



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0082364
(43) 공개일자 2024년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/55 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2818 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7013147
(22) 출원일자(국제) 2022년09월21일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년04월19일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2022/120265
(87) 국제공개번호 WO 2023/045977
국제공개일자 2023년03월30일
(30) 우선권주장
202111110032.3 2021년09월22일 중국(CN)

(71) 출원인
포트비타 바이오로직스 (싱가포르) 퍼티이. 리미
티드
싱가포르, 넘버29-11 사우스 비치 타워, 38 비치
로드
(72) 발명자
허 카이지에
중국, 지양수 215123, 쑤저우, 쑤저우 인더스트리
얼 파크, 168 동펑 스트리트
푸 췁젠
중국, 지양수 215123, 쑤저우, 쑤저우 인더스트리
얼 파크, 168 동펑 스트리트
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

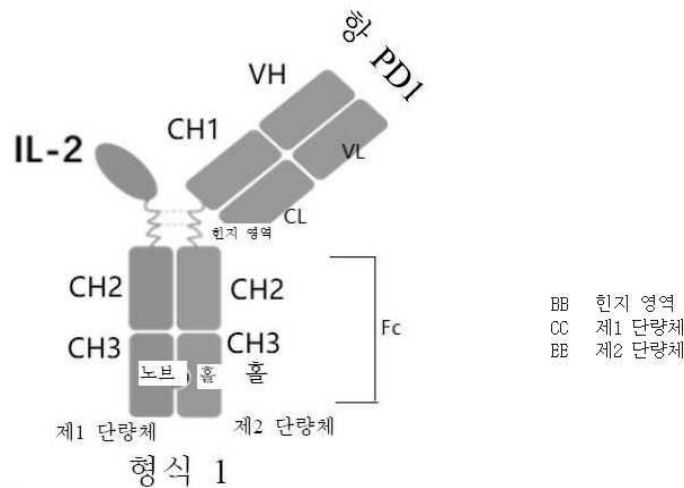
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 인터루킨-2 돌연변이 및 이의 융합 단백질

(57) 요약

신규 인터루킨-2(IL-2) 변이 단백질 및 이의 용도가 개시된다. 야생형 IL-2에 비해, IL-2 돌연변이 단백질은 개
선된 IL-2 수용체 결합 특성 및 개선된 약물 기량성과 같은 개선된 특성을 갖는다. 상기 IL-2 돌연변이 단백질을
포함하는 융합 단백질, 이량체 및 면역접합체, 상기 IL-2 돌연변이 단백질, 상기 이량체 및 상기 면역접합체를
코딩하는 핵산, 및 상기 핵산을 포함하는 벡터 및 숙주 세포가 또한 제공된다. 상기 IL-2 돌연변이 단백질, 상기
융합 단백질, 상기 이량체 및 상기 면역접합체, 이를 함유하는 약제학적 조성물을 제조하기 위한 방법 및 이의
치료적 용도가 추가로 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/55 (2013.01)

C07K 2319/30 (2013.01)

(72) 발명자

우 웨이웨이

중국, 지양수 215123, 쑤저우, 쑤저우 인터스트리얼 파크, 168 동펑 스트리트

조우 슈아이시앙

중국, 지양수 215123, 쑤저우, 쑤저우 인터스트리얼 파크, 168 동펑 스트리트

구안 지안

중국, 지양수 215123, 쑤저우, 쑤저우 인터스트리얼 파크, 168 동펑 스트리트

명세서

청구범위

청구항 1

면역접합체로서, (i) PD-1에 결합하는 항체 및 (ii) IL-2 돌연변이 단백질을 포함하며, 상기 돌연변이 단백질은, 야생형 IL-2(바람직하게는 인간 IL-2, 보다 바람직하게는 서열 번호: 3에 제시된 서열을 포함하는 IL-2)에 비해, 돌연변이:

(i) IL-2와 IL-2R α 의 결합 계면에서, 특히 위치 35 및/또는 42에서 IL-2R α 수용체에 대한 결합 친화성을 제거하거나 감소시키는 돌연변이;

및/또는

(ii) IL-2와 IL-2R β γ 의 결합 계면에서, 특히 위치 88, 127 및/또는 130으로부터 선택되는 적어도 하나의 위치에서 IL-2R β γ 수용체에 대한 결합을 약화시키는 돌연변이;

및

(iii) 단축된 B'C' 루프 영역(즉, 아미노산 잔기 aa72 및 aa84를 연결하는 서열)을 포함하며, 여기서 바람직하게는, 상기 단축된 루프 영역은 10, 9, 8, 7, 6 또는 5개 미만의 아미노산 길이를 가지며, 보다 바람직하게는 7개 아미노산 길이를 가지며; 바람직하게는, 상기 단축된 B'C' 루프 영역은 개선된 단백질 발현 수율 및/또는 순도를 초래하고;

상기 아미노산 위치는 서열 번호: 3에 따라 넘버링되는, 면역접합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 야생형 IL-2에 비해, 상기 돌연변이 단백질은:

(i) N88R + S130R;

N88D;

N88R;

F42A + N88R + S127E; 또는

K35E + N88R + S127E; 및

(ii) B'C' 루프 영역 서열 AGDASIH 또는 AQSKNFH;

및 선택적으로 (iii) T3A를 포함하는, 면역접합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 IL-2 돌연변이 단백질은 서열 번호: 4, 23, 25, 27, 29 또는 31에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 면역접합체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역접합체는:

Fc 단편에 융합되는 IL-2 돌연변이 단백질을 포함하는 제1 단량체; 및

PD-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편을 포함하는 제2 단량체를 포함하며, 여기서 바람직하게는, 상기 단편은 상기 항 PD-1 항체의 중쇄 1개 및 경쇄 1개를 포함하는, 면역접합체.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 제1 단량체에 있는 상기 Fc 단편은 노브 돌연변이를 포함하며 상기 제2 단량체에 있는 상기 항체 중쇄는 홀 돌연변이를 포함하거나; 또는 상기 제1 단량체에 있는 상기 Fc 단편은 홀 돌연변이를 포함하며 상기 제2 단량체에 있는 상기 항체 중쇄는 노브 돌연변이를 포함하는, 면역접합체.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 제1 단량체에 있는 상기 Fc 단편은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 Fc 단편이며, 바람직하게는 서열 번호: 6, 42 또는 43에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 면역접합체.

청구항 7

제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 단편에 융합되는 상기 IL-2 돌연변이 단백질은 서열 번호: 7, 24, 26, 28, 30 또는 32에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 면역접합체.

청구항 8

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄를 포함하며, 상기 중쇄 가변 영역은 각각 서열 번호: 9, 10 및 11의 아미노산 서열에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는, 면역접합체.

청구항 9

제4항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하며, 상기 경쇄 가변 영역은 각각 서열 번호: 16, 17 및 18의 아미노산 서열에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는, 면역접합체.

청구항 10

제4항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:

서열 번호: 8에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 영역; 및

서열 번호: 15에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 면역접합체.

청구항 11

제4항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:

서열 번호: 14 또는 22에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄; 및

서열 번호: 20에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄를 포함하는, 면역접합체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2 돌연변이 단백질은 링커를 통하여 Fc에 연결되거나, 또는 상기 IL-2 돌연변이 단백질은 링커를 통하여 상기 항 PD-1 항체에 연결되며, 바람직하게는 상기 링커는 (GGGS)_n으로부터 선택되며, 여기서 n은 1, 2, 3 또는 4이며, 예를 들어, 상기 링커는 서열 번호: 5에 제시되는, 면역접합체.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 면역접합체에 있는 하나 이상의 사슬, 또는 상기 제1 단량체 및/또는 상기 제2 단량체를 코딩하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 14

제13항에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 발현 벡터.

청구항 15

숙주 세포로서, 제13항에 따른 폴리뉴클레오티드 또는 제14항에 따른 벡터를 포함하며, 여기서 바람직하게는, 상기 숙주 세포는 효모 세포 또는 포유동물 세포, 특히 HEK293 세포 또는 CHO 세포인, 숙주 세포.

청구항 16

상기 면역접합체의 발현에 적합한 조건 하에서 제15항에 따른 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 면역접합체를 생성하기 위한 방법.

청구항 17

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 면역접합체 및 선택적으로 약제학적 보충 물질을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 18

암을 예방 및/또는 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서, 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 면역접합체 또는 제17항에 따른 약제학적 조성물의 용도로서, 여기서 바람직하게는, 상기 암은 고형 종양 또는 혈액 종양, 예를 들어, 결장직장암 또는 결장암과 같은 위장 종양 또는 흑색종이며; 예를 들어, 상기 암은 PD-1 항체 치료 저항성 암인, 용도.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 제2 치료제를 추가로 포함하는, 용도.

청구항 20

대상체의 암을 치료 및/또는 예방하기 위한 방법으로서, 상기 대상체에게 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 면역접합체 또는 제17항에 따른 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 바람직하게는, 상기 암은 고형 종양 또는 혈액 종양, 예를 들어, 결장직장암 또는 결장암과 같은 위장 종양 또는 흑색종이며; 예를 들어, 상기 암은 PD-1 항체 치료 저항성 암인, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질, 상기 융합 단백질 또는 상기 약제학적 조성물이 제2 치료제와 함께 조합 요법으로 투여되는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규 인터루킨-2(IL-2) 돌연변이 단백질 및 이의 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 야생형 IL-2에 비해 IL-2 수용체에 대한 개선된 결합성 및 개선된 약물 기량성과 같은 개선된 특성을 갖는 IL-2 돌연변이 단백질에 관한 것이다. 본 발명은 IL-2 돌연변이 단백질을 포함하는 융합 단백질, 이량체 및 면역접합체, 상기 IL-2 돌연변이 단백질, 이량체 및 면역접합체를 코딩하는 핵산, 및 상기 핵산을 포함하는 벡터 및 숙주 세포를 추가로 제공한다. 더 구체적으로, 본 발명은 IL-2 돌연변이 단백질 및 항 PD-1 항체를 포함하는 면역접합체를 제공한다. 본 발명은 IL-2 돌연변이 단백질, 융합 단백질, 이량체 및 면역접합체, 이를 포함하는 약제학적 조성물을 제조하기 위한 방법, 및 치료적 용도를 추가로 제공한다.

배경 기술

[0002] T-세포 성장 인자(TCGF)로도 알려진 인터루킨-2(IL-2)는 주로 활성화된 T 세포, 특히 CD4⁺T 보조 세포에 의해 생성되는 다기능 사이토카인이다. 진핵 세포에서 인간 IL-2(uniprot: P60568)는 153개 아미노산으로 이루어진 전구체 폴리펩티드로 합성되며, 20개의 N-말단 아미노산이 제거되면 성숙한 분비성 IL-2가 생성된다. 다른 종의

IL-2 서열에 대해서도 개시된 바 있었다. NCBI 참조 서열 번호 NP032392(마우스), NP446288(랫트) 또는 NP517425(침팬지)를 참조한다.

[0003] 인터루킨-2는 4개의 역평행 및 양친매성 α 나선을 가지며, 이는 기능에 필수적인 4차 구조를 형성한다(문헌 [Smith, *Science* 240,1169-76 (1988)]; 문헌[Bazan, *Science* 257,410-413 (1992)]). 대부분의 경우 IL-2는 인터루킨-2 수용체 α (IL-2R α ; CD25), 인터루킨-2 수용체 β (IL-2R β ; CD122), 인터루킨-2 수용체 γ (IL-2R γ ; CD132)의 세 가지 상이한 수용체를 통해 작용한다. IL-2R β 및 IL-2R γ 는 IL-2 신호전달에 중요한 반면, IL-2R α (CD25)는 신호전달에 필수적이지는 않지만 IL-2가 높은 친화성으로 수용체에 결합할 수 있도록 한다(문헌 [Krieg 등, *Proc Natl Acad Sci* 107,11906-11 (2010)]). IL-2R α , IL-2R β 및 IL-2R γ 의 조합에 의해 형성된 삼량체 수용체(IL-2R $\alpha\beta\gamma$)는 IL-2 고친화성 수용체이고(약 10pM의 K_D 를 가짐), IL-2R β 및 IL-2R γ 로 구성된 이량체 수용체(IL-2R $\beta\gamma$)는 중간 친화성 수용체이며(약 1nM의 K_D 를 가짐), 오직 서브유닛 α 에 의해 형성된 IL-2 수용체는 낮은 친화성 수용체이다.

[0004] 면역 세포는 이량체 또는 삼량체 IL-2 수용체를 발현한다. 이량체 수용체는 세포독성 CD8⁺ T 세포 및 자연 살해 세포(NK)에서 발현되는 반면, 삼량체 수용체는 활성화된 림프구 및 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ 억제 조절 T 세포(Treg)에서 주로 발현된다(문헌[Byman, O. 및 Sprent, J. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 180-190 (2012)]). 휴지 상태의 이펙터 T 세포와 NK 세포는 세포 표면에 CD25가 없기 때문에 IL-2에 상대적으로 둔감하다. 그러나 Treg 세포는 체내에서 최고 수준의 CD25를 일관되게 발현하므로 일반적으로 IL-2는 Treg 세포 증식을 우선적으로 자극한다.

[0005] IL-2는 상이한 세포의 IL-2 수용체에 결합함으로써 면역 반응에서 여러 작용을 매개하게 된다. 한 측면에서, IL-2는 T 세포 및 자연 살해(NK) 세포의 증식 및 분화를 자극하는 면역계에 대한 자극 효과를 갖는다. 따라서 IL-2는 암 및 만성 바이러스 감염의 치료를 위한 면역 치료제로 승인 받았다. 또 다른 측면에서, IL-2는 또한 면역억제성 CD4⁺ CD25⁺ 조절 T 세포(즉, Treg 세포)(문헌[Fontenot 등, *Nature Immunol* 6, 1142-51 (2005)]; 문헌[D'Cruz 및 Klein, *Nature Immunol* 6, 1152-59 (2005)]; 문헌[Maloy 및 Powrie, *Nature Immunol* 6, 1171-72 (2005)])의 유지에 기여하여 환자에서 활성화된 Treg 세포에 기인한 면역억제를 유발한다.

[0006] 또한, 수년간의 임상 실습 경험에서 고용량의 IL-2가 흑색종 및 신장암과 같은 암 치료에 있어서 현전한 임상 효과를 제공할 수 있지만 혈관 누출 증후군 및 저혈압과 같은 심혈관 독성을 포함하는 약물 관련 심각한 독성 부작용을 일으킬 수도 있음을 발견하였다. 연구에 따르면 이러한 독성은 염증 인자의 방출을 자극하는 IL-2에 의한 림프구(특히 T 세포 및 NK 세포)의 과활성화로 인해 발생할 가능성이 가장 높다. 예를 들어, 이것은 혈관 내피 세포를 수축시켜 세포 간 간격을 증가시키고 조직액의 유출을 유발하여, 이에 혈관 누출 부작용을 일으킬 수 있다.

[0007] IL-2의 임상적 사용의 또 다른 제한적 문제는 매우 짧은 반감기로 인해 약물 투여가 어렵다는 점이다. IL-2 분자의 무게는 15KDa에 불과하기 때문에 주로 사구체 여과에 의해 제거되며 인체에서 반감기가 약 1시간에 불과하다. 인체에 충분히 높은 노출을 달성하기 위해서는 임상적으로 8시간마다 많은 양의 IL-2를 주입해야 한다. 그러나 빈번한 투여는 환자에게 큰 부담을 주고, 더 중요한 것은 대량의 IL-2를 주입하면 최고 혈장 농도(C_{max})를 높게 유발할 수 있으며, 이는 약물 독성에 기여하는 또 다른 중요한 요인이 될 가능성 있다.

[0008] IL-2 면역요법과 관련된 이러한 문제를 극복하기 위해 여러 접근법이 채택되었다. 예를 들어, IL-2와 특정 항 IL-2 모노클로날 항체의 조합은 체내에서 IL-2의 치료 효과를 향상시키는 것으로 발견하였다(문헌[Kamimura 등, *J. Immunol.*, 177, 306-14 (2006)]; 문헌[Boyman 등, *Science*, 311, 1924-27 (2006)]). IL-2 분자를 조작하기 위한 일부 방식도 제안되었다. 예를 들어, Helen R. Mott 등은 IL-2R α 에 결합하는 능력이 제거된 인간 IL-2, F42A의 돌연변이 단백질을 개시했다. Rodrigo Vazquez-Lombardi 등 (문헌[*Nature Communications*, 8:15373, DOI: 10.1038/ncomms15373])은 또한 각각 아미노산 잔기 위치 38, 43 및 61에 잔기 돌연변이 R38D + K43E + E61R을 갖는 IL-2R α 에 결합하는 능력이 제거된 삼중 돌연변이 인간 IL-2 돌연변이 단백질 IL-2^{3X}를 제안하였다. CN1309705A는 IL-2와 IL-2R $\beta\gamma$ 의 결합이 감소되게 하는 위치 D20, N88 및 Q126에서의 돌연변이를 개시한다. 이러한 돌연변이 단백질은 여전히 약동학적 및/또는 약력학적 특성이 결핍되어 있으며 또한 포유동물 세포에서 발현될 때 낮은 발현 수율 및/또는 불량한 분자 안정성에 직면하고 있다.

[0009] 세포예정사 단백질 1(PD-1 또는 CD279)은 CD28 수용체 패밀리의 억제 구성원이며 이는 CD28, CTLA-4, ICOS 및 BTLA를 추가로 포함한다. PD-1은 세포 표면 수용체이며 활성화된 B 세포, T 세포 및 골수 세포에서 발현된다. PD-1은 구조적으로 면역글로불린 가변형 세포의 도메인과 면역수용체 티로신 기반 억제 모티프(ITIM) 및 면역수

용체 티로신 기반 스위치 모티프(ITSM)를 포함하는 세포질 도메인으로 구성되는 단량체 유형 1 막관통 단백질이다. PD-1에 대한 두 가지 리간드인 PD-L1 및 PD-L2가 확인되었으며, 이들은 PD-1에 결합한 후 T 세포의 활성화를 하향 조절하는 것으로 나타났다. PD-L1 및 PD-L2는 둘 모두 PD-1에 결합하나 CD28 패밀리의 다른 구성원에는 결합하지 않는 B7 상동체이다. PD-1에 대한 하나의 리간드인 PD-L1은 다양한 인간 암에서 풍부하다. PD-1과 PD-L1 사이의 상호작용은 중앙 침윤 림프구의 감소, T 세포 수용체 매개 증식의 감소 및 암성 세포의 면역 회피를 초래한다.

[0010] PD-1에 결합하는 다양한 항체는 W02017024465A1에서 개시되는 PD-1 항체와 같이 당업계에서 알려져 있다.

[0011] 따라서, 개선된 특성(예를 들어, 수용체에 대한 감소된 결합, 개선된 약물 기량성 등)을 갖는 신규 IL-2 분자, 특히 PD-1 항체를 갖는 면역접합체를 추가로 개발할 필요성이 당업계에서 존재한다.

발명의 내용

[0012] 본 발명은 다음 실시양태에 관한 것이다:

[0013] 1. 면역접합체로서, (i) PD-1에 결합하는 항체 및 (ii) IL-2 돌연변이 단백질을 포함하며, 상기 돌연변이 단백질은, 야생형 IL-2(바람직하게는 인간 IL-2, 보다 바람직하게는 서열 번호: 3에 제시된 서열을 포함하는 IL-2)에 비해, 돌연변이:

[0014] (i) IL-2와 IL-2R α 의 결합 계면에서, 특히 위치 35 및/또는 42에서 IL-2R α 수용체에 대한 결합 친화성을 제거하거나 감소시키는 돌연변이;

[0015] 및/또는

[0016] (ii) IL-2와 IL-2R β γ 의 결합 계면에서, 특히 위치 88, 127 및/또는 130으로부터 선택되는 적어도 하나의 위치에서 IL-2R β γ 수용체에 대한 결합을 약화시키는 돌연변이;

[0017] 및

[0018] (iii) 단축된 B'C' 루프 영역(즉, 아미노산 잔기 aa72 및 aa84를 연결하는 서열), 여기서 바람직하게는, 상기 단축된 루프 영역은 10, 9, 8, 7, 6 또는 5개 미만의 아미노산 길이를 가지며, 보다 바람직하게는 7개 아미노산 길이를 가지며; 바람직하게는, 상기 단축된 B'C' 루프 영역은 개선된 단백질 발현 수율 및/또는 순도를 초래하고; 및

[0019] 선택적으로 (iv) IL2의 N-말단, 특히 IL-2의 N-말단의 위치 3에서 O-글리칸 변형을 제거하는 돌연변이를 포함하며,

[0020] 상기 아미노산 위치는 서열 번호: 3에 따라 넘버링되는, 면역접합체.

[0021] 2. 실시양태 1에 있어서, 상기 야생형 IL-2에 비해, 상기 돌연변이 단백질은:

[0022] (i) N88D;

[0023] N88R;

[0024] N88R + S130R;

[0025] F42A + N88R + S127E;

[0026] F42A + N88R + S127E; 또는

[0027] K35E + N88R + S127E;

[0028] 및

[0029] (ii) B'C' 루프 영역 서열 AGDASIH 또는 AQSKNFH;

[0030] 및 선택적으로 (iii) T3A를 포함하는, 면역접합체.

[0031] 3. 실시양태1에 있어서, 상기 IL-2 돌연변이 단백질은 서열 번호: 4, 23, 25, 27, 29 또는 31에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 면역접합체.

- [0032] 4. 실시양태 1 내지 실시양태 3 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 면역접합체는:
- [0033] Fc 단편에 융합되는 IL-2 돌연변이 단백질을 포함하는 제1 단량체; 및
- [0034] PD-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편을 포함하는 제2 단량체를 포함하며, 여기서 바람직하게는, 상기 단편은 상기 항 PD-1 항체의 중쇄 1개 및 경쇄 1개를 포함하는, 면역접합체.
- [0035] 5. 실시양태 4에 있어서, 상기 제1 단량체에 있는 상기 Fc 단편은 노브 돌연변이를 포함하며 상기 제2 단량체에 있는 상기 항체 중쇄는 홀 돌연변이를 포함하거나; 또는 상기 제1 단량체에 있는 상기 Fc 단편은 홀 돌연변이를 포함하며 상기 제2 단량체에 있는 상기 항체 중쇄는 노브 돌연변이를 포함하는, 면역접합체.
- [0036] 6. 실시양태 4 또는 실시양태 5에 있어서, 상기 제1 단량체에 있는 상기 Fc 단편은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 Fc 단편이며, 바람직하게는 서열 번호: 6, 42 또는 43에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 면역접합체.
- [0037] 7. 실시양태 4 내지 실시양태 6 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 Fc 단편에 융합되는 상기 IL-2 돌연변이 단백질은 서열 번호: 7, 24, 26, 28, 30 또는 32에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 면역접합체.
- [0038] 8. 실시양태 4 내지 실시양태 7 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄를 포함하며, 상기 중쇄 가변 영역은 각각 서열 번호: 9, 10 및 11의 아미노산 서열에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는, 면역접합체.
- [0039] 9. 실시양태 4 내지 실시양태 8 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하며, 상기 경쇄 가변 영역은 각각 서열 번호: 16, 17 및 18의 아미노산 서열에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는, 면역접합체.
- [0040] 10. 실시양태 4 내지 실시양태 9 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:
- [0041] 서열 번호: 8에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 영역; 및
- [0042] 서열 번호: 15에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 면역접합체.
- [0043] 11. 실시양태 4 내지 실시양태 9 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:
- [0044] 서열 번호: 14 또는 22에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄; 및
- [0045] 서열 번호: 20에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄를 포함하는, 면역접합체.
- [0046] 12. 실시양태 1 내지 실시양태 11 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 IL-2 돌연변이 단백질은 링커를 통하여 Fc에 연결되거나, 또는 상기 IL-2 돌연변이 단백질은 링커를 통하여 상기 항 PD-1 항체에 연결되며, 바람직하게는 상기 링커는 (GGGS)_n이며, 여기서 n은 1, 2, 3 또는 4이며, 예를 들어, 상기 링커는 서열 번호: 5에 제시되는, 면역접합체.
- [0047] 13. 단리된 폴리뉴클레오티드로서, 실시양태 1 내지 실시양태 12 중 어느 한 실시양태에 따른 면역접합체에 있는 하나 이상의 사슬, 또는 상기 제1 단량체 및/또는 상기 제2 단량체를 코딩하는, 단리된 폴리뉴클레오티드.
- [0048] 14. 실시양태 13에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 발현 벡터.
- [0049] 15. 숙주 세포로서, 실시양태 13에 따른 폴리뉴클레오티드 또는 실시양태 14에 따른 벡터를 포함하며, 여기서 바람직하게는, 상기 숙주 세포는 효모 세포 또는 포유동물 세포, 특히 HEK293 세포 또는 CHO 세포인, 숙주 세포.
- [0050] 16. 상기 면역접합체의 발현에 적합한 조건 하에서 실시양태 15에 따른 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는,

실시양태 1 내지 실시양태 12 중 어느 한 실시양태에 따른 면역접합체를 생성하기 위한 방법.

- [0051] 17. 실시양태 1 내지 실시양태 12 중 어느 한 실시양태에 따른 면역접합체 및 선택적으로 약제학적 보충 물질을 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0052] 18. 암을 예방 및/또는 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서, 실시양태 1 내지 실시양태 12 중 어느 한 실시양태에 따른 면역접합체 또는 실시양태 17에 따른 약제학적 조성물의 용도로서, 여기서 바람직하게는, 상기 암은 고형 종양 또는 혈액 종양, 예를 들어, 결장직장암 또는 결장암과 같은 위장 종양 또는 흑색종이며; 예를 들어, 상기 암은 PD-1 항체 치료 저항성 암인, 용도.
- [0053] 19. 실시양태 18에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 제2 치료제를 추가로 포함하는, 용도.
- [0054] 20. 대상체의 암을 치료 및/또는 예방하기 위한 방법으로서, 상기 대상체에게 실시양태 1 내지 실시양태 12 중 어느 한 실시양태에 따른 면역접합체 또는 실시양태 17에 따른 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 바람직하게는, 상기 암은 고형 종양 또는 혈액 종양, 예를 들어, 결장직장암 또는 결장암과 같은 위장 종양 또는 흑색종이며; 예를 들어, 상기 암은 PD-1 항체 치료 저항성 암인, 방법.
- [0055] 21. 실시양태 20에 있어서, 상기 돌연변이 단백질, 상기 융합 단백질 또는 상기 약제학적 조성물이 제2 치료제와 함께 조합 요법으로 투여되는, 방법.

도면의 간단한 설명

- [0056] 도 1A는 본 발명의 항 PD-1 및 IL-2 돌연변이의 면역접합체의 분자 구조를 나타내며, 도 1B는 분자 2124 및 3010의 IL-2-Fc 융합 단백질의 분자 구조를 나타낸다.
- 도 2는 수용체(PDB: 2ERJ)에 결합하는 IL-2의 결정 구조를 나타낸다.
- 도 3은 IL-2R β γ 에 대한 면역접합체 및 대조 분자의 결합 곡선을 나타낸다.
- 도 4는 IL-2R α 에 대한 면역접합체 또는 대조 분자의 결합 곡선을 나타낸다.
- 도 5는 인간 PD1에 대한 면역접합체 또는 대조 분자의 결합 곡선을 나타낸다.
- 도 6은 CTLL2WT(huPD1-) 및 CTLL2-hPD-1(huPD1+)에서 면역접합체 또는 대조 분자의 활성 분석을 나타낸다.
- 도 7은 PD-1- 및 PD-1+의 T 세포 집단(CD4 또는 CD8)에서 면역접합체 또는 대조 분자의 활성을 개별적으로 나타낸다.
- 도 8은 HEK-Blue™ IL-2 세포(huPD-1- 세포) 및 PD-1 과발현 세포(HEK293 + hIL2R + hPD-1/SEAP가 안정적으로 형질감염된 세포주(huPD-1+ 세포))에서 면역접합체의 활성을 개별적으로 나타낸다.
- 도 9A는 마우스에서의 2132 및 2063의 항종양 효능을 나타내며; 도 9B는 마우스 체중에 대한 2132 및 2063의 효과를 나타낸다.
- 도 10A는 마우스 MC38 종양에서의 2063의 항종양 효능을 나타내며; 도 10B는 마우스 체중에 대한 2063의 효과를 나타낸다.
- 도 11A는 마우스 B16F10 종양에서의 2063의 항종양 효능을 나타내고; 도 11B는 마우스 B16F10 종양에서의 2063의 항종양 효능을 나타내며, 즉, 개별 종양 값을 나타내며; 도 11C는 마우스 체중에 대한 2063의 효과를 나타낸다.
- 도 12A는 마우스 MC38 종양에서의 2149의 항종양 효능을 나타내고; 도 12B는 마우스 MC38 종양에서의 2149의 항종양 효능을 나타내며, 즉, 생존 곡선을 나타내며; 도 12C는 마우스 체중에 대한 2149의 효과를 나타낸다.
- 도 13A는 마우스 B16F10 종양에서의 2149의 항종양 효능을 나타내고; 도 13B는 마우스 B16F10 종양에서의 2149의 항종양 효능을 나타내며, 즉, 개별 종양 값을 나타내며; 도 13C는 마우스 B16F10 종양에서의 2149의 항종양 효능을 나타내며, 즉, 생존 곡선을 나타내고; 도 13D는 마우스 체중에 대한 2149의 효과를 나타낸다.
- 도 14A는 마우스 B16F10 종양에서의 2061 및 2149의 항종양 효능을 나타내며, 즉, 개별 종양 값을 나타내고, 도 14B는 마우스 B16F10 종양에서의 2061 및 2149의 항종양 효능을 나타내며, 즉, 생존 곡선을 나타내며; 도 14C는 마우스 체중에 대한 2061 및 2149의 효과를 나타낸다.
- 도 15A는 마우스에서의 2214의 항종양 효능을 나타내고; 도 15B는 마우스에서의 2214의 항종양 효능을

나타내며, 즉, 생존 곡선을 나타내며; 도 15C는 마우스 체중에 대한 2214의 효과를 나타낸다.

도 16A는 마우스 B16F10 종양에서의 2214의 항종양 효능을 나타내며, 즉, 생존 곡선을 나타내고; 도 16B는 마우스 B16F10 종양에서의 2214의 항종양 효능을 나타내며, 즉, 생존 곡선을 나타내며; 도 16C는 마우스 체중에 대한 2214의 효과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 정의

본 발명을 아래에서 상세히 설명하기에 앞서, 본 발명은 본원에 기재된 특정 방법, 프로토콜 및 시약에 제한되지 않으며, 이는 달라질 수 있음을 이해하여야 한다. 또한, 본원에서 사용되는 용어는 단지 특정 실시양태를 설명하기 위한 것이며 본 발명의 범위를 제한하지 않는 것으로, 첨부되는 청구범위만이 본 발명의 범위를 제한할 것이다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 당업자가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 가진다.

본 명세서를 설명하기 위해 다음 정의가 사용될 것이고, 적절한 경우 단수형으로 사용된 용어는 또한 복수형을 포함할 수 있으며, 이의 반대도 마찬가지이다. 본원에서 사용되는 용어는 특정 실시양태를 설명하기 위한 것이며, 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것이 아니다.

수치와 조합하여 사용되는 용어 "약"은 명시된 수치 미만의 하한 5% 내지 명시된 수치 초과 상한 5% 범위의 수치를 망라하는 것으로 의도된다.

본원에 사용된 바와 같이, 용어 "및/또는"은 옵션 중 임의의 하나 또는 옵션 중 임의의 두 개 이상을 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같이, 용어 "포함하다(comprise/include)"는 요소, 정수 또는 단계를 포함하나 임의의 다른 요소, 정수 또는 단계를 배제하지 않음을 의미하는 것으로 의도된다. 본원에 사용된 용어 "포함하다(comprise/include)"는 별도로 정의하지 않는 한, 기재된 요소, 정수 또는 단계가 전체를 구성하는 상황을 또한 망라한다. 예를 들어, 돌연변이 또는 돌연변이의 조합을 "포함하는(comprising/including)" IL-2 돌연변이 단백질이 언급될 때, 이는 돌연변이 또는 돌연변이의 조합만을 갖는 IL-2 돌연변이 단백질 또한 망라하는 것으로 의도된다.

본원에 사용된 바와 같이, 야생형 "인터루킨-2" 또는 "IL-2"는 모 IL-2 단백질, 바람직하게는 자연 발생 IL-2 단백질, 예를 들어 인간, 마우스, 래트 또는 인간이 아닌 영장류로부터 유래된 천연 IL-2 단백질을 지칭하며, 본원에 개시된 돌연변이 또는 돌연변이의 조합이 도입된 템플릿으로써 작용하고, 처리되지 않은 형태(예를 들어, 신호 펩티드가 제거되지 않음) 및 처리된 형태(예를 들어, 신호 펩티드가 제거됨) 둘 모두를 포함한다. 신호 펩티드를 포함하는 전체 길이 천연 인간 IL-2 서열은 서열 번호: 1에 제시되며, 이의 성숙 단백질의 서열은 서열 번호: 2에 제시된다. 또한, 이 용어는 IL-2의 자연 발생한 대립 유전자 변이체와 스플라이스 변이체, 이소타입, 상동체 및 종 상동체를 포함한다. 이 용어는 또한 천연 IL-2의 변이체를 포함하며, 이는 예를 들어 천연 IL-2와 적어도 95%-99% 또는 그 이상의 동일성을 갖거나 1~10개 또는 1~5개 이하의 아미노산 돌연변이를 가질 수 있고(예를 들어, 보존적 치환) 바람직하게는 천연 IL-2 단백질과 실질적으로 동일한 IL-2R α 및/또는 IL-2R β γ 에 대한 결합 친화성을 가질 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 천연 IL-2 단백질에 비해, 야생형 IL-2 단백질은 IL-2 수용체에 대한 이의 결합에 영향을 미치지 않는 아미노산 돌연변이를 포함할 수 있다. 예를 들어, 위치 125에 도입된 돌연변이 C125S를 갖는 천연 인간 IL-2 단백질(uniprot: P60568)은 본원에 개시된 야생형 IL-2 단백질이다. C125S 돌연변이를 포함하는 야생형 인간 IL-2 단백질의 예는 서열 번호: 3에 제시된다. 일부 실시양태에서, 야생형 IL-2 서열은 서열 번호: 1, 2 또는 3에 제시된 아미노산 서열과 적어도 85% 또는 95% 초과, 또는 심지어 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%의 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다.

본원에 사용된 바와 같이, 아미노산 돌연변이는 아미노산 치환, 결실, 삽입 및 첨가일 수 있다. 치환, 결실, 삽입 및 첨가의 임의의 조합은 IL-2R α 에 대한 감소된 결합 친화성 및/또는 개선된 약물 기량성 및/또는 약화된 IL-2R β γ 과 같은 원하는 특성을 갖는 최종 돌연변이 단백질 구조를 획득하기 위해 이루어질 수 있다. 아미노산 결실 및 삽입은 폴리펩티드 서열 내의 결실 및 삽입뿐만 아니라 폴리펩티드 서열의 아미노- 및/또는 카복실 말단 결실 및 삽입을 포함한다. 예를 들어, 알려진 잔기는 전체 길이 인간 IL-2의 위치 1에서 결실될 수 있거나, 루프 영역의 길이를 단축시키기 위해 B'C' 루프 영역으로부터 하나 이상의 아미노산이 결실될 수 있다. 일부 실시양태에서, 바람직한 아미노산 돌연변이는 아미노산 치환, 예를 들어 단일 아미노산 치환의 조합 또는 아미노산 서열의 세그먼트 대체이다. 예를 들어, 야생형 IL-2의 B'C' 루프 영역 서열의 전체 또는 일부는 (IL-15의

B'C' 루프와 같은) 상이한 서열로 대체되어 바람직하게는 단축된 B'C' 루프 영역 서열을 획득할 수 있다.

[0065] 본 발명에서, IL-2 단백질 또는 IL-2 서열 세그먼트에 있는 아미노산 위치가 언급될 때, 이는 야생형 인간 IL-2 단백질(IL-2^{WT}라고도 칭함)의 서열 번호: 3에 제시된 아미노산 서열을 참조하여 결정된다. 다른 IL-2 단백질 또는 폴리펩티드(전체 길이 서열 또는 절단된 단편 포함)에서 상응하는 아미노산 위치는 서열 번호: 3과의 아미노산 서열 정렬에 의해 확인될 수 있다. 따라서, 본 발명에서 달리 언급하지 않는 한 IL-2 단백질 또는 폴리펩티드에서의 아미노산 위치는 서열 번호: 3에 따라 넘버링된 아미노산 위치이다. 예를 들어, "F42"가 언급될 때, 이는 서열 번호: 3의 위치 42에 있는 페닐알라닌 잔기 F, 또는 정렬에 의해 다른 IL-2 폴리펩티드 서열의 상응하는 위치에 있는 아미노산 잔기를 지칭한다. 또한, 이해 및 비교를 용이하게 하기 위해, 본 발명의 돌연변이가 특정한 특정 세그먼트(예를 들어, B'C' 루프 영역의 서열, 즉, 서열 번호: 3의 위치 73-83에 있는 11개 아미노산 잔기)의 부위 절단 또는 결실을 포함할 때, 특정 돌연변이 영역 및 돌연변이 방식이 결정되지만 하면 이 영역 외부의 아미노산 잔기의 넘버링은 변경되지 않은 채 유지된다. 예를 들어, B'C' 루프 영역의 서열, 즉, 서열 번호: 3의 위치 73-83에 있는 11개의 아미노산 잔기가 7개의 아미노산 잔기로 절단된 후, 번호 80-83은 더 이상 할당되지 않으며, B'C' 루프 영역 직후 다음 아미노산 잔기의 위치는 여전히 84이다. 아미노산 위치를 결정하기 위한 서열 정렬을 수행하려면 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>에서 접근 가능한 기본 로컬 정렬 검색 도구(Basic Local Alignment Search Tool)를 기본 매개변수로 사용할 수 있다.

[0066] IL-2 돌연변이 단백질이 본원에서 언급될 때, 단일 아미노산 치환은 [원래 아미노산 잔기/위치/치환용 아미노산 잔기]로 기재된다. 예를 들어, 위치 35에 있는 라이신이 글루타메이트로 치환되면 K35E로 표시될 수 있다. 주어진 위치(예를 들어, K35)에서 여러 선택적인 아미노산 치환(예를 들어, D 및 E)이 존재할 때, 아미노산 치환은 K35D/E로 표시될 수 있다. 상응하게, 단일 아미노산 치환은 "+" 또는 "-"를 통해 함께 연결되어 여러 주어진 위치에 있는 조합 돌연변이를 표시할 수 있다. 예를 들어, 위치 F42A, N88R 및 S127E에 있는 조합 돌연변이는 F42A+N88R+S127E 또는 F42A-N88R-S127E로 표시될 수 있다.

[0067] 본원에 사용된 바와 같이, "퍼센트 서열 동일성"은 비교 기간에 걸쳐 2개의 최적으로 정렬된 서열을 비교하여 결정될 수 있다. 바람직하게는, 서열 동일성은 참조 서열(예를 들어, 서열 번호: 3)의 전체 길이에 의해 결정된다. 비교를 위한 서열 정렬 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 퍼센트 서열 동일성을 결정하는 데 적합한 알고리즘은 예를 들어 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘을 포함한다(문헌[Altschul 등, *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-402, 1977] 및 문헌[Altschul 등, *J. Mol. Biol.* 215: 403-10, 1990]). BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립생명공학정보센터(National Center for Biotechnology Information)로부터 공개적으로 접근 가능하다. 본 출원의 목적을 위해, 퍼센트 동일성은 기본 매개변수를 가지고 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>에서 접근 가능한 기본 로컬 정렬 도구를 사용하여 결정할 수 있다.

[0068] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "보존적 치환"은 아미노산 서열을 포함하는 단백질/폴리펩티드의 생물학적 기능에 악영향을 미치지거나 이를 변경하지 않는 아미노산 치환을 지칭한다. 예를 들어, 보존적 치환은 부위 지정된 돌연변이 유발 및 PCR에 의해 매개된 돌연변이 유발과 같은 당업계에 알려진 표준 기술에 의해 도입될 수 있다. 전형적인 보존적 아미노산 치환은 유사한 화학적 특성(예를 들어, 전하 또는 소수성)을 갖는 다른 아미노산에 의한 아미노산의 치환을 지칭한다. 기능적으로 유사한 아미노산의 보존적 대체 표는 당업계에 잘 알려져 있다. 본 발명에서, 보존적 치환용 잔기는 하기 보존적 치환 표 X, 특히 표 X에서의 보존적 아미노산 치환용 바람직한 잔기로부터 유래한다.

[0069] 표 X

원래 잔기	예시적 치환	바람직한 보존적 아미노산 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Nle	Leu
Leu (L)	Nle; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Nle	Leu

[0070]

[0071]

예를 들어, 서열 번호: 1~3 중 하나에 대해 야생형 IL-2 단백질은 보존적 아미노산 치환을 가질 수 있거나 보존적 아미노산 치환만 가질 수 있고; 한 바람직한 실시양태에서, 보존적 치환은 10개 이하의 아미노산 잔기, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 잔기를 포함한다. 또 다른 예를 들어, 본원에서 구체적으로 주어진 IL-2 돌연변이 단백질 서열(예를 들어, 서열 번호: 4, 23, 25, 27, 29 및 31 중 임의의 하나)에 대해, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 보존적 아미노산 치환을 가질 수 있거나 보존적 아미노산 치환만 가질 수 있고; 한 바람직한 실시양태에서, 보존적 치환은 10개 이하의 아미노산 잔기, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 잔기를 포함한다.

[0072]

"친화성" 또는 "결합 친화성"은 결합 쌍의 구성원 사이의 상호작용을 반영하는 고유한 결합 능력을 지칭한다. 결합 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화성은 해리 속도 상수(k_{dis}) 대 결합 속도 상수(k_{on})의 비율인 평형 해리 상수(K_D)로 나타낼 수 있다. 결합 친화성은 당업계에서 알려진 일반적인 방법으로 측정할 수 있다. 친화성을 측정하기 위한 한 가지 특정 방법은 본원에 기재된 SPR 친화성 분석 기술 또는 BLI 분석 기술이다.

[0073]

본원에서, 항원 결합 분자는 항원, 예를 들어, 면역글로불린 분자, 항체 또는 항체 단편(예를 들어, Fab 단편 및 scFv 단편)에 특이적으로 결합할 수 있는 폴리펩티드 분자이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 항체, 예를 들어 항원으로서의 면역 체크포인트 분자에 대한 모노클로날 항체와 같은 결합 분자이다. 한 실시양태에서, 면역 체크포인트 분자는 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2이다.

[0074]

본원에 사용된 바와 같이, 항체 Fc 단편은 불변 영역의 적어도 일부를 함유하는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 지칭하며, 천연 서열의 Fc 단편 및 변이체 Fc 단편을 포함할 수 있다. 천연 서열의 Fc 단편은 면역글로불린의 다양한 천연 발생 Fc 서열, 예컨대 다양한 Ig 서브클래스 또는 이의 알로타입의 Fc 영역을 망라한다(문헌 [Gestur Vidarsson 등, IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, 20 October 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520]). 한 실시양태에서, 인간 IgG의 중쇄 Fc 단편은 중쇄의 Cys226 또는 Pro230에서 카복실 말단까지 연장된다. 또 다른 실시양태에서, Fc 단편의 C-말단 라이신(Lys447)은 존재하거나 존재하지 않을 수 있다. 다른 실시양태에서, Fc 단편은 돌연변이, 예를 들어 L234A-L235A 돌연변이를 포함하는 변이체 Fc 단편이다. 본원에서 달리 표시하지 않는 한, 문헌[Kabat, E.A. 등, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 제5판, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242]에 기재된 바와 같이, Fc 단편 내의 아미노산 잔기는 EU 인덱스라고도 하는 EU 넘버링 시스템에 의해 넘버링된다. 일부 실시양태에서, 항체 Fc 단편은 N-말단에 IgG1 힌지 서열 또는 IgG1 힌지 서열의 일부, 예를 들어 EU 넘버링에 따른 E216 내지 T225의 서열 또는 D221 내지 T225의 서열을 보유할

수 있다. 돌연변이는 힌지 서열에 함유될 수 있다.

[0075] IL-2 단백질은 4개의 α -나선 다발(A, B, C 및 D)이 있는 단백질 I형 사이토카인 패밀리의 구성원이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "B'C' 루프", "B'C' 루프 영역" 및 "B'C' 루프 서열"은 IL-2 단백질의 B와 C 나선 사이의 링커 서열을 지칭하면서 서로 교환해서 사용될 수 있다. IL-2 단백질의 B'C' 루프 서열은 IL-2 결정 구조(예를 들어, PDB: 2ERJ)에 대한 분석을 수행함으로써 결정할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해, 서열 번호: 3의 넘버링에 따라, B'C' 루프 서열은 IL-2 폴리펩티드에서 위치 72에 있는 잔기를 위치 84에 있는 잔기에 연결해주는 서열을 지칭한다. 서열 번호: 1, 2 및 3에 제시된 야생형 IL-2 단백질에서 링커 서열은 11개의 아미노산, 즉 A73~R83을 포함한다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단축된 루프 영역" 또는 "단축된 B'C' 루프 영역"은 돌연변이 단백질이 야생형 IL-2 단백질에 비해 길이가 감소된 B'C' 루프 서열을 갖고, 즉, 서열 번호: 3의 넘버링에 따라 아미노산 잔기 aa72와 aa84 사이의 링커 서열은 단축됨을 의미한다. "단축된 루프 영역"은 루프 서열에 대한 대체 또는 절단에 의해 달성될 수 있다. 대체 또는 절단은 B'C' 루프 서열의 임의의 영역 또는 부분에서 발생할 수 있다. 예를 들어, 대체 또는 절단은 루프 영역에서 서열 A73~R83에 대한 대체(예를 들어, IL-15의 B'C 루프 영역을 이용한 대체)일 수 있거나 또는 C-말단에서 하나 이상의 아미노산 잔기에 의한 서열의 절단일 수 있다. 또 다른 예를 들어, 대체 또는 절단은 루프 영역에서 서열 Q74~R83에 대한 대체일 수 있거나 또는 C-말단에서 하나 이상의 아미노산 잔기에 의한 서열의 절단일 수 있다. 대체 또는 절단 후, 필요한 경우 단일 아미노산 치환, 예를 들어 글리코실화 및/또는 역 돌연변이를 제거하기 위한 아미노산 치환을 루프 영역 서열에 추가로 도입하여 돌연변이 단백질의 성능, 예를 들어 약물 기량성을 추가로 개선할 수 있다. 따라서, 본원에서 돌연변이된 단축된 B'C' 루프 영역은 돌연변이가 도입된 후 위치 72에 있는 잔기를 위치 84에 있는 잔기에 연결해주는 서열을 통해 기재될 수 있다.

[0076] 본원에 사용된 바와 같이, "IL-2R α 결합 계면" 돌연변이는 IL-2가 IL-2R α (즉, CD25)와 상호작용하는 아미노산 부위에서 발생하는 돌연변이를 지칭한다. 이러한 상호작용 부위는 IL-2 착물과 이의 수용체(예를 들어, PDB: 1Z92)의 결정 구조를 분석함으로써 결정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 돌연변이는 특히 IL-2의 아미노산 잔기 35~72 영역에서의 돌연변이, 특히 35, 37, 38, 41, 42, 43, 45, 61, 62, 68 및 72 아미노산 부위에서의 돌연변이를 지칭한다. 바람직하게는, 돌연변이를 포함하는 IL-2 단백질은 돌연변이 도입 전 상응하는 단백질에 비하여 IL-2R α 에 대한 결합이 감소되거나 제거된다.

[0077] 본원에 사용된 바와 같이, "IL-2 β γ 결합 계면" 돌연변이는 IL-2가 IL-2R β γ (즉, CD122 및 CD132)와 상호작용하는 아미노산 부위에서 발생하는 돌연변이를 지칭한다. 이러한 상호작용 아미노산 부위는 IL-2 착물과 이의 수용체(예를 들어, PDB: 2ERJ)의 결정 구조를 분석함으로써 결정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 돌연변이는 특히 IL-2의 아미노산 잔기 12~20, 84~95 및 126~130 영역에서의 돌연변이, 특히 12, 15, 16, 19, 20, 84, 87, 88, 91, 92, 95, 126, 127 및 130 아미노산 부위에서의 돌연변이를 지칭한다. 바람직하게는, 돌연변이를 포함하는 IL-2 단백질은 돌연변이 도입 전 상응하는 단백질에 비하여 IL-2R β γ 에 대한 결합이 약화된다.

[0078] 본원에 사용된 바와 같이, IL-2R β γ 수용체에 대한 결합과 관련하여 "약화된" IL-2 단백질 분자는 돌연변이를 도입하기 전에 상응하는 IL-2 단백질에 비해 IL-2R β γ 수용체에 대한 결합 친화성의 감소를 초래하는 IL-2R β γ 와의 결합 계면으로 돌연변이를 도입하는 것을 의미한다. 더욱 바람직하게는, 약화된 분자는 상응하는 단백질에 비해 T 세포(예를 들어, CD8⁺ T 세포 또는 CD4⁺ T 세포) 및/또는 NK 세포에 대해 감소된 활성화 활성을 갖는다. 예를 들어, 약화된 분자와 상응하는 단백질에 의한 T 세포의 pSTAT5 신호 활성화의 EC₅₀ 값의 비율을 측정함으로써, 활성화 활성은 5배 이상, 예를 들어, 10배 이상, 또는 50배 이상, 또는 100배 이상, 또는 심지어 1000배 이상 감소할 수 있다. 예를 들어, T 세포에 대한 약화된 분자의 활성화 활성은 상응하는 단백질에 비해 10~50배, 50~100배, 100~1000배 또는 그 이상 감소할 수 있다. 따라서, 본 발명에서, 일부 실시양태에서, 본 발명의 약화된 분자는 IL-2R β γ 수용체에 대한 "약화된" 결합 친화성 및 T 세포에 대한 "약화된" 활성화 활성을 갖는다.

[0079] "항원 결합 단편"은 온전한 항체와 상이한 분자를 지칭하고, 이는 온전한 항체의 일부를 포함하고 온전한 항체가 결합하는 항원에 결합한다. 항체 단편의 예로는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, 도메인 항체(dAb), 선형 항체, 단쇄 항체(예를 들어, scFv), 단일 도메인 항체(예를 들어, VHH), 2가 항체 또는 이의 단편, 또는 낙타류 항체를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0080] 용어 "항원"은 면역 반응을 유도하는 분자를 지칭한다. 이러한 면역 반응은 특정 면역 세포의 항체 생성 또는 활성화, 또는 이 둘을 모두 포함한다. 당업자는 본질적으로 모든 단백질 및 펩티드를 포함하는 임의의 매크로

분자를 항원으로서 사용할 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 항원은 재조합 또는 게놈 DNA로부터 유래할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항원은 종양 관련 항원, 즉 종양의 발생, 발달 또는 진행과 관련된 항원, 예를 들어, PD-1, PD-L1 또는 PD-L2이다.

[0081] "상보성 결정 영역" 또는 "CDR 영역" 또는 "CDR"은 항체 가변 영역 내의 서열에서 가변성이 매우 높은 부분으로서, 구조적으로 정의된 루프("초가변 루프")를 형성하고/형성하거나 항원 접촉 잔기("항원 접촉 부위")를 포함한다. CDR은 주로 항원 에피토프에 대한 결합을 담당한다. 중쇄 및 경쇄의 CDR은 일반적으로 CDR1, CDR2 및 CDR3이라고 칭하고, N-말단으로부터 순차적으로 넘버링된다. 항체의 중쇄 가변 도메인에 위치한 CDR은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3이라고 칭하고, 반면에 항체의 경쇄 가변 도메인에 위치한 CDR은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3이라고 칭한다. 주어진 경쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열에서 각 CDR의 정확한 아미노산 서열의 경계는, 예를 들어, 항체의 3차원 구조와 CDR 고리의 배치에 기초한 Chothia(문헌[Chothia 등 (1989) *Nature* 342: 877-883; Al-Lazikani 등, *Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins*, *Journal of Molecular Biology*, 273: 927-948 (1997)]), 항체 서열 가변성에 기초한 Kabat(문헌[Kabat 등, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 제4판, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)]), AbM(University of Bath), Contact(University College London), International ImMuGeneTics database(IMGt)(World Wide Web 상의 imgt.cines.fr/) 및 다수의 결정 구조를 사용하는 친화성 진화 클러스터링에 기초한 North CDR 정의를 포함하는 많은 잘 알려진 항체 CDR 할당(assignment) 시스템 중 임의의 하나 또는 이들의 조합을 사용하여 결정될 수 있다.

[0082] 예를 들어, 상이한 CDR 측정 방식에 따르면, 각 CDR의 잔기는 다음과 같다.

CDR	Kabat 방식	AbM 방식	Chothia 방식	Contact 방식
LCDR1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
LCDR2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
LCDR3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
HCDR1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Kabat 넘버링 시스템)				
HCDR1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Chothia 넘버링 시스템)				
HCDR2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
HCDR3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101
(Kabat 넘버링 시스템)				

[0083]

[0084] CDR은 또한 기준 CDR 서열(예를 들어, 본 발명의 예시적인 CDR 중 임의의 것)과 Kabat 넘버링 위치가 동일한지의 여부에 기초하여 결정할 수 있다.

[0085] 달리 언급되지 않는 한, 본원에서 사용되는 용어 "CDR" 또는 "CDR 서열"은 위에 기재된 임의의 방식에 의해 결정된 CDR 서열을 망라한다.

[0086] 달리 명시되지 않는 한, 항체 가변 영역(중쇄 가변 영역 잔기 및 경쇄 가변 영역 잔기를 포함)의 잔기 위치는 Kabat 넘버링 시스템에 따라 넘버링된다(문헌[Kabat 등, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 제5판, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]).

[0087] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역에 있는 CDR은 North 넘버링 방식에 따라 정의된 CDR 서열이다.

[0088] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "링커"는 융합 단백질의 상이한 부분의 직접적인 연결을 가능하게 하는 임의의 분자를 지칭한다. 융합 단백질의 상이한 부분 사이에 공유 결합을 확립하기 위한 링커의 예는 펩티드 링커와 비 단백질 중합체를 포함하며 후자는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리알킬렌 옥사이드 및 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리프로필렌 글리콜의 공중합체를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 따른 용어 "펩티드 링커"는 융합 단백질의 제1 모이어티의 아미노산 서열을 융합 단백질의 제2 모이어티에 연결하는 아미노산 서열을 지칭한다. 예를 들어, 펩티드 링커는 융합 단백질의 IL-2 모이어티를 Fc 도메인 또는 이의 단편에 연결할 수 있다. 예를 들어, 펩티드 링커는 항체 중쇄의 C-말단을 IL-2에 연결하는 것과 같이 항체를 IL-2에 연결할

수도 있다. 바람직하게는, 펩티드 링커는 원하는 활성을 방해하지 않고 서로에 대한 형태를 유지하는 방식으로 두 개체를 연결하기에 충분한 길이를 갖는다. 펩티드 링커는 다음 아미노산 잔기: Gly, Ser, Ala 또는 Thr 을 주로 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있다. 유용한 링커는 예를 들어, (GS)_n, (GSGGS)_n, (GGGS)_n, (GGGS)_n 및 (GGGS)_nG를 포함하는 글리신-세린 중합체를 포함하며, 여기서 n은 적어도 1(또한 바람직하게는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10)의 정수이다. 유용한 링커는 또한 글리신-알라닌 중합체, 알라닌-세린 중합체 및 다른 가요성 링커를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 링커는 (GGGS)_n이며, 여기서 n은 1, 2, 3, 4 또는 5, 바람직하게는 2이다. 바람직하게는 본 발명의 링커는 서열 번호: 5에 제시된다.

[0089] "IgG 형태의 항체"는 IgG 형태에 속하는 항체의 중쇄 불변 영역을 지칭한다. 동일한 유형의 항체의 중쇄 불변 영역은 다 동일하고, 상이한 유형의 항체의 중쇄 불변 영역은 상이하다. 예를 들어, IgG4 형태의 항체는 항체의 중쇄 불변 영역이 IgG4로부터 유래됨을 의미하거나, 또는 IgG1 형태의 항체는 항체의 중쇄 불변 영역이 IgG1로부터 유래됨을 의미한다.

[0090] "인간화" 항체는 비인간 CDR로부터 유래한 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터 유래한 아미노산 잔기를 포함하는 항체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체는 적어도 1개, 일반적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 전부 포함하며, CDR 전부, 또는 실질적으로 전부가 비인간 항체의 CDR에 상응하고, FR 전부 또는 실질적으로 전부가 인간 항체의 FR에 상응한다. 인간화 항체는 인간 항체로부터 유래한 항체 불변 영역의 적어도 일부를 선택적으로 포함할 수 있다. 항체(예컨대, 비인간 항체)의 "인간화 형태"는 이미 인간화된 항체를 지칭한다.

[0091] "인간 항체", "완전 인간 항체" 및 "완전 인간화 항체"는 서로 교환하여 사용될 수 있고, 인간 또는 인간 세포에 의해 생성되거나 인간 항체 라이브러리 또는 다른 인간 항체 코딩 서열을 이용하는 비인간 공급원으로부터 유래한 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 항체를 지칭한다. 인간 항체의 해당 정의는 비인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 명시적으로 배제한다.

[0092] 본 발명의 면역접합체에 있는 항체 모이어티는 인간화 항체, 인간 항체 또는 키메라 항체일 수 있다.

[0093] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "융합"은 초기에 분리된 2개 이상의 단백질/유전자/화합물을 연결함으로써 형성된 융합을 지칭한다. 융합체를 구성하는 개체가 단백질인 경우 이를 융합 단백질이라고 칭한다. 융합 단백질은 본 출원의 융합의 범위 내에 망라된다. 예를 들어, Fc 이량체에 연결된 IL-2는 IL-2 융합 단백질을 구성할 수 있다. 융합을 구성하는 2개의 개체 분자 사이의 연결은 링커를 이용하거나 이용하지 않고 달성될 수 있다.

[0094] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "면역접합체"는 적어도 하나의 IL-2 분자 및 적어도 하나의 항체 또는 항체 단편을 포함하는 폴리펩티드 분자를 지칭한다. 본원에 기재된 바와 같이, IL-2 분자는 다양한 상호작용을 통해 다양한 구성으로 항체에 연결될 수 있다. 예를 들어, IL-2와 Fc의 융합 단백질과 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 분자의 단편이 이량체화를 통해 면역접합체를 구성할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 면역접합체는 도 1A에 나타난 구조 또는 IL-2 모이어티가 PD-1 항체 모이어티로 교환되는 도 1A에 나타난 구조를 갖는다.

[0095] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "제1" 및 "제2"는 각 모듈 유형이 하나 초과인 경우 구별을 용이하게 하기 위해 Fc 도메인, 단량체 등과 관련하여 사용된다. 명시적으로 언급되지 않는 한, 이들 용어의 사용은 면역접합체에 특정 순서 또는 방향을 부여하려는 의도가 아니다.

[0096] 본원에 기재된 바와 같이, 용어 "치료제"는 화학요법제, 사이토카인, 혈관신생 억제제, 세포독성제, 다른 항체, 소분자 약물 또는 면역조절제(예를 들어, 면역억제제)를 포함하는 종양, 예를 들어, 암을 예방하거나 치료하는데 효과적인 임의의 물질을 망라한다.

[0097] 용어 "유효량"은 단일 또는 다중 용량으로 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에게 투여한 후 상기 환자에서 예상된 효과를 생성하는 본 발명의 항체, 단편, 조성물 또는 조합의 양 또는 투여량을 지칭한다. "유효량"은 "치료적 유효량" 또는 "예방적 유효량"을 망라할 수 있다.

[0098] "치료적 유효량"은 원하는 기간 동안 필요한 용량으로 원하는 치료 결과를 달성하기에 효과적인 양을 지칭한다. 치료적 유효량은 또한 항체, 이의 단편, 조성물 또는 조합의 임의의 독성 또는 원하지 않은 효과가 유익한 치료 효과보다 못한 양을 말한다. "치료적 유효량"은 바람직하게는 측정 가능한 매개변수(예를 들어, 종양 부피)를 치료받지 않은 대상체에 비해 적어도 약 40%, 보다 더 바람직하게는 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 심지어 100%까지 억제한다. "예방적 유효량"은 원하는 기간 동안 필요한 용량으로 원하는 예방 효과를 달성하기에 효과적인 용량을 지칭한다. 일반적으로 예방적 용량은 질환의 이전 또는 초기 단계에 대상체에게 투여되기 때문에, 예방적 유효량은 치료적 유효량보다 적을 것이다.

- [0099] 용어 "숙주 세포", "숙주 세포주" 및 "숙주 세포 배양물"은 서로 교환하여 사용될 수 있으며, 외인성 핵산이 도입된 세포를 지칭하고 이러한 세포의 자손을 포함한다. 숙주 세포는 "형질전환체" 및 "형질전환 세포"를 포함하며, 이는 계대 횟수와 상관없이 1차 형질전환 세포 및 이로부터 유래한 자손을 포함한다. 자손은 핵산 함량이 모세포와 완전히 동일하지 않을 수 있으며, 돌연변이를 포함할 수 있다. 본원은 최초의 형질전환 세포로부터 선별되거나 선택되는 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이 자손을 포함한다.
- [0100] 본원에서 사용되는 용어 "표지"는 폴리뉴클레오타이드 프로브 또는 항체와 같은 작용제에 직접 또는 간접적으로 접합 또는 융합되어 접합 또는 융합된 작용제의 검출을 용이하게 하는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 표지 자체가 검출할 수 있거나(예를 들어, 방사성 동위원소 표지 또는 형광 표지), 효소 표지의 경우 검출 가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변화를 촉진할 수 있다. 상기 용어는 검출 가능한 물질을 프로브 또는 항체에 커플링(즉 물리적 연결)함으로써 프로브 또는 항체를 직접 표지하는 것과, 직접 표지된 다른 시약과 반응시킴으로써 프로브 또는 항체를 간접적으로 표지하는 것을 망라하고자 한다.
- [0101] "개체" 또는 "대상체"는 포유류를 포함한다. 포유류는 가축(예를 들어, 소, 염소, 고양이, 개, 말), 영장류(예를 들어, 인간과 원숭이와 같은 비인간 영장류), 토끼류 및 설치류(예를 들어, 마우스, 래트)를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 개체 또는 대상체는 인간이다.
- [0102] "항종양 효과"는 다양한 수단으로 입증할 수 있는 생물학적 효과를 지칭하며, 예를 들어 종양 부피 감소, 종양 세포 수 감소, 종양 세포 증식 감소 또는 종양 세포 생존력 감소를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 항종양 효과는 또한 대상체의 체중 감소 없이 항종양 효과와 관련된다.
- [0103] 용어 "종양" 및 "암"은 본원에서 서로 교환해서 사용될 수 있으며 고형 및 혈액 종양을 망라한다.
- [0104] 용어 "암"은 일반적으로 조절되지 않는 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물의 생리학적인 상태를 지칭하거나 설명한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체를 이용한 치료에 적합한 암은 전이성 형태의 암을 비롯한 고형 종양 또는 혈액 종양 등을 포함한다. 용어 "종양"은 악성 또는 양성 여부에 상관없이 모든 신생물 세포 성장 및 증식, 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직을 지칭한다. 본원에서 언급되는 경우 용어 "암", "암성" 및 "종양"을 상호배타적으로 사용하지 않는다.
- [0105] 용어 "약제학적 보충 물질"은 활성 물질과 함께 투여하는 희석제, 보조제(예를 들어, 프로인트 보조제(완전 및 불완전)), 부형제, 담체, 안정화제 등을 지칭한다.
- [0106] 용어 "약제학적 조성물"은 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적으로 발휘되게 하는 형태로 존재하고 조성물이 투여되는 대상체에 허용되지 않는 독성을 갖는 추가 성분을 함유하지 않는 조성물을 지칭한다.
- [0107] 용어 "약제학적 조합 또는 조합 생성물"은 키트 및 약제학적 조성물을 포함하나 이에 제한되지 않는 비고정 조합 생성물 또는 고정 조합 생성물을 지칭한다. 용어 "비고정 조합"은 활성 성분(예를 들어, (i) 본 발명의 돌연변이 단백질 또는 융합 및 (ii) 추가 치료제)이 환자에게 동시에 또는 순차적으로(특정 시간 제한 없이 또는 동일하거나 상이한 시간 간격으로) 별도의 개체로서 투여되는 것을 의미하며, 여기서 이러한 투여는 환자에게 2종 이상의 예방적 또는 치료적 유효 활성제를 제공한다. 용어 "고정 조합"은 2종 이상의 활성제가 단일 실체의 형태로 환자에게 동시에 투여되는 것을 의미한다. 2종 이상의 활성제의 용량 및/또는 시간 간격은 바람직하게는 성분의 조합 사용이 어느 한 성분의 단독 사용에 의해 달성되는 것보다 더 큰 질환 또는 장애에 대한 치료 효과를 초래할 수 있도록 선택된다. 성분은 각각 별도의 제제 형태를 취할 수 있고 이러한 별도의 제제 형태는 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0108] 용어 "조합 요법"은 본원에 기재된 바와 같은 질환을 치료하기 위해 2종 이상의 치료제 또는 치료 양식(예를 들어, 방사선 요법 또는 수술)의 투여/적용을 지칭한다. 이러한 투여는 이들 치료제를, 기본상 동시에 투여하는 방식, 예를 들어 고정 비율의 활성 성분을 함유하는 단위 캡슐의 형태로 같이 투여하는 것을 포함한다. 선택적으로, 이러한 투여는 여러 개 혹은 별개의 용기(예컨대, 정제, 캡슐, 분말 및 액체)에서의 활성 성분을 같이 투여하는 것을 포함한다. 분말 및/또는 액체는 투여 전에 재구성하거나 원하는 용량으로 희석될 수 있다. 또한 이러한 투여는 또한 대략 동일한 시간에 또는 상이한 시간에 순차적 방식으로 각 유형의 치료제를 사용하는 것을 포함한다. 모든 경우에 치료 요법은 본원에 기재된 장애 또는 증상의 치료에 있어서 약제학적 조합의 유용한 효과를 제공할 것이다.
- [0109] 본원에 사용된 바와 같이, "치료"(또는 "치료하다" 또는 "치료하는")는 기존의 증상, 장애, 병태 또는 질환의 진행 또는 중증도를 지연, 저해, 저지, 완화, 중단, 감소, 역전시키는 것을 지칭한다.

- [0110] 본원에 사용된 바와 같이, "예방"(또는 "예방하다" 또는 "예방하는")은 질환 또는 장애 또는 특정 질환 또는 장애의 증상의 발전 또는 진행을 억제하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 가족력에 암이 있는 대상체는 예방 요법의 후보자이다. 일반적으로, 암의 경우, 용어 "예방"(또는 "예방하다" 또는 "예방하는")은 암의 징후 또는 증상 개시 전에, 특히 암의 위험이 있는 대상체에게 약물을 투여하는 것을 지칭한다.
- [0111] 본원에서 사용되는 용어 "벡터"는 연결되어 있는 다른 핵산을 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 상기 용어는 자가 복제 핵산 구조로서 작용하는 벡터 및 숙주 세포에 도입되었을 때 상기 숙주 세포의 게놈에 결합하는 벡터를 포함한다. 일부 벡터는 조작 가능하게 연결된 핵산의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터"라고 칭한다.
- [0112] "대상체/환자/개체 샘플"은 환자 또는 대상체로부터 얻은 세포 또는 유체의 수집물을 지칭한다. 조직 또는 세포 샘플의 공급원은, 예를 들어 신선, 동결 및/또는 보존 장기 또는 조직 샘플 또는 생검 샘플 또는 천자 샘플로부터의 고체 조직; 혈액 또는 임의의 혈액 성분; 뇌척수액, 양수, 복막액, 또는 간질액과 같은 유체; 임신 또는 발달 기간 중 임의의 시점에서 대상체로부터 채취한 세포일 수 있다. 조직 샘플은 조직과 자연적으로 혼합되지 않는 화합물, 예컨대, 보존제, 항응고제, 완충제, 고정제, 영양제 및 항생제를 포함할 수 있다.
- [0113] II. 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질
- [0114] 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질의 유리한 생물학적 특성
- [0115] 본 발명자들은 장기간의 연구를 통해 다음의 분자 돌연변이 및 조작 또는 분자 돌연변이와 조작 중 하나 이상의 조합이 다음과 같이 수행되어 동시에 IL-2의 효능을 개선하고 IL-2의 독성 부작용을 감소시키며 우수한 생성물을 달성할 수 있음을 발견하였다:
- [0116] (i) IL-2R β γ 와 IL-2 수용체의 결합 계면에 특정 잔기 돌연변이를 도입하여 IL-2R β γ 수용체에 대한 결합을 약화시키고 IL-2의 활성을 어느 정도 하향 조절하는 것. IL-2R β γ 수용체에 대한 결합을 약화시키는 이러한 돌연변이를 포함함으로써, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 림프구를 활성화시켜 종양을 죽이는 한편, 대량의 염증 인자의 방출 및 이에 따른 림프구의 과활성화로 인한 약물 관련 독성을 방지할 수 있다. 또한, 림프구에서 광범위하게 발생하는 IL-2 수용체에 대한 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질의 결합 친화성을 감소시킴으로써, 약화 돌연변이는 또한 IL-2 수용체에 의해 매개되는 IL-2 돌연변이 단백질의 제거를 감소시키고 IL-2 돌연변이 단백질의 작용 기간을 연장할 수 있고;
- [0117] (ii) 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질을 IL-2-Fc 이량체로 구축시키는 것. 이 이량체의 형성은 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질의 분자량을 증가시켜, 신장 제거율을 크게 감소시키고 FcRn-매개 체내 재순환에 의해 IL2-Fc 융합 단백질의 반감기를 추가로 연장할 수 있다. 따라서 IL-2의 짧은 반감기와 높은 빈도의 고용량 투여로 인한 높은 피크 혈장 농도 문제가 극복되고;
- [0118] (iii) 예를 들어 IL-15 분자의 루프를 대체하거나 IL-2 분자의 B'C' 루프를 절단함으로써 IL-2의 B'C' 루프 구조를 조작하는 것. B'C' 루프 돌연변이는 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질에서 B'C' 루프 구조의 안정성을 유의하게 향상시킬 수 있고, IL-2 돌연변이 단백질 및 이로 구축된 IL-2-Fc 이량체 분자의 생성 성능을 유의하게 개선할 수 있으며, 예를 들어, 발현 수율 및 순도를 유의하게 개선할 수 있고;
- [0119] (iv) IL-2R α 에 대해 야생형 IL-2와 실질적으로 필적할 만한 결합 활성을 유지할 수 있거나; 또는 다음 돌연변이를 조합할 수 있는 것: (v) IL-2 돌연변이 단백질의 IL-2R α 에 대한 결합 성능을 변경하기 위한 IL-2와 IL-2R α 수용체의 결합 계면에서의 하나 이상의 특정 돌연변이. 또한, 본 발명자들은 본원에 개시된 돌연변이 단백질에서, IL-2 돌연변이 단백질의 IL-2R α 에 대한 결합 활성은 위에 설명한 우수한 특성을 유지하면서 필요에 따라 조절할 수 있어, 항종양 요법 또는 자가면역 질환의 치료와 같은 여러 측면에서 IL-2의 다양한 약물 형성 요구를 충족하고, 따라서 본원에 개시된 돌연변이 단백질에 우수한 약력학적 특성을 추가로 부여할 수 있다.
- [0120] 따라서, 서열의 조작을 통해, 본원에 개시된 IL2-Fc 분자는 한 측면에서 IL2R β / γ 수용체에 대한 결합 친화성을 약화시키고 보다 우수한 약동학적 실험 결과 및 약력학적 결과를 달성하며, 또 다른 측면에서 단백질 발현 수율 및 순도와 같은 약물 기량성이 유의하게 개선되었다.
- [0121] 따라서, 본 발명은 약물 기량성이 개선되고 IL-2 수용체 결합 특성이 개선된 IL-2 돌연변이 단백질을 제공한다. 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질을 포함하는 IL-2-Fc 분자는 림프구의 강한 작용에 의해 유발되는 염증 인자의 과도한 방출을 효과적으로 피할 수 있고, 보다 안정하고 오래 지속되는 약동학적 특성을 갖는다. 따라서, 낮은 단일 용량으로 인체에서 충분히 높은 약물 노출을 달성할 수 있으며, 이는 높은 C_{max}로 인한 약물 관련 독

성을 방지한다. 또한, 본 발명의 장기 지속형 IL-2-Fc 분자가 천연형 IL-2에 비해 림프구에 대한 면역자극 활성이 약화되었으나, 본 발명의 분자의 체내 유효 약물 농도는 약동학적 특성에 대한 유의한 개선으로 인해 더 오래 지속되고 장기간의 지속적인 림프구 자극, 천연 IL-2 분자에 필적할 만한 약력학적 효과 또는 더 나은 약력학적 효과, 동물에서 더 나은 항종양 효능 및 내성을 달성할 수 있다.

[0122] 또한, 본 발명의 유리한 생물학적 특성을 갖는 돌연변이 IL-2 단백질은 항원 결합 분자(예를 들어, 항체 또는 이의 단편)를 갖는 면역접합체로 형성되어 T 세포 또는 NK 세포를 활성화하고 확장하는 동안 항원 결합 분자의 면역 또는 면역치료 효과를 강화시킬 수도 있다.

[0123] 개선된 약물 기량성

[0124] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 개선된 약물 기량성을 갖는다. 예를 들어, 포유동물 세포, 예컨대 HEK293 세포 또는 CHO 세포에서, 특히 Fc 융합 단백질의 형태로 발현되는 경우, IL-2 돌연변이 단백질은 다음으로부터 선택된 하나 이상의 특성을 갖는다: (i) 야생형 IL-2 단백질에 비해 우수한 발현 수율; 및 (ii) 더 높은 단백질 순도를 위한 정제 용이성.

[0125] 본원에 개시된 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 야생형 IL-2에 비해 증가된 발현 수준을 나타낸다. 본원에 개시된 일부 실시양태에서, 증가된 발현은 포유동물 세포 발현 시스템에서 발생한다. 발현 수준은 세포 배양 상청액, 바람직하게는 1단계 친화성 크로마토그래피에 의해 정제된 상청액에서 재조합 IL-2 단백질의 양에 대한 정량적 또는 반정량적 분석을 근거하는 임의의 적합한 방법에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 샘플에서 재조합 IL-2 단백질의 양은 웨스턴 블롯팅 또는 ELISA로 평가할 수 있다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포에서 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질의 발현 수율은 야생형 IL-2에 비해 적어도 1.1배, 또는 적어도 1.5배, 또는 적어도 2배, 3배 또는 4배 이상, 또는 적어도 5, 6, 7, 8 또는 9배, 심지어 10배 이상, 예를 들어 약 10, 15, 20, 25, 30 또는 35배 증가한다.

[0126] 일부 실시양태에서, 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 정제된 단백질의 순도를 결정함으로써 나타낸 바와 같이, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질-Fc 융합체는 야생형 IL-2 단백질 융합체에 비해 더 높은 순도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 단백질의 순도는 A SEC-HPLC 기술에 의해 검출된다. 일부 바람직한 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질-Fc 융합은 1단계 단백질 A 친화성 크로마토그래피로 정제한 후 최대 70%, 또는 80%, 또는 90% 이상, 바람직하게는 92%, 93%, 94%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 순도를 가질 수 있다.

[0127] 일부 실시양태에서, 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 정제된 단백질의 순도를 결정함으로써 나타낸 바와 같이, 본원에 개시된 IL-2-Fc 이량체 단백질은 야생형 IL-2 단백질로 형성된 상응하는 IL-2-Fc 이량체 단백질에 비해 더 높은 순도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 단백질의 순도는 A SEC-HPLC 기술에 의해 검출된다. 일부 바람직한 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2-Fc 이량체 단백질은 1단계 단백질 A 친화성 크로마토그래피로 정제한 후 최대 70%, 또는 80%, 또는 90% 이상, 바람직하게는 92%, 93%, 94%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 순도를 가질 수 있다.

[0128] IL-2 β γ 수용체에 대한 약화된 결합

[0129] 일부 실시양태에서, IL-2R β γ 에 대한 결합 계면 내로 돌연변이를 도입함으로써, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 돌연변이 도입 전에 상응하는 단백질에 비해 IL-2 β γ 에 대한 결합 친화성을 약화시켰다.

[0130] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 IL-2R β γ 결합 계면 돌연변이를 도입함으로써 약화시키기 전에 비해 IL-2R β 및/또는 IL-2R β γ 수용체에 대해 감소된 결합 친화성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 약화되기 전에 비해 IL-2R β 수용체에 대해 감소된 결합 친화성을 가지며; 예를 들어, 결합 친화성은 1~20배 이상 감소한다. 일부 실시양태에서, IL-2R β 수용체에 대한 결합이 제거된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 약화되기 전에 비해 IL-2R β γ 수용체에 대해 감소된 결합 친화성을 가지며; 예를 들어, 결합 친화성은 1~100배 이상 감소한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 IL-2R β 수용체에 결합하지 않지만, 여전히 IL-2R β γ 수용체에 결합할 수 있다. 바람직하게는, IL-2R β γ 수용체에 대한 결합은 약화되기 전에 비해 1~100배, 예를 들어 약 20~80배 감소한다. 결합 친화성은 SPR 친화성 분석 기술을 사용하여 IL-2R β 또는 IL-2R β γ 수용체에 대한 Fc 단편 또는 이의 이량체 분자에 융합된 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질과 같은, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질의 결합의 평형 해리 상수(K_D)를 측정함으로써 결정될 수 있다.

[0131] IL-2R β γ 에 대한 결합 계면 내로 돌연변이를 도입함으로써, 일부 실시양태에서, 돌연변이 도입 전 상응하는 단

백질에 비해 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 IL-2 활성, 예를 들어 다음으로부터 선택된 적어도 하나의 IL-2 활성을 약화시켰다:

- [0132] - 약화 전에 비해 T 세포(예를 들어, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포, 예를 들어, $CD4^+/CD8^+$ $CD25^-$ T 세포 또는 $CD4^+$ $CD25^+$ T 세포)의 감소된 활성화;
- [0133] - 약화되기 전에 비해 감소된 NK 세포의 활성화; 및
- [0134] - 약화 전에 비해 T 세포/NK 세포에서 염증 인자의 IL-2 자극 방출 감소.
- [0135] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 약화되기 전에 비해 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)의 감소된 IL-2 매개 활성화 및/또는 증식을 초래한다. 한 실시양태에서, 림프구는 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포, 예컨대 $CD25^-$ T 세포이다. 한 실시양태에서, STAT5 인산화 분석에서, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포를 활성화시키는 IL-2 돌연변이 단백질의 능력은 T 세포 또는 NK 세포와 같은 림프구에서 IL-2 돌연변이 단백질에 의한 STAT5 인산화 신호의 활성화를 측정함으로써 확인된다. 예를 들어, 본 출원의 실시예에 기재된 바와 같이, 세포의 STAT5 인산화는 유세포 분석에 의해 분석되어 반수 최대 유효 농도(EC_{50})를 결정할 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 IL-2 약화된 분자와 상응하는 단백질에 의한 STAT5 인산화 신호의 활성화의 EC_{50} 값의 비율을 측정함으로써, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 분자는 T 세포에 대한 "약화된" 활성화 활성을 갖는다. 비율에 따라, T 세포에 대한 본원에 개시된 IL-2 돌연변이체 분자의 활성화 활성은 예를 들어, 5배 이상, 예를 들어, 10배 이상, 또는 50배 이상, 또는 100배 이상, 또는 심지어 1000배 이상 감소할 수 있다. 예를 들어, T 세포에 대한 본원에 개시된 IL-2 돌연변이체 분자의 활성화 활성은 상응하는 단백질에 비해 10~50배, 또는 50~100배, 또는 100~1000배, 또는 그 이상 감소할 수 있다. 일부 바람직한 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 야생형 IL-2에 비해 IL-2의 감소된 세포 표면 IL-2 수용체-매개 제거 및 증가된 체내 반감기를 갖는다.
- [0136] 일부 바람직한 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 야생형 IL-2에 비해 IL-2 및 이의 수용체에 의해 매개되는 감소된 체내 독성을 갖는다.
- [0137] *IL-2R α 수용체에 대한 유지된 결합 또는 변경된(바람직하게는 약화된) 결합*
- [0138] IL-2 단백질은 IL-2 수용체와 상호작용함으로써 신호전달 및 기능을 촉발한다. 야생형 IL-2는 상이한 IL-2 수용체에 대해 상이한 친화성을 나타낸다. 야생형 IL-2에 대해 낮은 친화성을 갖는 IL-2 β 및 IL-2 γ 수용체는 $CD8^+$ T 세포 및 NK 세포를 포함하는 휴지기 이펙터 세포에서 발현된다. 야생형 IL-2에 대해 높은 친화성을 갖는 IL-2R α 수용체는 조절 T 세포(Treg) 세포 및 활성화된 이펙터 세포에서 발현된다. 그 높은 친화성으로 인해 야생형 IL-2는 세포 표면의 IL-2R α 에 우선적으로 결합한 다음 IL-2R β γ 를 모집한다. Treg 세포와 활성화된 이펙터 세포는 IL-2R β γ 를 통해 방출되는 다운스트림 p-STAT5 신호에 의해 자극된다. 이론에 얽매이지 않고, IL-2R α 수용체에 대한 IL-2의 친화성을 변경하면 $CD25^+$ 세포를 우선적으로 활성화하기 위한 IL-2의 선호성과 Treg 세포의 IL-2 매개 면역 하향조절 효과가 변경된다.
- [0139] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 야생형 IL-2에 비해 IL-2R α 수용체에 결합하는 능력이 유지되거나 변경된 능력을 갖는다.
- [0140] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 야생형 IL-2에 비해 IL-2R α 수용체에 대한 결합을 유지한다. 본원에 사용된 바와 같이, 표현 "IL-2R α 수용체에 대한 결합을 유지한다"는 IL-2 돌연변이 단백질이 야생형 IL-2 단백질에 비해 IL-2R α 수용체에 대한 필적할 만한 결합 활성을 갖고 있음을 의미한다. 바람직하게는, "필적할 만한 결합 활성"은 동일한 방식으로 측정하는 경우, IL-2 돌연변이 단백질과 야생형 IL-2 단백질의 결합 활성 값(예를 들어, 결합 친화성 K_D)이 1:20 내지 20:1, 바람직하게는 1:10 내지 10:1의 비율임을 의미한다. 바람직하게는, IL-2 돌연변이 단백질은 야생형 IL-2에 비해 IL-2R α 결합 계면 돌연변이를 갖지 않는다.
- [0141] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이체 단백질은 IL-2R α 수용체에 대한 결합을 유지하는 약화된 IL-2 돌연변이체 분자이다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 약화된 IL-2 돌연변이 단백질은 야생형 IL-2에 비해 IL-2R α 결합 계면 돌연변이를 갖지 않는다. 바람직하게는, 약화된 IL-2 돌연변이 분자는 Treg에 대한 개선된 선택성 및/또는 NK 세포(예를 들어, $CD3^-$ $CD56^+$ NK 세포)에 대한 개선된 선택성을 갖는다. 한 실시양태에서, STAT5 인산화 분석에서, 림프구에 대한 IL-2 돌연변이 단백질의 선택성은 Treg 세포, NK 세포 및 $CD4^+$ 및

CD8⁺ 이펙터 T 세포와 같은 다른 림프구에서 IL-2 돌연변이 단백질에 의한 STAT5 인산화 신호의 활성화를 촉진함으로써 확인된다. 한 실시양태에서, STAT5 인산화 분석에서, IL-2 돌연변이 단백질의 선택성은 다른 림프구를 실질적으로 활성화시키지 않으면서 특정(하나 이상의 유형) 림프구를 선택적으로 활성화하는 IL-2 돌연변이 단백질의 용량 창에 의해 반영될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 약화된 IL-2 돌연변이 단백질은 CD25^{-/low} CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ 이펙터와 T 림프구와 같은 이펙터 T 세포에 비해 Treg에 대한 개선된 선택성 및/또는 NK 세포(CD3⁺ CD56⁺ NK 세포)에 대한 개선된 선택성을 나타낼 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 개선된 선택성은 IL-2 돌연변이 단백질의 낮은 약물 관련 독성에 의해 반영될 수 있다.

[0142] 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 야생형 IL-2에 비해 IL-2R α 와의 결합 계면에 돌연변이가 도입되고, 돌연변이는 IL-2 돌연변이 단백질이 IL-2R α 수용체에 대한 결합을 감소시키거나 제거하도록 한다.

[0143] 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 야생형 IL-2에 비해 CD25⁺ 세포를 우선적으로 활성화하기 위한 IL-2의 선호도를 감소시킨다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 야생형 IL-2에 비해 Treg 세포의 IL-2 매개 면역 하향조절을 감소시킨다.

[0144] 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 면역 하향조절 효과를 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 자가면역 질환을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0145] 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이체 단백질은 다음로부터 선택된 하나 이상의 개선된 특성을 갖는다:

[0146] - 야생형 IL-2에 비해 IL-2R 수용체(IL-2R α β γ , IL-2R α 및/또는 IL2R α β γ)에 대한 결합 친화성이 유지 또는 변경(예를 들어 감소 또는 증가, 바람직하게는 감소)됨;

[0147] - 야생형 IL-2에 비해 CD25⁺ 세포(예를 들어, CD8⁺ T 세포 및 Treg 세포)의 활성화가 유지 또는 변경(예를 들어, 감소 또는 증가)됨;

[0148] - 야생형 IL-2에 비해 CD25⁺ 세포(예를 들어, Treg 세포)를 우선적으로 활성화하기 위한 IL-2의 선호도가 유지 또는 변경(예를 들어, 제거 또는 감소 또는 증가)됨; 및

[0149] - 야생형 IL-2에 비해 Treg 세포에 의한 면역 반응의 IL-2 유도 하향조절 효과가 유지 또는 변경(예를 들어, 감소 또는 증가)됨.

[0150] 일부 실시양태에서, IL-2R α 수용체에 대한 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질의 결합 친화성은 야생형 IL-2(예를 들어, 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 3에 제시된 IL-2^{WT})에 비해 적어도 5배, 적어도 10배, 또는 적어도 25배, 특히 적어도 30배, 50배 또는 100배 이상 감소한다. 바람직한 실시양태에서, 본원에 개시된 돌연변이 단백질은 IL-2R α 수용체에 결합하지 않는다. 결합 친화성은 SPR 친화성 분석 기술을 사용하여 IL-2R α 수용체에 대한 Fc 단편 또는 이의 이량체 분자에 융합된 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질과 같은, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질의 결합의 평형 해리 상수(K_D)를 측정함으로써 결정될 수 있다.

[0151] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 야생형 IL-2에 비해 CD25⁺ 세포의 IL-2-매개 활성화 및/또는 증식을 감소시킨다. 한 실시양태에서, CD25⁺ 세포는 CD25⁺ CD8⁺ T 세포이다. 또 다른 실시양태에서, CD25⁺ 세포는 Treg 세포이다. 한 실시양태에서, STAT5 인산화 분석에서, CD25⁺ 세포를 활성화시키는 IL-2 돌연변이 단백질의 능력은 CD25⁺ 세포에서 IL-2 돌연변이 단백질에 의한 STAT5 인산화 신호의 활성화를 촉진함으로써 확인된다. 예를 들어, 본 출원의 실시예에 기재된 바와 같이, 세포의 STAT5 인산화는 유세포 분석에 의해 분석되어 반수 최대 유효 농도(EC₅₀)를 결정할 수 있다.

[0152] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 야생형 IL-2에 비해 CD25⁺ 세포를 우선적으로 활성화하기 위한 IL-2의 선호도를 제거하거나 감소시킨다. 한 실시양태에서, CD25⁺ 세포는 CD25⁺ CD8⁺ T 세포이다. 또 다른 실시양태에서, CD25⁺ 세포는 Treg 세포이다. 한 실시양태에서, STAT5 인산화 분석에서, CD25⁺ 세포를 활성

화시키는 IL-2 돌연변이 단백질의 능력은 각각 $CD25^-$ 세포 및 $CD25^+$ 세포에서 STAT5 인산화 신호를 활성화하는 IL-2 돌연변이 단백질의 EC_{50} 값을 측정함으로써 확인된다. 예를 들어, $CD25^+$ 세포에 대한 IL-2 돌연변이 단백질의 활성화 선호도는 $CD25^-$ 및 $CD25^+$ T 세포에서 STAT5 인산화 신호를 활성화할 때 IL-2 돌연변이 단백질의 EC_{50} 값의 비율을 계산함으로써 결정되었다. 바람직하게는, $CD25^+$ 세포에 대한 돌연변이 단백질의 선호도는 야생형 단백질에 비해 적어도 10배, 바람직하게는 적어도 100배, 150배, 200배, 또는 300배 이상 감소한다.

[0153] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 전체 내용이 본원에 포함된 PCT/CN2021/081840에 나타난 돌연변이 단백질의 특성을 갖는다.

[0154] 본원에 개시된 돌연변이 단백질

[0155] 한 측면에서, 본 발명은 IL-2 돌연변이 단백질을 제공하며, 상기 돌연변이 단백질은 야생형 IL-2(바람직하게는 인간 IL-2, 보다 바람직하게는 서열 번호: 3의 서열을 포함하는 IL-2)에 비해 다음 돌연변이를 포함하고:

[0156] (i) IL-2와 IL-2R α 의 결합 계면에서, 특히 위치 35 및/또는 42에서 IL-2R α 수용체에 대한 결합 친화성을 제거하거나 감소시키는 돌연변이;

[0157] 및/또는

[0158] (ii) IL-2와 IL-2R β γ 의 결합 계면에서, 특히 위치 88, 127 및/또는 130으로부터 선택되는 적어도 하나의 위치에서 IL-2R β γ 수용체에 대한 결합을 약화시키는/감소시키는 돌연변이;

[0159] 및

[0160] (iii) 단축된 B'C' 루프 영역(즉, 아미노산 잔기 aa72 및 aa84를 연결하는 서열), 여기서 바람직하게는, 상기 단축된 루프 영역은 10, 9, 8, 7, 6 또는 5개 미만의 아미노산 길이를 가지며, 보다 바람직하게는 7개 아미노산 길이를 가지며; 바람직하게는, 상기 단축된 B'C' 루프 영역은 개선된 단백질 발현 수율 및/또는 순도를 초래하고;

[0161] 상기 아미노산 위치는 서열 번호: 3에 따라 넘버링된다.

[0162] 한 실시양태에서, 상기 돌연변이 단백질은 상기 돌연변이 (i) 및 (iii)을 포함하거나 상기 돌연변이 (ii) 및 (iii)을 포함하거나 상기 돌연변이 (i), (ii) 및 (iii)을 포함한다.

[0163] IL-2R β γ 결합 계면 돌연변이

[0164] 본원에 개시된 돌연변이체 단백질에 적합한 IL-2R β γ 결합 계면 돌연변이는 본 발명의 다른 돌연변이와 조합될 수 있고 IL-2R β γ 에 대한 약화 또는 감소된 결합 친화성, 및/또는 림프구(예를 들어, T 세포/NK 세포)에 대한 약화된 활성화 활성을 초래하는 임의의 돌연변이일 수 있다.

[0165] 이러한 돌연변이의 예는 IL-2와 IL-2R β γ 의 결합 계면, 특히 위치, 88, 127 및 130으로부터 선택된 적어도 하나의 위치에서 IL-2R β γ 수용체에 대한 약화 또는 감소된 결합을 초래하는 돌연변이를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0166] 일부 실시양태에서, IL-2R β γ 결합 계면 돌연변이는 다음 돌연변이 중 하나 이상 또는 다음으로부터 선택된 다음 돌연변이의 조합을 포함한다:

[0167] N88D, N88R, S127E, S130R, N88R + S130R 및 N88R + S127E.

[0168] 다른 실시양태에서, 본 발명의 IL-2R β γ 결합 계면 돌연변이를 포함하는 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 IL-2R β γ 에 대한 약화 또는 감소된 결합, 예를 들어, SPR 친화성 분석에 의해 결정된 바와 같이 IL-2R β γ 에 대한 약화 또는 감소된 결합 친화성을 갖는다.

[0169] B'C' 루프 영역 돌연변이

[0170] 한 측면에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 야생형 IL-2에 비해 B'C' 루프 영역 돌연변이를 포함하고; 바람직하게는, 돌연변이는 B'C' 루프 영역의 증가한 안정성을 초래하고; 보다 바람직하게는, 돌연변이는 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질의 개선된 약물 기량성, 예를 들어 증가된 발현 수율 및/또는 순도를 초래한다.

[0171] 일부 실시양태에서, 도입된 돌연변이로 인해 돌연변이 단백질은 야생형 IL-2에 비해 단축된 B'C' 루프 영역(즉,

아미노산 잔기 aa72 및 aa84 사이의 단축된 링커 서열)을 포함한다(바람직하게는 인간 IL-2, 보다 바람직하게는 서열 번호: 3의 서열을 포함하는 IL-2).

[0172] 바람직하게는, 상기 단축된 루프 영역은 10, 9, 8, 7, 6 또는 5개 미만의 아미노산 길이를 가지며, 보다 바람직하게는 7개 아미노산 길이를 가지며, 여기서 아미노산 잔기는 서열 번호: 3에 따라 넘버링된다.

[0173] 본원에서, 본 발명에 적합한 B'C' 루프 영역 돌연변이는 B'C' 루프 영역의 절단 및 대체를 포함한다. 한 실시양태에서, 돌연변이는 B'C' 루프 영역에서 아미노산 잔기 aa73 내지 aa83의 절단(예를 들어, B'C' 루프 영역에서 1, 2, 3 또는 4개 아미노산의 절단) 또는 대체, 예를 들어 A(Q/G)SKN(F/I)H, 바람직하게는 AQSKNFH를 형성하는 절단 또는 SGDASIH로 대체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 돌연변이는 B'C' 루프 영역에서 아미노산 잔기 aa74 내지 aa83의 절단 또는 대체, 예를 들어 (Q/G)SKN(F/I)H를 형성하는 절단, 또는 GDASIH 또는 AGDASIH로 대체를 포함한다.

[0174] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 B'C' 루프 키메라 돌연변이를 포함한다. 야생형 IL-2에 비해 돌연변이 단백질은 aa72를 aa84에 연결해주는 서열의 전체 또는 일부를, 예를 들어 다른 4-나선 단쇄 사이토카인 패밀리 구성원으로부터의 짧은 B'C' 루프 서열로 치환하는 것을 포함한다. 야생형 IL-2의 치환에 적합한 짧은 B'C' 루프는 결정 구조의 중첩에 의해 다른 4-나선 단쇄 사이토카인 IL 패밀리 구성원, 예컨대 마우스와 같은 비인간 종의 IL-15, IL-4, IL-21 또는 IL 패밀리 구성원으로부터 확인될 수 있다. 한 실시양태에서, 치환에 사용되는 서열은 인터루킨 IL-15, 특히 인간 IL-15로부터의 B'C' 루프 서열이다. 한 실시양태에서, 치환은 B'C' 루프 영역에서 아미노산 잔기 aa73 내지 aa83의 치환을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 치환은 B'C' 루프 영역에서 아미노산 잔기 aa74 내지 aa83의 치환을 포함한다. 바람직하게는, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 치환 후, SGDASIH 또는 AGDASIH, 바람직하게는 AGDASIH로부터 선택된 B'C' 루프 서열(즉, aa72를 aa84에 연결해주는 서열)을 갖는다.

[0175] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 B'C' 루프 절단 돌연변이를 포함한다. 야생형 IL-2에 비해 돌연변이 단백질은 aa72를 aa84에 연결해주는 서열의 절단을 포함한다. 한 실시양태에서, 절단은 B'C' 루프 영역에서 아미노산 잔기 aa73 내지 aa83의 절단을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 절단은 B'C' 루프 영역에서 아미노산 잔기 aa74 내지 aa83의 절단을 포함한다. 예를 들어, 서열은 C-말단에서 1, 2, 3 또는 4개의 아미노산에 절단될 수 있다. 바람직하게는, 절단 후, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 A(Q/G)SKN(F/I)H, 바람직하게는 AQSKNFH의 서열을 갖는 B'C' 루프 영역을 갖는다. 바람직하게는, 절단 후, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 다음으로부터 선택된 B'C' 루프 서열(즉, aa72를 aa84에 연결해주는 서열)을 갖는다:

B'C' 루프의 서열
AQSKNFH
AGSKNFH
AQSANFH
AQSANIH

[0176]

[0177] 한 바람직한 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 AQSKNFH 또는 AGDASIH로부터 선택된 B'C' 루프 영역 서열(즉, aa72를 aa84에 연결해주는 서열)을 포함한다.

[0178] IL-2R α 결합 계면 돌연변이

[0179] 한 측면에서, 야생형 IL-2에 비해 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 IL-2R α 에 대한 결합 계면, 바람직하게는 위치 35 및/또는 42에서 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 바람직하게는, 돌연변이는 IL-2R α 수용체에 대한 결합 친화성을 제거하거나 감소시킨다.

[0180] 일부 바람직한 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2R α 결합 계면 돌연변이는 돌연변이 K35E 및/또는 F42A를 포함한다.

[0181] 다른 실시양태에서, 본 발명의 IL-2R α 결합 계면 돌연변이를 포함하는 본원에 개시된 IL-2 돌연변이체 단백질은 예를 들어 SPR 친화성 분석에 의해 결정된 바와 같이 IL-2R α 에 대한 변경(바람직하게는 감소 또는 제거)된 결합을 갖는다.

[0182] 기타 돌연변이

[0183] 위에 기재된 "IL-2R β γ 결합 계면 돌연변이, "B'C' 루프 영역 돌연변이" 및 "IL-2R α 결합 계면 돌연변이"에

더하여, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 위에 기재된 하나 이상의 유익한 특성을 유지하는 한 다른 영역 또는 위치에 하나 이상의 돌연변이를 가질 수도 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 개선된 발현 또는 균질성 또는 안정성과 같은 추가 이점을 제공하기 위해 위치 125에 C125S, C125A, C125T 또는 C125V와 같은 치환을 추가로 포함할 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제4,518,584호 참조). 또 다른 예를 들어, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 IL2의 N-말단에서 O-글리칸 변형을 제거하기 위해 위치 3에 있는 치환, 예를 들어 T3A를 추가로 포함할 수 있다. 당업자는 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질에 혼입될 수 있는 추가 돌연변이를 결정하는 방법을 알고 있다.

[0184] 돌연변이의 바람직한 예시적 조합

[0185] 일부 바람직한 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 IL-2R β γ 에 대한 결합이 약해지고, (i) 감소(또는 제거)된 IL-2R α 에 대한 결합; 및 (ii) 개선된 발현 수준 및 순도 중 하나 또는 둘 모두로부터 선택된 개선된 특성을 갖는다. 일부 실시양태에서, IL-2 돌연변이 단백질은 야생형 IL-2에 비해 IL-2R α 수용체에 대한 결합을 유지한다.

[0186] 일부 실시양태에서, 본 발명은 야생형 IL-2에 비해 하기를 포함하는 IL-2 돌연변이 단백질을 제공한다:

[0187] (i) N88D;

[0188] N88R;

[0189] N88R + S130R;

[0190] F42A + N88R + S127E; 또는

[0191] K35E + N88R + S127E;

[0192] 및

[0193] (ii) B'C' 루프 영역 서열 AGDASIH 또는 AQSKNFH;

[0194] 및 선택적으로 (iii) T3A.

[0195] 일부 실시양태에서, 본 발명은 야생형 IL-2에 비해 하기를 포함하는 IL-2 돌연변이 단백질을 제공한다:

[0196] (i) N88D;

[0197] N88R;

[0198] N88R + S130R;

[0199] F42A + N88R + S127E; 또는

[0200] K35E + N88R + S127E;

[0201] 및

[0202] (ii) B'C' 루프 영역 서열 AGDASIH 또는 AQSKNFH;

[0203] 및 (iii) T3A.

[0204] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은

[0205] (i) 서열 번호: 4에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는

[0206] (ii) 서열 번호: 4에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는

[0207] (iii) 서열 번호: 4에 제시된 아미노산 서열에 비해 1개 이상(바람직하게는 10개 이하, 보다 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하)의 아미노산 변화를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며,

[0208] 바람직하게는, 돌연변이 단백질은 N88D 치환 및 B'C' 루프 영역 서열 AGDASIH, 및 선택적으로 T3A를 포함한다.

[0209] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은

[0210] (i) 서열 번호: 23에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%

의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는

[0211] (ii) 서열 번호: 23에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는

[0212] (iii) 서열 번호: 23에 제시된 아미노산 서열에 비해 1개 이상(바람직하게는 10개 이하, 보다 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하)의 아미노산 변화를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며,

[0213] 바람직하게는, 돌연변이 단백질은 N88R 치환 및 B'C' 루프 영역 서열 AGDASIH, 및 선택적으로 T3A를 포함한다.

[0214] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은

[0215] (i) 서열 번호: 25에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는

[0216] (ii) 서열 번호: 25에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는

[0217] (iii) 서열 번호: 25에 제시된 아미노산 서열에 비해 1개 이상(바람직하게는 10개 이하, 보다 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하)의 아미노산 변화를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며,

[0218] 바람직하게는, 돌연변이 단백질은 N88R + S130R 치환 및 B'C' 루프 영역 서열 AGDASIH, 및 선택적으로 T3A를 포함한다.

[0219] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은

[0220] (i) 서열 번호: 27에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는

[0221] (ii) 서열 번호: 27에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는

[0222] (iii) 서열 번호: 27에 제시된 아미노산 서열에 비해 1개 이상(바람직하게는 10개 이하, 보다 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하)의 아미노산 변화를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며,

[0223] 바람직하게는, 돌연변이 단백질은 F42A + N88R + S127E 치환 및 B'C' 루프 영역 서열 AQSKNFH, 및 선택적으로 T3A를 포함한다.

[0224] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은

[0225] (i) 서열 번호: 29에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는

[0226] (ii) 서열 번호: 29에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는

[0227] (iii) 서열 번호: 29에 제시된 아미노산 서열에 비해 1개 이상(바람직하게는 10개 이하, 보다 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하)의 아미노산 변화를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며,

[0228] 바람직하게는, 돌연변이 단백질은 F42A + N88R + S127E 치환 및 B'C' 루프 영역 서열 AGDASIH, 및 선택적으로 T3A를 포함한다.

[0229] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은

[0230] (i) 서열 번호: 31에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는

[0231] (ii) 서열 번호: 31에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는

[0232] (iii) 서열 번호: 31에 제시된 아미노산 서열에 비해 1개 이상(바람직하게는 10개 이하, 보다 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하)의 아미노산 변화를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며,

[0233] 바람직하게는, 돌연변이 단백질은 K35E + N88R + S127E 치환 및 B'C' 루프 영역 서열 AQSKNFH, 및 선택적으로 T3A를 포함한다.

[0234] 본 발명에 적합한 돌연변이 및 조합 돌연변이에 대해서는 또한 출원인의 동시 계류 중인 출원 PCT/CN2021/081840을 참조하고, 이 출원의 전체 내용이 참고로 본원에 포함된다.

[0235] IL-2 돌연변이 단백질과 야생형 단백질 사이의 서열 차이는 서열 동일성 측면에서 또는 둘 사이의 아미노산의

수의 차이 측면에서 표현될 수 있다. 한 실시양태에서, IL-2 돌연변이 단백질은 야생형 단백질과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 또는 89% 동일성, 바람직하게는 90% 초과(바람직하게는 95%), 그러나 바람직하게는 97% 이하, 보다 바람직하게는 96% 이하의 동일성을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명에서 위에 기재된 돌연변이에 더하여, IL-2 돌연변이 단백질은 또한 야생형 단백질에 비해 15개 이하, 예를 들어 1~10개 또는 1~5개, 예를 들어 0, 1, 2, 3 또는 4개의 돌연변이를 가질 수 있다. 한 실시양태에서, 다른 돌연변이는 보존적 치환일 수 있다.

[0236] III. 융합 단백질 및 IL-2-Fc 이량체 단백질

[0237] 한 측면에서, 본 발명은 또한 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질을 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 한 바람직한 실시양태에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 개선된 약동학적 특성을 제공할 수 있는 또 다른 폴리펩티드, 예컨대 알부민, 바람직하게는 항체 Fc 단편에 융합된다.

[0238] 한 실시양태에서, 본 발명은 항체 Fc 단편에 융합된 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질을 포함하는 IL-2 돌연변이 단백질 융합 단백질을 제공한다.

[0239] 본 발명에서 사용하기 위한 Fc 단편은 이펙터 기능을 감소 또는 제거하는 돌연변이를 포함할 수 있다. 한 바람직한 실시양태에서, Fc 단편은 감소된 Fc-매개 이펙터 기능, 예를 들어 감소 또는 제거된 ADCC 및/또는 ADCP 및/또는 CDC 이펙터 기능을 갖는다. 예를 들어, 일부 특정 실시양태에서, 본 발명에 사용하기 위한 Fc 단편은 Fc γ 수용체에 대한 결합을 감소시키는 돌연변이 L234A/L235A 또는 L234A/L235E/G237A를 갖는다.

[0240] 또 다른 바람직한 실시양태에서, Fc 단편은 증가된 혈청 반감기를 초래하는 돌연변이, 예를 들어 FcRn에 대한 Fc 단편의 결합을 개선시키는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0241] 일부 실시양태에서, IL-2 돌연변이 단백질에 융합된 Fc 단편은 인간 IgG Fc, 예를 들어, 인간 IgG1 Fc, 인간 IgG2 Fc 또는 인간 IgG4 Fc이다. 한 실시양태에서, Fc 단편은 서열 번호: 6, 12, 42 또는 43에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 90% 동일성, 예를 들어 95%, 96%, 97%, 99% 또는 그 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0242] 일부 실시양태에서, IL-2 돌연변이 단백질은 직접적으로 또는 링커를 통해 Fc에 융합된다. 일부 실시양태에서, 링커는 CD25⁺ T 세포에 있는 Fc 융합 단백질의 활성화를 향상시키도록 선택될 수 있다. 한 실시양태에서, 링커는 (GGGGS)_n 또는 GSGS, 바람직하게는 (GGGGS)₂이다.

[0243] 추가 측면에서, 본 발명은 또한 Fc 단편에 융합된 본원에 개시된 IL-2 돌연변이체 단백질을 포함하는 이량체 분자를 제공한다. 이러한 이량체 분자를 사용하면 분자량이 60~80KDa로 증가할 수 있으며 신장 제거율이 크게 감소한다. 또한, IL2-Fc 융합 단백질의 반감기는 FcRn 매개 체내 재활용에 의해 추가로 연장될 수 있다.

[0244] 일부 실시양태, 본 발명은 동종이량체인 IL-2-Fc 이량체 단백질을 제공하고, 여기서 제1 단량체 및 제2 단량체가 N-말단에서 C-말단까지, i) IL-2 돌연변이 단백질; ii) 링커; 및 iii) Fc 단편을 포함한다.

[0245] 다른 실시양태에서, 본 발명은 이종이량체이고 하기를 포함하는 IL-2-Fc 이량체 단백질을 제공한다:

[0246] a) N-말단에서 C-말단까지, i) 상기 IL-2 돌연변이 단백질; ii) 상기 링커; 및 iii) 제1 Fc 단편을 포함하는 제1 단량체; 및

[0247] b) 제2 Fc 단편을 포함하는 제2 단량체.

[0248] 일부 실시양태에서, 상기 제1 Fc 단편 및 상기 제2 Fc 단편은 각각 상기 제1 단량체 및 상기 제2 단량체로부터 상기 이종이량체의 형성을 촉진하는 제1 이종이량체화 돌연변이 및 제2 이종이량체화 돌연변이를 포함한다. 일부 바람직한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 이종이량체화 돌연변이는 T366W/S354C/Y349C/T366S/L368A/Y407V 돌연변이 조합과 같은 노브:홀 돌연변이 조합을 포함한다.

[0249] 일부 바람직한 실시양태에서, 상기 제1 Fc 단편의 상기 제1 이종이량체화 돌연변이는 노브 돌연변이를 포함하고 상기 제2 Fc 단편의 상기 제2 이종이량체화 돌연변이는 홀 돌연변이를 포함하고; 대안적으로, 상기 제1 Fc 단편의 상기 제1 이종이량체화 돌연변이는 홀 돌연변이를 포함하고 상기 제2 Fc 단편의 상기 제2 이종이량체화 돌연변이는 노브 돌연변이를 포함한다.

[0250] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본원에 개시된 융합 단백질 및 이량체 분자에 적합한 Fc 단편은 임의의 항체 Fc 단편일 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 Fc 단편은 이펙터 기능이 억제되어 있다.

- [0251] 한 실시양태에서, Fc 단편은 Fc 영역의 이펙터 기능 및 Fc 영역의 보체 활성화 기능으로부터 선택되는 하나 이상의 특성으로 변형된다. 한 실시양태에서, 이펙터 기능 또는 보체 활성화 기능은 동일한 이소타입의 야생형 Fc 영역에 비해 감소되거나 제거되었다. 한 실시양태에서, 이펙터 기능은 Fc 영역의 글리코실화 감소, 자연적으로 감소 또는 제거된 이펙터 기능을 갖는 Fc 이소타입 사용, 및 Fc 영역 변형으로부터 선택된 방법을 사용하여 감소 또는 제거된다.
- [0252] 한 실시양태에서, 이펙터 기능은 Fc 영역의 글리코실화를 감소시킴으로써 감소되거나 제거된다. 한 실시양태에서, Fc 영역의 글리코실화는 야생형 글리코실화를 허용하지 않는 환경에서 본원에 개시된 융합 단백질 또는 이량체 분자를 생산하는 단계; Fc 영역에 이미 존재하는 탄수화물 그룹을 제거하는 단계; 및 야생형 글리코실화가 일어나지 않도록 Fc 영역을 변형시키는 단계로부터 선택된 방법을 사용하여 감소한다. 한 실시양태에서, 야생형 글리코실화가 일어나지 않도록 Fc영역을 변형시키는 방법, 예를 들어 Fc 영역의 위치 297에 돌연변이를 포함하여 해당 위치의 야생형 아스파라긴 잔기를 해당 위치, 예를 들어 N297A에서 글리코실화를 방해하는 다른 아미노산으로 대체하는 것을 이용하여 Fc영역의 글리코실화를 감소시킨다.
- [0253] 한 실시양태에서, 이펙터 기능은 적어도 하나의 Fc 영역 변형에 의해 감소되거나 제거된다. 한 실시양태에서, 적어도 하나의 Fc 영역 변형은 다음 위치로부터 선택되는, 하나 이상의 Fc 수용체에 대한 결합을 손상시키는 Fc 영역 포인트 돌연변이: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 및 439; 위치 270, 322, 329 및 321로부터 선택된 C1q에 대한 결합을 손상시키는 Fc 영역 포인트 돌연변이; 및 CH1 도메인의 위치 132에 있는 Fc 영역 포인트 돌연변이로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 이펙터 기능은 Fc 영역의 포인트 돌연변이 L234A & L235A(즉, LALA 돌연변이)에 의해 감소되거나 제거된다. 한 실시양태에서, 변형은 위치 270, 322, 329 및 321로부터 선택된 C1q에 대한 결합을 손상시키는 Fc 영역 포인트 돌연변이이다. 또 다른 실시양태에서, 변형은 일부 Fc 영역에 대한 제거이다.
- [0254] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본 발명의 이종이량체의 형성을 촉진하기 위해, 본원에 개시된 이량체 분자의 Fc 단편은 제1 단량체 및 제2 단량체의 이량체화에 유리한 돌연변이를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상응하는 노브 및 홀 돌연변이는 노브-인-홀 기술에 기초하여 제1 및 제2 단량체에 도입된다.
- [0255] 따라서, 한 실시양태에서, 본원에 개시된 이량체 분자는 하기를 포함한다:
- [0256] i) 선택적으로 돌연변이 P329G, L234A 및 L235A 또는 돌연변이 L234A 및 L235A를 갖는 인간 IgG1 서브타입의 동종이량체 Fc-영역, 또는
- [0257] ii) 선택적으로 돌연변이 P329G, S228P 및 L235E를 갖는 인간 IgG4 서브타입의 동종이량체 Fc-영역, 또는
- [0258] iii) 이종이량체 Fc-영역, 여기서
- [0259] a) 하나의 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366W를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366S, L368A 및 Y407V를 포함하거나, 또는
- [0260] b) 하나의 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366W 및 Y349C를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366S, L368A, Y407V 및 S354C를 포함하거나, 또는
- [0261] c) 하나의 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366W 및 S354C를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366S, L368A, Y407V 및 Y349C를 포함하며,
- [0262] 또는
- [0263] iv) 인간 IgG4 서브타입의 이종이량체 Fc-영역, 여기서 Fc-영역 폴리펩티드 둘 모두는 돌연변이 P329G, L234A 및 L235A를 포함하고, 및
- [0264] a) 하나의 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366W를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366S, L368A 및 Y407V를 포함하거나, 또는
- [0265] b) 하나의 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366W 및 Y349C를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366S, L368A, Y407V 및 S354C를 포함하거나, 또는
- [0266] c) 하나의 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366W 및 S354C를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366S, L368A, Y407V 및 Y349C를 포함하며,

- [0267] 또는
- [0268] iv) 인간 IgG4 서브타입의 이중이량체 Fc-영역, 여기서 Fc-영역 폴리펩티드 둘 모두는 돌연변이 P329G, S228P 및 L235E를 포함하고, 및
- [0269] a) 하나의 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366W를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366S, L368A 및 Y407V를 포함하거나, 또는
- [0270] b) 하나의 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366W 및 Y349C를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366S, L368A, Y407V 및 S354C를 포함하거나, 또는
- [0271] c) 하나의 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366W 및 S354C를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366S, L368A, Y407V 및 Y349C를 포함한다.
- [0272] 일부 실시양태에서, Fc 영역은 이중이량체의 정제를 도와주는 추가 돌연변이를 추가로 포함한다. 예를 들어, H435R 돌연변이(문헌[Eric J. Smith, *Scientific Reports* | 5:17943 | DOI: 10.1038/srep17943])는 단백질 A를 사용한 이중이량체의 정제를 촉진하기 위해 이중이량체(예를 들어, 홀 돌연변이가 있는 Fc 영역)의 Fc 영역 중 하나에 도입될 수 있다. 다른 실시양태에서, 힌지 영역을 포함하는 이중이량체 단량체의 경우, C220S와 같은 돌연변이가 또한 이중이량체의 형성을 촉진하기 위해 힌지 영역 내로 도입될 수 있다.
- [0273] 본 발명의 융합 단백질에 사용하기에 적합한 Fc 영역은 본 발명의 면역접합체의 Fc 부분에도 사용될 수 있다.
- [0274] 일부 실시양태에서, Fc에 융합된 IL-2 돌연변이 단백질은
- [0275] (i) 서열 번호: 7, 24, 26, 28, 30 또는 32에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는
- [0276] (ii) 서열 번호: 7, 24, 26, 28, 30 또는 32에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는
- [0277] (iii) 서열 번호: 7, 24, 26, 28, 30 또는 32에 제시된 아미노산 서열에 비해 1개 이상(바람직하게는 10개 이하, 보다 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하)의 아미노산 변화를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며,
- [0278] 여기서 IL-2 돌연변이 단백질은 본원에 기재된 돌연변이를 포함한다.
- [0279] 일부 실시양태에서, 본 발명의 Fc에 융합된 IL-2 돌연변이 단백질은
- [0280] (i) 서열 번호: 7에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는
- [0281] (ii) 서열 번호: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나, 또는
- [0282] (iii) 서열 번호: 7에 제시된 아미노산 서열에 비해 1개 이상(바람직하게는 10개 이하, 보다 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하)의 아미노산 변화를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며,
- [0283] 바람직하게는, 돌연변이 단백질은 N88D 치환 및 B'C' 루프 영역 서열 AGDASIH, 및 선택적으로 T3A를 포함한다.
- [0284] 일부 실시양태에서, 본 발명의 Fc에 융합된 IL-2 돌연변이 단백질은
- [0285] (i) 서열 번호: 24에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는
- [0286] (ii) 서열 번호: 24에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나, 또는
- [0287] (iii) 서열 번호: 24에 제시된 아미노산 서열에 비해 1개 이상(바람직하게는 10개 이하, 보다 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하)의 아미노산 변화를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며,
- [0288] 바람직하게는, 돌연변이 단백질은 N88R 치환 및 B'C' 루프 영역 서열 AGDASIH, 및 선택적으로 T3A를 포함한다.
- [0289] 일부 실시양태에서, 본 발명의 Fc에 융합된 IL-2 돌연변이 단백질은
- [0290] (i) 서열 번호: 26에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는

- [0291] (ii) 서열 번호: 26에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나, 또는
- [0292] (iii) 서열 번호: 26에 제시된 아미노산 서열에 비해 1개 이상(바람직하게는 10개 이하, 보다 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하)의 아미노산 변화를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며,
- [0293] 바람직하게는, 돌연변이 단백질은 N88R + S130R 치환 및 B'C' 루프 영역 서열 AGDASIH, 및 선택적으로 T3A를 포함한다.
- [0294] 일부 실시양태에서, 본 발명의 Fc에 융합된 IL-2 돌연변이 단백질은
- [0295] (i) 서열 번호: 28에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는
- [0296] (ii) 서열 번호: 28에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나, 또는
- [0297] (iii) 서열 번호: 28에 제시된 아미노산 서열에 비해 1개 이상(바람직하게는 10개 이하, 보다 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하)의 아미노산 변화를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며,
- [0298] 바람직하게는, 돌연변이 단백질은 F42A + N88R + S127E 치환 및 B'C' 루프 영역 서열 AQSKNFH, 및 선택적으로 T3A를 포함한다.
- [0299] 일부 실시양태에서, 본 발명의 Fc에 융합된 IL-2 돌연변이 단백질은
- [0300] (i) 서열 번호: 30에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는
- [0301] (ii) 서열 번호: 30에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나, 또는
- [0302] (iii) 서열 번호: 30에 제시된 아미노산 서열에 비해 1개 이상(바람직하게는 10개 이하, 보다 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하)의 아미노산 변화를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며,
- [0303] 바람직하게는, 돌연변이 단백질은 F42A + N88R + S127E 치환 및 B'C' 루프 영역 서열 AGDASIH, 및 선택적으로 T3A를 포함한다.
- [0304] 일부 실시양태에서, 본 발명의 Fc에 융합된 IL-2 돌연변이 단백질은
- [0305] (i) 서열 번호: 32에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는
- [0306] (ii) 서열 번호: 32에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나, 또는
- [0307] (iii) 서열 번호: 32에 제시된 아미노산 서열에 비해 1개 이상(바람직하게는 10개 이하, 보다 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하)의 아미노산 변화를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며,
- [0308] 바람직하게는, 돌연변이 단백질은 K35E + N88R + S127E 치환 및 B'C' 루프 영역 서열 AQSKNFH, 및 선택적으로 T3A를 포함한다.
- [0309] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본원에 개시된 융합 단백질 및 이량체 분자에서 IL-2 돌연변이 단백질과 Fc 단편을 연결하기에 적합한 링커는 당업계에 알려진 임의의 링커일 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 IgG1 힌지를 포함할 수 있거나, (GS)_n, (GSGGS)_n, (GGGGS)_n 및 (GGGS)_n으로부터 선택된 링커 서열을 포함할 수 있으며, 여기서 n은 적어도 1인 정수이다. 바람직하게는, 링커는 (G₄S)₂, 즉, GGGSGGGGS(서열 번호: 5)를 포함한다.
- [0310] **IV. 면역접합체**
- [0311] 본 발명은 본 발명의 IL2 돌연변이 단백질 또는 IL-2 돌연변이 단백질 융합 단백질(예를 들어, Fc 단편에 융합된 융합 단백질) 및 항원 결합 분자를 포함하는 면역접합체를 추가로 제공한다. 바람직하게는, 항원 결합 분자는 면역글로불린 분자, 특히 IgG 분자, 항체 또는 항체 단편, 더 특히 Fab 분자, scFv 분자 또는 (하나의 중쇄 및 하나의 경쇄를 포함하거나 이로 구성되는) 반 항체이다.
- [0312] 일부 실시양태에서, 항원 결합 분자는 종양 세포 또는 종양 환경에 존재하는 항원, 특히 및 바람직하게는 PD-1, PD-L1 및/또는 PD-L2에 특이적으로 결합한다. 따라서, 본 발명의 면역접합체는 대상체에게 투여된 후 종양 세포 또는 종양 환경을 표적으로 할 수 있고, 따라서 더 낮은 투여량의 치료 가능성 및 이에 따른 낮은 부작용 및 항

상된 면역요법 효과 또는 항종양 효과 등과 같은 추가 치료 이점을 제공한다.

- [0313] 본원에 개시된 면역접합체에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 직접적으로 또는 링커를 통해 또 다른 분자 또는 항원 결합 분자에 연결될 수 있고, 일부 실시양태에서 단백질분해 절단 부위가 그 사이에 제공된다. 본 발명의 면역접합체에서 본 발명의 IL-2 돌연변이 단백질 또는 이의 융합 단백질은 이량체화에 의해 다른 분자 또는 항원 결합 분자와 연결될 수도 있다.
- [0314] 일부 실시양태에서, 항체는 종양 관련 항원, 예를 들어 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2에 대한 항체이다.
- [0315] IL-2 돌연변이 단백질에 연결하기에 적합한 항체는 온전한 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 형태의 항체, 바람직하게는 IgG1 형태의 항체이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 인간화된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 인간 항체이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 키메라 항체이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체의 항원 결합 단편은 다음 항체 단편으로부터 선택된다: Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, 단쇄 항체(예를 들어, scFv), (Fab')₂, 단일 도메인 항체(예를 들어, VHH), 도메인 항체(dAb), 선형 항체 또는 반 항체.
- [0316] 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명의 면역접합체는 IL-2 돌연변이 단백질 또는 이의 융합 단백질 및 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0317] 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명의 면역접합체는 하기를 포함한다:
- [0318] Fc 단편에 융합되는 IL-2 돌연변이 단백질을 포함하는 제1 단량체; 및
- [0319] PD-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편, 바람직하게는 항 PD-1 항체의 중쇄 1개 및 경쇄 1개를 포함하는 단편을 포함하는 제2 단량체.
- [0320] 일부 실시양태에서, 제1 단량체에 있는 Fc 단편은 노브 돌연변이를 포함하고 제2 단량체에 있는 항체 중쇄는 홀 돌연변이를 포함하며, 그 반대도 마찬가지이다. 일부 실시양태에서, 노브 돌연변이는 노브: S354C & T366W이고, 및/또는 홀 돌연변이는 Y349C & T366S & L368A & Y407V이다.
- [0321] 한 구체적인 실시양태에서, 본 발명의 IL-2 돌연변이 단백질 융합 단백질은 도 1A에 나타난 바와 같은 형식 1의 형태를 갖는다.
- [0322] 본 발명의 한 실시양태에서, PD-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 WO2017024465A1에 개시된 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 한 실시양태에서, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 WO2017024465A1에 개시된 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 하나 이상의 CDR(바람직하게는 3개의 CDR, 즉 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 또는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3; 보다 바람직하게는 6개의 CDR, 즉 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 포함하거나, 또는 WO2017024465A1에 개시된 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 VH 및/또는 VL을 포함하거나, 또는 항체의 중쇄 및/또는 경쇄를 포함한다.
- [0323] 일부 실시양태에서, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역(HCDR): HCDR1, HCDR2 및 HCDR3으로부터의 3개의 상보성 결정 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 경쇄 가변 영역(LCDR)으로부터의 3개의 상보성 결정 영역: LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역(HCDR)으로부터의 3개의 상보성 결정 영역 및 경쇄 가변 영역(LCDR)으로부터의 3개의 상보성 결정 영역을 포함한다.
- [0324] 일부 측면에서, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역(VH)을 포함한다. 일부 측면에서, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 경쇄 가변 영역(VH)을 포함한다. 일부 측면에서, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역(VH) 및/또는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 중쇄 가변 영역으로부터의 3개의 상보성 결정 영역(CDR): HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 경쇄 가변 영역으로부터의 3개의 상보성 결정 영역(CDR): LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.
- [0325] 일부 실시양태에서, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항체 중쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항 PD-1 항체 중쇄는 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항체 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단

편은 중쇄 및 경쇄를 추가로 포함한다.

- [0326] 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 영역(VH)은
- [0327] (i) 서열 번호: 8에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는
- [0328] (ii) 서열 번호: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나, 또는
- [0329] (iii) 서열 번호: 8에 제시된 아미노산 서열에 비해 1개 이상(바람직하게는 10개 이하, 보다 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하)의 아미노산 변화(바람직하게는 아미노산 치환, 보다 바람직하게는 보존적 아미노산 치환)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 바람직하게는, 아미노산 변화는 CDR에서 발생하지 않는다.
- [0330] 일부 실시양태에서, 경쇄 가변 영역(VL)은
- [0331] (i) 서열 번호: 15에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는
- [0332] (ii) 서열 번호: 15에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나, 또는
- [0333] (iii) 서열 번호: 15에 제시된 아미노산 서열에 비해 1개 이상(바람직하게는 10개 이하, 보다 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하)의 아미노산 변화(바람직하게는 아미노산 치환, 보다 바람직하게는 보존적 아미노산 치환)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 바람직하게는, 아미노산 변화는 CDR에서 발생하지 않는다.
- [0334] 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 영역(HCDR)으로부터의 3개의 상보성 결정 영역 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3은 하기로부터 선택된다
- [0335] (i) 서열 번호: 8에 제시된 VH에 포함되는 3개의 상보성 결정 영역 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 또는
- [0336] (ii) (i)의 서열에 비해, 3개의 HCDR에서 총계 적어도 1개이며 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하의 아미노산 변화(바람직하게는 아미노산 대체, 보다 바람직하게는 보존적 대체)를 포함하는 서열.
- [0337] 일부 실시양태에서, 경쇄 가변 영역(LCDR)으로부터의 3개의 상보성 결정 영역 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 하기로부터 선택된다
- [0338] (i) 서열 번호: 15에 제시된 VL에 포함되는 3개의 상보성 결정 영역 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는
- [0339] (ii) (i)의 서열에 비해, 3개의 LCDR에서 적어도 1개이며 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하의 아미노산 변화(바람직하게는 아미노산 대체, 보다 바람직하게는 보존적 대체)를 포함하는 서열.
- [0340] 일부 실시양태에서, 서열 번호: 9에 제시된 아미노산 서열에 비해, HCDR1은 서열 번호: 9에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나, 또는 HCDR1은 1개, 2개 또는 3개의 변화(바람직하게는 아미노산 치환, 보다 바람직하게는 보존적 치환)를 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0341] 일부 실시양태에서, 서열 번호: 10에 제시된 아미노산 서열에 비해, HCDR2는 서열 번호: 10에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나, 또는 HCDR2는 1개, 2개 또는 3개의 변화(바람직하게는 아미노산 치환, 보다 바람직하게는 보존적 치환)를 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0342] 일부 실시양태에서, 서열 번호: 11에 제시된 아미노산 서열에 비해, HCDR3은 서열 번호: 11에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나, 또는 HCDR3은 1개, 2개 또는 3개의 변화(바람직하게는 아미노산 치환, 보다 바람직하게는 보존적 치환)를 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0343] 일부 실시양태에서, 서열 번호: 16에 제시된 아미노산 서열에 비해, LCDR1은 서열 번호: 16에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나, 또는 LCDR1은 1개, 2개 또는 3개의 변화(바람직하게는 아미노산 치환, 보다 바람직하게는 보존적 치환)를 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0344] 일부 실시양태에서, 서열 번호: 17에 제시된 아미노산 서열에 비해, LCDR2는 서열 번호: 17에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나, 또는 LCDR2는 1개, 2개 또는 3개의 변화(바람직하게는 아미노산 치환, 보다 바람직하게는 보존적 치환)를 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

- [0345] 일부 실시양태에서, 서열 번호: 18에 제시된 아미노산 서열에 비해, LCDR3은 서열 번호: 18에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나, 또는 LCDR3은 1개, 2개 또는 3개의 변화(바람직하게는 아미노산 치환, 보다 바람직하게는 보존적 치환)를 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0346] 일부 실시양태에서, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 불변 영역(HC)은 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4의 중쇄 불변 영역, 바람직하게는 IgG1의 중쇄 불변 영역, 예를 들어 L234A & L235A(LALA) 돌연변이를 갖는 IgG1의 중쇄 불변 영역이다. 일부 실시양태에서, 노브-인투-홀(knob-into-hole) 돌연변이가 중쇄 불변 영역에 도입된다. 예를 들어, 돌연변이 S354C 및 T366W를 도입하여 노브 돌연변이를 포함하는 항체 중쇄를 획득하고/하거나 돌연변이 Y349C & T366S & L368A & Y407V를 도입하여 홀 돌연변이를 포함하는 항체 중쇄를 획득한다. 일부 실시양태에서, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 불변 영역은 람다 또는 카파 경쇄 불변 영역이다.
- [0347] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 불변 영역은
- [0348] (i) 서열 번호: 21로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고;
- [0349] (ii) 서열 번호: 21로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는
- [0350] (iii) 서열 번호: 21로부터 선택된 아미노산 서열에 비해 1개 이상(바람직하게는 20개 또는 10개 이하, 보다 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하)의 아미노산 변화(바람직하게는 아미노산 치환, 보다 바람직하게는 보존적 아미노산 치환)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0351] 일부 실시양태에서, 홀 돌연변이를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 불변 영역은
- [0352] (i) 서열 번호: 13으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고;
- [0353] (ii) 서열 번호: 13으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는
- [0354] (iii) 서열 번호: 13으로부터 선택된 아미노산 서열에 비해 1개 이상(바람직하게는 20개 또는 10개 이하, 보다 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하)의 아미노산 변화(바람직하게는 아미노산 치환, 보다 바람직하게는 보존적 아미노산 치환)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0355] 일부 실시양태에서, 홀 돌연변이를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄는
- [0356] (i) 서열 번호: 14로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고;
- [0357] (ii) 서열 번호: 14로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는
- [0358] (iii) 서열 번호: 14로부터 선택된 아미노산 서열에 비해 1개 이상(바람직하게는 20개 또는 10개 이하, 보다 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하)의 아미노산 변화(바람직하게는 아미노산 치환, 보다 바람직하게는 보존적 아미노산 치환)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0359] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄는
- [0360] (i) 서열 번호: 22로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고;
- [0361] (ii) 서열 번호: 22로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는
- [0362] (iii) 서열 번호: 22로부터 선택된 아미노산 서열에 비해 1개 이상(바람직하게는 20개 또는 10개 이하, 보다 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하)의 아미노산 변화(바람직하게는 아미노산 치환, 보다 바람직하게는 보존적 아미노산 치환)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0363] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 불변 영역은
- [0364] (i) 서열 번호: 19로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고;
- [0365] (ii) 서열 번호: 19로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는

- [0366] (iii) 서열 번호: 19로부터 선택된 아미노산 서열에 비해 1개 이상(바람직하게는 20개 또는 10개 이하, 보다 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하)의 아미노산 변화(바람직하게는 아미노산 치환, 보다 바람직하게는 보존적 아미노산 치환)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0367] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄는
- [0368] (i) 서열 번호: 20으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고;
- [0369] (ii) 서열 번호: 20으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는
- [0370] (iii) 서열 번호: 20으로부터 선택된 아미노산 서열에 비해 1개 이상(바람직하게는 20개 또는 10개 이하, 보다 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하)의 아미노산 변화(바람직하게는 아미노산 치환, 보다 바람직하게는 보존적 아미노산 치환)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0371] 본 발명의 일부 특정 실시양태에서, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기를 포함한다:
- [0372] 서열 번호: 8에 제시된 VH에 포함된 3개의 상보성 결정 영역 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 서열 번호: 15에 제시된 VL에 포함된 3개의 상보성 결정 영역 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3.
- [0373] 본 발명의 일부 특정 실시양태에서, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기를 포함한다:
- [0374] 서열 번호: 9, 10 및 11 각각의 아미노산 서열에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 서열 번호: 16, 17 및 18 각각의 아미노산 서열에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3.
- [0375] 본 발명의 일부 특정 실시양태에서, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기를 포함한다:
- [0376] 서열 번호: 8에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된 VH, 및 서열 번호: 15에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된 VL.
- [0377] 본 발명의 일부 특정 실시양태에서, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기를 포함한다:
- [0378] 서열 번호: 14 또는 22에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된 중쇄; 및 서열 번호: 20에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된 경쇄.
- [0379] 일부 바람직한 실시양태에서, 면역접합체에 있는 항 PD-1 항체 단편은 중쇄 1개 및 경쇄 1개를 포함하거나 이로 구성된다.
- [0380] 본 발명의 일부 특정 실시양태에서, 항 PD-1 항체 단편은 하기를 포함한다:
- [0381] 서열 번호: 14에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 홀 돌연변이를 갖는 중쇄; 및
- [0382] 서열 번호: 20에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄.
- [0383] 본 발명의 면역접합체는 바람직하게는 항 PD-1 항체, Fc에 대한 IL-2 돌연변이 단백질 또는 이의 융합 단백질 및/또는 항 PD-1 항체 및 IL-2 돌연변이 단백질을 포함하는 공지된 면역접합체에 비해, 다음 특성 중 하나 이상 또는 모두를 갖는다:
- [0384] (1) 특히 야생형 IL-2 또는 이의 융합 단백질에 비해 IL-2R α 에 대한 감소 또는 제거된 결합 친화성;
- [0385] (2) 특히 Fc에 대한 IL-2 돌연변이 단백질 또는 이의 융합 단백질 및/또는 항 PD-1 항체 및 IL-2 돌연변이 단백질을 포함하는 공지된 면역접합체에 비해 IL-2R β γ 에 대한 감소된 결합 친화성;
- [0386] (3) PD-1을 발현하는 세포를 선택적으로 활성화할 수 있음, 즉, PD-1에 대해 높은 선택성을 갖고 있음;
- [0387] (4) 특히 항 PD-1 항체 및 IL-2 돌연변이 단백질을 포함하는 공지된 면역접합체에 비해 PD-1을 발현하지 않는 T

세포(예를 들어, $CD8^+$ 또는 $CD4^+$ T 세포)에서 더 낮은 활성 및 PD-1을 발현하는 T 세포(예를 들어, $CD8^+$ 또는 $CD4^+$ T 세포)에서 더 높은 활성, 이는 PD-1에 대한 높은 선택성을 나타냄;

[0388] (5) 특히 항 PD-1 항체 및 IL-2 돌연변이 단백질을 포함하는 공지된 면역접합체에 비해, IL-2 수용체를 발현(예를 들어, 과발현)하는 세포에서 더 약한 IL-2 활성;

[0389] (6) IL-2 수용체를 발현하지만 PD-1을 발현하지 않는 세포에 비해 IL-2 수용체와 PD-1을 발현하는 세포에서 더 강한 IL-2 활성, 이는 PD-1 양성 세포에 대한 선택성을 나타냄; 및

[0390] (7) 바람직하게는 항 PD-1 항체, Fc에 대한 IL-2 돌연변이 단백질 또는 이의 융합 단백질, 항 PD-1 항체와 IL-2 돌연변이 단백질 또는 이의 융합 단백질의 조합 및/또는 항 PD-1 항체 및 IL-2 돌연변이 단백질을 포함하는 공지된 면역접합체에 비해 더 강한 항종양 효과 및/또는 더 낮은 독성(예를 들어, 치료받은 대상체의 체중에 대한 효과가 없거나 더 작은 효과가 있음).

[0391] V. 폴리뉴클레오타이드, 벡터 및 숙주

[0392] 본 발명은 위의 IL-2 돌연변이 단백질 또는 융합 단백질 또는 이량체 분자 또는 접합체 중 임의의 하나에 있는 임의의 가닥 또는 임의의 단량체 또는 도메인을 코딩하는 핵산을 제공한다. 본원에 개시된 돌연변이 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 신규 고체상 DNA 합성에 의해 또는 당업계에서 알려진 방법을 사용하여 야생형 IL-2를 코딩하는 기존 서열의 PCR 돌연변이 유발에 의해 생산될 수 있다. 또한, 본원에 개시된 폴리뉴클레오타이드 및 핵산은 분비 신호 펩티드를 코딩하는 세그먼트를 포함할 수 있고, 본원에 개시된 돌연변이 단백질의 분비 발현이 지시될 수 있도록 본원에 개시된 돌연변이 단백질을 코딩하는 세그먼트에 조작 가능하게 연결된다.

[0393] 본 발명은 또한 본원에 개시된 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 한 실시양태에서, 벡터는 발현 벡터, 예를 들어, 진핵 발현 벡터이다. 벡터는 바이러스, 플라스미드, 코스미드, λ 파지 또는 효모 인공 염색체(YAC)를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 바람직한 실시양태에서, 본원에 개시된 발현 벡터는 pYD0_017 발현 벡터이다.

[0394] 또한, 본 발명은 상기 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 더 제공한다. IL-2 돌연변이 단백질, 융합체, 이량체 또는 면역접합체의 발현을 복제하고 지원하는 데 적합한 숙주 세포는 당업계에 잘 알려져 있다. 이러한 세포는 특정 발현 벡터로 형질감염되거나 형질도입될 수 있고, 벡터를 포함하는 다수의 세포는 대규모 발효기에서 접종을 위해 배양되어 임상 적용을 위한 충분한 IL-2 돌연변이, 융합체, 이량체 또는 면역접합체를 획득할 수 있다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 진핵 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 숙주 세포는 효모 세포 및 포유동물 세포(예를 들어, CHO 세포 또는 293 세포)로부터 선택된다. 이용 가능한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40 형질전환된 원숭이 신장 CV1주(COS-7), 인간 배아 신장주(293 또는 293T 세포, 예를 들어 문헌[Graham 등, *J Gen Virol* 36,59 (1977)]에 기재된 바와 같음), 아기 햄스터 신장 세포(BHK), 마우스 세르톨리 세포(TM4 세포, 예를 들어 문헌[Mather, *Biol Reprod* 23,243-251 (1980)]에 기재된 바와 같음), 원숭이 신장 세포(CV1), 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76), 인간 자궁경부암 세포(HELA), 개 신장 세포(MDCK), 버팔로 쥐 간 세포(BRL3A), 인간 폐 세포(W138), 인간 간 세포(HepG2), 마우스 유방 종양 세포(MMT060562), TRI 세포(예를 들어, 문헌[Mather 등, *Annals N.Y. Acad Sci* 383,44-68 (1982)]에 기재된 바와 같음), MRC5 세포 및 FS4 세포를 포함한다. 다른 이용 가능한 포유류 숙주 세포주는 dhfr-CHO 세포(문헌[Urlaub 등, *Proc Natl Acad Sci USA* 77,4216 (1980)])를 포함하는 차이나이즈 햄스터 난소(CHO) 세포 및 YO, NS0, P3X63, 및 Sp2/0과 같은 골수 세포주를 포함한다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 진핵 세포, 바람직하게는 포유동물 세포, 예컨대 차이나이즈 햄스터 난소(CHO) 세포, 인간 배아 신장(HEK) 세포, 또는 림프구(예를 들어, YO, NS0, 및 Sp20 세포)이다.

[0395] VI. 제조 방법

[0396] 추가 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질, 융합체, 이량체 또는 접합체를 제조하기 위한 방법을 제공하며, 여기서 상기 방법은 위에 제공된 바와 같은 IL-2 돌연변이 단백질, 융합체, 이량체 또는 접합체의 발현에 적합한 조건 하에 단백질, 융합체, 이량체 또는 접합체를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계와 선택적으로 숙주 세포(또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 단백질, 융합체, 이량체 또는 접합체를 분리시키는 단계를 포함한다.

[0397] 한 실시양태에서, IL-2 돌연변이 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 세포 내로 전달하고 발현시킨 후, 세포(또는 세포 배양 상청액)를 수집한다. IL-2 돌연변이 단백질을 추출하고 정제하여 IL-2 돌연변이 단백질을 획득한다. 한 특정 실시양태에서, 정제 방법은 친화성 정제 방법이다. 다른 구체적인 실시양태에서, 정제 방법은 이온 교환 정제이다.

- [0398] 한 실시양태에서, Fc에 융합된 IL-2 돌연변이 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 세포 내로 전달하고 발현시킨 후, 세포(또는 세포 배양 상청액)를 수집한다. Fc에 융합된 IL-2 돌연변이 단백질을 추출하고 정제하여 Fc에 융합된 IL-2 돌연변이 단백질을 획득한다. 한 특정 실시양태에서, 정제 방법은 친화성 정제 방법이다. 다른 구체적인 실시양태에서, 정제 방법은 이온 교환 정제이다.
- [0399] 한 실시양태에서, Fc에 융합된 IL-2 돌연변이 단백질을 코딩하는 핵산, PD-1 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산, 및 PD-1 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터는 세포 내로 전달되어 면역접합체 내로 발현 및 조립된 후, 세포(또는 세포 배양 상청액)를 수집하였다. 면역접합체를 추출하고 정제하여 면역접합체를 획득하였다. 한 특정 실시양태에서, 정제 방법은 친화성 정제 방법이다. 다른 구체적인 실시양태에서, 정제 방법은 이온 교환 정제이다.
- [0400] **VII. 분석**
- [0401] 본원에 제공된 IL-2 돌연변이 단백질은 당업계에 알려진 다양한 분석을 통해 이의 물리적/화학적 특성 및/또는 생물학적 활성에 대해 확인, 스크리닝 또는 특성화될 수 있다.
- [0402] 한 측면에서, 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질은 IL-2 수용체에 대한 이의 결합 활성에 대해 시험될 수 있다. 예를 들어, 인간 IL-2R α 또는 β 단백질, IL-2R β γ 또는 IL-2R α β γ 에 대한 결합은 ELISA 및 웨스턴 블롯팅과 같은 당업계에 알려진 방법에 의해, 또는 본원의 실시예에 개시된 예시적인 방법에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 세포 표면에서 돌연변이 단백질을 발현하도록 형질감염된 효모 디스플레이 세포와 같은 세포가 표지된(예를 들어, 비오틴 표지된) IL-2R α 또는 β 단백질, IL-2R β γ 또는 IL-2R α β γ 착물과 반응하는 유동 세포측정법을 사용할 수 있다. 대안적으로, 결합 동역학(예를 들어, K_D 값)을 포함하는 수용체에 대한 돌연변이 단백질의 결합은 IL-2-Fc 융합 또는 이량체 분자 형태의 SPR 분석에 의해 결정될 수 있다.
- [0403] 추가 측면에서, IL-2 수용체에 결합하는 IL-2 돌연변이 단백질의 능력은 수용체 결합의 다운스트림에서 신호전달 및/또는 면역 활성화를 측정함으로써 간접적으로 측정될 수 있다.
- [0404] 따라서, 일부 실시양태에서, 생물학적 활성을 갖는 IL-2 돌연변이 단백질을 확인하기 위한 분석이 제공된다. 생물학적 활성은 예를 들어 IL-2 수용체를 갖는 T 세포 및/또는 NK 세포 및/또는 Treg 세포의 증식을 유도하는 능력, IL-2 수용체를 갖는 T 세포 및/또는 NK 세포 및/또는 Treg 세포에서 IL-2 신호전달을 유도하는 능력, T 세포에서 세포 사멸을 유도하는 약화된 능력, 종양 퇴행을 유도하고/하거나 생존을 개선하는 능력, 및 감소된 혈관 투과성과 같은 감소된 체내 독성 특성을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명은 체내 및/또는 체외에서 이러한 생물학적 활성을 갖는 IL-2 돌연변이 단백질, 이의 Fc 융합체 및 이를 포함하는 이량체 분자를 제공한다.
- [0405] IL-2의 생물학적 활성을 결정하기 위해 당업계에 알려진 다양한 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, NK 세포에 의한 IFN- γ 생산을 자극하는 본원에 개시된(예를 들어, 이량체 분자 형태) IL-2 돌연변이 단백질의 능력을 시험하기에 적합한 분석은 배양된 NK 세포를 본원에 개시된 IL-2 돌연변이 단백질과 함께 인큐베이션하고, ELISA에 의해 배양 배지 중 IFN- γ 농도를 측정하는 단계를 포함한다. IL-2 신호전달 여러 신호전달 경로를 유도하고 JAK(야누스 키나아제) 및 STAT(신호 변환기 및 전사 활성화제) 신호전달 분자를 포함한다.
- [0406] IL-2와 수용체의 β 및 γ 서브유닛의 상호작용은 수용체와 JAK1 및 JAK3(각각 β 및 γ 서브유닛에 결합함)의 인산화를 초래한다. 그런 다음 STAT5는 인산화된 수용체에 결합하고 매우 중요한 티로신 잔기에서 인산화된다. 이것은 수용체로부터 STAT5의 해리, STAT5의 이량체화 및 표적 유전자의 전사를 촉진하는 핵으로의 STAT5 이량체의 전위를 초래한다. 따라서, IL-2 수용체를 통한 신호전달을 유도하는 돌연변이 IL-2 폴리펩티드의 능력은 예를 들어 STAT5의 인산화를 측정함으로써 평가될 수 있다. 이 방법의 세부사항은 실시예에 개시되어 있다. 예를 들어, PBMC는 본원에 개시된 돌연변이 IL-2 폴리펩티드, 융합체, 이량체 또는 면역접합체로 처리될 수 있고, 인산화된 STAT5의 수준은 유세포분석에 의해 결정된다.
- [0407] 항원에 대한 항체를 갖는 본 발명의 면역접합체의 경우, 위에 기재된 IL-2의 활성 또는 수준은 항원을 발현하는 세포에서 결정될 수 있다.
- [0408] 또한, 종양 성장 및 생존에 대한 돌연변이된 IL-2 또는 이의 융합체, 이량체 또는 면역접합체의 효과는 당업계에 알려진 다양한 동물 종양 모델에서 평가될 수 있다. 예를 들어, 암 세포주의 이종이식편을 면역결핍 마우스에 이식하고 본원에 개시된 돌연변이 IL-2 폴리펩티드, 융합체, 이량체 또는 면역접합체로 치료할 수 있다. 본원에 개시된 돌연변이 IL-2 폴리펩티드, 융합체, 이량체 분자 및 면역접합체의 체내 항종양 효과는 종양 성장 억제에 기초하여 결정될 수 있다(예를 들어, 이소타입 대조 항체 대비 계산됨). 또한, 본원에 개시된 돌연변이

IL-2 폴리펩티드, 융합체, 이량체 분자 및 면역접합체의 체내 독성은 동물의 체중 변화에 기초하여 결정될 수 있다(예를 들어, 절대 체중의 변화 또는 투여 전 체중 대비 체중의 백분율 변화). 체내 독성은 또한 사망률, 수명 관찰(행동, 체중, 체온과 같은 부작용의 가시적 증상), 및 임상 및 해부학적 병리에 기초하여 결정할 수 있다(예를 들어, 혈액 화학 값에 대한 측정 및/또는 조직병리학적 분석).

[0409] 추가 측면에서, 본원에 개시된 돌연변이 단백질의 약물 기량성(예를 들어, 발현 수율 및 생성물 순도)은 당업계에 알려진 방법을 사용하여 특성화할 수 있다. 발현 수율의 측정을 위해, 돌연변이 단백질이 배양된 세포로부터 분리되어 배양 상청액에서 발현되는 경우, 원심분리에 의해 수집된 세포 배양액에서 단백질 함량을 분석할 수 있다. 대안적으로, 분석은 수집된 세포 배양액에 대한 1단계 정제 후, 예를 들어 1단계 친화성 크로마토그래피 정제 후에 수행될 수 있다. 생성물의 순도 결정을 위해, 순도는 수집된 생산 세포의 배양 상청액에 대한 1단계 친화성 크로마토그래피 정제 후에 결정되어, 돌연변이 단백질의 정제 성능을 결정할 수 있다. 바람직하게는, 본원에 개시된 돌연변이 단백질은 해당 1단계 친화성 크로마토그래피에 의해 정제된 후, 야생형 단백질보다 상당히 높은 순도를 가지며, 이는 본원에 개시된 돌연변이 단백질이 더 나은 정제 성능을 가짐을 나타낸다. 순도 결정 방법은 SEC-HPLC 방법을 포함하나 이에 제한되지 않는 당업계에 알려진 임의의 통상적인 방법일 수 있다.

[0410] 추가 측면에서, 본원에 개시된 돌연변이 IL-2 폴리펩티드, 융합체, 이량체 분자 또는 면역접합체의 약동학적 특성, 예를 들어 반감기는 당업계에 알려진 방법을 사용하여 특성화될 수 있다.

[0411] VIII. 약제학적 조성물 및 약제학적 제제

[0412] 본 발명은 돌연변이 IL-2 폴리펩티드, 융합체, 이량체 또는 면역접합체를 포함하는 (약제학적 조성물 또는 약제학적 제제를 포함하는) 조성물 및 돌연변이 IL-2 폴리펩티드, 융합체, 이량체 또는 면역접합체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 조성물을 추가로 포함한다. 이러한 조성물은 선택적으로 완충제를 포함하여 당업계에 알려진 약제학적 담체 및 약제학적 부형제와 같은 적합한 약제학적 보충 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0413] 본원에 개시된 돌연변이 IL-2 폴리펩티드, 융합체, 이량체 또는 면역접합체를 포함하는 약제학적 조성물은 통상적인 혼합, 용해, 유화, 캡슐화, 포매 또는 동결건조 공정에 의해 제조될 수 있다. 약제학적 조성물은 단백질의 약제학적으로 사용될 수 있는 제제로의 가공을 촉진하는 하나 이상의 생리학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 부형제 또는 보조제를 사용하여 통상적인 방식으로 제제화 될 수 있다. 적합한 제제는 선택된 투여 경로에 따라 달라진다.

[0414] 면역접합체는 유리 산 또는 염기, 중성 또는 염 형태의 조성물로 제제화될 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 염은 유리 산 또는 유리 염기의 생물학적 활성을 실질적으로 유지하는 염이다. 이러한 염은 산 부가 염, 예를 들어, 단백질 조성물의 유리 아미노기, 또는 염산 또는 인산과 같은 무기 산, 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산 또는 만델산과 같은 유기 산을 사용하여 형성되는 산 부가 염을 포함한다. 유리 카복실기를 사용하여 형성되는 염은 또한 수산화 나트륨, 수산화 칼륨, 수산화 암모늄, 수산화 칼슘 또는 수산화 철과 같은 무기 염기; 또는 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘 또는 프로카인과 같은 유기 염기로부터 유래된다. 약제학적으로 허용 가능한 염은 상응하는 유리 염기 형태보다 수성 용매 및 다른 양성자성 용매에 더 잘 용해되는 경향이 있다.

[0415] IX. 조합 생성물

[0416] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 돌연변이 IL-2 폴리펩티드, 이의 융합체, 이량체 또는 면역접합체, 및 하나 이상의 다른 치료제(예를 들어, 화학요법제, 다른 항체, 세포독성제, 백신 및 항감염 활성제 등)를 포함하는 조합 생성물을 추가로 제공한다. 본 발명의 조합 생성물은 본 발명의 치료 방법에 사용될 수 있다.

[0417] 일부 실시양태에서, 조합 생성물은 암을 예방 또는 치료하기 위해 사용된다.

[0418] X. 치료 방법 및 용도

[0419] 한 측면에서, 본 발명은 대상체의 암과 같은 질환을 예방 또는 치료하기 위한 방법에 관한 것이며, 여기서 상기 방법은 대상체에게 유효량의 임의의 본원에 기재된 돌연변이 IL-2 폴리펩티드, 융합체, 이량체 또는 면역접합체를 투여하는 단계를 포함한다. 암은 초기, 중기 또는 말기 단계 암일 수 있으며, 또는 전이성 암일 수 있다. 일부 실시양태에서, 암은 고형 종양 또는 혈액 종양일 수 있다. 일부 실시양태에서, 암은 위장 종양 또는 흑색종, 예컨대 결장암 또는 결장직장암이다. 일부 실시양태에서, 종양은 잘 알려진 약물, 예컨대 알려진 항 PD-1 항체에 내성인 종양 또는 암, 예를 들어 난치성 종양 또는 암이다.

[0420] 일부 실시양태에서, 암은 PD-1, PD-L1 및/또는 PD-L2의 증가된 단백질 수준 및/또는 핵산 수준(예를 들어, 증가된 발현)을 특징으로 하는 암이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 돌연변이 IL-2 폴리펩티드, 융합체, 이량

체 또는 면역접합체는 숙주의 면역계를 자극하는 데, 예를 들어 세포의 면역 반응을 강화하는 데 사용될 수 있다. 위에 기재된 임의의 실시양태에 따른 "면역계 자극"은 면역 기능의 전반적인 증가, T 세포 기능의 증가, B 세포 기능의 증가, 림프구 기능의 회복, IL-2 수용체 발현의 증가, T 세포 반응성 증가, 자연 살해 세포 활성화 또는 림포카인 활성화 살해(LAK) 세포 활성화 증가 등 중 임의의 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0421] 본원에 개시된 돌연변이 IL-2 폴리펩티드, 융합체, 이량체 또는 면역접합체(및 이를 포함하는 약제학적 조성물, 및 선택적으로 추가 치료제)는 비경구 투여, 폐내 투여, 비강내 투여, 및 국소 치료에 필요한 경우 병변내 투여를 포함하는 임의의 적합한 방법에 의해 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근육 내, 정맥 내, 동맥 내, 복강 내 또는 피하 투여를 포함한다. 투여는 주사, 예를 들어, 정맥내 또는 피하 주사와 같은 임의의 적합한 경로에 의해 단기간 또는 장기간 투여에 따라 어느 정도 수행될 수 있다. 본원은 단일 투여 또는 여러 시점에서의 다중 투여, 볼루스 주사 및 펄스 주입을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 투여 방식을 망라한다.

[0422] 질환을 예방하거나 치료하기 위해, 본원에 개시된 돌연변이 단백질 IL-2 폴리펩티드, 융합체, 이량체 또는 면역접합체(단독으로 또는 하나 이상의 추가 치료제와 조합하여 사용됨)의 적절한 투여량은 치료할 질환의 유형, 항체의 유형, 질환의 중증도 및 진행, 항체를 투여하는 목적(예방 또는 치료), 이전 치료, 환자의 임상 이력, 항체에 대한 반응, 주치의의 재량에 따라 달라질 것이다. 항체는 단일 치료 또는 일련의 치료를 통해 환자에게 적절하게 투여된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 돌연변이 IL-2 폴리펩티드, 융합 단백질, 이량체 또는 면역접합체는 독성 없이 더 높은 용량으로 환자에게 투여될 수 있다.

[0423] 추가 측면에서, 본 발명은 전술한 방법(예를 들어, 치료용)에 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서 본원에 개시된 돌연변이 IL-2 폴리펩티드, 융합체, 이량체 또는 면역접합체의 용도를 추가로 제공한다.

[0424] 다음 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위해 기재된 것이다. 실시예는 본 발명의 청구범위를 제한하지 않으며, 어떠한 경우에도 청구범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0425] 본 발명의 이러한 측면 및 다른 측면과 실시양태를 도면(다음 도면의 간단한 설명) 및 본 발명의 다음 상세한 설명에 기술하고, 다음의 실시예를 통해 설명한다. 본 발명의 전문에 걸쳐 위에 기재된 일부 또는 전체 특징이 본 발명의 여러 실시양태에서 다양하게 조합될 수 있다. 다음 실시예는 본 발명을 추가로 설명한다. 단 실시예는 제한이 아니라 예시로 설명되며, 당업자는 다양한 변형을 가할 수 있음을 이해하여야 한다.

[0426] 실시예 1. 항 hPD-1 및 IL-2 돌연변이의 면역접합체 설계

[0427] 본 발명은 인간 PD-1에 특이적으로 결합하여 PD-1과 PD-L1의 결합을 차단하여 면역억제 메커니즘을 완화시킬 수 있고, 또한 T 세포 또는 NK 세포상에 있는 IL-2 수용체에 특이적으로 결합하여 T 세포 또는 NK 세포를 활성화하고 증폭시킬 수 있는 면역접합체 분자(α PD-1/IL-2m 면역접합체)를 설계하고, 여기서 상기 면역접합체 분자는 항 PD-1 항체 및 IL-2 돌연변이를 포함하고, PD-1 항체의 면역치료 효과를 강화할 수 있다.

[0428] 본 발명의 면역접합체 분자의 분자 형태는 도 1A에 나타나 있으며 면역접합체는 두 가지 부분: 1) PD-1에 결합하는 항체로부터 유래되는 제2 단량체, 여기서 PD-1에 결합하는 항체의 서열은 W02017024465A1로부터 유래되며; 및 2) 제1 단량체, 즉, 다음과 같이 조작된 IL-2 돌연변이(IL-2 돌연변이 단백질 또는 IL-2m): IL-2와 수용체의 착물의 결정 구조 2ERJ(도 2)에 따라, 수용체의 결합 계면에 있는 돌연변이 부위를 선택하여 IL-2와 수용체의 결합을 감소시키고; IL-2의 B'C' 루프 영역 서열(A73~R83, 서열 번호: 40에 제시된 야생형)을 최적화하여 IL-2의 약물 기량성을 개선하며, 여기서 상기 루프 영역의 최적화는 IL-2의 B'C' 루프 영역을 인간 IL-15 B'C' 루프 영역(AGDASIH, 서열 번호: 39)로 대체하는 것 또는 절단된 IL-2 B'C' 루프 영역(AQSKNFH, 서열 번호: 41)을 획득하기 위해 IL-2 B'C' 루프 영역의 마지막 4개의 아미노산을 결실시키는 것이다.

[0429] 실시예에서 사용되는 대조 분자, IL-2-Fc 융합단백질 및 IL-2 돌연변이-항 PD-1 항체 면역접합체에 대한 서열 정보는 서열 목록에서 나타나 있으며, IL-2 돌연변이 정보는 아래의 표에서 나타나 있다.

[0430] 표 1. IL-2 돌연변이-항 PD-1 항체 면역접합체 및 대조 분자

분자	돌연변이 부위	B'C' 루프 영역
2061	본 연구의 대조 분자는 US20180326010A1로부터 유래되며 IL-2R α 서브유닛에 대한 돌연변이 IL-2 폴리펩티드의 친화성을 제거하거나 감소시키도록 설계됨	WT
3010	C125S	WT
2063	T3A+N88D	IL15 B'C' 루프 영역으로 대체
2132	T3A+N88R	IL15 B'C' 루프 영역으로 대체
2149	T3A+N88R + S130R	IL15 B'C' 루프 영역으로 대체
2213	T3A+F42A+N88R + S127E	IL-2 B'C' 루프 영역의 절단
2214	T3A+F42A+N88R + S127E	IL15 B'C' 루프 영역으로 대체
2219	T3A+K35E+N88R + S127E	IL-2 B'C' 루프 영역의 절단

[0431]

[0432] 실시예 2. IL-2 수용체 및 면역접합체의 제조

[0433] IL-2 수용체의 발현 및 정제

[0434] 벡터 구축

[0435] avi 태그(GLNDIFEAQKIEWHE, 태그 펩티드는 BirA 효소 촉매 작용하에서 비오틴화될 수 있음) 및 6개의 히스티딘 태그(HHHHHH)를 IL-2 수용체 IL-2R α (UniProt: P01589, aa22-217) 서열의 C-말단에 연결시켜 pTT5 벡터 (Addgene)로 구축하고, 발현을 위해 HEK293 세포에 형질감염시킨 후, 니켈 컬럼(Histrap excel, GE, 17-3712-06)을 사용하여 친화성 정제를 수행하여 IL-2 R α 를 획득하였다.

[0436] IL-2R β γ 착물은 노브 인 홀에 기초한 Fc 이중이량체였다. Fc-노브의 N-말단(서열 번호: 37)에 IL-2R β 의 서열을 구축하고, Fc-홀의 N-말단(서열 번호: 38)에 IL-2R γ 의 서열을 구축하였다. 이들을 pcDNA3.1 벡터로 개별적으로 구축한 후 세포에 공동 형질감염시키고 발현시켰다. IL-2R β 를 함유하는 벡터 및 IL-2R γ 를 함유하는 벡터를 HEK293 세포에 동시 전달하였으며 일시적 형질감염 방법을 사용하여 발현시켰다. 먼저 슈퍼클린 벤치에서 플라스미드 DNA와 형질감염 시약 PEI(Polysciences, 23966)를 준비하였다. 3mL의 Opti-MEM 배지(Gibco, 카탈로그 번호 31985-070)를 50mL 원심분리 튜브에 첨가한 후 상응하는 플라스미드 DNA 30 μ g를 첨가하였다. 플라스미드가 함유된 Opti-MEM 배지를 0.22 μ m 여과기로 여과하였고, 90 μ g의 PEI(1g/L)를 첨가하고, 혼합물을 20분 동안 방치하였다. DNA/PEI 혼합물을 27mL의 HEK293 세포에 부드럽게 부었고, 잘 혼합하여, 37°C에서 8% CO₂로 6일 동안 배양하였다. 세포 상청액을 획득하고 정제하여 IL-2R β γ 착물을 획득하였다. 니켈 컬럼 친화성 정제: 정제를 위해 사용된 니켈 컬럼(5mL Histrap excel, GE, 17-3712-06)을 0.1M NaOH에 2시간 동안 담근 후 5 내지 10배 컬럼 부피의 초순수로 세척하여 알칼리 용액을 제거하였다. 정제 컬럼을 정제 전에 5배 정제 컬럼 부피의 결합 완충제(20mM Tris pH 7.4, 300mM NaCl)로 평형화되었다. 세포 상청액을 평형 컬럼에 통과시킨 후 10배 컬럼 부피의 세척 완충제(20mM Tris 7.4, 300mM NaCl, 10mM 이미다졸)를 컬럼에 통과시켜 비특이적 결합 이중단백질을 제거하였다. 그런 다음 표적 단백질을 3~5배 컬럼 부피의 용리액(20mM Tris 7.4, 300mM NaCl, 100mM 이미다졸)으로 용리하였다. 수집된 단백질을 한외여과 농축에 의해 PBS(Gibco, 70011-044)로 완충제 교환하고, 추가로 superdex200 increase(GE, 10/300GL, 10245605)를 사용하여 분리 및 정제하였다. 단량체의 용출 피크를 수집하였으며, 컬럼용 평형 완충제 및 용출 완충제는 PBS를 사용하였다.

[0437] Mabselect 친화성 정제: 세포를 13000rpm으로 20분 동안 원심분리하였으며 상청액을 수집하여 미리 포장된 컬럼 Histrap Mabselect Sure로 정제하였다. 절차는 다음과 같다: 패킹 컬럼은 정제 전에 5배 컬럼 부피의 평형 완충제(0.2M Tris, 0.15M NaCl, pH 7.2)로 평형화되었고; 수집된 상청액을 컬럼에 통과시킨 후, 컬럼을 10배 컬럼 부피의 평형 완충제로 세척하여 비특이적 결합 단백질을 제거하였으며; 패킹을 5배 컬럼 부피의 용리 완충제(0.1M 시트르산나트륨, pH 3.5)로 세척하였고 용리액을 수집하였으며; 용리액 1mL당 80 μ L의 Tris(2M Tris)를 첨가하였고, 혼합물을 한외여과 농축 튜브를 사용하여 PBS로 완충제 교환한 후, 농도 및 순도를 결정하였다.

[0438] 이온 교환 정제: 이중특이적 분자에 있는 이중이량체 분자를 이온 교환 크로마토그래피로 분리하였으며 동종이

량체 불순물을 제거하였다.

[0439] 면역접합체의 제조

[0440] 항 PD-1 항체의 중쇄 홀과 경쇄를 개별적으로 pcDNA3.1 벡터로 구축하였고, IL-2 단백질을 IgG1 Fc 노브의 N-말단에 링커를 통해 연결하였으며 pcDNA3.1 벡터로 구축하였다. 위의 세 가지 플라스미드 및 3배 질량의 PEI(예를 들어 1 μ g의 중쇄 홀 + 1 μ g의 경쇄 + 1 μ g의 IL-2m-링커-Fc-노브+ 9 μ g의 PEI)이 3mL의 HEK293 세포의 형질감염에 필요함)을 HEK293 세포에 동시 형질감염시켰고, 본 실시예에서 사용된 각 면역접합체 분자를 발현시키고 제조하였다.

[0441] 세포의 제조 및 샘플의 수집 및 정제는 위에 기재된 수용체의 제조 방법과 동일하다.

[0442] 실시예 3. 수용체에 대한 IL-2의 친화성 분석

[0443] 본 발명의 면역접합체와 인간 IL-2 수용체(IL2R α 또는 IL-2R β γ)의 결합에 대한 평형 해리 상수(K_D)를 표면 플라즈몬 공명(SPR)을 사용하여 결정하였다. SPR의 원리에 기초하여, 편광된 빛이 프리즘 단면에 특정 각도로 입사한 경우, 표면 플라즈마파가 프리즘과 금속의 계면에서 발생하여 금속막에 있는 자유 전자가 공명, 즉, 표면 플라즈몬 공명을 생성하게 하였다. 분석 시, 단백질 층이 센싱 칩 표면에 고정되었으며, 검출할 샘플이 칩 표면에 흐르고 있었다. 샘플에 있는 칩 표면에 있는 단백질과 상호작용할 수 있는 분자가 있었던 경우, 금속 막 표면의 굴절률이 변화되었으며 최종적으로 SPR 각도에 변화가 야기되었다. 분석물질의 친화성, 동역학 상수 등의 정보를 SPR 각도 변화를 감지함으로써 획득할 수 있었다.

[0444] 본 실시예에서, IL-2 수용체에 대한 면역접합체의 K_D 는 Biacore T200(Cytiva)에 의해 결정되었다. 구체적인 과정은 다음과 같았다: 비오틴 태그를 함유하는 IL2R α 및 IL2R β γ 단백질을 SA(스트렙타비딘)가 커플링된 칩 표면에 별도로 포획한 후, 칩 표면에 있는 단백질과 연구된 면역접합체 및 이동상에 있는 대조 분자 사이의 결합 및 해리를 친화성 및 동역학 상수를 획득하기 위해 검출하였다.

[0445] 방법은 칩 제조 및 친화성 검출을 포함한다. 분석 과정에서는 실험 완충제를 10배 희석한 10X HBS-EP+(BR-1006-69, Cytiva)를 사용하였다. 칩을 제조하는 동안, SA를 아미노 커플링 키트(BR-1006-33, Cytiva)를 사용하여 CM5 칩(29-1496-03, Cytiva) 표면에 커플링되었으며, 잔여 활성화 부위를 커플링 후 1M 에탄올아민을 주사하여 차단하였다. 친화성 분석의 각 주기는 수용체 포획, 연구할 분자의 특정 농도 결합 및 칩 재생성을 포함하였다. 구매 희석 후 분자(분자 농도 구매는 0~400nM였음)가 결합 시간 180초 및 해리 시간 300초로 30 μ L/분의 유속으로 낮은 농도에서 높은 농도의 순서로 칩 표면 위로 흐르게 했다. 마지막으로, 칩을 5mM NaOH(BR-1003-58, Cytiva)로 사용하여 재생성하였다. 데이터 결과를 Biacore T200 분석 소프트웨어(버전 번호 3.1)를 사용하고 분석 1:1 결합 또는 항상성 분석 모델을 사용하여 분석하였다.

[0446] 인간 PD1(카탈로그 번호 PD1-H5221, ACRO Biosystem)에 대한 연구할 면역접합체 또는 대조 분자의 친화성을 Biacore T200(Cytiva, T200)을 사용하여 결정하였다. 구체적인 과정은 다음과 같았다: 단백질 A(29127555, Cytiva)가 결합된 칩 표면에 연구할 분자를 포획한 후, 칩 표면에 있는 분자와 이동상에 있는 항원 사이의 결합 및 해리를 검출하여 친화성 및 동역학 상수를 획득하였다. 분석 과정에서는 실험 완충제를 10배 희석한 10X HBS-EP+(BR-1006-69, Cytiva)를 사용하였다. 친화성 분석의 각 주기는 연구할 분자의 포획, 항원의 특정 농도 결합 및 칩 재생성을 포함하였다. 구매 희석 후 항원(항원이 연구할 분자에 결합한 경우, 항원 농도 구매는 0~40nM였음)을 결합 시간 180초 및 해리 시간 600초로 30 μ L/분의 유속으로 낮은 농도에서 높은 농도 순서로 칩 표면 위로 흐르게 했다. 마지막으로, 칩을 10mM 글리신-HCl, pH 1.5(BR-1003-54, Cytiva)를 사용하여 재생성하였다. 데이터 결과를 Biacore T200 분석 소프트웨어(버전 번호 3.1)를 사용하고 1:1 결합 모델을 사용하여 분석하였다.

[0447] 표 2 및 도 3은 각각 IL-2R β γ 에 대한 면역접합체 또는 대조 분자의 결합 상수 및 결합 곡선을 나타내고, 여기서 3010은 1.09nM의 친화성으로 Fc에 융합된 야생형 IL-2 서열(서열 목록 참조)이었으며; 2061(US20180326010A1로부터 유래됨)은 대조 분자였고, 2061은 IL-2R β γ 에 대해 1.48nM의 친화성을 가졌으며; 본 연구의 IL-2 면역접합체는 3010 및 2061보다 약한 친화성을 가졌다.

[0448] 표 3 및 도 4는 각각 IL-2R α 에 대한 면역접합체 또는 대조 분자의 친화성 및 결합 곡선을 나타내고, 3010은 IL-2R α 에 대해 4.38E-08M의 친화성을 가졌으며; 2061에는 결합이 없었고; IL-2R α 에 대한 본 연구의 이중특이적 분자의 결합은 야생형 IL-2의 결합보다 약하였지만 대조 분자 2061의 결합보다 더 강하였다.

[0449] 표 4 및 도 5는 인간 PD1에 대한 면역접합체 또는 대조 분자의 친화성 및 결합 곡선을 각각 나타내며, 여기서

모든 대조 분자 및 본 연구의 분자는 인간 PD1에 대해 매우 강한 친화성을 가졌다.

표 2: IL-2R β γ 에 대한 면역접합체 또는 대조 분자의 결합 상수

샘플(분자 번호)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
3010	2.71E+05	2.94E-04	1.09E-09
2061	9.04E+04	1.34E-04	1.48E-09
2063	9.14E+04	3.88E-03	4.25E-08
2132	3.45E+04	8.88E-03	2.58E-07
2149	2.01E+04	1.27E-02	6.30E-07
2213	3.25E+04	1.51E-02	4.66E-07
2214	4.90E+05	4.92E-02	1.00E-07
2219	3.30E+04	1.82E-02	5.51E-07

표 3. IL-2R α 에 대한 면역접합체 또는 대조 분자의 친화성

샘플(분자 번호)	KD(M)
3010	4.38E-08
2061	N.B
2063	3.14E-07
2132	3.84E-07
2149	4.45E-07
2213	약한 결합
2214	약한 결합
2219	5.56E-07

표 4. 인간 PD1에 대한 면역접합체 또는 대조 분자의 친화성

샘플(분자 번호)	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
2061	4.601E+5	1.755E-4	3.815E-10
2063	3.923E+5	6.189E-5	1.578E-10
2132	4.303E+5	9.091E-5	2.113E-10
2149	4.015E+5	9.708E-5	2.418E-10
2213	4.002E+5	1.052E-4	2.627E-10
2214	4.276E+5	8.897E-5	2.081E-10
2219	4.260E+5	9.967E-5	2.340E-10

실시예 4. 면역접합체의 체외 활성 분석

I. CTLL2(huPD1-) 및 CTLL2-hPD-1(huPD1+)에 있는 PD-1에 대한 활성 분석

IL-2와 CTLL2 세포 표면에 있는 IL-2 수용체의 결합은 CTLL2 JAK-STAT 신호전달 경로를 활성화하고 리포터 유전자 신호를 촉발한다. CTLL2 세포주의 표면상에서 인간 PD-1(hPD-1, uniprot: Q15116)의 과발현은 hPD-1의 강화 효과하에서 CTLL2 JAK-STAT 신호전달 경로를 추가로 향상시킬 수 있다.

CTLL2-hPD-1 세포주의 구축:

렌트바이러스 + hPD-1 렌트바이러스의 구축 및 패키징:

1. 6×10^6 개 293T 세포를 T75 배양 플라스크에 75%~80%의 적합한 합류도로 플레이팅하였다.

[0462] 2. 패키징 시스템을 다음 표에 나열된 대로 균일하게 혼합하였고 실온에서 15분 동안 방치하였다.

성분	첨가량
Opti-MEM(gibco)	1ml
pWPT + hPD1(Genewiz)	8ug
psPAX2(SynbioTech)	4ug
pMD2g(SynbioTech)	2ug
PEI(Polysciences)	42ug

[0463]

[0464] 3. 배양 플라스크에 있는 배지는 미리 폐기하였으며, 10% FBS(PEAK)가 함유된 DMEM(ATCC) 신선한 배지 6mL를 첨가하였다. 4. 단계 (2)에서 제조된 패키징 시스템을 단계 (3)에서 대체된 배지에 첨가하였으며, 배양 플라스크를 5% CO₂의 37℃ 인큐베이터에 4~6시간 동안 방치하였다.

[0465] 5. 배양 플라스크를 5% CO₂로 37℃의 인큐베이터에서 4~6시간 동안 방치한 후, 배지를 2% 감소된 혈청 DMEM 배지로 대체하였으며, 바이러스를 48시간과 72시간에 별도로 수집하였다.

[0466] 6. 바이러스 농도: 수집된 바이러스를 원심분리하였으며 0.45μm 여과기 막을 통해 여과하였다. 각 성분의 부피비, 즉 바이러스 상청액:50% PEG8000:5M NaCl = 87:10:3에 따라 혼합물을 균일하게 혼합하였으며 4℃에서 밤새 농축하였다. 혼합물을 4℃, 3000g에서 20분 동안 원심분리한 후, 바이러스를 1mL의 CTS 배지(Gibco, A302100 2)에 재현탁시켰으며, 혼합된 용액을 4℃에서 용해시킨 후 -80℃에서 보관하였다.

[0467] CTLL2(Promega, CS2028B04)에 렌트바이러스 + hPD-1을 감염시켰으며, CTLL2-hPD-1이 안정적으로 형질감염된 세포주를 가압 선별 및 분류를 통해 획득하였다.

[0468] 실험 방법:

[0469] 1. 분석 배지를 1% MEM NEAA(Gibco, 11140-050), 10% FBS(PEAK, PS-FB1) 및 89% IMDM(Gibco, 12440-053)을 사용하여 제조하였다.

[0470] 2. CTLL2 또는 CTLL2-hPD-1 세포를 분석 배지로 2회 세척하였다.

[0471] 3. CTLL2 또는 CTLL2-hPD-1 세포의 밀도를 0.4ng/mL rhIL2(R&D, 202-IL)를 함유한 분석 배지를 사용하여 조정하였고, 세포를 96웰 백색 세포 배양 플레이트(NUNC)의 중앙에 플레이팅하였으며, 각 웰에 50000개 세포를 넣었다.

[0472] 4. 동일한 부피의 분석 배지를 가장자리 웰에 플레이팅하였으며, 세포를 18~20시간 동안 5% CO₂로 37℃에서 영양 결핍 상태로 만들었다.

[0473] 5. 희석된 시험 면역접합체 분자를 별도로 세포 플레이트에 첨가하였으며, 플레이트를 6시간 동안 5% CO₂로 37℃에서 인큐베이션하였다.

[0474] 6. 배양 플레이트를 꺼내어 15~20분 동안 실온으로 평형화시켰고; 동일한 부피의 루시페라제 분석 시스템 시약(Bio-Glo)을 각 웰에 첨가하였으며; 플레이트를 실온에서 5~15분 동안 인큐베이션하였고 마이크로플레이트 판독기(Molecular Devices)를 사용하여 판독하였다.

[0475] 결과는 도 6에 나타나 있다. 도 6의 결과는 본 연구의 αPD-1/IL-2m 면역접합체가 PD-1-음성 CTLL2에서보다 PD-1-양성 CTLL2 세포에서 더 강한 활성을 가졌다는 점을 나타내며, 여기서 2132는 두 세포 사이의 활성(EC₅₀)에서 24배 선택성을 가졌고, 2063은 42배 선택성을 가졌으며, 2149는 115배 선택성을 가졌고, 2219는 500배 선택성을 가졌으며, 2213 및 2214는 10000배 이상의 선택성을 가졌다. 결과는 본 발명의 면역접합체 분자가 PD-1-양성 CTLL2 세포를 선택적으로 활성화할 수 있음을 나타낸다.

[0476] II. αPD-1/IL2m 면역접합체 분자에 의한 PBMC에서의 pSTAT5 신호 검출

[0477] IL-2와 T 세포 표면에 있는 IL-2 수용체의 결합은 T 림프구에 있는 JAK-STAT 신호전달 경로를 활성화할 것이다. STAT5의 인산화 수준은 이러한 신호전달 경로의 활성화 수준에 대한 중요한 척도이다.

[0478] 실험 방법:

- [0479] 1. PBMC 해동
- [0480] (1) 액체 질소에 냉동보존된 PBMC(Miao Tong Biological Science & Technology Co., Ltd., 카탈로그 번호 PB100C)를 37℃에서 급속 진탕시켜 해동하였다.
- [0481] (2) 세포를 사전에 37℃로 예열해야 하는 10mL의 CTS 배지(Gibco)에 천천히 첨가하였으며, 100 µL의 DNase(STRMCELL, 카탈로그 번호 07900)를 첨가하였다.
- [0482] (3) 배지를 300g에서 8분 동안 원심분리하고 상청액을 제거하였다.
- [0483] (4) 잔류물을 10mL의 CTS에 재현탁시켰고; 현탁액을 T75 배양 플라스크로 이동시켰으며; 혼합물을 37℃의 5% 인큐베이터에서 밤새 안정화시켰다.
- [0484] 2. pSTAT5 시험
- [0485] (1) PD-1 mAb(Innovent, ADI-11416)를 Alexa Fluor™ 488 Antibody Labeling Kit(Thermo Fisher, A20181)로 표지하였고 AF488-항 인간 PD-1 형광 항체를 제조하여 밤새 배양된 현탁 PBMC를 표지하였다.
- [0486] (2) 표지된 현탁 PBMC를 96웰 U-플레이트에 5×10^5 개 세포/웰로 플레이팅하였다.
- [0487] (3) 희석 농도가 상이한 시험 면역접합체를 96웰 플레이트에 별도로 첨가하였으며, 세포를 시험 샘플과 함께 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다.
- [0488] (4) 혼합물을 400g에서 5분 동안 원심분리하고 상청액을 제거하였다.
- [0489] (5) 4% 조직 세포 고정 용액(Solarbio, P1110)을 200 µL/웰로 첨가하였으며, 플레이트를 실온, 400g에서 30분 동안 원심분리하였다.
- [0490] (6) 펄 완충제(perm buffer)를 200 µL/웰로 첨가하였으며, 플레이트를 4℃에서 30분 동안 방치한 후 400g으로 10분 동안 원심분리하였다.
- [0491] (7) 펄/세척 완충제(BD, perm/wash Buffer)를 200 µL/웰로 첨가하였으며, 세포를 2회 세척하였다.
- [0492] (8) 항체 염색 용액을 준비하였다. AF647-pSTAT5 항체의 양은 3 µL/100 µL 펄/세척 완충제/웰이었다. 잔여 염색 항체의 양은 1 µL/100 µL 펄/세척 완충제/웰이었다. 인큐베이션을 실온에서 1.5시간 동안 수행한 후 펄/세척 완충제로 2회 세척하였다.

이름	제조사	카탈로그 번호/모델
BV421 항 인간 CD3	Biolegend	300434
PE 항 인간 CD4	Biolegend	300508
AF700 항 인간 CD8a	Biolegend	300924
BV785 항 인간 CD25	Biolegend	356140
Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28	Invitrogen	11131D
AF647-pSTAT5 항체	BD	562076
AlexaFluor™488 Antibody Labeling Kit	Thermo Fisher	A20181
펄/세척 완충제	BD	554723
펄 완충제 III	BD	558050
인간 IgG 이소타입	abcam	Ab206195

- [0493]
- [0494] (9) 월당 150 µL 펄/세척 완충제에서 재현탁을 수행한 후 유세포 분석을 수행하였다.
- [0495] III. 면역접합체 분자에 의한 활성화된 PBMC에서 pSTAT5 신호의 검출
- [0496] 활성화된 T 림프구에서 pSTAT5 신호에 대한 면역접합체의 효과를 조사하였으며 T 림프구 활성화 후 PD-1의 작용 하에서 검증하였다.
- [0497] 1. PBMC 해동
- [0498] (1) 액체 질소에서 냉동보존된 PBMC를 37℃에서 빠르게 진탕하여 해동하였다.

- [0499] (2) 세포를 10mL의 CTS 배양 배지(37℃에서 예열되고 100 μ L의 DNase 함유)에 천천히 첨가하였다.
- [0500] (3) 배지를 300g에서 8분 동안 원심분리하고 상청액을 제거하였다.
- [0501] (4) 잔류물을 10mL의 CTS에 재현탁시켰고; 현탁액을 T75 배양 플라스크로 이동시켰으며; 혼합물을 37℃의 5% 인큐베이터에서 밤새 안정화시켰다.
- [0502] 2. T 림프구의 활성화 및 휴지
- [0503] (1) 밤새 배양된 현탁된 PBMC를 계수하였으며, 동일한 수의 CD3/CD28 비드를 첨가하여 48시간 동안 활성화하고 자극하였다.
- [0504] (2) 비드와 배양 배지를 제거하였으며 활성화된 세포를 세척하였다.
- [0505] (3) 활성화된 세포를 T75 배양 플라스크로 옮기고 48시간 동안 37℃/5%에서 휴지시켰다.
- [0506] 3. pSTAT5 시험
- [0507] (1) PD-1 mAb(Innovent, ADI-11416)를 Alexa Fluor™ 488 Antibody Labeling Kit(Thermo Fisher, A20181)로 표지하였으며 AF488-항 인간 PD-1 형광 항체를 제조하여 활성화되고 휴지되는 T 세포를 표지하였다.
- [0508] (2) 세포를 96웰 U-플레이트에 5×10^5 개 세포/웰로 플레이트링하였다.
- [0509] (3) 상이한 희석된 시험 항체를 96웰 플레이트에 개별적으로 첨가하였으며 세포를 시험 분자와 함께 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다.
- [0510] (4) 혼합물을 400g에서 5분 동안 원심분리하고 상청액을 제거하였다.
- [0511] (5) 4% 조직 세포 고정 용액을 200 μ L/웰로 첨가하였으며, 플레이트를 실온, 400g에서 30분 동안 원심분리하였다.
- [0512] (6) 펄 완충제를 200 μ L/웰로 첨가하였으며, 플레이트를 4℃에서 30분 동안 방치한 후 400g으로 10분 동안 원심 분리하였다.
- [0513] (7) 펄/세척 완충제를 200 μ L/웰로 첨가하였으며, 세포를 2회 세척하였다.
- [0514] (8) 항체 염색 용액을 준비하였다. pSTAT5 항체(BD)의 양은 3 μ L/100 μ L 펄/세척 완충제/웰이었다. 잔여 염색 항체의 양은 1 μ L/100 μ L 펄/세척 완충제/웰이었다. 인큐베이션을 실온에서 1.5시간 동안 수행한 후 펄/세척 완충제로 2회 세척하였다.
- [0515] (9) 월당 150 μ L 펄/세척 완충제에서 재현탁을 수행한 후 유세포 분석을 수행하였다.
- [0516] 도 7의 결과는 본 연구의 분자의 활성이 PD-1-음성(PD-1-) T 세포(CD4+PD1-T 또는 CD8+PD1-T)에서 대조 분자 2061보다 약하고; PD-1-양성(PD-1+) T 세포(CD4+PD1+T 또는 CD8+PD1+T)에서 2063의 활성이 대조 분자 2061의 활성보다 우수함을 나타내며, 이는 PD-1에 대한 2063의 선택성이 2061의 선택성보다 더 크고, PD-1+ T 세포에서 본 연구의 다른 분자의 활성도 2061의 활성보다 약함을 나타내며, 이는 고효율 IL-2에 의해 유발된 본 연구의 분자의 독성이 2061보다 더 적고, 체내에서 견딜 수 있는 용량도 2061보다 높음을 나타낸다.
- [0517] IV. HEK-Blue™ IL-2 세포 리포터 분석을 사용한 본 발명의 면역접합체의 활성 분석
- [0518] HEK293 세포에서, 과발현된 IL2R(CD25, CD122 및 CD132), JAK3 및 STAT5 유전자가 도입되었고, IL2 신호전달 경로를 갖는 HEK293 + hIL2R/SEAP 세포주(huPD-1-세포, HEK-Blue™ IL-2 세포, Invivogen, hkb-il2)가 구축되었으며, HEK293 + hIL2R/SEAP 세포 리포터 유전자가 IL2의 작용하에서 활성화되었다.

[0519] 재료

이름	제조업체/브랜드	카탈로그 번호/모델
DMEM 배지	Gibco	11965-118
Normocin	Invivogen	ANT-NR-1
페니실린-스트렙토마이신	Gibco	15070-063
호주 소 태아 혈청(FBS)	PeakSerum	PS-FB1
HEK-Blue™ IL-2 세포	Invivogen	hkb-il2
QUANTI-Blue	Invivogen	REP-QBS2
F96 MicroWell 플레이트	NUNC	167008
형광 정량적 마이크로플레이트 리더	Molecular Devices	spectra Max I3x
원심분리기	Thermo	ST40R

[0520]

[0521] HEK293 + hIL2R + hPD-1/SEAP 세포주의 구축: 렌트바이러스 + hPD-1 렌트바이러스를 위와 같이 구축하고 패키징 하였으며, HEK293 + h IL2R/SEAP(Invivogen, hkb-il2)를 렌트바이러스 + PD-1로 감염시켰고, HEK293 + hIL2R + hPD-1/SEAP가 안정적으로 형질감염된 세포주(huPD-1+ 세포)를 가압 선별 및 분류를 통해 획득하였으며, 다음 실험에 사용하였다.

[0522] 실험 방법:

[0523] 1. 세포를 소화시켰고, 세포 밀도를 조정하였으며, 플레이트 중앙의 60개 웰에 50000개 세포/웰로 세포를 플레이트하였다.

[0524] 2. 도면에 나타난 바와 같은 희석된 면역접합체와 대조 분자를 각각의 세포 웰에 별도로 첨가하였으며 플레이트를 37℃에서 20~24시간 동안 인큐베이션하였다.

[0525] 4. 20 μ L의 세포 배양 상청액을 취하였고, 180 μ L의 QUANTI-Blue를 첨가하였으며; 혼합물을 실온에서 15분 동안 방치한 후, OD630을 측정하였다.

[0526] HEK-Blue™ IL-2 세포(huPD-1-세포)는 IL-2 수용체를 과발현하는 HEK293 세포였다. 도 8 및 표 4에서 볼 수 있듯이, 본 연구에서 획득한 면역접합체는 2061에 비해 IL-2에서 적어도 3.14배 더 활성이었으며, 최대 감소는 2.21E+08배였다.

[0527] PD-1을 과발현하는 세포(HEK293 + hIL2R + hPD-1/SEAP가 안정적으로 형질감염된 세포주(huPD-1+ 세포))에서, 면역접합체는 매우 강한 IL-2 활성을 달성할 수 있었고, 2개의 세포에 대해 매우 높은 선택성을 유지할 수 있었는데, 예를 들어, 2063의 선택성은 3.52배에 도달할 수 있었고, 2132의 선택성은 53.45배에 도달할 수 있었으며, 2149의 선택성은 96.04배에 도달할 수 있었고, 2219의 선택성은 606.11배에 도달하였으며, 2214의 선택성은 5119.78배에 도달하였고, 2213의 선택성은 1.57E+07배에 도달하였다.

[0528] 표 4. PD-1- 세포 및 PD-1+ 세포에서 본 연구의 면역접합체의 선택적 활성

	2061	2063	2132	2149	2213	2214	2219
배수#	1	3.52	53.45	96.04	1.57E+7	5119.78	606.11

[0529]

[0530] #: 배수 = PD-1- 리포터 분석에서 분자의 EC₅₀/PD-1+ 리포터 분석에서 분자의 EC₅₀

[0531] 실시예 5. 면역접합체의 체내 약력학적 실험

[0532] 체내에서 α PD-1/IL2m 면역접합체의 효능을 입증하기 위해, hPD-1 녹인(knock-in) 마우스에 MC38 세포(마우스 결장암 세포주, OBiO Technology (Shanghai) Co., Ltd.)를 접종하여 본 발명의 이중 기능성 PD-1 항체 및 IL-2 돌연변이 분자 면역접합체(2063 및 2132)의 항종양 효능을 결정하였다. 인증 번호 20170010005748의 SPF 암컷 hPD-1 녹인 마우스(Shanghai Model Organisms Center, Inc.로부터 구입)를 실험에서 사용하였다.

[0533] MC38 세포를 후속 체내 연구를 위해 통상적으로 계대 배양하였다. MC38 세포를 원심분리에 의해 수집하고 PBS(1 $\times$)에 재현탁하여 5 $\times$ 10⁶개 세포/mL의 세포 농도를 갖는 세포 현탁액을 형성하였다. 0일차에, 0.2mL의 세포 현

탁액을 hPD-1 녹인 마우스의 우측 복부 부위에 피하 접종하여 MC38 종양-보유 마우스 모델을 확립하였다.

[0534] 종양 세포 접종 6일 후, 각 마우스의 종양 부피를 측정하였다. 마우스를 8개의 그룹으로 나누었다. 투여량 및 투여 경로는 표 5에 나타나 있다.

[0535] 표 5. 체내 실험에서 그룹과 투여량 및 투여 경로

그룹	투여량	투여 빈도	투여 경로
h-IgG*	20mg/kg	QWx3	복강내 주사
2063	10mg/kg	QWx3	복강내 주사
2132	10mg/kg	QWx3	복강내 주사

[0537] *: h-IgG는 Equitech-Bio(로트 번호 161206-0656)로부터 구입한 이소타입 대조 항체였음.

[0538] h-IgG, 2063 및 2132는 각각 2mg/mL, 1mg/mL 및 1mg/mL의 농도로 사용되었으며, 매주 1회 총 3회 용량(QW×3)으로 투여되었음. 투여는 MC38 세포 접종 후 6일, 13일 및 20일에 수행하였다. 마우스의 종양 부피 및 체중은 도 9A에 나타난 바와 같이 24일 동안 주 2회 모니터링하였다.

[0539] 접종 후 24일차에 상대 종양 성장 억제(TGI%)를 다음 식에 의해 계산하였다: $TGI\% = 100\% \times (\text{대조 그룹 종양 부피} - \text{치료 그룹 종양 부피}) / (\text{대조 그룹 종양 부피} - \text{투여 전의 대조 그룹 종양 부피})$. 종양 부피 측정: 종양의 장축(L)의 최대 길이와 단축(W)의 최대 길이는 버니어 캘리퍼(vernier caliper)로 측정했고, 종양의 부피는 다음 식을 사용하여 계산했다: $V = L \times W^2 / 2$. 마우스의 체중을 전자저울을 사용하여 측정하였다.

[0540] 종양 성장 억제 결과는 표 6에 나타나 있다: 접종 후 24일차에 2063 및 2132는 20mg/kg h-IgG 그룹에 비해 각각 98% 및 96%의 종양 성장 억제를 가졌다. 한편, 마우스의 체중 측정 결과(도 9B)는 접종 후 24일차에 마우스의 체중에 유의한 차이가 없음을 나타낸다.

[0541] 표 6. 항종양 효능 통계

그룹	종양 부피(mm ³)	종양 성장 억제(%)
h-IgG	2329.61	N/A
2063	112.47	98
2132	170.91	96

[0542] 체내에서 αPD-1/IL2m 면역접합체의 효능이 부모 항 PD-1 모노클로날 항체(Sintilimab, IBI308로도 알려져 있음)의 효능 보다 우수함을 추가로 입증하기 위해, hPD-1 녹인 마우스에 MC38 세포(마우스 결장암 세포주, OBiO Technology(Shanghai) Co., Ltd.)를 접종하여 본 발명의 면역접합체(2063)의 항종양 효능을 결정하였다. 인증 번호 20170010004237의 SPF 암컷 hPD-1 녹인 마우스(Shanghai Model Organisms Center, Inc.로부터 구입)를 실험에서 사용하였다.

[0544] MC38 세포를 후속 체내 연구를 위해 통상적으로 계대 배양하였다. MC38 세포를 원심분리에 의해 수집하고 PBS(1×)에 재현탁하여 5×10^6 개 세포/mL의 세포 농도를 갖는 세포 현탁액을 형성하였다. 0일차에, 0.2mL의 세포 현탁액을 hPD-1 녹인 마우스의 우측 복부 부위에 피하 접종하여 MC38 종양-보유 마우스 모델을 확립하였다.

[0545] 종양 세포 접종 12일 후, 각 마우스의 종양 부피를 측정하였다. 마우스를 8개의 그룹으로 나누었다. 투여량 및 투여 경로는 표 7에 나타나 있다.

[0546] 표 7. 체내 실험에서 그룹과 투여량 및 투여 경로

그룹	투여량	투여 빈도	투여 경로
h-IgG*	10mg/kg	QWx3	복강내 주사
2063	10mg/kg	QWx3	복강내 주사
IBI308	10mg/kg	QWx3	복강내 주사

[0548] *: h-IgG는 Equitech-Bio(로트 번호 161206-0656)로부터 구입한 이소타입 대조 항체였음.

[0549] h-IgG, 2063 및 IBI308을 모두 1mg/mL의 농도로 사용하였으며, 매주 1회 총 3회(QW×3) 투여하였다. 투여는 MC38 세포 접종 후 12일, 19일 및 26일에 수행하였다. 마우스의 종양 부피 및 체중은 도 10A에 나타난 바와 같이 29일 동안 주 2회 모니터링하였다. 접종 후 29일차에 상대 종양 성장 억제(TGI%)를 다음 식에 의해 계산하였다: $TGI\% = 100\% \times (\text{대조 그룹 종양 부피} - \text{치료 그룹 종양 부피}) / (\text{대조 그룹 종양 부피} - \text{투여 전의 대조 그룹 종양 부피})$. 종양 부피 측정: 종양의 장축(L)의 최대 길이와 단축(W)의 최대 길이는 버니어 캘리퍼(vernier caliper)로 측정했고, 종양의 부피는 다음 식을 사용하여 계산했다: $V = L \times W^2 / 2$. 마우스의 체중을 전자저울을 사용하여 측정하였다.

[0550] 종양 성장 억제 결과는 표 8에 나타나 있다: 접종 후 29일차에 2063 및 IBI308은 20mg/kg h-IgG 그룹에 비해 각각 112% 및 56%의 종양 성장 억제를 가졌다. 한편, 마우스의 체중 측정 결과(도 10B)는 접종 후 29일차에 마우스의 체중에 유의한 차이가 없음을 나타낸다.

[0551] 표 8. 항종양 효능 통계

그룹	종양 부피(mm ³)	종양 성장 억제(%)
h-IgG	2041.49	N/A
2063	66.19	112
IBI308	1057.37	55

[0552]

[0553] 체내에서 αPD-1/IL2m 면역접합체의 효능을 추가로 입증하기 위해, hPD-1 녹인 마우스에 PD-1 항체-저항성 B16F10 세포(마우스 흑색종 세포주, ATCC, CRL-6475)를 접종하여 αPD-1/IL2m 면역접합체(2063), 부모 항 PD-1 모노클로날 항체(IBI308) 및 PD-1 모노클로날 항체 및 IL2m-Fc 융합 단백질(2124, IL-2 서열은 2063과 동일하고, 서열은 서열목록에 나타냄)의 조합 투여의 항종양 효능을 결정하였다. 인증 번호 20170010004768의 SPF 암컷 hPD-1 녹인 마우스(Shanghai Model Organisms Center, Inc.로부터 구입)를 실험에서 사용하였다.

[0554] B16F10 세포를 후속 체내 연구를 위해 통상적으로 계대 배양하였다. B16F10 세포를 원심분리에 의해 수집하고 PBS(1×)에 재현탁하여 2.5×10^6 개 세포/mL의 세포 농도를 갖는 세포 현탁액을 형성하였다. 0일차에, 0.2mL의 세포 현탁액을 hPD-1 녹인 마우스의 우측 복부 부위에 피하 접종하여 B16F10 종양-보유 마우스 모델을 확립하였다.

[0555] 종양 세포 접종 7일 후, 각 마우스의 종양 부피를 측정하였다. 마우스를 6개의 그룹으로 나누었다. 투여량 및 투여 경로는 표 9에 나타나 있다.

[0556] 표 9. 체내 실험에서 그룹과 투여량 및 투여 경로

그룹	투여량	투여 빈도	투여 경로
h-IgG*	10mg/kg	QWx3	복강내 주사
IBI308	10mg/kg	QWx3	복강내 주사
IBI308 + 2124	10mg/kg + 6mg/kg	QWx3	복강내 주사
2063	10mg/kg	QWx3	복강내 주사

[0557]

[0558] *: h-IgG는 Equitech-Bio(로트 번호 161206-0656)로부터 구입한 이소타입 대조 항체였음.

[0559] h-IgG, IBI308, 2124 및 2063은 각각 1mg/mL, 1mg/mL, 0.6mg/mL 및 1mg/mL의 농도로 사용하였으며, 매주 1회 총 3회 용량(QW×3)으로 투여하였다. 투여는 B16F10 세포 접종 후 8일, 15일 및 22일에 수행하였다. 마우스의 종양 부피 및 체중은 도 11A 내지 도 11C에 나타난 바와 같이 28일 동안 주 2회 모니터링하였다.

[0560] B16F10 세포는 마우스 사망을 유도하기 위해 쉽게 전이되었기 때문에, 상대적인 종양 성장 억제(TGI%)는 접종 후 22일차에 다음 식에 의해 계산되었다: $TGI\% = 100\% \times (\text{대조 그룹 종양 부피} - \text{처리 그룹 종양 부피}) / (\text{대조 그룹 종양 부피} - \text{투여 전 대조 그룹 종양 부피})$. 종양 부피 측정: 종양의 장축(L)의 최대 길이와 단축(W)의 최대 길이는 버니어 캘리퍼(vernier caliper)로 측정했고, 종양의 부피는 다음 식을 사용하여 계산했다: $V = L \times W^2 / 2$. 마우스의 체중을 전자저울을 사용하여 측정하였다. 종양 부피가 2000mm³ 초과인 마우스를 안락사시켰다. 그룹에서 절반 이상의 사망이 발생한 경우, 전체 그룹의 종양 성장 곡선을 이러한 시점에 나타내지 않았다.

[0561] 종양 증식 억제 결과는 표 10에 나타나 있다: 접종 후 22일차에, IBI308, IBI308 + 2214 및 2063은 h-IgG 그룹

에 비해 각각 2%, 84% 및 99% 종양 성장 억제를 가졌으며 2063의 CR 속도는 비표적 IL2m-Fc 분자(2124)와 조합한 IBI308 및 IBI308보다 유의하게 우수하였다. 한편, 마우스의 체중 측정 결과(도 11C)는 모니터링 동안 마우스의 체중에 유의한 차이가 없음을 나타낸다.

표 10. 항종양 효능 통계

그룹	종양 부피(mm ³)	종양 성장 억제(%) 17일차	완전 반응률* 28일차
h-IgG	2900.61	N/A	0/6
IBI308	2838.44	2	0/6
IBI308 + 2124	362.03	90	0/6
2063	90.74	99	3/6

*완전 반응률: 종양의 부피가 0이 되어 종양이 완전히 퇴행되었음.

체내에서 본 발명의 αPD-1/IL2m 면역접합체 2149의 효능을 추가로 입증하기 위해, hPD-1 녹인 마우스에 MC38 세포(마우스 결장암 세포주, OBiO Technology(Shanghai) Co., Ltd.)를 접종하여 본 발명의 면역접합체(2149)의 항종양 효능을 결정하였다. 인증 번호 20170010006762의 SPF 암컷 hPD-1 녹인 마우스(Shanghai Model Organisms Center, Inc.로부터 구입)를 실험에서 사용하였다.

MC38 세포를 후속 체내 연구를 위해 통상적으로 계대 배양하였다. MC38 세포를 원심분리에 의해 수집하고 PBS(1 ×)에 재현탁하여 5 × 10⁶ 개 세포/mL의 세포 농도를 갖는 세포 현탁액을 형성하였다. 0일차에, 0.2mL의 세포 현탁액을 hPD-1 녹인 마우스의 우측 복부 부위에 피하 접종하여 MC38 종양-보유 마우스 모델을 확립하였다.

종양 세포 접종 8일 후, 각 마우스의 종양 부피를 측정하였다. 마우스를 8개의 그룹으로 나누었다. 투여량 및 투여 경로는 표 11에 나타나 있다.

표 11. 체내 실험에서 그룹과 투여량 및 투여 경로

그룹	투여량	투여 빈도	투여 경로
h-IgG*	40mg/kg	QWx3	복강내 주사
2149, 10mg/kg	10mg/kg	QWx3	복강내 주사
2149, 20mg/kg	20mg/kg	QWx3	복강내 주사
2149, 40mg/kg	40mg/kg	QWx3	복강내 주사

*: h-IgG는 Equitech-Bio(로트 번호 161206-0656)로부터 구입한 이소타입 대조 항체였음.

h-IgG, 10mg/kg의 2149, 20mg/kg의 2149 및 40mg/kg의 2149를 각각 4mg/mL, 1mg/mL, 2mg/mL 및 4mg/mL의 농도로 사용하였으며, 매주 1회 총 3회 용량(QW×3)으로 투여하였다. 투여는 MC38 세포 접종 후 8일, 15일 및 22일에 수행하였다. 마우스의 종양 부피 및 체중은 도 12A 내지 도 12B에 나타난 바와 같이 주 2회 모니터링하였다. 종양 부피가 2000mm³ 초과인 마우스를 안락사시켰으며, 마우스를 61일 동안의 실험 전반에 걸쳐 모니터링하였다. 일부 그룹에서 2000mm³ 초과 종양 부피를 갖는 마우스가 안락사되었기 때문에, 상대적인 종양 성장 억제(TGI%)는 접종 후 36일차에 다음 식에 의해 계산하였다: TGI% = 100% × (대조 그룹 종양 부피 - 치료 그룹 종양 부피)/(대조 그룹 종양 부피 - 투여 전 대조 그룹 종양 부피). 종양 부피 측정: 종양의 장축(L)의 최대 길이와 단축(W)의 최대 길이는 버니어 캘리퍼(vernier caliper)로 측정했고, 종양의 부피는 다음 식을 사용하여 계산했다: V = L × W²/2. 마우스의 체중을 전자저울을 사용하여 측정하였다.

도 12A 및 도 12B의 종양 성장 곡선 및 생존 곡선은 상이한 용량에서 2149 분자의 항종양 효능이 용량 의존적이었으며 마우스에 있는 종양은 20mg/kg 및 40mg/kg 그룹에서 완전히 퇴행되었음을 나타낸다. 또한, 이러한 이점은 도 12B의 생존 곡선에서도 나타났는데, 즉, 마우스에 있는 종양은 20mg/kg 및 40mg/kg 그룹에서 완전히 퇴행된 반면, 8마리의 마우스 중 2마리에서만 10mg/kg 그룹의 종양은 완전히 퇴행되었다. 종양 성장 억제 결과는 표 12에 나타나 있다: 접종 후 36일차에 10mg/kg의 2149, 20mg/kg의 2149 및 40mg/kg의 2149는 h-IgG 그룹에 비해 각각 84%, 103% 및 103% 종양 성장 억제를 가졌다. 한편, 마우스의 체중 측정 결과(도 12C)는 접종 후 36일차에

마우스의 체중에 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

표 12. 항종양 효능 통계

그룹	종양 부피(mm ³)	종양 성장 억제(%) 17일	완전 반응률*
		차	36일차
h-IgG	2426.63	N/A	0/8
2149, 10mg/kg	458.62	84	2/8
2149, 20mg/kg	0	103	8/8
2149, 40mg/kg	0	103	8/8

*완전 반응률: 종양의 부피가 0이 되어 종양이 완전히 퇴행되었음.

체내에서 면역접합체 2149의 효능을 입증하기 위해, hPD-1 녹인 마우스에 PD-1 항체-저항성 B16F10 세포(마우스 흑색종 세포주, ATCC, CRL-6475)를 접종하여 본 발명의 이중 기능성 PD-1 항체 및 IL-2 돌연변이 분자 융합 단백질(2149)의 항종양 효능을 결정하였다. 인증 번호 20170010007909의 SPF 암컷 hPD-1 녹인 마우스(Shanghai Model Organisms Center, Inc.로부터 구입)를 실험에서 사용하였다.

B16F10 세포를 후속 체내 연구를 위해 통상적으로 계대 배양하였다. B16F10 세포를 원심분리에 의해 수집하고 PBS(1×)에 재현탁하여 2.5×10^6 개 세포/mL의 세포 농도를 갖는 세포 현탁액을 형성하였다. 0일차에, 0.2mL의 세포 현탁액을 hPD-1 녹인 마우스의 우측 복부 부위에 피하 접종하여 B16F10 종양-보유 마우스 모델을 확립하였다.

종양 세포 접종 6일 후, 각 마우스의 종양 부피를 측정하였다. 마우스를 8개의 그룹으로 나누었다. 투여량 및 투여 경로는 표 13에 나타나 있다.

표 13. 체내 실험에서 그룹과 투여량 및 투여 경로

그룹	투여량	투여 빈도	투여 경로
h-IgG*	40mg/kg	QWx3	복강내 주사
IBI308, 20mg/kg	20mg/kg	QWx3	복강내 주사
IBI308, 40mg/kg	40mg/kg	QWx3	복강내 주사
2149, 20mg/kg	20mg/kg	QWx3	복강내 주사
2149, 40mg/kg	40mg/kg	QWx3	복강내 주사

*: h-IgG는 Equitech-Bio(로트 번호 161206-0656)로부터 구입한 이소타입 대조 항체였음.

h-IgG, 20mg/kg의 IBI308, 40mg/kg의 IBI308, 20mg/kg의 2149 및 40mg/kg의 2149를 각각 4mg/mL, 2mg/mL, 4mg/mL, 2mg/mL 및 4mg/mL의 농도로 사용하였으며, 매주 1회 총 3회 용량(QW×3)으로 투여하였다. 투여는 B16F10 세포 접종 후 8일, 15일 및 22일에 수행하였다. 마우스의 종양 부피 및 체중은 도 13A 내지 도 13B에 나타난 바와 같이 22일 동안 주 2회 모니터링하였다. B16F10 세포는 마우스 사망을 유도하기 위해 쉽게 전이되었기 때문에, 상대적인 종양 성장 억제(TGI%)는 접종 후 15일차에 다음 식에 의해 계산되었다: $TGI\% = 100\% \times (\text{대조 그룹 종양 부피} - \text{치료 그룹 종양 부피}) / (\text{대조 그룹 종양 부피} - \text{투여 전 대조 그룹 종양 부피})$. 종양 부피 측정: 종양의 장축(L)의 최대 길이와 단축(W)의 최대 길이는 버니어 캘리퍼(vernier caliper)로 측정했고, 종양의 부피는 다음 식을 사용하여 계산했다: $V = L \times W^2 / 2$. 마우스의 체중을 전자저울을 사용하여 측정하였다. 종양 부피가 2000mm³ 초과인 마우스를 안락사시켰다.

도 13A 및 도 13B의 종양 성장 곡선은 PD1 저항성 모델에서, IBI308은 거의 효능을 나타내지 않았으나, 20mg/kg 및 40mg/kg의 2149 그룹은 소정의 항종양 효과를 나타내었으며, 고용량 그룹은 저용량 그룹보다 더 양호한 항종양 효과를 가졌고, 이는 마우스의 생존 곡선에 동시에 반영되었으며; 고용량 그룹은 실험 종료점에서 2마리의 마우스에서 여전히 완전 종양 퇴행을 갖고 있음을 나타낸다(도 13C 및 표 14).

종양 성장 억제 결과는 표 12에 나타나 있다: 접종 후 15일차에, 20mg/kg의 IBI308, 40mg/kg의 IBI308, 20mg/kg의 2149 및 40mg/kg의 2149는 40mg/kg의 h-IgG 그룹에 비해 각각 29%, 27%, 82% 및 86% 종양 성장을 억

제하였다. 한편, 마우스의 체중 측정 결과(도 13D)는 접종 후 22일차에 마우스의 체중에 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

표 14. 항종양 효능 통계

그룹	종양 부피(mm ³)	종양 성장 억제(%) 15일차	완전 반응률 22일차
h-IgG	1014.92	N/A	0/6
IBI308, 20mg/kg	735.02	29	0/6
IBI308, 40mg/kg	757.11	27	0/6
2149, 20mg/kg	227.62	82	0/6
2149, 40mg/kg	193.90	86	2/6

체내에서 αPD-1/IL2m 면역접합체 2149의 효능이 대조 약물 PD-1-IL2v(분자 번호 2061, US20180326010A1로부터 유래된 서열, 또한 서열 목록 참조)의 효능 보다 우수하다는 것을 입증하기 위해, PD-1 항체 저항성 B16F10 세포(마우스 흑색종 세포주, ATCC, CRL-6475)를 녹인 마우스에 접종하여, 본 발명의 hPD-1 이중 기능성 PD-1 항체 및 IL-2 돌연변이 분자 융합 단백질(2149)의 항종양 효능을 결정하였다. 인증 번호 20170010008942의 SPF 암컷 hPD-1 녹인 마우스(Shanghai Model Organisms Center, Inc.로부터 구입)를 실험에서 사용하였다.

B16F10 세포를 후속 체내 연구를 위해 통상적으로 계대 배양하였다. B16F10 세포를 원심분리에 의해 수집하고 PBS(1×)에 재현탁하여 2.5×10⁶개 세포/mL의 세포 농도를 갖는 세포 현탁액을 형성하였다. 0일차에, 0.2mL의 세포 현탁액을 hPD-1 녹인 마우스의 우측 복부 부위에 피하 접종하여 B16F10 종양-보유 마우스 모델을 확립하였다.

종양 세포 접종 8일 후, 각 마우스의 종양 부피를 측정하였다. 마우스를 7개의 그룹으로 나누었다. 투여량 및 투여 경로는 표 15에 나타나 있다.

표 15. 체내 실험에서 그룹과 투여량 및 투여 경로

그룹	투여량	투여 빈도	투여 경로
h-IgG*	40mg/kg	QWx3	복강내 주사
IBI308	40mg/kg	QWx3	복강내 주사
2061, 10mg/kg	10mg/kg	QWx3	복강내 주사
2061, 20mg/kg	20mg/kg	QWx3	복강내 주사
2061, 40mg/kg	40mg/kg	QWx3	복강내 주사
2149, 10mg/kg	10mg/kg	QWx3	복강내 주사
2149, 40mg/kg	20mg/kg	QWx3	복강내 주사
2149, 40mg/kg	40mg/kg	QWx3	복강내 주사

*: h-IgG는 Equitech-Bio(로트 번호 161206-0656)로부터 구입한 이소타입 대조 항체였음.

h-IgG, 40mg/kg의 IBI308, 10mg/kg의 2061, 20mg/kg의 2061, 40mg/kg의 2061, 10mg/kg의 2149, 20mg/kg의 2149 및 40mg/kg의 2149를 각각 4mg/mL, 2mg/mL, 4mg/mL, 2mg/mL 및 4mg/mL의 농도로 사용하였으며, 매주 1회 총 3회 용량(QW×3)으로 투여하였다. 투여는 B16F10 세포 접종 후 8일, 15일 및 22일에 수행하였다. 마우스의 종양 부피 및 체중은 도 14A에 나타난 바와 같이 33일 동안 주 2회 모니터링하였다. B16F10 세포는 마우스 사망을 유도하기 위해 쉽게 전이되었기 때문에, 상대적인 종양 성장 억제(TGI%)는 접종 후 19일차에 다음 식에 의해 계산되었다: $TGI\% = 100 \times (\text{대조 그룹 종양 부피} - \text{치료 그룹 종양 부피}) / (\text{대조 그룹 종양 부피} - \text{투여 전 대조 그룹 종양 부피})$. 종양 부피 측정: 종양의 장축(L)의 최대 길이와 단축(W)의 최대 길이는 버니어 캘리퍼(vernier caliper)로 측정했고, 종양의 부피는 다음 식을 사용하여 계산했다: $V = L \times W^2 / 2$. 마우스의 체중을 전자저울을 사용하여 측정하였다. 종양 부피가 2000mm³ 초과인 마우스를 안락사시켰다. 그룹에서 절반 이상의 사망이 발생한 경우, 전체 그룹의 종양 성장 곡선을 이러한 시점에 나타내지 않았다.

종양 성장 억제 결과는 표 16에 나타나 있다: 접종 후 19일차에, 40mg/kg의 IBI308, 10mg/kg의 2061, 10mg/kg

의 2149, 20mg/kg의 2149 및 40mg/kg의 2149는 40mg/kg의 h-IgG 그룹에 비해 각각 21%, 96%, 79%, 87% 및 97% 종양 성장을 억제하였다. 2061의 20mg/kg 및 40mg/kg 그룹에서, 1차 주사 후 체중이 급격히 감소하였고 마우스가 사망하였기 때문에 TGI를 계산하지 않았다.

[0595] 또한, 본 발명자들은 마우스 생존에 대한 통계적 분석을 수행하였으며(도 14B), 이는 본 실험에서 2061 및 2149와 최대 용량/내약 용량을 비교할 때, 본 발명자들이 마우스가 40mg/kg의 용량으로 2149를, 10mg/kg의 용량으로 2061 분자를 투여하였을 경우 더 많이 생존했음을 알 수 있었고, 2149 그룹에서, 종양은 7마리 중 3마리에서 완전히 퇴행되었고, 2061 그룹에서, 종양은 한 마리의 마우스에서만 완전히 퇴행되었다는 것을 나타내었다. 한편, 마우스의 체중 측정 결과(도 14C)는 접종 후 29일차에 2149의 각 투여 그룹에서 마우스의 체중 감소가 없는 반면, 2061 그룹에서는 마우스의 체중 감소가 있었으며, 저용량(10mg/kg) 그룹에서는 마우스의 평균 체중이 5% 이상 감소하였고, 중용량(20mg/kg) 및 고용량(40mg/kg) 그룹에서는 마우스의 사망이 발생하였으며, 각 그룹에서 총 7마리 마우스가 있는데 6마리가 사망하였다는 것을 나타낸다. 세부 사항은 표 12에 나타나 있다. 2149는 비교적 안전하였으며, 저용량, 중용량 또는 고용량에서 유의한 체중 감소가 관찰되지 않았다. 저용량과 중용량에서는 각각 한 마리의 마우스만 사망하였으며, 고용량에서는 사망이 없었다. 더욱이, 2061보다 종양 완전 반응률이 더 높았다(표 16). 따라서, 2149는 2061보다 효능이 더 양호하고 안전하며 치료 범위가 더 높다.

[0596] 표 16. 항종양 효능 통계

그룹	19일차의 종양 부피(mm ³)	19일차의 마우스 사망	33일차의 종양 완전 반응률
h-IgG	1934.73	3/7	0/7
IBI308, 40mg/kg	1540.91	2/7	0/7
2061, 10mg/kg	146.28	0/7	1/7
2061, 20mg/kg	N/A	6/7	0/7
2061, 40mg/kg	N/A	6/7	0/7
2149, 10mg/kg	450.77	1/7	0/7
2149, 20mg/kg	301.05	1/7	1/7
2149, 40mg/kg	114.50	0/7	3/7

[0597] 체내에서 αPD-1/IL2m 면역접합체 2214의 효능을 검증하기 위해, hPD-1 녹인 마우스에 MC38 세포(마우스 결장암 세포주, OBiO Technology(Shanghai) Co., Ltd.)를 접종하여 본 발명의 이중 기능성 PD-1 항체 및 IL-2 돌연변이 분자 융합 단백질(2214)의 항종양 효능을 결정하였다. 인증 번호 20170010010829의 SPF 암컷 hPD-1 녹인 마우스(Shanghai Model Organisms Center, Inc.로부터 구입)를 실험에서 사용하였다.

[0599] MC38 세포를 후속 체내 연구를 위해 통상적으로 계대 배양하였다. MC38 세포를 원심분리에 의해 수집하고 PBS(1 ×)에 재현탁하여 5 × 10⁶ 개 세포/mL의 세포 농도를 갖는 세포 현탁액을 형성하였다. 0일차에, 0.2mL의 세포 현탁액을 hPD-1 녹인 마우스의 우측 복부 부위에 피하 접종하여 MC38 종양-보유 마우스 모델을 확립하였다.

[0600] 종양 세포 접종 7일 후, 각 마우스의 종양 부피를 측정하였다. 마우스를 7개의 그룹으로 나누었다. 투여량 및 투여 경로는 표 17에 나타나 있다.

[0601] 표 17. 체내 실험에서 그룹과 투여량 및 투여 경로

그룹	투여량	투여 빈도	투여 경로
h-IgG*	40mg/kg	QWx3	복강내 주사
2214	20mg/kg	QWx3	복강내 주사
2214	40mg/kg	QWx3	복강내 주사

[0602] *: h-IgG는 Equitech-Bio(로트 번호 161206-0656)로부터 구입한 이소타입 대조 항체였음.

[0604] h-IgG 및 2214를 모두 4mg/mL의 농도로 사용하였으며, 매주 1회 총 3회 용량(QW×3)으로 투여하였음. 투여는 MC38 세포 접종 후 7일, 14일 및 21일에 수행하였다. 마우스의 종양 부피 및 체중은 도 15A에 나타난 바와 같이 56일 동안 주 2회 모니터링하였다. 대조 그룹에 있는 마우스가 2000mm³ 초과 종양 부피를 가졌기 때문에, 본 발명자들은 상대적인 종양 성장 억제(TGI%)를 접종 후 28일차에 다음 식에 의해 계산하였다: TGI% = 100% × (대조 그룹 종양 부피 - 치료 그룹 종양 부피)/(대조 그룹 종양 부피 - 투여 전 대조 그룹 종양 부피). 종양 부

피 측정: 종양의 장축(L)의 최대 길이와 단축(W)의 최대 길이는 버니어 캘리퍼(vernier caliper)로 측정했고, 종양의 부피는 다음 식을 사용하여 계산했다: $V = L \times W^2 / 2$. 마우스의 체중을 전자저울을 사용하여 측정하였다.

[0605] 종양 성장 억제 결과는 표 18에 나타나 있다: 접종 후 28일차에 2214는 20mg/kg의 h-IgG 그룹에 비해 104% 종양 성장을 억제하였다. 한편, 마우스의 체중 측정 결과(도 15C)는 접종 후 28일차에 마우스의 체중에 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

[0606] 표 18. 항종양 효능 통계

그룹	종양 부피(mm ³)	종양 성장 억제(%) 28일차	종양 완전 반응 56일차
h-IgG	2183.75	N/A	0/7
2214, 20mg/kg	17.60	104	6/7
2214, 40mg/kg	16.73	104	7/7

[0607] 체내에서 αPD-1/IL2m 면역접합체 2214의 효능을 입증하기 위해, hPD-1 녹인 마우스에 PD-1 항체-저항성 B16F10 세포(마우스 흑색종 세포주, ATCC, CRL-6475)를 접종하여 본 발명의 이기능성 PD-1 항체 및 IL-2 돌연변이 분자 융합 단백질(2214)의 항종양 효능을 결정하였다. 인증 번호 20170010010829의 SPF 암컷 hPD-1 녹인 마우스(Shanghai Model Organisms Center, Inc.로부터 구입)를 실험에서 사용하였다.

[0609] B16F10 세포를 후속 체내 연구를 위해 통상적으로 계대 배양하였다. B16F10 세포를 원심분리에 의해 수집하고 PBS(1×)에 재현탁하여 2.5×10^6 개 세포/mL의 세포 농도를 갖는 세포 현탁액을 형성하였다. 0일차에, 0.2mL의 세포 현탁액을 hPD-1 녹인 마우스의 우측 복부 부위에 피하 접종하여 B16F10 종양-보유 마우스 모델을 확립하였다.

[0610] 종양 세포 접종 7일 후, 각 마우스의 종양 부피를 측정하였다. 마우스를 7개의 그룹으로 나누었다. 투여량 및 투여 경로는 표 19에 나타나 있다.

[0611] 표 19. 체내 실험에서 그룹과 투여량 및 투여 경로

그룹	투여량	투여 빈도	투여 경로
h-IgG*	40mg/kg	QWx3	복강내 주사
2214, 20mg/kg	20mg/kg	QWx3	복강내 주사
2214, 40mg/kg	40mg/kg	QWx3	복강내 주사

[0612] *: h-IgG는 Equitech-Bio(로트 번호 161206-0656)로부터 구입한 이소타입 대조 항체였음.

[0614] h-IgG, 20mg/kg의 2214 및 40mg/kg의 2214를 각각 4mg/mL, 2mg/mL 및 4mg/mL의 농도로 사용하였으며, 매주 1회 총 3회 용량(QW×3)으로 투여하였다. 투여는 B16F10 세포 접종 후 7일, 14일 및 21일에 수행하였다. 마우스의 종양 부피 및 체중은 도 16A 내지 도 16B에 나타난 바와 같이 63일 동안 주 2회 모니터링하였다. 종양 부피 측정: 종양의 장축(L)의 최대 길이와 단축(W)의 최대 길이는 버니어 캘리퍼(vernier caliper)로 측정했고, 종양의 부피는 다음 식을 사용하여 계산했다: $V = L \times W^2 / 2$. 마우스의 체중을 전자저울을 사용하여 측정하였다. 종양 부피가 2000mm³ 초과인 마우스를 안락사시켰다.

[0615] 도 16A에 있는 마우스의 생존 곡선은 두 용량 모두에서 2214가 마우스의 생존을 유의하게 연장할 수 있음을 나타낸다. 한편, 마우스의 체중 측정 결과(도 16C)는 접종 후 22일차에 마우스의 체중에 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

[0616] 서열 목록

서열 번호	설명	서열
1	전체 길이 천연 IL-2	MYRMQQLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGNNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNNVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFCQSISTLT
2	정숙한 IL-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGNNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLT
3	야생형 IL-2(C125S 포함)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGNNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSISTLT
분자 1063		
T3A + N88D 돌연변이를 갖고 IL15 B'C' 루프 영역으로 대체됨		
4	IL-2 돌연변이 단백질	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGNNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAGDASIHDLISDNVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSISTLT
5	링커	GGGGSGGGGS
6	Fc-노브	DKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNATKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
7	IL-2m-링커-Fc-노브	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGNNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAGDASIHDLISDNVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSISTLTGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAEEA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNATKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPDSIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEAL HNHYTQKSLSLSPGK
8	항 PD-1 중쇄 가변 영역	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GLIIPMFDTAGYAQKFQGRVAITVDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARA EHSSTGTFDYWGQGTLVTVSS
9	항 PD-1 중쇄 가변 영역 CDR1	GGTFSSYAIS

[0617]

10	항 PD-1 중 쇄 가변 영역 CDR2	LIIPMFDTAGYAQKFQG
11	항 PD-1 중 쇄 가변 영역 CDR3	AEHSSTGTFDY
12	Fc-론	DKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
13	항 PD-1 중 쇄 불변 영역	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	항 PD-1 중 쇄	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GLIIPMFDTAGYAQKFQGRVAITVDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARA EHSSTGTFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
15	항 PD-1 경 쇄 가변 영역	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQGISSWLAWYQQKPKGKAPKLLISA ASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYCYCQANHLPTFTGGGT KVEIK
16	항 PD-1 경 쇄 가변 영역 CDR1	RASQGISSWLA
17	항 PD-1 경 쇄 가변 영역	AASSLQS

[0618]

	역 CDR2	
18	항 PD-1 경 쇄 가변 영역 역 CDR3	QQANHLPTT
19	항 PD-1 경 쇄 불변 영역	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
20	항 PD-1 경 쇄	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLISA ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLSLQPEDFATYYCQQANHLPTFTGGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
21	중쇄 불변 영역(노브- 론 없음)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCTPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKITTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK(IgG1 Fc의 ADCC 효과를 감소시키기 위한 LALA 돌연변이(L234A 및 L235A) 보유)
22	중쇄(흔 돌 연변이 없 음)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGSGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GLIIPMFDTAGYAQKFQGRVAITVDESTSTAYMELSSLSRSEDATVYYCARA EHSSTGTFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPK DITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKITP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL SPGK(IgG1 Fc의 ADCC 효과를 감소시키기 위한 LALA 돌연변이(L234A 및 L235A) 보유)
분자 2132	T3A + N88R 돌연변이를 갖고 IL15 B'C' 루프 영역으로 대체됨 항 PD-1 항체 모이어티의 중쇄 및 경쇄는 분자 2063의 중쇄 및 경쇄와 동일함	
23	IL-2 돌연변 이 단백질	APASSSTEKKTQLQLEHLLLDLQMLNGDNNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKA TELKHLQCLEELKPLEEVLNLAGDASIHDLISRDNVTVLELKGSETTFMCE

[0619]

		YADETATIVEFLNRWITFSQSIISLT
5	링커	GGGGSGGGGS
6	Fe-노브	DKTHTCPPCPAEEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
24	IL-2m-링커 -Fc-노브	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGNNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEELKPLEEVNLAGDASIHDLISRDNVTVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISLTGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAEEA GGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
분자 2149	T3A + N88R + S130R 돌연변이를 갖고 IL15 B'C' 루프 영역으로 대체됨 항 PD-1 항체 모이어티의 중쇄 및 경쇄는 분자 2063의 중쇄 및 경쇄와 동일함	
25	IL-2 돌연변이 단백질	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGNNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEELKPLEEVNLAGDASIHDLISRDNVTVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIIRTLT
5	링커	GGGGSGGGGS
6	Fe-노브	DKTHTCPPCPAEEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
26	IL-2m-링커 -Fc-노브	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGNNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEELKPLEEVNLAGDASIHDLISRDNVTVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIIRTLTGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAEEA GGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
분자 2213	T3A + F42A + N88R + S127E 돌연변이를 갖고 B'C' 루프 영역이 절단됨	

[0620]

	항 PD-1 항체	모이어티의 중쇄 및 경쇄는 분자 2063의 중쇄 및 경쇄와 동일함
27	IL-2 돌연변이 단백질	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGDNNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHDLISRINVVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFSQEIISTLT
5	링커	GGGGSGGGGS
6	Fe-노브	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
28	IL-2m-링커-Fe-노브	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGDNNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHDLISRINVVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFSQEIISTLTGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPDSIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
분자 2214	T3A + F42A + N88R + S127E 돌연변이를 갖고 IL15 B'C' 루프 영역으로 대체된 항 PD-1 항체	모이어티의 중쇄 및 경쇄는 분자 2063의 중쇄 및 경쇄와 동일함
29	IL-2 돌연변이 단백질	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGDNNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAGDASIHDLSRINVVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQEIISTLT
5	링커	GGGGSGGGGS
6	Fe-노브	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	IL-2m-링커-Fe-노브	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGDNNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAGDASIHDLSRINVVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQEIISTLTGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPDSIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEAL

[0621]

		HNHYTQKSLSLSPGK
분자 2219	T3A + K35E + N88R + S127E 돌연변이를 갖고 B'C' 루프 영역이 절단됨 항 PD-1 항체 모이어티의 중쇄 및 경쇄는 분자 2063의 중쇄 및 경쇄와 동일함	
31	IL-2 돌연변이 단백질	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPELTRMLTFKGYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVNLAQSKNFHDLISRINVVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFSQEIISTLT
5	링커	GGGGSGGGGS
6	Fe-노브	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
32	IL-2m-링커-Fe-노브	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPELTRMLTFKGYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVNLAQSKNFHDLISRINVVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFSQEIISTLTGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
분자 2124	도 1B 형식 2 제1 단량체: IL-2 단백질-링커-Fe(노브) 제2 단량체: 힌지 영역-Fe(효)	
4	IL-2 단백질	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKGYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVNLAGDASIHDLSIDINVVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
5	링커	GGGGSGGGGS
6	Fe-노브	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
7	IL-2m-링커-Fe-노브	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKGYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVNLAGDASIHDLSIDINVVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEA

[0622]

		GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
35	인지 영역	EPKAS
12	Fe-혼	DKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
36	인지 영역 -Fe-혼	EPKASDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
분자 3010	도 1B 형식 2	제1 단량체: IL-2 단백질-링거-Fe(노브) 제2 단량체: 인지-Fe(혼)
3	IL-2 단백질	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGDNNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKA TELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNNVIVLELKGSETT FMCEYADETATVEFLNRWITFSQSIISTLT
5	링거	GGGGSGGGGS
6	Fe-노브	DKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
37	IL-2 단백질 -링거-Fe-노 브	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGDNNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKA TELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNNVIVLELKGSETT FMCEYADETATVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK

[0623]

35	인지 영역	EPKAS
12	Fe-혼	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAV KGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKITPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
36	Hing-Fe-혼	EPKASDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSL SCAVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKITPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
다른 서열		
37	IL-2Rβ-Fe- 노브	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGLQDTSQVHAWPDRRRWNQTC ELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDF KPFENLRLMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPG HTWEEAPLTLKQKQEWICLETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQ PLAFRTKPAALGKDTGLNDIFEAQKIEWHEDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPDSIAVEWESNGQPEN NYKITPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
38	IL-2Rγ-Fe- 혼	LNTILTPNGNEDTTADFFLTMTPTDSLVSSTLPLPEVQCFVFNVEYMNCT WNSSSEPQPTNLTLHYWYKNSDNDKVQKCSHYLFSEEITSGCQLQKKEIH LYQTFVVQLQDPREPRRQATQMLKLQNLVIPWAPENLTLHKLSSESQLELN WNNRFLNHCLEHLVQYRTDWDHSWTEQSVDRHKFSLPSVDGQKRYTF RVRSRFNPLCGSAQHWSEWSPHPIHWSNTSKENGLNDIFEAQKIEWHEH HHHHHHDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQ VSLSCAVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKITPPVLDSDGSFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK
39	IL-15 B'C' 루프 영역	AGDASIH
40	IL-2 B'C' 루 프 영역	AQSKNFHLRPR

[0624]

41	결단된 IL-2 B'C' 루프 영역	AQSKNFH 마지막 4개 아미노산(LRPR) 결실
42	Fe(노브-훈 돌연변이 없음, LALA 돌연변이 있음)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
43	Fe(노브-훈 돌연변이 없음, LALA 돌연변이 없음)	DKTHTCPPCPAPELGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
분자 2061		
33	중쇄 노브	US20180326010A1로부터 유래된 본 연구의 대조 분자 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSAAAGSFSSYTMWVRQAPGKLEWVA TISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLLT GRVYFALDSWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHPKSNKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGGGGGGGGGAPASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKN PKLTRMLTAKFAMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPR DLISNINVTLELKGSETTFMCEYADETATVEFLNRWITFAQSIISLT
45	중쇄 훈	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSAAAGSFSSYTMWVRQAPGKLEWVA TISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLLT GRVYFALDSWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHPKSNKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPSPRDELTKNQVSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

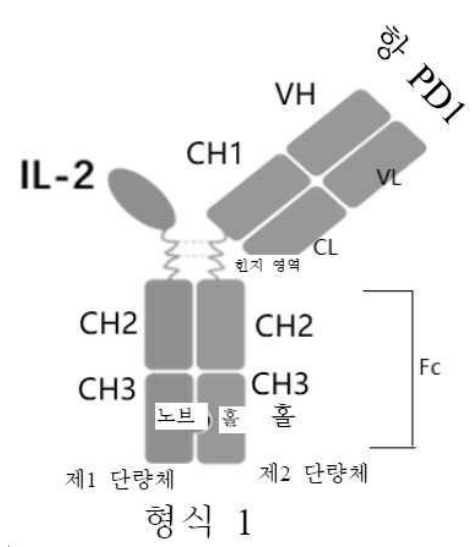
[0625]

		GK
34	경쇄 LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASEVDTSDNSFIHWYQQKPGQSPKLL IYRSTLESGLVDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNYDVPWTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC

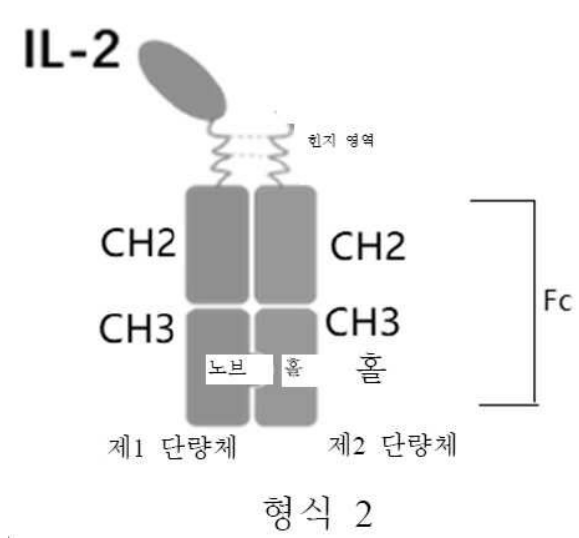
[0626]

도면

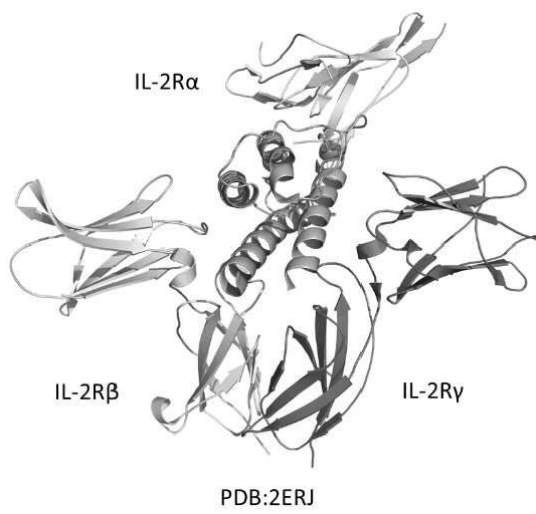
도면1a



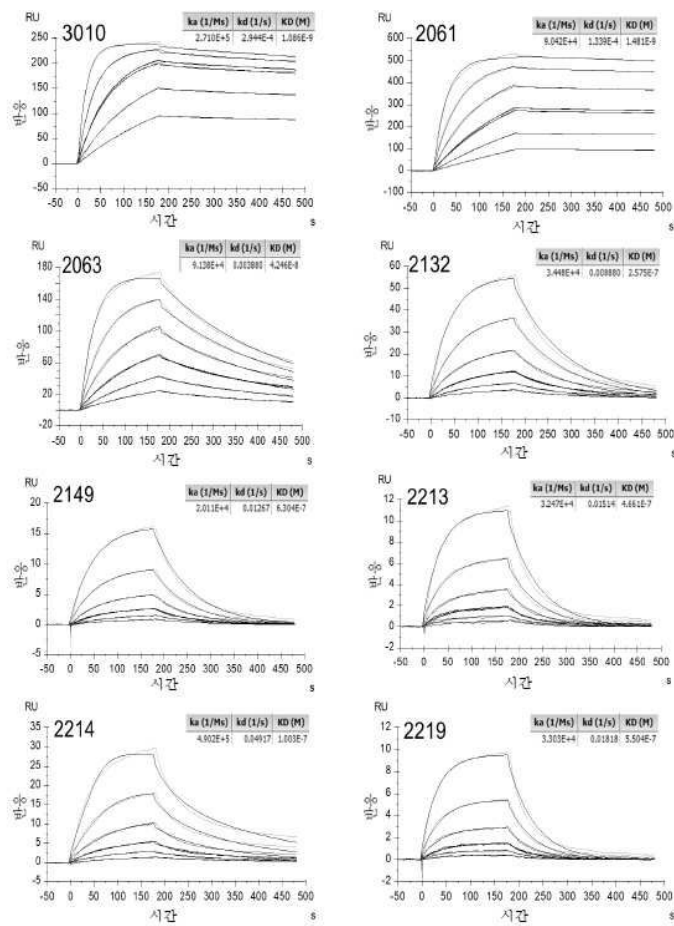
도면1b



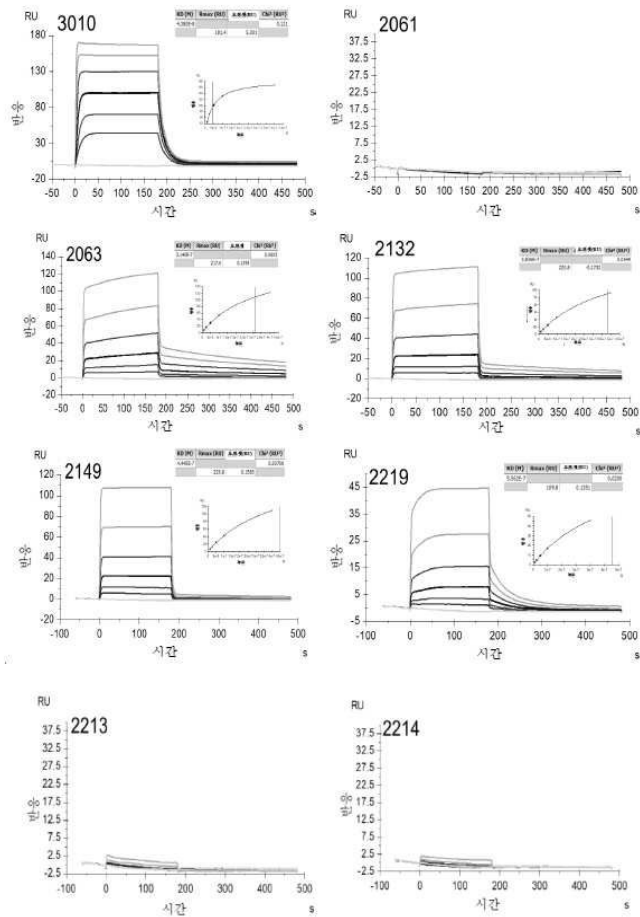
도면2



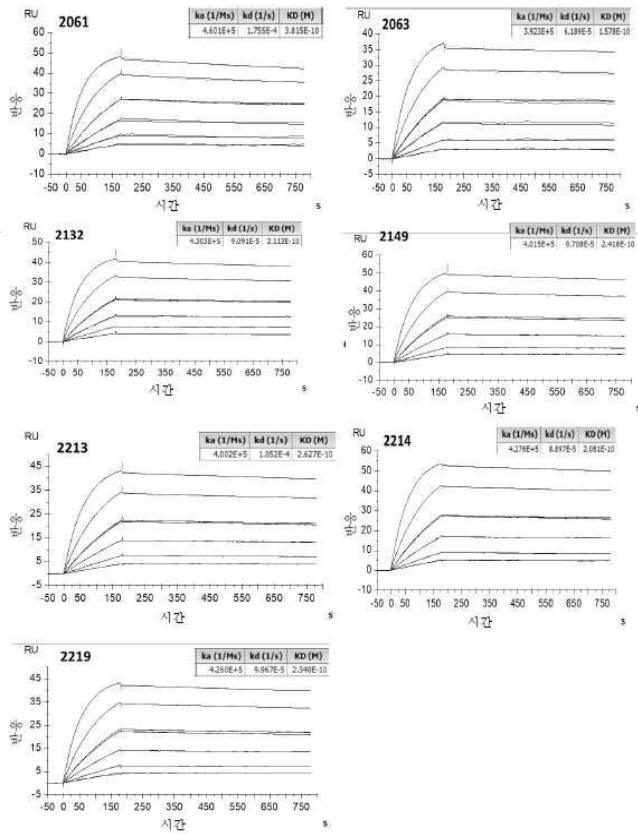
도면3



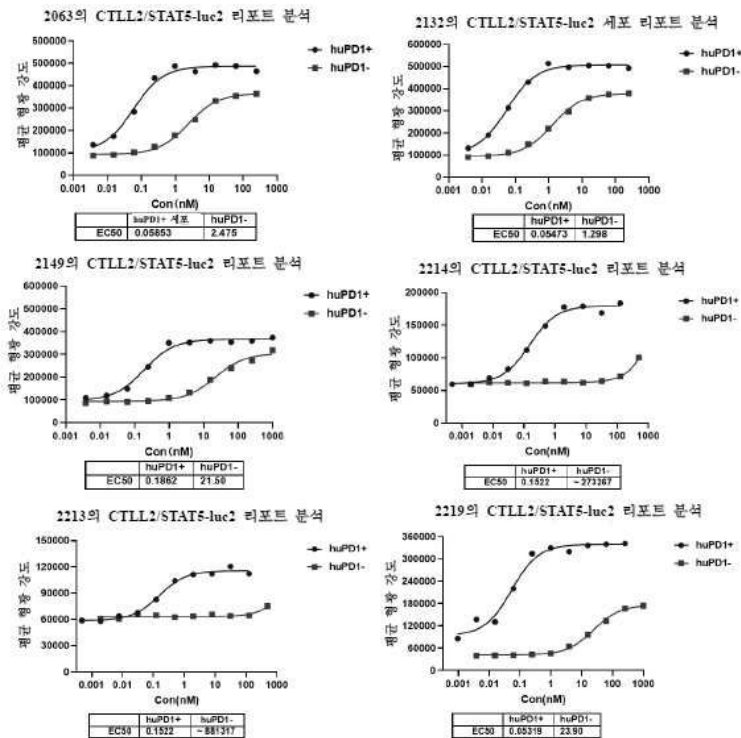
도면4



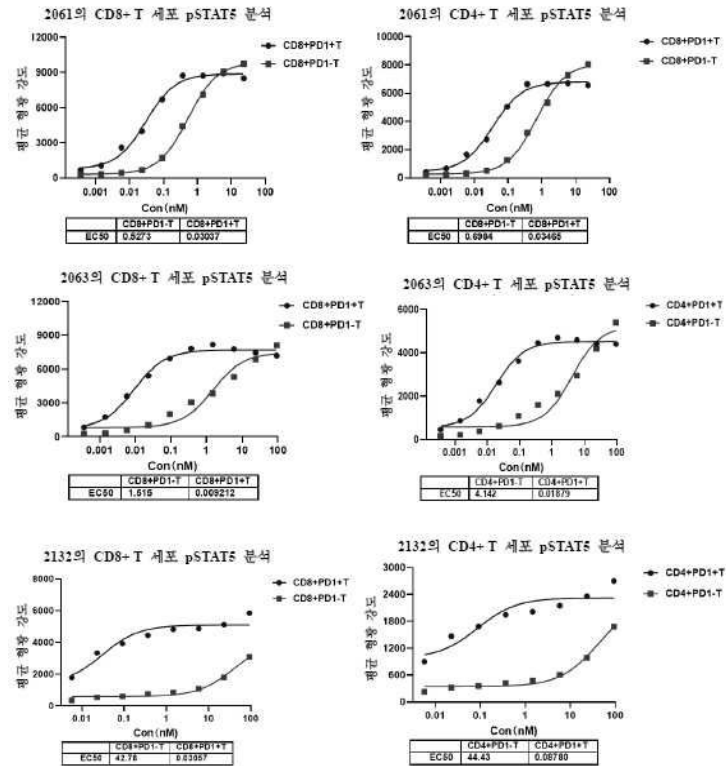
도면5



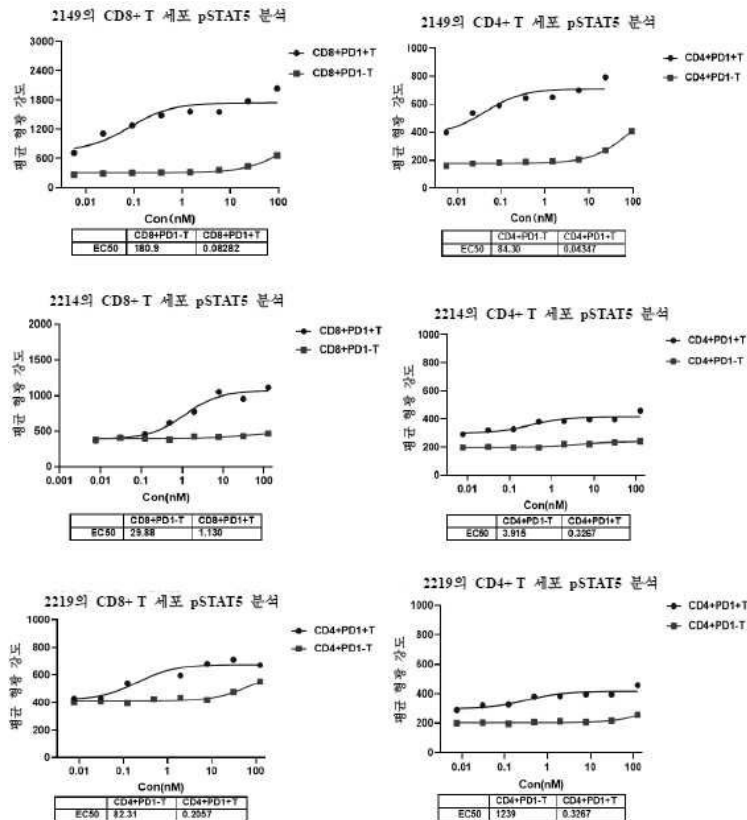
도면6



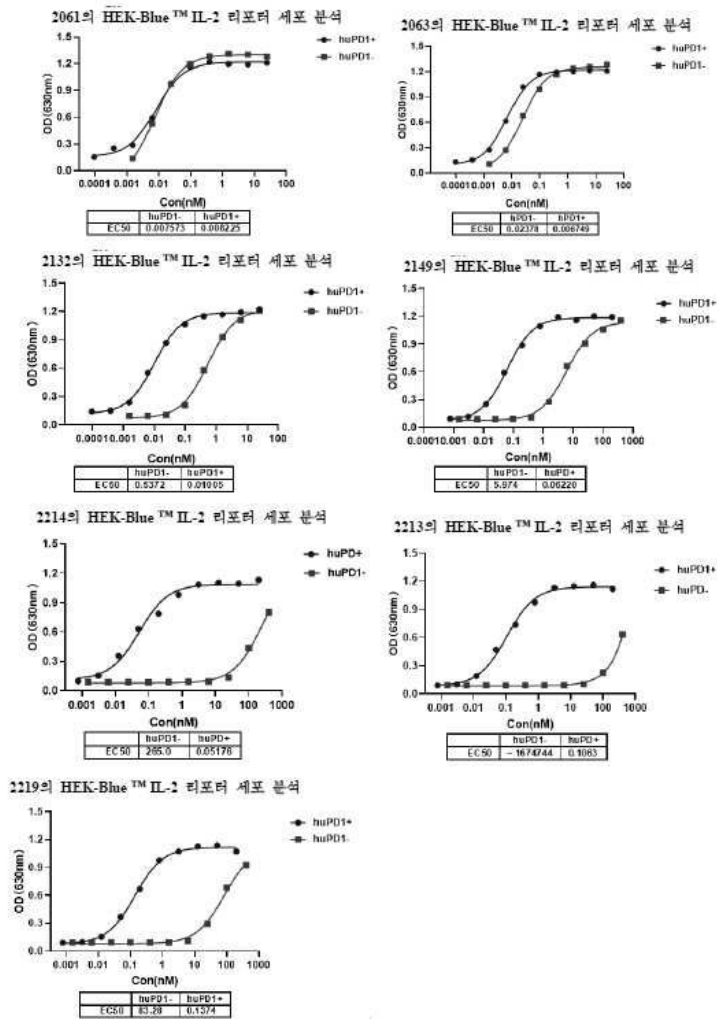
도면7a



도면7b

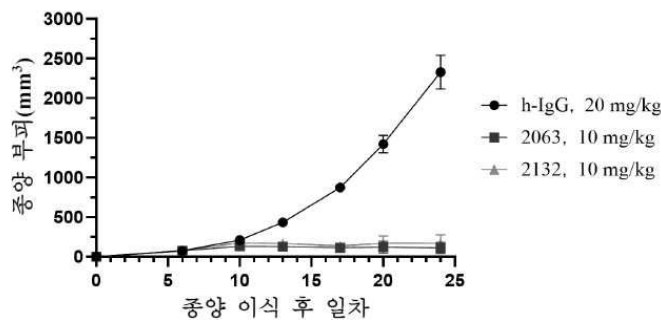


도면8

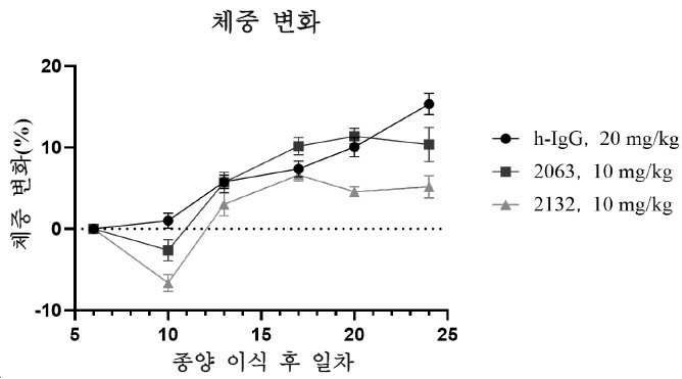


도면9a

MC38 모델에서 2132 2063의 항종양 효능

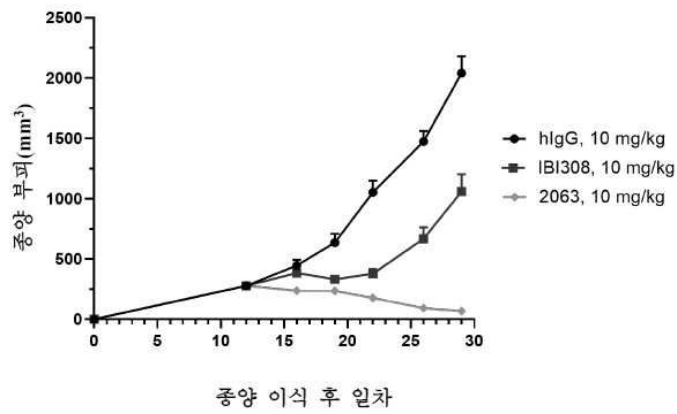


도면9b

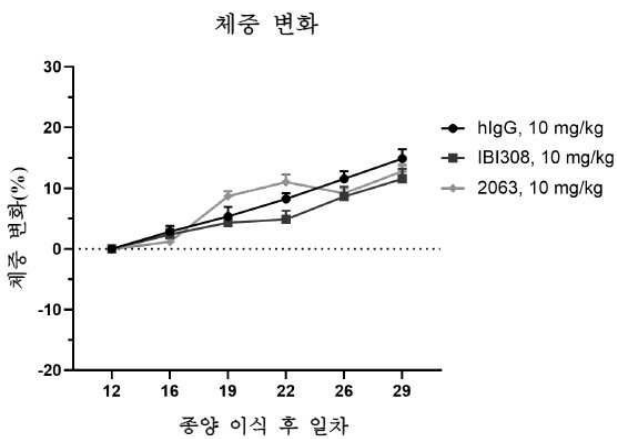


도면10a

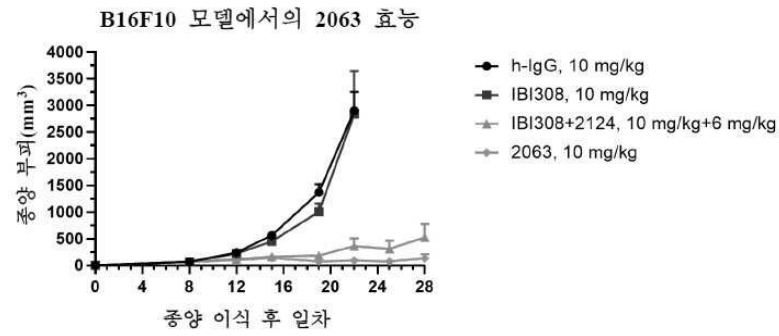
대규모 확립된 MC38 종양에서 2063의 항종양 효능



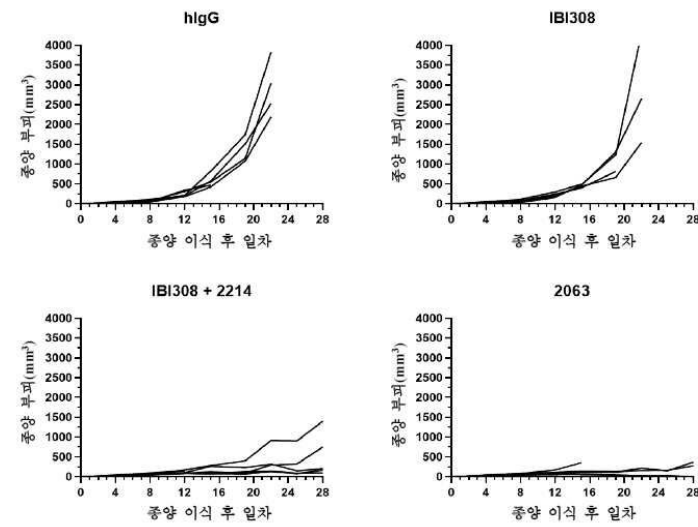
도면10b



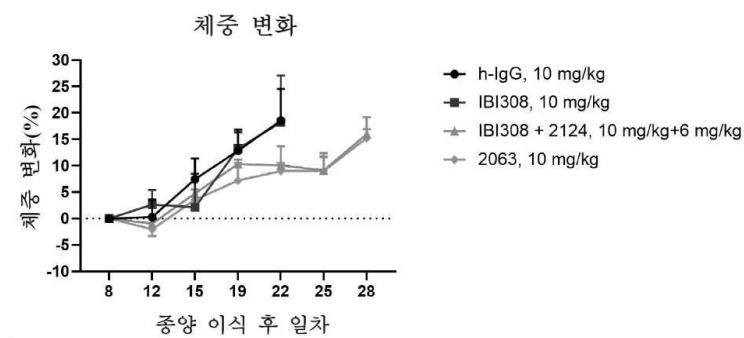
도면11a



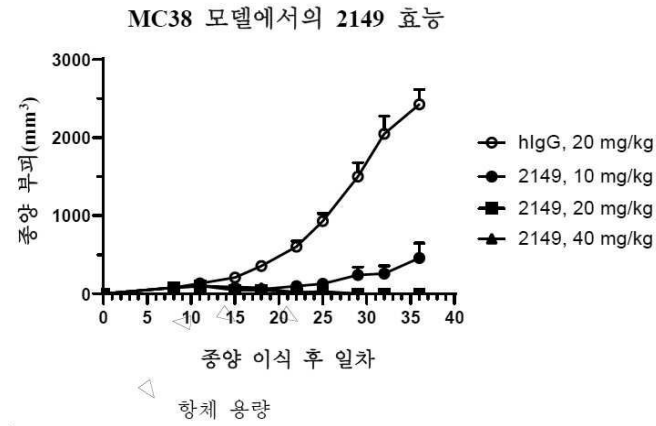
도면11b



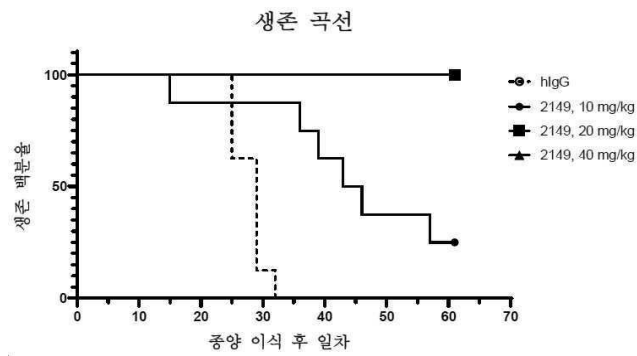
도면11c



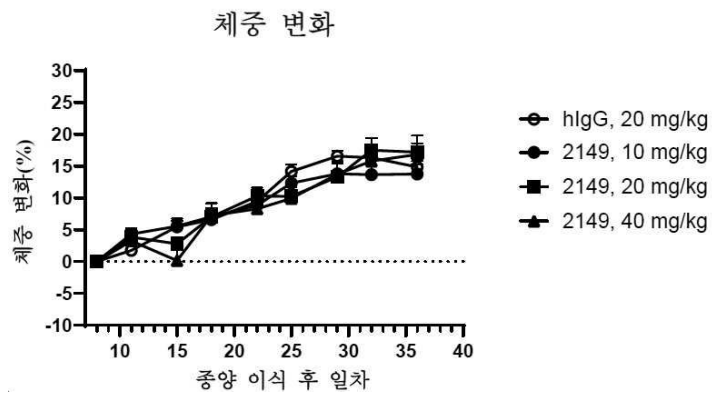
도면12a



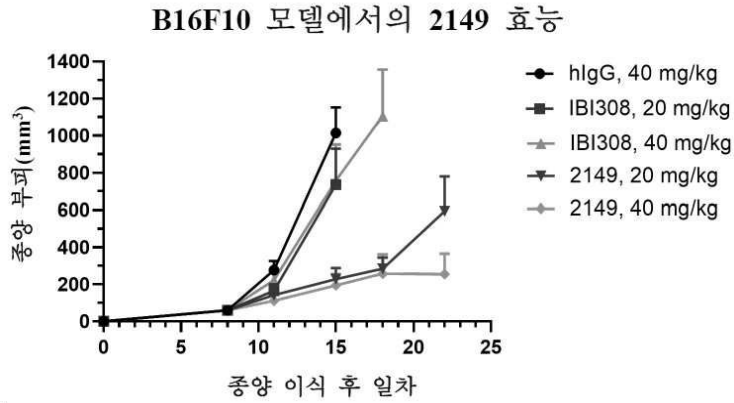
도면12b



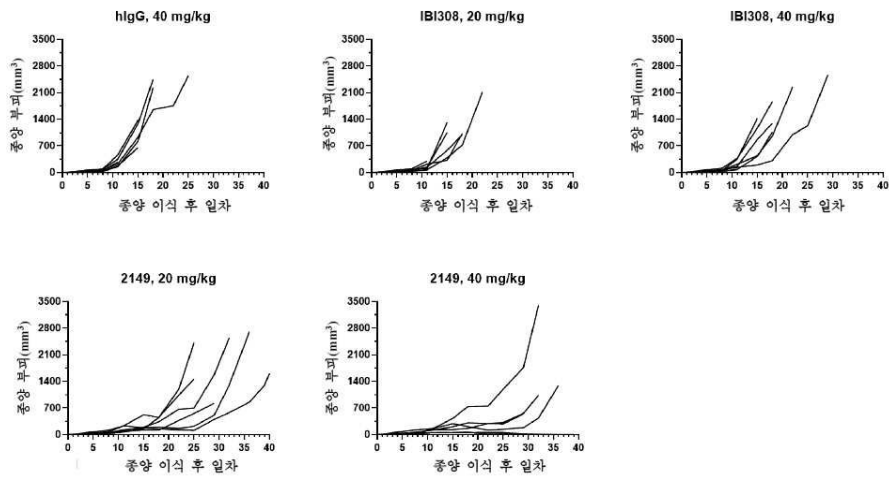
도면12c



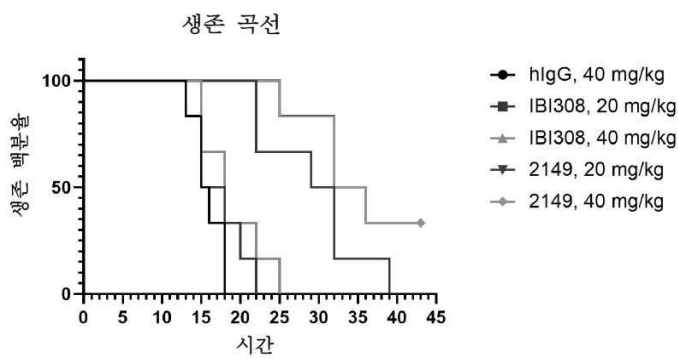
도면13a



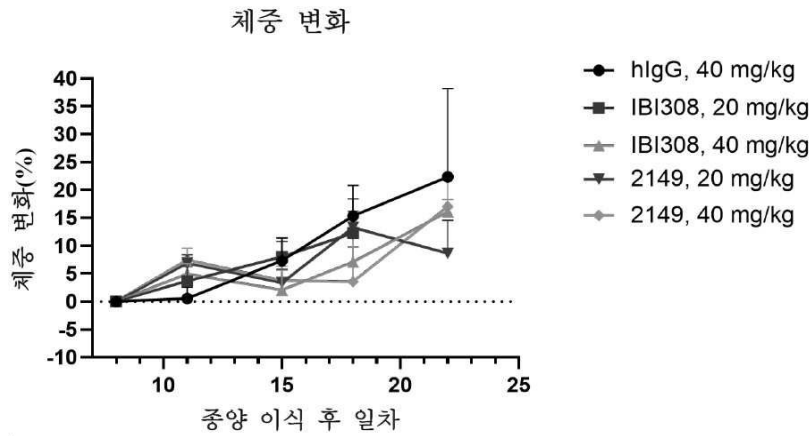
도면13b



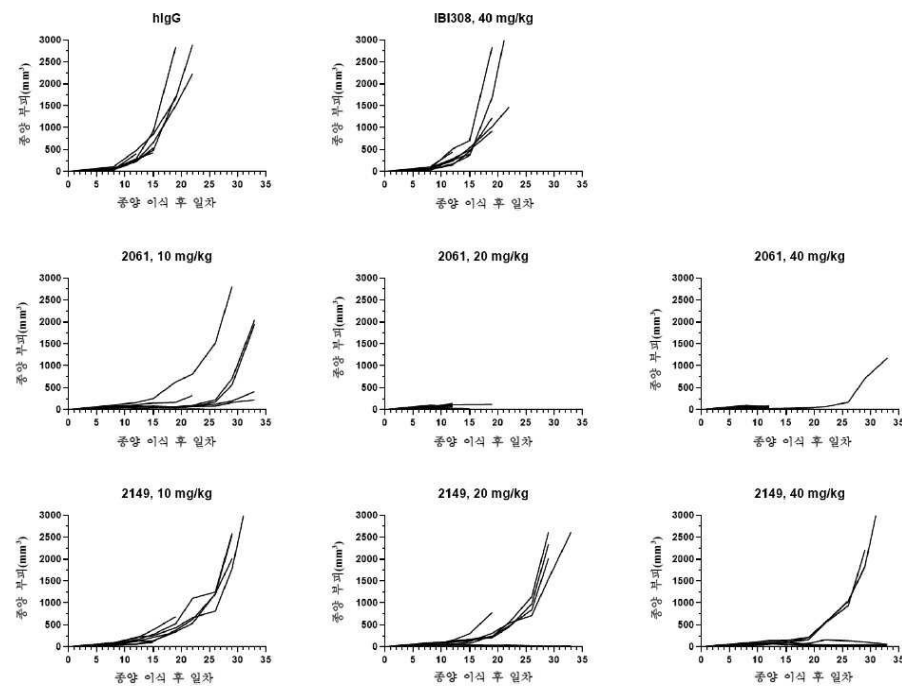
도면13c



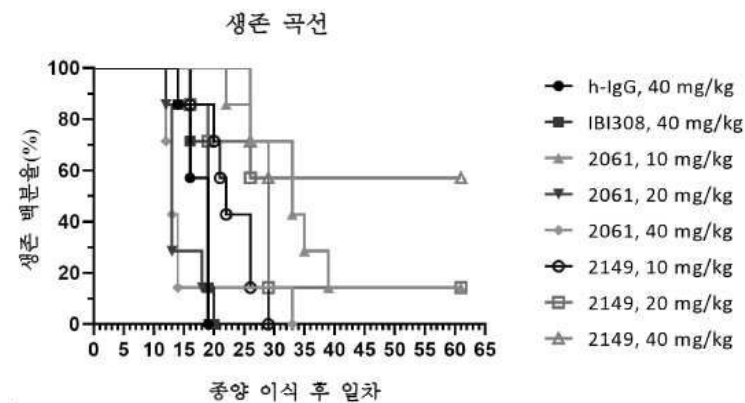
도면13d



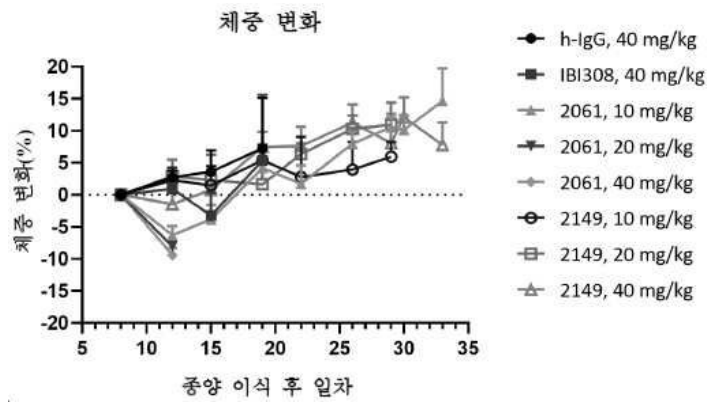
도면14a



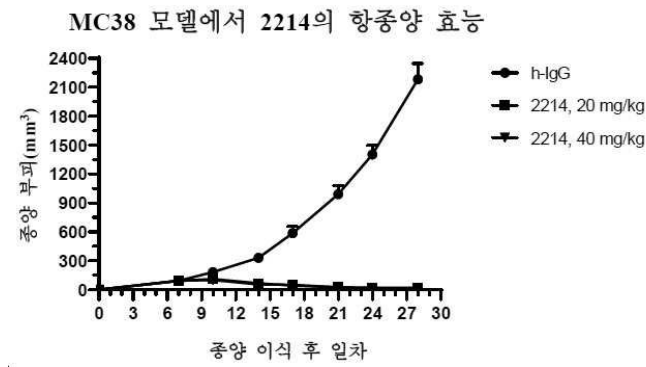
도면14b



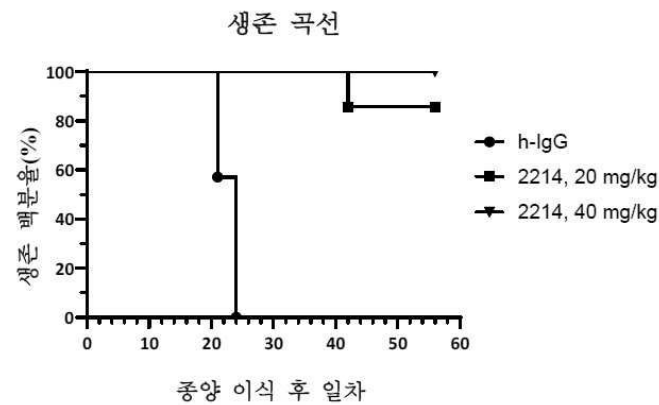
도면14c



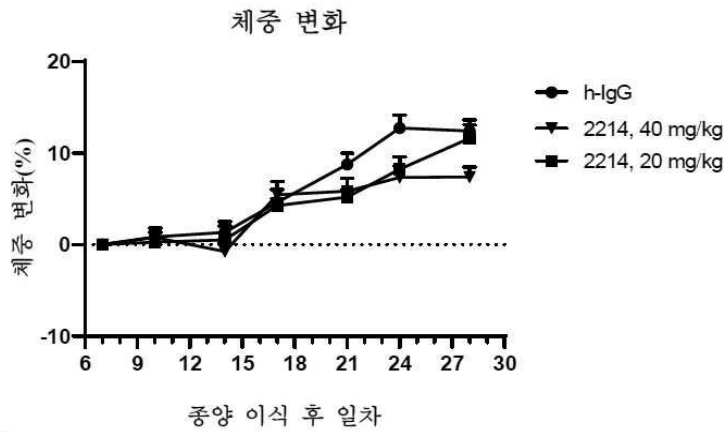
도면15a



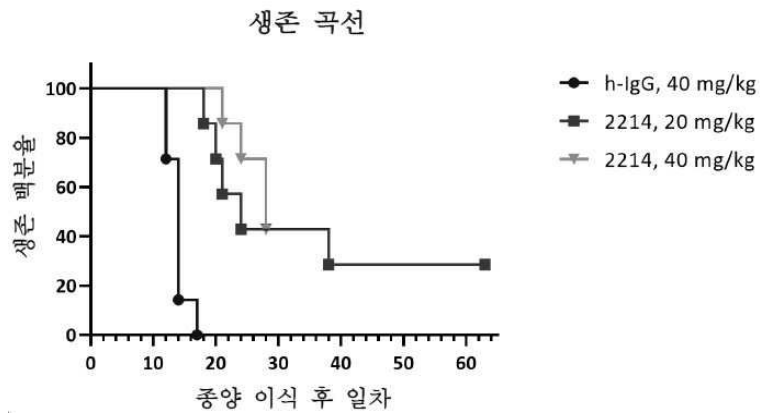
도면15b



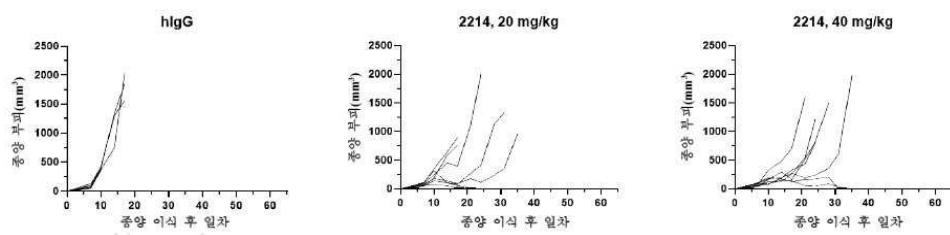
도면15c



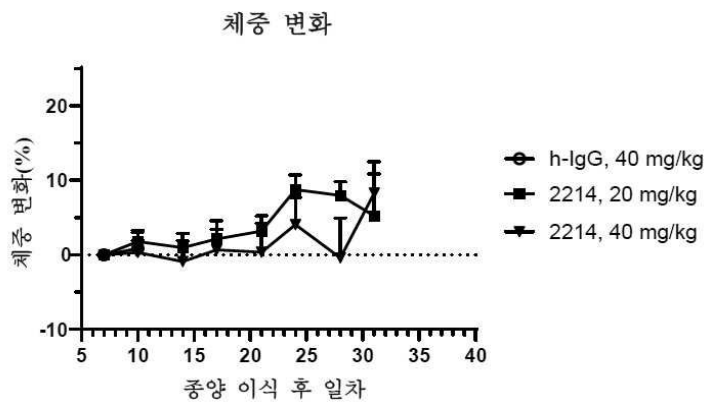
도면16a



도면16b



도면16c



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.