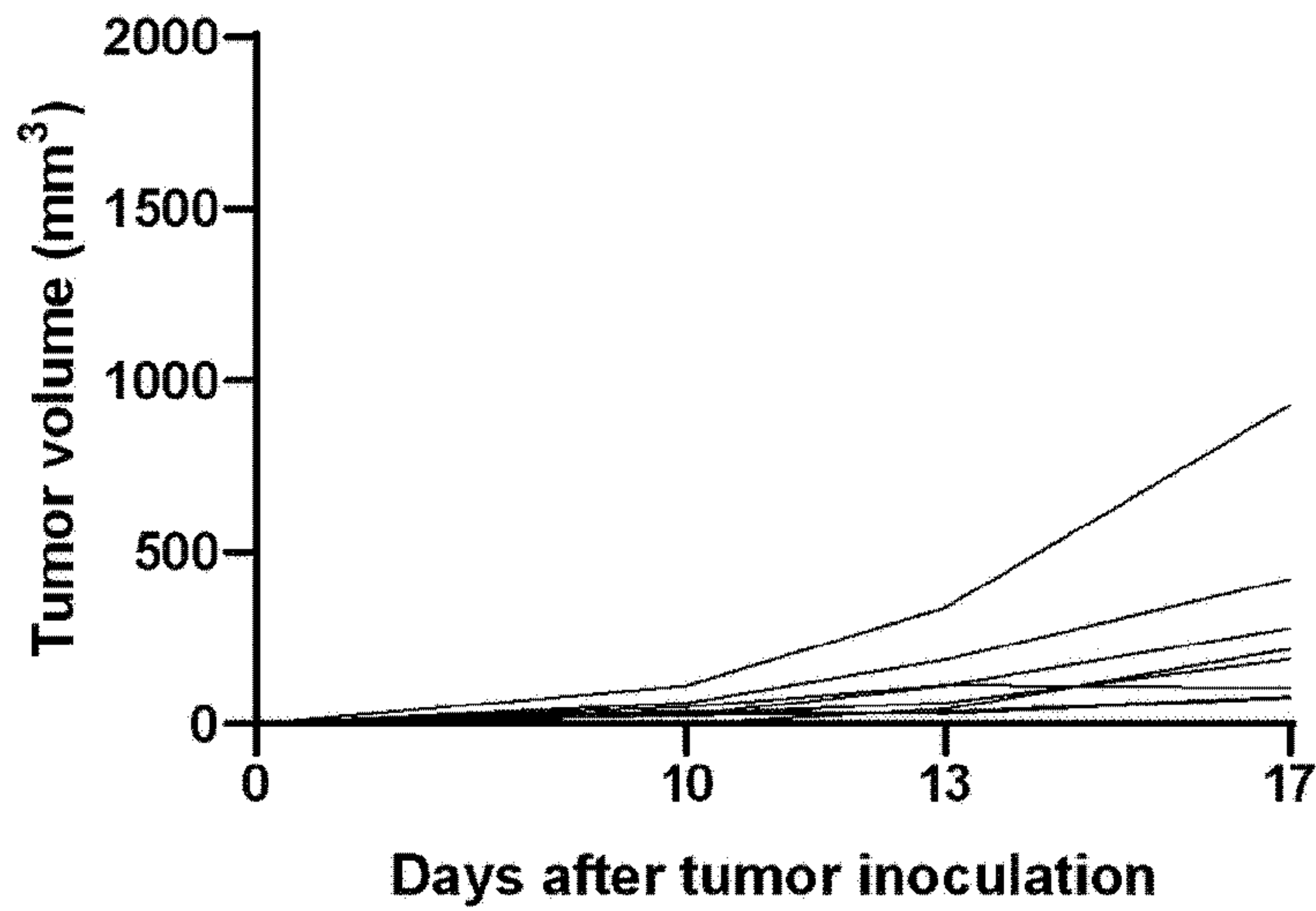


[도34]



[도35]

NK cell + mGI-101



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/016949

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/0783(2010.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C07K 14/55(2006.01)i; C07K 14/705(2006.01)i; A61K 35/17(2014.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 38/00(2006.01)i; A61K 38/20(2006.01)i; A61K 38/17(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)

C12N 5/0783(2010.01); A61K 31/7088(2006.01); A61K 38/00(2006.01); A61K 38/20(2006.01); A61K 39/395(2006.01); C07K 14/55(2006.01); C07K 14/705(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: IL-2, CD80, 융합단백질(fusion protein), 변이(mutation), NK 세포(NK cell), 암(cancer)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	CHAN, L. et al. IL-2/B7.1 (CD80) Fusagene Transduction of AML Blasts by a Self-Inactivating Lentiviral Vector Stimulates T Cell Responses in Vitro: a Strategy to Generate Whole Cell Vaccines for AML. MOLECULAR THERAPY. 2005, vol. 11, no. 1, pp. 120-131. See abstract; pages 120-121; and figure 1.	1,21-22 2-19 20
Y	WO 2017-220989 A1 (KYMAB LIMITED) 28 December 2017 (2017-12-28) See claims 1, 38-39, 41 and 45; and pages 6, 154 and 157.	2-8,12-19
Y	KR 10-2018-0069903 A (FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC.) 25 June 2018 (2018-06-25) See claims 1 and 25-27; paragraph [0042]; and SEQ ID NOs. 1 and 5.	9-11
Y	WO 2018-184964 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 11 October 2018 (2018-10-11) See claims 1-13, 17-18 and 23-32; pages 80-81 and 84; and the drawings.	2-8,12-19



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“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
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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
“D” document cited by the applicant in the international application	“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
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“&” document member of the same patent family
“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	

Date of the actual completion of the international search

27 April 2021

Date of mailing of the international search report

27 April 2021

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/016949

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2013-0149305 A1 (OSTRAND-ROSENBERG, S.) 13 June 2013 (2013-06-13) See entire document.	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/016949

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:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/016949

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2017-220989	A1	28 December 2017	AU	2017-281830	A1	13 December 2018
				BR	112018076260	A2	26 March 2019
				CA	3026474	A1	28 December 2017
				CA	3026477	A1	28 December 2017
				CN	109475602	A	15 March 2019
				CN	109475603	A	15 March 2019
				EP	3292967	A1	14 March 2018
				EP	3292967	B1	28 October 2020
				EP	3471753	A1	24 April 2019
				EP	3471754	A1	24 April 2019
				EP	3497128	A2	19 June 2019
				EP	3559041	A1	30 October 2019
				JP	2019-528083	A	10 October 2019
				JP	2019-534892	A	05 December 2019
				JP	2020-502198	A	23 January 2020
				JP	2020-511932	A	23 April 2020
				KR	10-2019-0030208	A	21 March 2019
				KR	10-2019-0032355	A	27 March 2019
				KR	10-2019-0038618	A	08 April 2019
				MX	2018016364	A	28 November 2019
				RU	2018147413	A	21 July 2020
				SG	11201810509	A	28 December 2018
				TW	201803904	A	01 February 2018
				TW	201803905	A	01 February 2018
				TW	201811820	A	01 April 2018
				TW	201811826	A	01 April 2018
				TW	201900680	A	01 January 2019
				TW	I640536	B	11 November 2018
				US	10604576	B2	31 March 2020
				US	2017-0362321	A1	21 December 2017
				US	2018-0066058	A1	08 March 2018
				US	2019-0202917	A1	04 July 2019
				US	2019-0330345	A1	31 October 2019
				US	2019-0330351	A1	31 October 2019
				US	2019-0338032	A1	07 November 2019
				US	2020-0190191	A1	18 June 2020
				US	9567399	B1	14 February 2017
				US	9617338	B1	11 April 2017
				US	9957323	B2	01 May 2018
				WO	2017-220988	A1	28 December 2017
				WO	2017-220990	A1	28 December 2017
				WO	2018-029474	A2	15 February 2018
				WO	2018-029474	A3	22 March 2018
				WO	2018-115859	A1	28 June 2018
KR	10-2018-0069903	A	25 June 2018	AU	2016-350701	A1	31 May 2018
				BR	112018008865	A2	06 November 2018
				CA	3001131	A1	11 May 2017
				CL	2018001172	A1	21 September 2018
				CN	108884139	A	23 November 2018
				CO	2018004132	A2	30 November 2018

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/016949

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)			
				CR	20180306	A	16 October 2018				
				EA	201891106	A1	28 December 2018				
				EC	SP18041501	A	30 June 2018				
				EP	3371208	A1	12 September 2018				
				IL	258725	A	28 June 2018				
				JP	2018-535204	A	29 November 2018				
				MX	2018005517	A	09 November 2018				
				PE	13002018	A1	09 August 2018				
				PE	20181300	A1	09 August 2018				
				PH	12018500933	A1	19 November 2018				
				SG	11201803009	A	30 May 2018				
				TW	201722985	A	01 July 2017				
				US	10273281	B2	30 April 2019				
				US	2017-0145071	A1	25 May 2017				
				US	2019-0194288	A1	27 June 2019				
				US	2019-0202889	A1	04 July 2019				
				WO	2017-079117	A1	11 May 2017				

WO	2018-184964	A1	11 October 2018	AR	111400	A1	10 July 2019				
				AU	2018-247765	A1	22 August 2019				
				BR	112019017329	A2	14 April 2020				
				CA	3053357	A1	11 October 2018				
				CL	2019002346	A1	10 January 2020				
				CN	110392692	A	29 October 2019				
				CO	2019009354	A2	09 September 2019				
				CR	20190426	A	01 November 2019				
				EP	3606946	A1	12 February 2020				
				JP	2020-515275	A	28 May 2020				
				KR	10-2019-0121816	A	28 October 2019				
				MX	2019011770	A	09 January 2020				
				PE	20191494	A1	21 October 2019				
				SG	11201909205	A	28 November 2019				
				TW	201900220	A	01 January 2019				
				US	2018-0326010	A1	15 November 2018				

				US	2013-0149305	A1	13 June 2013	US	10377810	B2	13 August 2019
				US	2015-0232532	A1	20 August 2015				
				US	2017-0226181	A1	10 August 2017				
				US	8956619	B2	17 February 2015				
				US	9650429	B2	16 May 2017				

A.발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/0783(2010.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C07K 14/55(2006.01)i; C07K 14/705(2006.01)i; A61K 35/17(2014.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 38/00(2006.01)i; A61K 38/20(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i

B.조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/0783(2010.01); A61K 31/7088(2006.01); A61K 38/00(2006.01); A61K 38/20(2006.01); A61K 39/395(2006.01); C07K 14/55(2006.01); C07K 14/705(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: IL-2, CD80, 융합단백질(fusion protein), 변이(mutation), NK 세포(NK cell), 암(cancer)

C.관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y A	CHAN, L. 등, ‘IL-2/B7.1 (CD80) Fusagene Transduction of AML Blasts by a Self-Inactivating Lentiviral Vector Stimulates T Cell Responses in Vitro: a Strategy to Generate Whole Cell Vaccines for AML’, MOLECULAR THERAPY, 2005, 11권, 1호, 페이지 120-131 초록; 페이지 120-121; 도면 1	1,21-22 2-19 20
Y	WO 2017-220989 A1 (KYMAB LIMITED) 2017.12.28 청구항 1, 38-39, 41, 45; 페이지 6, 154, 157	2-8,12-19
Y	KR 10-2018-0069903 A (파이프 프라임 테라퓨틱스, 인크.) 2018.06.25 청구항 1, 25-27; 단락 [0042]; 서열번호 1, 5	9-11
Y	WO 2018-184964 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2018.10.11 청구항 1-13, 17-18, 23-32; 페이지 80-81, 84; 도면	2-8,12-19

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일
2021년04월27일(27.04.2021)

국제조사보고서 발송일
2021년04월27일(27.04.2021)

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

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2019년 7월)

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호

PCT/KR2020/016949

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2013-0149305 A1 (OSTRAND-ROSENBERG, S.) 2013.06.13 전체 문헌	1-22

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. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - ☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일
- b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - ☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2017-220989 A1	2017/12/28	AU 2017-281830 A1	2018/12/13
		BR 112018076260 A2	2019/03/26
		CA 3026474 A1	2017/12/28
		CA 3026477 A1	2017/12/28
		CN 109475602 A	2019/03/15
		CN 109475603 A	2019/03/15
		EP 3292967 A1	2018/03/14
		EP 3292967 B1	2020/10/28
		EP 3471753 A1	2019/04/24
		EP 3471754 A1	2019/04/24
		EP 3497128 A2	2019/06/19
		EP 3559041 A1	2019/10/30
		JP 2019-528083 A	2019/10/10
		JP 2019-534892 A	2019/12/05
		JP 2020-502198 A	2020/01/23
		JP 2020-511932 A	2020/04/23
		KR 10-2019-0030208 A	2019/03/21
		KR 10-2019-0032355 A	2019/03/27
		KR 10-2019-0038618 A	2019/04/08
		MX 2018016364 A	2019/11/28
		RU 2018147413 A	2020/07/21
		SG 11201810509 A	2018/12/28
		TW 201803904 A	2018/02/01
		TW 201803905 A	2018/02/01
		TW 201811820 A	2018/04/01
		TW 201811826 A	2018/04/01
		TW 201900680 A	2019/01/01
		TW I640536 B	2018/11/11
		US 10604576 B2	2020/03/31
		US 2017-0362321 A1	2017/12/21
		US 2018-0066058 A1	2018/03/08
		US 2019-0202917 A1	2019/07/04
		US 2019-0330345 A1	2019/10/31
		US 2019-0330351 A1	2019/10/31
		US 2019-0338032 A1	2019/11/07
		US 2020-0190191 A1	2020/06/18
		US 9567399 B1	2017/02/14
		US 9617338 B1	2017/04/11
		US 9957323 B2	2018/05/01
		WO 2017-220988 A1	2017/12/28
		WO 2017-220990 A1	2017/12/28
		WO 2018-029474 A2	2018/02/15
		WO 2018-029474 A3	2018/03/22
		WO 2018-115859 A1	2018/06/28
KR 10-2018-0069903 A	2018/06/25	AU 2016-350701 A1	2018/05/31
		BR 112018008865 A2	2018/11/06
		CA 3001131 A1	2017/05/11
		CL 2018001172 A1	2018/09/21
		CN 108884139 A	2018/11/23
		CO 2018004132 A2	2018/11/30

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		CR 20180306 A	2018/10/16
		EA 201891106 A1	2018/12/28
		EC SP18041501 A	2018/06/30
		EP 3371208 A1	2018/09/12
		IL 258725 A	2018/06/28
		JP 2018-535204 A	2018/11/29
		MX 2018005517 A	2018/11/09
		PE 13002018 A1	2018/08/09
		PE 20181300 A1	2018/08/09
		PH 12018500933 A1	2018/11/19
		SG 11201803009 A	2018/05/30
		TW 201722985 A	2017/07/01
		US 10273281 B2	2019/04/30
		US 2017-0145071 A1	2017/05/25
		US 2019-0194288 A1	2019/06/27
		US 2019-0202889 A1	2019/07/04
		WO 2017-079117 A1	2017/05/11
WO 2018-184964 A1	2018/10/11	AR 111400 A1	2019/07/10
		AU 2018-247765 A1	2019/08/22
		BR 112019017329 A2	2020/04/14
		CA 3053357 A1	2018/10/11
		CL 2019002346 A1	2020/01/10
		CN 110392692 A	2019/10/29
		CO 2019009354 A2	2019/09/09
		CR 20190426 A	2019/11/01
		EP 3606946 A1	2020/02/12
		JP 2020-515275 A	2020/05/28
		KR 10-2019-0121816 A	2019/10/28
		MX 2019011770 A	2020/01/09
		PE 20191494 A1	2019/10/21
		SG 11201909205 A	2019/11/28
		TW 201900220 A	2019/01/01
		US 2018-0326010 A1	2018/11/15
US 2013-0149305 A1	2013/06/13	US 10377810 B2	2019/08/13
		US 2015-0232532 A1	2015/08/20
		US 2017-0226181 A1	2017/08/10
		US 8956619 B2	2015/02/17
		US 9650429 B2	2017/05/16