

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0157760
(43) 공개일자 2023년11월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/54 (2006.01) A61K 38/20 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/54 (2013.01)

A61K 38/20 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0057356

(22) 출원일자 2022년05월10일

심사청구일자 2022년05월10일

(71) 출원인

아주대학교산학협력단

경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김용성

경기도 수원시 영통구 센트럴파크로 60, 6303동 2502호 (이의동, 래미안광교)

김은지

전라남도 광양시 광양읍 예구1길 8 (덕례리, 영신그린빌)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영, 장제환

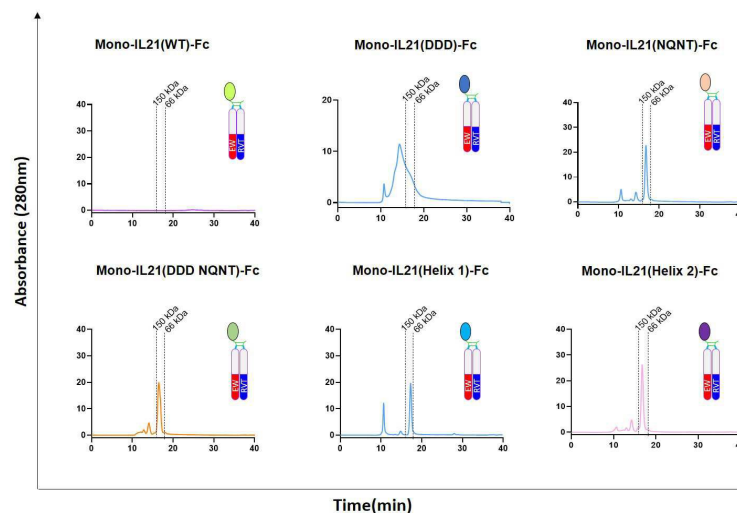
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 인터루킨21 변이체, 이를 포함하는 융합단백질 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 인터루킨21 변이체, 상기 인터루킨21 변이체와 항체 중쇄불변부위를 포함하는 융합단백질 및 이의 용도에 관한 것으로, 야생형 인터루킨21에서 일부 아미노산이 치환 및/또는 결실된 인터루킨21 변이체, 상기 인터루킨21 변이체에 제 1 Fc 영역 및 제 2 Fc 영역을 포함하는 항체(immunoglobulin) 중쇄불변부위 (Fc) 쌍이 융합된 융합단백질 및 상기 인터루킨21 변이체 또는 융합단백질의 암 예방 또는 치료 용도 및 상기 인터루킨21 변이체 또는 융합단백질을 이용한 면역세포 배양방법에 관한 것이다.

대표도 - 도12



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C07K 2319/30 (2013.01)

(72) 발명자

김준호

경기도 화성시 동탄공원로 21-12, 901동 1101 (능동, 포스코더샵)

이정미

서울특별시 강남구 압구정로 151, 105동 505호 (압구정동, 현대아파트)

유영빈

서울특별시 용산구 효창원로37나길 19-4, 202호 (용문동, 더하우스인빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465035847
과제번호	HR16C0001010022
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원 육성 R&D
연구과제명	(1유닛1세부) TPP(타겟물질 프로파일)기반 임상중개연구 플랫폼
기 여 율	57/100
과제수행기관명	아주대학교병원
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345347351
과제번호	2019R1A6A1A11051471
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	분자과학기술연구센터
기 여 율	3/100
과제수행기관명	아주대학교
연구기간	2019.06.01 ~ 2025.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711139824
과제번호	2020R1A2C2103061
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(이공)(유형1-2)중견연구(연평균연구비 1억원~2억원 이내)
연구과제명	CD244에 의한 건선질환 제어 기전 연구
기 여 율	20/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.09.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711157515
과제번호	2018M3A9D3079288
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(원천)바이오의료기술개발사업
연구과제명	Epigenome 조절을 통한 항암면역세포치료제 생산의 고도화
기 여 율	20/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2018.10.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 인터루킨21 (IL21)에서 N-말단을 기준으로 50, 54, 75 내지 88 및 124번 위치로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열이 치환 또는 결실된 인터루킨21 변이체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 서열번호 4의 아미노산 서열 중 다음으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환 또는 결실을 포함하는 인터루킨21 변이체:

- (1) K50N,
- (2) K54Q,
- (3) K75L,
- (4) P76D,
- (5) P77R,
- (6) S78N,
- (7) T79L,
- (8) R83N, R83D, R83L,
- (9) R84K, R84D, R84W,
- (10) Q85G, Q85S,
- (11) K86N, K86L,
- (12) H87A,
- (13) R88T, R88G, R88N,
- (14) R124Q, R124D,
- (15) 79 내지 82번 위치의 아미노산 결실, 및
- (16) 81 내지 84번 위치의 아미노산 결실.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 서열번호 4의 아미노산 서열 중 다음으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환 및/또는 결실을 포함하는 인터루킨21 변이체:

- (1) R83N, R84K, R124Q;
- (2) R83D, R84D, R124D;
- (3) K50N, K54Q, R86N, R88T;
- (4) K50N, K54Q, R83D, R84D, R86N, R88T, R124D;
- (5) K75L, P76D, P77R, S78N, 79 내지 82번 위치의 아미노산 결실, R83L, R84W, Q85G, K86L, H87A, R88G; 및
- (6) K75L, P76D, P77R, S78N, T79L, 81 내지 84번 위치의 아미노산 결실, Q85S, K86L, H87A, R88N.

청구항 4

제1항에 있어서, 서열번호 5 내지 10으로 구성된 군에서 선택되는 서열을 포함하는 인터루킨21 변이체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 인터루킨21 변이체; 및

제 1 Fc 영역 및 제 2 Fc 영역을 포함하는 항체(immunoglobulin) 중쇄불변부위 (Fc) 쌍을 포함하고,

상기 Fc쌍은 제 1 Fc 영역 또는 제 2 Fc 영역의 CH3 도메인 중 변이를 포함하는 이종이중체 (heterodimer)인, 융합단백질.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 인터루킨21 변이체는 제 1 Fc 영역 또는 제 2 Fc 영역의 N-말단에 결합하는 융합단백질.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 IL-21 또는 이의 변이체는 링커로 제 1 Fc 영역 또는 제 2 Fc 영역에 연결되어 있는 융합단백질.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 링커는 $(GS)_n$, $(GGS)_n$, $(GSGGS)_n$ 또는 $(G_nS)_m$ (n, m 은 각각 1 내지 10)을 포함하는 융합단백질.

청구항 9

제5항에 있어서, 상기 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역 각각은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD 및 IgE로 이루어진 군으로부터 선택된 Fc 영역 유래인 융합단백질.

청구항 10

제5항에 있어서, 상기 제 1 Fc 영역 또는 제 2 Fc 영역의 CH3 도메인 변이는 다음의 군에서 선택된 하나 이상의 변이를 포함하고 변이 위치는 EU index에 따르는 것을 특징으로 하는 융합단백질:

- (1) 제 1 Fc 영역의 CH3 도메인 중 K360 위치에서 K360E로 치환;
- (2) 제1 Fc 영역의 CH3 도메인 중 K409 위치에서 K409W로 치환;
- (3) 제 2 Fc 영역의 CH3 도메인 중 E347 위치에서 E347R로 치환; 및
- (4) 제2 Fc 영역의 CH3 도메인 중 F405 위치에서 F405T로 치환 및 D399 위치에서의 D399V로 치환.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 제 1 Fc 영역 또는 제 2 Fc 영역의 CH3 도메인 중 다음을 추가로 포함하고 변이 위치는 EU index에 따르는 것을 특징으로 하는 융합단백질:

- (i) 제1 Fc 영역의 CH3 도메인 내 Y349 위치에 치환된 시스테인 (C); 또는
- (ii) 제2 Fc 영역의 CH3 도메인 내 S354 위치에 치환된 시스테인 (C).

청구항 12

제5항에 있어서, 상기 제 1 Fc 영역 및 제 2 Fc 영역의 CH3 도메인 변이는 다음의 변이를 포함하고 변이 위치는 EU index에 따르는 것을 특징으로 하는 융합단백질:

- (1) 제 1 Fc 영역의 CH3 도메인 중 K360 위치에서 K360E로 치환, K409 위치에서 K409W로 치환; 및 (2) 제 2 Fc 영역의 CH3 도메인 중 E347 위치에서 E347R로 치환; 및 F405 위치에서 F405T로 치환 및 D399 위치에서의 D399V로 치환.

청구항 13

제5항에 있어서, 서열번호 5 내지 10으로 구성된 군에서 선택되는 서열을 포함하는 인터루킨21 변이체, 서열번호 1의 서열을 포함하는 제 1 Fc 영역 및 서열번호 2의 서열을 포함하는 제 2 Fc 영역을 포함하는 항체 (immunoglobulin) 중쇄불변부위 (Fc) 쌍을 포함하는, 융합단백질.

청구항 14

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 인터루킨21 변이체를 코딩하는 핵산.

청구항 15

제14항의 핵산을 포함하는 발현벡터.

청구항 16

제15항의 발현벡터를 포함하는, 형질전환 재조합 세포.

청구항 17

다음 단계를 포함하는 융합단백질의 제조방법:

- (a) 제16항의 세포를 배양하는 단계; 및
- (b) 상기 배양된 세포에서 융합단백질을 회수하는 단계.

청구항 18

제5항의 융합단백질을 코딩하는 핵산.

청구항 19

제18항의 핵산을 포함하는 발현벡터.

청구항 20

제19항의 발현벡터를 포함하는, 형질전환 재조합 세포.

청구항 21

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 인터루킨21 변이체 또는 제5항의 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 인터루킨21 변이체 또는 제5항의 융합단백질을 면역세포에 처리하는 것을 포함하는 배양방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 면역세포는 T 세포, NK 세포, 사이토카인 유도 살해세포(Cytokine Induced Killer cell, CIK), 활성화 세포독성 T 림프구(Cytotoxic T Lymphocyte, CTL), 마크로파지, 종양 조직 내 침투 T 세포 (Tumor-Infiltrating Lymphocytes, TIL), 수지상세포로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 배양방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 인터루킨21 변이체, 상기 인터루킨21 변이체와 항체 중쇄불변부위를 포함하는 융합단백질 및 이의 용도에 관한 것으로, 야생형 인터루킨21에서 일부 아미노산이 치환 및/또는 결실된 인터루킨21 변이체, 상기 인터루킨21 변이체에 제 1 Fc 영역 및 제 2 Fc 영역을 포함하는 항체(immunoglobulin) 중쇄불변부위 (Fc) 쌍이 융합된 융합단백질 및 상기 인터루킨21 변이체 또는 융합단백질의 암 예방 또는 치료 용도 및 상기 인터루킨21 변이

[0001]

체 또는 융합단백질을 이용한 면역세포 배양방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 사이토카인(cytokine)은 혈액 속에 함유되어 있는 비교적 작은 크기의 면역 단백질 중 하나다. 사이토카인은 세포로부터 분비된 후 다른 세포나 분비한 세포 자신에게 영향을 주어, 세포 신호화(cell signaling)에 중요한 역할을 한다.
- [0003] 사이토카인은 생체 조절에 필수적인 단백질로서 세포의 증식과 분화를 유도하고, 기능과 활성의 변화를 촉진하여 면역계 질환, 알러지, 아토피, 염증 및 다양한 형태의 종양에 관련되어 있다. 최근 면역항암제 및 면역세포 치료제 발달과 더불어, 면역세포 배양의 기초실험과 세포치료제 개발에 사용되는 연구용, 의약품용 사이토카인류 단백질의 수요가 기하급수적으로 증가하고 있다.
- [0004] 인터루킨21 (Interleukin-21, IL21)는 사이토카인(cytokine)이다. IL21은 IL4, IL7, IL9, IL13, 및 IL15를 포함하는 사이토카인의 IL2 과(family)의 구성원이다. 이 과의 단백질은 항암 및 항바이러스 효과 모두를 가지는 것으로 나타났다.
- [0005] IL21은 활성화된 헬퍼 T (CD4+ helper T cells, T_H1) 세포 및 natural killer T (NK-T) 세포에 의해 생산되며, 면역에 있어서 중요한 조절자로 알려져 있다. 특히, 종양 및 바이러스로 감염된 세포를 박멸하는 두개의 림프구 클래스인, CD8+ 킬러 T 세포 (CD8+ cytotoxic T lymphocyte) 및 natural killer (NK) 세포의 증식 (proliferation) 및 세포독성 기능(cytotoxicity effector function)을 활성화한다 (Spolski et al., Nat Rev Drug Discov. 2014;13(5):379-95). 또한, IL21은 B-세포의 선택 클래스를 자극한다. 따라서, IL21은 면역세포, 특히, NK 세포의 증식 및 활성화를 유도하는 사이토카인으로서 면역세포치료에 필수적이다. 그러나 현재까지 환자에게 직접 투여할 수 있도록 임상에 시판 승인된 사이토카인은 IL-2가 유일한 실정이다. IL2는 NK 세포의 생존능과 활성을 증대시키며 비용도 상대적으로 저가이지만, 면역억제세포인 조절 T 세포 (Regulatory T cells)를 활성화시켜 항암면역기능을 억제시키는 단점이 있다. 따라서, 조절 T 세포를 활성화시키지 않고 NK 세포를 활성화시키는 사이토카인의 상용화가 절실한 실정이다.
- [0006] 이러한 관점에서 최근 IL21이 항암면역 치료에 있어서 각광을 받고 있다. IL21은 IL2와 유사하게 CD4 양성 T 세포와 CD8 양성 T 세포의 증식과 분화를 촉진하나, 반대로 조절 T 세포의 증식에는 영향을 미치지 않는 것으로 보고되어 항암면역 세포치료제와의 병용투여가 기대되고 있다 (Al-Chami et al., Cytokine, 2016;82:33-37). 또한 IL21은 CD8 T 세포에서 기억세포로의 분화를 촉진시키며 (Li et al., Journal of Immunology, 2005), 특히 최근 연구에서는 HDAC 억제제와 함께 처리시 분화된 T세포의 유전자 리프로그래밍을 유도하며 stable memory-associated transcriptional signature를 획득하여 (increased *Lef1* and *Tcf7*) 기억세포로 Dedifferentiation 을 가능케하는 것이 보고 되었다 (Wang et al., Cancer Immunology Research, 2020). IL21 이 NK 세포 관련하여 보고된 바로는 1) IL15와 함께 Fms-like tyrosine kinase-3 (FLT3-L)가 존재할 때 사람 유래 CD34 양성 hematopoietic progenitor cells에서 유래한 NK 세포의 증식을 촉진한다는 결과 (Parrish-Novak et al. Nature, 2000;408(6808):57-63), 2)영양 세포주로 사용하는 K562세포에 membrane bound form IL21을 발현시키면 NK 세포의 체외 확장을 촉진시키고 노화가 억제되는 결과 (Lee DA et al. PlosOne, 2012;7(1):e30264), 3) Canine NK 세포의배양 시 IL2 plus IL15에 의한 증식을 촉진하는 결과 (Shin et al., Vet Immunol Immunopathol. 2015;165(1):1-13) 4) Human NK 세포에서 STAT3를 활성화시켜 NKG2D수용체의 발현을 촉진시키는 결과 (Zhu et al., Blood, 2014;124(3):403-411) 등이 있다.
- [0007] 재조합 인간 IL21(recombinant human IL21)은 전임상 및 임상시험에서 항암활성(antitumor activity)을 보였다. 하지만, 전신투여시 짧은 반감기와 IL21 수용체를 발현하는 타 면역세포들에 의하여 소진되어 종양부위로 타겟팅이 어려워 고농도로 투여를 하게 되었고, 다양한 면역세포에 동시작용하는 다면활성(Pleiotropic function) 따른 독성으로 임상 1상시험에서 실패했다 (Petrella et al., Journal of Clinical Oncology, 2013). 다양한 면역세포에 동시작용하는 다면활성(Pleiotropic function) 따른 독성으로 임상 1상시험에서 실패했다. 이런 단점을 극복하기 위해 여러 시도가 있어왔다. 반감기를 늘리기 위해 IL21을 항체의 이중이중체 중쇄 불변부위 (Heterodimeric Fc)에 단량체 형태로 결합한 형태인 mono-IL21-Fc 융합단백질이 있다 (대한민국 특허 등록 10-1928981; 미국특허등록 US10800825B2). 또한 IL21에 종양을 표적하는 항체에 융합한 이뮤노사이토카인 (antibody-cytokine conjugate, immunocytokine)을 개발하려는 시도가 있었다 (Shen et al. Front. Immunol. 2020;11:832). 하지만, IL21의 단백질 구조가 많은 양전하(positive charge)를 띠는 아미노산들이 표면에 노출되어 있고, 구조적으로도 다른 IL2 및 IL4에 비해 안정성(stability)이 감소하는 문제가 있다. 이러한 단점은 전

신 투여 시에, 체내의 다른 세포 및 조직에 분포하고 쉽게 분해되어 짧은 혈액반감기(serum half-life)를 유도하여, 궁극적으로 짧은 약물동력학 (Pharmacokinetics)을 초래하여 치료제로서 바람직하지 않은 특성을 가지고 있다. 이를 개선하기 위해서 재조합 IL21 형태에서 양전하를 줄이려는 돌연변이를 도입 및 다른 구조적 안정성을 부여하는 시도는 있어왔다 (미국등록특허 US8,475,784B2; Bondensgaard et al. J. Biol. Chem. 2007;282(32):23326-23336). 그럼에도 불구하고, IL21의 물성이 개량되어 긴 반감기를 부여할 수 있는 변이체 개발은 여전히 요구되는 실정이다.

[0008] 자연계에 존재하는 인간 항체(Immunoglobulin G (IgG), IgM, IgD, IgE, IgA)는 동일한 아미노산 서열을 가진 두 개의 중쇄와 동일한 서열을 가진 두 개의 경쇄가 조합 (assembly)된 형태로 존재한다. 이 때, 동일한 두 개의 중쇄 간의 동중이중화 (homodimerization)는 항체의 불변영역(Constant Region)의 마지막 도메인(IgG, IgD, IgA의 경우 CH3 도메인, IgM의 경우 CH4 도메인, IgE의 경우 CH2 및 CH4 도메인)간의 비공유결합(non-covalent interaction) 및 힌지(hinge)영역 간의 이황화 결합(disulfide bond)에 의해 유도된다.

[0009] 항체 유래 이중이중체 중쇄불변부위(heterodimeric Fc) 기술은 앞선 자연발생적 항체(IgG, IgM, IgA, IgD, IgE)의 동중이중화(homodimerization)에 큰 기여를 하는 불변영역의 마지막 도메인간의 상호작용면에 특정 비공유결합을 통해 이중이중화(heterodimerization)가 선호되고 동중이중화가 비선호되거나 배척되는 결합을 가지도록 엔지니어링함으로써 이중이중체 형태의 중쇄불변부위가 형성되게 하는 기술이다. 더 자세하게는 유전자 조작을 통해 각기 다른 두 개의 항체 중쇄의 CH3 도메인에 돌연변이를 유도하여, 두 개의 중쇄가 자연발생적 항체와 구조가 매우 유사하고, 서열에 있어 최소한의 편차를 가지면서 이중이중체를 형성하도록 유도하는 것이다. 그 중에서도 본 발명에서 사용한 EW-RVT heterodimeric Fc 돌연변이체는 기존의 위와 같은 돌연변이체의 상호작용을 서열 및 구조적으로 분석하여, 새로운 돌연변이 전략인 CH3 도메인 상호작용면의 선택적인 정전기적 결합이 형성되게 하고 (K360E_{CH3A}-Q347R_{CH3B}), 기존의 정전기적 결합 대신 상호보완적인 소수성 결합을 형성하도록 (K409W_{CH3A}-D399V_{CH3B}/F405T_{CH3B})하여 이중이중체의 형성을 증진시킨 돌연변이체이다 (미국등록특허 제9,951,145호; 대한민국 등록특허 제1,522,954호; Choi HJ et al. Molecular Cancer Therapeutics, 2013;12(12): 2748-2759). 기존의 mono-IL21-Fc 융합단백질은 hinge-CH2-CH3영역이 human IgG1, IgG2, IgG4의 서열을 도입한 EW-RVT heterodimeric Fc(γ 1/2/4, EW-RVT)에 기반해 제작했다 (대한민국 특허등록 10-1928981; 미국특허등록 US10800825B2). 이렇게 제조한 mono-IL21-Fc 융합단백질은 IL21이 야생형 Fc(γ 1/2/4)에 융합된 bi-IL21-Fc에 비교하여 우수한 NK 세포 증식 촉진 기능을 보이며, 체내에서 적인 빈도의 투여로 수용성 IL21이나 Bi-IL21-Fc에 비해 월등한 항종양 효과를 유도 가능하다는 것을 확인하였다 (대한민국 특허등록 10-1928981; 미국특허등록 US10800825B2).

[0010] IL21의 분자 구조 분석 결과, 양전하를 띠는 결사슬을 가진 아미노산이 CD8+ 킬러 T 세포 (CD8+ cytotoxic T lymphocyte) 및 natural killer (NK) 세포의 증식(proliferation) 및 활성화(Activation) 조절에 영향을 미치는 사이토카인 (IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IFNs)들과 비교했을 때 상대적으로 많으며, 결과적으로 IL21은 9.42의 등전점(isoelectric point, pI)을 가져, 체내 pH 조건에서 순전하가 양으로 하전되는 성질을 가짐을 확인했다. 또한, 3차 구조 상 표면에 양전하를 띠는 아미노산이 모여 있는 이온 패치를 형성하여 체내에서 여러 다른 수용체 및 세포와 비특이적인 상호작용을 하여 체내로 투여되었을 때 이로 인한 부작용을 나타낼 수 있음이 예상되었다.

[0011] 이러한 기술적 배경 및 한계점 하에서, 본 출원의 발명자들은 야생형 인터루킨21에서 일부 아미노산이 치환 및/또는 결실된 인터루킨 21 변이체, 상기 인터루킨21 변이체, 제 1 Fc 영역 및 제 2 Fc 영역을 포함하는 항체 (immunoglobulin) 중쇄불변부위 (Fc) 쌍을 포함하고 상기 제 1 Fc 영역 또는 제 2 Fc 영역의 CH3 도메인이 변이를 포함하는 이중이중체 (heterodimer)인 융합단백질을 개발하고, 본 발명을 완성하였다. 본 발명에 따라 개발된 변이체는 기존 mono-IL21-Fc 융합단백질과 비교하여 우수한 생물학적 활성능과 항 종양활성을 지니는 것을 발견하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 야생형 인터루킨21에서 하나 이상의 아미노산 서열이 치환 또는 결실된 인터루킨21 변이체를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 목적은 상기 인터루킨21 변이체 및 항체(immunoglobulin) 중쇄불변부위 (Fc) 쌍을 포함하는 융합단백

질을 제공하는 것이다.

- [0014] 본 발명의 목적은 상기 인터루킨21 변이체 또는 융합단백질을 코딩하는 핵산을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 목적은 상기 핵산을 포함하는 발현백터를 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 목적은 상기 발현백터를 포함하는 형질전환 재조합 세포를 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 목적은 상기 인터루킨21 변이체 또는 융합단백질의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 목적은 상기 인터루킨21 변이체 또는 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0019] 본 발명의 목적은 상기 인터루킨21 변이체 또는 융합단백질을 환자에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.
- [0020] 본 발명의 목적은 상기 인터루킨21 변이체 또는 융합단백질을 면역세포에 처리하는 것을 포함하는 배양방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0022] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 인터루킨21 (IL21)에서 N-말단을 기준으로 50, 54, 75 내지 88 및 124번 위치로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열이 치환 또는 결실된 인터루킨21 변이체에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명은 또한, 상기 인터루킨21 변이체; 및 제 1 Fc 영역 및 제 2 Fc 영역을 포함하는 항체(immunoglobulin) 중쇄불변부위 (Fc) 쌍을 포함하고, 상기 Fc쌍은 제 1 Fc 영역 또는 제 2 Fc 영역의 CH3 도메인 중 변이를 포함하는 이종이중체 (heterodimer)인, 융합단백질에 관한 것이다.
- [0024] 본 발명은 상기 인터루킨21 변이체 또는 융합단백질을 코딩하는 핵산에 관한 것이다.
- [0025] 본 발명은 상기 핵산을 포함하는 발현백터에 관한 것이다.
- [0026] 본 발명은 상기 발현백터를 포함하는, 형질전환 재조합 세포에 관한 것이다.
- [0027] 본 발명은 다음 단계를 포함하는 인터루킨21 변이체 또는 융합단백질의 제조방법에 관한 것이다:
- [0028] (a) 상기 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양된 세포에서 인터루킨21 변이체 또는 융합단백질을 회수하는 단계.
- [0029] 본 발명은 상기 인터루킨21 변이체 또는 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 상기 인터루킨21 변이체 또는 융합단백질을 환자에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다. 본 발명은 상기 인터루킨21 변이체 또는 융합단백질을 암의 예방 또는 치료용 제제의 제조에 사용하기 위한 용도에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명은 상기 인터루킨21 변이체 또는 융합단백질을 면역세포에 처리하는 것을 포함하는 배양방법에 관한 것이다.

발명의 효과

- [0031] 본 발명에서 언급한 기존 mono-IL21-Fc 융합단백질의 예상되는 한계점은 야생형 IL21의 높은 등전점으로 인해 체내 pH 환경에서 순전하가 양으로 하전되며, 표면에 양이온 패치가 형성되어 IL21 수용체 이외에도 여러 조직과 세포에 비특이적으로 상호작용할 수 있다는 점이다. 이에 따라서 체내로 mono-IL21-Fc 융합단백질이 주입되었을 때, 체내에서 생물학적 물성이 좋지 않고, 다른 세포와 조직과의 비특이적 상호작용을 통해 과한 면역반응을 보이는 부작용이 일어나고, 짧은 약물동력학이 초래될 수 있다. 이를 극복하기 위한 전략으로, 상기 이종이중체 중쇄불변부위 Fc($\gamma 1/4$, EW-RVT)에 인간 IL21 또는 이의 변이체가 융합된 mono-IL21-Fc 융합단백질 또는 이의 변이체는 기존 mono-IL21-Fc 융합단백질의 구조, IL21 수용체에 대한 결합능 및 T 세포 및 NK 세포에 대한 증식능 및 활성화능을 포함한 생물학적 활성능을 유지하여, 항종양 기능은 유지시키면서, 체내 물성은 향상되고, 부작용은 감소하며, 반감기를 증가시키는 효과를 유도할 수 있다.

- [0032] 본 발명에 따른 mono-IL21-Fc 융합단백질 또는 이의 변이체는 높은 생산 수율을 통해 치료 약물로 개발이 용이하며, 기존 mono-IL21-Fc 융합단백질의 IL21 수용체에 대한 결합능이 유지되어 원래의 생물학적 기능 (T 세포 증식능 및 독성능 증가, NK 세포에 대한 증식능 및 독성능 증가)이 유지되어 효과적인 항암 활성을 기대할 수 있다.
- [0033] 본 발명에 따른 mono-IL21-Fc 융합단백질 또는 이의 변이체는 면역세포치료제에 쓰이는 T 세포 및 NK 세포에 대한 증식능 및 활성화능을 체외 및 체내에서 증가시킬 수 있는 약물학적 조성물로 사용될 수 있다.
- [0034] 본 발명에 따른 mono-IL21-Fc 융합단백질 또는 이의 변이체는 면역세포치료제에 쓰이는 T 세포 및 NK 세포에 대한 증식능 및 활성화능을 증가시키기 위한 면역세포 배양의 기초실험과 세포치료제 개발에 사용되는 연구용 용도로 사용될 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 mono-IL21-Fc 융합단백질 또는 이의 변이체의 구축 전략은 IL21 외에도 체내에서 높은 양전하를 가져 생물학적 물성이 좋지 않고, 부작용이 예상되며, 약물동력학이 악화될 것이라고 예상되는 다양한 질병 치료 및 예방을 위한 약학 조성물로 활용되는 물질에 적용될 수 있는 변이체 구축 전략을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1a는 인간 IL21 사이토카인을 EW-RVT heterodimeric Fc에 monovalent 단량체 형태로 구축한 mono-IL21-Fc 융합단백질 (IL21 단량체-Fc 융합단백질)의 모식도이다. 여기에서 사용된 EW-RVT heterodimeric Fc는 인간 IgG1의 hinge 영역 서열과 인간 IgG4의 CH2-CH3 영역을 가지고 있는 Fc($\gamma 1/4$)에 EW-RVT 돌연변이를 도입한 것이다. Mono는 단량체(monovalent monomer)를 의미한다.
- 도 1b는 도 1a의 비교예로, 인간 IL21 사이토카인을 야생형 Fc에 bivalent 형태로 구축한 Bi-IL21-Fc 융합단백질(IL21 이량체-Fc 융합단백질)의 모식도이다. 야생형 Fc는 인간 IgG1의 hinge 영역 서열과 인간 IgG4의 CH2-CH3 영역을 가지고 있는 Fc($\gamma 1/4$)이다. Bi는 이량체 (bivalent dimer)을 의미한다.
- 도 2는 도 1a의 융합단백질을 동물세포에서 발현 및 정제하기 위한 발현 벡터 Fc($\gamma 1/4$)의 CH3A(EW) 및 Fc($\gamma 1/4$)의 CH3B(RVT)의 모식도를 나타낸 것이다.
- 도 3은 명시된 야생형 Fc($\gamma 1/4$, WT), 이중이중체 중쇄불변부위 Fc($\gamma 1/4$, EW-RVT), Bi-IL21-Fc와 mono-IL21-Fc 융합단백질 (mono-IL21-Fc 융합단백질의 경우, 동물세포 형질전환 시 사용된 CH3A(EW):CH3B(RVT) 발현벡터의 비율=1:1, 1.5:1, 2:1) 융합단백질을 HEK293F 세포에 공동형질 전환을 통해 일시적으로 발현 및 정제한 다음, 5 μ g의 단백질을 비환원성 조건과 환원성 조건의 10% SDS-PAGE 상에서 분리하고, Coomassie Blue 염색을 통해 크기 및 조합형태로 분석한 결과이다. Non-reducing은 비환원성 조건, Reducing은 환원성 조건, M은 단백질 마커 (marker)이다.
- 도 4는 상기 구축된 mono-IL21-Fc 융합단백질 (동물세포 형질전환 시 사용된 CH3A(EW):CH3B(RVT) 발현벡터 비율=1:1, 1.5:1, 2:1)를 야생형 Fc($\gamma 1/4$, WT), 그리고 이중이중체 중쇄불변부위 Fc($\gamma 1/4$, EW-RVT)와 함께 크기 배제 크로마토그래피 (Size exclusion chromatography, SEC)를 이용하여 분석한 결과이다. SEC분석에서 running buffer는 1X PBS (pH 7.4, 12mM phosphate, 137mM NaCl, 2.7mM KCl), Flow rate는 0.75 ml/min, 단백질 투입량은 30 μ g (1mg/ml 로 30 μ l injection)이었다.
- 도 5는 인간 IL21 야생형 (PDB ID:3tgx)의 구조를 Chimera X 프로그램을 통해 시각화 시키고, 각 아미노산 결사슬의 특성에 따라 지정된 색으로 강조한 것이다. 파란색은 양전하 결사슬을 가지는 아미노산, 빨간색은 음전하 결사슬을 가지는 아미노산, 회색은 소수성 결사슬을 가지는 아미노산, 그리고 초록색은 그 외의 아미노산을 나타낸다.
- 도 6a는 상기 구축된 mono-IL21-Fc 융합단백질을 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 분석한 결과이다. 상기 크기 배제 크로마토그래피에서 running buffer는 1X PBS (pH7.4, 137 mM NaCl), Flow rate는 0.75 ml/min, 단백질 투입량은 30 μ g (1mg/ml 로 30 μ l injection)이었다.
- 도 6b는 상기 구축된 mono-IL21-Fc 융합단백질을 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 분석한 결과이다. 상기 크기 배제 크로마토그래피에서 running buffer는 High Salt PBS(pH7.4, 12mM phosphate, 2.7mM KCl, 500 mM NaCl)이고, Flow rate는 0.75 ml/min, 단백질 투입량은 30 μ g (1mg/ml 로 30 μ l injection)이었다.
- 도 7은 인간 IL21 야생형에 비교하여 본 발명에서 구축한 IL21 아미노산 치환 변이체들의 서열 중 바뀐 서열을 나타내며 그 명명법 및 근거에 대한 그림을 나타낸 것이다.

도 8은 mono-IL21-Fc 융합단백질 아미노산 치환 변이체인 mono-IL21(NKQ)-Fc, mono-IL21(DDD)-Fc을 HEK293F 세포에 공동형질 전환을 통해 일시적으로 발현 및 정제한 다음, 대조군인 mono-IL21-Fc 융합단백질과 함께 5 µg의 단백질을 비환원성 조건과 환원성 조건의 10% SDS-PAGE 상에서 분리하고, Coomassie Blue 염색을 통해 크기 및 조합형태로 분석한 결과이다. Non-reducing은 비환원성 조건, Reducing은 환원성 조건, M은 단백질 마커(marker)이다.

도 9는 mono-IL21-Fc 융합단백질 아미노산 치환 변이체인 mono-IL21(DDD)-Fc, mono-IL21(NKQ)-Fc, mono-IL21(NQNT)-Fc를 대조군인 mono-IL21-Fc 융합단백질과 함께 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 분석한 결과이다. 상기 SEC분석에서 running buffer는 1X PBS (pH7.4, 137 mM NaCl)이고, Flow rate는 0.75 ml/min, 단백질 투입량은 30 µg (1mg/ml 로 30 µl injection)이었다.

도 10은 인간 IL21 야생형에 비교하여 본 발명에서 구축한 IL21 동원체(ortholog) 서열 이식 변이체들의 서열 중 바뀐 서열을 나타내며 그 명명법 및 근거에 대한 그림을 나타낸 것이다.

도 11은 mono-IL21-Fc 융합단백질 동원체(ortholog) 서열 이식 변이체인 mono-IL21(Helix 1)-Fc, mono-IL21(Helix 2)-Fc를 HEK293F 세포에 공동형질 전환을 통해 일시적으로 발현 및 정제한 다음, 대조군인 mono-IL21-Fc 융합단백질과 함께 5 µg의 단백질을 비환원성 조건과 환원성 조건의 10% SDS-PAGE 상에서 분리하고, Coomassie Blue 염색을 통해 크기 및 조합형태로 분석한 결과이다. Non-reducing은 비환원성 조건, Reducing은 환원성 조건, M은 단백질 마커(marker)이다.

도 12는 mono-IL21-Fc 융합단백질 융합단백질 동원체(ortholog) 서열 이식 변이체인 mono-IL21(Helix 1)-Fc, mono-IL21(Helix 2)-Fc를 대조군인 mono-IL21-Fc 융합단백질, mono-IL21-Fc 융합단백질, mono-IL21(DDD)-Fc, mono-IL21(NQNT)-Fc, mono-IL21(DDD NQNT)-Fc와 함께 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 분석한 결과이다. 상기 SEC분석에서 running buffer는 1XPBS이고, running buffer의 Flow rate는 0.75 ml/min, 단백질 투입량은 30 µg (1mg/ml 로 30 µl injection)이었다.

도 13은 mono-IL21-Fc 융합단백질 및 mono-IL21-Fc 융합단백질 변이체의 IL21이 세포표면의 IL21 수용체 (IL21 receptor)에 결합하는 정도를 FACS로 분석한 것이다. 인간 IL21 수용체를 발현하는 Jurkat 세포주(human CD4⁺ T-cell line)에 40nM, 200nM의 농도로 mono-IL21-Fc 융합단백질, mono-IL21(NKQ)-Fc, mono-IL21(DDD)-Fc 및 야생형 Fc를 처리한 후, 항-인간 IgG4 항체와 형광물질인 FITC가 융합된 항체로 형광표지하여 FACScalibur를 통해 형광 세기를 측정한 것이다.

도 14는 mono-IL21-Fc 융합단백질 및 mono-IL21-Fc 융합단백질 변이체에 의한 NK세포 증식효과를 나타낸 결과이다. 정상인의 혈액에서 분리한 PBMC에 100 grey의 감마 방사선 조사된 Jurkat (KL-1) 세포와 EBV-transformed LCL 세포 존재 하에 IL-2 (30 ng/ml monomeric IL-2 Fc)를 첨가하여 NK 세포를 배양하였다.

a, NK세포 배양 방법 및 스케줄에 대한 타임라인이다.

b, Day 0, 6, 14 에 획득한 NK세포의 수득률과 NK세포의 퍼센트를 나타낸 테이블이다.

c, Day 0, 6, 14 에 획득한 NK세포의 수득률을 나타낸 라인 그래프이다.

c, Day 0, 6, 14 에 획득한 NK세포의 수득률을 나타낸 바 그래프이다.

도 15는 mono-IL21-Fc 융합단백질 및 mono-IL21-Fc 융합단백질 변이체에 의한 NK세포 증식효과를 나타낸 결과이다. CD4/CD8 T 세포를 제거한 PBMC에 100 grey의 감마 방사선 조사된 Jurkat (KL-1) 세포와 EBV-transformed LCL 세포 존재 하에 IL-2 (30 ng/ml monomeric IL-2 Fc)를 첨가하여 NK 세포를 배양하였다.

a, NK세포 배양 방법 및 스케줄에 대한 타임라인이다.

b, Day 0, 6, 14 에 획득한 NK세포의 수득률과 NK세포의 퍼센트를 나타낸 테이블이다.

c, Day 0, 6, 14 에 획득한 NK세포의 수득률을 나타낸 라인 그래프이다.

c, Day 0, 6, 14 에 획득한 NK세포의 수득률을 나타낸 바 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서

[0037]

사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

- [0038] 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 인터루킨21 (IL21)에서 N-말단을 기준으로 50, 54, 75 내지 88 및 124번 위치로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열이 치환 또는 결실된 인터루킨21 변이체에 관한 것이다.
- [0039] 인간 IL21 사이토카인의 성숙형태 (mature form) 서열에 해당하는 아미노산 잔기 3번 내지 133 위치로 구성된, 서열번호 4의 인간 IL21에서 일부 아미노산 치환 또는 결실을 포함할 수 있다.
- [0040] (1) IL21 구조 분석을 통해 물성 악화에 원인이 될 가능성이 높은 아미노산 서열 및 영역을 선정하는 단계; (2) 상기 선정한 아미노산 자리 및 영역에, 물성 향상을 위해 치환될 아미노산을 디자인하는 단계; 및 (3) 상기 디자인한 IL21 변이체를 이중이중체 중쇄불변부위 Fc(γ 1/4, EW-RVT)와 융합하여 발현/정제한 후, 생물학적 물성을 분석하는 단계를 포함하는 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0041] 치료용 단백질 후보의 물성을 확인 및 개량은 치료용 단백질 제작에 중요하다. 치료용 단백질의 물성은 그 단백질의 치료 효능 및 약물동력학, 부작용의 유무를 좌우할 수 있다. 치료용 단백질의 물성은 단백질의 체내 순전하, 소수성 정도, 단백질의 부적절한 폴딩으로 인해 감소할 수 있다. 체내 순전하가 양 또는 음으로 강하게 하전되거나, 소수성이 강해 체내 수용성 환경에 용해될 수 없거나, 단백질이 체내에서 적절하게 폴딩 상태를 유지할 수 없는 경우 물성이 나빠질 수 있다. 이는 그 단백질의 구조 및 기능은 유지시키면서 물성 악화의 원인이 되는 아미노산을 선별하여 교대로 돌연변이 시킴으로써 개선시킬 수 있다.
- [0042] 인간 IL21의 구조는 클래스 1 사이토카인에 대해 전형적으로 나타나는 업-업-다운-다운으로 배열된 4개의 나선 (helix A, B, C, 내지 D) 구조와 나선 구조를 이어주는 루프 구조를 가진다. 구조적인 특성으로는, 인간 IL21의 mature form의 서열인 25번 아미노산부터 155번 아미노산까지 28번 내지 47번 아미노산이 Helix A, 65번 내지 80번 아미노산이 Helix B, 86번 내지 98번 아미노산이 Helix C, 126번 내지 144번 아미노산이 Helix D를 형성한다. IL21 수용체와의 결합에서는 14개의 IL21 잔기와 16개의 IL21 수용체 잔기가 반테르발스 결합을 형성하고, 그 중 IL21 Helix A 서열 내 27번 아르기닌, 31번 아르기닌, 34번 글루타민, Helix C 서열 내 98번 아르기닌, 95번 라이신이 가장 주된 아미노산이라고 알려져 있다. 본 발명에서는 이와 같은 야생형 IL21의 구조 및 기능에 영향을 주지 않으면서 생체 내 생물학적 물성을 향상시키기 위해서, 아미노산 치환 전략과 동원체 서열 이식 전략을 이용한다.
- [0043] 구체적으로, 상기 인터루킨21 변이체는 서열번호 4의 아미노산 서열 중 다음으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환 또는 결실을 포함할 수 있다:
- [0044] (1) K50N,
- [0045] (2) K54Q,
- [0046] (3) K75L,
- [0047] (4) P76D,
- [0048] (5) P77R,
- [0049] (6) S78N,
- [0050] (7) T79L,
- [0051] (8) R83N, R83D, R83L,
- [0052] (9) R84K, R84D, R84W,
- [0053] (10) Q85G, Q85S,
- [0054] (11) K86N, K86L,
- [0055] (12) H87A,
- [0056] (13) R88T, R88G, R88N,
- [0057] (14) R124Q, R124D,
- [0058] (15) 79 내지 82번 위치의 아미노산 결실, 및

- [0059] (16) 81 내지 84번 위치의 아미노산 결실.
- [0060] 본 발명에 따르면, IL21의 표면 양전하를 줄이기 위해서 양전하 결사슬을 가진 아미노산이 치환된 IL21변이체를 구축하였다. 이를 바탕으로, 상기 인터루킨21 변이체는 서열번호 4의 아미노산 서열 중 다음으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환 및/또는 결실을 포함할 수 있다:
- [0061] (1) R83N, R84K, R124Q;
- [0062] (2) R83D, R84D, R124D;
- [0063] (3) K50N, K54Q, R86N, R88T; 및
- [0064] (4) K50N, K54Q, R83D, R84D, R86N, R88T, R124D.
- [0065] 본 발명에 따르면, IL21의 비정형 영역을 포함한 K77~R90까지의 서열을 각각 상보적인 인간 IL4 서열과 동원체 IL4 서열로 바꾸어 mono-IL21-Fc 융합단백질 동원체 서열 이식 변이체를 구축하였다. 이를 바탕으로, 상기 인터루킨21 변이체는 서열번호 4의 아미노산 서열 중 다음으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환 및/또는 결실을 포함할 수 있다:
- [0066] (1) K75L, P76D, P77R, S78N, 79 내지 82번 위치의 아미노산 결실, R83L, R84W, Q85G, K86L, H87A, R88G; 및
- [0067] (2) K75L, P76D, P77R, S78N, T79L, 81 내지 84번 위치의 아미노산 결실, Q85S, K86L, H87A, R88N.
- [0068] 구체적 실시예에서, 상기 인터루킨21 변이체는 서열번호 5 내지 10으로 구성된 군에서 선택되는 서열을 포함할 수 있다.
- [0069] 본 명세서에서 "변이"란 아미노산을 해당 단백질의 구조 및 생물학적 또는 생화학적 기능의 손실을 야기하지 않는 유사한 생화학적 특성을 갖는 아미노산으로 치환하는 것을 포함하는 단백질의 변형을 의미한다. "아미노산 치환"은 해당 아미노산을 구조적으로는 유지시키나, 다른 화학적 특성을 가지는 결사슬을 가진 아미노산으로 대체시키는 치환이다. 자연계 존재하는 아미노산은 유사한 특성을 띠는 결사슬을 갖는 아미노산으로 분류될 수 있고, 이는 잘 알려져 있다. 이들 분류는 염기성 결사슬을 갖는 아미노산(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 결사슬을 갖는 아미노산(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 전하를 띠지 않는 극성 결사슬을 갖는 아미노산(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 결사슬을 갖는 아미노산(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지된 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 결사슬을 갖는 아미노산(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 포함한다. 본 발명은 인간 IL21을 아미노산 치환 전략을 통해 구축한 IL21 변이체를 제공하며, 여전히 활성을 보유할 수 있음을 보인다.
- [0070] 본 명세서에서 "동원체 서열 이식"이란 IL21과 같은 과(family)의 사이토카인 (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15)의 특정 서열 영역을 참고하여 IL21의 동일한 위치의 영역의 아미노산과 치환하는 것을 의미한다. IL21의 구조 분석 결과 Helix C에서 Helix D로 넘어가는 CD 루프 구조와 C 말단 영역이 구조적으로 결정이 되지 않는 비정형 영역이다. 비정형 영역의 형성은 여러 원인이 있지만, 그 중 가장 큰 원인이 불안정한 구조의 형성이므로, 해당 영역에 IL21과 같은 계열의 사이토카인의 서열을 참고하여, 가장 안정한 구조를 이룰 수 있을 것이라고 예상되는 CD 루프의 서열을 이식하여 이를 적용한 IL21의 변이체는 야생형과 비교하여 더 향상된 물성을 가질 것이라고 추측되었다.
- [0071] 본 발명의 인간 IL21 변이체는 목적하는 기능을 유지하는 범위 내에서, 본 명세서에 기재된 IL21 변이체의 서열 뿐만 아니라, 이의 생물학적 균등물도 포함할 수 있다. 예를 들면, IL21의 물성 또는 기타 생물학적 특성을 보다 더 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에 추가적인 변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어, 항체의 아미노산 서열 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 즉, 앞서 본 바와 같이 아미노산 잔기 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 잔기 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 가지며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.
- [0072] 다른 관점에서, 본 발명은 상기 IL21 변이체, 제 1 Fc 영역 및 제 2 Fc 영역을 포함하는 항체(immunoglobulin) 중쇄불변부위 (Fc) 쌍을 포함하고, 상기 제 1 Fc 영역 또는 제 2 Fc 영역의 CH3 도메인 중 변이를 포함하는 이

중이중체 (heterodimer)인, 융합단백질에 관한 것이다.

- [0073] 인터루킨21 (Interleukin-21, IL21) 사이토카인이 항체 이종이중체 중쇄불변부위 Fc(Heterodimeric Fc)에 단량체 형태로 융합한 융합단백질 ("IL21 단량체-Fc 융합단백질", "Heterodimeric Fc-fused IL21 monomer proteins", 또는 "mono-IL21-Fc 융합단백질"로 명명됨) 또는 인터루킨 21의 변이체가 항체 이종이중체 중쇄불변부위 Fc(Heterodimeric Fc)에 단량체 형태로 융합한 융합단백질 ("IL21 단량체-Fc 융합단백질 변이체", "Heterodimeric Fc-fused IL21 variant monomer proteins", 또는 "mono-IL21-Fc 융합단백질 변이체"로 명명됨)에 관한 것이다.
- [0074] 인터루킨21 (Interleukin-21, IL21) 사이토카인이 항체 이종이중체 중쇄불변부위 Fc(Heterodimeric Fc)에 다이머 형태로 융합한 융합단백질 ("IL21 다이머-Fc 융합단백질 변이체", "Heterodimeric Fc-fused IL21 variant dimeric proteins", 또는 "dimer-IL21-Fc 융합단백질 변이체"로 명명됨)에 관한 것이다.
- [0075] 인터루킨21 변이체의 경우 야생형 IL21의 아미노산 돌연변이를 통해 IL21의 비특이적 반응성을 감소시키고 및 구조적 안정성을 증가시킨 돌연변이체를 디자인하여, 이를 mono-IL21-Fc 융합단백질 변이체 형태로 발현했을 경우 융합단백질의 발현양도 증가시키고 생리학적 조건(Physiological conditions)에서 바람직하지 않은 올리고머 (oligomer) 형성을 줄이고, 모노머 (monomer) 형태로 존재할 수 있도록 생물학적 물성을 개량한 것이다.
- [0076] 구체적으로, 야생형 IL21의 융합단백질인 mono-IL21-Fc 융합단백질에 비해 생물학적 물성이 향상되었지만, 세포 표면에 발현된 IL21 수용체 (IL21 receptors)와 결합 능력 및 면역세포의 증식능을 보존하는 물성을 향상시킨 IL21 변이체를 개발하기 위한 기술이다.
- [0077] 야생형 IL21을 포함하는 융합단백질인 mono-IL21-Fc 융합단백질의 생리학적 조건에서 비특이적 상호작용을 줄임으로써 1) 체내에서 발생 가능한 부작용을 감소시키고, 2) 약물동력학 (pharmacokinetics)을 향상시키고, 3) 재조합 단백질 IL21 사이토카인의 짧은 반감기로 인하여 요구되는 빈번한 생체투여를 대체할 수 있으며, 4) 이에 따른 고가비용의 단점을 해결할 수 있는 IL21 변이체 포함 mono-IL21-Fc 융합단백질 변이체를 개발하기 위한 기술이다.
- [0078] 먼저 야생형 IL21이 인간 IgG1의 hinge 영역 서열과 인간 IgG4의 CH2-CH3 영역을 가지고 있는 Fc(γ 1/4)에 기반한 EW-RVT 돌연변이를 도입한 이종이중체 중쇄불변부위 EW-RVT heterodimeric Fc(γ 1/4, EW-RVT)에 융합된 mono-IL21-Fc 융합단백질 단량체 융합단백질을 구축하였다. 이후에, 야생형의 IL21의 구조를 분석하고, 단백질의 물성 및 특이성에 영향을 줄 수 있는 서열을 선정하여 아미노산 단위로 치환하거나 같은 계열의 사이토카인의 서열을 이식한 것을 디자인하고, 이를 mono-IL21-Fc 융합단백질 형태로 발현시켜, 발현양도 증가시키고 생리학적 조건(Physiological conditions)에서 바람직하지 않은 올리고머 (oligomer) 형성을 줄이고, 모노머 (monomer) 형태로 존재할 수 있는 mono-IL21-Fc 융합단백질의 변이체를 개발하였다.
- [0079] 본 발명에서는 IgG1의 hinge 영역 서열과 인간 IgG4의 CH2-CH3 영역을 가지고 있는 Fc(γ 1/4)에 기반한 EW-RVT 돌연변이를 도입한 EW-RVT 이종이중체 Fc(γ 1/4, EW-RVT)를 사용했다. 또한 비교예로 인간 IgG1의 hinge 영역 서열과 인간 IgG4의 CH2-CH3 영역을 가지고 있는 야생형 Fc(γ 1/4, WT)을 이용하여, Bi-IL21-Fc 융합단백질 (IL21 이량체-Fc 융합단백질)을 구축하여 비교하였다.
- [0080] 이를 바탕으로, 본 발명은 mono-IL21-Fc 융합단백질의 야생형 IL21 아미노산 서열을 치환하거나, 동원체 (ortholog)의 사이토카인의 서열을 이식한 mono-IL21-Fc 융합단백질 변이체를 제공한다. 더욱 구체적으로 mono-IL21-Fc 융합단백질 변이체 개발을 위한 IL21 구축 근거는 1) IL21 단백질 표면 양전하를 줄여 체내 비특이적 상호작용을 줄임으로써 물질의 안정성을 향상시키고, 체내 비특이적 상호작용을 줄이며, 이를 통해 더 긴 체내 반감기를 가지는 융합단백질의 제작, 2) IL21과 같은 과(family)의 사이토카인의 IL-2, IL-4와의 서열을 비교하여 IL21 구조 상, 불안정성을 야기할 수 있는 서열을 IL-2, IL-4의 서열로 이식시킴으로써 IL-2, IL-4가 가지는 더 나은 체내 안정성을 모방, 3) mono-IL21-Fc 융합단백질과 비교하였을 때 인간 IL21 수용체를 보이는 세포주에서의 수용체 결합능이 유지되는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0081] 본 발명에 따른 인터루킨21 변이체 포함 융합단백질 변이체 (heterodimeric Fc-fused protein variants)는 기존 구축된 mono-IL21-Fc 융합단백질의 구조는 유지함으로써, 그 기능과 활성을 유지할 수 있는 형태의 단백질을 제공한다.
- [0082] "Fc 영역"은 항체 유래의 힌지 영역(hinge domain), CH2 도메인, CH3 도메인을 포함하는 영역을 의미한다. 본 발명에서의 "제 1 Fc 영역 및 제 2 Fc 영역은 이종이중체 중쇄불변부위(heterodimeric Fc)의 형성이 촉진되도록 변이"되었다는 표현은 자연계에 존재하는 항체는 2개의 Fc 영역이 서로 동일한 서열을 가지는 동종이중체 중쇄

불변부위(homodimeric Fc) 형태를 가지게 되는데, 이러한 Fc 영역의 일부 서열에 변이를 유발시킴으로써, 제 1 Fc 영역 및 제 2 Fc 영역 간의 특정 비공유 결합을 통해 이종이중체 중쇄불변부위(heterodimeric Fc)의 형성이 촉진되며, 동종이중체의 형성이 감소되거나, 바람직하게는 거의 일어나지 않도록 변이되었다는 것을 의미한다.

- [0083] 바람직하게는 본 발명에 따른 제 1 Fc 영역 및 제 2 Fc 영역의 이종이중체 중쇄불변부위(heterodimeric Fc)의 형성이 촉진되도록 하는 변이는, 상기 항체 유래 제 1 Fc 영역 및 제 2 Fc 영역에 포함된 CH3 도메인 각각이 이종이중체 중쇄불변부위(heterodimeric Fc)의 형성이 촉진되도록 하는 변이를 포함할 수 있다.
- [0084] 본 발명에 있어서, 이종이중체 중쇄불변부위는 제 1 Fc 영역 및 제 2 Fc 영역을 포함하고, 상기 제 1 Fc 영역 및 제 2 Fc 영역은 이종이중체 중쇄불변부위의 형성이 촉진되도록 CH3 도메인이 변이된 것임을 특징으로 하는 이종이중체 중쇄불변부위를 의미한다.
- [0085] 상기 제 1 Fc 영역 또는 제 2 Fc 영역의 CH3 도메인 변이는 다음의 군에서 선택된 하나 이상의 변이를 포함하고 변이 위치는 EU index에 따르는 것을 특징으로 한다:
- [0086] (1) 제 1 Fc 영역의 CH3 도메인 중 K370 위치에서 K370E, K370R, K370M, K370D 또는 K370H로 치환;
- [0087] (2) 제 1 Fc 영역의 CH3 도메인 중 K409 위치에서 K409W로 치환;
- [0088] (3) 제 2 Fc 영역의 CH3 도메인 중 E357 위치에서 E357N, E357D, E357A, E357I, E357G 또는 E357M로 치환, 및 S364 위치에서 S364T 또는 S364W로 치환; 및
- [0089] (4) 제 2 Fc 영역의 CH3 도메인 중 F405 위치에서 F405T로 치환, 및 D399 위치에서 D399V로 치환.
- [0090] 상기 제 1 Fc 영역 또는 제 2 Fc 영역의 CH3 도메인 중 다음을 추가로 포함하고 변이 위치는 EU index에 따르는 것을 특징으로 할 수 있다:
- [0091] (i) 제 1 Fc 영역의 CH3 도메인 내 Y349 위치에 치환된 시스테인 (C); 또는
- [0092] (ii) 제 2 Fc 영역의 CH3 도메인 내 S354 위치에 치환된 시스테인 (C).
- [0093] 구체적으로, 상기 제 1 Fc 영역 또는 제 2 Fc 영역의 CH3 도메인의 변이는 다음의 군에서 선택된 하나 이상의 변이를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다: (단, 변이 위치는 EU index에 따름)
- [0094] (1) 제 1 Fc 영역의 CH3 도메인의 K360 위치에서의 K360E의 아미노산 잔기의 치환;
- [0095] (2) 제 2 Fc 영역의 CH3 도메인의 E347 위치에서의 E347R의 아미노산 잔기의 치환;
- [0096] (3) 제 1 Fc 영역의 CH3 도메인의 K409 위치에서의 K409W의 아미노산 잔기의 치환; 및
- [0097] (4) 제 2 Fc 영역의 CH3 도메인의 F405 위치에서의 F405T 아미노산 잔기의 치환 및 D399 위치에서의 D399V의 아미노산 잔기의 치환.
- [0098] 상기 제 1 Fc 영역 또는 제 2 Fc 영역의 CH3 도메인 중 다음을 추가로 포함하고 변이 위치는 EU index에 따르는 것을 특징으로 할 수 있다:
- [0099] (i) 제 1 Fc 영역의 CH3 도메인 내 Y349 위치에 치환된 시스테인 (C); 또는
- [0100] (ii) 제 2 Fc 영역의 CH3 도메인 내 S354 위치에 치환된 시스테인 (C).
- [0101] 본 발명에 따른 구체적 실시예에서, 상기 제 1 Fc 영역 및 제 2 Fc 영역의 CH3 도메인 변이는 (1) 제 1 Fc 영역의 CH3 도메인 중 K360 위치에서 K360E로 치환, K409 위치에서 K409W로 치환; 및 (2) 제 2 Fc 영역의 CH3 도메인 중 E347 위치에서 E347R로 치환; 및 F405 위치에서 F405T로 치환 및 D399 위치에서의 D399V로 치환을 포함하고, 변이 위치는 EU index에 따르는 것을 특징으로 할 수 있다 (이하, EW-RVT로 명명됨).
- [0102] 본 발명에 있어서, EW-RVT 이종이중체 Fc는 IgG1의 hinge 영역 서열과 인간 IgG4의 CH2-CH3 영역을 가지고 있는 Fc(γ 1/4)에 기반한 상기 EW-RVT 돌연변이를 도입한 EW-RVT heterodimeric Fc(γ 1/4, EW-RVT)를 의미한다.
- [0103] 바람직하게는 본 발명에 따른 항체 유래 제 1 Fc 영역 및 제 2 Fc 영역에 포함된 CH3 도메인은 각각 서열번호 1 및 서열번호 2의 서열번호로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 군에서 선택된 서열을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0104] 상기 제 1 Fc 영역 및 제 2 Fc 영역은 각각 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD 및 IgE로 이루어진 군으로부터 선택된 Fc 영역 유래인 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 상기 제 1 Fc 영역 및 제 2 Fc 영역

은 각각 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 유래인 것을 특징으로 하고, 상기 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역은 동종형(isotype) 항체 유래인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0105] 특히, 본 발명에 따른 항체 유래 제 1 Fc 영역 및 제 2 Fc 영역은 IgG4 유래의 표 1에 기재된 CH3 도메인의 서열을 가지는 것이 바람직하다.

[0106] 본 명세서에서 사용되는 용어, ' γ 1/4'는 항체 중쇄의 불변영역 도메인 중 힌지 영역은 높은 안정성으로 시중 치료용 항체에 많이 채택되는 IgG1 동종형을 사용하고, CH2 내지 CH3 영역은 원치 않는 ADCC(antibody-dependent cellular cytotoxicity)/CDC(complement-dependent cytotoxicity)와 같은 항체 고유 기능이 나타나지 않도록 하는 IgG4 동종형을 사용하여, 이가 융합된 Fc를 Fc(γ 1/4)라 한다.

[0107] [표 1]

구성	CH3A 제 1 Fc 영역의 CH3 서열 (EU number 341-447)	CH3B 제 2 Fc 영역의 CH3 서열 (EU number 341-447)
IgG4- EW-RVT	GQPREPQVYTLPPSQEEMTENQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS LGK (서열번호 1)	GQPREPRVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP PVLVSDGSFTLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호 2)
IgG4 야생형	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GK (서열번호 3)	

[0108]

[0109] 구체적으로, 본 발명에 따른 융합단백질은 서열번호 5 내지 10으로 구성된 군에서 선택되는 서열을 포함하는 인터루킨21 변이체, 서열번호 1의 서열을 포함하는 제 1 Fc 영역 및 서열번호 2의 서열을 포함하는 제 2 Fc 영역을 포함하는 항체(immunoglobulin) 중쇄불변부위(Fc) 쌍을 포함할 수 있다.

[0110] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 인터루킨21 변이체 또는 융합단백질을 코딩하는 핵산에 관한 것이다. 본 발명의 인터루킨21 변이체 또는 융합단백질을 코딩하는 핵산을 분리하여 인터루킨21 변이체 또는 융합단백질을 재조합적으로 생산할 수 있다.

[0111] "핵산"은 DNA(gDNA 및 cDNA) 및 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산에서 기본 구성단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다. 본 발명의 IL21 변이체를 코딩하는 핵산의 서열은 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오타이드의 추가, 결실, 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.

[0112] 상기 인터루킨21 변이체 또는 융합단백질을 암호화하는 DNA는 통상적인 분자생물학적 수법을 사용하여(예를 들어, CH3A(EW) 및 CH3B(RVT) DNA와 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 분리 또는 합성할 수 있으며, 핵산을 분리하고, 이를 복제 가능한 벡터 내로 삽입하여 추가로 클로닝하거나(DNA의 증폭) 또는 추가로 발현시킨다. 이를 바탕으로, 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터에 관한 것이다.

- [0113] 본 명세서에서 사용되는 용어, "발현벡터"는 숙주세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단으로, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터 등을 포함한다. 벡터의 성분으로는 일반적으로 다음 중의 하나 이상이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 항생제 내성 마커 유전자, 증강인자 요소, 프로모터, 전사 종결 서열. 인터루킨21 변이체 또는 융합단백질을 코딩하는 핵산은 프로모터 및 전사 종결 서열 등과 같이 작동적으로 연결되어 있다.
- [0114] "작동적으로 연결"은 핵산 발현조절서열(예: 프로모터, 시그널 서열 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 따라 상기 조절서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [0115] 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL λ 프로모터, pR λ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 또한, 예를 들어, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터, β -액틴 프로모터, 사람 헤모글로빈 프로모터 및 사람 근육 크레아틴 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터, 엡스타인바 바이러스(EBV)의 프로모터 및 로우스 사코마 바이러스(RSV)의 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [0116] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주세포에 관한 것이다. 본 발명의 융합단백질을 생성시키기 위해 사용된 숙주세포는 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵생물 세포일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0117] 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis* 및 바실러스 투링기엔시스(*Bacillus thuringiensis*)와 같은 바실러스 속 균주, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*, 예를 들면, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 프로테우스미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 및 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)(예를 들면, 스태필로코쿠스 카르노수스(*Staphylococcus carnosus*))와 같은 원핵 숙주세포를 이용할 수 있다.
- [0118] 다만, 동물 세포에 대한 관심이 가장 크며, 유용한 숙주 세포주의 예는 COS-7, BHK, CHO, CHOK1, DXB-11, DG-44, CHO/-DHFR, CV1, COS-7, HEK293, BHK, TM4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PER.C6, SP2/0, NS-0, U20S, 또는 HT1080일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0119] 본 명세서에서 "융합"은 기능 또는 구조가 다르거나 같은 두 분자를 일체화하는 것으로, 상기 인터루킨21 변이체에 제 1 Fc 영역 및 제 2 Fc 영역을 포함하는 항체(immunoglobulin) 중쇄불변부위 (Fc) 쌍이 결합할 수 있는 모든 물리, 화학적 또는 생물학적 방법에 의한 융합일 수 있다. 상기 융합은 바람직하게는 연결자 펩타이드에 의할 수 있으며, 이 연결자 펩타이드는 본 발명의 인터루킨21 변이체 및 제 1 Fc 영역 및 제 2 Fc 영역을 포함하는 항체(immunoglobulin) 중쇄불변부위 (Fc) 쌍의 다양한 위치에서 상기 생체 활성 분자와의 융합을 중계할 수 있다.
- [0120] 상기 인터루킨21 변이체는 제 1 Fc 영역 또는 제 2 Fc 영역의 N-말단에 결합할 수 있다. 상기 인터루킨21 변이체는 제 1 Fc 영역 또는 제 2 Fc 영역 중 어느 하나의 N-말단에 단량체 형태로 융합될 수 있다. 야생형 IL21의 아미노산 돌연변이를 통해 IL21의 비특이적 반응성을 감소시키고 및 구조적 안정성을 증가시킨 돌연변이체를 디자인하여, 이를 mono-IL21-Fc 융합단백질 변이체 형태로 발현했을 경우 융합단백질의 발현양도 증가시키고 생리학적 조건(Physiological conditions)에서 바람직하지 않은 올리고머 형성을 줄이고, 모노머 형태로 존재할 수 있도록 생물학적 물성을 개량한 것이다.
- [0121] 상기 IL-21 또는 이의 변이체는 링커로 제 1 Fc 영역 또는 제 2 Fc 영역에 연결될 수 있다. 상기 링커는 상기 링커는 펩타이드 링커일 수 있으며, 약 10-25 aa 길이를 가질 수 있다. 예를 들어, 글리신 및/또는 세린과 같은 친수성 아미노산이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0122] 구체적으로, 상기 링커는 예를 들어, (GS)_n, (GGG)_n, (GSGGS)_n 또는 (G_nS)_m (n, m은 각각 1 내지 10)을 포함할

수 있으나, 상기 링커는 예를 들어 $(G_nS)_m$ (n, m 은 각각 1 내지 10)일 수 있다.

- [0123] 다른 관점에서, 상기 인터루킨21 변이체 또는 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0124] 본 발명은 또한, 환자에게 필요한 유효량으로 본 발명에 따른 인터루킨21 변이체 또는 융합단백질을 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 및 치료방법에 관한 것이다.
- [0125] 특히, 본 발명에 따른 mono-IL21-Fc 융합단백질 변이체는 T 세포 및/또는 NK 세포의 증식을 활성화시키고 독성능을 증가시켜 항종양 또는 항암 효과를 보인다. 본 발명에 따른 mono-IL21-Fc 융합단백질 변이체는 암과 관련된 질환의 치료에 사용된다.
- [0126] 상기 암은 예를 들어 대장암, 흑색종, 유방암, 췌장암, 신장암, 전립선암, 난소암, 소장암, 식도암, 자궁경부암, 폐암, 림프종 및 혈액암으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0127] 본 발명은 더욱이, 본 발명에 따른 인터루킨21 변이체 또는 융합단백질을 포함하는 면역세포 배양용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 더욱이, 본 발명에 따른 인터루킨21 변이체 또는 융합단백질을 면역세포에 처리하는 단계를 포함하는 배양방법에 관한 것이다.
- [0128] 경우에 따라서, 배지, 혈청, 보충제 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 추가적으로 더 포함할 수 있다. 배지는 아미노산(amino acids), 당류(sugars), 무기염(inorganic salts) 및 비타민으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나를 포함할 수 있다. 바람직하게는 상기 세포 배양용 배지는 아미노산, 당류, 무기염 및 비타민을 모두 포함하는 것일 수 있다.
- [0129] 상기 조성물은 세포를 배양하기 위해 사용된 배지를 포함하며, 구체적으로 NK 세포, 보다 구체적으로 CD3-CD56+ 세포를 배양하기 위한 배지를 포함한다. 시험관 내에서(in vitro) 세포 성장 및 생존을 위해 세포가 필요로 하는 성분을 함유하거나, 세포 성장 및 생존을 돕는 성분을 함유한다. 구체적으로, 상기 성분은 비타민, 필수 또는 비필수 아미노산, 및 미량 원소일 수 있다.
- [0130] 상기 배지는 아미노산 성분, 비타민 성분, 무기염 성분, 기타 성분 및 정제수로 구성되며,
- [0131] a) 상기 아미노산 성분은 글리신, L-알라닌, L-발린, L-류신, L-이소류신, L-트레오닌, L-세린, L-시스테인, L-메티오닌, L-아스파르트산, L-아스파라긴, L-글루탐산, L-글루타민, L-리신, L-아르기닌, L-히스티딘, L-페닐알라닌, L-티로신, L-트립토판, L-프롤린, β -알라닌, γ -아미노부티르산, 오르니틴, 시트룰린, 호모세린, 트리오트티로신, 티록신 및 디옥시페닐알라닌으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 아미노산 또는 이들의 조합이고, 바람직하게는, 글리신, L-알라닌, L-아르기닌, L-시스테인, L-글루타민, L-히스티딘, L-라이신, L-메티오닌, L-프롤린, L-세린, L-트레오닌 및 L-발린으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 아미노산 또는 이들의 조합이며,
- [0132] b) 상기 비타민 성분은 바이오틴, D-판토텐산칼슘, 엽산, 나이아신아미드, 피리독신 하이드로클로라이드, 리보플라빈, 티아민 하이드로클로라이드, 비타민 B12, 엽화콜린, i-이노시톨 및 아스코르브산으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 비타민 또는 이들의 조합이고, 바람직하게는, i-이노시톨, 티아민 하이드로클로라이드, 나이아신아미드 및 피리독신 하이드로클로라이드로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 비타민 또는 이들의 조합이며,
- [0133] c) 상기 무기염 성분은 염화칼슘($CaCl_2$)(무수), 황산동 펜타하이드레이트($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), 황산제이철 헵타하이드레이트($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), 염화마그네슘(무수), 황산마그네슘($MgSO_4$)(무수), 염화칼륨(KCl), 염화나트륨(NaCl), 인산수소나트륨(Na_2HPO_4), 인산수소나트륨 모노하이드레이트($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$), 황산아연 헵타하이드레이트($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), 질산제이철 노나하이드레이트($Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$) 및 탄산수소나트륨($NaHCO_3$)으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 무기염 또는 이들의 조합이고, 바람직하게는, 염화나트륨(NaCl), 탄산수소나트륨($NaHCO_3$), 염화칼륨(KCl), 염화칼슘($CaCl_2$)(무수) 및 인산수소나트륨 모노하이드레이트($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 무기염 또는 이들의 조합이며,
- [0134] d) 상기 기타 성분은 D-글루코즈 (덱스트로즈), 소듐 피루베이트, 히포크산틴 Na, 티미딘, 리놀레산, 리포산, 아데노신, 시티딘, 구아노신, 우리딘, 2'-데옥시아데노신, 2'-데옥시시티딘 HCl 및 2'-데옥시구아노신으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 기타 성분 또는 이들의 조합이고, 바람직하게는, 소듐 피루베이트일 수 있다.

- [0135] e) 정제수는 상기 아미노산, 비타민, 무기염 및 기타 성분을 용해시키기 위해 사용되며, 1차 이상의 증류를 거쳐 수득되거나, 필터를 통해 정제된 물일 수 있다.
- [0136] 또한, 상기 조성물에 성장인자 또는 사이토카인을 더 포함할 수 있다. 상기 성장인자로 IGF, bFGF, TGF, HGF, EGF, VEGF 또는 PDGF 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다. 상기 사이토카인으로 IL-1, IL-4, IL-6, IFN- γ , IL-10, IL-15, IL-17 또는 IL-21 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0137] 또한, 상기 조성물에 자연살해세포 활성용 항체를 더 포함할 수 있다. 상기 활성용 항체로써 항 CD3 항체, 항 CD2 항체, 항 CD335 항체 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다. 또한 상기 자연살해세포 활성용 항체가 결합된 비드를 포함할 수 있다.
- [0138] 특히, 상기 NK 배양용 배지 조성물은 IL-15, IL-21 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 추가적으로 더 포함할 수 있다.
- [0139] 상기 IL-15 및 IL-21은 인터루킨(Interleukin, IL)의 한 종류로서, 림프구나 단핵구 및 대식세포 등 면역담당세포가 생산하는 단백질성 생물 활성물질을 의미한다. 상기 IL-15 및 IL-21은 자연살해세포를 증식을 촉진시켜 단핵세포를 원료세포로 사용하여 자연살해세포를 배양하는 경우에 사용할 수 있으나, 이들 만을 단독 또는 혼합하여 사용할 경우, 증식률 및 순도가 낮은 문제가 있다(Biossel L. et al., Biology of Blood and Marrow Transplantation, 14, 1031-1038, 2008).
- [0140] 구체적으로, 상기 배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), EDM(Endothelial differentiation medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, a-MEM(a-Minimal Essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium), Iscove's Modified Dulbecco's Medium, AIM-V Medium, X-vivo™ 15 Medium, NK MACS Medium과 같은 통상의 동물세포 배양용 배지를 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 배지로서 AIM-V Medium, X-vivo™ 15 Medium 및 NK MACS Medium을 사용하였다.
- [0141] 본 발명에서 사용되는 용어 "혈청"이란, 혈액이 완전 응고된 후 혈액으로부터 유리된 투명한 상층액을 의미한다. 또한, 동물세포의 배양에는 합성배지에 혈청을 필수적으로 첨가해야 하며, 소나 말, 인간의 혈청을 사용하는 것이 일반적이다. 소 유래 혈청의 경우, 채혈시기에 따라 소의 태자혈청(fetal bovine serum; FBS), 소의 신생자혈청(newborn bovine serum), 새끼소혈청(calf serum), 어미소혈청(bovine serum) 등을 사용할 수 있다. 인간 유래 혈청의 경우, 혈액형이 AB형인 공여자의 인간 혈청을 사용하며, A 및 B 혈액형 항원에 대한 항체가 없어 면역 반응성을 최소화할 수 있는 인간 AB 혈청(Human AB serum)을 사용할 수 있다. 또한 상기 "혈청"의 대체제로써 CTS Immune Cell SR 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 인간 AB 혈청 또는 CTS Immune Cell SR을 사용하였다.
- [0142] 상기 보충제는 세포 배양시 안정성과 세포 활성을 개선하기 위해, L-Glutamine 대체제인 GlutaMAX(Gibco®)를 사용할 수 있다. 또한, 상기 보충제는 NK MACS supplement(Miltenyi Biotec, 130-113-102)일 수 있다.
- [0143] 상기 면역세포는 T 세포, NK 세포, 사이토카인 유도 살해세포(Cytokine Induced Killer cell, CIK), 활성화 세포독성 T 림프구(Cytotoxic T Lymphocyte, CTL), 마크로파지, 종양 조직 내 침투 T 세포 (Tumor-Infiltrating Lymphocytes, TIL), 수지상세포로 구성된 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0144] 상기 방법으로 제조된 면역세포, 특히 NK 세포를 제공한다. 상기 NK 세포를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 약학 조성물의 투여량은 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 포함된 유효성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.
- [0145] 상기 약학 조성물의 투여량은 유효성분인 NK 세포를 기준으로 1×10^2 cells/kg 내지 1.0×10^{13} cells/kg일 수 있고, 1×10^7 cells/kg 내지 1.5×10^{11} cells/kg일 수 있다. 이때 투여는 하루에 한 번 투여할 수 있고, 수 회에 나누어 투여할 수도 있다.
- [0146] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0147] **실시예 1. mono-IL21-Fc 융합단백질 구축**

[0148] 융합단백질의 구축을 위한 Fc 변이체는 IgG4를 기반으로 하여 EW-RVT 돌연변이가 도입되어 이중이중체를 형성하는 이중이중체 중쇄불변부위 Fc(γ 1/4, EW-RVT)를 사용하였다. 기존 보고에 따르면, 항체와 사이토카인을 융합한 형태인 이뮤노사이토카인 (Immunocytokine)의 구축에 있어 IgG1이 가지는 ADCC/CDC와 같은 항체 고유 기능이 오히려 생체 내 제거현상(clearance)을 촉진한다. 따라서 본 명세서에 명시된 모든 융합단백질의 구축에 ADCC/CDC의 기능이 IgG1과 비교하였을 때 거의 나타나지 않는 IgG4 동종형을 사용하였다. (Gillies SD et al., 1999). 특히, 인간 IL21은 IL21 수용체와 상호작용이 용이하도록 추가의 펩타이드 링커 없이, hinge 영역을 이용하여 중쇄불변부위와 연결하였다. 이때 사용한 hinge 영역은 기존에 많이 사용하는 IgG1 유래 hinge를 사용하였고, 이중체 형성을 위한 중심 hinge 영역 (core hinge region) 내의 시스테인(cysteine) 잔기를 제외한 나머지 상부 hinge 영역 (upper hinge region)의 시스테인 잔기는 단백질 융합 시, 원하지 않는 이황화 결합이 생기는 것을 막기 위해 세린(serine) 잔기로 치환하였다 (Mutated hinge, 도 2).

[0149] 기존에 이중이중체 형성능이 기존에 보고된 IgG1 기반 EW-RVT 변이체와 유사한 정도로 유지될 것이라 예상되는 동종형별 변이체 중에서 IgG4를 기반으로 한 변이체 (IgG4-EW-RVT, Choi et al., 2013; 대한민국 특허등록 제 10-1522954호)를 이용하여 인간 IL21(Interleukin 21, 표 2, 서열번호 5) 융합단백질이 구축되었다. 자연계에 존재하는 IL21은 단량체로 작동하는 사이토카인으로, 하나의 IL21이 하나의 IL21 수용체(IL21R) 및 하나의 γ c-chain과 결합함으로써 활성을 가진다. 따라서 상기 이중이중체 중쇄불변부위 Fc(γ 1/4, EW-RVT)를 이용하여, 하나의 IL21을 서로 다른 Fc 변이체 (CH3A 또는 CH3B) 중 하나에만 연결하여 자연계에 존재하는 IL21의 단량체 형태를 유지하고자 하였다.

[0150] 도 1a는 CH3 돌연변이체 쌍이 도입된 mono-IL21-Fc 융합단백질의 모식도를 나타낸 것이다. CH3 돌연변이체 쌍이 도입된 IL21-Fc(γ 1/4,EW)를 암호화하는 DNA를 CMV 프로모터를 지닌 동물세포 발현 벡터인 pcDNA3.1(+)(Invitrogen, USA)에 signal sequence-IL21 mature form-Mutated Hinge-CH2-CH3A를 가지도록 인 프레임 (in-frame)으로 NotI/HindIII를 이용하여 클로닝하였다. 이 때 사용된 IL21은 인간 IL21(Uniprot entry name, Q9HBE4; 서열번호 4)로, signal sequence를 제외한 mature form을 코딩하는 DNA 서열만을 사용하였다.

[0151] mono-IL21-Fc 융합단백질에 대한 비교예로 야생형 Fc를 융합한 Bi-IL21-Fc를 구축하였다. 상기와 유사한 방법으로 인간 IL21 mature form을 코딩하는 DNA 서열을 야생형 IgG4 CH3가 들어가 있는 동물세포 발현벡터인 pcDNA3.1(+)(Invitrogen, USA)에 signal sequence-IL21 mature form-Mutated Hinge-CH2-CH3를 가지도록 인 프레임 (in-frame)으로 NotI/HindIII 제한효소를 이용하여 클로닝하였다. 표 2는 mono-IL21-Fc 융합단백질 및 Bi-IL21-Fc 융합단백질 구축에 사용된 인간 IL21의 아미노산 서열을 나타낸 것이다. 아미노산 서열은 IL21 mature form의 131개 아미노산 펩타이드 (인간 IL21의 아미노산 번호 32부터 아미노산 번호 162)로 구축되었으며 (Parrish-Novak et al. Nature, 2000;408(6808):57-63), 그 Numbering은 mono-IL21-Fc 선행 연구 내용과 동일하게 매겨진 것이다 (대한민국 특허등록 10-1928981; 미국특허등록 US10800825B2). 즉, 본 특허 명세서에서는 IL21의 mature form 32번부터 1번잔기로 명명하여 1-131번 잔기로 명명하였다 (표 2 및 표 4 참조).

[0152] [표 2]

구성	아미노산 서열 (a.a 1-131)
human	1QDRHMIRMRLQIDIVDQLKNYVNDLVPFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQ
IL21	KAQLKSANTGNNERIINVSIIKKLRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSDCDSYEKK
mature	PPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS ¹³¹
form	(서열번호 4)

[0153]

[0154] 실시예 2. Fc 및 mono-IL21-Fc 융합단백질 구축 및 발현/정제

[0155] 야생형 Fc(γ 1/4, WT) 및 이중이중체 중쇄불변부위 Fc(γ 1/4, EW-RVT), Bi-IL21-Fc 융합단백질, mono-IL21-Fc 융합단백질 (mono-IL21-Fc 융합단백질은 인간 IL21이 융합된 CH3A(EW) 및 CH3B(RVT)의 발현 벡터를 1:1, 1.5:1, 2:1 비율로 함)의 발현은 각 단백질을 암호화하는 플라스미드와 폴리에틸렌이민 (Polyethylenimine, PEI) (Polyscience)의 혼합물을 HEK293-F (Invitrogen) 세포에 일시적 트랜스펙션 (transient transfection)하여 무혈청 FreeStyle™ 293 발현배지 (Invitrogen)가 들어 있는 진탕 플라스크에서 배양함으로써 이루어진다.

자세한 방법은 다음과 같다.

[0156] 진탕 플라스크 (Corning)에 100 mL 일시적 트랜스펙션 시, HEK293-F 세포를 1.0×10^6 세포/ml의 밀도로 배지 90 ml에 과중하여, 135 rpm, 8% CO₂에서 배양하였다. 24시간 후, 각각의 이중이중체 중쇄불변부위를 포함한 융합단백질을 생산하기 위해 그에 따른 CH3A 및 CH3B 플라스미드를 4 ml FreeStyle™ 293 발현 배지 (Invitrogen)에 Fc(γ 1/4, WT)의 경우 125 μ g, 이중이중체 중쇄돌연변이 이중이중체 중쇄불변부위 Fc(γ 1/4, EW-RVT)의 경우 CH3A 62.5 μ g, CH3B 62.5 μ g, bi-IL21-Fc의 경우 125 μ g, mono-IL21-Fc 융합단백질 CH3A (EW):CH3B(RVT)=1:1의 경우 CH3A 62.5 μ g, CH3B 62.5 μ g, CH3A (EW):CH3B(RVT)=1.5:1의 경우 CH3A 75 μ g, CH3B 50 μ g, CH3A (EW):CH3B (RVT)=2:1의 경우 CH3A 83.3 μ g, CH3B 41.7 μ g 총 125 μ g (1.25 μ g/ml)으로 희석 및 필터하여, PEI 375 μ g을 희석한 6ml의 배지 (3.75 μ g/ml)와 혼합하여 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 그 후, 반응시킨 혼합배지를 앞서 90 ml로 과중한 세포에 넣어 짧게는 5일에서 길게는 7일 동안 배양하게 되면, 세포가 생산한 단백질은 세포에 의해 세포 바깥으로 분비되어 배지에 쌓이게 된다. 때문에 단백질은 세포 배양 후 3800 rpm에서 25분간 원심분리하여 채취한 세포 배양 상등액으로부터 단백질 A 세파로오스 컬럼 (protein A Sepharose column, GE healthcare)을 이용하여 정제하였다. 이 때, 정제방법은 단백질 A 컬럼 회사에서 제공하는 표준 프로토콜을 참조하였으며, 용출된 단백질은 Vivaspin 30,000 MWC0 (Satorius) 원심분리 농축기를 이용하여 1X PBS로 버퍼를 교환한 후 농축하였다. 정제된 단백질은 BCA protein assay kit (Thermo)내 용액을 이용하여 562 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 그려진 표준 곡선에 따라 그 양을 정량하였다. 표 3은 발현된 야생형 Fc(γ 1/4, WT), 이중이중체 중쇄불변부위 Fc(γ 1/4, EW-RVT), mono-IL21-Fc 융합단백질(형질전환 시 사용된 CH3A(EW):CH3B(RVT) 발현백터의 비율=1:1, 1.5:1, 2:1), Bi-IL21-Fc의 정제 수율을 나타낸 것이다. 결과 값은 3회 독립적인 실험을 수행한 후 평균의 표준오차 (mean $\pm$ SD)로 나타내었다. 수율 확인 결과, mono-IL21-Fc 융합단백질이 Bi-IL21-Fc 융합단백질과 비교해 월등히 높은 수준의 수율을 보이는 것으로 확인되었다.

[0157] [표 3]

단백질 명	정제 수율 (mg/L)
야생형 Fc(γ 1/4, WT)	160 $\pm$ 13
Fc(γ 1/4, EW-RVT)	191 $\pm$ 45
Bi-IL21-Fc 융합단백질	13.1 $\pm$ 7.9
mono-IL21-Fc 융합단백질 (EW:RVT =1:1)	51.3
mono-IL21-Fc 융합단백질 (EW:RVT =2:1)	70.7 $\pm$ 15.4
mono-IL21-Fc 융합단백질 (EW:RVT =1.5:1)	18.2

[0158]

[0159] 상기 정제된 야생형 Fc(γ 1/4, WT) 및 이중이중체 중쇄불변부위 Fc(γ 1/4, EW-RVT), mono-IL21-Fc 융합단백질(형질전환 시 CH3A(EW) 및 CH3B(RVT)의 발현 백터 비율=1:1, 1.5:1, 2:1) 및 Bi-IL21-Fc 융합단백질 5 μ g을 10% 비환원성 및 환원성 조건으로 SDS-PAGE 상에서 분석하였다 (도 3). 비환원성 조건에서 mono-IL21-Fc 융합단백질은 71 kDa, Bi-IL21-Fc 융합단백질은 86 kDa에서 관찰되었고, 환원성 조건에서는 Bi-IL21-Fc는 43 kDa에서 하나의 밴드만 관찰되었고, IL21이 융합된 이중이중체 중쇄불변부위 CH3A (EW)와 이중이중체 중쇄불변부위 CH3B (RVT) 두 개의 플라스미드로 이루어져 있는 mono-IL21-Fc 융합단백질의 경우에는 43, 28 kDa에서 두 개의 밴드가 관찰되었다. 이중이중체 중쇄불변부위 CH3A, CH3B 각각은 약 25kDa, 인간 IL21은 15kDa가 예상되는 단백질 사이즈이지만, 환원성 및 비환원성 조건에서 예상되는 단백질 사이즈보다 더 큰 사이즈의 밴드가 관찰된 이유는, 인간 IL21 및 Fc 내 N-글리코실화(N-Glycosylation)로 인한 것으로 판단되었다. 비환원성 조건의 mono-IL21-Fc 융합단백질 SDS-PAGE 결과를 보면, 플라스미드 비율에 따라서 결과가 다를 수 있었다. EW:RVT=1:1, 1.5:1에서는 이중이중체 중쇄불변부위 CH3A(EW)와 CH3B(RVT)가 1:1로 결합한 형태인 mono-IL21-Fc 융합단백질을 이루지 못해, 이중이중체 중쇄불변부위 CH3B (RVT)의 단량체 2개로 형성된 이량체로 보이는 밴드가 관찰되었고, EW:RVT=2:1에서는 이와 같은 밴드가 관찰되지 않았다. 따라서 하기 언급될 mono-IL21-Fc 융합단

백질 및 mono-IL21-Fc 융합단백질 변이체는 모두 플라스미드 비율 EW:RVT=2:1로 구축되었다.

[0160] 실시예 3. mono-IL21-Fc 융합단백질 물성 평가

[0161] 도 4는 발현시킨 야생형 Fc(γ 1/4, WT), 이중이중체 중쇄불변부위 Fc(γ 1/4,EW-RVT), mono-IL21-Fc 융합단백질 (형질 전환 시 이중이중체 중쇄불변부위 CH3A(EW):CH3B(RVT)의 발현백터 비율=1:1, 1.5:1, 2:1)에 대해 물성 분석을 위해서 SEC (크기 배제 크로마토그래피, Size Exclusion Chromatography, SEC)을 수행하여 시간 (분)에 따른 280nm에서의 mAU 값을 나타낸 크로마토그램이다. HPLC (Agilent Technologies, USA) 기기 및 Superdex200 10/300 GL 컬럼(Cytiva, USA)을 사용하여 다음의 구체적인 프로토콜에 의하여 측정하였다.

[0162] 필터와 탈기 과정(degassing)을 거친 3차수, 1X PBS (pH 7.4, 12mM phosphate, 137mM NaCl, 2.7mM KCl)를 준비한다. 야생형 Fc(γ 1/4, WT), 이중이중체 중쇄불변부위 Fc(γ 1/4,EW-RVT), Bi-IL21-Fc, mono-IL21-Fc 융합단백질 (플라스미드 비율 CH3A(EW):CH3B(RVT)=1:1, 1.5:1, 2:1)을 1 μ g/ml의 농도로 희석하여 준비하고, 각 45 μ l 씩 250 μ l inserts with Polyemer Feet, 100/PK (Agilent Technologies, USA)에 넣고 이를 Autosampler vial 에 넣어 최종적으로 분석할 시료를 준비했다. 또한, 미지 단백질 시료의 사이즈를 구별할 수 있도록 하는 마커 역시 같은 농도 조건으로 준비하였다. 150kDa에 해당하는 마커는 Alcohol dehydrogenase, 66kDa에 해당하는 마커는 BSA이다.

[0163] 먼저 컬럼 부피의 2~3배의 3차수를 0.5ml/min으로 흘려, 초기 컬럼 내 storage buffer(20% 에탄올)를 제거함과 동시에 표준화 과정을 진행하였고, 이가 완료되면, 2~3배 부피의 생리학적 조건의 running buffer인 1X PBS (pH7.4, 137 mM NaCl)를 0.75ml/min으로 흘려주어 분석 시작 전 표준화 과정을 완료하였다. 준비된 분석용 시료를 기기에 위치시킨 후, 유속은 0.75ml/min, 주입량은 30 μ g (준비된 45 μ l의 시료 중 30 μ l만 주입), 40분 분석 후 10분 포스트 타임 (post time)으로 설정하여 분석을 수행하였다. 샘플 주입기가 설정된 주입량만큼 샘플을 주입하면 버퍼가 흐르는 관으로 흘러들어가고, 이가 컬럼에 주입된다. 시료가 든 버퍼가 다공성의 수지가 압축된 컬럼을 통과하게 되면, 시료 내 단백질의 분자량, 즉 크기에 따라서 컬럼 밖으로 용출되는 시간에 차이가 생기고, 이 때 280nm에서의 흡광도의 변화를 측정하여 얻어지는 크로마토그램을 통해 물성을 분석하였다. 이 때, 단백질의 크기가 작을수록 다공성 수지의 내부를 많이 통과하여 더 늦은 시간에 용출되고, 단백질의 크기가 클수록 다공성 수지의 외부를 타고 컬럼을 통과해 더 빠르게 용출되는 원리로써 크로마토그램을 해석할 수 있다.

[0164] SEC 분석을 통해 야생형 Fc(γ 1/4, WT), 이중이중체 중쇄불변부위 Fc(γ 1/4, EW-RVT), mono-IL21-Fc 융합단백질 (형질전환 시 CH3A(EW):CH3B(RVT)=1:1, 1.5:1, 2:1)의 물성을 분석한 결과, mono-IL21-Fc 융합단백질의 피크가 마커와 비교했을 때 예상되는 크기에 맞는 피크가 관찰되지 않고 더 크기가 작은 단백질임을 의미하는 피크가 관찰됨을 확인하였다. 이는 추후 기술할 원인으로 인해, 생리학적 조건의 storage buffer인 1X PBS에서 mono-IL21-Fc 융합단백질 단백질의 생물학적 물성이 좋지 않음을 의미하였다. 생물학적 물성이 안정하지 못함은 체내에서 바람직한 기능을 하지 못하고, 부작용 및 면역원성(immunogenicity)을 가질 수 있음을 의미하기 때문에 mono-IL21-Fc 융합단백질의 생물학적 물성을 향상시키는 개량이 필수적임을 의미하였다.

[0165] 실시예 4. 분석 버퍼 조성에 따른 mono-IL21-Fc 융합단백질 SEC 결과 변화 분석

[0166] 실시예 3에서 수행한 SEC 분석 결과 mono-IL21-Fc 융합단백질의 물성이 좋지 않게 판단되었다. 이에 대한 원인 규명을 위해 인간 IL21의 구조를 분석하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다. IL21의 표면에 양전하 결사슬을 가진 아미노산은 22개 존재하였으며, 양전하 결사슬을 가진 아미노산 중 가장 큰 영향을 끼치는 아르기닌은 10개 존재하였다. IL21의 등전점은 9.42이며 pH 7.4 조건에서 IL21은 양으로 하전된다. 이를 통해 IL21 표면 양전하 결사슬이 SEC 분석 시 사용되는 컬럼과 비특이적 상호작용을 한다고 추측하였다. 따라서, IL21 표면 양전하를 상쇄시킬 수 있는 환경을 조성하는 고농도의 염을 포함한 running buffer인 High Salt PBS (12mM phosphate, 500mM NaCl, 2.7mM KCl, pH 7.4)를 사용하여 실시예 4에서 묘사한 SEC 분석 방법과 동일하게 SEC 분석을 수행하였고, mono-IL21-Fc 융합단백질을 의미하는 크기의 피크가 관찰됨을 알 수 있었다. 그 결과를 도 6b에 나타내었다. 그 대조군으로, running buffer로 생체 조건의 환경을 제공하는 1X PBS를 사용하여 SEC 분석을 진행한 mono-IL21-Fc 융합단백질의 결과를 도 6a에 나타내었다. 결과 분석 시, mono-IL21-Fc 융합단백질의 단백질 크기에 맞는 피크가 관찰됨을 확인하였으며, 결과적으로 인간 IL21이 생리학적 조건의 버퍼에서 강하게 양으로 하전되는 특성으로 인해 SEC 분석 시 컬럼과 비특이적 상호작용하여 1X PBS 조건에서는 피크가 보이지 않음을 증명하였다. IL21의 표면 양전하는 SEC 분석 시 이외에도 생체 내로 주입되었을 때, IL21 수용체가 아닌 다른 세포 및 조직에 비특이적 결합으로 인한 부작용을 나타내며, 짧은 약물동력학을 초래하여 치료제로서 바람직한 기능을 할 수 없으므로, 이후 실시예에서는 IL21의 표면 양전하를 줄인 변이체를 구축하였다.

- [0167] 실시예 5. mono-IL21-Fc 융합단백질의 IL21 변이체 구축 및 발현/정제
- [0168] IL21의 표면 양전하를 줄이기 위해서 양전하 결사슬을 가진 아미노산이 치환된 변이체 mono-IL21(NKQ)-Fc, mono-IL21(DDD)-Fc, mono-L21(NQNT)-Fc, mono-IL21(DDD NQNT)-Fc를 구축하였다 (표 4에 서열정보 명시). 구체적으로는, 먼저 IL21의 표면에 드러난 아미노산 정보를 얻기 위해 이미 밝혀진 단백질 구조 (PDB ID: 3TGX)를 견본으로 하여 Chimera X 프로그램을 통해 구조를 분석하였다. 구조 분석 결과 표면 양전하를 띠는 아미노산이 22개, 이 중 높은 수용액상 pKa(~13.8)를 갖는 아미노산인 아르기닌이 10개 존재하였다. 그리고 Chimera X 프로그램을 통해 구조를 살펴보았을 때, 구조가 정확하게 밝혀지지 않은 비정형 영역을 관찰할 수 있었다. mono-IL21-Fc 융합단백질 아미노산 치환 변이체는 비정형 영역 내의 아미노산을 치환하거나, 구조가 밝혀진 영역의 아미노산 치환을 통해 구축되었다.
- [0169] 비정형 영역은 불안정한 구조의 형성에 크게 기여하며, IL21의 경우 비정형 영역 내에 아르기닌이 3개 (85R, 86R, 126R) 존재하여 비특이성을 증가시키고, Oligomer를 형성할 가능성을 높여 물성을 악화시키고, 특히 SEC 컬럼과도 비특이적인 상호작용을 하여 도 4와 같은 결과가 도출될 수 있다고 판단되었다. 따라서 비정형 영역 내 아르기닌을 동원체(토끼, 돼지) 서열을 참고하여 전하를 띠지 않는 극성 아미노산 또는 아르기닌보다 양전하의 성질이 약한 라이신으로 치환하여 새로운 클론을 구축하였다(R85N, R86K, R126Q). 이를 mono-IL21(NKQ)-Fc (서열번호 5)라 명명하였다.
- [0170] 비정형 영역 내 아르기닌 (R85, R86, R126)을 아미노산 중 가장 강한 음전하 결사슬을 가지는 아스파라긴산으로 치환한 새로운 클론을 구축하였다(R85D, R86D, R126D). 이를 mono-IL21(DDD)-Fc (서열번호 6)라 명명하였다.
- [0171] 또한 Chimera X 프로그램을 통하여 IL21 구조를 분석하였을 때 (PDB ID: 3TGX), L21 수용체 결합 영역이거나 주변 잔기와 의미 있는 결합을 하지 않고, 결사슬 방향이 표면을 향하고 있는 아미노산을 선별하였고 (K52, K56, K88, R90) 이를 동원체 서열을 참고하여, 전하를 띠지 않는 극성 아미노산으로 치환한 (K52N, K56Q, K88N, R90T) 새로운 클론을 구축하였다. 이를 mono-IL21(NQNT)-Fc (서열번호 7)라 명명하였다.
- [0172] mono-IL21(DDD)-Fc와 mono-IL21(NQNT)-Fc의 치환 전략을 모두 포함하여 아미노산을 치환한 (K52N, K56Q, R85D, R86D, K88N, R90T, R126D) 새로운 클론을 구축하였다. 이를 mono-IL21(DDD NQNT)-Fc (서열번호 8)라 명명하였다.
- [0173] 본 실시예에서 구축한 클론들에 대한 근거에 대한 그림 및 치환 전략을 도 7에 명시하였다.
- [0174] mono-IL21(NKQ)-Fc, mono-IL21(DDD)-Fc, mono-IL21(NQNT)-Fc, mono-IL21(DDD NQNT)-Fc 클론을 구축하기 위해 동물세포 발현 벡터인 pcDNA3.1(+) (Invitrogen, USA)에 각각 signal sequence- IL21 (variants) mature form- Mutated Hinge-CH2-CH3A (IgG4, EW)를 가지도록 인 프레임 (in-frame)으로 NotI/HindIII를 이용하여 클로닝하였다.
- [0175] mono-IL21-Fc 융합단백질, mono-IL21(NKQ)-Fc, mono-IL21(DDD)-Fc, mono-IL21(NQNT)-Fc, mono-IL21(DDD NQNT)-Fc은 인간 IL21 야생형 및 변이체 (NKQ 또는 DDD 또는 NQNT 또는 DDD NQNT)가 융합된 IgG4 CH3A(EW) 및 IgG4 CH3B(RVT)의 발현 벡터를 2:1 비율로 하여 폴리에틸렌이민 (Polyethylenimine, PEI) (Polysciences)의 혼합물을 HEK293-F (Invitrogen) 세포에 일시적 트랜스펙션 (transient transfection)하여 무혈청 FreeStyle™ 293 발현배지 (Invitrogen)가 들어 있는 진탕 플라스크에서 배양함으로써 이루어진다. 자세한 방법은 다음과 같다.
- [0176] 진탕 플라스크 (Corning)에 100 mL 일시적 트랜스펙션 시, HEK293-F 세포를 1.0×10^6 세포/mL의 밀도로 배지 90 mL에 과중하여, 135 rpm, 8% CO₂에서 배양하였다. 24시간 후, 각각의 이중이중체 중쇄불변부위를 포함한 융합단백질을 생산하기 위해 그에 따른 CH3A 및 CH3B 플라스미드를 4mL FreeStyle™ 293 발현 배지 (Invitrogen)에 IgG4 CH3A (EW): IgG4 CH3B (RVT)=2:1=83.3 µg:41.7 µg, 총 125 µg (1.25 µg/mL)으로 희석 및 필터하여, PEI 375 µg을 희석한 6mL의 배지 (3.75 µg/mL)와 혼합하여 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 그 후, 반응시킨 혼합배지를 앞서 90 mL로 과중한 세포에 넣어 짧게는 5일에서 길게는 7일 동안 배양하게 되면, 세포가 생산한 단백질 즉, 이중이중체 중쇄불변부위를 포함한 융합단백질은 세포에 의해 세포 바깥으로 분비되어 배지에 쌓이게 된다. 때문에 단백질은 세포 배양 후 3800 rpm에서 25분간 원심분리하여 채취한 세포 배양 상등액으로부터 단백질 A 세파로오스 컬럼 (protein A Sepharose column, GE healthcare)을 이용하여 정제하였다. 이 때, 정제 방법은 단백질 A 컬럼 회사에서 제공하는 표준 프로토콜을 참조하였으며, 용출된 단백질은 Vivaspin 30,000 MWCO (Satorius) 원심분리 농축기를 이용하여 storage buffer (PBS pH7.4)로 버퍼를 교환한 후 농축하였다. 정

IL21(NQNT)-Fc를 1 µg/ml의 농도로 희석하여 준비하고, 각 45 µl씩 250 µl inserts with Polyemer Feet, 100/PK (Agilent Technologies, USA)에 넣고 이를 Autosampler vial에 넣어 최종적으로 분석할 시료를 준비했다. 또한, 미지 단백질 시료의 사이즈를 구별할 수 있도록 하는 마커 역시 같은 농도 조건으로 준비하였다. 150kDa에 해당하는 마커는 Alcohol dehydrogenase, 66kDa에 해당하는 마커는 BSA이다.

[0185] 먼저 컬럼 부피의 2~3배의 3차수를 0.5ml/min으로 흘려, 초기 컬럼 내 storage buffer(20% 에탄올)를 제거함과 동시에 표준화 과정을 진행하였고, 이가 완료되면, 2~3배 부피의 running buffer인 1X PBS (pH7.4, 137 mM NaCl)를 0.75ml/min으로 흘려주어 분석 시작 전 표준화 과정을 완료하였다. 준비된 분석용 시료를 기기에 위치시킨 후, 유속은 0.75ml/min, 주입량은 30 µg (준비된 45 µl의 시료 중 30 µl만 주입), 40분 분석 후 10분 포스트 타임 (post time)으로 설정하여 분석을 수행하였다.

[0186] SEC 분석을 통해 mono-IL21-Fc 융합단백질, mono-IL21(NKQ)-Fc, mono-IL21(DDD)-Fc, mono-IL21(NQNT)-Fc의 물성을 분석한 결과 mono-IL21(NQNT)-Fc 융합단백질 변이체에 대해서, 발견시킨 융합단백질에 해당하는 피크가 mono-IL21-Fc 융합단백질과 비교해 크게 증가함을 확인하였다. 이를 통해, 인간 IL21의 표면 양전하로 인해 SEC 분석 시 컬럼과 비특이적 상호작용을 하여, 분석 시 피크가 예상대로 나오지 않았다는 추측이 타당했으며, 이를 완화시킨 mono-IL21-Fc 융합단백질 변이체에 대해 그 생물학적 물성이 향상되었고, 체내 주입 시 비특이적 상호작용이 감소하며, 그로 인한 약물 부작용이 감소하며 약물동력학은 증가할 수 있음을 의미하였다.

[0187] **실시예 7. mono-IL21-Fc 융합단백질의 IL21 동원체(ortholog) 서열 이식 변이체 구축 및 발현/정제**

[0188] mono-IL21-Fc 융합단백질의 생물학적 물성의 추가적인 향상을 위해 실시예 6에서 수행했던 아미노산 치환을 이용해 mono-IL21-Fc 융합단백질 변이체를 구축한 것과 달리 새로운 전략을 통해 mono-IL21-Fc 융합단백질의 변이체를 개발하고자 하였다. 구체적으로는 먼저, IL21과 같은 계열의 사이토카인인 IL-2 (PDB ID: 1IAR)와 IL-4 (PDB ID: 2B5I)와의 다중 서열 정렬 및 2차 구조 예측 플랫폼인 PSIPRED를 통해 세 사이토카인 간 2차 구조 형성 양상을 비교해보았다. 서열 분석 결과, IL21의 Helix C는 IL2, IL4보다 짧고, Helix C에서 Helix D로 이어지는 루프 구조는 현저히 길며, 루프 구조 사이 비정형 영역도 존재하였다. 이와 같은 구조적인 차이로 인해 IL21의 구조 역시 불안정해질 수 있다고 판단하였다. 따라서 IL2와 IL4의 해당 영역의 상보적인 서열을 IL21과 비교하고, 소수성 아미노산 잔기가 많아 서열을 이식하였을 때, 구조 불안정성을 야기시킬 수 있는 인간 IL2보다는 친수성 잔기가 비교적 많은 IL4의 서열을 이용해 mono-IL21-Fc 융합단백질 동원체 서열 이식 변이체를 구축하였다. 그리하여 IL21의 비정형 영역을 포함한 K77~R90까지의 서열을 각각 상보적인 인간 IL4 서열과 동원체 IL4 서열로 바꾸어 mono-IL21-Fc 융합단백질 동원체 서열 이식 변이체를 구축하였고 (표 6에 서열정보 명시.), 인간 IL4 서열을 이용한 변이체를 mono-IL21(Helix 1)-Fc (서열번호 9), 동원체 IL4 서열을 이용한 변이체를 mono-IL21(Helix 2)-Fc (서열번호 10)으로 명명하였다.

[0189] 본 실시예에서 구축한 클론들에 대한 근거에 대한 그림 및 치환 전략을 도 9에 명시하였다.

[0190] mono-IL21(Helix 1)-Fc, mono-IL21(Helix 2)-Fc를 구축하기 위해 동물세포 발현 벡터인 pcDNA3.1(+) (Invitrogen, USA)에 각각 signal sequence- IL21 (Helix 1) mature form-Mutated Hinge-CH2-CH3A (IgG4, EW), signal sequence- IL21 (Helix 2) mature form-Mutated Hinge-CH2-CH3A (IgG4, EW)를 가지도록 인 프레임 (in-frame)으로 NotI/HindIII를 이용하여 클로닝하였다.

[0191] mono-IL21-Fc 융합단백질, mono-IL21(Helix 1)-Fc, mono-IL21(Helix 2)-Fc는 인간 IL21 야생형 또는 IL21(Helix 1) 또는 IL21(Helix 2)가 융합된 IgG4 CH3A(EW) 및 IgG4 CH3B(RVT)의 발현 벡터를 2:1 비율로 하여 폴리에틸렌이민 (Polyethylenimine, PEI) (Polyscience)의 혼합물을 HEK293-F (Invitrogen) 세포에 일시적 트랜스펙션 (transient transfection)하여 무혈청 FreeStyle™ 293 발현배지 (Invitrogen)가 들어 있는 진탕 플라스크에서 배양함으로써 이루어진다. 자세한 방법은 다음과 같다.

[0192] 진탕 플라스크 (Corning)에 100 mL 일시적 트랜스펙션 시, HEK293-F 세포를 1.0×10^6 세포/ml의 밀도로 배지 90 ml에 파종하여, 135 rpm, 8% CO₂에서 배양하였다. 24시간 후, 각각의 이중중체 중쇄불변부위를 포함한 융합단백질을 생산하기 위해 그에 따른 CH3A 및 CH3B 플라스미드를 4ml FreeStyle™ 293 발현 배지 (Invitrogen)에 CH3A (EW):CH3B (RVT)=2:1=83.3 µg:41.7 µg, 총 125 µg (1.25 µg/ml)으로 희석 및 필터하여, PEI 375 µg을 희석한 6ml의 배지 (3.75 µg/ml)와 혼합하여 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 그 후, 반응시킨 혼합배지를 앞서 90 ml로 파종한 세포에 넣어 짧게는 5일에서 길게는 7일 동안 배양하게 되면, 세포가 생산한 단백질 즉, 이중중체 중쇄불변부위를 포함한 융합단백질은 세포에 의해 세포 바깥으로 분비되어 배지에 쌓이게 된다. 때문에 단백질은 세포 배양 후 3800 rpm에서 25분간 원심분리하여 채취한 세포 배양 상등액으로부터 단백질 A 세

파로오스 컬럼 (protein A Sepharose column, GE healthcare)을 이용하여 정제하였다. 이 때, 정제방법은 단백질 A 컬럼 회사에서 제공하는 표준 프로토콜을 참조하였으며, 용출된 단백질은 Vivaspin 30,000 MWCO (Satorius) 원심분리 농축기를 이용하여 storage buffer (PBS pH7.4)로 버퍼를 교환한 후 농축하였다. 정제된 단백질은 BCA protein assay kit (Thermo)내 용액을 이용하여 562 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 그려진 표준 곡선에 따라 그 양을 정량하였다 (표 7). 결과 값은 3회 독립적인 실험을 수행한 후 평균의 표준오차 (mean $\pm$ SD)로 나타내었다. 수율 확인 결과, mono-IL21(Helix 1)-Fc, mono-IL21(Helix 2)-Fc의 수율은 mono-IL21-Fc 융합단백질과 유사한 것으로 확인되었다.

[표 6]

Residue Number of Human IL21 mature form	
Clone name	IL21 QDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDEVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSI
IL21(Helix 1)	QDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDEVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSI
IL21(Helix 2)	QDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDEVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSI

Residue Number of Human IL21 mature form		서열번호
Clone name	IL21 IKKLLKRRKPPSTNAGRQKHLITCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLQKMIHQHLSRTHGSEDS	4
IL21(Helix 1)	IKKLLKRLDRNLWGLAGLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLQKMIHQHLSRTHGSEDS	9
IL21(Helix 2)	IKKLLKRLDRNLNLANLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLQKMIHQHLSRTHGSEDS	10

* unstructured region

[표 7]

단백질 명	정제 수율 (mg/L)
mono-IL21-Fc 융합단백질	66.9 $\pm$ 11.0
Mono-IL21(Helix 1)-Fc	70.2 $\pm$ 14.1
Mono-IL21(Helix 2)-Fc	57.8 $\pm$ 20.6

상기 정제된 mono-IL21-Fc 융합단백질, mono-IL21(Helix 1)-Fc, mono-IL21(Helix 2)-Fc 5 μ g을 10% 비환원성 및 환원성 조건으로 SDS-PAGE 상에서 분석하였다 (도 11). 비환원성 조건에서 mono-IL21-Fc 융합단백질 mono-IL21(Helix 1)-Fc, mono-IL21(Helix 2)-Fc는 71 kDa에서 관찰되었고, 환원성 조건에서는 인간 야생형 IL21 및 IL21(Helix 1)가 융합된 이중이중체 중쇄불변부위 CH3A(EW)와 이중이중체 중쇄불변부위 CH3B (RVT) 두 개의 플라스미드로 이루어져 있는 mono-IL21-Fc 융합단백질, mono-IL21(NKQ)-Fc, mono-IL21(DDD)-Fc는 43, 28 kDa에서 두 개의 밴드가 관찰되었다. IL21(Helix 2)가 융합된 이중이중체 중쇄불변부위 CH3A(EW)는 43kDa보다 더 큰 크기를 가지는 밴드가 관찰되었다. 이는 IL21(Helix 2) 구축 시, 동원체의 IL4 서열이 이식될 때 N-글리코실화(N-Glycosylation) 영역이 하나 더 생성되었고 (N90~T92), 이로 인한 결과로 판단되었다. 결과적으로 SDS-PAGE 상에서 분석했을 때 각 이중이중체 중쇄불변부위에 대한 발현 및 이를 통한 융합 단백질 형성에는 문제가 없는 것으로 확인되었다.

실시예 8. mono-IL21-Fc 융합단백질의 IL21 동원체 서열 이식 변이체 물성 평가

도 12는 발현시킨 mono-IL21-Fc 융합단백질 동원체(ortholog) 서열 이식 변이체 단량체 융합단백질에 대해 기존 구축된 mono-IL21-Fc 융합단백질, mono-IL21(DDD)-Fc, mono-IL21(NQNT)-Fc, mono-IL21(DDD NQNT)-Fc와의 물성 비교 분석을 위해서 SEC (Size Exclusion Chromatography, SEC)을 수행하여 280nm에서의 mAU 값을 나타낸 크로마토그램이다. HPLC (Agilent Technologies, USA) 기기 및 Superdex200 10/300 GL 컬럼(Cytiva, USA)을 사용하여 다음의 구체적인 프로토콜에 의하여 측정하였다.

필터와 탈기 과정(degassing)을 거친 3차수, 1X PBS (pH7.4, 137 mM NaCl)를 준비한다. 구축된 mono-IL21-Fc 융합단백질, mono-IL21(DDD)-Fc, mono-IL21(NQNT)-Fc, mono-IL21(DDD NQNT)-Fc, mono-IL21(Helix 1)-Fc, mono-IL21(Helix 2)-Fc를 1 μ g/ml의 농도로 희석하여 준비하고, 각 45 μ l씩 250 μ l inserts with Polymer Feet, 100/PK (Agilent Technologies, USA)에 넣고 이를 Autosampler vial에 넣어 최종적으로 분석할 시료를 준비했다. 또한, 미지 단백질 시료의 사이즈를 구별할 수 있도록 하는 표준 시료 역시 같은 농도 조건으로 준비

하였다. 150kDa에 해당하는 표준 시료는 Alcohol dehydrogenase, 66kDa에 해당하는 표준 시료는 BSA이다.

[0202] 먼저 컬럼 부피의 2~3배의 3차수를 0.5ml/min으로 흘려, 초기 컬럼 내 storage buffer(20% 에탄올)를 제거함과 동시에 표준화 과정을 진행하였고, 이가 완료되면, 2~3배 부피의 running buffer인 1X PBS (pH7.4, 137 mM NaCl)를 0.75ml/min으로 흘려주어 분석 시작 전 표준화 과정을 완료하였다. 준비된 분석용 시료를 기기에 위치시킨 후, 유속은 0.75ml/min, 주입량은 30 μ g (준비된 45 μ l의 시료 중 30 μ l만 주입), 40분 분석 후 10분 포스트 타임 (post time)으로 설정하여 분석을 수행하였다.

[0203] 크기 배제 크로마토그래피를 통해 mono-IL21-Fc 융합단백질 동원체 서열 이식 변이체의 물성을 분석한 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, mono-IL21(Helix1)-Fc, mono-IL21(Helix 2)-Fc는 mono-IL21-Fc 융합단백질에 비해 높은 메인 피크를 관찰할 수 있었다. 특히 mono-IL21(Helix 2)-Fc에 대해 mono-IL21-Fc 융합단백질에 비해서 oligomer 비율이 적고, 메인 피크의 높이가 높음을 관찰할 수 있다. 이는 서열이 바뀐 부분에 대하여 결사슬이 양전하를 띠는 아르기닌이 3개에서 1개로 줄어들었고, 비정형 영역을 Helix 구조로 치환해주어, 구조적인 안정성이 더 부여되었기 때문에 관찰된 결과라고 추측되었다.

[0204] 실시예 9. mono-IL21-Fc 융합단백질의 수용체 결합능 평가

[0205] 구축한 mono-IL21-Fc 융합단백질 variants의 IL21 수용체에 대한 결합능을 평가하기 위해서, IL21 수용체를 발현하는 CD4 양성 인간 T 세포주인 Jurkat 세포주를 통해 mono-IL21-Fc 융합단백질, mono-IL21(NKQ)-Fc, mono-IL21(DDD)-Fc의 수용체 결합능을 평가하였다. 구체적으로는, 2.0×10^6 cells/sample의 양으로 세포를 준비한 다음, 워싱버퍼 (PBS+ 1% FBS)를 통해 워싱한 후, mono-IL21-Fc 융합단백질, mono-IL21(NKQ)-Fc, mono-IL21(DDD)-Fc를 각각 200nM, 50nM의 양으로 4°C 조건으로 1시간 처리하였다. 이후 다시 워싱버퍼를 통해 워싱한 후, 2차 항체인 항-인간 IgG4 FITC를 4°C, 차광 조건에서 30분동안 처리하였다. 그 후 워싱버퍼로 워싱한 후 유세포 분석 기기인 FACScalibur (BD bioscience, USA)를 통해 분석되었다.

[0206] IL21 수용체에 대한 결합능은 mono-IL21-Fc 융합단백질 및 mono-IL21(variants)-Fc를 처리하는 과정을 포함한 실험군과 그렇지 않은 대조군을 형광물질로 표지한 후 형광 신호의 세기를 측정함으로써 평가되었다. 이에 대한 결과를 도 13에 나타내었다. 그 결과, mono-IL21(variants)-Fc 역시 mono-IL21-Fc 융합단백질과 비교하였을 때, 형광 신호가 유사하게 나타나며, 처리한 단백질 농도를 늘림에 따라, 신호 강도의 세기 역시 증가함을 확인할 수 있다. 이로써 mono-IL21(variants)-Fc의 수용체 결합능이 유지되어 생물학적 활성에는 문제가 없음을 알 수 있다.

[0207] 실시예 10. mono-IL21-Fc 융합단백질 변이체의 생물학적 활성능 평가

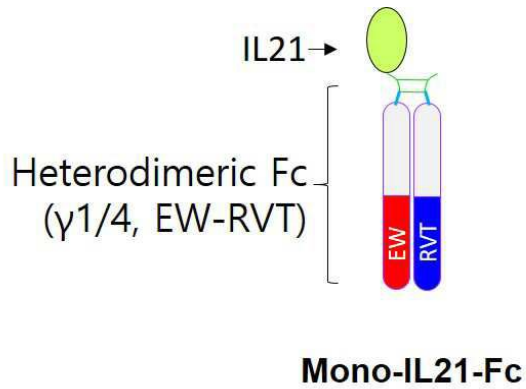
[0208] 적법 절차에 따라 동의 하에 사람의 혈액을 채취하였고 Ficoll (Ficoll-paque™ PLUS, GE healthcare)을 이용하여 1:2비율로 Ficoll 층 위에 혈액을 조심히 올려 2500 rpm 에서 30분간 원심분리하고 밀도(비중) 차이에 의해 분리된 연막층(buffy coat)에서 말초혈액 단핵세포(PBMC)를 분리하였다 (도 14). 또한군은 Ficoll로 분리한 PBMC에서 NK세포를 Enrich 하기 위해 CD4 T cell 과 CD8 T cell을 magnetic bead (Myltenyi Biotech)를 사용하여 제거한후 배양을 시작하였다 (도 15). 그리고 100 Gy 감마 방사선 조사한 Jurkat 세포와 EBV- LCL 세포를 말초혈액 단핵세포와 1:1 비율로 RPMI 1640(Corning)에 10% FBS(Fetal Bovine Serum, HyClone)와 1% Penicillin streptomycin(Gibco), IL-2-Fc (monomer, 30 ng/ml)가 첨가된 media에 배양하였다. 이 때 mono Fc-IL21 융합단백질 변이체 7종(Mono-IL21-Fc, Mono-IL21 (NKQ)-Fc, Mono-IL21 (DDD)-Fc, Mono-IL21 (NQNT)-Fc, Mono-IL21 (DDD NQNT)-Fc, Mono-IL21 (Helix 1)-Fc, Mono-IL21 (Helix 2)-Fc)을 Day 0에 한번 30ng/ml로 처리하였다. 3~4일마다 IL-2-Fc (monomer)가 30 ng/ml가 함유된 RPMI 배지를 첨가하였고 세포 수는 2.5×10^5 cells/ml로 맞춰 6일째 플라스크로 옮겨 배양하였다. Day 6와 Day 10에 세포들을 CD3-(FITC), CD56+(APC)으로 형광 염색하여 Flow cytometry를 통해 NK 세포의 %를 측정하고 최종적으로 NK 세포의 확장배율을 계산하였다. 그 결과, PBMC를 사용한 경우, NQNT, DDD-NQNT가 WT-IL21 보다 월등히 높은 수득율을 보였고 (도 14), CD4와 CD8 T세포를 제거한 PBMC를 사용한 경우, NQNT, helix-1 에서 높은 수득율을 보였다 (도 15). 이를 통해 mono Fc-IL21 융합단백질 변이체를 처리한 군에서 NK세포 증식 확장능이 향상됨을 확인할 수 있었다. NK 세포 치료제의 체외 확장 배양 시 기존 처리 방법에서 mono Fc-IL21 융합단백질 변이체를 추가로 처리해주면 기존의 방법에 비해 다량의 NK 세포 확장 유도가 가능함을 알 수 있었다.

[0209] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예로, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할

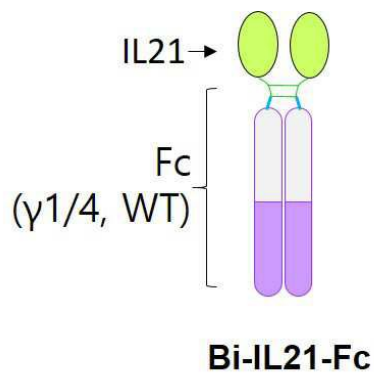
것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다. 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 용이하게 이용될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

도면

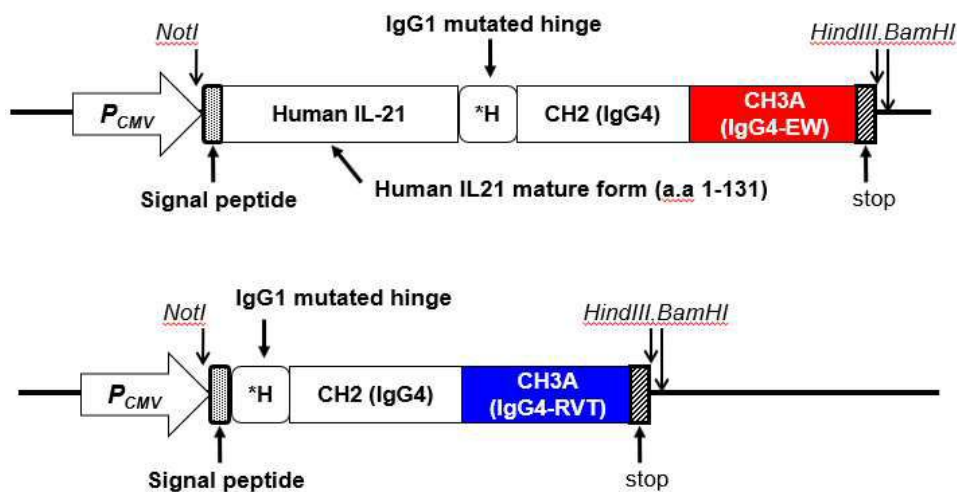
도면1a



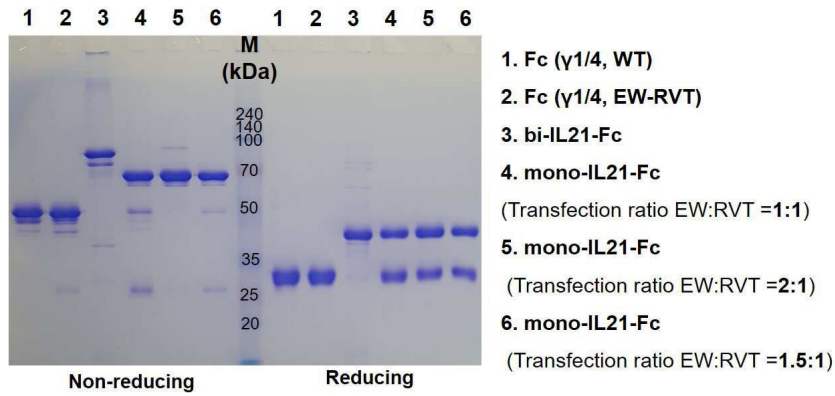
도면1b



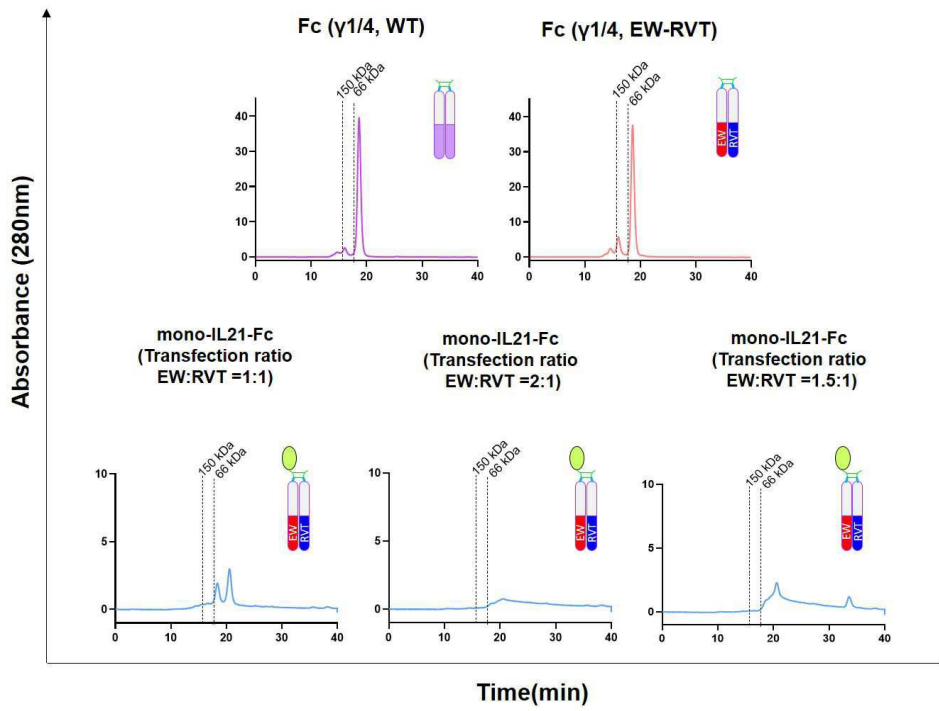
도면2



도면3



도면4



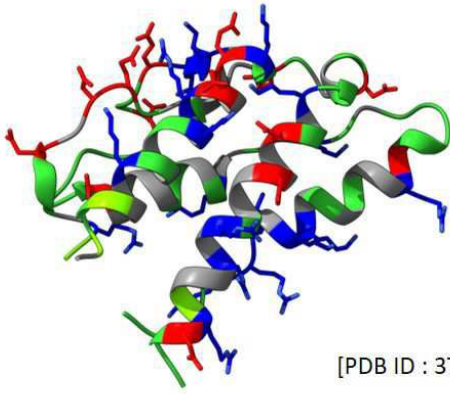
도면5

Positive charged residue (10 Arg, 12 Lys) : **Blue**

Negative charged residue (6 Asp, 8 Glu) : **Red**

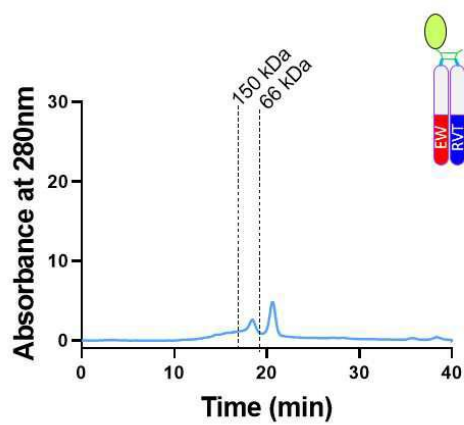
Hydrophobic residue (Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Trp) : **Gray**

Others (Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Gly, Pro, His, Tyr) : **Green**



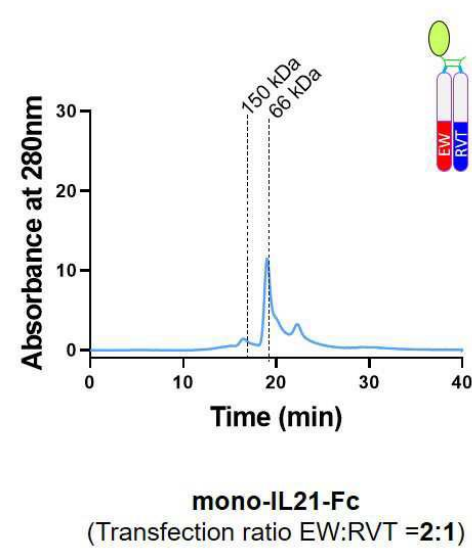
Theoretical pI: 9.42

도면6a

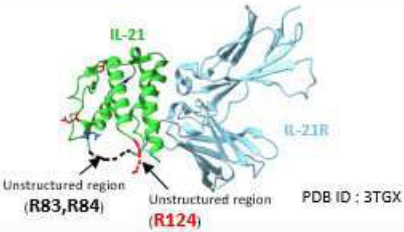
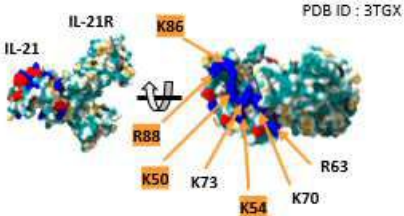


mono-IL21-Fc
(Transfection ratio EW:RVT=2:1)

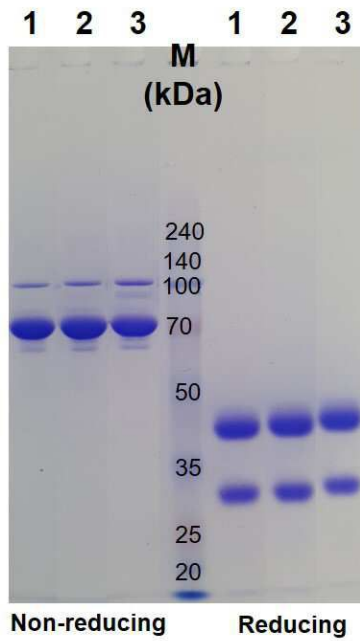
도면6b



도면7

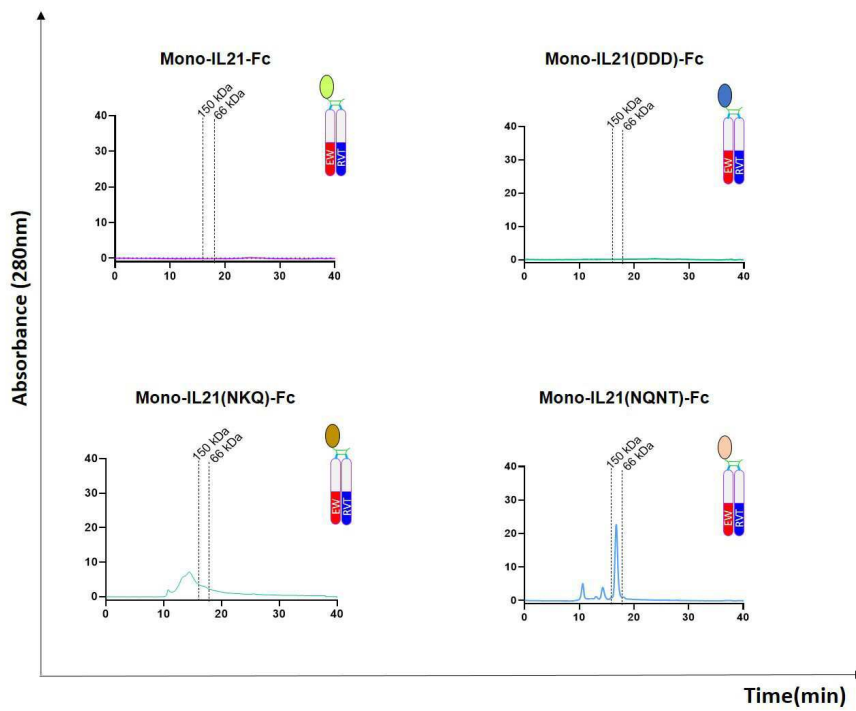
	IL21 variants	Mutations	rationale
1	IL21(NKQ)	R83N, R84K, R124Q	
2	IL21(DDD)	R83D, R84D, R124D	
3	IL21(NQNT)	K50N, K54Q, K86N, R88T	
4	IL21(DDD NQNT)	R83D, R84D, R124D K50N, K54Q, K86N, R88T	

도면8

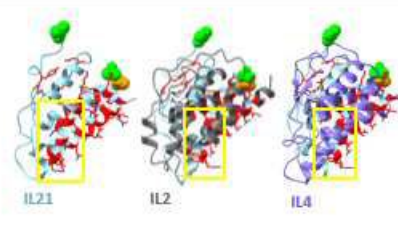


1. Mono-IL21-Fc
2. Mono-IL21(NKQ)-Fc
3. Mono-IL21(DDD)-Fc

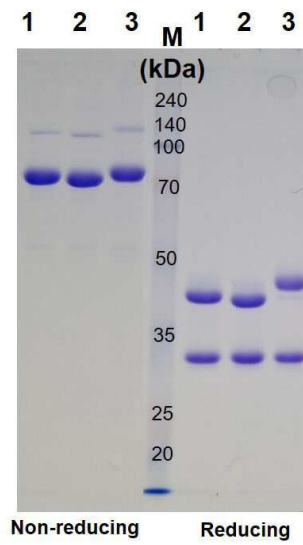
도면9



도면10

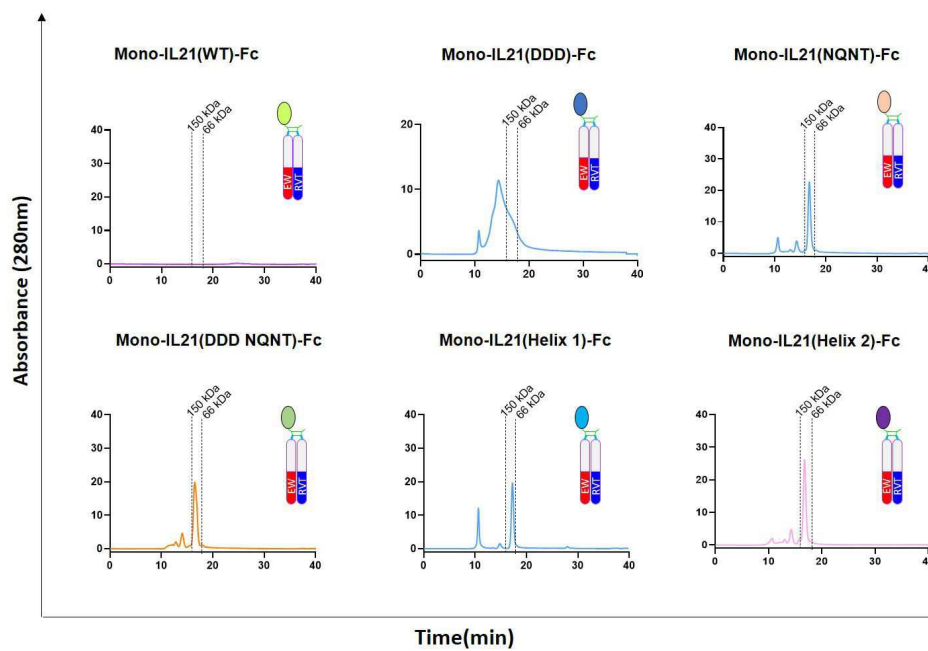
IL21 Variant	Mutation	rationale
5 IL21(Helix 1)	(K75~R88 Region) KPPSTNAGRRQKHR → LDRNLWGLAG	
6 IL21(Helix 2)	(K75~R88 Region) KPPSTNAGRRQKHR → LDRNLNLAN	

도면11



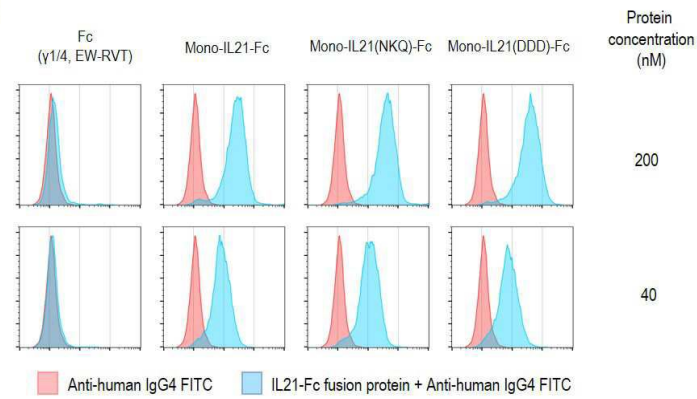
1. Mono-IL21-Fc
2. Mono-IL21(Helix 1)-Fc
3. Mono-IL21(Helix 2)-Fc

도면12

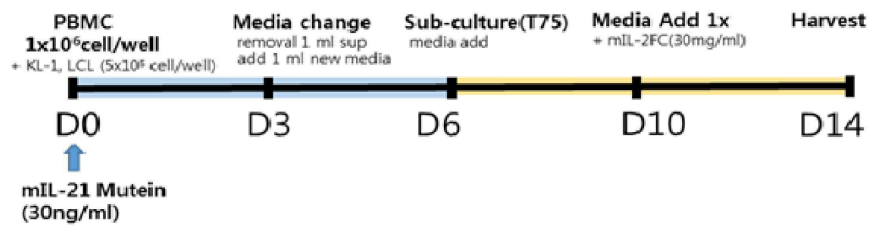


도면13

Cell line : Jurkat cell
(The CD4+ human T-cell line)



도면14a



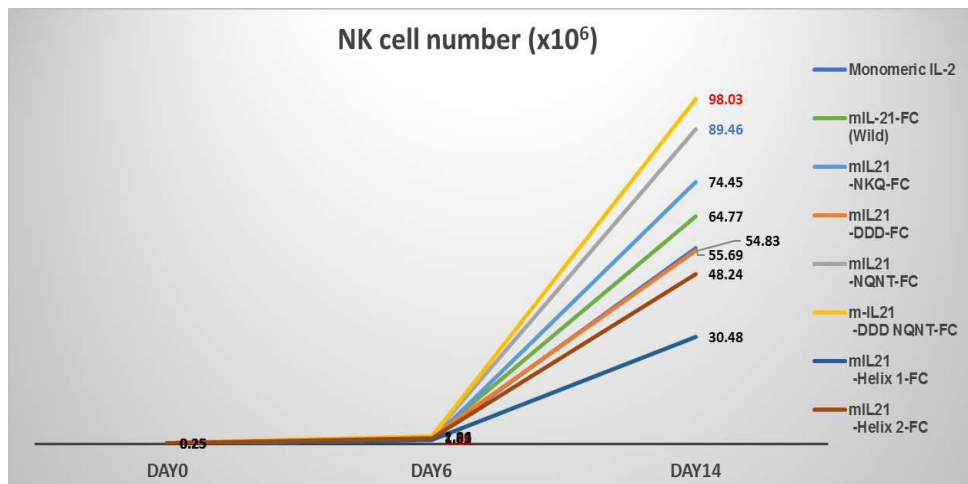
도면14b

PBMC (KL1+LCL)			mIL-21-FC (Wild)	mIL21 -NKQ-FC	mIL21 -DDD-FC	mIL21 -NQNT-FC	m-IL21 -DDD NQNT-FC	mIL21 -Helix 1-FC	mIL21 -Helix 2-FC
Monomeric IL-21 FC Mutein		-	+	+	+	+	+	+	+
DAY0	Total cell number(x10 ⁶)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	NK frequency(%)	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%
	NK cell number (x10 ⁶)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
DAY6	Total cell number(x10 ⁶)	3.00	4.20	3.90	4.40	4.40	4.30	2.90	4.30
	NK frequency(%)	47%	45%	31%	40%	48%	48%	40%	38%
	NK cell number (x10 ⁶)	1.41	1.89	1.21	1.76	2.11	2.06	1.16	1.63
DAY14	Total cell number(x10 ⁶)	66.30	76.20	89.70	64.50	106.50	116.70	38.10	60.30
	NK frequency(%)	84%	85%	83%	85%	84%	84%	80%	80%
	NK cell number (x10 ⁶)	55.69	64.77	74.45	54.83	89.46	98.03	30.48	48.24
Fold		222.77	259.08	297.80	219.30	357.84	392.11	121.92	192.96

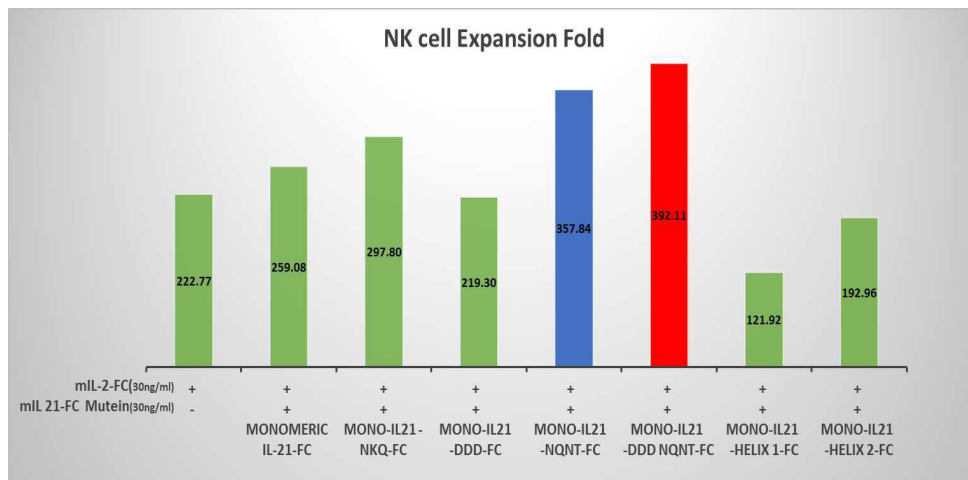
[IL-2 dimeric Fc]

Day 0	IL-2 only	Mutein 1	Mutein 2	Mutein 3	Mutein 4	Mutein 5	Mutein 6	Mutein 7
Total cell count	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06
NK cell %	6.49%	6.49%	6.49%	6.49%	6.49%	6.49%	6.49%	6.49%
Total NK count	6.49E+04	6.49E+04	6.49E+04	6.49E+04	6.49E+04	6.49E+04	6.49E+04	6.49E+04
Day 6	IL-2 only	Mutein 1	Mutein 2	Mutein 3	Mutein 4	Mutein 5	Mutein 6	Mutein 7
Total cell count	2.70E+06	3.96E+06	3.78E+06	2.88E+06	3.24E+06	4.41E+06	3.60E+06	4.23E+06
NK cell %	36.10%	36.50%	38.60%	37.60%	41.60%	41.70%	35.80%	35.40%
Total NK count	9.75E+05	1.45E+06	1.46E+06	1.08E+06	1.35E+06	1.84E+06	1.29E+06	1.50E+06
Day 9	IL-2 only	Mutein 1	Mutein 2	Mutein 3	Mutein 4	Mutein 5	Mutein 6	Mutein 7
Total cell count	4.23E+06	5.78E+06	9.50E+06	4.66E+06	9.16E+06	5.78E+06	5.13E+06	4.96E+06
NK cell %	47.80%	49.40%	52.40%	53.90%	61.60%	61.60%	55.10%	54.00%
Total NK count	2.02E+06	2.85E+06	4.98E+06	2.51E+06	5.64E+06	3.56E+06	2.82E+06	2.68E+06
Day 14	IL-2 only	Mutein 1	Mutein 2	Mutein 3	Mutein 4	Mutein 5	Mutein 6	Mutein 7
Total cell count	1.76E+07	2.54E+07	2.51E+07	4.81E+07	3.56E+07	2.71E+07	3.13E+07	1.99E+07
NK cell %	57.90%	69.00%	75.90%	75.30%	82.00%	82.10%	73.70%	69.90%
Total NK count	1.02E+07	1.75E+07	1.91E+07	3.62E+07	2.92E+07	2.22E+07	2.31E+07	1.39E+07
Fold 값	157	270	294	558	450	343	355	214

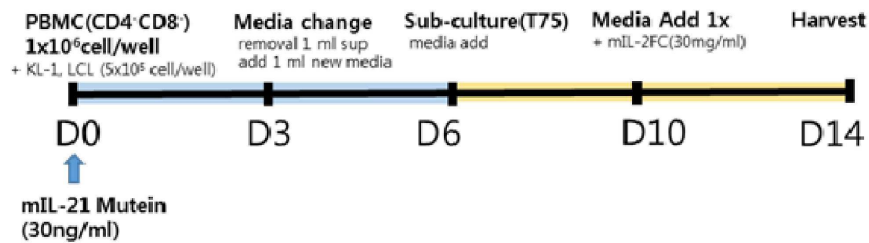
도면14c



도면14d



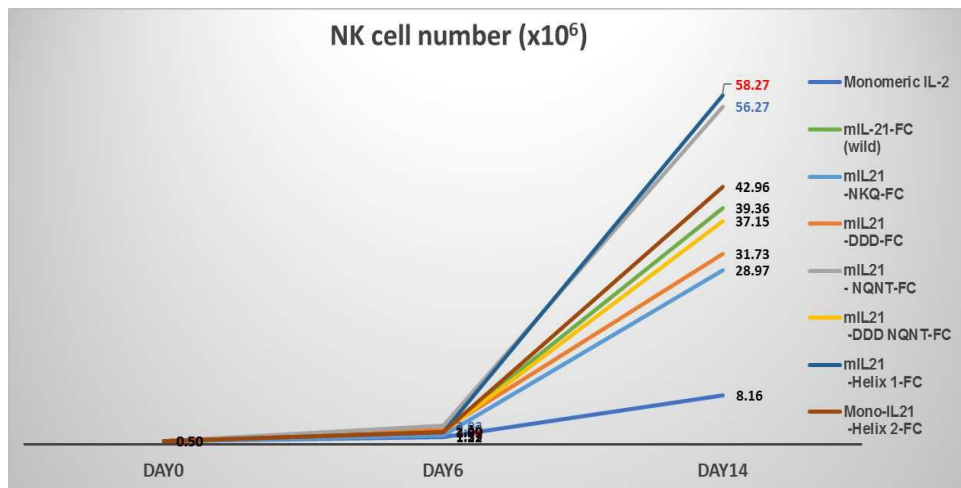
도면15a



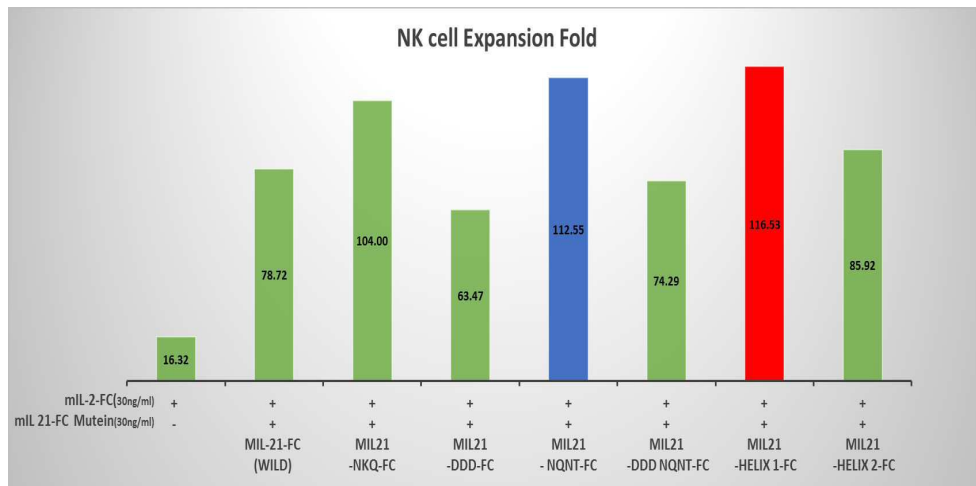
도면15b

PBMC CD4-CD8- (KL1+LCL)			mIL-21-FC (wild)	mIL21 -NKQ-FC	mIL21 -DDD-FC	mIL21 -NQNT-FC	mIL21 -DDD NQNT-FC	mIL21 -Helix 1-FC	mIL21 -Helix 2-FC
Monomeric IL-21 FC Mutein (30ng/ml)			-	+	+	+	+	+	+
DAY0	Total cell number(x10 ⁵)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	NK frequency(%)	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%
	NK cell number (x10 ⁵)	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
DAY6	Total cell number(x10 ⁵)	1.50	2.50	3.00	2.85	3.65	2.35	2.30	2.40
	NK frequency(%)	81%	84%	83%	84%	83%	85%	85%	83%
	NK cell number (x10 ⁵)	1.22	2.10	2.49	2.39	3.03	2.00	1.96	1.99
DAY14	Total cell number(x10 ⁵)	12.00	48.00	64.20	38.70	67.80	45.30	74.70	53.70
	NK frequency(%)	68%	82%	81%	82%	83%	82%	78%	80%
	NK cell number (x10 ⁵)	8.16	39.36	52.00	31.73	56.27	37.15	58.27	42.96
Fold		16.32	78.72	104.00	63.47	112.55	74.29	116.53	85.92

도면15c



도면15d



서열 목록

- <110> Ajou University Industry Academic Cooperation Foundation
Korea University Research and Business Foundation
- <120> Interleukin21 Variant and Fusion Protein Comprising the Same and
Uses Thereof
- <130> P22-B032
- <160> 10
- <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> IgG4-EW-RVT CH3A

<400> 1

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
1 5 10 15

Glu Met Thr Glu Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Trp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

100 105

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG4-EW-RVT CH3B

<400> 2

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Arg Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
1 5 10 15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Val Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Thr Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

100 105

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG4 WT

<400> 3

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu

1 5 10 15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly

65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

100 105

<210> 4

<211> 131

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> IL21

<400> 4

Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp

1 5 10 15

Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala

20 25 30
 Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe
 35 40 45
 Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile
 50 55 60

 Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn
 65 70 75 80
 Ala Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser
 85 90 95
 Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu
 100 105 110
 Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser
 115 120 125
 Glu Asp Ser

130
 <210> 5
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL21 NKQ
 <400> 5
 Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala
 20 25 30
 Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe
 35 40 45
 Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile
 50 55 60
 Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn
 65 70 75 80
 Ala Gly Asn Lys Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser

85 90 95
Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu
100 105 110
Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Gln Thr His Gly Ser
115 120 125

Glu Asp Ser

130

<210> 6

<211> 131

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL21 DDD

<400> 6

Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp

1 5 10 15

Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala

20 25 30

Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe

35 40 45

Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile

50 55 60

Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn

65 70 75 80

Ala Gly Asp Asp Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser

85 90 95

Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu

100 105 110

Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Asp Thr His Gly Ser

115 120 125

Glu Asp Ser

130

<210> 7

<211> 131

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL21 NQNT

<400> 7

Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp

1 5 10 15

Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala

20 25 30

Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe

35 40 45

Gln Asn Ala Gln Leu Gln Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile

50 55 60

Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn

65 70 75 80

Ala Gly Arg Arg Gln Asn His Thr Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser

85 90 95

Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu

100 105 110

Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser

115 120 125

Glu Asp Ser

130

<210> 8

<211> 131

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL21 DDDNQNT

<400> 8

Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp

1 5 10 15

Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala

20 25 30

Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe

35 40 45

Gln Asn Ala Gln Leu Gln Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile

50 55 60

Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn

65 70 75 80

Ala Gly Asp Asp Gln Asn His Thr Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser

85 90 95

Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu

100 105 110

Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Asp Thr His Gly Ser

115 120 125

Glu Asp Ser

130

<210> 9

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL21 Helix1

<400> 9

Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp

1 5 10 15

Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala

20 25 30

Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe

35 40 45

Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile

50 55 60

Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp

65 70 75 80

Gly Leu Ala Gly Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Lys

85 90 95

Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu Gln Lys Met

100 105 110
Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu Asp Ser

115 120 125

<210> 10

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL21 Helix2

<400> 10

Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp

1 5 10 15

Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala

20 25 30

Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe

35 40 45

Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile

50 55 60

Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Asn

65 70 75 80

Ser Leu Ala Asn Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Lys

85 90 95

Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu Gln Lys Met

100 105 110
Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu Asp Ser

115 120 125