(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0155960
(43) 공개일자 2023년11월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/70532 (2013.01)
A61K 39/4631 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2023-0048083
(22) 출원일자 2023년04월12일
심사청구일자 2023년04월12일
(30) 우선권주장
1020220054766 2022년05월03일 대한민국(KR)
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
정상택
서울특별시 강남구 선릉로69길 20, 112동 702호
하지연
서울특별시 강동구 성내로 80, 103동 1304호
(74) 대리인
위병갑

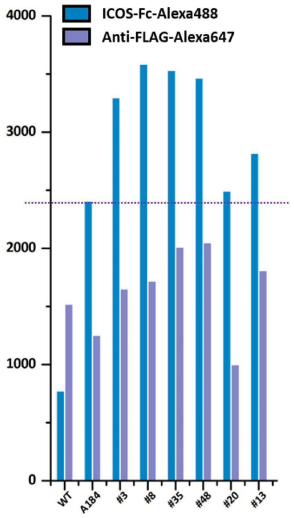
전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 **ICOS와의 결합력이 향상된 ICOS-L 변이체**

(57) 요 약

본 발명은 ICOS와의 결합력이 증대된 ICOS-L 변이체들에 관한 것으로, 본 발명의 ICOS-L 변이체는 야생형 ICOS-L 및 종래의 ICOS-L 변이체에 비해 현저히 증가된 ICOS와의 결합력 (~약 100배)을 가지며, 거대분자인 IgG 항체에 비해 크기가 현저히 작아 종양 미세환경으로의 침투가 용이하고, 생산이 쉽고 다양한 면역 치료제와의 융합을 통한 치료제 및 이미징 분자로의 응용이 용이하므로, 암 치료 및 진단에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
G01N 33/574 (2013.01)
C07K 2319/02 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
G01N 2800/52 (2021.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711155931
과제번호 2020M3E5E2037775
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명 포유류 세포 디스플레이, 차세대 염기서열분석 및 Fc repertoire 분석을 기반으로 한 치료용 항체의 표적세포 살상 작용 기작 극대화 기반 기술 확립
기 여 율 1/3
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711135894
과제번호 2021R1F1A1046672
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 효과적 암 진단 및 치료제를 위한 무당화 PD-1 단백질 변이체 개발
기 여 율 1/3
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2021.06.01 ~ 2022.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711098515
과제번호 2019R1A4A1029000
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 기초연구지원사업 (기초연구실)
연구과제명 면역관문 억제 항체치료 불응암 통합 제어 연구실
기 여 율 1/3
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2025.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

야생형(Wild type) ICOS-L(Inducible T cell costimulator-ligand)의 아미노산 서열 중 4번째, 51번째, 52번째, 54번째, 57번째, 74번째, 130번째 및 234번째 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산이 야생형의 아미노산과 다른 서열로 치환된, ICOS-L 변이체.

청구항 2

제 1항에 있어서, 야생형 ICOS-L의 아미노산은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는, ICOS-L 변이체.

청구항 3

제 1항에 있어서, E4D, Q51P, Q51H, Q51P, N52S, S54N, N57H, L74R, S130C 및 K234R로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ICOS-L 변이체.

청구항 4

제 1항에 있어서, Q51P 및 N57H의 아미노산 치환을 포함하는, ICOS-L 변이체.

청구항 5

제 1항에 있어서, Q51H, S54N 및 S130C의 아미노산 치환을 포함하는, ICOS-L 변이체.

청구항 6

제 1항에 있어서, N52S 및 K234R의 아미노산 치환을 포함하는, ICOS-L 변이체.

청구항 7

제 1항에 있어서, E4D 및 Q51P의 아미노산 치환을 포함하는, ICOS-L 변이체.

청구항 8

제 1항에 있어서, Q51P 및 L74R의 아미노산 치환을 포함하는, ICOS-L 변이체.

청구항 9

제 1항에 있어서, 막관통 도메인을 추가로 포함하는, ICOS-L 변이체.

청구항 10

제 9항에 있어서, 막관통 도메인에 연결된 세포질 시그널링 도메인을 추가로 포함하는, ICOS-L 변이체.

청구항 11

제 1항의 ICOS-L 변이체, 및 면역 글로불린의 Fc 도메인 또는 이의 변이체를 포함하는 면역조절 단백질.

청구항 12

제 11항에 있어서, Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 IgG1의 Fc 도메인에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 13

제 11항에 있어서, Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 IgG1의 Fc에 비해 감소된 효과기 기능(effector function)을 나타내는 Fc 도메인 변이체인, 면역조절 단백질.

청구항 14

제 11항에 있어서, Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 IgG1의 Fc 도메인에서 카밧 넘버링 시스템(Kabat numbering system)에 따라 넘버링된 234, 235 또는 329 위치의 아미노산이 야생형의 아미노산과 다른 서열로 치환된, 면역조절 단백질.

청구항 15

제 11항에 있어서, Fc 도메인 변이체는 L234A, L235A 및 P329G의 아미노산 치환을 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 16

제 1항의 ICOS-L 변이체 또는 제 11항의 면역조절 단백질, 및 표적화 모이어티를 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 17

제 16항에 있어서, 표적화 모이어티는 면역 세포 표면의 분자에 특이적으로 결합하는, 컨쥬게이트.

청구항 18

제 17항에 있어서, 면역 세포는 항원 제시 세포(APC) 또는 림프구인, 컨쥬게이트.

청구항 19

제 16항에 있어서, 표적화 모이어티는 종양 표면의 분자에 결합하는 종양-국소화 모이어티인, 컨쥬게이트.

청구항 20

제 16항에 있어서, 표적화 모이어티는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편인, 컨쥬게이트.

청구항 21

제 20항에 있어서, 항체는 세툭시맙, 파니투무맙, 잘루투무맙, 니모투주맙, 트라스투주맙, 아도-트라스투주맙, 엠타신, 토시투모맙(Bexxar®), 리툭시맙(리툭산, 맙테라), 이브리투모맙 티욱세탄(제발린), 다클리주맙(제나팍스), 겜투주맙(마일로타르그), 알렘투주맙, CEA-스캔 Fab 단편, OC125 모노클로날 항체, ab75705, B72.3, 베바시주맙(Avastin®), 아파티닙, 악시티닙, 보수티닙, 카보자티닙, 세리티닙, 크리조티닙, 다브라페닙, 다사티닙, 디누툭시맙, 엘로티닙, 에베롤리무스, 이브루티닙, 이마티닙, 라파티닙, 렌바티닙, 닐로티닙, 올라파립, 올라라투맙, 팔보시클립, 파조파닙, 페르투주맙, 라무시루맙, 레고라페닙, 룩소리티닙, 소라페닙, 수니티닙, 템시롤리무스, 트라메티닙, 반데타닙, 베무라페닙, 비스모데깁, 바실릭시맙, 이필리무맙, 니보루맙, 펨브롤리주맙, MPDL3280A, 피딜리주맙(CT-011), AMP-224, MSB001078C, 또는 MEDI4736, BMS-935559, LY3300054, 아테졸리주맙, 아벨루맙 또는 두르발루맙인, 컨쥬게이트.

청구항 22

제 1항의 ICOS-L 변이체, 제 11항의 면역조절 단백질 또는 제 16항의 컨쥬게이트를 포함하는 T-세포 활성화제.

청구항 23

제 22항에 있어서, T-세포는 세포독성 T 세포 또는 CAR(chimeric antigen receptor)-T 세포인, T-세포 활성화제.

청구항 24

제 9항의 ICOS-L 변이체를 암호화하는 핵산 및 재조합 항원 수용체의 하나 이상의 사슬을 암호화하는 하나 이상의 핵산을 포함하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 25

제 24항에 있어서, 재조합 항원 수용체는 키메라 항원 수용체 (Chimeric antigen receptor, CAR) 또는 조작된 T 세포 수용체 (T cell receptor, TCR)인 폴리뉴클레오타이드.

청구항 26

제 1항의 ICOS-L 변이체, 제 11항의 면역조절 단백질 또는 제 16항의 컨쥬게이트를 포함하는 조작된 세포.

청구항 27

제 26항에 있어서, 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 조작된 T-세포 수용체를 추가로 포함하는 조작된 세포.

청구항 28

제 1항의 ICOS-L 변이체, 제 11항의 면역조절 단백질, 제 16항의 컨쥬게이트 또는 제 26항의 조작된 세포를 포함하는 항암 보조제.

청구항 29

제 28항에 있어서, 면역 관문 억제제(Immune checkpoint inhibitors)의 항암 효과를 증진시키는 면역 항암 보조제인, 항암 보조제.

청구항 30

제 28항에 있어서, 면역 관문 억제제와 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 병용 투여되는 항암 보조제.

청구항 31

제 29항에 있어서, 면역 관문 억제제가 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CTLA-4 항체, 또는 이의 변이체인, 항암 보조제.

청구항 32

제 1항의 ICOS-L 변이체, 제 11항의 면역조절 단백질, 제 16항의 컨쥬게이트 또는 제 26항의 조작된 세포를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 33

제 32항에 있어서, 암은 뇌종양, 흑색종, 골수종, 비소세포성폐암, 구강암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 암의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 34

제 1항의 ICOS-L 변이체, 제 11항의 면역조절 단백질, 제 16항의 컨쥬게이트 또는 제 26항의 조작된 세포를 포함하는 암 진단용 조성물.

청구항 35

제 34항에 있어서, 발색효소, 방사성 동위원소, 크로모포어(chromopore), 발광물질 및 형광물질로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나를 추가로 포함하는, 암 진단용 조성물.

청구항 36

a) 대상으로부터 분리된 생물학적 시료와 제 34항의 조성물을 접촉시키는 단계;

b) 시료에서 ICOS의 발현을 확인하는 단계; 및

c) 정상 대조군 시료에서의 ICOS의 발현과 비교하는 단계를 포함하는, 암 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 37

면역 관문 억제제를 처리한 대상으로부터 분리된 생물학적 시료에서 제 1항의 ICOS-L 변이체, 제 11항의 면역조절 단백질, 제 16항의 컨쥬게이트 또는 제 26항의 조작된 세포를 이용하여 ICOS의 발현양을 확인하는 단계를 포함하는, 면역 관문 억제제에 대한 치료 반응성 예측 또는 예후 진단 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 ICOS와의 결합력이 증대된 ICOS-L 변이체들에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암 치료를 위한 의약품은 크게 저분자 의약품과 고분자 의약품으로 나뉘며 특이성이 없어 부작용이 상대적으로 큰 저분자 의약품에 비해 특이성이 있는 고분자 의약품이 치료제로서 각광을 받고 있다. 암세포들은 면역세포들에 의한 살상 작용기작을 회피하기 위해 정상세포들이 면역세포 활성화를 억제할 때 이용되는 면역관문(immune checkpoint) 단백질을 세포 표면에 발현하고 있어, 최근 암을 치료하기 위한 방법으로써 면역관문 억제 단백질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 면역 관문 억제제에 대한 반응을 보이는 환자는 치료과정에서의 부작용도 적고, 다양한 암종들에 대해 기존 항암제에 비해 우수한 치료 효과들이 보고되면서 이용이 폭발적으로 증가하고 있지만, 여전히 절반 이상의 환자들은 임상 허가된 면역 관문 억제제들에 반응을 보이지 않으며, 일부 초기 반응자들도 치료 후 다시 암이 진행되는 내성이 관측되고 있다. 면역 관문 억제제에 대한 내성 원인은 환자별 종양면역학적 특성에 따라 다르기 때문에 효과적인 치료와 의료비용 절감을 위해 치료적합 환자 선별이 가능한 새로운 바이오마커가 필요하며, 많은 전임상 및 임상 연구사례들에서 면역자극 약물을 이용한 병용 치료법이 환자의 반응률을 향상시킨다는 것이 보고되고 있어 효과적인 면역자극 치료제 또한 절실히 필요하다.

[0003] 최근 CTLA-4(Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4), PD-1(Programmed Cell Death Protein 1) 등의 면역관문 단백질들의 작용을 억제하는 다양한 항체 치료제들이 개발되어 임상 수요가 폭발적으로 증가하고 있으며, 이에 따라 면역 관문 억제제 시장은 2020년부터 2027년까지 연평균 21.8%로 지속적으로 성장할 것으로 예측되고 있다. 그러나, 항체는 분자량 150,000의 거대 분자 단백질이기 때문에 암 조직 내부로 침투가 어려워 암 미세환경 (tumor micro-environment) 내부 종양세포들과 면역세포들의 면역관문 단백질들의 작용을 저해하기가 어려운 단점이 존재한다. 보다 효과적인 치료를 위해서는 항체보다 크기가 훨씬 작으면서 암 조직 내부로 침투가 용이한 단백질 치료제 필요성이 대두되었다.

[0004] 한편, T 세포 활성화를 위한 공동자극 수용체인 ICOS(Inducible Co-Stimulator)는 외부 항원에 대한 T 세포 반응을 활성화시키는 T 세포 특이적 공동자극 분자로, 다양한 암종들의 치료 예후와 관련이 있다는 사실들이 보고되면서 면역자극을 위한 치료제뿐만 아니라 면역 관문 억제제 치료 반응 예측을 위한 바이오마커로서의 가능성도 제시되고 있다. 종양 미세환경에 존재하는 T 세포들을 관측하기 위해 방사성 동위원소를 활용한 실시간 이미징이나 암 조직 분리 후 염색을 통한 ICOS 발현 유무 검증이 필요하며, 거대 분자인 항체에 비해 크기가 훨씬 작고 암 조직 침투가 용이한 작은 단백질 분자 사용이 바람직하다. 또한, ICOS 표적물질들은 면역 관문 억제제들과의 병용 치료제로써의 효능도 검증되고 있어, ICOS의 활성을 촉진함으로써 암세포 사멸에 매우 중요한 세포독성 T 세포를 더욱 활성화시키거나, ICOS를 발현하는 조절 T 세포를 사멸시킴으로써 항암 효능을 유도하는 2가지 측면으로 치료제 개발 연구들이 진행되고 있다. 그러나, 야생형 ICOS-L은 ICOS에 매우 낮은 친화도 (평형해리상수 = ~700 nM)을 가지기 때문에 이의 활용이 어려운 문제점이 있어 왔다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 ICOS와의 결합력이 증대된 ICOS-L 변이체를 제공하는 것이다.

[0006] 또한, 본 발명의 목적은 ICOS 활성 촉진제를 제공하는 것이다.

[0007] 또한, 본 발명의 목적은 ICOS 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 목적은 암의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 목적은 암 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명의 목적은 암 진단을 위한 정보제공 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 아울러, 본 발명의 목적은 면역 관문 억제제에 대한 치료 반응성 예측 또는 예후 진단 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적의 달성을 위해, 본 발명은 ICOS와의 결합력이 증대된 ICOS-L 변이체를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 ICOS-L 변이체를 포함하는 ICOS 활성 촉진제를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 ICOS-L 변이체를 포함하는 ICOS 검출용 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 ICOS-L 변이체를 포함하는 암의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 ICOS-L 변이체를 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 암 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다.

[0018] 아울러, 본 발명은 면역 관문 억제제에 대한 치료 반응성 예측 또는 예후 진단 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 ICOS-L 변이체는 야생형 ICOS-L 및 종래의 ICOS-L 변이체에 비해 현저히 증가된 ICOS와의 결합력 (~약 100배)을 가지며, 거대분자인 IgG 항체에 비해 크기가 현저히 작아 종양 미세환경으로의 침투가 용이하고, 생산이 쉽고 다양한 면역 치료제와의 융합을 통한 치료제 및 이미징 분자로의 응용이 용이하므로, 암 치료 및 진단에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 ICOS-Fc 단백질의 발현벡터 및 정제된 단백질의 SDS-PAGE 젤 사진을 나타낸 도이다.

도 2는 정제된 ICOS-Fc와 야생형 ICOS-L의 결합력을 ELISA로 분석한 도이다:

PD-L1 WT: 음성 대조군.

도 3은 ICOS-L 디스플레이 방법 선택을 위한 유세포 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 구축된 이니셜 라이브러리의 아미노산 서열 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 스크리닝 진행 과정에 따른 라이브러리 증폭을 유세포 분석기로 검증한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 유세포 분석기를 이용한 ICOS-L 변이체들의 ICOS와의 결합력 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 야생형 ICOS-L, 대조군 A184, 및 발현 및 정제한 본 발명에서 발굴한 ICOS-L 변이체 6종 (Y3, Y8, Y13, Y20, Y35 및 Y48)의 SDS-PAGE 젤 사진을 나타낸 도이다.

도 8은 야생형 ICOS-L, 대조군 A184, 및 본 발명에서 발굴한 ICOS-L 변이체 6종의 ICOS 결합력을 ELISA로 분석한 도이다.

도 9는 Y8 변이체의 결정적 돌연변이 분석을 위해 발현 및 정제된 ICOS-L 변이체들 (Y8_P51Q 및 Y8_H57N)의 SDS-PAGE 젤 사진을 나타낸 도이다.

도 10은 야생형 ICOS-L, 대조군 A184, Y8 변이체, Y8_P51Q 변이체 및 Y8_H57N 변이체의 ICOS와의 결합력을 ELISA로 분석한 도이다.

도 11은 Octet을 사용하여 측정한 야생형 ICOS-L, 대조군 A184, Y8 변이체, Y8_P51Q 변이체 및 Y8_H57N 변이체의 센서그램을 나타낸 것이다.

도 12는 Octet을 사용하여 측정한 야생형 ICOS-L, 대조군 A184, Y8 변이체, Y8_P51Q 변이체 및 Y8_H57N 변이체의 KD 값을 나타낸 것이다.

도 13은 정제된 ICOS 단일체 단백질의 SDS-PAGE 젤 사진을 나타낸 도이다.

도 14는 발현 및 정제된 Fc에 융합된 야생형 ICOS-L, A184 및 본 발명의 변이체 (Y8 및 Y8_H57N) 단백질들의

SDS-PAGE 젤 사진을 나타낸 도이다.

도 15는 발현 및 정제된 ICOS-L-Fc (야생형-Fc, A184-Fc, Y8-Fc 및 Y8_H57N-Fc)와 야생형 ICOS의 결합력을 ELISA로 분석한 도이다.

도 16은 PD-L1-Fc 및 ICOS-L-Fc (야생형-Fc, A184-Fc, Y8-Fc 및 Y8_H57N-Fc)들이 유도한 T 세포 분화 정도를 유세포 분석기로 검증한 결과를 나타낸 도이다.

도 17은 PD-L1-Fc 및 ICOS-L-Fc (야생형-Fc, A184-Fc, Y8-Fc 및 Y8_H57N-Fc)들이 유도한 T 세포의 인터페론 감마 분비 양을 ELISA로 검증한 결과를 나타낸 도이다.

도 18은 Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙(ATZ)의 SDS-PAGE 젤 사진을 나타낸 도이다.

도 19는 Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 중쇄에 야생형 ICOS-L, ICOS-L A184 변이체 또는 본 발명의 ICOS-L 변이체 (Y8 및 Y8_H57N) 단백질들이 융합된 단백질들 (항체에 융합된 ICOS-L)의 SDS-PAGE 젤 사진을 나타낸 도이다.

도 20은 Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 경쇄에 야생형 ICOS-L, ICOS-L A184 변이체 또는 본 발명의 ICOS-L 변이체 (Y8 및 Y8_H57N) 단백질들이 융합된 단백질들 (항체에 융합된 ICOS-L)의 SDS-PAGE 젤 사진을 나타낸 도이다.

도 21은 아테졸리주맙의 중쇄에 야생형 ICOS-L, ICOS-L A184 변이체 또는 본 발명의 ICOS-L 변이체 (Y8 및 Y8_H57N)가 융합된 단백질과 야생형 ICOS의 결합력을 ELISA로 분석한 도이다:

ATZ; Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙;

ATZ(H)-Wild-type: Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 중쇄에 야생형 ICOS-L이 융합된 단백질;

ATZ(H)-A184: Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 중쇄에 ICOS-L A184 변이체가 융합된 단백질;

ATZ(H)-Y8: Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 중쇄에 ICOS-L Y8 변이체가 융합된 단백질; 및

ATZ(H)-Y8_H57N: Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 중쇄에 ICOS-L Y8_H57N 변이체가 융합된 단백질.

도 22은 아테졸리주맙의 경쇄에 야생형 ICOS-L, ICOS-L A184 변이체 또는 본 발명의 ICOS-L 변이체 (Y8 및 Y8_H57N)가 융합된 단백질과 야생형 ICOS의 결합력을 ELISA로 분석한 도이다:

ATZ; Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙;

ATZ(L)-Wild-type: Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 경쇄에 야생형 ICOS-L이 융합된 단백질;

ATZ(L)-A184: Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 경쇄에 ICOS-L A184 변이체가 융합된 단백질;

ATZ(L)-Y8: Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 경쇄에 ICOS-L Y8 변이체가 융합된 단백질; 및

ATZ(L)-Y8_H57N: Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 경쇄에 ICOS-L Y8_H57N 변이체가 융합된 단백질.

도 23은 아테졸리주맙의 중쇄에 야생형 ICOS-L, ICOS-L A184 변이체 또는 본 발명의 ICOS-L 변이체 (Y8 및 Y8_H57N)가 융합된 단백질 (50 nM)이 유도한 T 세포 분화 정도를 유세포 분석기로 검증한 결과를 나타낸 도이다:

ATZ; Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙;

ATZ(H)-Wild-type: Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 중쇄에 야생형 ICOS-L이 융합된 단백질;

ATZ(H)-A184: Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 중쇄에 ICOS-L A184 변이체가 융합된 단백질;

ATZ(H)-Y8: Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 중쇄에 ICOS-L Y8 변이체가 융합된 단백질; 및

ATZ(H)-Y8_H57N: Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 중쇄에 ICOS-L Y8_H57N 변이체가 융합된 단백질.

도 24는 아테졸리주맙의 경쇄에 야생형 ICOS-L, ICOS-L A184 변이체 또는 본 발명의 ICOS-L 변이체 (Y8 및 Y8_H57N)가 융합된 단백질 (50 nM)이 유도한 T 세포 분화 정도를 유세포 분석기로 검증한 결과를 나타낸 도이다:

ATZ; Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙;

ATZ(L)-Wild-type: Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 경쇄에 야생형 ICOS-L이 융합된 단백질;

ATZ(L)-A184: Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 경쇄에 ICOS-L A184 변이체가 융합된 단백질;

ATZ(L)-Y8: Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 경쇄에 ICOS-L Y8 변이체가 융합된 단백질; 및

ATZ(L)-Y8_H57N: Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 경쇄에 ICOS-L Y8_H57N 변이체가 융합된 단백질.

도 25은 아테졸리주맙의 중쇄에 야생형 ICOS-L, ICOS-L A184 변이체 또는 본 발명의 ICOS-L 변이체 (Y8 및 Y8_H57N)가 융합된 단백질 (100 nM)이 유도한 T 세포의 인터페론 감마 분비량을 ELISA로 검증한 결과를 나타낸 도이다:

ATZ; Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙;

ATZ(H)-Wild-type: Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 중쇄에 야생형 ICOS-L이 융합된 단백질;

ATZ(H)-A184: Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 중쇄에 ICOS-L A184 변이체가 융합된 단백질;

ATZ(H)-Y8: Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 중쇄에 ICOS-L Y8 변이체가 융합된 단백질; 및

ATZ(H)-Y8_H57N: Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 중쇄에 ICOS-L Y8_H57N 변이체가 융합된 단백질.

도 26은 아테졸리주맙의 경쇄에 야생형 ICOS-L, ICOS-L A184 변이체 또는 본 발명의 ICOS-L 변이체 (Y8 및 Y8_H57N)가 융합된 단백질 (100 nM)이 유도한 T 세포의 인터페론 감마 분비량을 ELISA로 검증한 결과를 나타낸 도이다:

ATZ; Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙;

ATZ(L)-Wild-type: Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 경쇄에 야생형 ICOS-L이 융합된 단백질;

ATZ(L)-A184: Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 경쇄에 ICOS-L A184 변이체가 융합된 단백질;

ATZ(L)-Y8: Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 경쇄에 ICOS-L Y8 변이체가 융합된 단백질; 및

ATZ(L)-Y8_H57N: Fc 도메인에 LALAPG 돌연변이를 도입한 아테졸리주맙의 경쇄에 ICOS-L Y8_H57N 변이체가 융합된 단백질.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0022] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0023] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 통합된다.

[0024] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib(α-아미노이소부티르산), Sar(N-methylglycine) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 발명에서 약어로 언급된 아미노산은 하기와 같이 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다:

[0025] 알라닌: A, 아르기닌: R, 아스파라긴: N, 아스파르트산: D, 시스테인: C, 글루탐산: E, 글루타민: Q, 글리신: G, 히스티딘: H, 이소류신: I, 류신: L, 리신: K, 메티오닌: M, 페닐알라닌: F, 프롤린: P, 세린: S, 트레오닌: T, 트립토판: W, 티로신: Y 및 발린: V.

[0027] 일 측면에서, 본 발명은 야생형(Wild type) ICOS-L(Inducible Co-Stimulator-ligand)의 아미노산 서열 중 4번째, 51번째, 52번째, 54번째, 57번째, 74번째, 130번째 및 234번째 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산이 야생형의 아미노산과 다른 서열로 치환된, ICOS-L 변이체에 관한 것이다.

[0028] 일 구현예에서, 상기 ICOS-L 변이체는 야생형 ICOS-L에 비해 ICOS와의 결합력이 증대될 수 있다.

[0029] 일 구현예에서, 야생형 ICOS-L의 아미노산은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 상기 아미노산 위치는 서열번호 1의 아미노산 서열을 기준으로 할 수 있다.

[0030] 일 구현예에서, ICOS-L 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열로 구성될 수 있다.

[0031] 일 구현예에서, 본 발명의 ICOS-L 변이체는 E4D, Q51P, Q51H, Q51P, N52S, S54N, N57H, L74R, S130C 및 K234R로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있으며, 이로 인해 ICOS와의 결합력이 증대될 수 있다.

[0032] 일 구현예에서, 본 발명의 ICOS-L 변이체는 아미노산 치환 N57H를 포함할 수 있으며, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 변이체 Y8_P51Q일 수 있다.

[0033] 일 구현예에서, 본 발명의 ICOS-L 변이체는 아미노산 치환 Q51P를 포함할 수 있으며, 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 변이체 Y8_H51N일 수 있다.

[0034] 일 구현예에서, 본 발명의 ICOS-L 변이체는 아미노산 치환 Q51P 및 N57H를 포함할 수 있으며, 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 변이체 Y8일 수 있다.

[0035] 일 구현예에서, 본 발명의 ICOS-L 변이체는 아미노산 치환 Q51H, S54N 및 S130C를 포함할 수 있으며, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 변이체 Y13일 수 있다.

[0036] 일 구현예에서, 본 발명의 ICOS-L 변이체는 아미노산 치환 N52S 및 K234R를 포함할 수 있으며, 서열번호 6의 아

미노산 서열을 포함하는 변이체 Y20일 수 있다.

[0037] 일 구현예에서, 본 발명의 ICOS-L 변이체는 아미노산 치환 E4D 및 Q51P를 포함할 수 있으며, 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 변이체 Y35일 수 있다.

[0038] 일 구현예에서, 본 발명의 ICOS-L 변이체는 아미노산 치환 Q51P 및 L74R를 포함할 수 있으며, 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 변이체 Y48일 수 있다.

[0039] 일 구현예에서, 본 발명의 ICOS-L 변이체는 막관통 도메인을 추가로 포함할 수 있다.

[0040] 일 구현예에서, 본 발명의 ICOS-L 변이체는 막관통 도메인에 연결된 세포질 시그널링 도메인을 추가로 포함할 수 있다.

[0041] 일 구현예에서, 본 발명의 ICOS-L 변이체는 발색효소, 방사성 동위원소, 크로모포어(chromopore), 발광물질 및 형광물질로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나로 표지될 수 있으며, 형광물질은 Cy(cyanine) 계열, 로다민(Rhodamine) 계열, 알렉사(Alexa) 계열, BODIPY 계열 또는 ROX 계열의 형광물질일 수 있으며, 나일 레드 (Nile Red), 보디피 (BODIPY, 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene), 시아닌 (cyanine), 플루오레세인 (fluorescein), 로다민 (rhodamine), 쿠마린 (coumarine) 또는 알렉사 (Alexa)일 수 있다.

[0042] 본 발명의 ICOS-L 변이체는 야생형 ICOS-L 단백질 (또는 펩타이드)에서 일부 아미노산 서열이 치환된 것을 말하며, 본 발명에서 사용된, 용어 "변이체"는 기준 물질과 비교하였을 때 최소한 한개의 아미노산 차이(치환, 삽입 또는 결손)를 포함하는 대응하는 아미노산 서열을 말한다. 특정 구체예들에 있어서 "변이체"는 기준 서열과 비교하였을 때 높은 아미노산 서열 상동성(homology) 및/또는 보존적 아미노산 치환, 결손 및/또는 삽입을 가진다. 또한, 본 발명에서 사용된, 용어 "ICOS-L 변이체"는 이의 ICOS와의 결합 활성을 조절하기 위하여 하나 또는 그 이상의 아미노산에서 돌연변이된 ICOS-L 변이체 단백질을 말한다.

[0043] 구체적으로, 본 발명의 ICOS-L 변이체는 표준 합성 방법, 재조합 발현 시스템, 또는 임의의 다른 당해 분야의 방법에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 펩타이드들은, 예를 들어 하기를 포함하는 방법을 포함하는 다수의 방법으로 합성될 수 있다:

[0044] (a) 펩타이드를 고체상 또는 액체상 방법의 수단으로 단계적으로 또는 단편 조립에 의해 합성하고, 최종 펩타이드 생성물을 분리 및 정제하는 방법; 또는

[0045] (b) 펩타이드를 암호화하는 핵산 작제물을 숙주세포 내에서 발현시키고, 발현 생성물을 숙주 세포 배양물로부터 회수하는 방법; 또는

[0046] (c) 펩타이드를 암호화하는 핵산 작제물의 무세포 시험관 내 발현을 수행하고, 발현 생성물을 회수하는 방법; 또는

[0047] (a), (b) 및 (c)의 임의의 조합으로 펩타이드의 단편을 수득하고, 이어서 단편을 연결시켜 펩타이드를 수득하고, 당해 펩타이드를 회수하는 방법.

[0048] 보다 구체적인 예로, 유전자 조작을 통하여, 본 발명의 ICOS-L 변이체를 암호화하는 유전자를 제조하고 이를 숙주 세포에 형질전환시킨 후, 발현하여 본 발명의 ICOS-L 변이체를 생산할 수 있다.

[0049] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 ICOS-L 변이체 및 반감기-연장 모이어티를 포함하는 면역조절 단백질에 관한 것이다.

[0050] 일 구현예에서, ICOS-L 변이체는 반감기-연장 모이어티에 직접 또는 링커를 통해 간접적으로 연결될 수 있다.

[0051] 일 구현예에서, 반감기 연장 모이어티는 멀티머화 도메인, 알부민, 알부민-결합 폴리펩타이드, Pro/Ala/Ser (PAS), 인간 융모성 고나도트로핀의 베타 서브유닛의 C-말단 펩타이드(CTP), 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 아미노산의 구조화되지 않은 긴 친수성 서열(XTEN), 히드록시에틸 전분(HES), 알부민-결합 소분자, 또는 이의 조합을 포함할 수 있다.

[0052] 일 구현예에서, 멀티머화 도메인은 면역글로불린의 Fc 도메인, 류신 지퍼, 이소류신 지퍼 또는 아연 핑거일 수 있다.

[0053] 일 구현예에서, 본 발명의 면역조절 단백질은 상기 ICOS-L 변이체, 및 면역 글로불린의 Fc 도메인 또는 이의 변이체를 포함할 수 있다.

[0054] 일 구현예에서, 상기 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 IgG1의 Fc 도메인에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[0055] 일 구현예에서, 상기 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 IgG1의 Fc에 비해 감소된 효과기 기능(effector function)을 나타낼 수 있으며, 불활성 또는 무이펙터(effectorless) Fc일 수 있다.

[0056] 일 구현예에서, 효과기 기능은 항체 의존성 세포성 세포독성 (ADCC), 보체 의존성 세포독성, 프로그램된 세포사멸 또는 세포성 식세포작용일 수 있다.

[0057] 일 구현예에서, 상기 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 IgG1의 Fc 도메인에서 카밧 넘버링 시스템(Kabat numbering system)에 따라 넘버링된 234, 235 또는 329 위치의 아미노산이 야생형의 아미노산과 다른 서열로 치환될 수 있으며, L234A, L235A 및 P329G의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[0058] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 ICOS-L 변이체 또는 면역조절 단백질, 및 표적화 모이어티를 포함하는 컨쥬게이트에 관한 것이다.

[0059] 일 구현예에서, ICOS-L 변이체 또는 면역조절 단백질은 표적화 모이어티에 직접 또는 링커를 통해 간접적으로 링크될 수 있다.

[0060] 일 구현예에서, 표적화 모이어티는 면역 세포 표면의 분자에 특이적으로 결합할 수 있으며, 면역 세포는 항원 제시 세포 또는 림프구일 수 있다.

[0061] 일 구현예에서, 표적화 모이어티는 종양 표면의 분자에 결합하는 종양-국소화 모이어티일 수 있다.

[0062] 일 구현예에서, 표적화 모이어티는 분자 HER1/EGFR, HER2/ERBB2, CD20, CD25 (IL-2Rα 수용체), CD33, CD52, CD133, CD206, CEA, CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5, CEACAM6, 암 항원 125 (CA125), 알파-태아단백질 (AFP), 루이스 Y, 태그72, 카프린-1, 메소텔린, PDGF 수용체 (PDGFR; 예컨대 PDGF-R α), PD-1, PD-L1, CTLA-4, IL-2 수용체, 혈관내피 성장인자 (VEGF), CD30, EpCAM, EphA2, 글리피칸-3, gpA33, 뮤신, CAIX, PSMA, 폴레이트-결합 단백질, 강글리오사이드 (예컨대 GD2, GD3, GM1 및 GM2), VEGF 수용체(VEGFR),VEGFR2, VEGF-A, 인테그린 αVβ3, 인테그린 α5β1, ERBB3, MET, IGF1R, EPHA3, TRAILR1, TRAILR2, RANKL, FAP, 테나신, AFP, BCR 복합체, CD3, CD18, CD44, CTLA-4, gp72, HLA-DR 10 β, HLA-DR 항원, IgE, MUC-1, nuC242, PEM 항원, 메탈로프로테이나제, 에프린 수용체, 에프린 리간드, HGF 수용체, CXCR4, CXCR4, 봄베신 수용체, SK-1항원, Bcr-abl, RET, MET, TRKB, TIE2, ALK, ROS, EML4-ALK, ROS1, BRAFV600E, SRC, c-KIT, mTOR, TSC1, TSC2, BTK, KIT, BRCA, CDK 4/6, JAK1, JAK2, BRAF, FLT-3, MEK1, MEK2, SMO 또는 B7-H6(NCR3LG1)에 특이적이거나 또는 이들 성분에 결합할 수 있다.

[0063] 일 구현예에서, 표적화 모이어티는 단백질, 펩타이드, 핵산, 소분자 또는 나노입자일 수 있으며, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편인 것이 더욱 바람직하다.

[0064] 일 구현예에서, 상기 항체는 세툭시맙, 파니투무맙, 잘루투무맙, 니모투주맙, 트라스투주맙, 아도-트라스투주맙, 엠타신, 토시투모맙(Bexxar®), 리툭시맙(리툭산, 맙테라), 이브리투모맙 티욱세탄(제발린), 다클리주맙(제나팍스), 겜투주맙(마일로타르그), 알렘투주맙, CEA-스캔 Fab 단편, OC125 모노클로날 항체, ab75705, B72.3, 베바시주맙(Avastin®), 아파티닙, 악시티닙, 보수티닙, 카보자티닙, 세리티닙, 크리조티닙, 다브라페닙, 다사티닙, 디누툭시맙, 엘로티닙, 에베롤리무스, 이브루티닙, 이마티닙, 라파티닙, 렌바티닙, 닐로티닙, 올라파립, 올라라투맙, 팔보시클립, 파조파닙, 페르투주맙, 라무시루맙, 레고라페닙, 룩소리티닙, 소라페닙, 수니티닙, 템시롤리무스, 트라메티닙, 반데타닙, 베무라페닙, 비스모데깁, 바실릭시맙, 이필리무맙, 니보루맙, 펨브롤리주맙, MPDL3280A, 피딜리주맙(CT-011), AMP-224, MSB001078C, 또는 MEDI4736, BMS-935559, LY3300054, 아테졸리주맙, 아벨루맙 또는 두르발루맙, 또는 항체의 변이체일 수 있으며, 아테졸리주맙 또는 이의 변이체일 수 있다.

[0065] 일 구현예에서, 면역학적 활성을 가진 단편은 Fab, Fd, Fab', dAb, F(ab'), $F(ab')_2$, scFv(single chain fragment variable), Fv, 단일쇄 항체, Fv 이량체, 상보성 결정 영역 단편, 인간화 항체, 키메라 항체 및 디아바디(diabody)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0066] 일 구현예에서, 본 발명의 ICOS-L 변이체는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 중쇄 또는 경쇄의 C-말단 또는 N-말단에 직접 또는 링커를 통해 간접적으로 링크된다.

[0067] 일 구현예에서, 본 발명의 컨쥬게이트는 융합 단백질일 수 있다.

[0068] 일 구현예에서, 본 발명의 컨쥬게이트는 탐지 또는 정제를 위한 표지를 추가로 포함할 수 있다.

[0069] 일 구현예에서, 본 발명의 컨쥬게이트는 컨쥬게이트의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편이 암 세포 표면 분자 (예컨대, PD-L1)에 특이적으로 결합하며, 컨쥬게이트의 ICOS-L 변이체가 종양 미세환경에 존재하는 T 세포의 ICOS과 결합함으로써 T 세포를 활성화시켜 면역세포에 의한 암세포 사멸을 통한 항암 활성을 가지며, 암세포 특이적으로 결합하기 때문에 암의 진단에도 사용되는 테라노스틱 제제로서 사용될 수 있다. 또한, CAR(chimeric antigen receptor)-T 세포를 제작하여 항암제로 이용될 수 있으며, 항암제와 함께 동시에, 별도로 또는 순차적으로 투여되는 항암보조제로서도 사용될 수 있다.

[0070] 상기 항체는 전체(whole) 항체 형태일 뿐 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 전체 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄(light chain) 및 2개의 전체 길이의 중쇄(heavy chain)를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합(disulfide bond)으로 연결되어 있다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, 항체 단편의 예는 (i) 경쇄의 가변영역(VL) 및 중쇄의 가변영역(VH)과 경쇄의 불변영역(CL) 및 중쇄의 첫번째 불변 영역(CH1)으로 이루어진 Fab 단편; (ii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iii) 단일 항체의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (iv) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편(Ward ES et al., Nature 341:544-546 (1989)]; (v) 분리된 CDR 영역; (vi) 2개의 연결된 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')2 단편; (vii) VH 도메인 및 VL 도메인이 항원 결합 부위를 형성하도록 결합시키는 펩타이드 링커에 의해 결합된 단일쇄 Fv 분자(scFv); (viii) 이특이적인 단일쇄 Fv 이량체(PCT/US92/09965) 및 (ix) 유전자 융합에 의해 제작된 다가 또는 다특이적인 단편인 디아바디(diabody) WO94/13804) 등을 포함한다.

[0071] 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 동물 유래 항체, 키메릭 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 및 이들의 면역학적 활성을 가진 단편으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 상기 항체는 재조합적 또는 합성적으로 생산된 것일 수 있다.

[0072] 원하는 항원을 피면역 동물에게 면역시켜 생산하는 동물 유래 항체는 일반적으로 치료 목적으로 인간에 투여시 면역거부반응이 일어날 수 있으며, 이러한 면역거부반응을 억제하고자 키메릭 항체(chimeric antibody)가 개발되었다. 키메릭 항체는 유전공학적 방법을 이용하여 항-아이소타입(anti-isotype) 반응의 원인이 되는 동물 유래 항체의 불변 영역을 인간 항체의 불변 영역으로 치환한 것이다. 키메릭 항체는 동물 유래 항체에 비하여 항-아이소타입 반응에 있어서 상당 부분 개선되었으나, 여전히 동물 유래 아미노산들이 가변 영역에 존재하고 있어 잠재적인 항-이디오타입(anti-idiotypic) 반응에 대한 부작용을 내포하고 있다. 이러한 부작용을 개선하고자 개발된 것이 인간화 항체(humanized antibody)이다. 이는 키메릭 항체의 가변 영역 중 항원의 결합에 중요한 역할을 하는 CDR(complementaritiy determining regions) 부위를 인간 항체 골격(framework)에 이식하여 제작된다.

[0073] 인간화 항체를 제작하기 위한 CDR 이식(grafting) 기술에 있어서 가장 중요한 것은 동물 유래 항체의 CDR 부위를 가장 잘 받아들일 수 있는 최적화된 인간 항체를 선정하는 것이며, 이를 위하여 항체 데이터베이스의 활용, 결정구조(crystal structure)의 분석, 분자모델링 기술 등이 활용된다. 그러나, 최적화된 인간 항체 골격에 동물 유래 항체의 CDR 부위를 이식할지라도 동물 유래 항체의 골격에 위치하면서 항원 결합에 영향을 미치는 아미노산이 존재하는 경우가 있기 때문에, 항원 결합력이 보존되지 못하는 경우가 상당수 존재하므로, 항원 결합력을 복원하기 위한 추가적인 항체 공학 기술의 적용은 필수적이라고 할 수 있다.

[0074] 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 생체에서 분리된 (생체에 존재하지 않는) 것 또는 비자연적으로 생산(non-naturally occurring)된 것일 수 있으며, 예컨대, 합성적 또는 재조합적으로 생산된 것일 수 있다.

[0075] 본 발명에서 "항체"라 함은, 면역계 내에서 항원의 자극에 의하여 만들어지는 물질을 의미하는 것으로서, 그 종류는 특별히 제한되지 않으며, 자연적 또는 비자연적(예컨대, 합성적 또는 재조합적)으로 얻어질 수 있다. 항체는 생체 외뿐 아니라 생체 내에서도 매우 안정하고 반감기가 길기 때문에 대량 발현 및 생산에 유리하다. 또한, 항체는 본질적으로 다이머(dimer) 구조를 가지므로 접착능(avidity)이 매우 높다. 완전한 항체는 2개의 전장(full length) 경쇄 및 2개의 전장 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합으로 연결되어 있다. 항체의 불변 영역은 중쇄 불변 영역과 경쇄 불변 영역으로 나뉘어지며, 중쇄 불변 영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ε) 타입을 가지고, 서브클래스로 감마1(γ1), 감마2(γ2), 감마3(γ3), 감마4(γ4), 알파1(α1) 및 알파2(α2)를 가진다. 경쇄의 불변 영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.

[0076] 본 발명에서 용어, "중쇄(heavy chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위해 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 V_H 및 3개의 불변 영역 도메인 C_{H1} , C_{H2} 및 C_{H3} 과 힌지(hinge)를 포함

하는 전장 중쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다. 또한, 용어 "경쇄(light chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 V_L 및 불변 영역 도메인 C_L을 포함하는 전장 경쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다.

[0077] 본 발명에서 용어, "가변 영역(variable region) 또는 가변 부위 (variable domain)"는 항원과 특이적으로 결합하는 기능을 수행하면서 서열상의 많은 변이를 보이는 항체 분자의 부분을 의미하고, 가변 영역에는 상보성 결정 영역인 CDR1, CDR2 및 CDR3가 존재한다. 상기 CDR 사이에는 프레임 워크 영역(framework region, FR) 부분이 존재하여 CDR 고리를 지지해주는 역할을 한다. 상기 "상보성 결정 영역"은 항원의 인식에 관여하는 고리모양의 부위로서 이 부위의 서열이 변함에 따라 항체의 항원에 대한 특이성이 결정된다.

[0078] 본 발명에서 용어, "scFv(single chain fragment variable)"는 유전자 재조합을 통해 항체의 가변영역만을 발현시켜 만든 단쇄항체를 말하며, 항체의 VH 영역과 VL 영역을 짧은 펩티드 사슬로 연결한 단일쇄 형태의 항체를 말한다. 상기 용어 "scFv"는 달리 명시되지 않거나, 문맥상 달리 이해되는 것이 아니라면, 항원 결합 단편을 비롯한 scFv 단편을 포함하고자 한다. 이는 통상의 기술자에게 자명한 것이다.

[0079] 본 발명에서 용어, "상보성결정영역(complementarity determining region, CDR)"은 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 고가변 영역 (hypervariable region)의 아미노산 서열을 의미한다. 중쇄 및 경쇄는 각각 3개의 CDR을 포함할 수 있다 (CDRH1, CDRH2,CDRH3 및 CDRL1, CDRL2, CDRL3). 상기 CDR은 항체가 항원 또는 항원결정부위에 결합하는 데 있어서 주요한 접촉 잔기를 제공할 수 있다.

[0080] 본 발명에서, 용어, "특이적으로 결합" 또는 "특이적으로 인식"은 당업자에게 통상적으로 공지되어 있는 의미와 동일한 것으로서, 항원 및 항체가 특이적으로 상호작용하여 면역학적 반응을 하는 것을 의미한다.

[0081] 본 발명에서 용어, "항원결합단편"은 면역글로불린 전체 구조에 대한 그의 단편으로, 항원이 결합할 수 있는 부분을 포함하는 폴리펩타이드의 일부를 의미한다. 예를 들어, scFv, (scFv) 2 , scFv-Fc, Fab, Fab' 또는 F(ab') 2 일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 항원결합단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(C_{H1})을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 C_{H1} 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab') 2 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 당업계에 널리 공지되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변 부위와 경쇄 가변 부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 단쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 상기 링커는 1 내지 100개 또는 2 내지 50개의 임의의 아미노산으로 이루어진 펩타이드 링커일 수 있으며, 당업계에 적절한 서열이 알려져 있다. 상기 항원결합단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab') 2 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.

[0082] 본 발명에서 용어 "힌지 영역(hunge region)"은 항체의 중쇄에 포함되어 있는 영역으로서, C_{H1} 및 C_{H2} 영역 사이에 존재하며, 항체 내 항원 결합 부위의 유연성(flexibility)를 제공하는 기능을 하는 영역을 의미한다. 예컨대, 상기 힌지는 인간 항체로부터 유래한 것일 수 있으며, 구체적으로, IgA, IgE, 또는 IgG, 예컨대, IgG1, IgG2, IgG 3, 또는 IgG4로부터 유래한 것일 수 있다.

[0083] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 ICOS-L 변이체, 면역조절 단백질, 또는 컨쥬게이트를 암호화하는 핵산분자, 이를 포함하는 벡터 및 상기 벡터를 포함하는 숙주세포에 관한 것이다.

[0084] 본 발명에서 사용되는 용어 "핵산분자"는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이며, 다르게 특별하게 언급되어 있지 않은 한 자연의 핵산 유사체를 포함한다(Scheit, Nucleotide Analogs , John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews , 90:543-584(1990)).

[0085] 본 발명에서 사용되는 용어 "벡터"는 숙주 세포에 삽입되어 숙주 세포 게놈과 재조합되고 이에 삽입되거나, 또는 에피좀으로서 자발적으로 복제하는 컴피턴트 뉴클레오티드 서열을 포함하는 임의의 핵산을 의미한다. 이러한 벡터로는 선형 핵산, 플라스미드, 파지미드, 코스미드, RNA 벡터, 바이러스 벡터 등이 있다.

[0086] 본 발명에서 사용되는 용어 "숙주 세포"는 하나 이상의 DNA 또는 벡터가 도입되는 진핵 또는 원핵 세포를 가리키며, 특정 대상 세포만이 아니라 그 자손 혹은 잠재적 자손까지도 가리키는 것으로 이해되어야 한다. 어떤 변형이 돌연변이 혹은 환경적 영향 때문에 후속 세대에 일어날 수 있기 때문에 사실 상기 자손은 부모 세포와 동일하지는 않지만, 본 발명에서 사용된 바와 같이 상기 용어의 범주 내에서 여전히 포함된다.

[0087] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 ICOS-L 변이체, 면역조절 단백질 또는 컨쥬게이트를 포함하는 T-세포 활성화제에 관한 것이다.

[0088] 일 구현예에서, T-세포는 세포독성 T 세포 또는 CAR(chimeric antigen receptor)-T 세포일 수 있다.

[0089] ICOS는 외부 항원에 대한 T 세포 반응을 활성화시키는 T 세포 특이적 공동자극 분자로, 다양한 암종들의 치료 예후와 관련이 있다는 사실들이 보고되었으므로, 본 발명의 T-세포 활성화제는 면역자극을 증진시키는 치료제뿐만 아니라 면역 관문 억제제 치료 반응 예측을 위한 바이오마커로서도 활용될 수 있다.

[0090] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 ICOS-L 변이체, 면역조절 단백질 또는 컨쥬게이트를 포함하는, ICOS 검출용 조성물에 관한 것이다.

[0091] 일 구현예에서, 상기 ICOS 검출용 조성물은 종양 미세환경에 존재하는 T 세포들을 관측하기 위한 용도로 사용될 수 있다.

[0092] 일 구현예에서, 암 조직에서 ICOS 발현 유무 검증을 통해 종양 미세환경에 존재하는 T 세포들을 관측할 수 있다.

[0093] 일 구현예에서, 상기 조성물은 ICOS의 단백질 발현량을 검출 및 정량할 수 있다.

[0094] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 ICOS-L 변이체, 면역조절 단백질 또는 컨쥬게이트를 포함하는, 생체 이미징용 조성물에 관한 것이다.

[0095] 일 측면에서, 본 발명은 막관통 도메인을 포함하는 ICOS-L 변이체, 또는 상기 막관통 도메인에 연결된 세포질 시그널링 도메인을 추가로 포함하는 ICOS-L 변이체를 암호화하는 핵산 및 재조합 항원 수용체의 하나 이상의 사슬을 암호화하는 하나 이상의 핵산을 포함하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다.

[0096] 일 구현예에서, 상기 재조합 항원 수용체는 키메라 항원 수용체 (Chimeric antigen receptor, CAR) 또는 조작된 T 세포 수용체 (T cell receptor, TCR)일 수 있다.

[0097] 일 구현예에서, 상기 ICOS-L 변이체를 암호화하는 핵산 및 재조합 수용체의 하나 이상의 사슬을 암호화하는 하나 이상 핵산은 각각 리보좀 스키핑(ribosome skipping)을 일으키는 펩타이드 또는 자가-절단 펩타이드를 암호화하는 핵산에 의해 분리될 수 있다.

[0098] 일 구현예에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 ICOS-L 변이체를 암호화하는 핵산, 자가-절단 펩타이드 또는 리보좀 스키핑을 일으키는 펩타이드를 암호화하는 핵산 및 CAR을 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다.

[0099] 일 구현예에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 ICOS-L 변이체를 암호화하는 핵산, 제1 자가-절단 펩타이드 또는 리보좀 스키핑을 일으키는 펩타이드를 암호화하는 핵산, 조작된 TCR 알파 사슬 또는 조작된 TCR 베타 사슬 중 하나를 암호화하는 핵산, 제2 자가-절단 펩타이드 또는 리보좀 스키핑을 일으키는 펩타이드를 암호화하는 핵산, 및 조작된 TCR 알파 사슬 또는 조작된 TCR 베타 사슬 중 다른 하나를 암호화하는 핵산을 포함할 수 있으며, 자가-절단 펩타이드 또는 리보좀 스키핑을 일으키는 펩타이드는 T2A, P2A, E2A 또는 F2A일 수 있다.

[0100] 본 발명에서 용어, "CAR(chimeric antigen receptor)"는, 면역 효과기 세포에 특정 항원에 대한 특이성을 부여할 수 있는, 자연적으로 존재하지 않는 수용체를 의미한다. 보통, 상기 CAR은 T 세포에 단일클론항체의 특이성을 이식하기 위하여 사용되는 수용체를 말한다. CAR은 대개 세포 외 도메인(Ectodomain), 막관통 도메인(transmembrane domain) 및 세포 내 도메인(Ectodomain)으로 구성된다.

[0101] 상기 세포 외 도메인은 항원 결합 부위(antigen recognition region)를 포함하며, CAR의 막관통 도메인은 세포 외 도메인과 연결된 형태로, 자연적 또는 합성된 것에서 유래한 것일 수 있다. 자연적으로 존재하는 것에 유래한 경우, 막 결합 또는 막투과성 단백질에서 유래한 것일 수 있으며, T 세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 체인, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CDS, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD 154 또는 CD8 등 다양한 단백질의 막 투과성 영역에서 유래한 부분일 수 있다. 이러한 막관통 도메인의 서열은 막투과성 단백질의 막투과성 영역 부분을 공지하고 있는 통상의 기술분야에 공지된 문헌 등으로부터

얻을 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0102] 또한, 상기 막관통 도메인이 합성된 것일 경우, 이는 류신 및 발린과 같은 소수성 아미노산 잔기를 주로 포함할 수 있으며, 그 예로 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 트리플렛(triplet)이 합성된 막관통 도메인에 존재할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 막관통 도메인에 대한 서열정보는 합성된 막관통 도메인에 대한 통상의 기술분야에 공지된 문헌으로부터 얻을 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0103] 본 발명의 CAR에서 상기 세포 내 도메인은 세포 내에 존재하는 CAR의 도메인 일부로서, 막관통 도메인과 연결된 형태이다. 본 발명의 상기 세포 내 도메인은 CAR의 항원 결합 부위에 항원이 결합하면 T 세포 활성화, 바람직하게는 T 세포 증식을 가져오는 것이 특징인, 세포 내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 상기 세포 내 신호전달 도메인은 세포 외에 존재하는 항원 결합 부위에 항체가 결합하면, T 세포 활성화를 가져올 수 있는 신호를 전달하는 부분이라면 특별히 그 종류에 제한되지 않으며, 다양한 종류의 세포 내 신호전달 도메인이 사용될 수 있으며, 그 예로 면역수용체 티로신-기초한 활성화 모티프(tyrosine-based activation motif) 또는 ITAM일 수 있으며, 상기 ITAM은 CD3 제타(ζ, zeta), FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CDS, CD22, CD79a, CD79b, CD66d 또는 FcεRIγ에서 유래한 것을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0104] CAR는 T-세포 신호화 분자의 세포질 도메인에 경첩 및 막관통 영역을 통해 커플링되는 종양 연계 항원 (TAA)에 특이적인 항체의 단쇄 단편 가변부 (scFv)를 포함한다. 대부분의 통상적인 림프구 활성화 모이어티는 T-세포 촉발 (예를 들어 CD3ζ) 모이어티를 갖는 탠덤(tandem)에서 T-세포 공자극 (예를 들어 CD28, CD137, OX40, ICOS, 및 CD27) 도메인을 포함한다. CAR-매개 입양 면역요법은 CAR-이식된 세포가 비-HLA-제한 방식으로 표적 종양 세포 상의 TAA를 직접 인식하게 한다.

[0105] 일 측면에서, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[0106] 일 구현예에서, 상기 벡터는 바이러스 벡터일 수 있으며, 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터일 수 있다.

[0107] 일 측면에서, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 포함하는 조작된 세포에 관한 것이다.

[0108] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 ICOS-L 변이체, 면역조절 단백질, 또는 컨쥬게이트를 포함하는 조작된 세포에 관한 것이다.

[0109] 일 구현예에서, 상기 조작된 세포는 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 조작된 T-세포 수용체를 추가로 포함할 수 있다.

[0110] 일 구현예에서, 본 발명의 ICOS-L 변이체, 면역조절 단백질, 또는 컨쥬게이트가 조작된 세포로부터 분비될 수 있으며, 조작된 세포는 막관통 도메인을 포함하는 ICOS-L 변이체를 포함할 수 있다.

[0111] 일 구현예에서, 본 발명의 ICOS-L 변이체는 세포 표면에서 발현될 수 있다.

[0112] 일 구현예에서, 상기 세포는 면역 세포일 수 있으며, 면역 세포는 항원 제시 세포(APC) 또는 림프구일 수 있고, 림프구는 T 세포일 수 있다. 상기 T 세포는 $CD4^+$ T세포 (도움 T 세포, TH 세포), $CD8^+$ T세포 (세포독성 T 세포, CTL), 기억 T 세포, 조절 T 세포 (Treg 세포) 자연살해 T 세포 등 있으며, 본 발명에서 CAR이 도입되는 T 세포는 바람직하게는 $CD8^+$ T세포이나, 이에 제한되지 않는다.

[0113] 일 구현예에서, 상기 조작된 세포는 일차 세포일 수 있으며, 경우에 따라, 세포는 포유동물 세포일 수 있고, 인간 세포일 수 있다.

[0114] 일 구현예에서, 상기 조작된 세포는 키메라 항원 수용체 발현 세포는 키메라 항원 수용체 발현 대식세포(CAR-macrophage), 키메라 항원 수용체 발현 T(CAR-T) 세포, 키메라 항원 수용체 발현-감마-델타 T(CAR-Gamma-delta T) 세포 또는 자연살해(CAR-NK) 세포일 수 있다.

[0115] 본 발명에서 용어, "키메라 항원 수용체 발현 T(CAR-T) 세포"는 CAR을 발현하는 T 세포를 의미한다. 상기 키메라 항원 수용체 발현 T(CAR-T) 세포는 i) HLA(human leukocyte antigen)에 비의존적인 방식으로 암 항원을 인지하므로, 세포 표면에 HLA 발현을 감소시켜 항암제의 작용을 회피하는 암들을 치료할 수 있는 이점을 지니며, ii) HLA 타입과 무관하므로, 환자의 HLA 타입과 관계없이 치료에 이용할 수 있으며, iii) 짧은 시간 내에 많은 양의 암 특이적 T 세포를 만들어 낼 수 있으므로, 우수한 항암 효과를 나타낼 수 있는 이점을 지닌다.

[0116] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 ICOS-L 변이체, 면역조절 단백질, 또는 컨쥬게이트를 암호화하는 핵산 분자

를 포함하는 감염 물질(infectious agent)에 관한 것이다.

[0117] 일 구현예에서, ICOS-L 변이체, 면역조절 단백질, 또는 컨쥬게이트는 발현될 때 감염 물질로부터 분비되며, 일부 경우에 암호화된 ICOS-L 변이체는 막관통 도메인을 포함할 수 있다.

[0118] 일 구현예에서, 암호화된 ICOS-L 변이체는 그것이 발현되는 세포의 표면에서 발현될 수 있다.

[0119] 일 구현예에서, 감염 물질은 세균 또는 바이러스일 수 있으며, 바이러스는 항암 바이러스(oncolytic virus)일 수 있다. 항암 바이러스는 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 헤르페스 바이러스, 대상포진 바이러스, 수포성 구내염 바이러스, 레오바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 파보바이러스, 홍역 바이러스, 수포성 구내염 바이러스 (VSV), 콕사키 바이러스 또는 백시니아 바이러스일 수 있다.

[0120] 일 구현예에서, 바이러스는 특이적으로 수지상 세포(DC)를 표적으로 삼거나 및/또는 수지상 세포-지향성(dendritic cell-tropic)일 수 있으며, 상기 바이러스는 변형된 신드비스 바이러스 엔벨로프 산물로 슈도타이프된 렌티바이러스 벡터일 수 있다.

[0121] 일 구현예에서, 감염 물질은 표적 세포의 사멸을 야기하거나 또는 면역 반응을 개시 또는 부스트할 수 있는 또 다른 유전자 산물을 암호화하는 핵산 분자를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 추가의 유전자 산물은 항암제, 항대사제, 항혈관형성제, 면역조절 분자, 면역 체크포인트 억제제, 항체, 사이토카인, 성장 인자, 항원, 세포독성 유전자 산물, 프로-아폽토시스 유전자 산물, 항-아폽토시스 유전자 산물, 세포 매트릭스 분해 유전자, 조직 재생을 위한 유전자 또는 인간의 체세포를 다분화능으로 재프로그램하는 유전자로부터 선택될 수 있다.

[0122] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 ICOS-L 변이체 또는 면역조절 단백질을 유효성분으로 포함하는 염증성 또는 자가면역 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

[0123] 일 구현예에서, 상기 염증성 질환은 항호중구 세포질 항체 (ANCA)-관련 혈관염, 혈관염, 자가면역 피부 질환, 이식, 류마티스성 질환, 염증성 위장관 질환, 염증성 안질환, 염증성 신경 질환, 염증성 폐질환, 염증성 내분비 질환, 또는 자가면역 혈액학적 질환일 수 있으며,

[0124] 일 구현예에서, 상기 자가면역 질환은 염증성 장질환, 크론씨병, 궤양성 대장염, 다발성 경화증, 천식, 류마티스성 관절염 또는 건선일 수 있다.

[0125] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 ICOS-L 변이체, 면역조절 단백질, 컨쥬게이트 또는 조작된 세포를 포함하는 항암 보조제에 관한 것이다.

[0126] 일 구현예에서, 상기 보조제는 면역 관문 억제제(Immune checkpoint inhibitors)의 항암 효과를 증진시킬 수 있으며, 면역 관문 억제제와 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 병용 투여될 수 있다.

[0127] 일 구현예에서, 면역 관문 억제제는 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CTLA-4 항체, 또는 이의 변이체일 수 있다.

[0128] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 ICOS-L 변이체, 면역조절 단백질, 컨쥬게이트 또는 조작된 세포를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

[0129] 일 구현예에서, 암은 뇌종양, 흑색종, 골수종, 비소세포성폐암, 구강암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0130] 본 발명의 약학적 조성물은 단독의 요법으로 이용될 수 있으나, 다른 통상적인 생물학적 요법, 화학 요법 또는 방사 요법과 함께 이용될 수도 있으며, 이러한 병행 요법을 실시하는 경우에는 보다 효과적으로 암을 치료할 수 있다. 본 발명을 암의 예방 및 치료에 이용하는 경우 상기 조성물과 함께 이용될 수 있는 화학 요법제는 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 프로카르바진(procarbazine), 메클로레타민(mechlorethamine), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 멜팔란(melphalan), 클로라부실(chlorambucil), 비술판(bisulfan), 니트로소우레아(nitrosourea), 디악티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 블레오마이신(bleomycin), 플리코마이신(plicomycin), 미토마이신(mitomycin), 에토포시드(etoposide), 탁목시펜(tamoxifen), 택솔(taxol), 트랜스플라티눔(transplatinum),

5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 빈크리스틴(vincristin), 빈블라스틴(vinblastin) 및 메토트렉세이트(methotrexate) 등을 포함한다. 본 발명의 조성물과 함께 이용될 수 있는 방사 요법은 X-선 조사 및 γ-선 조사 등이다.

[0131] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 ICOS-L 변이체 또는 이를 포함하는 조성물의 투여에 의해 암의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0132] 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack Publishing Co.에 기술되어있다.

[0133] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0134] 본 발명의 약학적 조성물은 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 정상 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로스 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0135] 일 구현예에서, 상기 약학 조성물은 경구형 제형, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 및 분무제를 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있다.

[0136] 본 발명의 조성물은 또한 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로스 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0137] 본 발명의 조성물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 단백질을 0.0001 내지 10 중량 %로, 바람직하게는 0.001 내지 1 중량 %를 포함한다.

[0138] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스

테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0139] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용) 하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명에 따른 조성물의 일일 투여량은 0.0001 ~ 10 ㎎/㎖이며, 바람직하게는 0.0001 ~ 5 ㎎/㎖이며, 하루 일 회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.

[0140] 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다.

[0141] 일 구현예에서, 상기 본 발명의 조성물은 면역 관문 억제제와의 병용 치료제로서 사용될 수 있다.

[0142] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 ICOS-L 변이체, 면역조절 단백질, 컨쥬게이트 또는 조작된 세포를 포함하는 암 진단용 조성물에 관한 것이다.

[0143] 일 구현예에서, 상기 조성물은 발색효소, 방사성 동위원소, 크로모포어(chromopore), 발광물질 및 형광물질로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나를 추가로 포함할 수 있다.

[0144] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 암 진단용 조성물을 포함하는, 암 진단 키트에 관한 것이다.

[0145] 일 구현예에서, 상기 키트는 대상체 또는 환자로부터 생체 시료를 수집하기 위한 도구 및/또는 시약 뿐 아니라 그 시료로부터 게놈 DNA, cDNA, RNA 또는 단백질을 준비하기 위한 도구 및/또는 시약을 더 포함할 수 있다.

[0146] 본 발명에서 용어 “암 진단 키트”는 본 발명의 암 진단용 조성물이 포함된 키트를 의미한다. 따라서, 상기 표현 “암 진단 키트”는 “암 진단용 조성물”과 서로 교차 또는 혼용하여 사용이 가능하다. 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)(예컨대, 전-전이성 또는 전이성 암 상태의 동정, 암의 단계 결정 또는 치료에 대한 암의 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.

[0147] 본 발명의 ICOS-L 변이체는 ICOS와 현저히 증대된 결합력으로 특이적으로 결합함으로써, T-세포의 활성화를 촉진하는 면역자극 약물로서 작용하여 암세포를 사멸하는 항암 활성, 또는 ICOS를 발현하는 조절 T 세포를 사멸시킴으로써 항암 효능을 유도하는 항암 활성을 가지며, 종양 미세환경에 존재하는 T 세포들에 특이적으로 결합하기 때문에 암의 진단에도 사용되는 테라노스틱 제제로서 사용될 수 있다.

[0148] 일 측면에서, 본 발명은 대상으로부터 분리된 생물학적 시료와 본 발명의 암 진단용 조성물을 접촉시키는 단계; ICOS-L 변이체와 ICOS의 결합 수준을 확인하는 단계; 및 정상 대조군 시료에서의 상기 ICOS-L 변이체와 ICOS의 결합 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 암 진단을 위한 정보제공 방법에 관한 것이다.

[0149] 일 구현예에서, 대상으로부터 분리된 생물학적 시료에서의 ICOS-L 변이체와 ICOS의 결합 수준이 정상 대조군 시료에서의 ICOS-L 변이체와 ICOS의 결합 수준이 에 비해 높은 경우, 상기 검사 대상이 암일 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0150] 본 발명에서 사용된 용어, "시료(샘플)"는 대상 또는 환자로부터 얻은 생물학적 시료를 의미한다. 생물학적 시료의 공급원은 신선한, 동결된 및/또는 보존된 장기 또는 조직 샘플 또는 생검 또는 흡인물로부터의 고형 조직; 혈액 또는 임의의 혈액 구성분; 대상의 임신 또는 발생의 임의의 시점의 세포일 수 있다.

[0151] 일 측면에서, 본 발명은 면역 관문 억제제를 처리한 대상으로부터 분리된 생물학적 시료에서 본 발명의 ICOS-L 변이체, 면역조절 단백질, 컨쥬게이트 또는 조작된 세포을 이용하여 ICOS의 발현양을 확인하는 단계를 포함하는, 면역 관문 억제제에 대한 치료 반응성 예측 또는 예후 진단 방법에 관한 것이다.

[0153] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하

기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0155] **실시예 1. ICOS-L 변이체 탐색을 위한 이합체(dimer) 인간 ICOS (ICOS-Fc) 제작**

[0156] 1-1. 이합체 인간 ICOS 클로닝

[0157] 결합 활성(Avidity)을 높여 더 효율적으로 ICOS와 결합력이 강한 ICOS-L 변이체를 스크리닝하기 위해, ICOS의 C-말단 부분에 인간 IgG 항체의 Fc 영역(도메인)을 발현시켜 이합체화 반응(dimerization)을 유도하고, Fc와 ICOS 사이에는 글라이신(glycine) 및 세린(serine)으로 구성된 GS 링커를 넣어 각각의 단백질의 유동성을 확보하였다. 구체적으로, Twist Bioscience 사 (미국)에서 ICOS 세포외 영역 부분인 아미노산 서열 E21-K140의 DNA를 합성하여 디자인한 프라이머와 Vent Polymerase (New England Biolab)를 사용해 유전자를 증폭하였다. Fc 또한 디자인된 프라이머와 Vent Polymerase를 사용하여 유전자를 증폭하였으며, 증폭된 ICOS와 Fc 유전자는 assembly PCR을 진행한 후, *Bss*HII 및 *Xba*I (New England Biolab)을 사용해 제한효소 처리하였다. 제한효소 처리된 ICOS-Fc 유전자는 동일한 제한효소 처리된 동물세포용 벡터인 pMAZ 벡터에 라이게이션하였다. 라이게이션된 플라스미드는 Jude1 대장균에 트랜스포메이션한 후, 단일 클론을 확보하고 염기서열 분석하여 ICOS-Fc가 pMAZ 벡터에 성공적으로 삽입된 것을 확인하였다.

[0159] 1-2. 이합체 인간 ICOS (ICOS-Fc)의 발현 및 정제

[0160] Expi293F 세포를 $2x10^6$ cells/ml의 밀도로 300 ml 계대배양하고 하루 뒤, Freestyle 293 expression 배양액 (Gibco. 12338-018) 30 ml에 상기 실시예 1에서 제작한 ICOS-Fc 발현벡터를 PEI(Polyehylenimine, Polyscience, 23966)와 1:4의 비율로 섞어 상온에서 20분간 두었다가 상기 Expi293F 동물세포에 트랜스펙션하였다. 세포를 CO_2 진탕배양기에서 37 ℃, 125 rpm, 8% CO_2의 조건으로 7일간 배양한 후 원심 분리하여 상등액만 취하였다. 그 후 25x PBS를 이용해 평형을 맞추고 바틀 탑 필터를 이용해 0.2 μm 필터 (Merck Millipore)로 여과하였다. 여과된 배양액을 Protein A resin 1 ml을 넣어 주고 4 ℃에서 16 시간 교반 한 후 컬럼에 통과시켜 레진을 회수한 후 10 ml PBS로 세척하였다. 세척한 레진을 100 mM glycine pH 2.7 버퍼로 용출한 후 1M Tris-HCl pH 8.0을 이용하여 중화시켜 정제된 ICOS-Fc 이합체 단백질을 수득하고 Centrifugal filter units 3K (Merck Millipore)을 사용하여 buffer를 1x PBS로 바꿔주었다. 발현 및 정제한 ICOS-Fc 이합체 단백질을 SDS-PAGE 젤로 확인하였다 (도 1).

[0162] 1-3. 정제된 ICOS-Fc의 ICOS-L과의 결합력 검증 및 형광 물질 표지화

[0163] 상기 실시예 1-2에서 정제한 ICOS-Fc의 ICOS-L과의 결합력을 분석하기 위해 ELISA 분석을 수행하였다. 구체적으로, 0.05 M Na_2CO_3 (pH 9.6)에 4 μg/ml로 희석한 ICOS-Fc를 Flat Bottom Polystyrene High Bind 96웰 마이크로플레이트 (Costar)에 50 μl씩 분주하여 4 ℃에서 16 시간 동안 고정화한 후 100 μl의 0.5% BSA(Bovine serum albumin) (Gibco) (in PBS, pH 7.4)으로 상온에서 2 시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST (pH 7.4) 180 μl로 4 회씩 세척한 뒤 0.5% BSA (in PBS pH 7.4)으로 연속 희석된 야생형 ICOS-L를 각 웰에 50 μl씩 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 4 회의 세척 후 항-His-HRP 컨쥬게이트 50 μl을 넣어 상온에서 1 시간 동안 반응시킨 후 4 회 세척하였다. 그 후, 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific)을 50 μl씩 첨가해 발색한 뒤 2 M H_2SO_4을 50 μl씩 넣어주어 반응을 종료시키고 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek)을 이용해 분석하였다.

[0164] 그 결과, ICOS-Fc이 야생형 ICOS-L과 결합하는 것을 확인하였으며 (도 2), 프로브로 사용하기 위해 ICOS 이합체 (dimer) 단백질을 Alexa488 labeling kit를 사용해 형광 표지화하였다.

[0166] **실시예 2. 스크리닝 방법 선택**

[0167] 2-1. Yeast surface display 방법 선택을 위한 ICOS-L 클로닝

[0168] 효율적인 변이체 스크리닝을 위해 yeast surface anchoring motif를 결정하기로 하였고, ICOS-L의 N-말단을

Aga2에 anchoring 시키는 시스템 (pCTCON-Aga2-ICOS-L-FLAG) 및 C-말단을 Aga2에 anchoring 시키는 시스템 (pCTCON-ICOS-L-Aga2-FLAG)을 비교하기 위해 ICOS-L을 클로닝하였다. 구체적으로, Twist Bioscience (미국) 사에서 야생형 ICOS-L 유전자와 종래의 변이체 A184 (N52H, N57Y 및 Q100P)를 합성하여 디자인한 프라이머와 Vent Polymerase (New England Biolab)를 사용해 유전자를 증폭하였다. 증폭된 야생형 ICOS-L와 A184 유전자는 *Sfi*I (New England Biolab)을 사용해 제한효소 처리하였으며, 제한효소 처리된 유전자는 동일한 제한효소 처리된 pCTCON 벡터에 라이게이션하였다. 라이게이션 된 플라스미드는 Jude1 대장균에 트랜스포메이션한 후, 단일 클론을 확보하고 염기서열 분석하여 pCTCON-Aga2-ICOS-L_WT-FLAG, pCTCON-Aga2-ICOS-L_A184-FLAG, pCTCON-ICOS-L_WT-Aga2-FLAG 및 pCTCON-ICOS-L_ A184-Aga2-FLAG의 4종의 플라스미드가 성공적으로 클로닝됐음을 확인하였다.

[0170] 2-2. 디스플레이 방법 선택

[0171] ICOS와의 결합력 검증을 통해 Yeast 디스플레이 방법을 선택하였고, 상기 실시예 2-1에서 제작한 4종의 플라스미드를 각각 AWY101 (Trp-) 균주에 트랜스포메이션하였다. 유세포 분석기를 이용해 ICOS-L의 ICOS와의 결합력을 확인하기 위해 50 μg/ml의 카나마이신(Kanamycin) 및 40 μg/ml의 클로람페니콜(Chloramphenicol)이 첨가된 SDCAA (20 g/L Glucose, 6.7 g/L Yeast nitrogen base without amino acids, 5 g/L casamino acids, 5.4 g/L Na_2HPO_4, 8.56 g/L NaH_2PO_4) 배지 5 ml에서 30℃ 및 225 rpm으로 16시간 동안 배양하였다. 배양된 세포는 원심분리 (2,500g, 5분, 4℃)하여 $5x10^7$개의 세포를 수득한 뒤, 50 μg/ml의 카나마이신 및 40 μg/ml의 클로람페니콜이 첨가된 SGCAA (20 g/L Galactose, 6.7 g/L Yeast nitrogen base without amino acids, 5 g/L casamino acids, 5.4 g/L Na_2HPO_4, 8.56 g/L NaH_2PO_4) 배지 5 ml에서 20℃ 및 225 rpm으로 24시간 동안 인덕션 (induction)하였다. 인덕션 후, $2x10^7$개의 세포를 원심분리 (14,000g, 30초, 4℃)하여 e-튜브에 회수하였다. 세포를 회수한 각 e-튜브에 PBSB (0.1% BSA in PBS) 1 ml을 넣어 재현탁하고 원심분리 (14,000g, 30초, 4℃)하여 세포를 다시 모은 후, PBSB 0.5 ml을 넣고 재현탁하여 $4x10^7$ cell/ml을 만들었다. 25 μl의 세포를 새로운 e-튜브에 옮긴 후, 25 μl의 PBSB, ICOS-Fc-Alexa488 (200 nM) 및 Anti-FLAG-iFluor647 (1000:1) 프로브를 각각 넣고 상온에서 30분 동안 인큐베이션하여 세포에 형광 프로브로 표지하였다. 그 후, 원심분리 (14,000g, 30초, 4℃)하여 상등액을 버리고 200 μl의 PBSB로 재현탁하여 세척하고, 다시 원심분리 (14,000g, 1분, 4℃)하여 200 μl의 PBSB로 재현탁한 시료를 준비하였다. FACSLyric (BD Biosciences) 장비로 준비된 시료들의 형광 신호값을 측정함으로써 야생형 ICOS-L 및 A184의 발현양, 및 ICOS 와의 결합력을 간접적으로 분석하였다.

[0172] 그 결과, 상기 플라스미드 모두 발현은 잘 되었으나, N-말단 부분이 Aga2에 anchoring되어 yeast에 디스플레이된 야생형 ICOS-L에 비해 C-말단 부분이 Aga2에 anchoring되어 yeast에 디스플레이된 ICOS-L의 ICOS에 대한 결합력이 현저히 증가한 것을 확인하여, C-말단을 anchoring한 형태로 스크리닝을 진행하기로 결정하였다 (도 3).

[0174] **실시예 3. 초고속 스크리닝 기법을 사용하기 위한 거대 ICOS-L error-prone library 제작**

[0175] ICOS와 결합력이 증가된 ICOS-L 변이체들을 고속으로 탐색하기 위해, pCTCON-ICOS-L_WT-Aga2-FLAG를 기반으로 ICOS-L의 모든 부위에 무작위 돌연변이가 들어갈 수 있게 양쪽의 *Sfi*I site를 포함하는 프라이머를 디자인하였다. 디자인한 프라이머와 *Taq* Polymerase (TAKARA), dNTPs (Invitrogen), $MgCl_2$ 및 $MnCl_2$ (SIGMA)를 사용하여 Error-Prone PCR 기법으로 DNA를 1차 증폭시켰다. 증폭된 유전자를 Vent polymerase를 이용하여 2차 증폭시켜 준비하였으며 (24 μg), 해당 벡터는 *Sfi*I 제한 효소 처리하여 준비하였다 (8 μg). 준비된 두 유전자를 AWY101 균주에 트랜스포메이션하여 상동 재조합(homologous recombination)을 통한 라이브러리를 구축하였다. 구축된 라이브러리는 4.5×10^7 크기였으며, 시퀀스 분석을 통해 DNA 기준 0.89% (평균 6.3개 돌연변이/총 714 bp), 아미노산 기준 2.05% (평균 4.8개 돌연변이/총 238 아미노산)의 error-rate를 가지는 것을 확인하였다 (도 4).

[0177] **실시예 4. ICOS-L 변이체 스크리닝**

[0178] 4-1. ICOS-L 변이체 스크리닝

[0179] AWY101에 트랜스포메이션된 초기 라이브러리를 50 μg/ml의 카나마이신 및 40 μg/ml의 클로람페니콜이 첨가된

SDCAA (20 g/L Glucose, 6.7 g/L Yeast nitrogen base without amino acids, 5 g/L casamino acids, 5.4 g/L Na_2HPO_4, 8.56 g/L NaH_2PO_4) 배지 500 ml에서 30℃ 및 225 rpm으로 16시간 동안 배양하였다. 죽은 세포를 걸러내기 위해 배양된 세포를 SDCAA 배지 100 ml에 OD_{450}=0.7로 접종한 후 30℃ 및 225 rpm으로 16시간 동안 배양하였으며, 배양된 세포를 SGCAA 배지 100 ml에 OD_{450}=0.7로 접종하여 20℃ 및 225 rpm으로 2일 동안 배양하였다. 인덕션 후, $1x10^8$ 개의 세포를 원심분리 (14,000g, 30초, 4℃)하여 e-튜브에 회수하였다. 세포를 회수한 e-튜브에 PBSB (0.1% BSA in PBS) 1 ml을 넣어 재현탁하고 원심분리 (14,000g, 30초, 4℃)하여 세포를 다시 모은 후, Anti-FLAG-iFluor647 (1000:1) 및 ICOS-Fc-Alexa488 (200 nM) 프로브를 넣은 1 ml의 PBSB로 재현탁하고 상온에서 1시간동안 인큐베이션하여 표지하였다. 그 후, 원심분리 (14,000g, 30초, 4℃)하여 상등액을 버리고 1 ml의 PBSB로 재현탁하여 세척하고, 또 다시 원심분리 (14,000g, 1분, 4℃)하여 1 ml의 PBSB로 재부유하여 시료를 준비하였다. S3 sorter (Bio-Rad) 장비를 이용하여 준비된 라이브러리 시료의 형광 신호값을 측정하여 ICOS에 높은 결합력을 가지는 효모(yeast)들을 회수하였으며, 회수한 효모들은 SDCAA 20 ml에서 30℃ 및 225 rpm으로 배양하였다. 배양된 세포들은 다음날 회수하여 SGCAA 100 ml에서 20℃ 및 225 rpm으로 2-3일 동안 배양하여 인덕션한 후, 다음 라운드를 진행하였다. 위와 같은 스크리닝 과정은 프로브(probe)의 농도를 줄여가며 총 4회 진행하였다.

[0181] 4-2. ICOS와의 결합력이 증가된 ICOS-L 변이체들의 증폭 확인

[0182] 50 μg/ml의 카나마이신 및 40 μg/ml의 클로람페니콜이 첨가된 SDCAA (20 g/L Glucose, 6.7 g/L Yeast nitrogen base without amino acids, 5 g/L casamino acids, 5.4 g/L Na_2HPO_4, 8.56 g/L NaH_2PO_4) 배지 100 ml에 이니셜, 1라운드, 2라운드, 3라운드 및 4라운드의 라이브러리를 각각 따로 접종하여 30℃ 및 225 rpm으로 16시간 동안 배양하였다. 죽은 세포를 걸러내기 위해 배양된 세포를 SDCAA 배지 100 ml에 각각 OD_{450}=0.7로 접종한 후 30℃ 및 225 rpm으로 16시간 동안 배양하였으며, 배양된 세포를 SGCAA 배지 100 ml에 OD_{450}=0.7로 접종하여 20℃ 및 225 rpm으로 2일 동안 배양하였다. 인덕션 후, 라이브러리들을 $2x10^7$ 개의 세포에 해당하는 양으로 각각 원심분리 (14,000g, 30초, 4℃)하여 e-튜브에 회수하였다. 세포를 회수한 각 e-튜브에 PBSB (0.1% BSA in PBS) 1 ml을 넣어 재현탁하고 원심분리 (14,000g, 30초, 4℃)로 세포를 다시 모은 후, PBSB 0.5 ml을 넣고 재현탁하여 $4x10^7$ cell/ml을 만들었다. 25 μl의 세포를 새로운 e-튜브에 옮긴 후, 25 μl의 PBSB, ICOS-Fc-Alexa488 (200 nM) 및 Anti-FLAG-iFluor647 (1000:1) 프로브를 각각 넣고 상온에서 30분 동안 인큐베이션하여 세포에 형광 프로브로 표지하였다. 그 후, 원심분리 (14,000g, 30초, 4℃)하여 상등액을 버리고 200 μl의 PBSB로 재현탁하여 세척하고, 또 다시 원심분리 (14,000g, 1분, 4℃)하여 200 μl의 PBSB로 재현탁하여 시료를 준비하였다. FACSLyric (BD Biosciences) 장비로 준비된 시료들의 형광 신호값을 측정함으로써 각 라이브러리들의 ICOS와의 결합력을 간접적으로 분석하였다.

[0183] 그 결과, 스크리닝이 진행됨에 따라 점차 ICOS와의 결합력이 향상된 변이체들이 증폭(enrichment)되고 있음을 확인하였다 (도 5).

[0185] **실시예 5. ICOS-L 변이체들의 아미노산 서열 분석 및 ICOS와의 결합력이 증가된 ICOS-L 변이체들 선별**

[0186] Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep kits (Zymo Research)를 이용하여 4 라운드 라이브러리의 DNA를 확보한 후, Jude1 대장균에 트랜스포메이션시켜 50개 콜로니의 염기서열 분석을 진행하였다. 그 결과, 18종의 변이체들을 선별할 수 있었으며, 이들의 ICOS와의 결합력을 분석하기 위해 18종 변이체의 플라스미드를 각각 AWY101(Trp-) 균주에 트랜스포메이션하였다. 유세포 분석기를 이용해 변이체들의 ICOS와의 결합력을 확인하기 위해 야생형 ICOS-L, A184 및 18종의 변이체들을 50 μg/ml의 카나마이신 및 40 μg/ml의 클로람페니콜이 첨가된 SDCAA (20 g/L Glucose, 6.7 g/L Yeast nitrogen base without amino acids, 5 g/L casamino acids, 5.4 g/L Na_2HPO_4, 8.56 g/L NaH_2PO_4) 배지 5 ml에서 30℃ 및 225 rpm으로 16시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 원심분리 (2,500g, 5분, 4℃)하여 $5x10^7$개의 세포를 수득한 뒤, 50 μg/ml의 카나마이신 및 40 μg/ml의 클로람페니콜이 첨가된 SGCAA (20 g/L Galactose, 6.7 g/L Yeast nitrogen base without amino acids, 5 g/L casamino acids, 5.4 g/L Na_2HPO_4, 8.56 g/L NaH_2PO_4) 배지 5 ml에서 20℃ 및 225 rpm으로 24시간 동안 인덕션하였다. 인덕션 후,

원심분리 (14,000g, 30초, 4℃)하여 2x10^7 개의 세포를 e-튜브에 회수하였다. 세포를 회수한 각 e-튜브에 PBSB (0.1% BSA in PBS) 1 ml을 넣어 재현탁하고 원심분리 (14,000g, 30초, 4℃)하여 세포를 다시 모은 후, PBSB 0.5 ml을 넣고 재현탁하여 4x10^7 cell/ml을 만들었다. 25 μl의 세포를 새로운 e-튜브에 옮긴 후, 25 μl의 PBSB, ICOS-Fc-Alexa488 (67.7 nM) 및 Anti-FLAG-iFluor647 (1000:1) 프로브를 각각 넣고 상온에서 30분 동안 인큐베이션하여 세포에 형광 프로브를 표지하였다. 그 후, 원심분리 (14,000g, 30초, 4℃)하여 상등액을 버리고 200 μl의 PBSB로 재현탁하여 세척하고, 또 다시 원심분리 (14,000g, 1분, 4℃)하여 200 μl의 PBSB로 재현탁해 시료를 준비하였다. FACSLyric (BD Biosciences) 장비로 준비된 시료들의 형광 신호값을 측정함으로써 변이체들의 발현양 및 ICOS와의 결합력을 간접적으로 분석하였다. 이를 통해 ICOS 와의 결합력이 향상된 총 6종의 ICOS-L 변이체 Y3, Y8, Y13, Y20, Y35 및 Y48를 선별하였다 (도 6).

[0188] **실시예 6. ICOS와의 결합력이 증가된 ICOS-L 변이체들의 발현 및 정제**

[0189] ICOS-L 변이체들의 동물세포 발현벡터를 제작하기 위해 야생형 ICOS-L, 대조군인 ICOS-L_A184, 상기 실시예 5에서 확보한 변이체 6종의 유전자 중 Y3, Y13, Y20, Y35 및 Y48을 디자인된 프라이머와 Vent Polymerase (New England Biolab)를 사용하여 증폭하였다. 증폭된 유전자는 *Bss*HII 및 *Xba*I (New England Biolab)을 사용해 제한효소 처리하였다. 제한효소 처리된 ICOS-L 변이체들의 유전자는 동일한 제한효소 처리된 동물세포용 벡터인 pMAZ 벡터에 라이게이션하였다. 라이게이션된 플라스미드를 Jude1 대장균에 트랜스포메이션한 후, 단일 클론을 확보해 염기서열 분석을 진행한 결과, 변이체들의 유전자가 벡터에 성공적으로 삽입되었음을 확인하였다. 또한, Y8 변이체는 유전자 서열 내에 *Xba*I 제한효소 자리가 존재하여 디자인된 프라이머와 Vent Polymerase로 증폭한 뒤, 2X Gibson assembly master mix (New England Biolab)를 사용하여 pMAZ 벡터에 삽입하였다. 반응 완료된 유전자 시료를 Jude1 대장균에 트랜스포메이션한 후, 단일 클론을 확보해 염기서열 분석을 진행한 결과, Y8 의 유전자 또한 벡터에 성공적으로 삽입되었음을 확인하였다. 제작한 ICOS-L 변이체 발현용 벡터 (pMAZ-ICOS-L_WT, pMAZ-ICOS-L_A184, pMAZ-ICOS-L_Y3, pMAZ-ICOS-L_Y8, pMAZ-ICOS-L_Y13, pMAZ-ICOS-L_Y20, pMAZ-ICOS-L_Y35 및 pMAZ-ICOS-L_Y48)를 Expi293F 동물세포에 트랜스펙션하고 CO_2 진탕배양기에서 37 ℃, 125 rpm 및 8% CO_2 조건으로 7일간 배양한 후 원심분리하여 상등액만 분리하였다. 그 후 25x PBS를 이용해 평형을 맞추었으며, 0.2 μm 시린지 필터 (Sartorius, S6634)를 이용해 여과하였다. 여과된 배양액에 Ni-NTA 레진 0.15 ml을 넣고 상온에서 1 시간 동안 교반하여 레진을 회수한 뒤 10 mM 이미다졸 (Sigma)이 포함된 PBS 용액 1 ml로 2회 세척하고 20 mM 이미다졸이 포함된 PBS 용액 1 ml로 2회 더 세척하였다. 250 mM 이미다졸이 포함된 PBS 용액으로 용출한 후 centrifugal filter units 10K (Merck Millipore)을 사용하여 1X PBS (pH 7.4)로 버퍼를 바꾸었다. 그 뒤, 발현 및 정제한 야생형 ICOS-L, 대조군 A184 및 본 발명에서 발굴한 변이체 6종을 SDS-PAGE 젤로 확인하였다 (도 7).

[0191] **실시예 7. ICOS-L 변이체들의 ICOS와의 결합력 검증**

[0192] 정제된 ICOS-L 변이체들의 ICOS 결합력을 분석하기 위해 ELISA를 진행하였다. 구체적으로, 0.05 M Na_2CO_3 pH 9.6에 4 μg/ml로 희석한 ICOS-Fc를 Flat Bottom Polystyrene High Bind 96웰 마이크로플레이트 (costar)에 50 μl씩 분주하여 4 ℃에서 16 시간 동안 고정화한 후 100 μl의 0.5% BSA (Gibco) (in PBS pH 7.4)으로 상온에서 2 시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST (pH 7.4) 180 μl로 4 회씩 세척한 뒤 0.5% BSA (in PBS pH 7.4)으로 연속 희석된 ICOS-L 변이체들을 50 μl 각 웰에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 4 회 세척 후 anti-His-HRP 컨쥬게이트 50 μl을 넣어 상온에서 1 시간 동안 반응시키고 4 회 세척하였다. 그 후, 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution(Thermo Fisher Scientific)을 50 μl씩 첨가해 발색한 뒤 2 M H_2SO_4을 50 μl씩 첨가하여 반응을 종료시킨 다음 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek)을 이용해 분석하였다.

[0193] 그 결과, Y3 변이체를 제외한 모든 변이체들이 야생형 ICOS-L 보다 ICOS에 높은 결합력을 나타냈으며, 특히 Y8 변이체가 종래의 A184 보다도 높은 결합력을 나타냈다 (도 8).

[0195] **실시예 8. ICOS와의 결합력을 향상시키는 ICOS-L의 결정적 돌연변이 탐색**

[0196] 8-1. 돌연변이 회복 변이체들 제작

[0197] 대조군인 A184보다 향상된 결합력을 가지는 Y8 변이체의 결정적 돌연변이(critical mutation)가 무엇인지 탐색하기 위해 Y8이 가지는 2개의 돌연변이를 각각 야생형 ICOS-L의 아미노산 서열로 치환시킨 변이체들인 Y8_P51Q (Y8 변이체의 P51을 Q로 치환) 및 Y8_H57N (Y8 변이체의 H57을 N으로 치환)을 만들었다. Y8_P51Q 및 Y8_H57N 변이체의 동물세포 발현벡터를 제작하기 위해 준비한 pMAZ-ICOS-L_Y8 플라스미드를 디자인한 프라이머와 *Pfu* turbo polymerase (Agilent)를 사용하여 Quikchange PCR 기법으로 유전체를 증폭하였다. 증폭된 유전자를 Jude1에 트랜스포메이션하여 시퀀스를 확인하였다. 제작된 ICOS-L 변이체 발현용 벡터 (pMAZ-ICOS-L_WT, pMAZ-ICOS-L_A184, pMAZ-ICOS-L_Y8, pMAZ-ICOS-L_Y8_P51Q 및 pMAZ-ICOS-L_Y8_H57N)를 Expi293F 동물세포에 트랜스펙션하여 7일간 배양한 후 원심 분리하여 상등액만 분리하였다. 그 후 25x PBS를 이용해 평형을 맞추었으며, Bottle top filter를 이용해 0.2 μm filter (Thermo Fisher Scientific)로 여과하였다. 여과된 배양액에 Ni-NTA 레진 0.5 ml을 넣어 주고 4 ℃에서 16 시간 동안 교반한 후 컬럼을 이용해 레진을 회수한 후 20 CV (column volume)의 10 mM 이미다졸 (Sigma)이 포함된 PBS 용액으로 세척한 후 20 CV의 20 mM 이미다졸이 포함된 PBS 용액으로 한번 더 세척하였다. 그 후 250 mM 이미다졸이 포함된 PBS 용액으로 용출한 뒤 centrifugal filter units 10K (Merck Millipore)을 사용하여 1X PBS (pH 7.4)로 버퍼를 바꾸었다. 그 결과 각 1 mg 이상의 정제된 4 가지 변이체들을 얻을 수 있었다. 정제된 ICOS-L 변이체들의 순도를 높이기 위해 Size exclusion chromatography (NGC Chromatography, Biorad)를 수행하였다. Superdex 200 10/300 GL 컬럼 (Cytiva)을 이용하여 응집(aggregation)된 단백질들은 제거하고 분획(Fraction) 21과 22 만을 리커버리(recovery)하였다. 이 후 SDS-PAGE를 통해 5종의 ICOS-L 변이체들의 순도가 높아졌음을 확인하였다 (도 9).

[0199] 8-2. Y8 변이체의 결정적 돌연변이 탐색

[0200] Y8 변이체의 결정적 돌연변이(critical mutation)를 탐색하기 위해 ELISA를 진행하였다. 구체적으로, 0.05 M Na_2CO_3 pH 9.6에 4 μg/ml로 희석한 ICOS-Fc들을 Flat Bottom Polystyrene High Bind 96웰 마이크로플레이트 (costar)에 50 μl씩 분주하여 4 ℃에서 16 시간 동안 고정화한 후 100 μl의 0.5% BSA (Gibco) (in PBS pH 7.4)으로 상온에서 2 시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST (pH 7.4) 180 μl로 4 회씩 wash를 진행한 뒤 0.5% BSA (in PBS pH 7.4)으로 연속 희석된 상기 실시예 8-1에서 제작한 정제된 각 ICOS-L 변이체들을 50 μl 각 웰에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 4번의 세척 후 anti-His-HRP 컨쥬게이트 50 μl을 넣어 상온에서 1 시간 동안 반응시킨 후 4회 세척하였다. 그 뒤, 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific)을 50 μl씩 첨가해 발색한 뒤 2 M H_2SO_4 50 μl씩 넣어주어 반응을 종료시킨 다음 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek)을 이용해 분석하였다.

[0201] 그 결과, Y8의 H57 돌연변이보다 P51 돌연변이가 결합력 향상에 큰 영향을 주는 것으로 보이며, P51 및 H57 돌연변이가 함께 존재할 때의 결합력이 가장 우수한 것으로 나타났다 (도 10).

[0203] **실시예 9. 결정적 돌연변이 포함 ICOS-L 변이체들의 ICOS에 대한 결합력 비교**

[0204] 야생형 ICOS-L, 종래의 A184 변이체 및 ICOS-L 변이체들 (Y8, Y8_P51Q 및 Y8_H57N)의 ICOS에 대한 결합력을 Bio-layer interferometry assay (Octet R8, Satorius)를 통해 측정하여 비교하였다. 구체적으로 1X PBS (pH 7.4)로 1분 동안 평형(equilibrium)을 잡은 Protein A biosensor (Satorius)에 5 μg/ml의 ICOS-Fc를 1분간 고정화한 후 1X PBS (pH 7.4)로 1분 동안 기준선(baseline)을 잡은 뒤, 10분 동안 3.13 nM - 500 nM 농도 범위의 ICOS-L 변이체를 결합(association)시켰고, 1X PBS (pH 7.4)를 10분 동안 흘려 해리(dissociation)하였다. 이렇게 각 변이체들의 농도별 센서그램(sensorgram)을 분석하여 (도 11), 최종적인 평형해리상수(KD) 값을 분석하였다 (도 12).

[0206] **실시예 10. ICOS-L 변이체의 결합력 측정을 위한 ICOS 단일체 제작**

[0207] 10-1. ICOS 단일체 클로닝

[0208] 다양한 형태의 ICOS-L 변이체들의 ICOS 결합력을 측정하기 위해 ICOS의 이합체 형성 가능성을 제거시킨 ICOS 세포외 영역 부분의 아미노산 서열 E21-H129을 암호화하는 DNA를 디자인한 프라이머와 Vent Polymerase (New England Biolab)를 사용해 유전자를 증폭하였다. 증폭된 유전자는 *Bss*HII 및 *Xba*I (New England Biolab)을 사

용해 제한효소 처리하였으며, 제한효소 처리된 ICOS (E21-H129) 유전자를 동일한 제한효소 처리된 동물세포용 벡터인 pMAZ 벡터에 라이게이션하였다. 라이게이션된 플라스미드를 Jude1 대장균에 트랜스포메이션한 후, 단일 클론을 확보하고 염기서열 분석하여 ICOS (E21-H129)가 pMAZ 벡터에 성공적으로 삽입된 것을 확인하였다.

[0210] 10-2. ICOS 단일체 단백질의 발현 및 정제

[0211] 제작한 ICOS 발현용 벡터를 Expi293F 동물세포에 트랜스펙션하고 CO_2 진탕배양기에서 37 ℃, 125 rpm 및 8% CO_2 조건으로 7일간 배양한 후 원심분리하여 상등액만 분리하였다. 그 후 25× PBS를 이용해 평형을 맞추었으며, 0.2 μm 바틀탑 필터 (Merck Millipore)를 이용해 여과하였다. 여과된 배양액에 Ni-NTA 레진 0.5 ml을 넣고 상온에서 1 시간 동안 교반하여 레진을 회수한 뒤 10 mM 이미다졸 (Sigma)이 포함된 PBS 용액 10 ml로 세척하고 20 mM 이미다졸이 포함된 PBS 용액 10 ml로 한번 더 세척하였다. 250 mM 이미다졸이 포함된 PBS 용액으로 용출한 후 centrifugal filter units 10K (Merck Millipore)을 사용하여 1× PBS (pH 7.4)로 버퍼를 바꾸었다. 그 뒤, 발현 및 정제한 ICOS 단일체 단백질을 SDS-PAGE 젤로 확인하였다 (도 13).

[0213] **실시예 11. 항체 Fc 도메인에 융합된 ICOS-L 변이체 제조**

[0214] 11-1. 항체 Fc 도메인에 융합된 ICOS-L 변이체 클로닝

[0215] 발굴된 ICOS-L 변이체들의 T 세포 활성화 능력을 평가하기 위해 인간 IgG1 항체의 silent Fc 변이체인 LALAPG (L234A/L235A/P329G)에 융합하였다. 야생형 ICOS-L, 종래의 A184 변이체 및 본 발명의 ICOS-L 변이체들 (Y8 및 Y8_H57N)의 C-말단 부분에 인간 IgG1 항체의 Fc 도메인을 융합하기 위해 디자인한 프라이머와 Vent Polymerase (New England Biolab)를 사용해 ICOS-L 및 Fc (LALAPG) 유전자를 증폭하였다. 증폭된 유전자들을 assembly PCR을 진행한 후, 2× Gibson assembly master mix (New England Biolab)를 사용하여 pMAZ 벡터에 삽입하였다 (pMAZ-ICOS-L_WT-Fc, pMAZ-ICOS-L_A184-Fc, pMAZ-ICOS-L_Y8-Fc 및 pMAZ-ICOS-L_Y8_H57N-Fc). 반응 완료된 유전자 시료를 Jude1 대장균에 트랜스포메이션한 후, 단일 클론을 확보해 염기서열 분석을 진행한 결과, Fc (LALAPG)에 융합된 4종의 ICOS-L 변이체들이 pMAZ 벡터에 성공적으로 삽입되었음을 확인하였다.

[0217] 11-2. 항체 Fc 도메인에 융합된 ICOS-L 변이체들의 발현 및 정제

[0218] Expi293F 세포를 2 × 10^6 cells/ml의 밀도로 100 ml 계대배양하고 하루 뒤, Freestyle 293 expression 배양액 (Gibco. 12338-018) 10 ml에 상기 실시예 11-1에서 제작한 Fc 융합된 ICOS-L 변이체 발현벡터 (pMAZ-ICOS-L_WT-Fc, pMAZ-ICOS-L_A184-Fc, pMAZ-ICOS-L_Y8-Fc 및 pMAZ-ICOS-L_Y8_H57N-Fc)를 PEI(Polyehylenimine, Polyscience, 23966)와 1:4의 비율로 섞어 상온에서 20분간 두었다가 상기 Expi293F 동물세포에 트랜스펙션하였다. 세포를 CO_2 진탕배양기에서 37 ℃, 125 rpm 및 8% CO_2의 조건으로 7일간 배양한 후 원심 분리하여 상등액만 취한 후 25× PBS를 이용해 평형을 맞추고 바틀 탑 필터를 이용해 0.2 μm 필터 (Merck Millipore)로 여과하였다. 여과된 배양액에 Protein A resin 0.5 ml을 넣어 주고 컬럼에 통과시켜 레진을 회수한 후 10 ml PBS로 세척하였다. 세척한 레진을 100 mM 글라이신 (pH 2.7) 버퍼로 용출한 후 1 M Tris-HCl (pH 8.0)을 이용하여 중화시켜 정제된 ICOS-L 변이체 융합 단백질을 수득하고 Centrifugal filter units 10K (Merck Millipore)을 사용하여 1× PBS로 버퍼 교체하였다. 발현 및 정제한 항체 Fc 도메인 (LALAPG)에 융합된 ICOS-L 변이체들을 SDS-PAGE 젤로 확인하였다 (도 14).

[0220] 11-3. 항체 Fc 도메인에 융합된 ICOS-L 변이체들의 ICOS와의 결합력 검증

[0221] 상기 실시예 11-2에서 정제한 항체 Fc 도메인 (LALAPG)에 융합된 ICOS-L 변이체들의 ICOS와의 결합력을 분석하기 위해 ELISA 분석을 수행하였다. 구체적으로, 0.05 M Na_2CO_3 (pH 9.6)에 4 μg/ml로 희석한 ICOS-L-Fc들을 Flat Bottom Polystyrene High Bind 96웰 마이크로플레이트 (Costar)에 50 μl씩 분주하여 4 ℃에서 16 시간 동안 고정화한 후 100 μl의 0.5% BSA(Bovine serum albumin) (Gibco)가 포함된 PBS (pH 7.4)로 상온에서 2 시간 동안 블로킹하였다. 0.05% Tween20가 포함된 1× PBS (pH 7.4)(PBST) 180 μl로 4 회씩 세척한 뒤, 0.5% BSA가 포함된 PBS (pH 7.4)으로 연속 희석된 야생형 ICOS를 각 웰에 50 μl씩 분주하여 상온에서 1 시간 동안

반응시켰다. 4 회의 세척 후 anti-His-HRP conjugate 50 μl을 넣어 상온에서 1 시간 동안 반응시킨 후 4 회 세척하였다. 그 후, 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific)을 50 μl씩 첨가해 발색한 뒤 2 M H_2SO_4을 50 μl씩 넣어주어 반응을 종료시키고 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek)을 이용해 분석하였다. 그 결과, 항체 Fc 도메인 (LALAPG)에 융합된 ICOS-L 변이체들이 Fc를 융합하기 전과 동일한 순위로 야생형 ICOS와 결합하는 것을 확인하였다 (도 15).

[0223] **실시예 12. 항체 Fc 도메인에 융합된 ICOS-L 변이체들의 T 세포 활성화 확인**

[0224] 12-1. T 세포 분화 분석을 통한 T 세포 활성 검증

[0225] 항체 Fc 도메인에 융합된 ICOS-L 변이체들의 공동 자극(co-stimulation) 신호 전달로 인한 T 세포 활성화 능력을 확인하기 위해, T 세포의 분화 정도를 확인하였다. 구체적으로, Flat Bottom Cell Culture Plate (SPL)에 1.5 μg/ml의 항-CD3 항체 (Biolegend) 및 50 nM의 Fc가 융합된 ICOS-L 변이체들을 각각 50 μl씩 분주하고 4 ℃에서 20 시간 동안 고정화한 후 200 μl의 PBS (pH 7.4)로 3 회 세척하였다. 인간 PBMCs(Peripheral Blood Mononuclear Cells)으로부터 Pan T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec)를 이용하여 T 세포를 분리하고, CFSE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)(Invitrogen)로 염색하여 AIM-V medium (Gibco)에 resuspension 한 후, 단백질이 고정화된 플레이트에 5 × 10^4 cells 씩 분주하였다. CO_2 세포배양기에서 37 ℃, 5% CO_2의 조건으로 3일간 배양한 후 배양한 T 세포 배양액을 400 × g로 5 분 동안 원심분리하고, PBS 100 μl로 재현탁하여 V-bottom cell culture plate (Corning)로 세포를 회수하였다. 회수된 세포를 원심분리하여 50 μl의 PBS로 재현탁하였으며, 항 CD4-APC 프로브 또는 항 CD8-APC 프로브 (200:1)를 50 μl 씩 넣고 상온에서 20분 동안 인큐베이션하여 세포에 형광 프로브를 표지하였다. 그 후, 100 μl의 PBS로 세척 후 원심분리 (400 × g, 5분) 하여 200 μl의 PBS로 재현탁해 시료를 준비하고 FACSLyric (BD Biosciences) 장비로 준비된 시료들의 CFSE 형광 신호값 감소를 측정하였다. 그 결과, 항체 Fc 도메인에 융합된 ICOS-L 변이체들에 의해 T 세포의 활성화가 유도되어 T 세포의 분화가 일어났음을 확인하였다 (도 16). 이를 통해, ICOS와의 결합력이 향상된 본 발명의 ICOS-L 변이체가 $CD4^+$ T 세포 및 $CD8^+$ T 세포의 분화를 성공적으로 유도하였음을 확인하였다.

[0227] 12-2. 사이토카인 분비 분석을 통한 T 세포 활성 검증

[0228] 항체 Fc 도메인에 융합된 ICOS-L 변이체들의 공동 자극 (co-stimulation) 신호 전달로 인한 T 세포 활성화 능력을 확인하기 위해, 사이토카인 (인터페론 감마) 분비 정도를 확인하였다. 구체적으로, 상기 실시예 12-1에서와 같이 T 세포를 분리하고, CFSE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)(Invitrogen)로 염색하여 AIM-V medium (Gibco)에 resuspension 한 후, 단백질이 고정화된 플레이트에 5 × 10^4 cells 씩 분주하였다. CO_2 세포배양기에서 37 ℃, 5% CO_2의 조건으로 3일간 배양한 배양액을 400 × g로 5 분 동안 원심분리하고, 상등액을 확보하여 DuoSet® Human IFN-γ ELISA Kit (R&D Systems)로 항체 Fc 도메인에 융합된 ICOS-L 변이체들의 T 세포 활성화 능력을 검증하였다. 그 결과, 항체 Fc 도메인에 융합된 변이체들이 사이토카인 분비도 현저히 향상시키는 것으로 나타났다 (도 17).

[0230] **실시예 13. 항체에 융합된 ICOS-L 변이체 제작**

[0231] 13-1. 항 PD-L1 항체 (Atezolizumab)의 제작

[0232] 13-1-1. 아테졸리주맙(Atezolizumab) 발현 벡터 클로닝

[0233] ICOS-L 변이체 응용의 한 예로서, 항체에 ICOS-L 변이체를 융합하여 항체의 효능을 극대화시킬 수 있는지 확인하기 위해, 항 PD-L1 항체인 아테졸리주맙을 제작하였으며, 기존 항체에 비해 정제 수율과 단백질 안정성을 향상시키기 위해 아테졸리주맙의 Fc 도메인에 기존의 IgG1 N297A 돌연변이가 아닌 LALAPG 돌연변이를 도입하여 항체의 효과기 기능(effector function)을 감소시켰다. 구체적으로, 아테졸리주맙의 중쇄(heavy chain)의 가변영역(variable region) 유전자와 LALAPG 돌연변이가 도입된 중쇄의 불변영역(constant region) 유전자를 각각 디자인한 프라이머와 Vent Polymerase (New England Biolab)를 사용해 증폭하여 assembly PCR을 수행하였으며,

확보된 유전자를 *Bss*HII 및 *Xba*I (New England Biolab)로 제한효소 처리하였다. 또한, 아테졸리주맙 경쇄(light chain)의 가변영역 유전자도 경쇄의 불변영역 유전자와 assembly PCR을 수행하여 동일한 제한효소를 처리하였다. 제한효소 처리된 중쇄 및 경쇄 유전자들을 동일한 제한효소 처리된 동물세포용 벡터인 pMAZ 벡터에 라이게이션하고, 라이게이션된 플라스미드를 Jude1 대장균에 트랜스포메이션하여, 단일 클론을 확보하고 염기서열 분석하여 효과기 기능을 제거한 아테졸리주맙의 중쇄 및 경쇄 유전자가 pMAZ 벡터에 성공적으로 삽입된 것을 확인하였다.

[0235] 13-1-2. 아테졸리주맙의 발현 및 정제

[0236] 상기 실시예 13-1-1에서 제작한 아테졸리주맙의 중쇄 및 경쇄 유전자를 1:1로 섞은 후 PEI(Polyehylenimine, Polyscience, 23966)와 1:4의 비율로 섞어 상온에서 20분간 두었다가 Expi293F 동물세포에 트랜스펙션하였다. CO_2 진탕배양기에서 37 ℃, 125 rpm 및 8% CO_2 조건으로 7일간 배양한 후 원심분리하여 상등액만 분리하였다. 그 후 25x PBS를 이용해 평형을 맞추고 바틀 탑 필터를 이용해 0.2 μm 필터 (Merck Millipore)로 여과하였다. 여과된 배양액을 Protein A resin 1 ml을 넣어 주고 컬럼에 통과시켜 레진을 회수한 후 10 ml PBS로 세척하였다. 세척한 레진을 100 mM glycine pH 2.7 버퍼로 용출한 후 1 M Tris-HCl (pH 8.0)을 이용하여 중화시켜 정제된 아테졸리주맙을 수득하고 Centrifugal filter units 30K (Merck Millipore)을 사용하여 1× PBS로 버퍼 교체하였다. 이 후, 발현 및 정제한 아테졸리주맙 항체(ATZ)를 SDS-PAGE 젤로 확인하였다 (도 18).

[0238] 13-2. 항 PD-L1 항체에 융합된 ICOS-L 변이체 제작

[0239] 13-2-1. 아테졸리주맙에 융합된 ICOS-L 변이체 클로닝

[0240] 본 발명의 ICOS-L 변이체들을 항 PD-L1 항체인 아테졸리주맙 (IgG1 Fc-LALAPG)에 융합하기 위해 클로닝을 수행하였다. 구체적으로, 야생형 ICOS-L, 종래의 ICOS-L A184 변이체 및 본 발명의 ICOS-L 변이체들 (Y8 및 Y8_H57N)을 각각 아테졸리주맙의 중쇄의 C-말단 또는 경쇄의 C-말단에 융합하기 위해 디자인한 프라이머와 Vent Polymerase (New England Biolab)를 사용해 ICOS-L, 아테졸리주맙의 중쇄 및 경쇄 유전자를 증폭하였다. 증폭된 유전자들을 assembly PCR 진행한 후, 2× Gibson assembly master mix (New England Biolab)를 사용하여 pMAZ 벡터에 삽입하였다. 반응 완료된 유전자 시료를 Jude1 대장균에 트랜스포메이션한 후, 단일 클론을 확보해 염기서열 분석을 진행한 결과, 아테졸리주맙의 중쇄 또는 경쇄 C-말단에 융합된 ICOS-L 변이체들이 pMAZ 벡터에 성공적으로 삽입되었음을 확인하였다.

[0242] 13-2-2. 아테졸리주맙에 융합된 ICOS-L 변이체들의 발현 및 정제

[0243] Expi293F 세포를 2 × 10^6 cells/ml의 밀도로 100 ml 계대배양하고 하루 뒤, Freestyle 293 expression 배양액 (Gibco. 12338-018) 10 ml에 상기 실시예 13-2-1에서 제작한 아테졸리주맙의 중쇄에 융합된 ICOS-L 변이체 발현벡터 (pMAZ-Atezolizumab-IgH-ICOS-L_WT, pMAZ-Atezolizumab-IgH-ICOS-L_A184, pMAZ-Atezolizumab-IgH-ICOS-L_Y8 또는 pMAZ-Atezolizumab-IgH-ICOS-L_Y8_H57N) (+ pMAZ-Atezolizumab-IgL) 및 아테졸리주맙의 경쇄에 융합된 ICOS-L 변이체 발현벡터 (pMAZ-Atezolizumab-IgL-ICOS-L_WT, pMAZ-Atezolizumab-IgL-ICOS-L_A184, pMAZ-Atezolizumab-IgL-ICOS-L_Y8 또는 pMAZ-Atezolizumab-IgL-ICOS-L_Y8_H57N) (+ pMAZ-Atezolizumab-IgH)를 각각 PEI(Polyehylenimine, Polyscience, 23966)와 1:4의 비율로 섞어 상온에서 20분간 두었다가 상기 Expi293F 동물세포에 트랜스펙션하였다. 세포를 CO_2 진탕배양기에서 37 ℃, 125 rpm, 8% CO_2의 조건으로 7일간 배양한 후 원심 분리하여 상등액만 취하였다. 그 후 25x PBS를 이용해 평형을 맞추고 바틀 탑 필터를 이용해 0.2 μm 필터 (Merck Millipore)로 여과하였다. 여과된 배양액을 Protein A resin 0.5 ml을 넣어 주고 컬럼에 통과시켜 레진을 회수한 후 10 ml PBS로 세척하였다. 세척한 레진을 100 mM glycine (pH 2.7) 버퍼로 용출한 후 1 M Tris-HCl (pH 8.0)을 이용하여 중화시켜 정제된 아테졸리주맙의 중쇄 또는 경쇄에 융합된 ICOS-L 변이체들을 수득하고 Centrifugal filter units 10K (Merck Millipore)을 사용하여 buffer를 1× PBS로 바꿔주었다. 또한, 발현 및 정제한 아테졸리주맙의 중쇄 또는 경쇄에 융합된 ICOS-L 변이체들을 SDS-PAGE 젤로 확인하였다 (도 19 및 20).

[0245] 13-3. 항 PD-L1 항체에 융합된 ICOS-L 변이체들의 ICOS와의 결합력 검증

[0246] 상기 실시예 13-2에서 정제한 아테졸리주맙의 중쇄 또는 경쇄에 융합된 ICOS-L 변이체들의 ICOS와의 결합력을 분석하기 위해 ELISA 분석을 수행하였다. 구체적으로, 0.05 M Na_2CO_3 (pH 9.6)에 40 nM의 PD-L1-Fc를 Flat Bottom Polystyrene High Bind 96웰 마이크로플레이트 (Costar)에 50 μl씩 분주하여 4 ℃에서 16 시간 동안 고정화한 후 100 μl의 0.5% BSA(Bovine serum albumin) (Gibco)가 포함된 PBS (pH 7.4)으로 상온에서 2 시간 동안 블로킹하였다. PBST (pH 7.4) 180 μl로 4 회씩 세척한 뒤 0.5% BSA가 포함된 PBS (pH 7.4)로 희석한 아테졸리주맙의 중쇄 또는 경쇄에 융합된 ICOS-L 변이체 200 nM을 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 4 회의 세척 후 0.5% BSA (in PBS pH 7.4)으로 연속 희석된 야생형 ICOS를 각 웰에 50 μl씩 분주하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 4회의 세척 후 anti-His-HRP 컨쥬게이트 50 μl을 넣어 상온에서 1 시간 동안 반응시킨 후 4 회 세척하였다. 그 후, 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific)을 50 μl씩 첨가해 발색한 뒤 2 M H_2SO_4을 50 μl씩 넣어주어 반응을 종료시키고 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek)을 이용해 분석하였다. 그 결과, 아테졸리주맙의 중쇄에 융합된 ICOS-L 변이체들 (ATZ(H)-A184, ATZ(H)-Y8 및 ATZ(H)-Y8_H57N) 및 경쇄에 융합된 ICOS-L 변이체들 (ATZ(L)-A184, ATZ(L)-Y8 및 ATZ(L)-Y8_H57N)이 아테졸리주맙에 융합되기 전과 동일한 순위로 야생형 ICOS와 결합하는 것으로 나타났다 (도 21 및 22).

[0248] **실시예 14. 항체에 융합된 ICOS-L 변이체의 T 세포 활성화 능력 검증**

[0249] 14-1. T 세포 분화 분석을 통한 T 세포 활성 검증

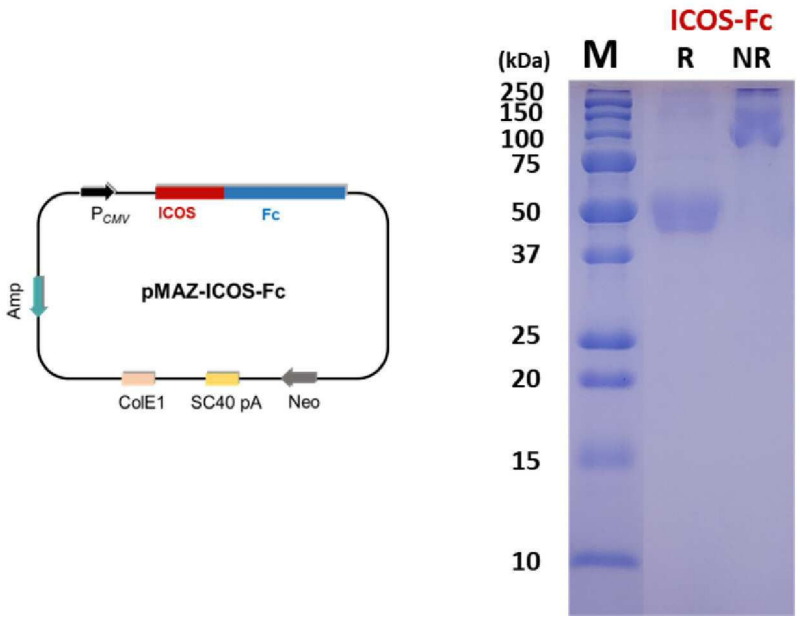
[0250] 아테졸리주맙의 중쇄 또는 경쇄에 융합된 ICOS-L 변이체들의 공동 자극 (co-stimulation) 신호 전달로 인한 T 세포 활성화 능력을 검증하기 위해, T 세포의 분화 정도를 상기 실시예 12-1에서와 같이 확인하였다. 그 결과, 아테졸리주맙의 중쇄 또는 경쇄에 융합된 ICOS-L 변이체들에 의해 T 세포의 활성화가 유도되어 T 세포의 분화가 일어났음을 확인하였다 (도 23 및 24). 이를 통해 아테졸리주맙에 융합하여도 ICOS-L 변이체들이 여전히 $CD4^+$ T 세포 및 $CD8^+$ T 세포의 분화를 성공적으로 유도함을 확인하였다.

[0252] 14-2. 사이토카인 분비 분석을 통한 T 세포 활성 검증

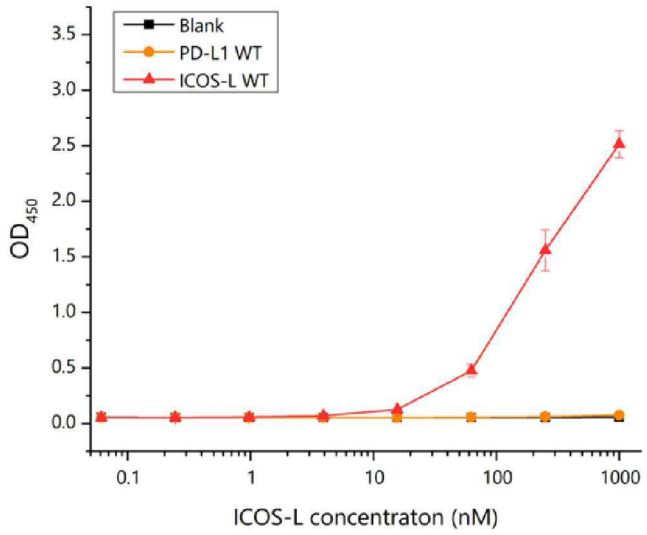
[0253] 아테졸리주맙의 중쇄 또는 경쇄에 융합된 ICOS-L 변이체들의 공동 자극 (co-stimulation) 신호 전달로 인한 T 세포 활성화 능력을 검증하기 위해, 사이토카인 (인터페론 감마) 분비 정도를 상기 실시예 12-2에서와 같이 확인하였다. 그 결과, 아테졸리주맙 항체보다 ICOS-L을 융합한 아테졸리주맙을 처리한 T 세포의 사이토카인 분비가 현저하게 증가하는 것으로 나타났다 (도 25 및 26). 이를 통해 ICOS-L이 T 세포의 활성화를 성공적으로 유도시킴으로써 아테졸리주맙의 효능을 극대화시키는 것을 확인하였다.

도면

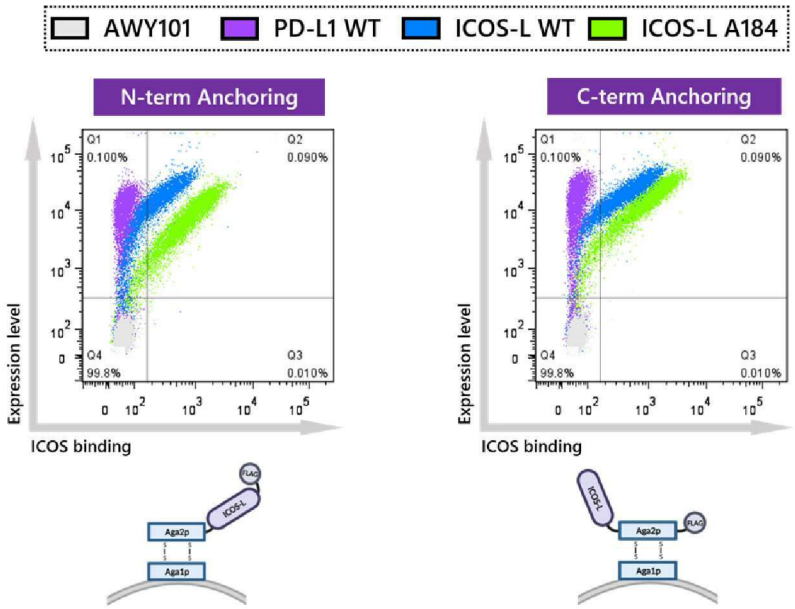
도면1


ICOS-Fc
(kDa)
M
R
NR
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
P CMV
ICOS
Fc
pMAZ-ICOS-Fc
Amp
ColE1
SC40 pA
Neo

도면2


Blank
PD-L1 WT
ICOS-L WT
OD450
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
10
100
1000
ICOS-L concentraton (nM)

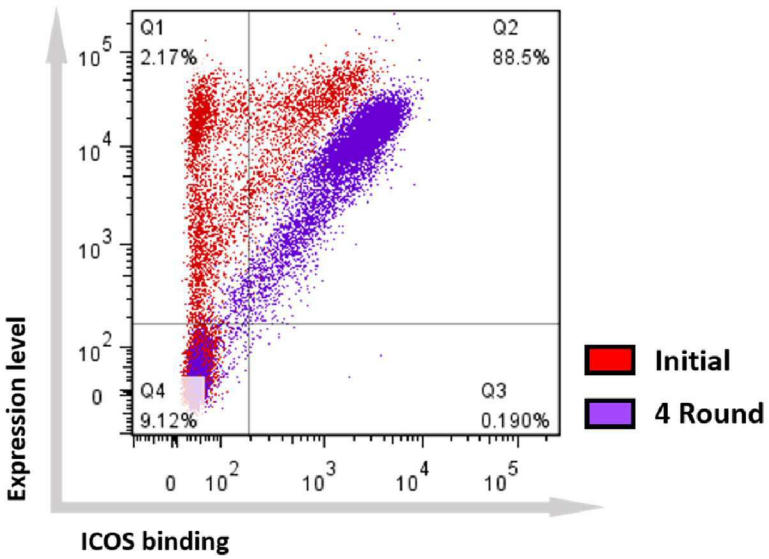
도면3


AWY101
PD-L1 WT
ICOS-L WT
ICOS-L A184
N-term Anchoring
C-term Anchoring
Q1
0.100%
Q2
0.090%
Q4
99.8%
Q3
0.010%
Expression level
ICOS binding
FLAG
ICOS-L
Aga2p
Aga1p

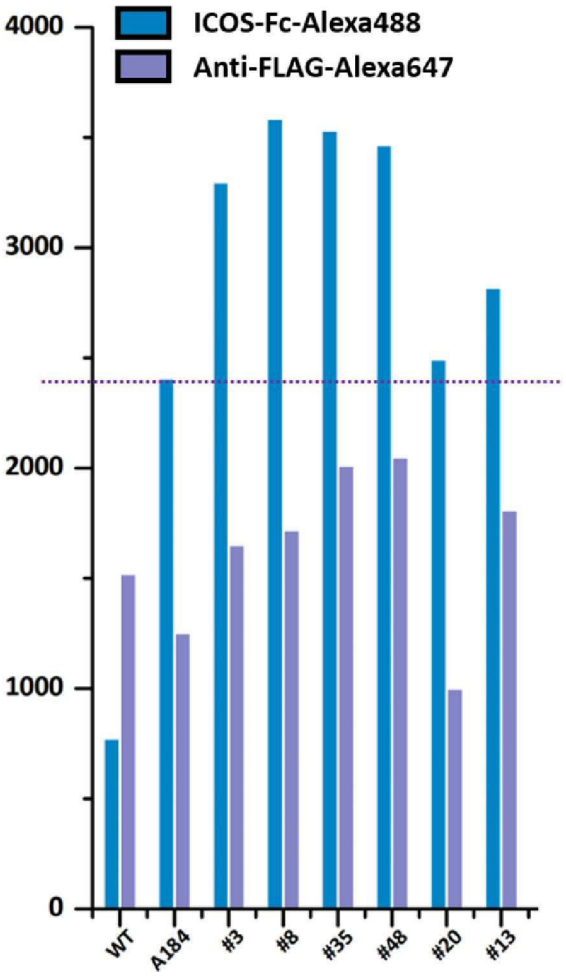
도면4



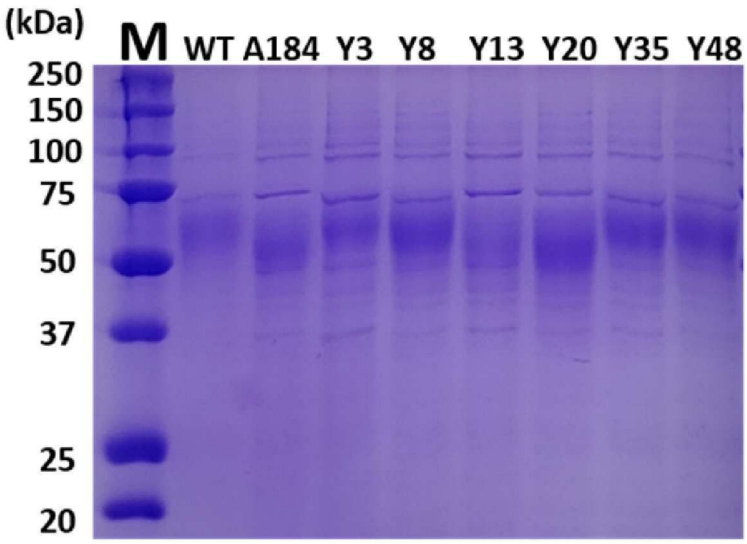
도면5


Q1
2.17%
Q2
88.5%
Q4
9.12%
Q3
0.190%
Expression level
ICOS binding
Initial
4 Round

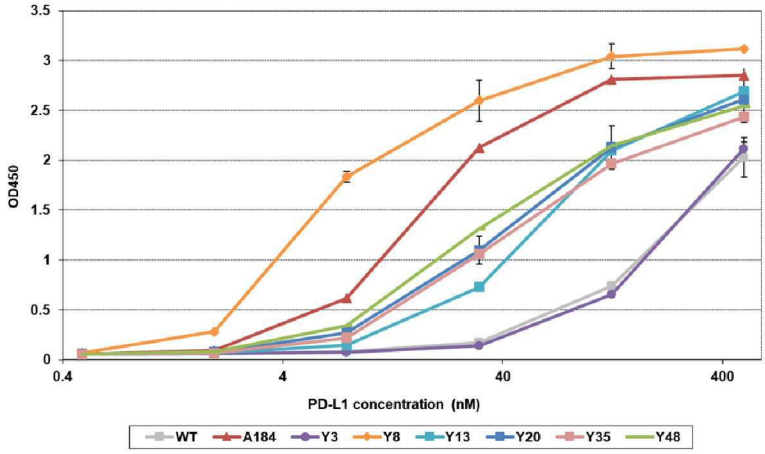
도면6


ICOS-Fc-Alexa488
Anti-FLAG-Alexa647
4000
3000
2000
1000
0
WT
A184
#3
#8
#35
#48
#20
#13

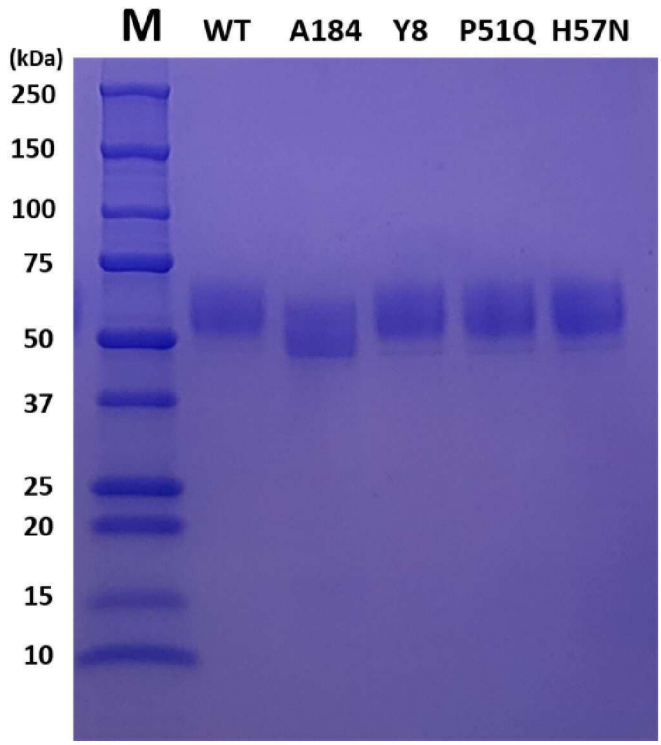
도면7


(kDa)
M
WT A184 Y3 Y8 Y13 Y20 Y35 Y48
250
150
100
75
50
37
25
20

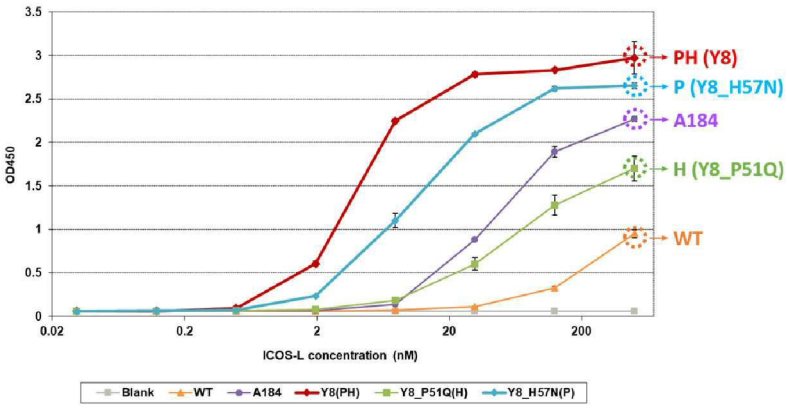
도면8


3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
OD450
0.4
4
40
400
PD-L1 concentration (nM)
WT
A184
Y3
Y8
Y13
Y20
Y35
Y48

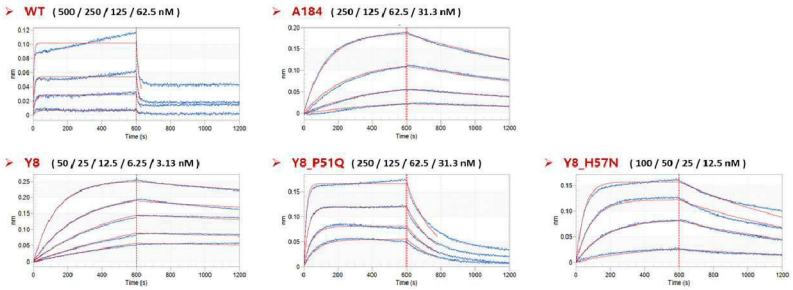
도면9


M
WT
A184
Y8
P51Q
H57N
(kDa)
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

도면10



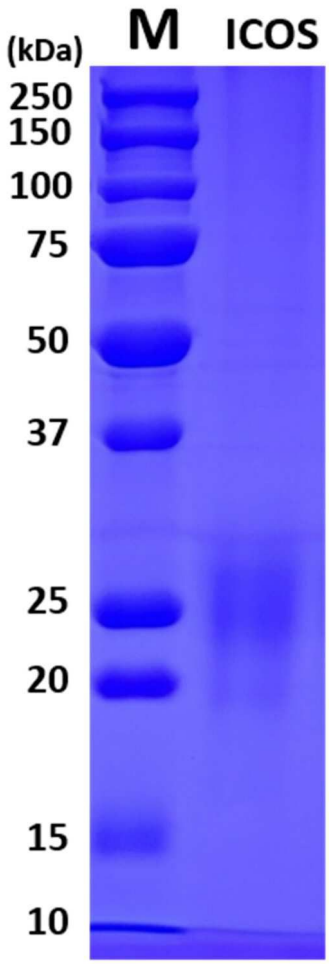
도면11



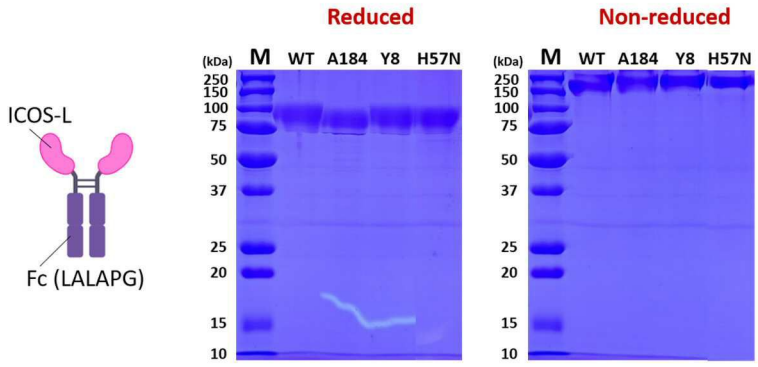
도면12

ICOS-L Variants	k_{on}	k_{off}	K_D	Fold Increase	Rank
WT	2.98×10^{5}	3.37×10^{-2}	**1.13×10^{-7}**	1	5
A184	2.80×10^{4}	6.45×10^{-4}	**2.31×10^{-8}**	4.89	3
Y8	1.50×10^{5}	1.79×10^{-4}	**1.19×10^{-9}**	94.96	1
P51Q	2.44×10^{5}	5.67×10^{-3}	**2.33×10^{-8}**	4.85	4
H57N	2.02×10^{5}	9.61×10^{-4}	**4.75×10^{-9}**	23.79	2

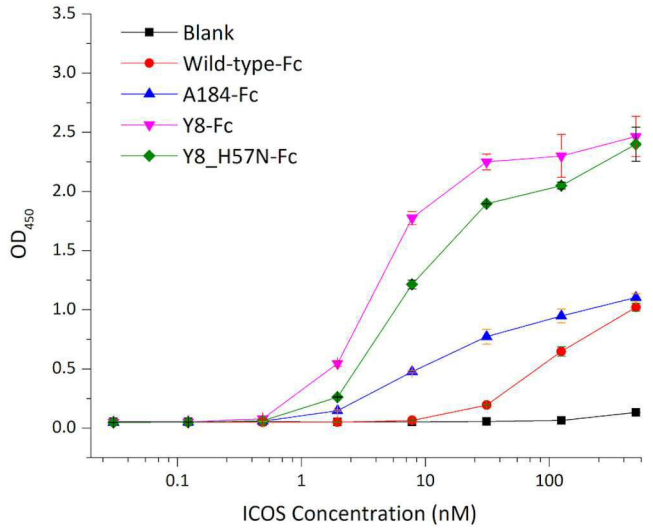
도면13


(kDa)
M
ICOS
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

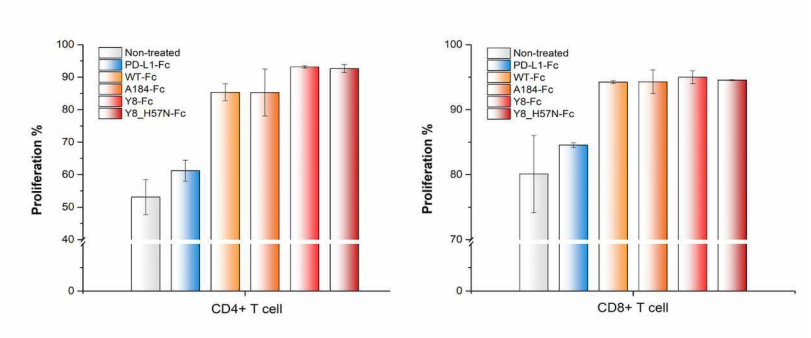
도면14


ICOS-L
Fc (LALAPG)
Reduced
Non-reduced
(kDa)
M
WT
A184
Y8
H57N
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

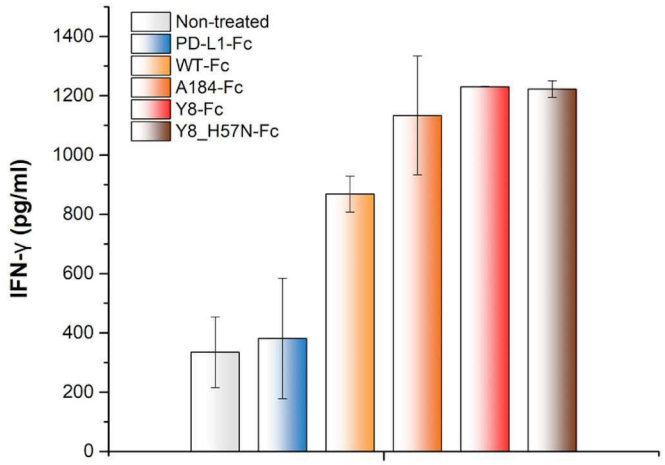
도면15



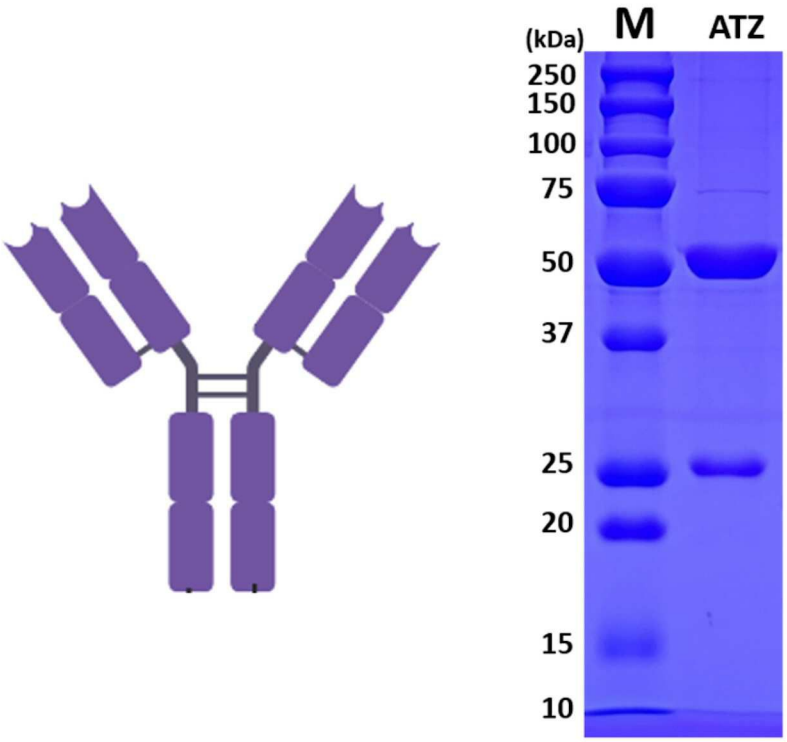
도면16



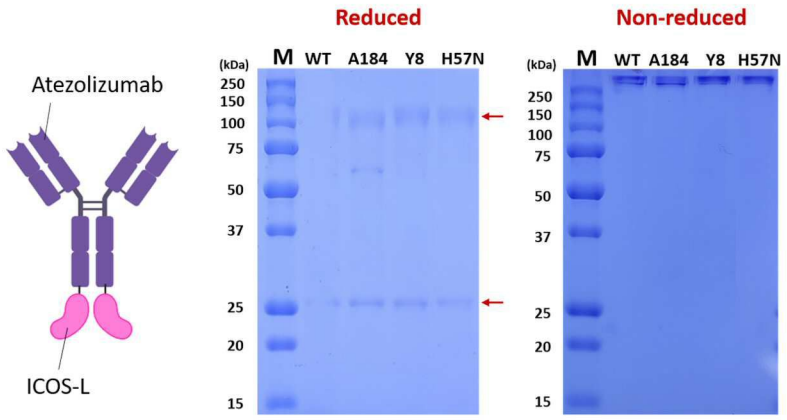
도면17



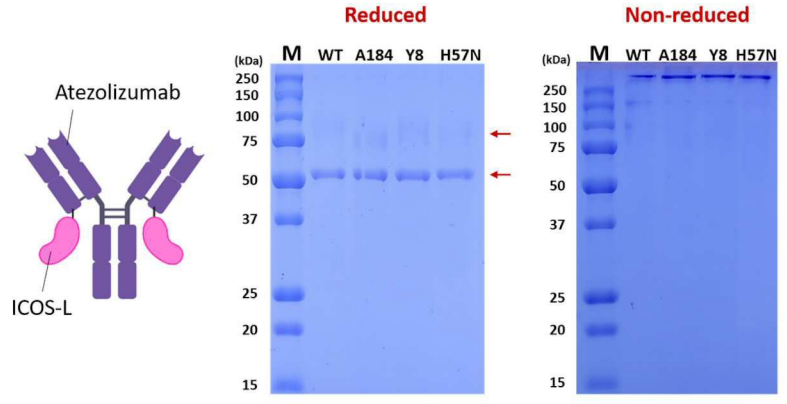
도면18



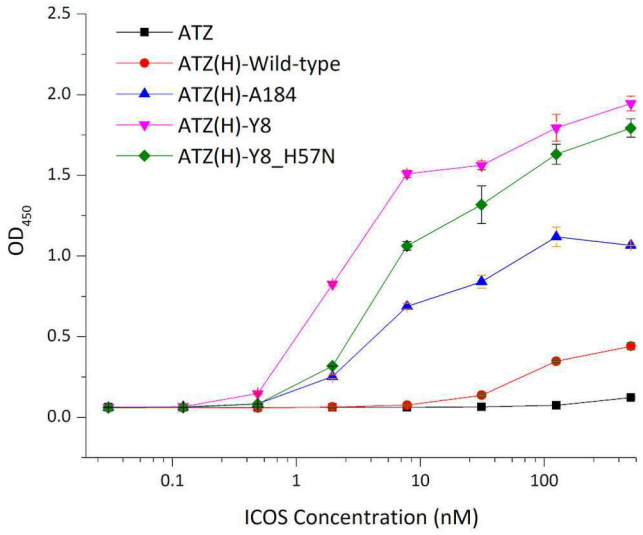
도면19



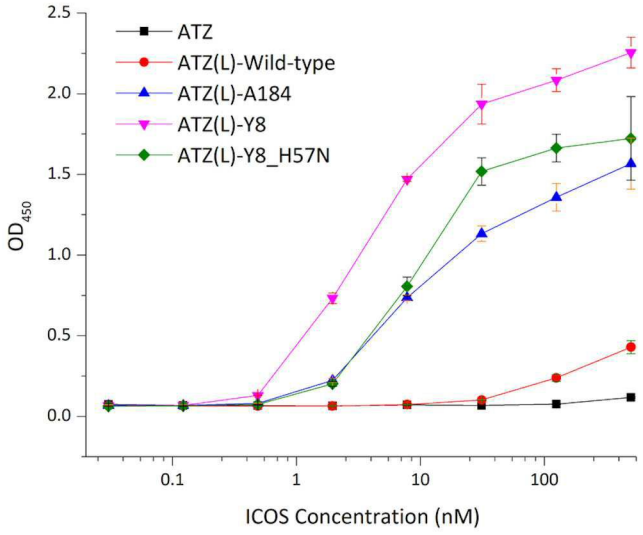
도면20



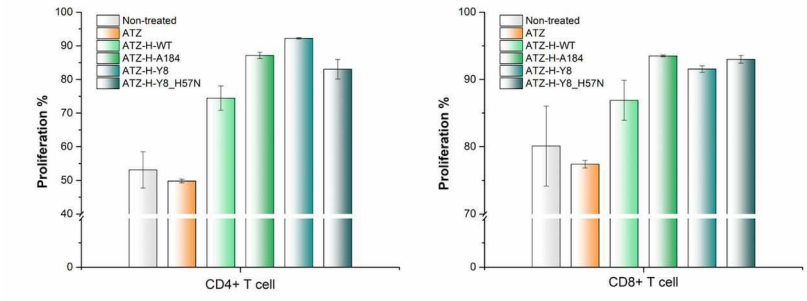
도면21



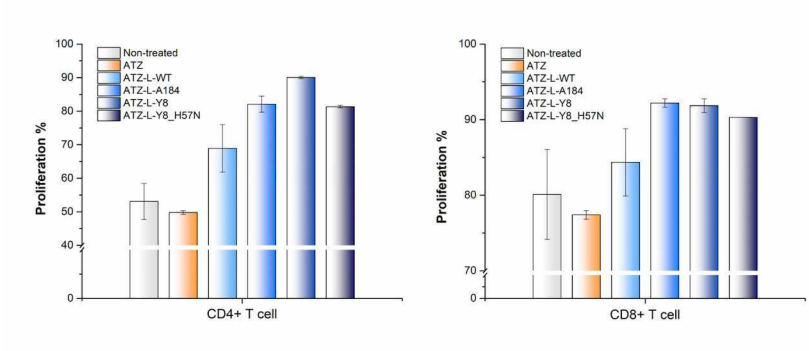
도면22



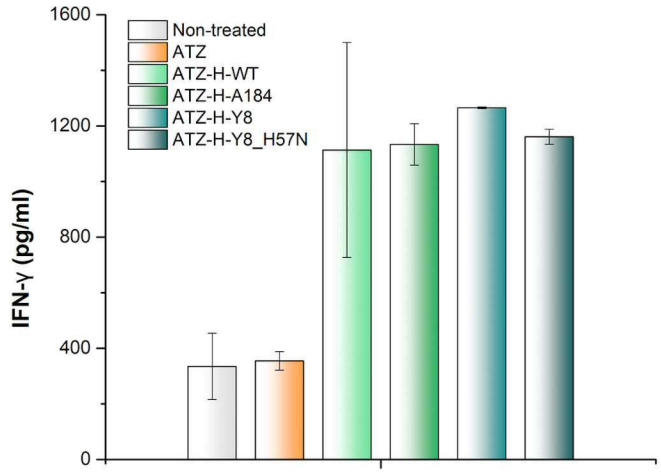
도면23



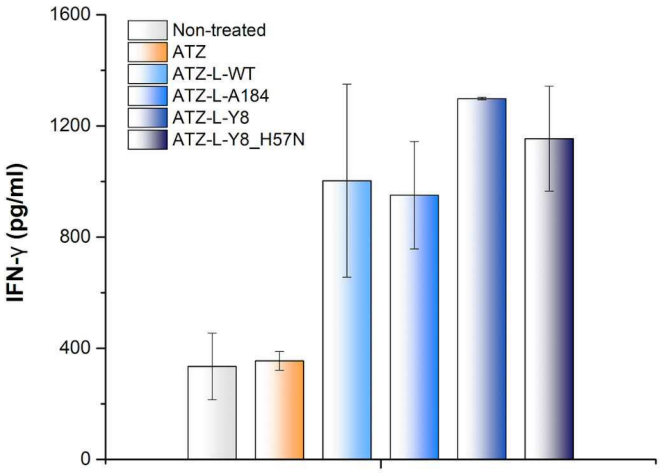
도면24



도면25



도면26



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.