

명세서

발명의 명칭: 항체 중쇄불변부위 이중이중체에 융합된 사이토카인 및 이를 포함하는 약제학적 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 항체(immunoglobulin) 중쇄불변부위 (Fc) 쌍의 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하고,
- [2] 상기 제1 Fc 영역 및/또는 제2 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단 중 하나 이상의 말단에 생리활성 단백질의 서브유닛(subunit)이 결합되어 있는 이중이중체-융합단백질(heterodimeric Fc-fused protein)에 있어서,
- [3] 상기 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역은 이중이중체(heterodimer)의 형성이 촉진되도록 CH3 도메인이 변이된 것임을 특징으로 하는 이중이중체-융합단백질(heterodimeric Fc-fused protein) 및
- [4] 상기 이중이중체-융합단백질을 포함하는 약제학적 조성물에 대한 것이다.
- [5]
- [6] 본 발명에 따른 이중이중체-융합단백질(heterodimeric Fc-fused protein)은 2 이상의 서브유닛이 단백질 복합체(protein complex)를 형성하여 하나의 생리활성 단백질을 구성하는 단백질을 본래 자연계에 존재하는 형태 및 구조로 항체중쇄불변부위(Fc)에 융합할 수 있어, 자연계에 존재하는 그대로의 활성을 유지할 수 있는 장점이 있다.
- [7] 본 발명에 따른 항체 중쇄불변부위 이중이중체-융합단백질을 이용할 경우, 상기 이중이중체-융합단백질에 포함된 생리활성 단백질의 체내 반감기가 현저하게 증가되어, 체내에서의 각종 생리활성이 오랜 시간 동안 지속될 수 있는 장점이 있다.
- [8] 또한 본 발명에 따른 항체 중쇄불변부위 이중이중체 Fc의 N-말단 또는 C-말단에 생리활성 단백질의 서브유닛이 융합된 이중이중체-융합단백질은 야생형 Fc 기반 융합 단백질에 비해 발현 후, 정제과정이 용이하다.

[9]

배경기술

- [10] 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 비공유 결합(non-covalent interaction) 및 힌지(hinge) 영역 간의 이황화 결합(disulfide bond)에 의해 유도된다.
- [11] 항체 유래 이중이중체 중쇄불변부위(heterodimeric Fc) 기술은 앞선 자연발생적

항체(IgG, IgM, IgA, IgD, IgE)의 동중이중화에 큰 기여를 하는 불변영역의 마지막 도메인(CH3 domain)간의 특정 비공유 결합을 통해 이중이중화가 선호되고, 동중이중화가 비선호되거나 배척되는 결합을 가지도록 엔지니어링함으로써 이중이중체 형태의 중쇄불변부위를 만드는 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(미국등록특허 제7,695,936호; 대한민국 등록특허 제1,522,954호). 상기의 이중이중체 중쇄불변부위 기술은 이중항체를 만들기 위한 기반기술로서, 지금까지 알려진 이중이중체 형성을 유도하는 CH3 도메인 돌연변이체는 대부분 CH3 도메인 상호작용면에 항체의 구조 기반 rational design에 의한 비대칭적 돌연변이 쌍을 도입함으로써 제조되었다 (Spreter Von Kreudenstein et al., 2014). 선구자적 연구로는 제넨텍사의 knob-into-hole(knob-into-hole) 기술이 있고(Ridgway et al., 1996), 자임웁스사의 ZW1 (Von Kreudenstein et al., 2013), 젠코어사의 HA-TF(Moore GL et al., 2011), EMD세로노사의 SEEDbody(Davis JH et al., 2010)등 많은 다국적 제약회사에서 상기의 기반 기술을 개발 및 보고하였다.

- [12] 그 중에서도 본 발명에서 사용한 A107 돌연변이체는 효모 세포 표면 발현 시스템을 이용하여 제작된 인간 항체 이중이중체 중쇄불변부위 라이브러리로부터 선별된 고수율 이중이중체 중쇄불변부위로, CH3 도메인 상호작용면의 소수성 코어는 보존하고 전하를 띠는 아미노산에 돌연변이를 유도하여 공간보완적인 소수성 결합이 형성되게 하고 (K409W_{CH3A}-D399V/F405T_{CH3B}), 수소결합이 형성되도록 하여 (K370E_{CH3A}-E357N_{CH3B}) 이중이중체의 형성을 증진시킨 돌연변이체이다(Choi et al. 2016; 대한민국 특허출원 제2015-0142181호).
- [13] 상기의 A107 돌연변이체를 포함하여 현재까지 보고된 이중이중체 중쇄불변부위 돌연변이체(heterodimeric Fc variants)는 모두 인간 항체 동중형 중에서도 가장 많은 부분을 차지하는 IgG1을 기반으로 한 것이며, IgG1 이외의 다른 동중형(IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE)에 대한 돌연변이체는 보고된 바가 없다.
- [14] 이는 미국 식약청(FDA)의 허가를 받아 시판되고 있는 치료용 항체의 대부분이 IgG1 동중형을 채택하고 있기 때문인데 (Irani et al. 2015), 최근에는 항체-의존성 세포 세포독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC)이나 보체-의존성 세포독성(complement-dependent cellular cytotoxicity, CDC)과 같은 항체 고유의 효과 기능(effector function)이 크게 필요하지 않은 면역조절 항체(immune-modulating antibody) 혹은 수용체 작용제(agonist) 융합 단백질의 경우, IgG1에 비해 이러한 효과 기능이 현저히 떨어지는 IgG2나 IgG4를 기반으로 한 치료용 단백질의 개발이 이루어지고 있는 실정이다.
- [15]

- [16] 한편, 생리활성 단백질은 대부분 그 크기가 작은 경우가 많아, 체내에서의 반감기가 짧다는 문제점이 존재한다. 이러한 단점을 해결하기 위하여, PEG 등을 접합시키거나, 항체 유래 Fc(crystallizable fragment) 영역을 융합시키는 등의 시도가 있어왔지만, 아직까지 효율적으로 생리활성 단백질의 활성이 오랜 시간 동안 충분히 유지되는 형태의 개발은 이루어지지 못하고 있는 실정이다.
- [17] 특히, 2 이상의 서브유닛이 단백질 복합체(protein complex)를 형성하여 생리활성을 나타내는 단백질의 경우, 자연계에 존재하는 본연의 단백질 복합체 구조가 그대로 형성되어 본래 단백질의 활성을 제대로 나타낼 뿐 아니라, 그 활성이 오랜 시간 동안 충분히 유지될 수 있는 형태의 개발은 전무하다시피 한 상황이다.
- [18] 이러한 기술적 배경하에서, 본 발명자들은 IgG1 뿐 아니라, 기존에 보고되지 않은 IgG2, IgG3, 그리고 IgG4와 같은 다른 동종형(isotype) 항체 유래의 Fc 영역을 포함하는 이종이중체(heterodimer) 변이체를 구축하고, 이를 이용하여 2 이상의 서로 다른 서브유닛(subunit)으로 이루어져 있으며, 2 이상의 서브유닛이 하나의 단백질 복합체(protein complex)를 형성하여 생리활성을 나타내는 단백질의 하나 이상의 서브유닛을 상기 Fc 영역의 말단에 결합시킨 이종이중체-융합단백질(heterodimeric Fc-fused protein) 형태의 새로운 치료용 융합단백질을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [19] 특히, 본 발명에서의 2 이상의 서로 다른 서브유닛(subunit)으로 이루어져 있으며, 2 이상의 서브유닛이 단백질 복합체(protein complex)를 형성하여 생리활성을 나타내는 단백질은 바람직하게는 인터루킨-12(Interleukin-12, IL-12)가 사용될 수 있다.
- [20] 인터루킨-12(IL-12)는 면역세포 중에서도 세포 독성 T 세포 (CTL; Cytotoxic T Lymphocytes), 자연 살해 세포 (NK; Natural Killer cells)와 같은 면역세포의 활성을 증가시켜 종양을 직접 죽이거나, 인터페론 감마(IFN- γ)와 같은 프로-염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)의 분비를 통해 면역 반응이 억제되어 있는 종양미세환경 (tumor microenvironment) 내 면역반응을 활성화시킴으로써, 종양유발(tumorigenesis)을 억제할 수 있다는 점에서 항암 사이토카인(anti-cancer cytokine)으로 많은 연구가 이루어져 왔다 (Lasek et al., 2014). 하지만 인터루킨-12를 이용한 치료법의 개발에 있어 사이토카인 자체의 짧은 반감기는 지속적인 투여를 요구하게 되고, 이는 곧 독성으로 이어질 수 있기 때문에, 이를 항체나 Fc와의 융합(fusion)을 통해 long-acting IL-12의 형태로 이용하고자 하는 연구들이 있었다 (Tugues et al., 2015). 하지만 상기 연구들은 CH3 도메인간의 상호작용을 통해 동종이중체를 이루는 야생형 항체의 융합으로 인해, 내생형 사이토카인 (endogenous form cytokine)과는 다르게 bivalency를 가지게 되고 이로 인해, 내생형 인터루킨 12 보다 떨어지는 생리활성을 보이거나, 인터루킨 12로 인한 원하지 않는 국소화 현상(localization)이 나타나는 등의 문제가 함께 발생되고 있는 상황이다(Tzeng et al., 2015; Dumont et al., 2006).

- [21] 따라서, 야생형 항체 혹은 Fc 영역을 이용해 monovalency를 가지는 융합 단백질을 만들기 위한 노력으로 도 1의 (A)~(C)와 같이 하나의 Fc 영역의 C 말단에만 추가적인 정제를 위한 선택적인 태그(tag)를 융합하거나 Fc 영역과 단백질을 따로 고순도로 정제하여 융합하는 등의 전략을 통해 융합단백질을 구축하는 방법을 이용해왔다. 하지만 이러한 형태는 많은 양의 단백질을 생산하는 데 있어 손실이 클 뿐만 아니라, 추가적인 정제 과정의 최적화를 위한 연구 또한 필요로 한다.
- [22] 하지만, 본 발명에 따른 항체 중쇄불변부위 이중이중체-융합단백질(heterodimeric Fc-fused protein)의 형태를 이용하면 추가적인 정제 과정의 최적화 과정 없이 도 2와 같은 상기 monovalent 형태의 이중이중체-융합단백질을 용이하게 제조할 수 있다.
- [23]
- [24] **발명의 요약**
- [25] 본 발명에서 해결하고자 하는 과제는 2 이상의 서브유닛이 단백질 복합체(protein complex)를 형성하여 생리활성을 나타내는 단백질의 활성이 오랜 시간 동안 충분히 유지될 수 있는 새로운 형태의 항체 중쇄불변부위 이중이중체-융합단백질(heterodimeric Fc-fused protein)을 제공하는 것이다.
- [26] 특히, 본 발명에 따른 항체 중쇄불변부위 이중이중체-융합단백질(heterodimeric Fc-fused protein)은 2 이상의 서브유닛이 단백질 복합체(protein complex)를 형성하여 생리활성을 나타내는 단백질을 자연계에 존재하는 형태 그대로 최대한 모사함으로써, 자연계에 존재하는 그대로의 활성을 유지할 수 있는 형태이다.
- [27] 더불어 항체 중쇄불변부위 융합으로 융합단백질의 체내 반감기를 현저하게 증가되어, 체내에서의 각종 생리활성이 오랜 시간 동안 지속될 수 있는 장점이 있다.
- [28] 또한, 본 발명은 상기 항체 중쇄불변부위 이중이중체-융합단백질(heterodimeric Fc-fused protein)을 포함하는 약제학적 조성물 및 이를 이용한 질병, 특히 암의 치료를 위한 조성물 및 치료방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [29]
- [30] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 항체(immunoglobulin) 중쇄불변부위 (Fc) 쌍의 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하고,
- [31] 상기 제1 Fc 영역 및/또는 제2 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단 중 하나 이상의 말단에 생리활성 단백질이 결합되어 있는 이중이중체-융합단백질(heterodimeric Fc-fused protein)에 있어서,
- [32] 상기 생리활성 단백질은 2 이상의 서로 다른 서브유닛(subunit)으로 이루어져 있으며, 2 이상의 서로 다른 서브유닛(subunit)은 하나의 단백질 복합체(protein complex)를 형성하여 생리활성을 나타내는 것을 특징으로 하며,
- [33] 상기 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역은 이중이중체(heterodimeric Fc)의 형성이

촉진되도록 CH3 도메인이 변이된 것임을 특징으로 하는

이종이중체-융합단백질(heterodimeric Fc-fused protein)을 제공한다.

- [34] 또한 본 발명은 상기 이종이중체-융합단백질을 포함하는 약제학적 조성물 및 이를 이용한 질병, 특히 암의 치료를 위한 조성물 및 치료방법을 제공한다.

[35]

도면의 간단한 설명

- [36] 도 1(A) 내지 1(C)는 기존 야생형 인간 항체 중쇄불변부위를 이용해 단량체 및 이종이중체 형태의 융합단백질을 얻기 위한 전략을 나타낸 도면이다.

- [37] 도 1(D)는 기존 문헌에서 낚-인트-홀 이종이중체 중쇄불변부위 (KiH heterodimeric Fc) 변이체가 포함된 IgG 형태의 항체에 단량체 사이토카인을 융합시켜 항체-사이토카인 (Immunocytokine)을 구축한 사례를 나타낸 도면이다.

- [38] 도 2(A) 및 2(B)는 이종이중체 중쇄불변부위를 이용해 구축할 수 있는 단량체 및 이종이중체 융합단백질 형태를 제시한 도면이다.

- [39] 도 2(C)는 이종이중체 중쇄불변부위가 포함된 IgG 형태의 인간 항체에 이종이중체 융합단백질 형태를 제시한 도면이다.

- [40] 도 3은 인간 항체 동종형별 이종이중체 형성을 위한 CH3 도메인 변이체의 제작을 위해 각 인간 항체 면역글로불린 G 동종형별 CH3 도메인의 서열을 나열하여 비교하고, 잠재적 돌연변이 위치를 선정한 결과를 나타낸 도면이다.

- [41] 도 4는 도 3에서 선정된 위치에 돌연변이를 유도한 서열을 가지고 동종형별 이종이중체 중쇄불변부위 변이체의 구조 모델링을 진행, 그 결과로 얻어진 모델링 구조를 각각 야생형 IgG1 기반의 A107 돌연변이체와 비교 및 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

- [42] 도 5는 서열 및 구조 분석을 통해 구축된 동종형별 이종이중체 중쇄불변부위를 동물 세포에서 발현하기 위한 벡터의 모식도이다. 변이된 힌지 영역을 포함한 각 동종형별 이종이중체 중쇄불변부위 변이체는 제한효소 NotI/HindIII를 이용하여 벡터에 클로닝하였다.

- [43] 도 6은 발현되는 단백질의 이중체 사이즈 차이로 이종이중체 중쇄불변부위 변이체가 어느 정도의 이종이중체 형성능을 가지는지 평가하기 위한 scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 동시 발현 시스템을 간략하게 모식도로 나타낸 도면이다.

- [44] 도 7은 도 6에서와 같이 CH3 돌연변이 쌍에 의한 항체 중쇄불변부위의 이종이중체의 형성 수율을 평가하기 위해 구축된 단일 사슬 항체 절편(scFv)이 융합된 scFv-Fc를 동물 세포 발현 벡터인 pcDNA3.1 벡터에 클로닝하기 위해 구축한 모식도이다.

- [45] 도 8은 도 5 및 도 7에 기재된 발현시스템에 따라 구축된 CH3 돌연변이 쌍이 도입된 동물세포 발현벡터를 도 6에서 기술한 이종이중체의 형성능 평가를 위해 HEK293F 세포에 공동형질 전환을 통해 일시적으로 발현 및 정제한 다음, 이종이중체 항체 형성능의 평가를 위해 5 μ g의 단백질을 비환원성 조건의

SDS-PAGE상에서 분리하고, Coomassie Blue 염색을 통해 크기 및 조합형태로 분석한 결과를 나타낸 도면이다. 이 때, 음성대조군으로 야생형 CH3가 이용된 야생형 Fc 을 이용하였다.

- [46] 도 9는 도 8과 같은 방법으로 SDS-PAGE로 단백질을 분리한 이후, AP 효소가 달린 항 인간 IgG 항체 (anti-human IgG-AP conjugated antibody)를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행한 결과를 나타낸 도면이다.
- [47] 도 10(A)는 본 발명의 대조군이 되는, 중쇄불변부위가 융합되지 않은 내생형의 인터루킨 12 사이토카인의 형태를 나타낸 모식도이다.
- [48] 도 10(B)는 본 발명의 비교예로 아미노산 링커로 연결된 인터루킨 12 사이토카인을 야생형 IgG4 Fc에 융합한 bi-IL-12-Fc 융합단백질의 형태를 나타낸 모식도이다.
- [49] 도 10(C)는 인터루킨 12 사이토카인을 본 발명의 동종형별 이중이중체 중쇄불변부위 변이체 중 IgG4를 기반으로 만들어진 γ 4-A107 변이체를 융합한 mono-IL-12-Fc 융합단백질의 형태를 나타낸 모식도이다.
- [50] 도 11(A) 및 11(B)는 본 발명의 실시예(도 10c)의 융합단백질을 동물세포에서 발현 및 정제하기 위한 벡터의 모식도이다.
- [51] 도 12는 본 발명의 비교예(도 10(B)의 융합단백질을 동물세포에서 발현 및 정제하기 위한 벡터의 모식도이다.
- [52] 도 13은 인간 및 마우스의 인터루킨 유전자를 가지고 구축된 도 11(A) 및 (B)의 동물세포 발현벡터를 HEK293F 세포에 공동형질 전환을 통해 일시적으로 발현 및 정제한 다음, 5 μ g의 단백질을 비환원성 조건의 SDS-PAGE상에서 분리하고, Coomassie Blue 염색을 통해 크기 및 조합형태로 분석한 결과를 나타내는 도면이다.
- [53] 도 14는 도 13의 융합단백질들을 크기 배제 크로마토그래피를 이용해 분석한 결과를 나타낸 도면이다.
- [54] 도 15는 IL-12에 대한 수용체를 갖지 않는 정상 말초혈액 면역세포 (normal PBMC)와 mitogen인 PHA(phytohaemagglutinin)를 처리하여 IL-12에 대한 수용체를 유도시킨 말초혈액 면역세포 (PHA-activated PBMC)에 대하여 구축된 mono-hIL-12-Fc와 야생형 bi-hIL-12-Fc의 결합능을 유세포 분석기 (FACS)로 확인한 결과를 나타내는 도면이다.
- [55] 도 16은 Mitogen인 PHA를 처리하여 IL-12에 대한 수용체를 유도시킨 말초혈액 면역세포 (PHA-activated PBMC)에서 Fc (A107), recombinant human IL-12(rhIL-12), bi-hIL-12-Fc와 mono-hIL-12-Fc의 농도별 처리에 따른 세포증식을 WST-1 세포증식 어세이를 통해 측정된 결과를 나타내는 도면이다.
- [56] 도 17은 도 16에서 배양된 배양 상청액 내의 IFN- γ 의 농도를 ELISA를 통해 측정된 결과를 나타내는 도면이다
- [57] 도 18은 마우스 IL-12가 마우스 IL-12 수용체뿐만 아니라 인간 IL-12 수용체에도 결합한다는 특성을 이용하여 구축된 mono-mIL-12-Fc와

bi-mIL-12-Fc의 결합능을 정상 말초혈액 면역세포 (normal PBMC)와 PHA라는 mitogen을 처리하여 IL-12에 대한 수용체를 유도시킨 말초혈액 면역세포 (PHA-activated PBMC)를 이용하여 유세포 분석기로 확인한 결과를 나타내는 도면이다

- [58] 도 19는 PHA를 처리하여 IL-12에 대한 수용체를 유도시킨 말초혈액 면역세포 (PHA-activated PBMC)에서 Fc (A107), recombinant mouse IL-12(rmIL-12), bi-mIL-12-Fc와 mono-mIL-12-Fc의 농도 별 처리에 따른 세포증식을 WST-1 세포증식 어세이를 통해 측정한 결과를 나타내는 도면이다.
- [59] 도 20(A)는 CT26^{HER2/Neu} 암세포를 이식한 Balb/c 마우스에서 종양의 크기가 100 mm³일 때 Fc (A107), rmIL-12, bi-mIL-12-Fc와 mono-mIL-12-Fc를 복강 투여하면서 측정한 종양 부피의 변화, 투여 끝에 마우스의 치사 후 종양의 크기의 확인결과를 나타내는 도면이다.
- [60] 도 20(B)는 상기 도 20(A)의 실험과정에서 주기적으로 측정된 마우스 체중 변화를 나타낸 그래프이다.
- [61] 도 21(A)는 CT26^{HER2/Neu} 이식 Balb/c 마우스에서 종양의 크기가 300 mm³일 때 bi-mIL-12-Fc와 mono-mIL-12-Fc를 일주일에 두 번씩 농도 별로 복강 투여하면서 마우스의 종양 부피의 변화를 측정한 도면이다.
- [62] 도 21(B)는 상기 도 21(A)의 실험과정에서 주기적으로 측정된 개별 마우스의 종양의 부피변화를 나타낸 그래프이다.
- [63] 도 21(C)는 상기 도 21(A)의 마지막 투여 후 3일째 마우스를 치사하여 종양의 크기의 확인한 결과를 나타내는 도면이다.
- [64] 도 21(D)는 상기 도 21(A)의 실험과정에서 주기적으로 측정된 마우스 체중 변화를 나타낸 그래프이다.
- [65] 도 21(E)는 상기 도 21(A)의 마지막 투여를 마친 후 1일째에 마우스의 얼굴 정맥에서 혈액을 채취하여 간 독성의 지표인 알라닌 아미노 전이효소 (ALT) 측정한 그래프이다.
- [66] 도 22(A)는 상기 도 21(A)의 마지막 투여 3일 후에 마우스를 치사하여 비장에서 CD4⁺ T세포, CD8⁺ T세포 및 NK세포 수의 증가를 측정한 그래프이다.
- [67] 도 22(B)는 상기 도 21(A)의 3번째 투여 3일 후에 마우스를 치사하여 종양에 침윤되어 있는 총 면역세포, CD4⁺ T세포, CD8⁺ T세포의 수를 나타내는 도면이다.
- [68] 도 23(A)는 상기 도 21(A)의 마지막 투여 24시간 후에 마우스의 얼굴 정맥에서 채혈하여 분리한 혈청내의 IFN- γ 농도를 ELISA로 측정한 결과이다.
- [69] 도 23(B)는 CT26^{HER2/Neu} 암세포를 이식한 Balb/c 마우스에서 종양의 크기가 300 mm³일 때 1 μ g rmIL-12와 같은 물 농도의 bi-mIL-12-Fc와 mono-mIL-12-Fc를 복강 투여한 후 1일, 3일 및 5일 후에 마우스의 얼굴 정맥에서 채혈하여 분리한 혈청내의 IFN- γ 농도를 ELISA로 측정한 그래프이다.
- [70] 도 23(C)는 상기 도 21(A)의 마지막 투여 3일 후에 마우스를 치사하여 비장에서 분리한 세포독성 T 세포의 CT26^{HER2/Neu} 암세포에 대한 세포독성효과를 측정한

그래프이다.

- [71] 도 23(D)는 상기 도 21(A)의 3번째 투여 3일 후에 마우스를 치사하여 비장에서 분리한 세포독성 T 세포의 세포독성효과를 종양항원을 발현하는 CT26^{HER2/Neu} 암세포와 발현하지 않는 4T1세포를 이용하여 유세포 분석기로 분석한 도면이다.
- [72] 도 23(E)는 상기 도 21(A)의 3번째 투여 3일 후에 마우스를 치사하여 비장에서 분리한 자연살해세포의 CT26^{HER2/Neu} 암세포에 대한 세포독성 효과를 측정한 그래프이다.
- [73] 도 24(A)는 상기 도 21(A)의 마지막 투여 3일 후에 마우스를 치사하여 비장에서 분리한 CD8⁺ 효과 T 세포의 수를 측정한 그래프이다.
- [74] 도 24(B)는 상기 도 21(A)의 마지막 투여 3일 후에 마우스를 치사하여 비장에서 분리한 CD8⁺ 효과기억 T 세포의 수를 측정한 그래프이다.
- [75] 도 24(C)는 상기 도 21(A)의 마지막 투여 3일 후에 마우스를 치사하여 비장에서 분리한 CD8⁺ 중심기억 T 세포의 수를 측정한 그래프이다.
- [76] 도 24(D)는 상기 도 21(A)에서 1 μ g mono-IL-12-Fc의 투여 120일 후에 생존한 마우스와 같은 주령의 Balb/c 마우스에 CT26^{HER2/Neu} 암세포를 재이식하여 마우스의 종양 부피의 변화를 측정한 도면이다.
- [77] 도 24(E)는 상기 도 21(A)의 3번째 투여 3일 후에 마우스를 치사하여 비장에 존재하는 CD8⁺ T세포 중 기억전구효과세포(KLRG1⁺IL-7R⁺)와 단명효과세포(KLRG1⁺IL-7R⁻)의 비율을 유세포 분석기(flow cytometry)로 분석한 도면이다.
- [78] 도 25(A)는 상기 도 21(A)의 3번째 투여 3일 후에 마우스를 치사한 후 비장세포를 분리하여 기억세포의 분화를 억제하는 전사인자인 T-bet의 발현이 높은 CD8⁺ T세포의 비율을 유세포 분석기로 측정하여 분석한 그래프이다.
- [79] 도 25(B)는 상기 도 21(A)의 3번째 투여 3일 후에 마우스를 치사한 후 비장세포를 분리하여 기억세포의 분화를 촉진하는 Eomes의 발현이 높고 T-bet의 발현이 낮은 CD8⁺ T세포의 비율을 유세포 분석기로 측정하여 분석한 그래프이다.
- [80] 도 25(C)는 CT26^{HER2/Neu} 암세포를 이식한 Balb/c 마우스에서 종양의 크기가 300 mm³일 때 1 μ g rmIL-12와 같은 물 농도의 bi-mIL-12-Fc와 mono-mIL-12-Fc를 1회 복강 투여하고 24시간 후에 사타구니 림프절에서 분리한 CD8⁺ T 세포에서 인산화된 STAT4의 발현 양을 유세포 분석기로 측정한 그래프이다.
- [81] 도 25(D)는 도 25(C)의 1회 복강투여 72시간 후에 사타구니 림프절에서 기억세포의 분화를 억제하는 T-bet을 발현하는 CD8⁺ T 세포의 비율을 유세포 분석기로 측정한 그래프이다.
- [82] 도 25(E)는 정상 Balb/c 마우스의 비장과 사타구니 림프절에서 분리한 CD8⁺ T 세포를 Fc를 인지하는 항체로 교차 결합시킨 mono-mIL-12-Fc와 bi-mIL-12-Fc로 자극하였을 때 pSTAT4의 발현량을 유세포 분석기로 측정한 그래프이다.
- [83] 도 25(F)는 정상 Balb/c 마우스의 비장과 사타구니 림프절에서 분리한 CD8⁺ T

세포를 Fc를 인지하는 항체로 교차 결합시킨 mono-mIL-12-Fc와 bi-mIL-12-Fc로 자극하였을 때 T-bet을 발현하는 CD8⁺ T 세포의 비율을 유세포 분석기로 측정한 그래프이다.

- [84] 도 26은 mono-mIL-12-Fc에 의한 기억전구효과세포와 기억세포의 분화 유도 기전 및 bi-mIL-12-Fc에 의한 단명효과세포의 분화 유도기전을 나타낸 전반적인 모식도이다.
- [85]
- [86] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예
- [87] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [88] 본 발명은 일 관점에서, 항체(immunoglobulin) 중쇄불변부위 (Fc) 쌍의 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하고,
- [89] 상기 제1 Fc 영역 및/또는 제2 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단 중 하나 이상의 말단에 생리활성 단백질이 결합되어 있는 이종이중체-융합단백질(heterodimeric Fc-fused protein)에 있어서,
- [90] 상기 생리활성 단백질은 2 이상의 서로 다른 서브유닛(subunit)으로 이루어져 있으며, 2 이상의 서로 다른 서브유닛(subunit)은 단백질 복합체(protein complex)를 형성하여 생리활성을 나타내는 것을 특징으로 하며,
- [91] 상기 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역은 이종이중체(heterodimer)의 형성이 촉진되도록 CH3 도메인이 변이된 것임을 특징으로 하는 이종이중체-융합단백질(heterodimeric Fc-fused protein)에 대한 것이다.
- [92] 본 발명에서 있어서, “Fc 영역” 또는 “중쇄불변부위”는 항체 유래의 CH2 도메인, CH3 도메인 및 힌지 영역(hinge domain)을 포함하는 영역을 의미한다. 다만, IgE의 경우에는 CH2 도메인, CH3 도메인, CH4 도메인 및 힌지 영역(hinge domain)을 포함하는 영역을 의미한다.
- [93] 본 발명에서의 “제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역은 이종이중체(heterodimer)의 형성이 촉진되도록 변이”되었다는 표현은 자연계에 존재하는 항체는 2개의 Fc 영역이 서로 동일한 서열을 가지는 동종이중체(homodimer) 형태를 가지게 되는데, 이러한 Fc 영역의 일부 서열에 변이를 유발시킴으로써, 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역 간의 특정 비공유 결합을 통해 이종이중체(heterodimer)의 형성이 촉진되며, 동종이중체의 형성이 감소되거나, 바람직하게는 거의 일어나지 않도록 변이되었다는 것을 의미한다.
- [94] 바람직하게는 본 발명에 따른 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역의 이종이중체(heterodimer)의 형성이 촉진되도록 하는 변이는, 상기 항체 유래 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역에 포함된 CH3 도메인 각각이 이종이중체(heterodimer)의 형성이 촉진되도록 하는 변이를 포함할 수 있다.

- [95] 본 발명에 있어서, “중쇄불변부위 이중이중체(heterodimeric Fc 또는 Fc heterodimer)”는 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하고, 상기 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역은 이중이중체(heterodimer)의 형성이 촉진되도록 CH3 도메인이 변이된 것임을 특징으로 하는 이중이중체를 의미한다.
- [96]
- [97] 본 발명에서의 상기 제1 Fc 영역 및 제2 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 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역은 각각 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 유래인 것을 특징으로 하고,
- [98] 또한 상기 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역은 동종형(isotype) 항체 유래인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [99]
- [100] 다른 관점에서, 상기 CH3 도메인의 변이는 다음의 군에서 선택된 하나 이상의 변이를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명에서의 모든 변이 위치는 EU index에 따른다.
- [101] (1) 제1 Fc 영역의 CH3 도메인의 K370 위치에서의 아미노산 잔기의 치환; 및 제2 Fc 영역의 CH3 도메인의 E357 및/또는 S364 위치에서의 아미노산 잔기의 치환; 및/또는
- [102] (2) 제1 Fc 영역의 CH3 도메인의 K409 위치에서의 아미노산 잔기의 치환; 및 제2 Fc 영역의 CH3 도메인의 F405 및/또는 D399 위치에서의 아미노산 잔기의 치환.
- [103]
- [104] 바람직하게는 상기 제1 Fc 영역의 CH3 도메인의 K370 위치에서의 아미노산 잔기의 치환은 K370E, K370R, K370M, K370D 또는 K370H이고,
- [105] 상기 제2 Fc 영역의 CH3 도메인의 E357 위치에서의 아미노산 잔기의 치환은 E357N, E357D, E357A, E357I, E357G 또는 E357M이고, S364 위치에서의 아미노산 잔기의 치환은 S364T 또는 S364W인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [106] 또한, 상기 제1 Fc 영역의 CH3 도메인의 K409 위치에서의 아미노산 잔기의 치환은 K409W이고, 상기 제2 Fc 영역의 CH3 도메인의 F405 위치에서의 아미노산 잔기의 치환은 F405T이고, D399 위치에서의 아미노산의 치환은 D399V인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [107] 상기 K370E와 같은 아미노산 잔기 변이는 370 번째 위치의 K가 E로 변이된 것을 의미하며, 본 발명에서의 모든 아미노산 잔기 변이는 이와 동일한 의미로 사용된다.
- [108] 가장 바람직하게는 상기 제1 Fc 영역 또는 제2 Fc 영역의 CH3 도메인의 변이는 다음의 군에서 선택된 하나 이상의 변이를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. (단, 변이 위치는 EU index에 따름)
- [109] (1) 제1 Fc 영역의 CH3 도메인의 K370 위치에서의 K370E, K370R, K370M,

- K370D 또는 K370H의 아미노산 잔기의 치환;
- [110] (2) 제2 Fc 영역의 CH3 도메인의 E357 위치에서의 E357N, E357D, E357A, E357I, E357G 또는 E357M의 아미노산 잔기의 치환 및 S364 위치에서의 치환은 S364T 또는 S364W의 아미노산 잔기의 치환;
- [111] (3) 제1 Fc 영역의 CH3 도메인의 K409 위치에서의 K409W의 아미노산 잔기의 치환; 및
- [112] (4) 제2 Fc 영역의 CH3 도메인의 F405 위치에서의 F405T 아미노산 잔기의 치환 및 D399 위치에서의 D399V의 아미노산 잔기의 치환.
- [113]
- [114] 상기와 같은 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역의 CH3 도메인 내에는 하기의 결합을 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [115] (i) 제1 Fc 영역의 CH3 도메인 내 Y349 위치에 치환된 시스테인 (C); 및
- [116] (ii) 제2 Fc 영역의 CH3 도메인 내 S354 위치에 치환된 시스테인 (C)의 결합.
- [117]
- [118] 또 다른 관점에서, 상기 CH3 도메인의 변이는 다음의 군에서 선택된 하나 이상의 변이를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [119] (1) 제1 Fc 영역의 CH3 도메인의 K360 위치에서의 아미노산 잔기의 치환; 및 제2 Fc 영역의 CH3 도메인의 E347 위치에서의 아미노산 잔기의 치환; 및/또는
- [120] (2) 제1 Fc 영역의 CH3 도메인의 K409 위치에서의 아미노산 잔기의 치환; 및 제2 Fc 영역의 CH3 도메인의 F405 및 D399 위치에서의 아미노산 잔기의 치환.
- [121]
- [122] 바람직하게는 상기 제1 Fc 영역의 CH3 도메인의 K360 위치에서의 아미노산 잔기의 치환은 K360E이고, 상기 제2 Fc 영역의 CH3 도메인의 E347 위치에서의 아미노산 잔기의 치환은 E347R인 것을 특징으로 할 수 있으며,
- [123] 상기 제1 Fc 영역의 CH3 도메인의 K409 위치에서의 아미노산 잔기의 치환은 K409W이고, 상기 제2 Fc 영역의 CH3 도메인의 F405 위치에서의 아미노산 잔기의 치환은 F405T이고, D399 위치에서의 아미노산의 치환은 D399V인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [124]
- [125] 가장 바람직하게는 상기 제1 Fc 영역 또는 제2 Fc 영역의 CH3 도메인의 변이는 다음의 군에서 선택된 하나 이상의 변이를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. (단, 변이 위치는 EU index에 따름)
- [126] (1) 제1 Fc 영역의 CH3 도메인의 K360 위치에서의 K360E의 아미노산 잔기의 치환;
- [127] (2) 제2 Fc 영역의 CH3 도메인의 E347 위치에서의 E347R의 아미노산 잔기의 치환;
- [128] (3) 제1 Fc 영역의 CH3 도메인의 K409 위치에서의 K409W의 아미노산 잔기의 치환;

- [129] (4) 제2 Fc 영역의 CH3 도메인의 F405 위치에서의 F405T 아미노산 잔기의 치환 및 D399 위치에서의 D399V의 아미노산 잔기의 치환
- [130]
- [131] 상기와 같은 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역의 CH3 도메인 내에는 하기의 결합을 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [132] (i) 제1 Fc 영역의 CH3 도메인 내 Y349 위치에 치환된 시스테인 (C); 및
- [133] (ii) 제2 Fc 영역의 CH3 도메인 내 S354 위치에 치환된 시스테인 (C)의 결합.
- [134]
- [135] 바람직하게는 본 발명에 따른 항체 유래 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역에 포함된 CH3 도메인은 각각
- [136] (1) 서열번호 1 및 서열번호 2;
- [137] (2) 서열번호 3 및 서열번호 4;
- [138] (3) 서열번호 5 및 서열번호 6;
- [139] (4) 서열번호 8 및 서열번호 9;
- [140] (5) 서열번호 11 및 서열번호 12; 및
- [141] (6) 서열번호 14 및 서열번호 15;
- [142] 의 서열번호로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 군에서 선택된 서열을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [143] 특히, 본 발명에 따른 항체 유래 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역은 IgG4 유래의 표 1에 기재된 CH3 도메인의 서열을 가지는 것이 바람직하다.
- [144]

[145] [표1]

구성	제1 Fc 영역의 CH3 서열 (EU number 341~447)	제2 Fc 영역의 CH3 서열 (EU number 341~447)
γ 4-EWRVT	GQPREPQVYTLPPSQEEMTENQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSWLTV DKSRWQEGNVFSCSVMEALHNH YTQKSLSLSLGK (서열번호 1)	GQPREPRVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLVSDGSFTLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS LGK (서열번호 2)
γ 4-EWRVT _s	GQPREPQVCTLPPSQEEMTENQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSWLTV DKSRWQEGNVFSCSVMEALHNH YTQKSLSLSLGK (서열번호 3)	GQPREPRVYTLPPCQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLVSDGSFTLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL SLGK (서열번호 4)
γ 4-A107	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSWLTV DKSRWQEGNVFSCSVMEALHNH YTQKSLSLSLGK (서열번호 5)	GQPREPQVYTLPPSQENMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLVSDGSFTLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS LGK (서열번호 6)

[146]

[147] 본 발명에 따른 이종이중체-융합단백질(heterodimeric Fc-fused protein)에 있어서,

[148] 상기 제1 Fc 영역 또는 제2 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단 중 어느 하나의 말단에만 생리활성 단백질의 서브유닛(subunit)이 결합되어 있을 수도 있고,

[149] 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단 각각에 1 종의(하나의) 생리활성 단백질의 서로 다른 하나 이상의 서브유닛(subunit)이 각각 결합되어 있을 수도 있다(도 2(B) 및 도 2(C) 참조).

[150] 상기 “제1 Fc 영역 또는 제2 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단 중 어느 하나의 말단에만 생리활성 단백질의 서브유닛(subunit)이 결합”되어 있다는 의미는, 제1

Fc 영역 또는 제2 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단의 4개 말단 중에서 어느 하나의 말단에만 생리활성 단백질의 서브유닛(들) 중 하나가 결합되어 있고, 상기 생리활성 단백질의 나머지 서브유닛(들)이 링커-매개된 형태로 상기 1 Fc 영역 또는 제2 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단 중 어느 하나의 말단에 결합된 생리활성 단백질의 서브유닛과 결합되어 있다는 의미이다. 상기 링커는 아미노산 링커인 것이 바람직하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [151] 또한, 상기 “제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단 각각에 1 종의(하나의) 생리활성 단백질의 서로 다른 하나 이상의 서브유닛(subunit)이 각각 결합”되었다는 의미는 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역 N-말단 모두에 생리활성 단백질의 서로 다른 하나 이상의 서브유닛(들)이 각각 결합되거나, 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역의 C-말단 모두에 생리활성 단백질의 서로 다른 하나 이상의 서브유닛(들)이 각각 결합된 경우,
- [152] 또는 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역의 N-말단 및 C-말단 모두에 생리활성 단백질의 서로 다른 하나 이상의 서브유닛이 각각 결합된 형태를 의미한다.
- [153]
- [154] 본 발명에 따른 항체 중쇄불변부위 이중이중체-융합단백질에 있어서, 상기 제1 Fc 영역 및/또는 제2 Fc 영역의 말단과 생리활성 단백질의 서브유닛(subunit)의 결합은 유전적 융합(genetic fusion)에 의해 융합된 것을 특징으로 할 수 있으며,
- [155] 또 다른 양태로 상기 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역과 생리활성 단백질의 서브유닛(subunit)은 링커 매개된 형태로 결합된 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 링커는 아미노산 링커인 것이 바람직하지만, 이에 한정되지는 않는다.
- [156]
- [157] 또 다른 관점에서, 본 발명에 따른 항체 중쇄불변부위 이중이중체-융합단백질(heterodimeric Fc-fused protein)에 있어서,
- [158] 상기 생리활성 단백질은 2 이상의 서로 다른 서브유닛(subunit)으로 이루어져 있으며, 2 이상의 서로 다른 서브유닛(subunit)은 (하나의) 단백질 복합체(protein complex)를 형성하여 생리활성을 나타내는 것을 특징으로 한다.
- [159] “2 이상의 서로 다른 서브유닛(subunit)으로 이루어져 있으며, 2 이상의 서로 다른 서브유닛(subunit)은 (하나의) 단백질 복합체(protein complex)를 형성하여 생리활성을 나타내는 것”의 의미는 생리활성 단백질이 2개 이상의 서브유닛들이 단백질 복합체(protein complex)를 형성하는 경우에 목적하는 생리활성을 나타냄을 의미하는 것으로,
- [160] 상기 생리활성 단백질은 인터루킨 12 (IL-12), 인터루킨 23 (IL-23), 인터루킨 27 (IL-27), 인터루킨 35 (IL-35) 및 난포자극호르몬(FSH)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하지만, 이에 한정되는 것은 아니며, 이외에도 본 발명의 목적에 부합하는 어떠한 생리활성 단백질도 사용될 수 있음은 통상의 기술자에게는 자명한 것이다.
- [161] 가장 바람직한 본 발명에 따른 생리활성 단백질은 인터루킨 12 (IL-12)이다.

[162]

[163] 본 발명에 따른 2 이상의 서로 다른 서브유닛(subunit)으로 이루어져 있으며, 2 이상의 서로 다른 서브유닛(subunit)은 1 종의 단백질 복합체(protein complex)를 형성하여 생리활성을 나타내는 단백질을, 본 발명에 따른 바람직한 생리활성 단백질인 인터루킨-12(IL-12)를 예로 들어 구체적으로 설명한다.

[164] IL-12는 p35(IL-12A)와 p40(IL-12B)의 2개의 서브유닛으로 이루어져 있으며, 생리활성을 띠는 활성 형태는 상기 p35와 p40의 이종이중체(heterodimer)인 p70의 형태이다. 자연계에서는 IL-12가 활성을 가지기 위해서는 상기 p35와 p40의 이종이중체(heterodimer)인 p70의 형태로 존재하여야 한다.

[165] 본 발명에서는 자연계에서의 IL-12의 존재형태를 최대한 모사하기 위하여, 본 발명에 따른 항체 중쇄불변부위 이종이중체-융합단백질의 형태로 구현하였다.

[166] 구체적으로, 상기에서 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하고, 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역 말단 중 어느 하나 이상의 말단에 생리활성 단백질의 하나 이상의 서브유닛(subunit)이 결합되어 있는 항체 중쇄불변부위 이종이중체-융합단백질(heterodimeric Fc-fused protein)에 있어서,

[167] (i) 상기 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단 중 어느 하나의 말단에만 하나의 생리활성 단백질을 구성하는 하나 이상의 서브유닛(subunit)(들)이 결합되고, 나머지 서브유닛(들)이 링커로 연결되어 결합되어 있을 수도 있고,

[168] (ii) 제1 Fc 영역 말단 및 제2 Fc 영역의 N-말단 및/또는 C-말단 각각에 1 종의 생리활성 단백질의 서로 다른 하나 이상의 서브유닛(subunit)(들)이 각각 결합되어 있을 수도 있다.

[169] 상기와 같은 경우에 있어, IL-12를 예로 들어 설명하면,

[170] (i)의 경우에는 제1 Fc 영역 또는 제2 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단 중 어느 하나의 말단에만 p35 또는 p40 서브유닛이 결합되어 있고, 나머지 서브 유닛은 제1 Fc 영역 또는 제2 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단 중 어느 하나의 말단에 결합된 p35 또는 p40의 서브유닛과 링커로 연결되어 이종이중체-융합단백질을 형성하도록 할 수 있다(도 2(B) 및 도 2(C) 참조).

[171] (ii)의 경우에는 제1 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단에 p35와 p40에서 선택된 어느 하나의 서브유닛이 결합되고, 제2 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단에는 다른 하나의 서브유닛이 결합된 형태를 가지는 이종이중체-융합단백질을 형성할 수 있다(도 2(B) 및 도 2(C) 참조).

[172] 상기와 같은 형태로 인해, 자연계에 존재하는 본연의 이종이중체 형태를 유지하면서 기존 재조합 인터루킨 12 단백질과 유사한 생체 외 생리활성을 보이는 것을 확인하였다(도 2(B), 도 2(C) 및 도 10(C) 참조).

[173] 이에 따라 본 발명에 따른 바람직한 항체 중쇄불변부위 이종이중체-융합단백질은 상기 생리활성 단백질이 인터루킨 12 (IL-12)이고,

[174] 상기 제1 Fc 영역 또는 제2 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단 중 어느 하나의

- 말단에만 인터루킨 12 (IL-12)의 p35 또는 p40 서브유닛이 결합되어 있고, 나머지 서브유닛이 링커-매개된 형태로 상기 1 Fc 영역 또는 제2 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단 중 어느 하나의 말단에 결합된 서브유닛과 결합되어 있거나, 또는
- [175] 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단 각각에 인터루킨 12 (IL-12)의 p35 및 p40 서브유닛이 각각 결합되어 있는 것을 특징으로 한다.
- [176]
- [177] 또 다른 관점에서, 본 발명에 따른 항체 중쇄불변부위 이종이중체-융합단백질(heterodimeric Fc-fused protein)에 있어서,
- [178] 상기 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역 내 N-말단에 포함된 힌지(hinge) 영역은, 힌지 영역 내에 포함된 시스테인 잔기가 변이된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [179] 바람직하게는 상기 힌지 영역에서의 시스테인 잔기의 변이는 이종이중체(heterodimer) 형성을 위한 중심 힌지 영역(core hinge region) 내의 시스테인 잔기를 제외한 나머지 상부 힌지 영역 (upper hinge region)의 시스테인(cysteine) 잔기가 모두 세린(serine) 잔기로 치환된 것을 특징으로 할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [180] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD 및 IgE로 이루어진 완전한 항체(whole antibody) 형태에 포함되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [181] 본 발명에 있어서, “완전한 항체(whole antibody) 형태”는 IgG, IgA 및 IgD의 경우에는 Fc 영역 내의 CH2 도메인, CH3 도메인 및 힌지 영역(IgE의 경우 CH4 도메인도 포함됨)에, 추가적으로 CH1 도메인, VH 도메인, CL 도메인 및 VL 도메인을 포함하는 완전한 형태의 항체를 의미한다.
- [182]
- [183] 또 다른 관점에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체 중쇄불변부위 이종이중체-융합단백질을 포함하는 약제학적 조성물에 대한 것이다. 본 발명에 따른 약학 조성물의 용도는 항체 중쇄불변부위 이종이중체-융합단백질 내에 포함된 생리활성 단백질의 용도에 따라 좌우되는 것을 특징으로 한다.
- [184] 바람직하게는 본 발명에 따른 항체 중쇄불변부위 이종이중체-융합단백질 내에 포함된 생리활성 단백질은 IL-12 또는 이의 하나 이상의 서브유닛이며, 이에 따라 본 발명은 생리활성 단백질로 IL-12를 포함하는 항체 중쇄불변부위 이종이중체-융합단백질을 포함하는 암 치료를 위한 약제학적 조성물을 제공한다.
- [185] 상기 생리활성 단백질로 IL-12 또는 이의 하나 이상의 서브유닛을 포함하는 항체 중쇄불변부위 이종이중체-융합단백질을 포함하는 암 치료를 위한 약제학적 조성물로 치료가능한 암은 대장암, 흑색종, 유방암, 췌장암, 신장암, 전립선암, 난소암, 소장암, 식도암, 자궁경부암, 폐암, 림프종 및 혈액암으로 이루어진 군에서 선택될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [186] 본 발명에 따른 약제학적 조성물에는 추가적으로 제약상 허용되는 담체가

포함될 수 있다. "제약상(약학적으로) 허용되는 담체"는 제제를 제제화하거나 또는 안정화시키는 것을 돕기 위해서 활성 성분에 추가될 수 있는 물질이고, 환자에게 유의한 해로운 독성 효과를 야기하지 않는다.

- [187] 상기 담체는 환자를 자극하지 않고 본 발명에 따른 이중이중체-융합단백질의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 다른 담체는 예를 들어 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences (E. W. Martin)]에 기재되어 있다.
- [188] 제약상 허용되는 담체는 멸균 주사가 가능한 용액제 또는 분산액제를 즉각 투여용(extemporaneous)으로 제조하기 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 제약 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 작용제의 사용은 당업계에 공지되어 있다. 조성물은 바람직하게는 비경구 주사용으로 제제화된다. 조성물은 용액제, 마이크로에멀전제, 리포솜제, 또는 높은 약물 농도에 적합한 기타 주문된 구조물로서 제제화될 수 있다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이것들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 일부 경우에, 조성물 중에 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨 또는 염화나트륨을 포함시킬 수 있다. 멸균 주사가 가능한 용액제는 필요한 양의 이중이중체-융합단백질을 필요에 따라 상기 기재된 성분들 중 1 종 또는 이것들의 조합물과 함께 적절한 용매 중에 혼입시킨 후에 멸균 마이크로여과를 수행하여 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액제는 활성 화합물을 기본적인 분산 매질 및 상기 기재된 것들로부터의 기타 필요한 성분을 함유하는 멸균 비히클로 혼입시켜 제조된다. 멸균 주사가 가능한 용액제를 제조하기 위한 멸균 분말의 경우, 일부 제조 방법은 활성 성분 및 임의의 추가의 원하는 성분의 분말을 이것의 미리 멸균-여과시킨 용액으로부터 생성하는 진공 건조 및 냉동-건조(동결건조)이다.
- [189] 또한, 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 고통받는 환자의 중증도에 따라 달라질 수 있는 투여량 및 빈도로 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 조성물은 필요에 따라 볼루스로서 또는 연속 주입에 의해 환자에게 투여될 수 있다. 또 다른 형태로, 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 직장으로, 정맥으로(intravenously), 피하로(subcutaneously), 자궁내로(intrauterinely) 또는 뇌혈관내로(intracerebrovascularly) 투여될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.
- [190]

- [191] 또한, 상기 IL-12를 포함하는 항체 중쇄불변부위 이중이중체-융합단백질을 포함하는 암 치료를 위한 약제학적 조성물은 다른 항암제와 병용 치료를 위한 용도로 사용될 수 있으며, 상기 다른 항암제는 세포독성 T 세포 및/또는 자연살해(NK: Natural Killer) 세포인 것이 바람직하지만, 이에 한정되는 것은 아니며, 다른 당해 기술분야에서 사용될 수 있는 모든 항암제가 병용 치료를 위해 사용될 수 있다.
- [192] 특히 인터루킨 12을 포함하는 항체 중쇄불변부위 이중이중체-융합단백질을 포함하는 암 치료를 위한 약제학적 조성물을 세포독성 T 세포 및/또는 자연살해(NK: Natural Killer) 세포와 병용 치료를 위해 사용하는 경우,
- [193] (1) T세포 또는 자연살해(NK) 세포를 자극하여 사이토카인 분비의 증가;
- [194] (2) antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) 또는 세포독성 T 림프구 (CTL)의 반응의 증가;
- [195] (3) 세포독성 T 림프구 (CTL) 및/또는 자연살해 세포 수의 증가;
- [196] (4) 종양부근으로의 림프구 유입의 증가; 또는
- [197] (5) 생체 내에서 림프구의 IL-12R beta1과 IL-12R beta2 시그날의 증가;
- [198] 를 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [199]
- [200] 또 다른 관점에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체 중쇄불변부위 이중이중체-융합단백질을 포함하는 약제학적 조성물을 치료를 요하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 질병의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.
- [201] 상기 조성물의 경우와 마찬가지로, 치료 또는 예방 가능한 질병은 항체 중쇄불변부위 이중이중체-융합단백질 내에 포함된 생리활성 단백질의 용도에 따라 좌우되며,
- [202] 바람직하게는 본 발명에 따른 항체 중쇄불변부위 이중이중체-융합단백질 내에 포함된 생리활성 단백질의 하나 이상의 서브유닛이 IL-12의 하나 이상의 서브유닛일 경우, 암 환자의 치료, 특히 대장암, 흑색종, 유방암, 췌장암, 신장암, 전립선암, 난소암, 소장암, 식도암, 자궁경부암, 폐암, 림프종 및 혈액암으로 이루어진 군에서 선택되는 암을 앓고 있는 환자의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.
- [203]
- [204] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 통상의 기술자에게는 자명한 것이다.
- [205]
- [206] 실시예
- [207] 실시예 1: 인간 항체 동종형별 이중이중체 형성을 위한 항체 중쇄불변부위 CH3 도메인 변이체의 고안 (서열 분석)
- [208] 이중이중체 형성이 선호되는 CH3 도메인 돌연변이가 도입된 각 인간 항체

동종형(isotype)별 중쇄불변부위 이중이중체의 단편을 만들기 위해, 아래에 서술한대로 먼저 이중체 형성을 위한 상호작용에 주요하게 작용하는 CH3 도메인간의 아미노산 서열의 유사 정도를 분석하였다. 이 때, 이중의 CH3A:CH3B(본 발명에 있어, CH3A 및 CH3B는 각각 제1 Fc 영역의 CH3 영역 및 제2 Fc 영역의 CH3 영역을 의미한다)에 유도되는 돌연변이 쌍(A107)은 기존의 문헌 또는 특허에 공개된 중쇄불변부위 이중이중체 형성을 증진시키기 위한 전략으로 CH3A:CH3B 형성이 고수율로 형성되도록 한다(Choi et al. 2016; 대한민국 특허출원 제2015-0142181호). 도 3은 각 인간 항체 면역글로불린 G(IgG) 동종형별 CH3 도메인의 서열을 나열하여 비교한 것이다. 각 아미노산 서열은 International ImMunoGeneTics information system (IMGT ; URL: <http://www.imgt.org/>) 에서 확인하였다. 특히 IgG3의 경우 여러 다양한 Gm 동종이인자형(Gm allotype)중에서도 혈청 내 반감기가 다른 IgG 동종형과 유사한 정도로 유지되는 것으로 보고된 G3m(s,t)의 서열을 사용하였다(Stapleton NM et al., 2011).

- [209] 서열 분석 결과, A107 돌연변이가 도입되는 위치 중에서도 409번째 아미노산 서열이 IgG1, IgG2, IgG3와는 다르게 IgG4에서 아르기닌으로 다른 서열을 가지는 것 이외에는 다른 돌연변이의 위치에는 모든 동종형에서 보존되어 있는 서열을 가지는 것을 확인하였다. 이에 동일한 아미노산 서열 번호를 가지는 위치를 A107 돌연변이 쌍을 IgG1이 아닌 다른 동종형에 이식하기 위한 위치로 선정하였다. 본 발명에서의 모든 아미노산 위치 표기는 EU index (numbering)을 따른다.
- [210]
- [211] 실시예 2: 인간 항체 동종형별 이중이중체 형성을 위한 항체 중쇄불변부위 CH3 도메인 변이체의 고안 (구조 모델링)
- [212] 실제 동종형별 CH3 도메인 변이체를 구축하기에 앞서 실시예 1에서 선정한 위치에 A107 돌연변이쌍이 도입되었을 때, 구조적으로도 돌연변이가 안정적으로 도입되어 이중이중체를 형성할 수 있을지의 여부를 도 3에 각 돌연변이가 도입된 변이체의 서열을 이용, 구조 모델링을 통해 예측하였다. 구조 모델링은 이미 밝혀진 Immunoglobulin Fc heterodimer variant의 구조(PDB ID : 4X98)를 견본(template)으로 하여 온라인 모델링 서버 (URL : <https://swissmodel.expasy.org/>; Biasini M et al., 2014)를 통해 예측하였다. 얻어진 각각의 구조는 돌연변이가 도입된 이후 CH3 도메인의 구조적 변화 및 A107 돌연변이의 위치 등을 관찰하기 위하여 단백질의 구조를 볼 수 있는 Pymol 소프트웨어를 이용하여 중첩시켰다. 중첩 구조 상에서 기존 IgG1 동종형을 기반으로 하여 구축된 고수율로 CH3A:CH3B 중쇄불변부위 이중이중체를 형성하는 돌연변이체 A107의 모델링 구조와 비교하였을 때, 각 동종형에 A107 돌연변이가 도입되었을 때에도, 크게 구조가 달라지지 않고 유지되는 것을 확인하였고, 특히 이식된 A107 돌연변이 아미노산 잔기의 방향이 거의 일치하고

돌연변이 아미노산 간의 상호작용을 위한 거리 또한 비슷한 정도로 유지되고 있음을 확인하였다 (도 4 참조).

[213]

[214] 실시예 3: 인간 항체 동종형별 A107 중쇄불변부위 이중이중체 변이체 (A107 heterodimeric Fc isotype variants)의 구축

[215] 실시예 1의 서열 분석과 실시예 2의 구조 분석을 통해 설계된 각 동종형별 A107 중쇄불변부위 이중이중체 돌연변이체는 합성 올리고뉴클레오타이드 (Macrogen, Korea)를 이용해 통상의 기술자에 의해 행해지는 부위 지정 돌연변이 (Site-directed mutagenesis) 방법으로 동물세포 발현 벡터 pcDNA3.1(+) (Invitrogen, USA)에 signal sequence-hinge-CH2-CH3의 순서를 가지도록 인 프레임 (in-frame)으로 NotI/HindIII 제한효소를 이용하여 클로닝 하였다 (도 5 참조).

[216] 이 때 사용된 힌지 영역은 이중체 형성을 위한 중심 힌지 영역 (core hinge region)내의 시스테인 잔기를 제외한 나머지 상부 힌지 영역 (upper hinge region)의 시스테인(cysteine) 잔기는 단백질 융합시, 원하지 않는 이황화 결합이 생기는 것을 막기 위해 세린(serine) 잔기로 치환하였다. 특히, IgG3의 경우 G3m(s,t) 동종이인자형이 가지는 힌지 영역 47개 아미노산 서열 중 중심 힌지 영역의 C 말단 15개 아미노산만으로도 IgG3가 가지는 높은 항체 고유의 효과 기능 (ADCC, CDC)이 유지되는 것을 문헌을 통해 확인하였고(Dall'Acqua WF et al., 2006), 이에 도 5에 나타낸 서열의 C 말단 15개 아미노산만을 사용하였다.

[217] 표 2는 본 발명의 야생형 및 A107 중쇄불변부위 이중이중체 변이체쌍 내의 CH3 영역의 아미노산 서열 정보를 나타낸 것이다.

[218]

[219] [표2]

구성	CH3A 사슬 (제1 Fc 영역의 CH3 서열) (EU number 341~447)	CH3B 사슬 제2 Fc 영역의 CH3 서열 (EU number 341~447)
IgG1 Wild type	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 7)	서열번호 7과 동일
γ 1-A107	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVEGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSFFL YSWLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 8)	GQPREPQVYTLPPSRDNLTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLVSDGSFTLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNH YTQKSLSLSPGK (서열번호 9)
IgG2 Wild type	GQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPMLDSGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 10)	서열번호 10과 동일
γ 2-A107	GQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVEGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPMLDSGSF FLYSWLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 11)	GQPREPQVYTLPPSRENMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPMLVSDGSFTLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNH YTQKSLSLSPGK (서열번호 12)

[220]

IgG3 Wild type	GQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAM EWES SGQPENNYKTTTPVLDSG SFF LYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 13)	서열번호 13과 동일
γ 3-A107	GQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVEGFYPSDIAM EWES SGQPENNYKTTTPVLDSG SFF LYSWLTVDKSRWQQGNIFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 14)	GQPREPQVYTLPPSRENMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAM EWESSGQPE NNYKTTTPVLVSDGSFTLYSKLTV DKSRWQQGNIFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSPGK (서열번호 15)
IgG4 Wild type	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSG SFF LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호 16)	서열번호 16과 동일
γ 4-A107	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVEGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSG SFF LYSWLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호 5)	GQPREPQVYTLPPSQENMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLVSDGSFTLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNH YTQKSLSLSLGK (서열번호 6)

[221]

[222] 실시예 4: 인간 항체 동종형별 A107 이종이중체 중쇄불변부위 변이체의 이종이중체 형성능 평가 방법

[223] 상기 실시예 3에서 제작한 각 동종형별 A107 중쇄불변부위 이종이중체 돌연변이체가 실제로 야생형 A107 돌연변이체와 유사한 정도의 이종이중체 형성능을 가지는 지 확인하기 위하여 동종의 연구에서 중쇄불변부위 이종이중체 형성능 평가에 주요하게 사용되는 scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 동시 발현 시스템을 사용하고자 하였다 (Choi et al., 2013). 도 6은 scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 동시 발현 시스템을 나타낸 모식도이다. scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 동시 발현 시스템에서 정제된 항체는 scFv-Fc_{CH3A} 동종이중체 (103 kDa)와 scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 이종이중체 (78 kDa), Fc_{CH3B} 동종이중체 (53 kDa)의 분자량이 각각 다르게 나타나기 때문에,

SDS-PAGE 상에서 이중이중체의 형성 정도를 비교할 수 있다.

- [224] 상기 Fc_{CH3B} 벡터는 실시예 3에서 구축된 벡터를 사용하였고, 추가적으로 Fc_{CH3A} 의 N 말단에만 scFv를 도입하는 즉, pcDNA3.1(+)-scFv-hinge-CH2-CH3A (scFv- Fc_{CH3A})의 포맷으로 발현되는 벡터를 클로닝하였다. 도 7은 상기 scFv- Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 동시 발현 시스템에서 사용한 동물세포 발현벡터인 pcDNA3.1(+)-scFv-hinge-CH2-CH3A (scFv- Fc_{CH3A}) 벡터의 모식도를 나타낸 것이다. 사용한 scFv 항체는 DR4에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 hAY4의 친화도가 향상된 버전인 hAY4a의 VH와 VL 부위를 연결한 항체이다(Lee, Park et al. 2010). NotI 제한 효소와 힌지 영역 바로 앞에 위치한 BsiWI 제한효소를 이용하여 클로닝 하였다. 변이체에 대한 대조군으로 야생형 Fc를 동일한 포맷 (scFv-Fc/Fc)으로 구축하였다.
- [225]
- [226] 실시예 5: 인간 항체 동종형별 A107 이중이중체 중쇄불변부위 변이체를 포함한 항체의 발현 및 정제
- [227] 상기 구축된 scFv- Fc_{CH3A} 및 Fc_{CH3B} 의 동시 발현은 각각의 발현 벡터(1:1 비율)와 폴리에틸렌이민 (Polyethylenimine, PEI) (Polyscience)의 혼합물을 HEK293-F(Invitrogen) 세포에 일시적 트랜스펙션(transient transfection)하여 무혈청 FreeStyle 293 발현 배지(Invitrogen)가 들어있는 진탕 플라스크에서 배양함으로써 이루어진다. 자세한 방법은 다음과 같다.
- [228] 진탕 플라스크(Corning)에 200 mL 트랜스펙션 시, HEK293-F 세포를 2.0×10^6 세포/ml의 밀도로 배지 100 ml에 파종하여, 150 rpm, 8 % CO_2 에서 배양하였다. 각각의 인간화 항체를 생산하기 위해 그에 따른 중쇄 및 경쇄 플라스미드를 10 ml FreeStyle 293 발현 배지 (Invitrogen)에 중쇄 125 μ g, 경쇄 125 μ g 총 250 μ g (2.5 μ g/ml)으로 희석하여, PEI 750 μ g을 희석한 10 ml의 배지 (7.5 μ g/ml)와 혼합하여 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 그 후, 반응시킨 혼합배지를 앞서 100 ml로 파종한 세포에 넣어 4시간 동안 150 rpm, 8% CO_2 에서 배양 후, 나머지 100 ml의 FreeStyle 293 발현 배지를 추가하여 짧게는 5일에서 길게는 7일동안 배양하게 되면, 세포가 생산한 단백질 즉, 중쇄불변부위 변이체를 포함한 항체는 세포에 의해 세포 바깥으로 분비되어 배지에 쌓이게 된다. 때문에 단백질은 세포 배양 후 2500 rpm에서 20 분간 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, 정제된 단백질은 BCA protein assay kit (Thermo)내 용액을 이용하여 562 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 그려진 표준 곡선에 따라 그 양을 정량하였다.
- [229]
- [230] 실시예 6: 인간 항체 동종형별 A107 이중이중체 중쇄불변부위 변이체의 이중이중체 형성능 평가

- [231] 상기 실시예 5에서 정제된 동종형별 A107 중쇄불변부위 이중이중체 변이체를 포함한 항체 5 μ g을 12% 비환원성 조건으로 SDS-PAGE 상에서 분석하였다(도 8). CH3A 변이체의 동종이중체는 103 kD, CH3B 변이체의 동종이중체는 53kD, CH3B 변이체의 단량체는 25 kD에서 관찰되었으며, CH3A 변이체와 CH3B 변이체의 이중이중체는 78 kD에서 관찰되었다. 더 정교한 동종이중체의 정도를 파악하기 위해 웨스턴 블랏(Western blot)을 함께 수행하였다. 웨스턴 블랏은 SDS-PAGE 분석보다 적은 양인 0.1 μ g의 단백질을 12% 비환원성 조건으로 분리한 이후, 통상의 기술자들이 하는 방법을 이용해 anti-human IgG-AP conjugated antibody (Sigma)을 처리하여 수행하였다(도 9).
- [232] 도 8 및 도 9에서 대조군인 야생형 CH3 도메인이 도입된 IgG1 이중이중체는 SDS-PAGE상에서 CH3A/CH3B 각각의 동종이중체 및 CH3A:CH3B 이중이중체가 모두 관찰된 반면, IgG1를 제외한 IgG2, IgG3, IgG4에 A107 이중이중체 형성 돌연변이를 도입한 인간 항체 동종형별 A107 중쇄불변부위 이중이중체 변이체는 모두 기존에 보고된 IgG1 기반 A107 돌연변이체와 유사하거나 더 높은 수율로 이중이중체를 형성하는 것을 확인하였다. 이 때, IgG4 변이체의 경우, CH3A 혹은 CH3B가 포함된 Fc 모노머 (Half Fc)도 함께 관찰되었는데, 이는 자연적으로 일어나는 IgG4의 특징 중의 하나로, 혈액 내에서 Fab-arm exchange가 일어나기에 앞서 힌지 영역 (특히, 중심 힌지 영역 내 228번째 세린)을 중심으로 Half Fc를 형성하는 특징에 기인한 결과이다 (Liu H et al., 2012).
- [233]
- [234] 실시예 7: 인간/마우스 IL-12 fusion protein 구축
- [235] 이중이중체 형성능이 기존에 보고된 IgG1 기반 A107 중쇄불변부위 이중이중체 변이체와 유사한 정도로 유지되는 것이 확인된 상기 실시예 1-6의 동종형별 변이체 중에서도 IgG4를 기반으로 한 변이체 (γ 4-A107)를 이용하여 지속성 인터루킨 12 (Interleukin 12) 융합단백질을 구축하였다. 자연계에 존재하는 인터루킨 12는 p35 단위체 (p35; IL-12A) 과 p40 단위체 (p40; IL-12B) 서로 다른 두 개의 단위체로 이루어져있고, 상기 두 개의 단위체가 상호작용하여 이중이중체를 형성함으로써 활성을 가진다. 이러한 이중이중체의 형성은 두 개의 단위체 사이에 존재하는 하나의 이황화 결합에 의해 더욱 단단하게 안정적으로 결합함으로써 이루어진다. 이에 각각의 단위체를 서로 다른 이중이중체 Fc 변이체 (CH3A 혹은 CH3B)에 연결함으로써 자연계에 존재하는 사이토카인의 이중이중체 형태를 유지하고자 하였다.
- [236] 융합단백질의 구축을 위한 중쇄불변부위 이중이중체 변이체는 IgG4를 기반으로 하여 A107 돌연변이가 도입되어 이중이중체를 형성하는 γ 4-A107을 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 ADCC/CDC의 기능이 IgG1과 비교하였을 때 거의 나타나지 않는 IgG4 동종형을 사용하여 융합단백질을 구축하였다 (Gillies SD et al., 1999).

- [237] 도 10은 본 발명에 사용된 IL-12의 제조용 단백질, γ 4-A107를 이용한 Monovalent IL-12 융합단백질(mono-IL-12-Fc) 그리고 야생형 Fc를 이용한 bivalent IL-12 융합단백질(bi-IL-12-Fc)의 모식도를 나타낸 것이다. 그 중에서도 (C)는 본 발명에서 제작한 CH3 돌연변이체 쌍이 도입된 융합단백질이다. 인간 인터루킨 12 (hIL-12, Uniprot entry name P29460, P29459; 서열번호 17-18) 및 마우스 인터루킨 12(mIL-12, Uniprot entry name P43432, P43431; 서열번호 19-20)는 모두 signal sequence를 제외한 mature form을 코딩하는 DNA서열만을 증폭하여 γ 4-A107 변이체가 들어가있는 동물세포 발현 벡터에 도 11(A) 및 (B)와 같은 인 프레임 (in-frame)으로 NotI/BsiWI 제한효소를 이용하여 클로닝 하였고 각각 mono-hIL-12-Fc와 mono-mIL-12-Fc로 명명하였다. 특히 인간/마우스 p35 단위체는 p40 단위체와의 충분한 상호작용이 가능하도록 p35 단위체와 힌지 영역 사이에 15 개의 유연성이 있는 펩타이드 링커 (flexible (G₄S)₃ Linker)를 부여하였다. (C)에 대한 비교예로 인간 인터루킨 12(hIL-12)와 마우스 인터루킨 12(mIL-12)를 야생형 IgG4 Fc(wt IgG4)를 융합한 bi-hIL-12-Fc와 bi-mIL-12-Fc를 구축하였다. 이중이중체를 이루어야만 활성을 가지는 IL-12를 하나의 Fc에 융합시키기 위해 두 개의 단위체를 상기 15개 펩타이드 링커로 연결해준 다음, γ 4-A107 변이체가 들어가있는 동물세포 발현 벡터에 도 12와 같은 인-프레임 (in-frame)으로 NotI/BsiWI 제한효소를 이용하여 클로닝 하였다. 상기 비교예는 IL-12 융합단백질을 만들기 위한 기존의 연구에서 사용된 형태의 융합단백질이다 (Lisan S. Peng et al., 1999).

- [238] 표 3은 상기 융합단백질의 구축에 사용된 인간 및 마우스 인터루킨 12의 단위체의 mature form에 대한 아미노산 서열이다.

- [239]

[240] [표3]

구성	CH3A 사슬 (p40 subunit)	CH3B 사슬 (p35 subunit)
Mature human IL-12	IWELKKDVYVVELDWYPDAPG EMVVLTCDTPEEDGITWTLDQ SSEVLGSGKTLTRVKEFGDAG QYTCHKGGEVLSHSLLLHKKE DGIWSTDILKDQKEPKNKTFLR CEAKNYSGRFTCWWLTTISTD LTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAA TLSAERVGRDNKEYEYSVECC EDSACPAAEESLPIEVMVDAVH KLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDT WSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKR EKKDRVFTDKTSATVICRKNASI SVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS (서열번호 17)	RNLPVATPDPMFPLHHSQNLLR AVSNMLQKARQTLEFYPTSEEID HVDITKDKTSTVEACLPLELTKNES CLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMM ALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAK LLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQ ALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKI KLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (서열번호 18)
Mature mouse IL-12	MWELEKDVYVVEVDWTPDAP GETVNLTCDTPEEDDITWTSD QRHGVIKSGKTLTTVKEFLDA GQYTCHKGGETLSHSLLLHK KENGIWSTEILKNFKNKTFLKC EAPNYSGRFTCSWLVRNMDL KFNKSSSSPPDSRAVTCGMASL SAEKVTLQRDYEKYSVSCQED VTCPTAEETLPIELALEARQQN KYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQ MKPLKNSQVEVSWEYPDSWST PHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKKE TKEGCNQKGAFLVEKTSTEVQ CKGGNVCVQAQDRYYNSSCSK WACVPCRVR (서열번호 19)	RVIPVSGPARCLSQSRNLLKTDDM VKTAREKLKHYSCAEDIDHEDITR DQTSTLKTCLPLELHKNESCLATR ETSSSTRGSCLPQKTSMMTLCL GSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNH NHQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHN GETLRQKPPVGEADPYRVKMKLCI LLHAFSTRVVTINRVMGYLSSA (서열번호 20)

[241]

- [242] 실시예 8: IL-12 fusion protein 발현/정제
- [243] 도 10 (C)의 mono-IL-12-Fc 융합단백질은 human/mouse IL-12.p40- γ 4-A107A 및 human/mouse IL-12.p35- γ 4-A107B의 발현 벡터를 1:1 비율로 하여 실시예 5와 같은 방법으로 발현/정제하였다. 도 10 (B)의 bi-IL-12-Fc 융합단백질은 human/mouse scIL-12-IgG4 Fc(wt) 발현 벡터의 단일 트랜스팩션을 통해 발현/정제하였다. 모든 융합단백질은 100 ml HEK293F cell culture 당 12-13 mg의 유사한 정도로 발현/정제되었다.
- [244] 상기 정제된 mono-IL-12-Fc 및 bi-IL-12-Fc 융합단백질 5 μ g을 12% 비환원성 조건으로 SDS-PAGE 상에서 분석하였다 (도 13). IL-12.p40-CH3A 변이체의 모노머는 60 kD, 동종이중체는 120 kD, IL-12.p35-CH3B 변이체의 모노머는 50 kD 동종이중체는 100 kD에서 관찰되었으며, IL-12.p40-CH3A 변이체와 IL-12.p35-CH3B 변이체의 이종이중체는 110 kD에서 관찰되었다. 다만 인간과 마우스의 인터루킨 단위체가 연결된 단백질은 다소 다른 사이즈에서 밴드가 관찰되었는데, 이는 서로 다른 글리코실화(glycosylation) 패턴에 의한 것임을 참고문헌을 통해 확인하였다 (Lo et al., 2007). 또한 앞선 실시예 6에 서술한 것과 마찬가지로 IgG4를 기반으로 한 모든 IL-12 융합단백질에서 모노머가 관찰되었다. p35 단위체는 p40 단위체의 도움 없이는 자연적으로도 모노머 형태로 발현되지 않는다는 기존의 보고와 유사하게 이종이중체 중쇄불변부위 변이체를 이용한 mono-IL-12-Fc 융합단백질에서는 p40 단위체가 연결된 CH3A 모노머만이 관찰되었다 (Gillies et al., 1998b).
- [245] 도 14는 상기 융합단백질들의 크기 별 배제 크로마토그래피 (SEC; Size-Exclusion Chromatography) 결과이다. Mono-hIL-12-Fc 융합단백질에서 일부 중합체가 관찰되었다.
- [246]
- [247] 실시예 9: Mono-hIL-12-Fc 융합단백질의 IL-12 수용체에 대한 결합능 평가
- [248] 실시예 8에서 발현, 정제한 mono-hIL-12-Fc의 IL-12 수용체에 대한 결합능을 bi-hIL-12-Fc와 비교 분석하였다.
- [249] 도 15는 bi-hIL-12-Fc와 비교하여 구축된 mono-hIL-12-Fc이 IL-12 수용체에 결합능을 보이는 것을 유세포 분석기기인 FACS Calibur (BD Biosciences)로 확인한 결과이다.
- [250] 구체적으로는, 인간의 말초혈액에서 면역세포 (PBMC)를 분리하기 위하여 15 ml 시험관에 Ficoll (GE Healthcare) 5 ml을 채워 넣었다. 채혈한 혈액은 PBS (pH 7.4)와 1:1로 섞은 후 흔들어 준 다음 10 ml 만큼 취해서 Ficoll이 담긴 시험관에 Ficoll과 섞이지 않게 넣고 750 g에서 20분간 no break 상태로 원심 분리하였다. 그 후 Ficoll 위에 형성된 buffy coat를 회수하여 PBS (pH 7.4)로 2번 세척한 후 T세포, B세포, NK 세포 및 단핵구를 포함하는 PBMC를 얻었다. 분리된 정상 PBMC는 IL-12의 binding을 볼 수 있을 만큼 많은 양의 IL-12R 를 발현하고 있지 않다. 때문에 PHA (Sigma-Aldrich) 라는 mitogen을 72 h 동안 처리하여 T세포와

NK세포가 활성화 할 수 있도록 자극을 주었다. PHA를 처리하게 되면 면역세포가 분열하면서 T세포와 NK세포에 IL-12 수용체가 발현된다는 보고가 있다. 10% FBS가 포함된 RPMI1640 배지에 1×10^6 cells/ml의 PBMC를 넣고 mitogen으로 PHA를 10 μ g/ml 농도로 첨가한 후 37도, 5% CO₂ 배양기에서 배양 72 시간 동안 배양하였다. 정상 PBMC와 PHA로 활성화된 PBMC는 차가운 PBS(pH 7.4)로 세척하고 각 샘플당 5×10^5 개의 세포를 준비하였다. Fc (A107), bi-hIL-12-Fc 및 mono-hIL-12-Fc를 1 μ M 농도로 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시킨 후 차가운 PBS (pH 7.4)로 세척하였다. 인간 IgG4를 인지하는 FITC 형광이 연결된 이차항체(Sigma-Aldrich)를 4°C에서 30분간 반응시키고 PBS(pH 7.4)로 세척 후, 유세포 분석기기인 FACS Calibur (BD Bioscience)로 분석하였다. 분석 후, 각각의 샘플에 대한 히스토그램 그래프를 얻어 mono-hIL-12-Fc의 IL-12 수용체에 대한 결합능을 평가하였다.

[251] 분석결과, bi-hIL-12-Fc와 mono-hIL-12-Fc은 IL-12 수용체를 발현하지 않는 정상 PBMC에는 결합하지 않고 PHA로 활성화되어 IL-12 수용체를 발현하는 PBMC에만 결합하였다. 따라서 mono-hIL-12-Fc의 IL-12 수용체에 대한 결합능은 bi-hIL-12-Fc와 동일한 것으로 확인되었다.

[252]

[253] 실시예 10: Mono-hIL-12-Fc 융합단백질의 PBMC 증식 유도 능력 평가

[254] IL-12 fusion protein내 IL-12 moiety가 IL-12 수용체에 결합하여 실제 recombinant IL-12(rIL-12) 만큼의 생리활성을 유지하는지를 recombinant human IL-12 (rhIL-12, Thermo Fisher Scientific)을 대조 군으로 하여 확인하였다.

[255] 도 16은 PHA로 활성화된 PBMC에서 Fc (A107), rhIL-12, bi-hIL-12-Fc와 mono-hIL-12-Fc에 의한 세포증식 능력을 확인한 WST-1 세포증식 시험 결과이다.

[256] 구체적으로는, 실시예 9에서와 동일하게 PHA로 활성화된 PBMC (2 x 10⁴, 50 μ l)를 96웰 플레이트(SPL, Korea)에 첨가하고 10 % FBS가 포함된 RPMI1640 배지로 연속적으로 희석된 50-0.4 pM의 Fc (A107), rhIL-12, bi-hIL-12-Fc와 mono-hIL-12-Fc를 50 μ l씩 첨가한 다음 72 시간 동안 5 % CO₂, 37 °C 조건에서 배양 후, 세포증식시험을 위해 WST-1 (Water-soluble Tetrazolium salts, Sigma-aldrich) 시약을 10 μ l씩 각 웰에 첨가한 후 37 °C에서 4시간 반응시키고 570 nm에서 흡광도를 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices)를 이용하여 측정하였다.

[257] 분석 결과, mono-hIL-12-Fc는 rhIL-12와 유사하거나 더 높은 PBMC 증식능을 가지는 것을 확인하였다.

[258]

[259] 실시예 11: Mono-hIL-12-Fc 융합단백질의 PBMC에 대한 IFN- γ 분비 유도 능력 평가

[260] 도 17은 PHA로 활성화된 PBMC에서 Fc (A107), rhIL-12, bi-hIL-12-Fc와 mono-hIL-12-Fc에 의한 IFN- γ 분비 양을 측정한 ELISA 결과이다.

- [261] 구체적으로는, 실시예 10에서 72시간 동안 배양된 세포배양액 내 IFN- γ 농도를 측정하기 위하여 ELISA용 96-웰 플레이트 (Thermo Fisher Scientific, Korea)에 인간 IFN- γ 포획 항체 (Thermo Fisher Scientific)를 12시간 동안 코팅한 후, PBST (PBS with 0.1% Tween-20)으로 세척 후, 1% BSA (PBS with 1% bovine serum albumin)를 넣고 1시간 동안 실온에서 blocking하였다. PBST (PBS with 0.1% Tween-20)으로 세척 후, 실시예 2에서 배양된 배양액을 1% BSA로 5배 희석하여 100 μ l씩 첨가한 다음 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. PBST (PBS with 0.1% Tween-20)으로 세척 후, biotin이 결합된 IFN- γ 검출 항체(Thermo Fisher Scientific)를 실온에서 1시간 동안 결합시켰다. PBST (PBS with 0.1% Tween-20)으로 세척 후, avidin이 결합된 horse radish peroxidase (HRP) (Thermo Fisher Scientific)를 실온에서 30분간 결합시킨 다음 PBST (PBS with 0.1% Tween-20)으로 세척 후, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB, sigma-aldrich) 기질을 넣어 마이크로플레이트 리더를 이용하여 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다.
- [262] 분석 결과, mono-hIL-12-Fc은 PBMC에 대한 IFN- γ 분비 유도능이 rhIL-12와 유사거나 더 높은 것을 확인하였다.
- [263]
- [264] 실시예 12: Mono-mIL-12-Fc의 IL-12 수용체에 대한 결합능 평가.
- [265] 실시예 8에서 발현, 정제한 mono-mIL-12-Fc의 IL-12 수용체에 대한 결합능을 bi-mIL-12-Fc와 비교 분석하였다.
- [266] 도 18은 bi-mIL-12-Fc과 비교하여 구축된 mono-mIL-12-Fc이 IL-12 수용체에 결합능을 보이는 것을 확인한 Flow cytometry 결과이다.
- [267] 구체적으로는, 마우스 IL-12는 마우스 IL-12 수용체뿐만 아니라 인간 IL-12 수용체에도 결합한다고 보고되어 실시예 9에서와 같은 방법으로 분석하였다. 분석결과, bi-mIL-12-Fc과 mono-mIL-12-Fc은 IL-12 수용체를 발현하지 않는 정상 PBMC에는 결합하지 않고 PHA로 활성화되어 IL-12 수용체를 발현하는 PBMC에만 결합하였다. 따라서 mono-mIL-12-Fc의 IL-12 수용체에 대한 결합능은 bi-mIL-12-Fc와 동일한 것으로 확인되었다.
- [268]
- [269] 실시예 13: Mono-mIL-12-Fc의 PBMC 증식 유도 능력 평가
- [270] 도 19는 PHA로 활성화된 PBMC에서 Fc (A107), recombinant mouse IL-12(rmIL-12), bi-mIL-12-Fc과 mono-mIL-12-Fc에 의한 세포증식 능을 확인한 WST-1 세포증식 어세이 결과이다.
- [271] 구체적으로는, 실시예 9에서와 동일하게 PHA로 활성화된 PBMC (2×10^4 , 50 μ l)를 96웰 플레이트에 첨가하고 10 % FBS가 포함된 RPMI1640 배지로 연속적으로 희석된 50-0.4 pM의 Fc (A107), rmIL-12, bi-mIL-12-Fc과 mono-mIL-12-Fc를 50 μ l씩 첨가한 다음 72시간동안 5 % CO₂, 37°C 조건에서 배양 후, 실시예 10과 같은 방법으로 WST 어세이를 수행하였다. 분석 결과,

mono-mIL-12-Fc은 rmIL-12와 유사하게 PBMC 증식을 유도하는 능력을 가지는 것을 확인하였다.

[272]

[273] 실시예 14: Mono-mIL-12-Fc의 생체 내 종양성장 억제능 평가

[274] 실시예 13에서 mono-mIL-12-Fc의 PHA로 활성화된 PBMC에서의 세포증식능을 확인하였다. 생체 내에서도 mono-mIL-12-Fc의 효과가 동일하게 나타나는지 확인하였다.

[275] 도 20(A)와 20(B)는 mono-mIL-12-Fc의 마우스 생체 내에서 종양 성장 억제 활성을 100 mm³ 크기의 종양에서 측정한 결과이다.

[276] 구체적으로, 4 주령의 암컷 Balb/c 마우스 (NARA Biotech, Korea)의 털을 면도기로 제거하고 CT26^{HER2/Neu} 대장암세포 (1×10⁶ 세포/마우스)를 150 μL PBS에 희석하여 마우스 피하에 이식하였다. 유사한 크기의 종양 (평균 부피 100~120 mm³)을 가진 마우스를 처리집단으로 무작위로 배정하고, Fc (A107), rmIL-12 (Thermo Fisher Scientific), bi-mIL-12-Fc과 mono-mIL-12-Fc을 마우스 한 마리당 1 μg 분자당량의 IL-12를 1주일에 2회씩 총 6회 복강으로 주사하였다. 종양은 일주일에 2회씩 측정하고, 종양의 부피 (V)는 $V = \text{길이} \times \text{폭}^2 / 2$ 로 계산하였다.

[277] 도 20(A)에 나타난 바와 같이, 대조군에 비해 1 μg의 rmIL-12 투여는 종양 성장 억제효과가 없었으나 같은 몰 농도의 mono-mIL-12-Fc과 bi-mIL-12-Fc는 종양 성장을 억제하였다. 또한, 도 20(B)에서 대조군과 비교하여 mono-mIL-12-Fc과 bi-mIL-12-Fc의 투여 시 마우스의 체중 변화가 거의 없는 것을 확인하였으며, 이에 따라 독성은 없는 것으로 판단되었다.

[278] 도 21(A), 21(B)와 21(C)는 농도별로 투여한 mono-mIL-12-Fc의 마우스 생체 내에서 종양 성장 억제 활성을 300 mm³ 크기의 종양을 가진 마우스에서 측정한 결과이다.

[279] 구체적으로, 4 주령의 암컷 Balb/c 마우스 (NARA Biotech, Korea)의 털을 면도기로 제거하고 CT26^{HER2/Neu} 대장암세포 (1×10⁶ 세포/마우스)를 150 μL PBS에 희석하여 마우스 피하에 이식하였다. 유사한 크기의 종양 (평균 부피 300 mm³)을 가진 마우스를 처리집단으로 무작위로 배정하고, 마우스 한 마리당 0.1~2 μg rmIL-12와 몰 농도가 같은 bi-mIL-12-Fc과 mono-mIL-12-Fc를 1주일에 2회씩 총 6회 복강으로 주사하였다. 종양은 일주일에 2회씩 측정하고, 종양의 부피 (V)는 $V = \text{길이} \times \text{폭}^2 / 2$ 로 계산하였다.

[280] 도 21(A)와 21(B) 및 21(C)에 나타난 바와 같이 크기가 큰 종양에 대해서도 1 μg IL-12 이하의 몰 농도에서 mono-mIL-12-Fc가 bi-mIL-12-Fc에 비해 유의적으로 종양성장을 억제하는 효과가 높았다. 0.25 μg IL-12와 같은 몰 농도의 bi-mIL-12-Fc는 종양의 성장을 억제하는 효과는 보였지만 종양을 제거하지는 못했다. 그러나 같은 몰 농도의 mono-mIL-12-Fc는 40%의 마우스에서 종양을 제거하는 효과를 보였다. 또한 bi-mIL-12-Fc가 종양을 제거하지 못한 0.5 μg IL-12 농도에서 mono-mIL-12-Fc를 5회만 투여하더라도 73%의 마우스의 종양이

제거되었다.

[281]

[282] 실시예 15: Mono-mIL-12-Fc의 생체 내 독성 평가

[283] 도 21(D)은 농도 별로 투여한 mono-mIL-12-Fc의 생체 내에서의 독성을 체중변화로 측정한 결과이다.

[284] 구체적으로, 도 21(A)와 같이 투여된 마우스의 체중을 1주일에 두 번씩 측정하여 체중감소 여부를 관찰하였다. 대조군의 경우 종양의 크기가 커지면서 체중이 증가하였으나, 모든 농도의 bi-mIL-12-Fc과 mono-mIL-12-Fc를 투여한 마우스에서 투여 전에 비해 체중 감소가 없는 것을 확인하였다. 따라서 mono-mIL-12-Fc는 체중감소를 유도하는 생체 내 독성은 없는 것으로 판단되었다.

[285] 도 21(D)은 간 독성의 지표인 알라닌 아미노 전이효소 (ALT) 측정한 결과이다.

[286] 구체적으로, 도 21(A)의 마우스에서 마지막 투여 24시간째에 얼굴정맥에서 채혈하였다. 혈액은 2시간 동안 실온에 방치하여 혈액응고를 유도한 후 8000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층의 혈청을 회수하였다. 혈청 내 ALT의 농도를 측정하기 위해 마지막 IL-12-Fc 융합단백질 투여 24시간 뒤, 마우스의 얼굴 정맥에서 채혈하였다. 혈액은 2시간 동안 실온에 방치 하여 혈액응고를 유도한 후 8000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층의 혈청을 회수하였다. 혈청 내 ALT 농도를 측정하기 위해서 ALT 측정용 기질액 (alanine과 α -ketoglutarate 혼합액)을 15 ml 시험관에 취해 37°C 항온수조에서 5분간 배양하였다. 여기에 종양이 이식된 마우스에 bi-mIL-12-Fc과 mono-mIL-12-Fc를 투여한 다음 혈액을 채취하여 분리한 혈청을 10배 희석하여 200 μ l씩 첨가한 후 진탕하여 37°C 항온수조에서 30분간 배양하였다. 항온수조에서 꺼낸 시험관에 정색시액 (2,4-dinitrophenyl-1-hydrazone)을 1 ml 가해 섞은 후 실온에서 20분간 방치하였다. 그 후, 0.4 N 수산화나트륨 용액을 10 ml 가하여 혼합한 후 실온에 10분 방치하였다. 광전분광광도계(GeneQuant100, GE Healthcare)를 사용하여 505 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 혈청대신 표준곡선시액을 첨가하여 작성한 표준곡선에 의해 ALT의 단위를 환산하여 구하였다. Bi-mIL-12-Fc과 mono-mIL-12-Fc를 투여한 마우스에서 채혈하여 얻은 혈청은 대조군이나 정상 Balb/c 마우스에서 채혈하여 얻은 혈청과 비슷한 ALT 활성을 나타내어 bi-mIL-12-Fc과 mono-mIL-12-Fc를 종양이식마우스에 0.5 μ g이나 1 μ g IL-12와 같은 몰 농도를 투여하였을 때 간 독성을 유도하지 않는 것으로 확인되었다.

[287]

[288] 실시예 16: 생체 내에서 mono-mIL-12-Fc의 면역세포 증식 유도능 평가

[289] 실시예 15에서 2 μ g IL-12와 같은 몰 농도를 투여하였을 때는 bi-mIL-12-Fc과 mono-mIL-12-Fc 모두 종양을 제거하였으나 1 μ g IL-12 보다 낮은 몰 농도에서는 mono-mIL-12-Fc가 bi-mIL-12-Fc 보다 유의적으로 종양성장 억제효과가 높았다. 실제로, mono-mIL-12-Fc의 높은 종양성장 억제효과가 IL-12의 수용체를 가진

NK세포, CD4⁺ T세포 및 CD8⁺ T세포와 같은 고유의 효과세포의 수의 증가와 관련이 있는지를 확인하였다.

- [290] 도 22(A)는 상기 도 21(A)의 마지막 투여 3일 후에 마우스를 치사하여 비장에서 CD4⁺ T세포, CD8⁺ T세포 및 NK세포 수의 증가를 확인한 결과이다.
- [291] 구체적으로, 21(A)과 같이 처리한 후 종양이식 34일째에 마우스의 비장을 적출하여 페트리디쉬에서 철망을 이용해 분쇄한 다음 2%의 FBS가 포함된 배지 10 ml로 세척하였다. 그 후, 적혈구 용혈버퍼 (red blood cell lysis buffer)를 1 ml 넣어 적혈구를 용혈시킨 다음 PBS로 세척하여 비장세포 혼탁액을 준비하고 헤모사이토미터로 세포의 수를 계수하였다. 비장림프구를 APC, FITC, PE 또는 PE-cy5가 결합된 CD45, CD3, CD4, CD8 및 CD49b를 인지하는 항체를 넣어 4°C에서 30분간 염색하고 차가운 PBS(pH 7.4)로 세척한 다음 유세포 분석기인 FACS Calibur (BD Bioscience)와 Flow jo(Thermo Fisher Scientific)로 분석하였다. 각각의 샘플을 닷플롯(dot plot)으로 분석하여 CD45⁺CD3⁺CD4⁺ 세포군, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ 세포군 및 CD45⁺CD3⁺CD49b⁺ 세포군을 각각 CD4⁺ T세포, CD8⁺ T세포, NK세포로 정의하여 전체 비장세포에 대한 비율을 구하고 헤모사이토미터로 계수된 세포의 수를 곱하여 mono-mIL-12-Fc 투여 후 증가된 CD4⁺ T세포, CD8⁺ T세포 및 NK세포의 수를 분석하였다.
- [292] 그 결과, 대조군에 비해 mono-mIL-12-Fc는 종양이 이식된 마우스에서 농도의존적으로 CD4⁺ T세포, CD8⁺ T세포의 수를 증가시켰음을 확인할 수 있었다. 반면, bi-mIL-12-Fc는 0.5 µg IL-12와 같은 몰 농도를 투여한 군에서만 CD8⁺ T세포의 수를 증가시켰고, 1 µg IL-12와 같은 몰 농도를 투여한 군에서는 CD4⁺ T세포와 CD8⁺ T세포의 수를 증가시키지 못했다. NK세포는 종양이식 마우스에서 기억세포를 형성하지 못한다는 선행연구결과 (Cerwenka and Lanier, 2016; Schreiber et al., 2011)와 일치하게 종양이식 34일째에는 mono-mIL-12-Fc와 bi-mIL-12-Fc투여군 모두에서 NK세포 수가 대조군과 비슷함을 확인하였다. 따라서 mono-mIL-12-Fc는 bi-mIL-12-Fc보다 CD4⁺ T세포, CD8⁺ T세포의 수를 유의적으로 증가시켜 종양형성 억제효과가 높았음을 확인하였다.
- [293] 종양성장을 억제하기 위해서는 종양에 침윤된 적응 면역세포인 CD4⁺ T세포와 CD8⁺ T세포 수의 증가가 중요하다는 보고(Schreiber et al., 2011)를 근거로 mono-mIL-12-Fc가 종양에 침윤된 적응 면역세포의 수를 증가시켰는지를 분석하였다. Mono-mIL-12-Fc를 6번의 투여하였을 때 종양이 없는 마우스가 많았으므로 3번 투여 후 마우스의 종양에 침윤된 면역세포의 수를 분석하였다.
- [294] 도 22(B)는 상기 도 21(A)의 3번째 투여 3일 후에 마우스를 치사하여 종양에 침윤되어 있는 총 면역세포, CD4⁺ T세포 및 CD8⁺ T세포의 수를 나타낸 결과이다.
- [295] 구체적으로, 21(A)과 같이 처리한 후 종양이식 24일째에 마우스의 종양을 적출하여 무게를 측정한 후, 페트리디쉬에서 철망과 collagenase (100 µg/ml)을 이용해 분쇄한 다음 2%의 FBS가 포함된 배지 10 ml를 넣어 50 g에서 5분간 원심분리하여 실질조직을 제거하였다. 그 후, 적혈구 용혈버퍼 (red blood cell

lysis buffer)를 1 ml 넣어 적혈구를 용혈시킨 다음 PBS로 세척하여 세포 혼탁액을 준비하고 헤모사이토미터로 세포의 수를 계수하였다. 종양에서 분리한 세포를 APC, FITC 또는 PE-cy5가 결합된 CD45, CD3, CD4 및 CD8를 인지하는 항체를 넣어 4°C에서 30분간 염색하고 차가운 PBS(pH 7.4)로 세척한 다음 유세포 분석기인 FACS Calibur (BD Bioscience)와 Flow jo(Thermo Fisher Scientific)로 분석하였다. 각각의 샘플을 닷플롯(dot plot)으로 분석한 후 CD45+ 세포군, CD45+CD3+CD4+ 세포군 및 CD45+CD3+CD8+ 세포군 및 CD45+CD3+CD49b+ 세포군을 각각 총 종양침윤면역세포, 종양침윤 CD4+ T세포 및 종양침윤 CD8+ T세포로 정의하였다. 전체 종양에서 분리한 세포에 대한 이들 세포의 비율을 구하여 헤모사이토미터로 계수된 세포의 수를 곱한 다음 mono-mIL-12-Fc 투여 후 증가된 총 종양침윤면역세포, 종양침윤 CD4+ T세포 및 종양침윤 CD8+ T세포의 수를 분석하였다.

- [296] 그 결과, 대조군에 비해 bi-mIL-12-Fc와 mono-mIL-12-Fc는 종양이 이식된 마우스에서 농도의존적으로 종양에 침윤된 총 면역세포와 CD4+ T세포, CD8+ T세포의 수를 증가시켰음을 확인할 수 있었다. 같은 물 농도의 투여군에서 mono-mIL-12-Fc는 bi-mIL-12-Fc보다 유의적으로 종양에 침윤된 총 면역세포와 CD4+ T세포, CD8+ T세포의 수를 증가시켰다. 따라서 mono-mIL-12-Fc는 bi-mIL-12-Fc보다 종양에 침윤된 CD4+ T세포, CD8+ T세포의 수를 유의적으로 증가시켜 종양형성 억제효과가 높았음을 확인하였다.
- [297]
- [298] 실시예 17: Mono-mIL-12-Fc의 생체 내 면역세포의 사이토카인 분비 및 세포독성증진 기능 평가
- [299] IL-12는 T 세포와 NK 세포의 IFN- γ 분비를 증가시켜 암세포의 성장을 억제시키는 것으로 알려져 있다 (Trinchieri, 2003). 또한 IL-12는 세포독성 T세포와 자연살해세포의 암세포에 대한 직접적인 세포독성효과를 증진시켜 항암효과를 나타낸다. 따라서 Mono-IL-12-Fc의 높은 항암효과가 종양을 이식한 마우스의 혈중 IFN- γ 농도 증가와 세포독성 T세포 및 자연살해세포의 암세포에 대한 직접적인 세포독성효과 증진에 의한 것인지를 분석하였다.
- [300] 도 23(A)는 상기 도 21(A)의 마지막 투여 24시간 후에 마우스의 얼굴 정맥에서 채혈하여 분리한 혈청내의 IFN- γ 농도를 ELISA로 측정한 결과이다.
- [301] 구체적으로는, 도 20(A)에서의 마지막 mIL-12-Fc 용합단백질 투여 24시간 뒤, 마우스의 얼굴 정맥에서 채혈하였다. 혈액은 2시간 동안 실온에 방치 하여 혈액응고를 유도한 후 8000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층의 혈청을 회수하였다. 혈청 내 IFN- γ 농도를 측정하기 위하여 ELISA용 96-웰 플레이트(Thermo Fisher Scientific)에 마우스 IFN- γ 포획 항체를 12시간 동안 코팅한 후, PBST (PBS with 0.1% Tween-20)으로 세척 후, 1% BSA (PBS with 1% bovine serum albumin)를 넣고 1시간 동안 실온에서 blocking하였다. PBST (PBS with 0.1% Tween-20)으로 세척 후, 혈청을 1% BSA로 10배 희석하여 실온에서

2시간 동안 반응시켰다. PBST (PBS with 0.1% Tween-20)으로 세척 후, biotin이 결합된 마우스 IFN- γ 검출 항체(Thermo Fisher Scientific)를 실온에서 1시간 동안 결합시켰다. PBST (PBS with 0.1% Tween-20)으로 세척 후, avidin이 결합된 HRP (Thermo Fisher Scientific)를 실온에서 30분간 결합시킨 다음 PBST (PBS with 0.1% Tween-20)로 세척 후, TMB (Sigma-Aldrich Korea)기질을 넣어 마이크로플레이트 리더를 이용하여 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 도 23(A)에 나타낸 바와 같이 bi-mIL-12-Fc를 투여한 마우스의 혈청 내 IFN- γ 농도는 대조군에 비해 증가되지 않았다. 그러나 1 μ g IL-12와 같은 몰 농도까지 mono-mIL-12-Fc를 투여한 마우스의 혈청 내 IFN- γ 농도는 대조군에 비해 농도의존적으로 증가됨을 관찰하였고 mono-mIL-12-Fc의 종양생성 억제효과는 일부 암세포 증식억제 효과를 가지는 것으로 알려진 IFN- γ 의 분비를 증가시켰기 때문임을 확인하였다.

- [302] 종양을 이식한 마우스에서 bi-mIL-12-Fc가 NK세포와 T세포에 의한 IFN- γ 의 분비를 유도하는 능력이 낮아서 도 23(A)에서 bi-mIL-12-Fc를 투여한 마우스의 혈중 IFN- γ 의 농도가 낮았는지를 규명하기 위해 mono-mIL-12-Fc와 bi-mIL-12-Fc를 한 번만 투여한 후 시간 별로 혈중 IFN- γ 의 농도를 측정하였다.
- [303] 도 23(B)는 CT26^{HER2/Neu} 대장암 세포를 이식한 Balb/c 마우스에 bi-mIL-12-Fc와 mono-mIL-12-Fc를 1회 복강 투여한 후 시간 별로 혈청내의 IFN- γ 농도를 ELISA로 측정한 결과이다.
- [304] 구체적으로는, CT26^{HER2/Neu} 대장암 세포를 이식한 Balb/c 마우스에서 종양의 크기가 300 mm³일 때 1 μ g mIL-12와 같은 몰 농도의 bi-mIL-12-Fc와 mono-mIL-12-Fc를 복강 투여하였다. 1일, 3일 및 5일 후에 마우스의 얼굴 정맥에서 채혈하였다. 혈액은 2시간 동안 실온에 방치 하여 혈액응고를 유도한 후 8000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층의 혈청을 회수하였다. 혈청 내 IFN- γ 농도를 측정하기 위하여 ELISA용 96-웰 플레이트(Thermo Fisher Scientific)에 마우스 IFN- γ 포획 항체를 12시간 동안 코팅한 후, PBST (PBS with 0.1% Tween-20)으로 세척 후, 1% BSA (PBS with 1% bovine serum albumin)를 넣고 1시간 동안 실온에서 blocking하였다. PBST (PBS with 0.1% Tween-20)으로 세척 후, 혈청을 1% BSA로 10배 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. PBST (PBS with 0.1% Tween-20)으로 세척 후, biotin이 결합된 마우스 IFN- γ 검출 항체(Thermo Fisher Scientific)를 실온에서 1시간 동안 결합시켰다. PBST (PBS with 0.1% Tween-20)으로 세척 후, avidin이 결합된 HRP (Thermo Fisher Scientific)를 실온에서 30분간 결합시킨 다음 PBST (PBS with 0.1% Tween-20)로 세척 후, TMB (Sigma-Aldrich Korea)기질을 넣어 마이크로플레이트 리더를 이용하여 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 도 23(B)에 나타낸 바와 같이 종양을 이식한 마우스에서 bi-mIL-12-Fc 투여군은 5일째까지 mono-mIL-12-Fc 투여군과 비슷한 혈중 IFN- γ 의 농도를 보여 bi-mIL-12-Fc가 효과세포에서 IFN- γ 의 분비를 유도하는 능력에 대한 본질적 결함은 없는 것으로 나타났다.

- [305] 도 23(C)는 상기 도 21(A)의 마지막 투여 3일 후에 마우스를 치사하여 비장에서 분리한 세포독성 T 세포의 CT26^{HER2/Neu} 암세포에 대한 세포독성효과를 측정된 그래프이다.
- [306] 구체적으로는, 도 21(A)에서의 마지막 사이토카인 투여 후 72시간 뒤, 마우스를 치사하고 비장을 적출한 다음 70 마이크론 메쉬를 넣은 60 mm 접시에 비장과 PBS를 넣고 분쇄하였다. 원심분리 하여 얻은 세포에 적혈구 용혈 완충액을 넣어 적혈구를 용혈 시킨 후 PBS로 세척하고 CD3를 인지하는 APC가 결합된 항체 (Thermo Fisher Scientific), CD8을 인지하는 PE가 결합된 항체 (Thermo Fisher Scientific)를 넣어 4°C에서 30 분간 반응시켰다. PBS로 세척 후, 세포독성 T 세포 (CD3⁺CD8⁺)를 FACS Aria III (BD biosciences, Korea)로 분리하였다. 세포독성 T 세포의 표적세포인 CT26^{HER2/Neu} 암세포에 대한 세포독성효과를 측정하기 위하여 CT26^{HER2/Neu} 암세포는 calcein AM (Thermo Fisher Scientific Inc., 10 μ M)으로 염색하였다. CT26^{HER2/Neu} 암세포(2×10^6)를 2 ml의 DPBS에 현탁 시킨 후 calcein AM (10 mM) 2 μ l를 넣고 섞은 다음 5 % CO₂, 37°C 조건에서 45 분간 반응시켰다. 10% FBS가 첨가된 RPMI1640을 10 ml 넣어 3번 세척한 다음 96웰 플레이트에 각 웰 당 2×10^4 개의 세포를 넣고 세포독성 T 세포 (1×10^5 /100 μ l/well)를 각각 넣어 5 % CO₂, 37°C 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 녹색 형광을 내는 살아있는 CT26^{HER2/Neu} 암세포와 녹색 형광을 내지 않는 죽은 CT26^{HER2/Neu} 암세포를 유세포 분석기로 분석하여 세포독성 T세포의 세포독성 효과를 백분율로 표시하였다. Mono-mIL-12-Fc를 투여한 중양이식 마우스에서 분리한 세포독성 T세포는 bi-mIL-12-Fc를 투여한 중양이식 마우스에서 분리한 세포독성 T세포나 대조군에서 분리한 세포독성 T세포보다 표적세포인 CT26^{HER2/Neu} 암세포에 대한 세포독성효과가 높았으며 mono-mIL-12-Fc의 종양생성 억제효과는 일부 세포독성 T세포에 의한 암세포의 직접적인 세포독성효과임을 확인하였다.
- [307] 도 23(D)는 중양이식 마우스에서 mono-IL-12-Fc의 투여에 의해 증진된 세포독성 T 세포의 세포독성효과가 암 항원특이적인 것인지를 측정하기 위해 도 21(A)의 3번째 투여 3일 후에 마우스를 치사하여 비장에서 분리한 세포독성 T 세포의 세포독성효과를 종양항원을 발현하는 CT26^{HER2/Neu} 암세포와 발현하지 않는 4T1세포를 이용하여 측정된 결과이다.
- [308] 구체적으로는, 도 20(A)에서 mono-IL-12-Fc의 3회 투여 72시간 뒤, 마우스를 치사하고 비장을 적출한 다음 70 마이크론 메쉬를 넣은 60 mm 접시에 비장과 PBS를 넣고 비장을 분쇄하였다. 세포독성 T 세포의 표적세포인 CT26^{HER2/Neu} 암세포와 세포독성 T세포의 표적세포가 아닌 4T1에 대한 세포독성효과를 측정하기 위하여 도 21(C)와 같은 방법으로 CT26^{HER2/Neu} 암세포와 4T1 암세포를 calcein AM (Thermo Fisher Scientific Inc., 10 μ M)으로 염색하였다. 10% FBS가 첨가된 RPMI1640을 10 ml 넣어 3번 세척한 다음 96웰 플레이트에 각 웰 당 2×10^4 개의 세포를 넣고 세포독성 T 세포 (1×10^5 /100 μ l/well)를 각각 넣어 5 % CO₂, 37°C 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 녹색 형광을 내는 살아있는 CT26^{HER2/Neu}

암세포 또는 4T1 암세포와 녹색 형광을 내지 않는 죽은 CT26^{HER2/Neu} 암세포 또는 4T1 암세포를 유세포 분석기로 분석하여 세포독성 T 세포의 세포독성 효과를 백분율로 표시하였다. 분석결과 mono-mIL-12-Fc의 투여에 의해 증진된 세포독성 T세포의 세포독성 효과는 표적세포 특이적임을 확인하였다.

- [309] 도 23(E)는 상기 도 21(A)의 3번째 투여 3일 후에 마우스를 치사하여 비장에서 분리한 자연살해세포의 CT26^{HER2/Neu} 암세포에 대한 세포독성 효과를 측정 한 결과이다.
- [310] 구체적으로는, 도 21(A)에서의 3번째 투여 3일 후에, 마우스를 치사하고 비장을 적출한 다음 70 마이크론 메쉬를 넣은 60 mm 접시에 비장과 PBS를 넣고 분쇄하였다. 원심분리 하여 얻은 세포에 적혈구 용혈 완충액을 넣어 적혈구를 용혈 시킨 후 PBS로 세척하고 CD3를 인지하는 APC가 결합된 항체 (Thermo Fisher Scientific), CD49b를 인지하는 PE가 결합된 항체 (Thermo Fisher Scientific)를 넣어 4°C에서 30 분간 반응시켰다. PBS로 세척 후, 자연살해 세포 (CD3⁺CD49b⁺)를 FACS Aria III (BD biosciences, Korea)로 분리하였다. 자연살해 세포의 표적세포인 CT26^{HER2/Neu} 암세포에 대한 세포독성효과를 측정하기 위하여 CT26^{HER2/Neu} 암세포는 calcein AM (Thermo Fisher Scientific Inc., 10 µM)으로 염색하였다. CT26^{HER2/Neu} 암세포(2×10^6)를 2 ml의 DPBS에 현탁 시킨 후 calcein AM (10 mM) 2 µl를 넣고 섞은 다음 5 % CO₂, 37°C 조건에서 45 분간 반응시켰다. 10% FBS가 첨가된 RPMI1640을 10 ml 넣어 3번 세척한 다음 96웰 플레이트에 각 웰 당 2×10^4 개의 세포를 넣고 자연살해 세포 (1×10^5 /100 µl/well)를 각각 넣어 5 % CO₂, 37°C 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 녹색 형광을 내는 살아있는 CT26^{HER2/Neu} 암세포와 녹색 형광을 내지 않는 죽은 CT26^{HER2/Neu} 암세포를 유세포 분석기로 분석하여 자연살해 세포의 세포독성 효과를 백분율로 표시하였다. Mono-mIL-12-Fc를 투여한 종양이식 마우스에서 분리한 자연살해 세포는 bi-mIL-12-Fc를 투여한 종양이식 마우스에서 분리한 자연살해 세포나 대조군에서 분리한 세포독성 T세포보다 표적세포인 CT26^{HER2/Neu} 암세포에 대한 세포독성효과가 높았으며 mono-mIL-12-Fc의 종양생성 억제효과는 일부 자연살해 세포에 의한 암세포의 직접적인 세포독성효과임을 확인하였다.
- [311]
- [312] 실시예 18: 생체 내에서 mono-mIL-12-Fc의 효과 CD8⁺ T세포 및 기억 CD8⁺ T세포 형성능 평가
- [313] 종양을 이식한 마우스에서 적응면역의 생성은 효과 기억 CD8⁺ T세포 및 기억 CD8⁺ T세포 형성여부로 평가된다. Mono-mIL-12-Fc에 의한 종양제거효과가 효과 기억 CD8⁺ T세포 및 기억 CD8⁺ T세포 형성에 의한 것인지를 측정하였다.
- [314] 도 24(A), 24(B) 및 24(C)는 각각 종양을 가진 마우스에 mono-mIL-12-Fc를 투여 하였을 때 생성된 효과 CD8⁺ T세포, 효과 기억 CD8⁺ T세포 및 기억 CD8⁺ T세포의 수를 측정한 결과이다.
- [315] 구체적으로, 21(A)과 같이 처리한 후 종양이식 34일째에 마우스의 비장을

적출하여 페트리디쉬에서 철망을 이용해 분쇄한 다음 2%의 FBS가 포함된 배지 10 ml로 세척한 후, 적혈구 용혈버퍼 (red blood cell lysis buffer)를 1 ml 넣어 적혈구를 용혈시킨 다음 PBS로 세척하여 비장세포 혼탁액을 준비하고 헤모사이토미터로 세포의 수를 계수하였다. 비장세포를 PE-cy5, PE, FITC 또는 APC가 결합된 CD3, CD8, CD62L 및 IL-7 receptor(IL-7R)를 인지하는 항체를 넣어 4°C에서 30분간 염색하고 차가운 PBS(pH 7.4)로 세척한 다음 유세포 분석기인 FACS Calibur (BD Bioscience)와 Flow jo(Thermo Fisher Scientific)로 분석하였다. 각각의 샘플을 닷플롯(dot plot)으로 분석하여 CD3+CD8+CD62L^{low}IL-7R^{low} 세포군, CD3+CD8+CD62L^{low}IL-7R^{hi} 세포군 및 CD3+CD8+CD62L^{hi}IL-7R^{hi} 세포군을 각각 효과 CD8⁺ T세포, 효과 기억 CD8⁺ T세포 및 기억 CD8⁺ T세포로 정의하여 전체 비장세포에 대한 비율을 구하고 헤모사이토미터로 계수된 세포의 수를 곱하여 mono-mIL-12-Fc 투여 후 증가된 효과 CD8⁺ T세포, 효과 기억 CD8⁺ T세포 및 기억 CD8⁺ T세포의 수를 분석하였다. 그 결과, 대조군에 비해 mono-mIL-12-Fc는 종양이 이식된 마우스에서 농도의존적으로 효과 기억 CD8⁺ T세포 및 기억 CD8⁺ T세포의 수를 증가시켰음을 확인할 수 있었다. 반면, bi-mIL-12-Fc는 0.5 µg IL-12와 같은 물 농도를 투여한 군에서만 효과 기억 CD8⁺ T세포 및 기억 CD8⁺ T세포의 수를 증가시켰고, 1 µg IL-12와 같은 물 농도를 투여한 군에서는 효과 기억 CD8⁺ T세포 및 기억 CD8⁺ T세포의 수를 증가시키지 못했다. 따라서 mono-mIL-12-Fc는 bi-mIL-12-Fc보다 효과 기억 CD8⁺ T세포 및 기억 CD8⁺ T세포의 수를 유의적으로 증가시켜 종양제거효과가 높았음을 확인하였다.

[316] 도 24(D)는 상기 도 21(A)에서 1µg mono-IL-12-Fc의 투여 120일 후에 생존한 마우스에 CT26^{HER2/Neu} 암세포를 재이식하여 마우스의 종양 부피의 변화를 측정한 결과이다.

[317] 구체적으로, 도 21(A)에서 1µg mono-IL-12-Fc의 투여 후 생존한 마우스와 주령이 일치하는 암컷 Balb/c 마우스(NARA Biotech, Korea)에 마지막 1µg mono-IL-12-Fc를 투여한지 120일째에 마우스의 털을 면도기로 제거하고 CT26^{HER2/Neu} 세포 (1×10⁶ 세포/마우스)를 150 µL PBS에 희석하여 마우스 피하에 이식하였다. 그 후, 추가적인 1µg mono-IL-12-Fc의 투여 없이 종양을 일주일에 2회씩 측정하고, 종양의 부피 (V)는 $V = \text{길이} \times \text{폭}^2 / 2$ 로 계산하였다. 그 결과, 대조군에 비해 1µg mono-mIL-12-Fc의 투여 후 살아남은 마우스는 11일째부터 종양이 제거된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 종양이식 마우스에 mono-mIL-12-Fc를 투여하면 효과 기억 CD8⁺ T세포 및 기억 CD8⁺ T세포를 생성하여 다시 같은 종양을 재이식하더라도 종양을 제거하는 것으로 확인되었다.

[318]

[319] 실시예 19: 생체 내에서 mono-mIL-12-Fc의 기억전구 효과 CD8⁺ T세포 형성능력 평가

[320] 실시예 16과 실시예 18에서 bi-mIL-12-Fc는 mono-mIL-12-Fc에 비해 종양을

이식한 마우스에서 비장 CD8⁺ T세포의 수, 효과 기억 CD8⁺ T세포의 수 및 중심 기억 CD8⁺ T세포의 수를 증가시키는 효과가 낮음을 관찰하였다. 활성화된 CD8⁺ T세포들이 종양세포를 직접 파괴하는 과정(effector phase)이 지나면 효과 CD8⁺ T세포는 일부만 기억전구효과세포(memory precursor effector cells, MPEC)를 거쳐 기억 CD8⁺ T세포로 분화되고 대부분 단명효과세포(short-lived effector cells, SLEC)로서 죽는 것으로 보고되어 있다. 따라서 bi-mIL-12-Fc의 투여로 활성화된 CD8⁺ T세포들이 단명효과세포로 분화되었기 때문에 기억 CD8⁺ T세포의 수가 적게 생성되어 종양을 제거하지 못하였는지를 측정하였다.

- [321] 도 24(E)는 상기 도 21(A)의 3번째 투여 3일 후에 마우스를 치사하여 비장에 존재하는 CD8⁺ T세포 중 기억전구효과세포(KLRG1⁺IL-7R⁺)와 단명효과세포(KLRG1⁺IL-7R⁻)의 비율을 분석한 결과이다.
- [322] 구체적으로, 21(A)과 같이 처리한 후 종양이식 24일째에 마우스의 비장을 적출한 후, 페트리디쉬에서 철망을 이용해 분쇄한 다음 2%의 FBS가 포함된 배지 10 ml를 넣어 세척하였다. 그 후, 적혈구 용혈버퍼(red blood cell lysis buffer)를 1 ml 넣어 적혈구를 용혈시킨 다음 PBS로 세척하여 세포 혼탁액을 준비하였다. 비장세포를 PE-cy5, PE, FITC 또는 APC가 결합된 CD3, CD8, KLRG1 및 IL-7 receptor(IL-7R)를 인지하는 항체를 넣어 4°C에서 30분간 염색하고 차가운 PBS(pH 7.4)로 세척한 다음 유세포 분석기인 FACS Calibur (BD Bioscience)와 Flow jo(Thermo Fisher Scientific)로 분석하였다. 각각의 샘플을 닷플롯(dot plot)으로 분석하여 CD3⁺CD8⁺KLRG1⁺IL-7R⁺ 세포군과 CD3⁺CD8⁺KLRG1⁺IL-7R⁻ 세포군을 각각 기억전구효과세포와 단명효과세포로 정의하여 전체 비장세포에 대한 비율을 분석하였다. 그 결과, 대조군에 비해 mono-mIL-12-Fc는 종양이 이식된 마우스에서 농도의존적으로 기억전구효과세포의 비율을 증가시켰음을 확인할 수 있었다. 반면, bi-mIL-12-Fc의 투여는 대조군에 비해 기억전구효과세포의 비율은 증가시키지 못했고 오히려 단명효과 세포의 수를 증가시켰다. 따라서 mono-mIL-12-Fc는 bi-mIL-12-Fc보다 기억전구세포의 생성을 촉진하여 효과 기억 CD8⁺ T세포 및 기억 CD8⁺ T세포의 수를 유의적으로 증가시켜 종양제거효과가 높았음을 확인하였다.
- [323]
- [324] 실시예 20: Mono-mIL-12-Fc가 기억세포 분화유도에 관계된 전사인자의 발현에 미치는 영향 평가
- [325] CD8⁺ T세포에 높은 농도의 IL-12를 투여하거나 2일이상 지속적으로 IL-12를 주면서 활성화시키면 CD8⁺ T세포를 단명효과세포로 분화시키는 전사인자인 T-bet의 발현이 높아지고 기억전구효과세포로 분화시키는 전사인자인 eomesodermin(Eomes)의 발현이 감소되는 것으로 보고되어 있다. 따라서 mono-mIL-12-Fc와 bi-mIL-12-Fc가 CD8⁺ T세포에서 T-bet과 Eomes의 발현을 다르게 조절하여 단명효과세포로 분화되는 비율이 달라졌는지를 측정하였다.
- [326] 도 25(A)와 25(B)는 상기 도 21(A)의 3번째 투여 3일 후에 마우스를 치사하여

비장에서 기억세포의 분화를 억제하는 T-bet의 발현이 높은 CD8⁺ T세포의 비율과 기억세포의 분화를 촉진하는 Eomes의 발현이 높고 T-bet의 발현이 낮은 CD8⁺ T세포의 비율을 유세포 분석기로 측정하여 분석한 결과이다.

- [327] 구체적으로, 21(A)과 같이 처리한 후 종양이식 24일째에 마우스의 비장을 적출한 후, 페트리디쉬에서 철망을 이용해 분쇄한 다음 2%의 FBS가 포함된 배지 10 ml를 넣어 세척하였다. 그 후, 적혈구 용혈버퍼 (red blood cell lysis buffer)를 1 ml 넣어 적혈구를 용혈 시킨 다음 PBS로 세척하여 세포 혼탁액을 준비하였다. 비장세포를 PE-cy5 또는 FITC가 결합된 CD3와 CD8를 인지하는 항체를 넣어 4°C에서 30분간 염색하고 차가운 PBS(pH 7.4)로 세척한 다음 핵내에 전사인자를 염색하는 시약인 Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 세포를 고정(fixation)하고 투과(permeabilization)시킨 다음 PE 또는 efluor 660이 결합된 T-bet 또는 Eomes를 인지하는 항체를 넣어 4°C에서 30분간 염색한 다음 투과버퍼(permeabilization buffer)를 넣어 유세포 분석기인 FACS Calibur (BD Bioscience)와 Flow jo(Thermo Fisher Scientific)로 분석하였다. 각각의 샘플을 닷플롯(dot plot)으로 분석하여 CD3⁺CD8⁺T-bet^{high} 세포군과 CD3⁺CD8⁺Eomes⁺T-bet^{low} 세포군의 비율을 분석하였다. 그 결과, 대조군에 비해 mono-mIL-12-Fc는 종양이 이식된 마우스에서 농도의존적으로 CD3⁺CD8⁺T-bet^{high} 세포군의 비율은 감소시키고, CD3⁺CD8⁺Eomes⁺T-bet^{low} 세포군의 비율을 증가시켰음을 확인할 수 있었다. 반면 bi-mIL-12-Fc는 0.5 µg IL-12와 같은 몰 농도를 투여한 군에서만 CD3⁺CD8⁺T-bet^{high} 세포군의 비율은 감소시키고, CD3⁺CD8⁺Eomes⁺T-bet^{low} 세포군의 비율을 증가시켰고, 1 µg IL-12와 같은 몰 농도를 투여한 군에서는 CD3⁺CD8⁺T-bet^{high} 세포군의 비율은 감소시키거나 CD3⁺CD8⁺Eomes⁺T-bet^{low} 세포군의 비율을 증가시키는 효과가 없었다. 따라서 mono-mIL-12-Fc는 bi-mIL-12-Fc보다 CD3⁺CD8⁺T-bet^{high} 세포군의 비율은 감소시키고, CD3⁺CD8⁺Eomes⁺T-bet^{low} 세포군의 비율을 증가시켜 효과 기억 CD8⁺ T세포 및 기억 CD8⁺ T세포의 수를 유의적으로 증가시켜 종양제거효과가 높았음을 확인하였다.

- [328] CD8⁺ T 세포는 T 세포 수용체 신호와 공동자극신호의 존재 하에서 IL-12와 같은 염증성 사이토카인으로 자극하면 STAT4의 인산화가 증가되고 인산화된 STAT4 (pSTAT4)는 핵 내부로 이동하여 T-bet enhancer에 결합하여 T-bet의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 1 µg IL-12와 같은 몰 농도의 bi-mIL-12-Fc를 투여하였을 때 CD8⁺ T세포가 단명화세포로 분화되는 것이 1 µg IL-12와 같은 몰 농도의 bi-mIL-12-Fc를 투여하면 mono-mIL-12-Fc보다 종양을 이식한 마우스의 종양주위 림프절(tumor draining lymph node)인 사타구니림프절에서 CD8⁺ T세포가 활성화될 때 pSTAT4와 T-bet의 발현을 증가시켰기 때문인지를 측정하였다.

- [329] 도 25(C)는 CT26^{HER2/Neu} 이식 Balb/c 마우스에서 종양의 크기가 300 mm³일 때 1 µg rmIL-12와 같은 몰 농도의 bi-mIL-12-Fc와 mono-mIL-12-Fc의 1회 복강 투여

24시간 후에 사타구니 림프절에서 분리한 CD8⁺ T 세포에서 인산화된 STAT4의 발현양을 유세포 분석기로 측정한 결과이다.

- [330] 구체적으로, 도 23(B)와 같이 CT26^{HER2/Neu} 대장암세포를 이식한 Balb/c 마우스에서 종양의 크기가 300 mm³일 때 1μg mIL-12와 같은 물 농도의 bi-mIL-12-Fc와 mono-mIL-12-Fc를 복강 투여하였다. 24시간 후에 마우스의 사타구니 림프절을 적출한 후, 페트리디쉬에서 철망을 이용해 분쇄한 다음 2%의 FBS가 포함된 배지 10 ml를 넣어 세척하였다. 그 후, 적혈구 용혈버퍼 (red blood cell lysis buffer)를 1 ml 넣어 적혈구를 용혈 시킨 다음 PBS로 세척하여 세포 혼탁액을 준비하였다. 사타구니 림프절세포를 PE-cy5 또는 FITC가 결합된 CD3와 CD8를 인지하는 항체를 넣어 4°C에서 30분간 염색하고 차가운 PBS(pH 7.4)로 세척한 다음 차가운 메탄올을 넣어 고정(fixation)하였다. 그 후 사타구니 림프절 세포를 차가운 PBS(pH 7.4)로 세척한 다음 APC가 결합된 pSTAT4를 인지하는 항체를 넣어 4°C에서 30분간 염색하고 차가운 PBS(pH 7.4)로 세척한 후 유세포 분석기인 FACS Calibur (BD Bioscience)와 Flow jo(Thermo Fisher Scientific)로 분석하였다. 각각의 샘플을 닷플랏(dot plot)으로 분석하여 CD3⁺CD8⁺ T 세포에 발현된 pSTAT4의 양을 비교하였다. 그 결과, mono-mIL-12-Fc에 비해 bi-mIL-12-Fc는 종양이 이식된 마우스의 사타구니 림프절에서 CD8⁺ T 세포가 활성화될 때 pSTAT4의 발현을 증가시키는 효과를 보였다.
- [331] 도 25(D)는 도 25(C)의 1회 복강투여 72시간 후에 사타구니 림프절에서 기억세포의 분화를 억제하는 T-bet을 발현하는 CD8⁺ T 세포의 비율을 유세포 분석기로 측정한 결과이다.
- [332] 구체적으로, 도 23(B)와 같이 CT26^{HER2/Neu} 대장암세포를 이식한 Balb/c 마우스에서 종양의 크기가 300 mm³일 때 1μg mIL-12와 같은 물 농도의 bi-mIL-12-Fc와 mono-mIL-12-Fc를 복강 투여하였다. 72시간 후에 마우스의 사타구니 림프절을 적출한 후, 페트리디쉬에서 철망을 이용해 분쇄한 다음 2%의 FBS가 포함된 배지 10 ml를 넣어 세척하였다. 그 후, 적혈구 용혈버퍼 (red blood cell lysis buffer)를 1 ml 넣어 적혈구를 용혈 시킨 다음 PBS로 세척하여 세포 혼탁액을 준비하였다. 사타구니 림프절세포를 PE-cy5 또는 FITC가 결합된 CD3와 CD8를 인지하는 항체를 넣어 4°C에서 30분간 염색하고 차가운 PBS(pH 7.4)로 세척한 다음 핵내에 전사인자를 염색하는 시약인 Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 세포를 고정(fixation)하고 투과(permeabilization)시켰다. 그 후, PE 또는 APC가 결합된 T-bet을 인지하는 항체를 넣어 4°C에서 30분간 염색한 다음 투과버퍼(permeabilization buffer)를 넣어 유세포 분석기인 FACS Calibur (BD Bioscience)와 Flow jo(Thermo Fisher Scientific)로 분석하였다. 각각의 샘플을 닷플랏(dot plot)으로 분석하여 T-bet을 발현하는 CD3⁺CD8⁺ T 세포의 비율을 비교하였다. 그 결과, mono-mIL-12-Fc에 비해 bi-mIL-12-Fc는 종양이 이식된 마우스의 사타구니 림프절에서 CD8⁺ T 세포가 활성화될 때 T-bet의 발현을

증가시키는 효과를 보였다. 따라서 1 μ g IL-12와 같은 물 농도의 bi-mIL-12-Fc를 투여하였을 때 CD8+ T세포가 단명효과세포로 분화되는 것은 mono-mIL-12-Fc보다 종양을 이식한 마우스의 종양주위 림프절(tumor draining lymph node)인 사타구니림프절에서 CD8+ T세포가 활성화될 때 pSTAT4와 T-bet의 발현을 증가시켰기 때문임을 확인하였다.

- [333] 도 25(E)와 도 25(F)는 한 분자에서 2분자의 IL-12를 발현하는 bi-mIL-12-Fc처럼 mono-mIL-12-Fc를 Fc를 인지하는 항체로 교차결합시켜 2분자의 IL-12에 의해 CD8+ T세포가 자극을 받도록 하면 bi-mIL-12-Fc를 처리했을 때와 비슷한 수준으로 pSTAT4와 T-bet의 발현이 증가되는지를 측정한 결과이다.
- [334] 구체적으로는, 정상 Balb/c 마우스에서 비장과 사타구니 림프절을 적출한 후, 페트리디쉬에서 절망을 이용해 분쇄한 다음 2%의 FBS가 포함된 배지 10 ml를 넣어 세척하였다. 그 후, 적혈구 용혈버퍼 (red blood cell lysis buffer)를 1 ml 넣어 적혈구를 용혈 시킨 다음 PBS로 세척하여 세포 혼탁액을 준비하였다. 림프구세포를 PE 가 결합된 CD8를 인지하는 항체를 넣어 4°C에서 30분간 염색하고 차가운 PBS(pH 7.4)로 세척한 다음 anti-PE microbeads(Miltenyi Biotec)를 15분간 결합시켜 MACS separator와 LS column(Miltenyi Biotec)을 이용하여 CD8+ T 세포를 분리하였다. 0.5 μ g/ml의 CD3를 인지하는 항체를 100 μ l씩 넣어 4°C에서 12시간 배양한 96-well round bottom plate를 PBS로 세척하여 플레이트에 부착되지 않은 CD3를 인지하는 항체를 제거하고 2 μ g/ml의 CD28을 인지하는 항체를 50 μ l씩 넣었다. 그 후 mono-mIL-12-Fc와 bi-mIL-12-Fc를 여러 농도의 Fc를 인지하는 항체와 4°C에서 30분간 반응시킨 다음 20 pM IL-12와 같은 농도가 되도록 첨가하였다. 그 후, CD8+ T 세포(4×10^4 /well)를 넣고 37°C의 세포배양기에서 pSTAT4의 발현을 측정하기 위해서는 3시간, T-bet의 발현을 측정하기 위해서는 3일간 배양하였다. pSTAT4와 T-bet의 발현은 각각 도 25(C)와 도 25(D)의 방법으로 염색한 다음 유세포 분석기인 FACS Calibur(BD Bioscience)와 Flow jo(Thermo Fisher Scientific)로 분석하였다. 각각의 샘플을 닷플롯(dot plot)으로 분석하여 CD8+ T 세포에 발현된 pSTAT4 또는 T-bet의 양을 비교하였다. 그 결과, mono-mIL-12-Fc를 Fc를 인지하는 항체로 교차결합시켜 2분자의 IL-12에 의해 CD8+ T세포가 자극을 받도록 하면 bi-mIL-12-Fc를 처리했을 때와 비슷한 수준으로 pSTAT4와 T-bet의 발현이 증가됨을 확인하였다.
- [335] 결론적으로, 도 26에 묘사한 바와 같이 mono-mIL-12-Fc는 bi-mIL-12-Fc에 비해 CD8+ T세포에서 pSTAT4와 T-bet의 발현을 적게 유도하여 CD8+ T세포가 기억전구효과세포로의 분화를 거쳐 효과기억세포 및 중심기억세포로 분화되도록 유도하므로 낮은 농도(0.5 μ g IL-12와 같은 물농도)에서도 종양을 이식한 마우스의 종양을 제거하여 마우스의 수명을 연장시킬 수 있다. 반면 bi-mIL-12-Fc는 CD8+ T세포에서 pSTAT4와 T-bet의 발현을 많이 유도하여 단명효과세포로 분화되도록 하고 기억세포로 분화되지 못하게 하므로

mono-mIL-12-Fc와 같은 물농도로 투여할 경우 종양을 이식한 마우스에서 종양이 완전히 제거되지 않으며 더 높은 농도(2 µg IL-12와 같은 물농도)를 투여하여 종양세포를 직접 파괴하는 과정(effector phase)에서 세포독성 CD8⁺ T세포들을 증식(expansion)시켜야 종양을 제거할 수 있다.

[336]

산업상 이용가능성

[337] 본 발명에 따른 항체 중쇄불변부위 이중이중체-융합단백질(heterodimeric Fc-fused protein)은 2 이상의 서브유닛이 단백질 복합체(protein complex)를 형성하여 생리활성 단백질을 자연계에 존재하는 형태를 최대한 모사함으로써, 자연계에 존재하는 그대로의 활성을 유지할 수 있으며, 또한, 상기 생리활성 단백질의 체내에서의 반감기가 현저하게 연장될 수 있는 장점이 있다.

[338] 또한, 본 발명에 따른 이중이중체-융합단백질(heterodimeric Fc-fused protein) 형태는 추가적인 정제 과정의 최적화 과정 없이 monovalent 형태의 이중이중체-융합단백질의 제조가 용이하다는 장점도 가진다.

[339]

[340] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[341]

서열목록 Free Text

[342] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

- [청구항 1] 항체(immunoglobulin) 중쇄불변부위 (Fc) 쌍의 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하고,
 상기 제1 Fc 영역 및/또는 제2 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단 중 하나 이상의 말단에 생리활성 단백질의 서브유닛이 결합되어 있는 항체 중쇄불변부위 이종이중체-융합단백질(heterodimeric Fc-fused protein)에 있어서,
 상기 생리활성 단백질은 2 이상의 서로 다른 서브유닛(subunit)으로 이루어져 있으며, 2 이상의 서로 다른 서브유닛(subunit)은 단백질 복합체(protein complex)를 형성하여 생리활성을 나타내는 것을 특징으로 하며,
 상기 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역은 이종이중체(heterodimeric Fc)의 형성이 촉진되도록 CH3 도메인이 변이된 것임을 특징으로 하는 항체 중쇄불변부위 이종이중체-융합단백질(heterodimeric Fc-fused protein).
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 상기 제1 Fc 영역 또는 제2 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단 중 어느 하나의 말단에만 생리활성 단백질의 서브유닛 중 하나가 결합되어 있고, 상기 생리활성 단백질의 나머지 서브유닛이 링커-매개된 형태로 상기 1 Fc 영역 또는 제2 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단 중 어느 하나의 말단에 결합된 생리활성 단백질의 서브유닛과 결합되어 있는 항체 중쇄불변부위 이종이중체-융합단백질.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단 각각에 1 종의 생리활성 단백질을 구성하는 서로 다른 하나 이상의 서브유닛(subunit)이 각각 결합되어 있는 항체 중쇄불변부위 이종이중체-융합단백질.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
 서로 다른 서브유닛이 1 종의 단백질 복합체(protein complex)를 형성하여 활성을 나타내는 생리활성 단백질은 인터루킨 12 (IL-12), 인터루킨 23 (IL-23), 인터루킨 27 (IL-27), 인터루킨 35 (IL-35) 및 난포자극호르몬(FSH)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 이종이중체-융합단백질.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
 서로 다른 서브유닛이 1 종의 단백질 복합체(protein complex)를 형성하여 활성을 나타내는 생리활성 단백질은 인터루킨 12 (IL-12)인 것을 특징으로 하는 항체 중쇄불변부위 이종이중체-융합단백질.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
 상기 제1 Fc 영역 또는 제2 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단 중 어느 하나의

- 말단에만 인터루킨 12 (IL-12)의 p35 또는 p40 서브유닛이 결합되어 있고, 나머지 서브유닛이 링커-매개된 형태로 상기 1 Fc 영역 또는 제2 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단 중 어느 하나의 말단에 결합된 서브유닛과 결합되어 있는 항체 중쇄불변부위 이중이중체-융합단백질.
- [청구항 7] 제5항에 있어서,
제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단 각각에 인터루킨 12 (IL-12)의 p35 및 p40 서브유닛이 각각 결합되어 있는 항체 중쇄불변부위 이중이중체-융합단백질.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역은 각각 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD 및 IgE로 이루어진 군으로부터 선택된 Fc 영역 유래인 것을 특징으로 하는 항체 중쇄불변부위 이중이중체-융합단백질.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD 및 IgE로 이루어진 완전한 항체(whole antibody) 형태에 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 항체 중쇄불변부위 이중이중체-융합단백질.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 제1 Fc 영역 또는 제2 Fc 영역의 CH3 도메인의 변이는 다음의 군에서 선택된 하나 이상의 변이를 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 중쇄불변부위 이중이중체-융합단백질. (단, 변이 위치는 EU index에 따름)
(1) 제1 Fc 영역의 CH3 도메인의 K370 위치에서의 K370E, K370R, K370M, K370D 또는 K370H의 아미노산 잔기의 치환;
(2) 제2 Fc 영역의 CH3 도메인의 E357 위치에서의 E357N, E357D, E357A, E357I, E357G 또는 E357M의 아미노산 잔기의 치환, 및 S364 위치에서의 치환은 S364T 또는 S364W의 아미노산 잔기의 치환;
(3) 제1 Fc 영역의 CH3 도메인의 K409 위치에서의 K409W의 아미노산 잔기의 치환; 및
(4) 제2 Fc 영역의 CH3 도메인의 F405 위치에서의 F405T 아미노산 잔기의 치환, 및 D399 위치에서의 D399V의 아미노산 잔기의 치환.
- [청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 제1 Fc 영역 또는 제2 Fc 영역의 CH3 도메인의 변이는 다음의 군에서 선택된 하나 이상의 변이를 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 중쇄불변부위 이중이중체-융합단백질. (단, 변이 위치는 EU index에 따름)
(1) 제1 Fc 영역의 CH3 도메인의 K360 위치에서의 K360E의 아미노산 잔기의 치환;
(2) 제2 Fc 영역의 CH3 도메인의 E347 위치에서의 E347R의 아미노산 잔기의 치환;
(3) 제1 Fc 영역의 CH3 도메인의 K409 위치에서의 K409W의 아미노산

잔기의 치환;

(4) 제2 Fc 영역의 CH3 도메인의 F405 위치에서의 F405T 아미노산 잔기의 치환, 및 D399 위치에서의 D399V의 아미노산 잔기의 치환.

- [청구항 12] 제10항 또는 제11항에 있어서,
상기 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역의 CH3 도메인 내에 하기의 결합을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 이중이중체-융합단백질. (단, 상기 위치는 EU index에 따름)
(1) 제1 Fc 영역의 CH3 도메인 내 Y349 위치에 치환된 시스테인 (C); 및
(2) 제2 Fc 영역의 CH3 도메인 내 S354 위치에 치환된 시스테인 (C)의 결합.
- [청구항 13] 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 항체 중쇄불변부위 이중이중체-융합단백질을 포함하는 약제학적 조성물.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 항체 중쇄불변부위 이중이중체-융합단백질 내에 포함된 생리활성 단백질은 인터루킨 12 (IL-12)인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,
암 치료를 위한 약제학적 조성물.
- [청구항 16] 제15항에 있어서,
상기 암은 대장암, 흑색종, 유방암, 췌장암, 신장암, 전립선암, 난소암, 소장암, 식도암, 자궁경부암, 폐암, 림프종 및 혈액암으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.
- [청구항 17] 제16항에 있어서,
다른 항암제와 병용 치료를 위한 약제학적 조성물.