

명세서

발명의 명칭: IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 및 항암제를 포함하는 암 치료용 약학 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] IL-2(Interleukin 2)는 T 세포 성장 인자(T-cell growth factors, TCGF)로도 불리며, 림프구 생성, 생존 및 항상성에서 중심 역할을 하는 구형의 당단백질이다. IL-2의 단백질 크기는 15.5 kDa 내지 16 kDa이며, 133개 아미노산으로 이루어져 있다. IL-2는 개별적 3개의 서브유닛으로 구성된 IL-2 수용체(IL-2 receptor)에 결합함으로써 각종 면역 작용을 매개한다.
- [3] 또한, IL-2는 활성화된 T 세포 중 특히, CD4+ 헬퍼 T 세포(helper T cell)에 의해 주로 합성된다. IL-2는 T 세포의 증식 및 분화를 자극하고, 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte, CTL)의 생성, 말초혈 림프구의 세포독성 세포 및 림포카인-활성화 살해 세포(lymphokine activated killer cell, LAK cell)로의 분화를 유도한다.
- [4] 한편, CD80은 B7-1로 알려져 있으며, 리간드와 결합하여 공동자극 반응(costimulatory responses) 및 공동억제 반응(coinhibitory responses)을 전달하여 면역 조절에 관여하는 막 단백질(membrane-bound proteins) 중 B7 패밀리의 하나이다. CD80은 T 세포, B 세포, 수지상세포 및 단핵구(monocyte)의 표면에 발현하는 막관통 단백질이다. CD80은 CD28, CTLA-4(CD152) 및 PD-L1(programmed cell death ligand 1)에 결합하는 것으로 알려져 있다. CD80, CD86, CTLA-4 및 CD28은 공동자극-공동억제 시스템에 관여한다. 예를 들어, T 세포의 활성을 조절하고, 증식, 분화 및 생존에 관여한다.
- [5] 또한, 최근 키트루다(Keytruda®)와 같은 면역관문 억제제가 각광을 받고 있다. 면역관문 억제제는 우리 몸의 면역계를 활성화 시켜 암 세포를 공격하도록 도움을 주는 항암제이다. 현재까지 암 치료는 암세포의 특징인 빠르게 분열하는 세포를 죽이는데 초점을 맞추었기 때문에, 암세포뿐만 아니라 정상 세포 중 빠르게 분열하는 세포에도 작용하여 부작용이 나타났다. 그러나, 면역항암제는 암 환자의 면역체계를 활용해 암세포에 영향을 주므로 기존 항암제가 나타내는 전형적인 부작용은 거의 없다고 알려져 있다. 키트루다와 같은 항 PD-1 항체는 T 세포의 특정 수용체(PD-1)에 결합하여 암세포가 활동성 T 세포의 감시체계를 피하는 경로를 차단하여, 인체 내 T 세포가 암세포를 공격할 수 있게 하는 면역 재활성을 통하여 항암효과를 나타내게 된다(KR10-2018-0030580A).

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 이에 본 발명자들은 안전하고 효과적인 IL-2를 개발하기 위해 연구한 결과, IL-2 단백질과 CD80 단백질을 한 분자 내에 포함하는 신규한 융합단백질과 항암제가 뛰어난 항암 효과를 나타낸다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [7] 상기 목적 달성을 위해, 본 발명의 일 측면은, IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학 조성물을 제공한다

발명의 효과

- [8] IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질은 IL-2에 의해 면역세포를 활성화시킬 수 있을 뿐 아니라, CD80에 의해 Treg 세포를 효과적으로 조절할 수 있다. 뿐만 아니라, 항암제와 병용 투여할 경우, 시너지 효과가 나타남을 확인하였다. 따라서, 상기 IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학 조성물은 암 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [9] 도 1은 융합단백질 이량체의 일 실시예를 도식화한 것이다.
 [10] 도 2는 융합단백질 이량체가 림프절에서 나타내는 작용 기작을 도식화한 것이다.
 [11] 도 3은 융합단백질 이량체가 종양미세환경에서 나타내는 작용 기작을 도식화한 것이다.
 [12] 도 4는 융합단백질의 구조를 도식화한 것이다. 이때, GI101 및 mGI101은 융합단백질의 일 실시예이며, GI101C1, GI101C2 및 mGI101C1은 융합단백질의 활성을 비교하기 위한 비교예이다.
 [13] 도 5는 융합단백질의 다양한 구체예를 나타낸 것이다. 인간 유래의 단백질과 마우스 유래의 단백질을 조합하여 융합단백질을 제조할 수 있으며, Fc 이외에도 다양한 링커를 통해 CD80 단백질과 IL-2 단백질이 결합될 수 있다.
 [14] 도 6은 수득한 융합단백질 이량체(GI101)를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.
 [15] 도 7은 흡광도에 따른 융합단백질(GI101)의 함량을 나타낸 것이다.
 [16] 도 8은 수득한 융합단백질 이량체(GI101)를 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로 분석한 것이다.
 [17] 도 9는 수득한 mGI101 융합단백질 이량체를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.
 [18] 도 10은 수득한 GI101C1 융합단백질 이량체를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.
 [19] 도 11은 수득한 GI101C2 융합단백질 이량체를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.
 [20] 도 12는 수득한 mGI101C1 융합단백질 이량체를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.
 [21] 도 13은 수득한 GI102-M45 융합단백질 이량체를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

- [22] 도 14는 수득한 GI102-M61 융합단백질 이량체를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.
- [23] 도 15는 수득한 GI102-M72 융합단백질 이량체를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.
- [24] 도 16은 hCTLA-4와 GI101간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.
- [25] 도 17은 hPD-L1과 GI101간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.
- [26] 도 18은 hPD-L1과 hPD-1간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.
- [27] 도 19는 mCTLA-4와 mGI101간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.
- [28] 도 20은 mPD-L1과 mGI101간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.
- [29] 도 21은 GI101(hCD80-Fc-hIL-2v)과 CTLA-4의 결합력을 확인한 것이다.
GI101(hCD80-Fc-hIL-2v)은 CTLA-4에 대해 높은 결합력을 가짐을 확인하였다.
- [30] 도 22는 GI101과 IL-2R α 또는 IL-2R β 간의 결합 친화성을 확인한 것이다.
- [31] 도 23은 GI101과 IL-2R α 간의 결합 친화성을 확인한 것이다.
- [32] 도 24는 GI101과 IL-2R β 간의 결합 친화성을 확인한 것이다.
- [33] 도 25는 IL-2R α 와 GI102-M45간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.
- [34] 도 26은 IL-2R α 와 GI102-M61간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.
- [35] 도 27은 IL-2R α 와 GI102-M72간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.
- [36] 도 28은 IL-2R β 와 GI102-M45간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.
- [37] 도 29는 IL-2R β 와 GI102-M61간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.
- [38] 도 30은 IL-2R β 와 GI102-M72간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.
- [39] 도 31 및 도 32는 GI101, GI101C1, GI101C2 또는 IL-2를 농도 별로 세포에 처리하고 배양하였을 때의 세포에서 분비하는 IFN- γ 양을 측정한 것이다.
- [40] 도 33은 GI101, GI101C1, GI101C2 및 IL-2(Proleukin)가 CD8+ T 세포의 증식에 미치는 영향을 확인한 것이다.
- [41] 도 34는 GI101이 effector T 세포에 작용하는 기전을 도식화한 것이다.
- [42] 도 35는 GI101 및 GI102가 CD8+ T 세포와 CD4+ T 세포의 증식에 미치는 영향을 확인한 것이다. 이때, (A)는 CD8+ T 세포와 CD4+ T 세포의 비율을 나타내며, (B)는 CD8+ T 세포의 증식능력을 나타내고, (C)는 CD4+/FoxP3+ Treg 세포의 비율을 나타낸다.
- [43] 도 36 및 도 37은 GI101 및 GI101w가 CD8+ T 세포와 NK 세포의 증식에 미치는 영향을 확인한 것이다.
- [44] 도 38 및 도 39는 GI101이 effector T 세포에 미치는 영향을 확인한 것이다.
- [45] 도 40은 mGI101 및 mGI102-M61이 마우스의 면역세포에 미치는 영향을 확인한 것이다.
- [46] 도 41 및 도 42는 GI101이 PD-L1 및 CTLA-4가 발현되는 암세포에 의한 T 세포 활성 억제에 미치는 영향을 확인한 것이다.
- [47] 도 43은 마우스 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서 mGI101의 용량에 따른 종양 억제 효과를 확인한 것이다.
- [48] 도 44는 마우스 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서 mGI101의 투여에 따른 마우스 생존율을 분석한 것이다.

- [49] 도 45는 마우스 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서의 GI101의 종양 억제 효과를 확인한 것이다.
- [50] 도 46은 마우스 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에 hIgG4, 항 PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 CD8+ T 세포, IFN- γ T 세포, CD4+ T 세포 및 Treg 세포를 FACS로 분석한 것이다.
- [51] 도 47은 마우스 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에 hIgG4, 항 PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 CD8+ T 세포, IFN- γ T 세포, CD4+ T 세포 및 Treg 세포를 FACS로 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- [52] 도 48은 마우스 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에 hIgG4, 항 PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 대식세포를 FACS로 분석한 것이다.
- [53] 도 49는 마우스 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에 hIgG4, 항 PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 대식세포를 FACS로 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- [54] 도 50은 마우스 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에 hIgG4, 항 PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 수지상세포를 FACS로 분석한 것이다.
- [55] 도 51은 마우스 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에 hIgG4, 항 PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 수지상세포를 FACS로 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- [56] 도 52는 마우스 유래 폐암세포(LL/2) 식립 마우스에서의 GI101의 종양 억제 효과를 확인한 것이다.
- [57] 도 53은 마우스 유래 폐암세포(LL/2) 식립 마우스에 hIgG4, 항 PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 CD8+ T 세포, IFN- γ T 세포, CD4+ T 세포 및 Treg 세포를 FACS로 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- [58] 도 54는 마우스 유래 폐암세포(LL/2) 식립 마우스에 hIgG4, 항 PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 대식세포를 FACS로 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- [59] 도 55는 마우스 유래 폐암세포(LL/2) 식립 마우스에 hIgG4, 항 PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 수지상세포를 FACS로 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- [60] 도 56은 마우스 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서의 mGI102-M61의 종양 억제 효과를 확인한 것이다.
- [61] 도 57은 마우스 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서 mGI102-M61 투여에 따른 마우스의 생존율을 분석한 것이다.
- [62] 도 58은 마우스 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서의 mGI101의 종양 억제 효과를 확인한 것이다.
- [63] 도 59는 마우스 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서의 mGI101의 종양 억제율을 나타낸 것이다.
- [64] 도 60은 인간 유래 유방암세포(MDA-MB-231) 식립 마우스에서 GI101과

- 키트루다 병용시 종양 성장 그래프를 나타낸 것이다. 대조군(hIgG4)에 비하여 GI101과 키트루다 단독 처리군의 종양 성장이 저해되었다. 대조군에 비해 GI101과 키트루다 병용 처리군의 종양 성장이 저해되었다. GI101과 키트루다 단독 처리군에 비해 GI-101과 키트루다 병용 처리군의 종양 성장이 저해되었다.
- [65] 도 61은 인간 유래 유방암세포(MDA-MB-231) 식립 마우스에서 GI-101과 키트루다 병용시 종양 성장 억제율을 나타낸 것이다. IgG4 처리군은 종양성장 억제율 30% 이상 2마리, 50% 이상 1마리, 80% 이상 1마리였다. GI101 처리군은 종양성장 억제율 30% 이상 5마리, 50% 이상 5마리, 80% 이상 2마리였다. 키트루다 처리군은 종양성장 억제율 30% 이상 7마리, 50% 이상 5마리, 80% 이상 3마리였다. GI101과 키트루다 병용 처리군은 종양성장 억제율 30% 이상 8마리, 50% 이상 8마리, 80% 이상 6마리였다.
- [66] 도 62는 인간 유래 유방암세포(MDA-MB-231) 식립 마우스에서 GI101과 키트루다 병용시 각 처리군의 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.
- [67] 도 63은 인간 유래 유방암세포(MDA-MB-231) 식립 마우스에서 hIgG4 처리군의 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.
- [68] 도 64는 인간 유래 유방암세포(MDA-MB-231) 식립 마우스에서 GI101 처리군의 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.
- [69] 도 65는 인간 유래 유방암세포(MDA-MB-231) 식립 마우스에서 키트루다 처리군의 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.
- [70] 도 66은 인간 유래 유방암세포(MDA-MB-231) 식립 마우스에서 GI101과 키트루다 병용 처리군의 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.
- [71] 도 67은 설치류 유래 대장암세포(MC38) 식립 마우스에서 mGI101과 항 PD-1 항체 병용 투여시 종양 성장 그래프를 나타낸 것이다.
- [72] 도 68은 설치류 유래 대장암세포(MC38) 식립 마우스에서 mGI101과 항 PD-1 항체 병용 투여시 종양 성장 억제율을 나타낸 것이다.
- [73] 도 69는 설치류 유래 대장암세포(MC38) 식립 마우스에서 mGI101과 항 PD-1 항체 병용 투여시 각 처리군의 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.
- [74] 도 70은 설치류 유래 대장암세포(MC38) 식립 마우스에서 hIgG4 처리군의 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.
- [75] 도 71은 설치류 유래 대장암세포(MC38) 식립 마우스에서 mGI101 처리군의 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.
- [76] 도 72는 설치류 유래 대장암세포(MC38) 식립 마우스에서 항 PD-1 항체 처리군의 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.
- [77] 도 73은 설치류 유래 대장암세포(MC38) 식립 마우스에서 mGI101과 항 PD-1 항체 병용 처리군의 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.
- [78] 도 74는 설치류 유래 대장암세포(MC38) 식립 마우스에서 mGI101과 항 PD-1 항체 병용 처리군 중 완전 관해를 보인 실험동물에 설치류 유래 대장암세포를

- 제주입한 후 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.
- [79] 도 75는 설치류 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서 mGI101과 항 PD-L1 항체 병용 투여시 종양 성장 그래프를 나타낸 것이다.
- [80] 도 76은 설치류 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서 mGI101과 항 TIGIT 항체 병용 투여시 종양 성장 그래프를 나타낸 것이다.
- [81] 도 77은 설치류 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서 mGI101과 TGF- β R 억제제인 Galunisertib 병용 투여시 종양 성장 그래프를 나타낸 것이다.
- [82] 도 78은 설치류 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서 mGI101과 TGF- β R 억제제인 Galunisertib 병용 투여시 종양 성장 억제율을 나타낸 것이다.
- [83] 도 79는 설치류 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서 mGI101, TGF- β R 억제제인 Galunisertib 및 이를 병용 투여시 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.
- [84] 도 80은 설치류 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서 mGI101과 VEGFR 억제제인 Axitinib 병용 투여시 종양 성장 그래프를 나타낸 것이다.
- [85] 도 81은 설치류 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서 mGI101과 VEGFR 억제제인 Axitinib 병용 투여시 종양 성장 억제율을 나타낸 것이다.
- [86] 도 82는 설치류 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서 mGI101과 VEGFR 억제제인 Axitinib 병용 투여시 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.
- [87] 도 83은 설치류 유래 폐암세포(LL/2) 식립 마우스에서 mGI101과 VEGFR 억제제인 Axitinib 병용 투여시 종양 성장 그래프를 나타낸 것이다.
- [88] 도 84는 설치류 유래 폐암세포(LL/2) 식립 마우스에서 mGI101과 VEGFR 억제제인 Axitinib 병용 투여시 종양 성장 억제율을 나타낸 것이다.
- [89] 도 85는 설치류 유래 폐암세포(LL/2) 식립 마우스에서 mGI101과 VEGFR 억제제인 Axitinib 병용 투여시 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.
- [90] 도 86은 설치류 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서 mGI101과 VEGFR 억제제인 Lenvatinib 병용 투여시 종양 성장 그래프를 나타낸 것이다.
- [91] 도 87은 설치류 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서 mGI101과 VEGFR 억제제인 Lenvatinib 병용 투여시 종양 성장 억제율을 나타낸 것이다.
- [92] 도 88은 설치류 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서 mGI101과 VEGFR 억제제인 Lenvatinib 병용 투여시 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.
- [93] 도 89는 설치류 유래 신장암세포(Renca) 식립 마우스에서 mGI101과 VEGFR 억제제인 Lenvatinib 병용 투여시 종양 성장 그래프를 나타낸 것이다.
- [94] 도 90은 설치류 유래 신장암세포(Renca) 식립 마우스에서 mGI101과 VEGFR 억제제인 Lenvatinib 병용 투여시 종양 성장 억제율을 나타낸 것이다.
- [95] 도 91는 설치류 유래 신장암세포(Renca) 식립 마우스에서 mGI101과 VEGFR

억제제인 Lenvatinib 병용 투여시 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.

- [96] 도 92는 인간 유래 대장암 세포주(HCT116)에서 mGI101, EGFR 억제제인 Cetuximab 및 이를 병용 처리시 암세포주의 사멸 효과를 나타낸 것이다.
- [97] 도 93은 설치류 유래 유방암세포(4T1) 식립 마우스에서 mGI101과 PARP 억제제인 Olaparib 병용 투여시 종양 성장 그래프를 나타낸 것이다.
- [98] 도 94는 설치류 유래 유방암세포(4T1) 식립 마우스에서 mGI101과 PARP 억제제인 Olaparib 병용 투여시 종양 성장 억제율을 나타낸 것이다.
- [99] 도 95는 설치류 유래 유방암세포(4T1) 식립 마우스에서 mGI101과 PARP 억제제인 Olaparib 병용 투여시 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.
- [100] 도 96은 설치류 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서 mGI101과 DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제인 Guadecitabine 병용 투여를 위한 실험 스케줄을 도식화한 것이다.
- [101] 도 97은 설치류 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서 mGI101(0.6 mpk)과 DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제인 Guadecitabine 병용 투여시 종양 성장 그래프를 나타낸 것이다.
- [102] 도 98은 설치류 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서 mGI101(0.6 mpk)과 DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제인 Guadecitabine 병용 투여시 종양 성장 억제율을 나타낸 것이다.
- [103] 도 99는 설치류 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서 mGI101(0.6 mpk)과 DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제인 Guadecitabine 병용 투여시 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.
- [104] 도 100은 설치류 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서 mGI101(3 mpk)과 DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제인 Guadecitabine 병용 투여시 종양 성장 그래프를 나타낸 것이다.
- [105] 도 101은 설치류 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서 mGI101(3 mpk)과 DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제인 Guadecitabine 병용 투여시 종양 성장 억제율을 나타낸 것이다.
- [106] 도 102는 설치류 유래 대장암세포(CT26) 식립 마우스에서 mGI101(3 mpk)과 DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제인 Guadecitabine 병용 투여시 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.
- [107] 도 103은 설치류 유래 유방암세포(4T1) 식립 마우스에서 mGI101, Docetaxel 및 항 PD-L1 항체 병용 투여시 종양 성장 그래프를 나타낸 것이다.
- [108] 도 104는 설치류 유래 유방암세포(4T1) 식립 마우스에서 mGI101, Docetaxel 및 항 PD-L1 항체 병용 투여시 종양 성장 억제율을 나타낸 것이다.
- [109] 도 105는 설치류 유래 유방암세포(4T1) 식립 마우스에서 mGI101, Docetaxel 및 항 PD-L1 항체 병용 투여시 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.

- [110] 도 106은 설치류 유래 유방암세포(EMT6) 식립 마우스에서 mGI101과 Paclitaxel 병용 투여를 위한 실험 스케줄을 도식화한 것이다.
- [111] 도 107은 설치류 유래 유방암세포(EMT6) 식립 마우스에서 mGI101과 Paclitaxel 병용 투여시 종양 성장 그래프를 나타낸 것이다.
- [112] 도 108은 설치류 유래 유방암세포(EMT6) 식립 마우스에서 mGI101과 Paclitaxel 병용 투여시 종양 성장 억제율을 나타낸 것이다.
- [113] 도 109는 설치류 유래 유방암세포(EMT6) 식립 마우스에서 mGI101과 Paclitaxel 병용 투여시 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.
- [114] 도 110은 설치류 유래 폐암세포(TC1) 식립 마우스에서 mGI101, Cisplatin, Pemetrexed 및 항 PD-1 항체 병용 투여 후 항암 효과를 확인하기 위한 실험 스케줄이다. 또한, 상기 도면에 mGI101에 의한 유지 요법(maintenance therapy) 효과를 확인하기 실험 스케줄을 함께 도식화하였다.
- [115] 도 111은 설치류 유래 폐암세포(TC1) 식립 마우스에서 mGI101, Cisplatin, Pemetrexed 및 항 PD-1 항체 병용 투여 및 유지 요법 시행시 종양 성장 그래프를 나타낸 것이다.
- [116] 도 112는 설치류 유래 폐암세포(TC1) 식립 마우스에서 mGI101, Cisplatin, Pemetrexed 및 항 PD-1 항체 병용 투여 및 유지 요법 시행시 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.
- [117] 도 113 내지 도 117은 설치류 유래 폐암세포(TC1) 식립 마우스에서 mGI101, Cisplatin, Pemetrexed 및 항 PD-1 항체 병용 투여 및 유지 요법 시행시 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 실험군별로 나타낸 것이다.
- [118] 도 118은 설치류 유래 폐암세포(TC1) 식립 마우스에서 mGI101, Cisplatin, Pemetrexed 및 항 PD-1 항체 병용 투여 및 유지 요법 시행 후 마우스의 생존율을 나타낸 것이다.
- [119] 도 119는 인간 유래 유방암세포(BT-474) 식립 마우스에서 GI101과 Trastuzumab 병용 투여시 종양 성장 그래프를 나타낸 것이다.
- [120] 도 120은 인간 유래 유방암세포(BT-474) 식립 마우스에서 GI101과 Trastuzumab 병용 투여시 종양 성장 억제율을 나타낸 것이다.
- [121] 도 121은 인간 유래 유방암세포(BT-474) 식립 마우스에서 GI101과 Trastuzumab 병용 투여시 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.
- [122] 도 122는 인간 대장암 세포주(HCT116)에서 GI101, Her2 억제제인 Pertuzumab 및 이를 병용 처리시 GI101의 농도에 따른 암세포주의 사멸 효과를 나타낸 것이다.
- [123] 도 123은 설치류 유래 유방암세포(4T1) 식립 마우스에서 mGI101과 CDK4/6 억제제인 Abemaciclib 병용 투여시 종양 성장 그래프를 나타낸 것이다.
- [124] 도 124는 설치류 유래 유방암세포(4T1) 식립 마우스에서 mGI101과 CDK4/6 억제제인 Abemaciclib 병용 투여시 종양 성장 억제율을 나타낸 것이다.
- [125] 도 125는 설치류 유래 유방암세포(4T1) 식립 마우스에서 mGI101과 CDK4/6

억제제인 Abemaciclib 병용 투여시 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.

- [126] 도 126은 인간 유래 유방암 세포주세포(MDA-MB-231)에서 GI101, CDK4/6 억제제 Ribociclib 및 이를 병용 처리시 암세포주의 사멸 효과를 나타낸 것이다.
- [127] 도 127은 설치류 유래 대장암세포(MC38) 식립 마우스에서 mGI101과 STING agonist인 DMXAA 병용 투여를 위한 실험 스케줄을 도식화한 것이다.
- [128] 도 128은 설치류 유래 대장암세포(MC38) 식립 마우스에서 mGI101과 STING agonist인 DMXAA 병용 투여 후 마우스의 생존율을 나타낸 것이다.
- [129] 도 129는 설치류 유래 대장암세포(MC38) 식립 마우스에서 mGI101과 STING agonist인 DMXAA 병용 투여 후 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.
- [130] 도 130 내지 도 133은 설치류 유래 대장암세포(MC38) 식립 마우스에서 mGI101과 STING agonist인 DMXAA 병용 투여 후 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 실험군별로 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [131] 융합단백질의 병용 요법
- [132] 본 발명의 일 측면은, CD80 단백질 또는 이의 단편 및 IL-2 단백질 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질 이량체; 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [133] 상기 IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 이량체는 체내의 면역 활성을 증가시키기 때문에, 종래에 활용되고 있는 다양한 항암 치료법과 병행하여 이용할 수 있다. 구체적으로, 병용 가능한 종래 치료법은 화학 요법(Chemotherapy)을 위한 화학항암제, 표적항암제, 항암 바이러스, 항체치료제, 세포치료제, 면역관문 억제제 및 이의 조합으로 구성된 군에서 선택될 수 있다.
- [134] 본 명세서에서 사용된 용어, "화학항암제"는 항종양 약물(antineoplastic agent) 또는 세포독성 약물(cytotoxic agent)라고도 한다. 주로 DNA에 직접 작용하여 DNA의 복제, 전사, 번역과정을 차단하거나 대사경로에 핵산 전구체의 합성을 방해하고 세포분열을 저해함으로써 항암활성을 나타내는 약물을 총칭하는 것이다. 상기 항종양 약물은 종양세포 뿐 아니라, 정상세포에도 작용하여 세포독성을 나타낸다. 화학항암제는 유지요법(maintenance therapy)에 사용될 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용된 용어, "유지요법"은 초기 항암치료 후 약물로 암을 치료하는 것으로, 암의 재발을 예방하거나 지연시키기 위하여 실시하는 치료방법을 의미한다.
- [135] 구체적으로, 화학항암제는 Alyklating Agent, Microtubule Inhibitor, Anti metabolite 및 Topoisomerase Inhibitor으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. Alyklating Agent는 Mechlorethamine, Cyclophosphamide, Ifosfamide,

- Melphalan, Chlorambucil, Thiotepa, Altretamine, Procarbazine, Busulfan, Streptozocin, Carmustine, Iomustine, Dacabazine, Cisplatin, Carboplatin, 및 Oxaliplatin으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 일 수 있다. Microtubule Inhibitor는 Docetaxel, Velban, Oncovin 및 Navelbine으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 일 수 있다. Anti-metabolite은 Fluorouracil, Capecitabine, Cytarabine, Gemcitabine, Fludarabine, Methotrexate, Pemetrexed 및 Mercaptopurine으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 일 수 있다. Topoisomerase Inhibitor는 Hycamtin, Camptosar, Vepesid, Paclitaxel, Blenoxane, Adriamycin 및 Cerubidine으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 일 수 있다.
- [136] 본 명세서에서 사용된 용어, "표적항암제"는 암세포에만 많이 나타나는 특정 단백질이나 특정 유전자 변화를 표적으로 암의 성장과 발생에 관여하는 신호를 차단하여 암세포 특이적으로 사멸시키는 치료제이다. 세포 외부에서 반응하는 단일클론항체와 세포 내부에서 작용하는 저분자(small molecule) 물질로 분류된다. 단일 클론항체는 세포 외부에 전달되는 암세포 유도신호를 차단하는 항암제로 증식, 사멸 등과 관련된 개시 신호에 작용하며, 저분자 물질은 세포 내부에서 발생하는 복잡한 신호전달에 작용한다.
- [137] 구체적으로, 표적이 되는 단백질은 EGFR, VEGFR, CD20, CD38, RNAK-L, BTK, Bcr-abl, PDGFR/FGFR 계열, MEK/RAF, HER2/Neu, Ubiquitin, JAK, ALK, PARP, TGF β RI, Proteasome, Bcl-2, C-Met, VR1, VR2, VR3, c-kit, AXL, RET, Braf, DNMT, CDK4/6, STING 등 일 수 있다.
- [138] 상기 표적항암제는 Cetuximab, Trastuzumab, Pertuzumab, Axitinib, Lenvatinib, Bevacizumab, Ramucirumab, Aflibercept, Rituximab, Obinutuzumab, Daratumumab, Denosumab, Ibrutinib, Dasatinib, Nilotinib, Imatinib, Bosutinib, Galunisertib, Vactosertib, Nintedanib, Sunitinib, Sorafenib, Cabozantinib, Regorafenib, Masitinib, Semaxanib, Tivozanib, Vandetanib, Pazopanib, Trametinib, Dabrafenib, Trastuzumab, Afatinib, Lapatinib, Neratinib, Lenalidomide, Lxazomib, Ruxolitinib, Lestaurtinib, Pacritinib, Cobimethinib, Selumetinib, Trametinib, Binimetinib, Alectinib, Crizotinib, Venetoclax, Crizotinib, Cabozantinib, Bemcentinib, Gilteritinib, Selpercatinib, Pralsetinib, Vemurafenib, Olaparib, Talazoparib, Niraparib, Rucaparib, Azacitidine, Decitabine, Guadecitabine, Abemaciclib, Ribociclib, Palbociclib, CDNs, SB11285 및 DMXAA로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 일 수 있다.
- [139] 본 명세서에서 사용된 용어, "표피성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor, EGFR)"은 세포의 성장, 분열, 생존 및 사멸을 조절하는 세포막 수용체로서, 다양한 암에서 종양 조직 내에 EGFR의 발현이 증가되어 있다. 상기 EGFR이 증가된 종양조직은 침습, 전이 및 항암제 내성이 높은 것으로 알려져 있다. EGFR 억제제는 상기 EGFR을 저해하는 물질은, 일 구체예로 Cetuximab, Trastuzumab, Pertuzumab, Gefitinib, Elotinib 또는 Panitumumab 일 수 있다.
- [140] 본 명세서에서 사용된 용어, "혈관생성인자수용체(Vascular Endothelial Growth

Factor, VEGFR)"는 혈관신생을 유도하는 혈관생성인자의 세포막 수용체로서, VEGFR 억제제는 상기 혈관신생을 저해하여 종양의 성장 및 전이를 억제한다. VEGFR 억제제의 일 구체예로, Axitinib, Lenvatinib, Bevacizumab, Ramucirumab 또는 Aflibercept 일 수 있다.

- [141] 본 명세서에서 사용된 용어, "CD20(B lymphocyte antigen CD20)"은 B 세포 표면에 발현된 단백질로서 B 세포 림프종 치료를 위한 표적 단백질로 사용되고 있다. CD20 표적억제제는 Rituximab 또는 Obinutuzumab 일 수 있다.
- [142] 본 명세서에서 사용된 용어, "CD38(cluster of differentiation 38)"은 면역세포에서 신호전달계 수용체 역할을 하면서 세포의 증식 및 사멸을 조절하는 단백질로서, 이를 표적으로 하는 억제제는 Daratumumab 일 수 있다.
- [143] 본 명세서에서 사용된 용어, "RANK-L(Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)"은 파골세포의 표면에서 발현되는 RANK 수용체로, 리간드와 결합하여 활성화되면 뼈의 파괴를 일으키는 작용을 한다. RANK-L 억제제는 골전이나 골다공증에 의해 고통받는 암환자에게 주로 사용하며, 구체적으로 Denosumab 일 수 있다.
- [144] 본 명세서에서 사용된 용어, "BTK(Bruton's tyrosine kinase)"는 B 세포의 증식에 관여하는 효소로서 과발현시 혈액암으로 발전할 수 있다. BTK 표적억제제의 일 구체예는 Ibrutinib 일 수 있다.
- [145] 본 명세서에서 사용된 용어, "Bcr-abl"은 만성골수성백혈병 환자에서 많이 발현되는 융합 단백질로서, 혈액 세포의 비정상적인 증식을 유도하는 것으로 알려져 있다. 구체적으로, 상기 단백질의 억제제는 Dasatinib, Nilotinib, Imatinib 또는 Bosutinib 일 수 있다.
- [146] 본 명세서에서 사용된 용어, "종양성장인자 β 수용체(tumor growth factor β receptor, TGF β R)"는 종양성장인자의 세포막 수용체로서, 상피세포와 조혈세포의 성장, 이동, 분화 및 사멸 등을 조절한다. 상기 TGF β R 표적억제제에는 Galunisertib 또는 Vactosertib 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [147] 본 명세서에서 사용된 용어, "PDGFR(platelet derived growth factor)"는 암세포에서 빈도 높게 발현되는 PDGF의 세포막 수용체로서, 혈관 신생에 관여하여 암의 성장, 전이, 약물 내성을 조절하는 것으로 알려져 있다. FGFR(Fibroblast growth factor receptor)은 섬유아세포 성장인자(FGF)의 수용체로서, 세포성장, 분화 및 이동 등을 포함한 다양한 생물 과정들을 조절한다. FGFR 유전자는 돌연변이가 잘 일어나며, 이러한 변이체는 유방암, 자궁암, 난소암, 자궁경부암 등에서 흔히 관찰된다. PDGFR 또는 FGFR을 표적으로 하는 억제제는 Nintedanib, Sunitinib, Sorafenib, Cabozantinib, Lenvatinib, Regorafenib, Masitinib, Semaxanib, Tivozanib, Vandetanib, Axitinib, 또는 Pazopanib 일 수 있다.
- [148] 본 명세서에서 사용된 용어, "MEK/RAF"는 세포증식, 세포주기 조절, 세포생존,

혈관신생, 세포의 이동 등에 관여하는 세포내 신호전달 매개체로, 암세포에서 과활성 되어있다. MEK/RAF를 표적으로 억제제는 Trametinib 또는 Dabrafenib 일 수 있다.

- [149] 본 명세서에서 사용된 용어, "HER-2/neu(human epidermal growth factor receptor 2)는 PI3K/AkT를 활성화를 통해 세포 증식을 조절한다. 전이성 유방암 및 난소암 등에서 과발현 되어 있고 항암제 내성을 유발하는 것으로 알려져 있다. Her2/neu 표적항암제는 Trastuzumab, Afatinib, Lapatinib 또는 Neratinib 일 수 있다.
- [150] 본 명세서에서 사용된 용어, "유비퀴틴(Ubiquitin)"은 다른 단백질에 결합하여 단백질 분해효소인 프로테아좀(proteasome)에 의한 단백질 분해(ubiquitin-proteasome system, UPS)를 유도함으로써 세포 항상성을 유지시킨다. 상기 UPS의 비정상적인 발현 또는 활성이 다양한 종양에서 관찰되며, 이들의 억제제는 항암활성을 나타낸다. 구체적으로 유비퀴틴 또는 프로테아좀을 표적으로 하는 억제제는 Lenalidomide 또는 Lxazomib 일 수 있다.
- [151] 본 명세서에서 사용된 용어, "JAK(Janus kinase)"은 세포증식, 세포생존, 세포의 이동 및 면역반응을 조절하는 전사인자인 STAT의 상위 단백질로서, JAK의 억제제는 STAT의 활성 억제를 통해 세포증식을 감소시키고 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져있다. 상기 JAK 표적억제제는 Ruxolitinib, Lestaurtinib 또는 Pacritinib 일 수 있다.
- [152] 본 명세서에서 사용된 용어, "MAP2K(Mitogen-activated protein kinase kinase)"는 MAPK를 인산화시켜 세포증식, 세포주기 조절, 세포생존, 혈관신생, 세포의 이동 등에 관여하는 세포내 신호전달 매개체로, 암세포에서 과활성 되어있다. MAP2K 표적억제제는 Cobimethinib, Selumetinib, Trametinib 또는 Binimetinib 일 수 있다.
- [153] 본 명세서에서 사용된 용어, "ALK(Anaplastic lymphoma kinase, 역형성림프종 키나제)"는 세포증식, 세포의 이동, 혈관신생성을 촉진하고, 세포사멸을 억제하는 신호 전달 매개체로 다양한 암조직에서 과활성 되어있다. ALK 표적억제제는 Alectinib 또는 Crizotinib 일 수 있다.
- [154] 본 명세서에서 사용된 용어, "Bcl-2"는 세포사를 억제하는 단백질로, 다양한 암조직에서 과발현 또는 과활성 되어 있다. Bcl-2를 표적으로 하는 억제제는 Venetoclax 일 수 있다.
- [155] 본 명세서에서 사용된 용어, "C-Met"은 간세포성장인자(hepatocyte growth factor, HGF)의 수용체로서, 세포성장, 형성, 운동성, 생존 및 혈관 신생 등에 관련된 신호전달을 활성화한다. C-Met 표적항암제는 Crizotinib 또는 Cabozantinib 일 수 있다.
- [156] 본 명세서에서 사용된 용어, "VR(vanilloid receptor)는 TRPV(Transient receptor potential vanilloid)로도 알려져 있으며, VR1, VR2, VR3, VR4, VR5 및 VR6 형태로 존재한다. VR은 암 진행 과정에서 각 단계별로 암세포의 증식, 사멸, 이동, 침윤 및 혈관신생을 조절하는 것으로 알려져 있다.
- [157] 본 명세서에서 사용된 용어, "c-kit"는 CD117로도 알려져 있으며, 세포생존,

증식 및 분화를 활성화하는 신호 전달을 유도한다. c-kit은 원종양 유전자(proto-oncogene)로 상기 유전자의 과발현 또는 돌연변이는 암 발병과 관련이 있다.

- [158] 본 명세서에서 사용된 용어, "AXL(tyrosin-protein kinase receptor UFO)"는 세포표면에 존재하는 티로신 키나아제 수용체로서, 세포증식 및 생존에 관여하는 신호 전달을 매개한다. 항암치료에 있어 항암제 내성에 관여하는 것으로 알려져있다. AXL 표적항암제의 일 구체에는 Bemcentinib 또는 Gilteritinib 일 수 있다.
- [159] 본 명세서에서 사용된 용어, "RET(REarranged during transfection)"는 세포증식, 세포사멸 및 생존에 관여하는 신호를 매개하는 수용체로, RET의 돌연변이는 암발생에 관여하는 것으로 알려져 있다. RET의 표적 억제제는 Selpercatinib 또는 Pralsetinib 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [160] 본 명세서에서 사용된 용어, "Braf"는 세포증식, 세포주기 조절, 세포생존, 혈관신생, 세포의 이동 등에 관여하는 MAPK 신호 전달 매개체로서, 암세포에서 유전적 변이가 관찰된다. Braf를 표적으로 하는 억제제는 Vemurafenib 일 수 있다.
- [161] 본 명세서에서 사용된 용어, "PARP(Poly[ADP-ribose]polymerase)"는 핵에서 손상된 DNA를 인지해 활성화된 후 DNA 수선 관련 단백질을 활성화시키는 단백질이다. PARP 표적억제제는 암세포의 DNA 수선을 저해하여 암세포의 증식을 억제한다. 상기 PARP 표적억제제의 일 구체에는 Olaparib, Talazoparib, Niraparib 또는 Rucaparib 일 수 있다.
- [162] 본 명세서에서 사용된 용어, "DNA 메틸 전이효소(DNA methyltransferase, DNMT)"는 DNA를 감고 있는 히스톤 단백질에 메틸기를 붙이는 효소로, 상기 과정을 통해 유전자의 발현이 억제된다. 상기 DNMT 표적억제제는 암 억제 유전자 과메틸화를 저해해 암 억제 유전자의 정상적 발현을 유도함으로써 항암활성을 나타낸다. DNMT 표적억제제의 일 구체에는 Azacitidine, Decitabine, Guadecitabine 일 수 있다.
- [163] 본 명세서에서 사용된 용어, "CDK(cyclin dependent kinase) 4/6"는 세포주기를 조절하여 세포 성장을 촉진시키는 단백질로서, 다양한 악성 종양의 발생 및 진행 단계에서 과활성 되어있다. CDK4/6 표적억제제는 암세포의 세포주기를 저해하여 세포 증식을 억제하고 세포사멸을 유도함으로써 항암 활성을 나타낸다. CDK4/6 표적억제제는 Abemaciclib 또는 Palbociclib 일 수 있다.
- [164] 본 명세서에서 사용된 용어, "STING(Stimulator of Interferon Genes)"은 암세포에서 나오는 DNA 조각들을 인식하는 생체 내 센서로, 인터페론 유전자를 자극시켜 수지상세포와 같은 체내 면역세포를 활성화 시킨다. 상기 STING의 작용제(agonist)는 면역 증강효과 및 암혈관신생 억제 효과를 나타내며, 예를 들어, STING agonist는 CDNs, SB11285, DMXAA 등 일 수 있다.
- [165] 본 명세서에서 사용된 용어, "항암바이러스 치료제"는 증식이 가능하고

감염력이 있는 바이러스에 암 세포를 타겟팅하는 특정 유전자를 삽입하여 암을 사멸시키는 치료제이다. 상기 항암바이러스 치료제는 Talimogenem 또는 Laherparepvec 일 수 있다.

- [166] 본 명세서에서 사용된 용어, "항체 치료제"는 암세포의 특이적 단백질을 항원으로 인식하는 항체를 이용하여 항암효과를 나타내는 치료제이다. 항체치료제는 Trastuzumab, Emtansine, Emtansine, Rituximab, Ibritumomab, Tositumomab, Brentuximab, Ofatumumab, Obinutuzumab, Necitumumab, Bevacizumab, Ramucirumab, Nivolumab, Pembrolizumab, Atezolizumab, Durvalumab, Ipilimumab 등 일 수 있다.
- [167] 본 명세서에서 사용된 용어, "면역세포치료제"는 수지상세포(dendritic cell), 자연 살해 세포(natural killer cell), T 세포 등 면역세포를 이용하여 체내의 면역반응을 활성화시켜 항암 효과를 나타내는 치료제이다. 면역세포치료제는 체내 면역세포를 추출해 강화시키거나 유전공학적으로 변형시킨 다음 체내에 다시 주입하여 사용한다. 대표적인 면역세포치료제로 T 수용체 발현 T 세포(T cell receptor-modified T cells, TCR-T), 키메릭 항원 수용체 발현 T 세포(chimeric antigen receptor-modified T cells, CAR-T) 등이 있다. 구체적으로, Tisagenlecleucel 또는 Axicabtagene Ciloleucel 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [168] 본 명세서에서 사용된 용어, "면역관문 억제제"는 면역세포의 분화, 증식, 활성을 억제하는 면역관문 단백질(immune checkpoint protein)의 활성을 저해하는 하는 물질로, 암세포가 면역시스템을 회피하는 기능을 발휘하는 것을 막음으로써 암세포를 제거하는 것으로 알려져 있다. 상기 면역관문 억제제는 항 CTLA-4 항체, 항 PD-1 항체, 항 PD-L1 항체, 항체 PD-L2 항체, 항 B7-H4 항체, 항 HVEM 항체, 항 TIM3 항체, 항 GAL9 항체, 항 LAG3 항체, 항 VISTA 항체, 항 KIR 항체, 항 BTLA 항체 및 항 TIGIT 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다. 일 구체예로, 상기 면역관문 억제제는 Ipilimumab, Pembrolizumab, Nivolumab, Cemiplimab, Atezolizumab, Avelumab 및 Duralumab 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [169] 본 명세서에서 사용된 용어, "ADC(antibody drug conjugate)"는 항체와 세포 독성 약물을 화학적으로 결합하여 표적 전달을 통해 높은 항암 효과를 보이는 치료제이다. Gemtuzumab-Ozogamicin, Brentuximab-Vedotin, Trastuzumab-Emtansine, Inotuzumab-Ozogamicin 및 Eribulin-Mesylate 등 일 수 있다.
- [170] 상기 IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 이량체는 항암 백신 등과 병행하여 이용할 수 있다.
- [171] 뿐만 아니라, 항암제는 상술한 항암제뿐 아니라, 항암 백신 등과 함께 이용될 수 있다.
- [172] 바람직하게 상기 항암제는 Cisplatin, Oxaliplatin, ALTIMA, Axitinib(VR1,2,3, PDGFR, c-kit), Galunisertib(TGFβRI), Lenvatinib(VR1,2,3), Ramucirumab(VR2),

Cabozatinib(c-Met, VR2, AXL, RET), Olaparib(PARP), Guadecitabine(DNMT), Docetaxel, Paclitaxel, Pemetrexed, Vemurafenib(Braf), Abemaciclib(CDK4/6), Cetuximab(EGFR), Durvalumab(PD-L1), Trastuzumab(Her2), DMXAA, NK cell, T cell 및 Keytruda(PD-1)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 일 수 있다.

- [173] 또한, 상기 항암제는 하나 이상의 항암제를 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 융합단백질 이량체는 2개의 항암제와 함께 상용될 수 있다. 일 예로, 화학 항암제 및 표적항암제; 화학 항암제 및 항암 바이러스; 표적 항암제 및 항체 치료제; 화학 항암제 및 세포 치료제; 및 화학 항암제 및 면역관문 억제제일 수 있다. 또한, 표적항암제 및 항암 바이러스; 표적 항암제 및 항체 치료제; 표적 항암제 및 세포치료제; 표적항암제 및 면역관문 억제제일 수 있다. 또한, 항암 바이러스 및 항체 치료제; 항암 바이러스 및 세포 치료제; 및 항암 바이러스 및 면역관문 억제제 일 수 있다. 또한, 항체 치료제 및 세포 치료제; 및 항체 치료제 및 면역관문 억제제일 수 있다.
- [174] 또한, 상기 융합단백질 이량체는 3개의 항암제와 함께 사용될 수 있다. 상기 2개의 항암제에 상이한 항암제를 추가로 더 포함하여 사용될 수 있다.
- [175] 일 실시예로 상기 항암제는 화학항암제 및 표적항암제; 화학항암제 및 면역관문 억제제; 또는 화학항암제, 표적항암제 및 면역관문 억제제일 수 있다.
- [176] **융합단백질 이량체의 항암 유지 요법 용도**
- [177] 본 발명의 또 다른 측면은, CD80 단백질 또는 이의 단편 및 IL-2 단백질 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질 이량체를 유효성분으로 항암 유지 요법용 조성물을 제공한다.
- [178] 상술한 바와 같이, "유지요법"은 초기 항암치료 후에 암을 치료하는 것을 의미한다. 특히, 암의 재발을 예방하거나 지연시켜 암 치료 효과를 높이는 치료 방법이다.
- [179] 이때, 유지 요법을 위해서 추가적으로 적어도 하나의 항암제를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 항암제는 상술한 바와 같다.
- [180] **융합단백질 이량체를 포함하는 키트**
- [181] 본 발명의 또 다른 측면은, CD80 단백질 또는 이의 단편 및 IL-2 단백질 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질 이량체 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.
- [182] 본 발명의 또 다른 측면은, CD80 단백질 또는 이의 단편 및 IL-2 단백질 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질 이량체 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 항암 유지 요법용 키트를 제공한다.
- [183] **IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질**
- [184] 본 명세서에서 사용하는 용어, "IL-2" 또는 "인터루킨-2"는 달리 언급되지 않는 한, 포유동물, 예를 들어, 영장류(예, 인간) 및 설치류(예, 마우스 및 래트)를 포함하여 임의의 척추동물 공급원으로부터 수득한 임의의 야생형 IL-2를 의미한다. 상기 IL-2는 동물 세포에서 수득된 것일 수도 있으나, IL-2를 생산할 수

있는 재조합 세포로부터 수득된 것도 포함한다. 또한, 상기 IL-2는 야생형 IL-2 또는 이의 변이체일 수 있다.

- [185] 본 명세서에서는 IL-2 혹은 이의 변이체를 총칭하여 "IL-2 단백질" 혹은 "IL-2 폴리펩티드"의 용어로 표현하기도 한다. IL-2, IL-2 단백질, IL-2 폴리펩티드, 및 IL-2 변이체는 예를 들어, IL-2 수용체(receptor)에 특이적으로 결합한다. 이 특이적인 결합은 당업자에게 알려진 방법을 통해 확인할 수 있다.
- [186] 상기 IL-2의 일 구체예는 서열번호 35 또는 서열번호 36의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, 이때, 상기 IL-2는 성숙된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 성숙된 IL-2는 신호서열을 포함하지 않는 것일 수 있으며, 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 이때, 상기 IL-2는 야생형 IL-2의 N-말단 또는 C-말단의 일부가 결실된(truncated) 단편을 포함하는 개념으로 이용될 수 있다.
- [187] 또한, 상기 IL-2의 단편은 서열번호 35 또는 서열번호 36의 아미노산 서열을 가지는 단백질의 N 말단으로부터 연속적으로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개의 아미노산이 결실된 형태일 수 있다. 또한 상기 IL-2의 단편은 서열번호 35 또는 서열번호 36의 아미노산 서열을 가지는 단백질의 C 말단으로부터 연속적으로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개의 아미노산이 결실된 형태일 수 있다.
- [188] 본 명세서에서 사용하는 용어, "IL-2 변이체"는 전장(full-length) IL-2 또는 상술한 IL-2의 단편의 아미노산 일부가 치환된 형태를 의미한다. 즉, IL-2 변이체는 야생형 IL-2 또는 이의 단편과 다른 아미노산 서열을 가질 수 있다. 그러나, 상기 IL-2 변이체는 야생형 IL-2와 동등하거나 유사한 활성을 가질 수 있다. 여기에서, "IL-2 활성"은 예를 들어 IL-2 수용체에 특이적으로 결합하는 것을 의미할 수 있으며, 이 특이적 결합은 당업자에게 알려진 방법을 통해 측정할 수 있다.
- [189] 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 야생형 IL-2의 아미노산 일부가 치환된 것일 수 있다. 아미노산 치환에 의한 IL-2 변이체의 일 구체예로는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째, 45번째, 61번째 및 72번째 아미노산 중 적어도 하나가 치환된 것일 수 있다.
- [190] 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째, 45번째, 61번째 또는 72번째 아미노산 중 적어도 어느 하나가 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다. 뿐만 아니라, IL-2가 서열번호 35의 아미노산 서열의 N 말단의 일 부분이 결실된 형태일 경우, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 상보적으로 대응되는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 예를 들어, IL-2가 서열번호 35의 아미노산을 서열을 가질 경우에, 상기 IL-2의 변이체는 서열번호 35의 아미노산 서열에서 58번째, 62번째, 65번째,

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

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

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

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

- [193] 또한, 상기 IL-2 변이체는 네 군데의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째, 45번째 및 61번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째, 45번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 45번째, 61번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째, 61번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 42번째, 45번째, 61번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다.
- [194] 나아가, 상기 IL-2 변이체는 다섯 군데의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째, 45번째, 61번째 및 72번째 아미노산이 모두 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다.
- [195] 이때, 상기 치환에 의해 도입되는 "다른 아미노산"은 알라닌(alanine), 아르기닌(arginine), 아스파라긴(Asparagine), 아스파르트산(aspartic acid), 시스테인(cysteine), 글루탐산(glutamic acid), 글루타민(glutamine), 히스티딘(histidine), 이소루신(isoleucine), 루신(leucine), 리신(lysine), 메티오닌(methionine), 페닐알라닌(phenyl alanine), 프롤린(proline), 세린(serine), 트레오닌(threonine), 트립토판(tryptophan), 티로신(tyrosine) 및 발린(valine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다. 단, 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 상기 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째는 아르기닌으로 치환될 수 없으며, 42번째는 페닐알라닌으로 치환될 수 없고, 45번째는 티로신으로 치환될 수 없으며, 61번째는 글루탐산으로 치환될 수 없고, 72번째는 루신으로 치환될 수 없다.
- [196] 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째 아미노산인 아르기닌은 아르기닌을 제외한 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째 아미노산인 아르기닌은 알라닌으로 치환(R38A)될 수 있다.
- [197] 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 42번째 아미노산인 페닐알라닌은 페닐알라닌을 제외한 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 42번째 아미노산인 페닐알라닌은 알라닌으로 치환(F42A)될 수 있다.
- [198] 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산

서열에서 45번째 아미노산인 티로신은 티로신을 제외한 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 45번째 아미노산인 티로신은 알라닌으로 치환(Y45A)될 수 있다.

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

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

- [205] 또한, 상기 IL-2 변이체는 네 군데의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A, Y45A 및 E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A, Y45A 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, Y45A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A, Y45A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다.
- [206] 나아가 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A, Y45A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다.
- [207] 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 일 구체예는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 하기 (a) 내지 (d) 조합 중 선택되는 어느 하나의 조합의 치환이 일어난 것일 수 있다:
- [208] (a) R38A/F42A
- [209] (b) R38A/F42A/Y45A
- [210] (c) R38A/F42A/E61R
- [211] (d) R38A/F42A/L72G
- [212] 이때, IL-2가 서열번호 35의 아미노산 서열을 가질 경우, 서열번호 10과 상보적으로 대응되는 위치에 아미노산 치환을 가질 수 있다. 또한, IL-2가 서열번호 35의 아미노산 서열의 단편인 경우에도, 서열번호 10과 상보적으로 대응되는 위치의 아미노산이 치환될 수 있다.
- [213] 구체적으로, 상기 IL-2의 변이체는 서열번호 6, 22, 23 또는 24의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [214] 또한, 상기 IL-2 변이체는 생체 내에서 낮은 독성을 가지는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다. 이때, 상기 생체 내에서 낮은 독성이란, IL-2가 IL-2 수용체의 알파체인(IL-2R α)과 결합하여 유발되는 부작용일 수 있다. 상기 IL-2와 IL-2R α 결합에 의한 부작용을 개선시키기 위해서 다양한 IL-2 변이체가 개발되었으며, 이러한 IL-2 변이체는 미국특허 5,229,109 및 대한민국특허 1667096에 개시된 것들을 사용할 수 있다. 특히, 본 출원에서 기술되는 IL-2의 변이체는 IL-2 수용체의 알파체인(IL-2R α)과 결합력이 낮아 생체내 독성이 야생형 IL-2에 비해 낮다.
- [215] 본 명세서에서 사용하는 용어, "CD80"은 "B7-1"로도 불리며, 수지상세포, 활성화된 B 세포 및 단핵구에 존재하는 막단백질이다. CD80은 T 세포의 활성화와 생존에 필수적인 공자극 신호를 제공한다. CD80은 T 세포 표면에

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

- [216] 본 명세서에서 사용하는 용어, "CD80 단편"이란, CD80의 절단형을 의미한다. 또한, 상기 CD80 단편은 CD80의 세포외도메인일 수 있다. CD80 단편의 일 구체예로는 CD80의 신호서열인 N-말단으로부터 1번째 내지 34번째의 아미노산이 제외된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 35번째 내지 288번째의 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 또한, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 35번째 내지 242번째 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 또한, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 35번째 내지 232번째 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 또한, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 35번째 내지 139번째 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 또한, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 142번째 내지 242번째 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 상기 일 실시예로 CD80 단편은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [217] 또한, 상기 IL-2 단백질 및 상기 CD80 단백질은 링커 혹은 캐리어(carrier)에 의해 결합된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 또는 이의 변이체 및 상기 CD80(B7-1) 또는 이의 단편은 링커 혹은 캐리어에 의해 결합된 것일 수 있다. 본 명세서에서 링커와 캐리어는 호환적으로 사용되기도 한다.
- [218] 상기 링커는 두 개의 단백질을 연결시켜준다. 링커의 일 구체예로는 1개 내지 50개의 아미노산, 알부민 또는 이의 단편, 또는 면역글로불린의 Fc 도메인 등을 포함할 수 있다. 이때, 상기 면역글로불린의 Fc 도메인은 면역글로불린의 중쇄 불변 영역 2(CH2) 및 중쇄 불변 영역 3(CH3)을 포함하며, 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 및 경쇄 불변 영역 1(CH1)은 포함하지 않는 단백질을 의미한다. 상기 면역글로불린은 IgG, IgA, IgE, IgD 또는 IgM 일 수 있으며, 바람직하게는 IgG4 일 수 있다. 이때, 야생형 면역글로불린 G4의 Fc 도메인은 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [219] 또한, 상기 면역글로불린의 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인뿐만 아니라, Fc 도메인 변이체일 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용하는 용어 "Fc 도메인 변이체"는 야생형 Fc 도메인의 당쇄 형태(glycosylation pattern)와 다르거나, 야생형 Fc 도메인에 비해 증가된 당쇄, 야생형 Fc 도메인에 비해 감소한 당쇄, 또는 당쇄가 제거(deglycosylate)된 형태일 수 있다. 또한, 무당쇄(aglycosylated) Fc 도메인도 포함된다. Fc 도메인 혹은 변이체는 배양조건 혹은 호스트의 유전자 조작을 통해 조정된 숫자의 시알산(sialic acid), 푸코실화(fucosylation), 당화(glycosylation)를 갖도록 한 것일 수 있다.
- [220] 또한, 화학적 방법, 효소적 방법 및 미생물을 사용한 유전공학적 엔지니어링

방법 등과 같이 통상적인 방법으로 면역글로불린의 Fc 도메인의 당쇄를 변형시킬 수 있다. 또한, 상기 Fc 도메인 변이체는 면역글로불린은 IgG, IgA, IgE, IgD 또는 IgM의 Fc 영역이 혼합된 형태일 수 있다. 또한, 상기 Fc 도메인 변이체는 상기 Fc 도메인의 일부 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 형태일 수 있다. 상기 Fc 도메인 변이체의 일 구체예로는 서열번호 12의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

- [221] 융합단백질은 Fc 도메인을 링커(혹은 캐리어)로 하여 이의 N-말단과 C-말단에 각각 CD80과 IL-2 단백질이 연결되거나 혹은 IL-2와 CD80이 연결된 구조를 가질 수 있다. Fc 도메인의 N-말단 혹은 C-말단과 CD-80 혹은 IL-2의 연결은 임의적으로 링커 펩타이드에 의해 이루어질 수 있다.
- [222] 구체적으로, 상기 융합단백질은 하기 구조식(I) 또는 (II)로 이루어진 것일 수 있다:
- [223] N'-X-[링커(1)]n-Fc 도메인-[링커(2)]m-Y-C' (I)
- [224] N'-Y-[링커(1)]n-Fc 도메인-[링커(2)]m-X-C' (II)
- [225] 이때, 상기 구조식(I) 및 (II)에 있어서,
- [226] 상기 N'은 융합단백질의 N-말단이고,
- [227] 상기 C'는 융합단백질의 C-말단이며,
- [228] 상기 X는 CD80 단백질이고,
- [229] 상기 Y는 IL-2 단백질이며,
- [230] 상기 링커(1) 및 링커(2)는 펩타이드 링커이고,
- [231] 상기 n 및 m은 각각 독립적으로, 0 또는 1이다.
- [232] 바람직하게는, 상기 융합단백질은 구조식(I)로 이루어진 것일 수 있다. 상기 IL-2 단백질은 상술한 바와 같다. 또한, 상기 CD80 단백질은 상술한 바와 같다. 일 구체예에 따르면, IL-2 단백질은 야생형 IL-2와 비교하여 1개에서 5개까지의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체일 수 있다. CD80 단백질은 야생형 CD80의 N-말단 혹은 C-말단으로부터 연속적으로 약 34개까지의 아미노산 잔기가 절실된(truncated) 단편일 수 있다. 혹은 CD80 단백질은 T 세포 표면 수용체(T cell surface receptors) CTLA-4와 CD28에 결합하는 활성을 갖는 세포외 면역글로불린-유사 도메인일 수 있다.
- [233] 구체적으로, 상기 융합단백질은 서열번호 9, 26, 28 또는 30의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 또 다른 구체예에 따르면, 융합단백질은 서열번호 9, 26, 28 또는 30의 아미노산 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 혹은 100%의 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이때, 동일성은, 예를 들어, 퍼센트 상동성, NCBI(National Center of Biotechnology Information)의 BlastN software과 같은 상동성 비교 소프트웨어를 통해 결정될 수 있다.
- [234] 상기 CD80 단백질과 Fc 도메인의 사이에는 펩타이드 링커(1)가 포함될 수 있다. 상기 펩타이드 링커(1)은 5 내지 80개의 연속된 아미노산, 20 내지 60개의

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

- [235] 상기 펩타이드 링커(2)는 1 내지 50개의 연속된 아미노산, 또는 3 내지 30개의 연속된 아미노산, 또는 5 내지 15개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 일 구체예로 상기 펩타이드 링커(2)는 $(G4S)_n$ (이때, n 은 1 내지 10의 정수) 일 수 있다. 이때, $(G4S)_n$ 에서 n 은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10일 수 있다. 일 실시예로, 상기 펩타이드 링커(2)가 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커일 수 있다.
- [236] 본 발명의 다른 측면은, 상기 IL-2 단백질 및 상기 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 두 개가 결합된 이량체를 제공한다. 상기 IL-2 또는 이의 변이체 및 CD80 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질은 상술한 바와 같다.
- [237] 이때, 이량체를 구성하는 융합단백질 간의 결합은 링커 내에 존재하는 시스테인에 의해 이황화 결합에 의해 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이량체를 구성하는 융합단백질은 동일한 것일 수도 있으나, 서로 상이한 융합단백질일 수 있다. 바람직하게는, 상기 이량체는 동형이량체(homodimer)인 것일 수 있다. 상기 이량체를 구성하는 융합단백질의 일 실시예는 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 단백질일 수 있다.
- [238] **약학적 용도**
- [239] 본 발명의 IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 이량체 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물은 암 치료 및/또는 예방 효능(efficacy)을 증가시킬 수 있다.
- [240] 상기 IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 또는 상기 융합단백질 2개가 결합된 융합단백질 이량체는 상술한 바와 같다.
- [241] 상기 암은 위암, 간암, 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 자궁경부암, 갑상선암, 후두암, 급성 골수성 백혈병, 뇌종양, 신경모세포종, 망막 모세포종, 두경부암, 침샘암 및 림프종으로 구성된 군에서 선택될 수 있다.
- [242] 상기 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 암 예방 또는 치료용 약학 조성물에서 그 유효성분은 항암 활성을 나타낼 수 있는 한, 용도, 제형, 배합 목적 등에 따라 임의의 양(유효량)으로 포함될 수 있는데, 통상적인 융합단백질의 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001 중량% 내지 20.0 중량% 범위 내에서 결정될 것이다. 여기서 "유효량"이란 항암 효과를 유도할 수 있는 유효성분의 양을 말한다.

- 이러한 유효량은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 실험적으로 결정될 수 있다.
- [243] 본 명세서에서 사용된 용어, “치료”는 치료학적 처리 및 예방적 처리를 모두 포함하는 의미로 사용될 수 있다. 이때, 예방은 개체의 병리학적 상태 또는 질환을 완화시키거나 감소시키는 의미로 사용될 수 있다. 일 구체예에서, 용어 “치료”는 인간을 포함한 포유류에서 질환을 치료하기 위한 적용이나 어떠한 형태의 투약을 모두 포함한다. 또한, 상기 용어는 질환 또는 질환의 진행을 억제하거나 늦추는 것을 포함하며; 손상되거나, 결손된 기능을 회복시키거나, 수리하여, 질환을 부분적이거나 완전하게 완화시키거나; 또는 비효율적인 프로세스를 자극하거나; 심각한 질환을 완화하는 의미를 포함한다.
- [244] 본 명세서에서 사용된 용어, “효능(efficacy)”은 1년, 5년, 또는 10년과 같이 일정 기간에 걸쳐 생존 또는 질병이 없는 상태에서 생존(disease-free survival)과 같은 하나 이상의 파라미터에 의해 결정될 수 있다. 뿐만 아니라, 상기 파라미터는 개체에서 적어도 하나의 종양의 크기가 억제되는 것을 포함할 수 있다.
- [245] 생체이용률과 같은 약동학적 파라미터(Pharmacokinetic parameters) 및 클리어런스율(clearance rate)과 같은 기본적인 파라미터(underlying parameters)도 효능에 영향을 줄 수 있다. 따라서, “향상된 효능”(예를 들어, 효능의 개선)은 향상된 약동학적 파라미터 및 향상된 효능에 기인할 수 있으며, 시험 동물 또는 인간 대상체에서 클리어런스율 및 종양 성장을 비교하거나, 생존, 재발율 또는 질병이 없는 상태에서 생존과 같은 파라미터를 비교하여 측정될 수 있다.
- [246] 여기서 “치료학적으로 유효한 양” 또는 “약학적으로 유효한 양”이란 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 화합물 또는 조성물의 양으로서, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미한다. 상기 유효량의 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 일 구체예에서 치료학적으로 유효한 양은 암을 치료하는데 효과적인 약물의 양을 의미한다.
- [247] 이때, 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 환자에게 전달하기에 적절한 비-독성 물질이면 어떠한 담체라도 가능하다. 증류수, 알코올, 지방, 왁스 및 비활성 고체가 담체로 포함될 수 있다. 약물학적으로 허용되는 애쥬번트(완충제, 분산제) 또한 약학 조성물에 포함될 수 있다.
- [248] 구체적으로, 상기 약학 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하여 당업계에 공지된 통상의 방법으로 투여 경로에 따라 비경구용 제형으로 제조될 수 있다. 여기서 “약제학적으로 허용되는” 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적용 가능한 이상의 독성을 지니지 않는다는 의미이다.

- [249] 상기 약학 조성물이 비경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 주사제, 경피 투여제, 비강 흡입제 및 좌제의 형태로 제제화될 수 있다. 주사제로 제제화할 경우 적합한 담체로서는 멸균수, 에탄올, 글리세롤이나 프로필렌 글리콜 등의 폴리올 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline)나 주사용 멸균수, 5% 덱스트로스 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 약제학적 조성물의 제제화와 관련하여서는 당업계에 공지되어 있으며, 구체적으로 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)] 등을 참조할 수 있다. 상기 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주된다.
- [250] 상기 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 성별, 연령, 환자의 중증도, 투여 경로에 따라 1일 0.01 ug/kg 내지 10 g/kg 범위, 또는 0.01 mg/kg 내지 1 g/kg 범위일 수 있다. 투여는 1일 1회 또는 수회로 나누어 이루어질 수 있다. 이러한 투여량은 어떠한 측면으로든 본원 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 아니 된다.
- [251] 상기 약학 조성물이 적용(처방)될 수 있는 대상은 포유동물 및 사람이며, 특히 사람인 경우가 바람직하다. 본원의 약학 조성물은 유효성분 이외에, 항암 활성의 상승·보강을 위하여 이미 안전성이 검증되고 항암 활성을 갖는 것으로 공지된 임의의 화합물이나 천연 추출물을 추가로 포함할 수 있다.
- [252] **융합단백질 이량체 및 항암제를 포함하는 조성물의 용도**
- [253] 본 발명의 또 다른 측면은, 암 질환을 치료하기 위한, CD80 단백질 또는 이의 단편 및 IL-2 단백질 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질 이량체 및 항암제를 포함하는 병용 투여용 조성물의 용도를 제공한다.
- [254] 본 발명의 또 다른 측면은, 암 질환의 치료효과를 향상(enhance)시키기 위한 IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 이량체 및 항암제를 포함하는 병용 투여용 조성물의 용도를 제공한다.
- [255] 본 발명의 또 다른 측면은, 유지 요법을 위한 CD80 단백질 또는 이의 단편 및 IL-2 단백질 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질 이량체의 용도를 제공한다. 이때, 항암제를 더 포함할 수 있다.
- [256] 본 발명의 또 다른 측면은, IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 또는 상기 융합단백질 2개가 결합된 융합단백질 이량체 및 항암제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 질환을 치료하는 방법 및/또는 치료효과를 향상시키는 방법을 제공한다.
- [257] 상기 개체는 암을 앓고 있는 개체일 수 있다. 또한 상기 개체는 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다. 상기 IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 또는 상기 융합단백질 2개가 결합된 융합단백질 이량체는 상술한 바와 같다.
- [258] 상기 융합 단백질 또는 융합단백질 이량체의 투여경로, 투여량 및 투여횟수는 환자의 상태 및 부작용의 유무에 따라 다양한 방법 및 양으로 대상에게 투여될

수 있고, 최적의 투여방법, 투여량 및 투여횟수는 통상의 기술자가 적절한 범위로 선택할 수 있다. 또한, 상기 융합 단백질 또는 융합단백질 이량체는 치료하고자 하는 질환에 대하여 치료효과가 공지된 다른 약물(예를 들어, 상술한 항암제) 또는 생리학적 활성물질과 병용하여 투여되거나, 다른 약물과의 조합 제제 형태로 제형화될 수 있다.

- [259] 본 발명의 일 구체예의 융합단백질은 IL-2의 활성으로 인해 자연살해세포와 같은 면역세포를 활성화시킬 수 있다. 따라서, 암 질환에 효과적으로 활용할 수 있다. 특히, 야생형과 비교하여 2개 내지 5개 위치의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체, 특히 서열번호 10의 아미노산 서열에서 R38A, F42A, Y45A, E61R 및 L72G로 구성된 군에서 선택되는 위치에서 두 군데, 세 군데, 네 군데 또는 다섯 군데의 위치의 아미노산 치환을 포함하는 IL-2 변이체는 IL-2 수용체의 알파 체인과의 결합력을 낮추어 종래 IL-2가 가지고 있는 약리학적 부작용을 개선된 특성을 보이는 것이 확인되었다. 따라서, 이런 IL-2 변이체는 단독으로 혹은 융합단백질의 형태로 사용할 경우 종래에 알려진 IL-2의 문제점인 혈관(또는 모세관) 누출 증후군(VLS)의 발생을 감소시킬 수 있다.
- [260] IL-2 단백질 또는 이의 변이체, CD80 단백질 또는 이의 변이체 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물
- [261] 본 발명의 또 다른 측면으로, IL-2 또는 이의 변이체, CD80 단백질 또는 이의 변이체 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 조성물을 제공한다.
- [262] 이때, 상기 IL-2 또는 이의 변이체는 상술한 바와 같다. 또한, IL-2 또는 이의 변이체는 면역글로불린 Fc 영역을 더 포함할 수 있다. 이때, IL-2 또는 이의 변이체는 Fc 영역의 N 말단 또는 C 말단에 결합할 수 있다. 일 구체예로 IL-2 또는 이의 변이체는 Fc 영역의 C 말단에 결합할 수 있다. 또한, IL-2의 변이체는 상술한 바와 같이 두 곳의 아미노산이 치환된 형태이거나, 세 곳의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 이때, IL-2 또는 이의 변이체는 Fc 영역에 직접 결합할 수도 있으나, 펩타이드 링커를 통해 결합될 수 있다. 이때, 펩타이드 링커는 상술한 링커 중 어느 하나 일 수 있다.
- [263] 또한, 상기 CD80 단백질 또는 이의 변이체는 상술한 바와 같다. 또한, CD80 또는 이의 변이체는 면역글로불린 Fc 영역을 더 포함할 수 있다. 이때, CD80 또는 이의 변이체는 Fc 영역의 N 말단 또는 C 말단에 결합할 수 있다. 이때, CD80은 단편의 형태일 수 있으며, V domain을 포함하는 CD80의 단편일 수 있다. 일 구체예로 CD80 또는 변이체는 Fc 영역의 N 말단에 결합할 수 있다. 또한, CD80의 변이체는 이의 활성이 유지되는 한 다양한 형태의 변이체 일 수 있다.
- [264] 또한, 상기 항암제는 상술한 다양한 종류의 항암제 중 선택되는 어느 하나 일 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [265] 이하, 본원 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기

실시에는 본원 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본원 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[266] **I. 융합단백질 제조**

[267] **제조예 1. hCD80-Fc-IL-2 변이체(2M)의 제조: GI101**

[268] 인간 CD80 단편, Fc 도메인 및 IL-2 변이체를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), CD80 단편(서열번호 2), Ig 힌지(서열번호 3), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 두 개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(2M)(R38A, F42A)(서열번호 6)를 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 8)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 9의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37°C, 125 rpm, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질을 "GI101"로 명명하였다.

[269] 정제는 MabSelect SuRe protein A resin이 포함된 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 25 mM Tris, 25 mM NaCl, pH 7.4의 조건에서 융합단백질을 결합시켰다. 그 후, 100 mM NaCl, pH 3의 100 mM의 아세트산으로 용출하였다. pH 9의 20%의 1 M Tris-HCl를 수거용 튜브에 넣은 후, 융합단백질을 수거하였다. 수거된 융합단백질을 16시간 동안 PBS 버퍼로 투석하여 바꾸어 주었다.

[270] 그 후, TSKgel G3000SWXL column(TOSOH Bioscience)을 사용하여 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)를 이용하여 시간에 따른 280 nm 파장에서의 흡광도를 측정하여 고농도 융합단백질을 확보하였다. 이때, 분리 정제된 융합단백질은 reduced(R) 또는 non-reduced(NR) 조건하에서 SDS-PAGE를 실행하고, 코마시블루(coomassie blue)로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 6). NanoDrop을 사용하여 검출시 2.78 mg/ml의 농도로 융합단백질이 포함된 것을 확인하였다(도 7). 또한, 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 분석한 결과는 도 8에 나타난 바와 같다.

[271] **제조예 2. mCD80-Fc-IL-2 변이체(2M)의 제조: mGI101**

[272] 마우스 CD80, Fc 도메인 및 IL-2 변이체를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), mCD80(서열번호 13), Ig 힌지(서열번호 3), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 두 개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(2M)(R38A, F42A)(서열번호 6)를 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 14)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 15의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37°C, 125 rpm, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질을 "mGI101"로 명명하였다.

- [273] 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 분리 정제된 융합단백질은 reduced(R) 또는 non-reduced(NR) 조건하에서 SDS-PAGE를 실행하고, 코마시블루로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 9). NanoDrop을 사용하여 흡광도 280 nm로 검출시 1.95 mg/ml의 농도로 융합단백질이 포함된 것을 확인하였다.
- [274] **제조예 3. hCD80-Fc의 제조: GI101C1**
- [275] 인간 CD80 단편 및 Fc 도메인을 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), CD80 단편(서열번호 2), Ig 힌지(서열번호 3) 및 Fc 도메인(서열번호 4)를 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 16)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 17의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37°C, 125 rpm, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질을 "GI101C1"으로 명명하였다.
- [276] 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 분리 정제된 융합단백질은 reduced(R) 또는 non-reduced(NR) 조건하에서 SDS-PAGE를 실행하고, 코마시블루로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 10). NanoDrop을 사용하여 흡광도 280 nm로 검출시 3.61 mg/ml의 농도로 융합단백질이 포함된 것을 확인하였다.
- [277] **제조예 4. Fc-IL-2 변이체(2M)의 제조: GI101C2**
- [278] Fc 도메인 및 IL-2 변이체를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 두 개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(2M)(R38A, F42A)(서열번호 6)를 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 18)을 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 19의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37°C, 125 rpm, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질을 "GI101C2"으로 명명하였다.
- [279] 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 분리 정제된 융합단백질은 reduced(R) 또는 non-reduced(NR) 조건하에서 SDS-PAGE를 실행하고, 코마시블루로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 11). NanoDrop을 사용하여 흡광도 280 nm로 검출시 4.79 mg/ml의 농도로 융합단백질이 포함된 것을 확인하였다.
- [280] **제조예 5. mCD80-Fc의 제조: mGI101C1**
- [281] 마우스 CD80 및 Fc 도메인을 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널

펩타이드(서열번호 1), 마우스 CD80(서열번호 13), Ig 힌지(서열번호 3) 및 Fc 도메인(서열번호 4)을 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 20)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 21의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37°C, 125 rpm, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합 단백질을 "mGI101C1"으로 명명하였다.

[282] 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 분리 정제된 융합단백질은 reduced(R) 또는 non-reduced(NR) 조건하에서 SDS-PAGE를 실행하고, 코마시블루로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 12). NanoDrop을 사용하여 흡광도 280 nm로 검출시 2.49 mg/ml의 농도로 융합단백질이 포함된 것을 확인하였다.

[283] 상기 제조예 1 내지 5에서 제작한 융합단백질들을 하기 표 1에 정리하여 나타냈다.

[284] [표1]

구분	N 말단	링커	C 말단
제조예 1(GI101)	hCD80 단편	Fc 도메인	hIL-2m
제조예 2(mGI101)	mCD80 단편	Fc 도메인	hIL-2m
제조예 3(GI101C1)	CD80 단편	Fc 도메인	-
제조예 4(GI101C2)	-	Fc 도메인	IL-2m
제조예 5(mGI101C1)	mCD80 단편	Fc 도메인	-

[285] **제조예 6. CD80-Fc-IL-2의 제조: GI101w**

[286] 인간 CD80 단편, Fc 도메인 및 인간 IL-2를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), CD80 단편(서열번호 2), Ig 힌지(서열번호 3), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 성숙된 인간 IL-2(서열번호 10)를 포함하는 N-말단으로부터 이 순서대로 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 31)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 32의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37°C, 125 rpm, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질을 "GI101w"로 명명하였다. 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다.

[287] **제조예 7. hCD80-Fc-IL-2 변이체(3M)의 제조: GI102-M45**

- [288] 인간 CD80 단편, Fc 도메인 및 세개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(3M)(R38A, F42A, Y45A)(GI102-M45)를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), CD80 단편(서열번호 2), Ig 힌지(서열번호 3), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 IL-2 변이체(서열번호 22)를 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 25)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 26의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37°C, 125 rpm, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질을 "GI102-M45"로 명명하였다.
- [289] 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 분리 정제된 융합단백질은 reduced(R) 또는 non-reduced(NR) 조건하에서 SDS-PAGE를 실행하고, 코마시블루로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 13).
- [290] **제조예 8. hCD80-Fc-IL-2 변이체(3M)의 제조: GI102-M61**
- [291] 인간 CD80 단편, Fc 도메인 및 세개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(3M)(R38A, F42A, E61R)(GI101-M61)를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), CD80 단편(서열번호 2), Ig 힌지(서열번호 3), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 IL-2 변이체(서열번호 23)를 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 27)을 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 28의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37°C, 125 rpm, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질을 "GI102-M61"로 명명하였다.
- [292] 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 분리 정제된 융합단백질은 reduced(R) 또는 non-reduced(NR) 조건하에서 SDS-PAGE를 실행하고, 코마시블루로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 14).
- [293] **제조예 9. hCD80-Fc-IL-3M의 제조: GI102-M72**
- [294] 인간 CD80 단편, Fc 도메인 및 세 개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(3M)(R38A, F42A, L72G)(GI102-M72)를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), CD80 단편(서열번호 2), Ig 힌지(서열번호 3), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 IL-2 변이체(서열번호 24)를 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 29)을 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 30의

융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37°C, 125 rpm, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질을 "GI102-M72"로 명명하였다.

[295] 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 분리 정제된 융합단백질은 reduced(R) 또는 non-reduced(NR) 조건하에서 SDS-PAGE를 실행하고, 코마시블루로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 15).

[296] 제조예 10. mCD80-Fc-IL-3M의 제조: mGI102-M61

[297] 마우스 CD80 단편, Fc 도메인 및 세개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(3M)(R38A, F42A, E61R)(GI102-M61)를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), mCD80 단편(서열번호 13), Ig 힌지(서열번호 3), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 IL-2 변이체(서열번호 23)를 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 33)을 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 34의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37°C, 125 rpm, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질을 "mGI102-M61"로 명명하였다.

[298] 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다.

[299] II. 융합단백질과 리간드의 결합 친화성 확인

[300] 융합단백질과 리간드의 결합 친화성을 확인하기 위해, Octet RED 384를 이용하여 결합 친화성을 측정하였다.

[301] 실험예 1. hCTLA-4 및 GI101 간의 결합 친화성 확인

[302] AR2G 바이오센서(Amine Reactive 2nd gen, ForteBio, Cat: 18-5092)를 Microplate-96-well(GreinerBio-one, Cat:655209)에 증류수를 200 μ l씩 담고 미리 수화시켰다. AR2G 바이오센서에 붙일 리간드(CTLA-4, Human CTLA-4/CD152, His tag, Sino Biological, Cat: 11159-H08H)를 10 mM 농도의 아세트레이트 버퍼(pH 5, AR2G reagent Kit, ForteBio, Cat: 18-5095)에 5 μ g/ml 농도가 되도록 희석하였다. 또한, 리간드에 붙을 GI101을 1,000 nM, 500 nM, 250 nM, 125 nM 또는 62.5 nM 농도가 되도록 1X AR2G kinetic buffer(AR2G reagent Kit, ForteBio, Cat: 18-5095)에 희석시켰다. Activation buffer는 증류수에 20 mM 농도의 EDC 및 10 mM 농도의 s-NHS(AR2G reagent Kit, ForteBio, Cat: 18-5095)를 혼합하여 제작하였다. Microplate-384-well(GreinerBio-one, Cat: 781209)에 각 시약을 80 μ l씩 넣고 프로그램을 세팅하였다.

[303] 그 결과, hCTLA-4와 GI101 간의 결합 친화성이 도 16에 나타난 바와 같이 측정되었다.

[304] 실험예 2. hPD-L1/GI101 및 hPD-L1/PD-1 간의 결합 친화성 확인

[305] Ni-NTA(Nickel charged Tris-NTA, Ni-NTA 바이오센서, ForteBio, 18-5101)를

Microplate-96-well에 1X Ni-NTA kinetic buffer(10X Kinetics buffer, ForteBio, 18-1042)를 200 μl 씩 담고 미리 수화시켰다. Ni-NTA 바이오센서에 붙일 리간드(Human PD-L1/B7-H1 protein, His-tag, Sino biological, Cat: 10084-H08H)를 1X Ni-NTA kinetic buffer에 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도가 되도록 희석하였다. 리간드에 붙을 GI101을 1,000 nM, 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62.5 nM로 1X Ni-NTA kinetic buffer에 희석하였다. 또한, 리간드에 붙을 인간 PD-1/PDCD1(Human PD-1/PDCD1, Fc Tag, Sino Biological, Cat: 10377-H02H)을 2,000 nM, 1,000 nM, 500 nM, 250 nM 또는 125 nM 농도가 되도록 1X Ni-NTA kinetic buffer에 희석시켰다. 그 후, Microplate-384-well에 각 시약을 80 μl 씩 넣고 프로그램을 세팅하였다.

- [306] 그 결과, hPD-L1과 GI101 간의 결합 친화성은 도 17에 나타난 바와 같이 측정되었다. 또한, hPD-L1과 hPD-1 간의 결합 친화성은 도 18에 나타난 바와 같이 측정되었다.
- [307] **실험예 3. mCTLA-4 및 mGI101 간의 결합 친화성 확인**
- [308] 실험예 1과 동일한 방법으로 mCTLA-4 및 mGI101 간의 결합 친화성을 확인하였다. 이때, 사용한 장비는 다음과 같다: 바이오센서: AR2G, 리간드: mCTLA-4(재조합 마우스 CTLA-4 Fc 키메라, R&D systems, Cat: 434-CT-200), 분석물: mGI101(500 nM, 250 nM, 125 nM, 62.5 nM, 31.3 nM).
- [309] 그 결과, mCTLA-4 및 mGI101 간의 결합 친화성은 도 19에 나타난 바와 같이 측정되었다.
- [310] **실험예 4. mPD-L1 및 mGI101 간의 결합 친화성 확인**
- [311] 실험예 1과 동일한 방법으로 mPD-L1 및 mGI101 간의 결합 친화성을 확인하였다. 이때, 사용한 장비는 다음과 같다. 바이오센서: AR2G, 리간드: mPD-L1(재조합 마우스 mGI101 B7-H1/PD-L1 Fc 키메라, R&D systems, Cat: 434-CT-200), 분석물: mGI101(500 nM, 250 nM, 125 nM, 62.5 nM, 31.3 nM).
- [312] 그 결과, mPD-L1 및 mGI101 간의 결합 친화성은 도 20에 나타난 바와 같이 측정되었다.
- [313] **실험예 5. GI-101(hCD80-Fc-hIL-2v)의 CTLA-4에 대한 결합력 확인**
- [314] 결합 동역학 측정은 30°C 및 1,000 rpm의 교반을 통한 Octet RED 384 기기(ForteBio, Pall Life Science)를 이용하여 수행하였다. CTLA-4에 대한 결합력 측정은 Amine Reactive 2 generation(AR2G) 바이오센서칩을 사용하여 측정하고, PD-L1에 대한 결합력 측정은 Nickel charged Tris-NTA(Ni-NTA) 바이오센서칩을 사용하여 측정하였다. Human CTLA-4-His Tag(Sino Biological, Cat: 11159-H08H)은 AR2G 바이오센서칩을 400 mM EDC와 100 mM sulfo-NHS의 조합으로 활성화시킨 후, 10 mM 아세트이트 완충액(pH 5)으로 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석하여 AR2G 바이오센서에 300초간 로딩해서 고정시켰다.
- [315] 그런 다음, 다양한 농도의 GI-101(hCD80-Fc-hIL-2v), GI-101C1(hCD80-Fc), Ipilimumab(Bristol-Myers Squibb) 및 GI-101C2(Fc-hIL-2v)와의 결합을 300초 동안

측정하고 해리 역시도 300초 동안 측정하였다. 결합 동역학 분석은 Pall사에서 제공하는 Octet Data analysis HT software ver 10을 사용하였다. 그 결과는 도 21에 나타냈다.

- [316] 실험예 6. IL-2R α 또는 IL-2R β 와 GI101 간의 결합 친화성 확인
- [317] IL-2R α 에 대한 결합력 측정은 AR2G 바이오센서를 사용하여 측정하였고, IL-2R β 에 대한 결합력 측정은 Ni-NTA 바이오센서(Nickel charged Tris-NTA, Ni-NTA 바이오센서, ForteBio, 18-5101)를 사용하여 측정하였다.
- [318] AR2G 바이오센서에 붙일 리간드(IL-2R α -His Tag, Acro, Cat: ILA-H52H9)를 10 mM 농도의 아세트이트 버퍼(pH 5, AR2G reagent Kit, ForteBio, Cat: 18-5095)에 5 μ g/ml 농도가 되도록 희석하였다. AR2G 바이오센서를 400 mM 농도의 EDC와 100 mM 농도의 sulfo-NHS를 혼합시켜 제조한 버퍼로 활성화시킨 후, 희석시켜둔 리간드를 AR2G 바이오센서에 300초 동안 로딩해서 고정시켰다.
- [319] 한편, Ni-NTA 바이오센서에 붙일 리간드(IL-2R β -His Tag, Acro, Cat: CD2-H5221)를 1X Ni-NTA kinetic buffer에 5 μ g/ml 농도가 되도록 희석하였다. 희석시킨 리간드를 Ni-NTA 바이오센서에 600초 동안 로딩해서 고정시켰다.
- [320] 그 후, 리간드에 붙을 다양한 농도의 GI101, GI101w 또는 Proleukin(Novartis, hIL-2)을 300초 동안 로딩한 후, 결합을 측정하고, 해리도 300초 동안 측정하였다. 결합 동역학 분석은 Pall사에서 제공하는 Octet Data analysis HT software ver. 10을 사용하였다. 그 결과를 도 22 내지 도 24에 나타냈다.
- [321] 그 결과, GI101이 GI101w 및 Proleukin에 비해 IL-2 수용체의 IL-2R α 에 대한 결합력은 낮고, IL-2R β 에 대한 결합력이 높은 것을 확인하였다.
- [322] 실험예 7. 융합단백질과 리간드의 결합 친화성 측정
- [323] 융합단백질과 리간드의 결합 친화성을 확인하기 위해, Octet RED 384를 이용하여 결합 친화성을 측정하였다.
- [324] 실험예 7.1. IL-2 alpha receptor와 GI101-M45, GI101-M61 및 GI101-M72의 결합 친화성 확인
- [325] AR2G 바이오센서(Amine Reactive 2nd gen, ForteBio, Cat: 18-5092)를 Microplate-96-well(GreinerBio-one, Cat:655209)에 증류수(DW)를 200 μ l씩 담고 미리 수화시켰다. 바이오센서에 붙일 리간드(Ligand)(Human IL-2 R alpha protein, His Tag, Acro, ILA-H52H9)를 10 mM 아세트이트 pH 5 버퍼(AR2G reagent Kit, ForteBio, Cat: 18-5095)에 5 μ g/ml의 농도로 희석하였다. 리간드에 붙을 분석물(GI101-M45, GI101-M61, GI101-M72)을 각각 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62.5 nM로 1X AR2G kinetic buffer(AR2G reagent Kit, ForteBio, Cat: 18-5095)에 희석하였다. Activation buffer는 DW에 20 mM EDC, 10 mM s-NHS(AR2G reagent Kit, ForteBio, Cat: 18-5095)의 농도로 제작하였다. Microplate-384-well(GreinerBio-one, Cat:781209)에 각 시약을 80 μ l씩 넣고 프로그램을 세팅하였다.
- [326] 그 결과, IL-2 alpha receptor와 GI101-M45간의 결합 친화성은 도 25에 나타낸

- 바와 같다. 또한, IL-2 alpha receptor와 GI101-M61간의 결합 친화성은 도 26에, IL-2 alpha receptor와 GI101-M72 간의 결합 친화성은 도 27에 나타낸 바와 같다.
- [327] **실험예 7.2. IL-2R β 에 대한 GI102-M45, GI102-M61 및 GI102-M72의 결합 친화성 확인**
- [328] Ni-NTA 바이오 센서를 Microplate-96-well에 1X Ni-NTA kinetic buffer(10X Kinetics buffer, ForteBio, 18-1042)를 200 μ l씩 담고 미리 수화시켰다. 바이오 센서에 붙일 리간드(Human IL-2 R beta protein, His-Tag, Acro, CD2-H5221)를 1X Ni-NTA kinetic buffer에 2 μ g/ml 농도가 되도록 희석하였다. 리간드에 붙을 GI102-M45, GI102-M61 또는 GI102-M72를 500 nM, 250 nM, 125 nM 또는 62.5 nM 농도가 되도록 1X Ni-NTA kinetic buffer에 희석시켰다. Microplate-384-well에 각 시약을 80 μ l씩 넣고 프로그램을 세팅하였다.
- [329] 그 결과, IL-2R β 와 GI102-M45 간의 결합 친화성은 도 28에 나타난 바와 같이 측정되었으며, IL-2R β 와 GI102-M61 간의 결합 친화성은 도 29에 나타난 바와 같이 측정되었다. 또한, IL-2R β 와 GI102-M72 간의 결합 친화성은 도 30에 나타난 바와 같이 측정되었다.
- [330] **III. 융합단백질의 면역 활성 확인**
- [331] **실험예 8. 융합단백질에 의한 IFN- γ 생산량 확인**
- [332] **실험예 8.1. CFSE-labeled PBMC의 배양**
- [333] 인간에게서 분리한 PBMC(Peripheral blood mononuclear cells)를 1 μ M 농도의 CellTrace CFSE 염료와 37°C에서 20분간 반응을 시켜 CFSE(carboxyfluorescein succinimidyl ester)로 라벨링 시켰다. 세포에 결합하지 않은 CFSE는 염색 반응 용액의 5배 되는 배양 배지와 5분간 반응시킨 후, 1,300 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 제거하였다. CFSE가 라벨링된 PBMC는 배양 배지(10% 우태아 혈청(FBS), 10 mM HEPES, 100 U/ml 페니실린/스트렙토마이신, 1 mM sodium pyruvate, 55 μ M 2-머캅토에탄올, 1 mM 비필수 아미노산 및 2 mM L-글루타민이 함유된 RPMI1640 배지)에 재현탁 시킨 후, Microplate-96-well에 각 웰 당 1x10⁵ 세포수 만큼 넣고, 5 μ g/ml의 PHA(Lectin from Phaseolus Vulgaris, red kidney bean, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, cat No. L1668-5MG)와 GI101, GI101C1, GI101C2 또는 IL-2(Aldesleukin; 인간 재조합 IL-2, Novartis)를 처리하여 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 6일 동안 배양하였다.
- [334] 이때, GI101, GI101C1, GI101C2 및 IL-2는 1 nM, 10 nM 또는 100 nM 농도로 처리하였다. 세포는 FACS로 분석하였고, ELISA kit(Biolegend, San Diego, CA, USA, cat No.430103)를 이용하여 배양배지에 존재하는 인간 IFN- γ 를 측정하였다.
- [335] **실험예 8.2. FACS 분석**
- [336] 상층액이 제거된 세포 펠릿을 FACS 버퍼(3% 우태아 혈청, 10 mM EDTA, 1 M HEPES, 100 unit/ml 페니실린, 스트렙토마이신, 1 mM sodium pyruvate)로 씻어준 뒤, Fc blocker(Biolegend, cat NO. 422302)와 4°C에서 5분간 반응시켰다. 그 후, APC anti-CD3 Ab(Biolegend, cat NO. 300412)와 PE anti-CD8a Ab(Biolegend, cat

NO. 300908)를 처리하고 4°C에서 20분간 반응시킨 후 FACS buffer로 세척하였다. 세포 펠렛은 FACS 버퍼에 재현탁 시킨 후, BD LSR Fortessa(BD biosciences, San Diego, CA, USA)와 FlowJo Software를 사용하여 분석하였다.

[337] **실험예 8.3. Human IFN- γ ELISA**

[338] 세포를 배양했던 각 샘플들의 상층액에 분비된 인간 IFN- γ 의 양은 인간 IFN- γ ELISA kit(Biolegend, cat No.430103)를 사용하여 측정하였다. 간단히 설명하면, 항 인간-IFN- γ 항체를 ELISA 플레이트에 넣고, 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켜 코팅시켰다. 그 후, 1% BSA가 첨가된 PBS 용액으로 상온에서 1시간 동안 블로킹시켰다. 워싱버퍼(0.05% Tween-20 in PBS)로 세척한 후, 표준 용액 및 각각의 샘플들을 적절히 희석하여 넣은 후 실온에서 2시간 반응시켰다.

[339] 반응이 끝난 후, 플레이트를 세척하여 2차 항체(detection antibody)를 넣고 상온에서 1시간 반응시켰다. 워싱버퍼로 세척한 후, Avidin-HRP 용액을 넣고 실온에서 30분간 반응시키고, 기질용액을 넣어 상온인 어두운 곳에서 20분간 발색반응을 유도시켰다. 마지막으로 H₂SO₄을 넣어 발색반응을 중지시켜 Epoch Microplate Spectrophotometer(BioTek instruments, Winooski, VT, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 농도계산을 하였다.

[340] 그 결과, GI101로 처리한 세포가 GI101C1, GI101C2 또는 IL-2를 처리한 세포보다 IFN- γ 분비량이 현저하게 증가한 것을 확인하였다(도 31 및 도 32).

[341] **실험예 9. GI101이 CD8+ T 세포의 증식에 미치는 영향 확인**

[342] 인간에서 분리한 PBMC(Peripheral blood mononuclear cells)를 1 μ M 농도의 CellTrace CFSE 염료와 37°C에서 20분간 반응을 시켜 CFSE로 라벨링시켰다. 세포에 결합하지 않은 CFSE는 염색반응 용액의 5배되는 배양 배지와 5분간 반응시킨 후, 1,300 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 제거하였다. CFSE가 라벨링된 PBMC는 배양배지(10% 우태아 혈청, 10 mM HEPES, 100 U/ml 페니실린/스트렙토마이신, 1 mM sodium pyruvate, 55 μ M 2-머캅토에탄올, 1 mM 비필수 아미노산 및 2 mM L-글루타민이 함유된 RPMI1640 배지)에 재현탁 시킨 후, Microplate-96-well에 각 웰 당 1x10⁵ 세포수 만큼 넣었다.

[343] 그 후, 1 μ g/ml의 항 CD3 ϵ 항체(Biolegend cat No. L1668-5MG) 및 GI101, GI101C1, GI101C2 또는 Proleukin(Novartis)을 처리하여, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6일동안 배양하였다. 이때, GI101, GI101C1, GI101C2 및 IL-2는 100 nM 농도로 세포에 처리하였다. 배양된 세포들은 APC-TCR $\alpha\beta$ 항체와 PE-CD8 α 항체를 사용한 FACS 분석방법으로 CD8+ T 세포들 중 CFSE로 라벨링 되지 않은 세포들의 비율 정도를 측정함으로써 이 세포들의 증식 정도를 조사하였다.

[344] 그 결과, GI101이 *in vitro*에서 야생형 IL-2인 Proleukin에 유사한 정도의 CD8+ T 세포의 증식을 활성화시키는 것을 확인하였다(도 33 및 도 34).

[345] **실험예 10. GI101 및 GI102가 CD8+ T 세포의 증식에 미치는 영향 확인**

[346] 인간 PBMC를 Allcells(Lot#3014928, USA)에서 구입하였다. 1 M 농도의 CellTrace CFSE 염료를 이용하였으며, 이를 인간 PBMC와 상온에서 20분간 빛을

차단한 조건에서 반응시켰다. 1 μ M 농도의 CellTrace CFSE 염료와 37°C에서 20분간 반응을 시켜 CFSE로 라벨링시켰다. 세포에 결합하지 않은 CFSE는 염색반응 용액의 5배되는 배양 배지와 5분간 반응시킨 후, 1,300 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 제거하였다. CFSE가 라벨링된 PBMC는 배양배지(10% 우태아 혈청, 10 mM HEPES, 100 U/ml 페니실린/스트렙토마이신, 1 mM sodium pyruvate, 55 μ M 2-머캅토에탄올, 1 mM 비필수 아미노산 및 2 mM L-글루타민이 함유된 RPMI1640 배지)에 재현탁 시킨 후, Microplate-96-well에 각 웰 당 1×10^5 세포수 만큼 넣었다.

- [347] 그 후, 1 μ g/ml의 항 CD3 ϵ 항체(OKT3, eBioscience, USA) 및 GI101, GI101C1, GI101C2 또는 Proleukin(Novartis)을 CFSE가 라벨링된 PBMC에 처리하여, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 7일 동안 배양하였다. 이때, GI101, GI101C1, GI101C2 및 IL-2는 10 μ M 농도로 세포에 처리하였다.
- [348] 배양된 세포들은 항 인간 CD4-PE 항체(BioLegend, U.S.A.), 항 인간 CD8-PE/Cy7 항체(BioLegend, USA), 항 인간 FoxP3-APC 항체(BioLegend, U.S.A.)를 사용하여 FACS 분석방법으로 CD8+ T 세포들 중 CFSE로 라벨링 되지 않은 세포들의 비율 정도를 측정함으로써 이 세포들의 증식 정도를 조사하였다.
- [349] 그 결과, GI101, GI102_M61, GI101C2, Proleukin 처리한 군은 대조군(No stimulus), 항 CD3 항체 단독, GI101C1 처리군에 비해 CD8+ T 세포의 비율을 유의미하게 증가하였다. 또한, 음성대조군(No stimulation)과 항 CD3 항체 단독 처리에 비해 GI101, GI101C2, Proleukin은 CD4+/FoxP3+ Treg 세포의 증식을 유의미하게 증가시키나, GI102와 GI101C1은 CD4+/FoxP3+ Treg 세포의 증식을 유의미하게 증가시키지 않았다(도 35).
- [350] **실험예 11. GI101 또는 GI101w가 CD8+ T 세포 및 NK 세포의 증식에 미치는 영향 확인**
- [351] 오리엔트 바이오(Orient Bio, Korea)에서 구입한 7주령 C57BL/6 마우스를 3 마리씩 3그룹으로 나누어 PBS, GI101 또는 GI101w를 복강 내로 주사를 하였다. 이 때, GI101와 GI101w는 각각 PBS 200 μ l에 40.5 μ g이 되도록 제조하여 복강 내로 주사를 하였다. 주사 5일 후, 각 그룹의 마우스에서 비장을 적출하여 세포를 분리하여 혈구 계수기(hemocytometer)를 사용하여 총 세포의 수를 측정하였다. 비장세포는 APC-CD3 ϵ 항체(Biolegend; 145-2C11), PE-NK1.1 항체(Biolegend; PK136) 및 Pacific blue-CD8 α 항체(BD; 53-6.7)로 염색한 FACS 분석방법으로 비장세포 중 CD8+ T 세포와 NK 세포의 비율을 조사하였다. 그래서, 비장에 존재하는 CD8+ T 세포와 NK 세포의 수를 계산하였다.
- [352] 그 결과, GI101이 GI101w보다 생체 내에서 CD8+ T 세포와 NK 세포를 증식을 활성화 시키는 것을 확인하였다(도 36 및 도 37).
- [353] **실험예 12. GI101이 T 세포의 기능에 미치는 영향 확인**
- [354] CTLA-4 blockade bioassay kit(Promega cat No. JA4005)를 사용하여 실험을 진행하였으며, 실험을 간단히 설명하면 아래와 같다. 액체질소에서 보관 중인

CTLA-4 Effector 세포를 37°C 항온수조에서 3분 동안 녹여, 0.8 ml의 CTLA-4 Effector 세포를 예열된 3.2 ml assay buffer(90% RPMI+10% 우태아 혈청)와 잘 섞어준 후, 96-well-white cell culture plate(SPL, cat No. 30196)의 각 웰 당 25 μ l씩 넣었다. 그리고, 다양한 농도의 GI101을 25 μ l 넣었다. 음성 대조군의 경우는 assay buffer를 25 μ l 넣었다. 그리고, aAPC/Raji cell을 준비하기 전까지 96-well-white cell culture plate를 커버를 씌운 뒤 상온에 두었다.

- [355] 액체질소에서 보관 중인 aAPC/Raji 세포를 37°C 항온수조에서 3분 동안 녹여 0.8 ml의 aAPC/Raji 세포를 예열된 3.2 ml assay buffer와 잘 섞어준 다음 플레이트에 각 웰 당 25 μ l씩 넣고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 16시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 상온에서 15분 동안 놓아둔 후 다음 거품이 생기지 않게 주의하여 Bio-Glo reagent를 넣었다. 가장자리 바깥 웰 중 3군데에도 Bio-Glo reagent를 넣어 블랭크로 사용하여 백그라운드 신호(background signal)를 보정하였다. 10분간 상온에서 반응시킨 후, Cytation 3(BioTek instruments, Winooski, VT, USA)로 luminescence를 측정하였다. 최종적인 데이터 분석은 RLU(GI101-background)/RLU(No treatment-background)로 계산하였다.
- [356] 그 결과, GI101은 effector T 세포에 발현하는 CTLA-4와 결합하여 T 세포의 기능을 억제시키지 않고 오히려 활성화시키는 것을 확인하였다(도 38 및 도 39).
- [357] 실험예 13. mGI101 및 mGI102가 면역세포에 미치는 영향 확인
- [358] 오리엔트(Korea)에서 구입한 7주령 C57BL/6 마우스를 3마리씩 3그룹으로 나누어 PBS, 3 mg/kg, 6 mg/kg, 12 mg/kg의 GI101 또는 3 mg/kg, 6 mg/kg, 12 mg/kg의 mGI102(mGI102-M61)를 정맥 내로 투여하였다. 주사 1일, 3일, 5일, 7일 및 14일째에 각 그룹의 마우스에서 비장조직을 적출하였다. 그 후, 비장조직을 각각의 항체를 이용하여 FACS 분석방법으로 effector CD8+ T 세포, NK 세포, Treg 세포의 수를 계산하고, Treg 세포에 대한 effector CD8+ T 세포와 NK 세포의 비율을 각각 계산하였다. 각각의 세포분석에 사용한 항체의 정보는 아래와 같다:
- [359] Effector CD8+ T cell: PB anti-mouse CD3 ϵ antibody(Biolegend, # 155612; KT3.1.1), FITC anti-mouse CD8 α antibody(BD, # 553031, 53-6.7), PE/Cy7 anti-mouse CD44 antibody(Biolegend, # 103030; IM7), APC anti-mouse CD122 antibody(Biolegend, # 123214; TM- β 1)
- [360] NK cell: PB anti-mouse CD3 ϵ antibody(Biolegend, # 155612; KT3.1.1), PE anti-mouse NK-1.1(Biolegend, # 108708; PK136)
- [361] Treg cell: FITC anti-mouse CD3 antibody(Biolegend, # 100204; 17A2), PB anti-mouse CD4 antibody(Biolegend, # 100531; RM4-5), PE anti-mouse CD25 antibody(Biolegend, # 102008; PC61), APC anti-mouse Foxp3 antibody(Invitrogen, # FJK-16s, 17-5773-82).
- [362] 그 결과, mGI101 또는 mGI102(mGI102-M61)를 투여한 군에서 CD8+ T 세포와 NK세포가 투여 3일 후부터 14일까지의 시점에서 PBS 투여군과 비교하여 유의하게 증가되었다. 또한, mGI102를 투여한 군에서 활성화된 CD8+ T

세포/Treg 세포 및 NK 세포/Treg 세포의 비율이 투여 3일 후부터 7일까지의 시점에서 PBS 투여군과 비교하여 유의하게 증가되었음을 확인하였다(도 40).

[363] **IV. 융합단백질의 항암효과 확인**

[364] 실험예 14. GI101이 PD-L1 및 CTLA-4가 발현되는 암세포에 의한 T 세포 활성화 억제에 미치는 영향 확인

[365] PD-L1 및 CTLA-4가 발현되는 NCI-H292 암세포주를 $10 \mu\text{g/ml}$ Mitomycin C(Sigma)를 포함하는 배양배지에서 3시간 동안 배양한 후, Mitomycin C를 배양배지로 세척하여 제거하였다. 그 후, 5×10^4 세포수의 Mitomycin C를 처리한 NCI-H292 암세포주를 1×10^5 세포수의 인간 PBMC와 Microplate-96-well에서 배양하였다. 이때, T 세포의 활성을 위해 $5 \mu\text{g/ml}$ 의 PHA(Sigma)를 처리하였다. 또한, 50 nM 농도의 GI101C1와 GI101를 50 nM 농도의 IgG1-Fc(Biolegend) 또는 abatacept(=Orencia; Bristol-Myers Squibb)에 4°C 에서 30분 동안 반응시킨 후, NCI-H292 암세포에 처리하였다. 3일 후에 세포 배양액의 상층액을 회수하여 ELISA kit(Biolegend)을 사용하여 IFN- γ 의 양을 정량하였다.

[366] 양성대조군으로는 Mitomycin C를 처리한 NCI-H292 암세포주가 없는 상태에서 PHA로 자극시킨 인간 PBMC를 사용하였고, 음성대조군으로는 Mitomycin C 처리한 NCI-H292 암세포주가 존재하는 상태에서 PHA로 자극시킨 인간 PBMC를 사용하였다. IFN- γ ELISA kit를 이용한 실험 방법은 실험예 9.3과 동일한 방법으로 진행하였다.

[367] 그 결과, GI101은 PD-L1이 과발현된 암세포주에 의해 억제된 면역반응을 효과적으로 활성화시켰다. 또한, GI101은 effector T 세포에 발현하는 CTLA-4의 신호전달을 억제 시키는 것을 확인하였다(도 41 및 도 42).

[368] 실험예 15. 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서의 mGI101의 항암효과 확인

[369] 오리엔트 바이오에서 분양 받은 BALB/c 마우스(암컷, 7주)를 7일의 적응기간을 거친 후에 5×10^6 세포수의 CT-26 암세포주(ATCC, U.S.A.)를 0.05 ml 페놀레드 무첨가 매트릭스 매트릭스(BD)와 혼합하여 마우스의 우측 등 부위의 피하에 0.1 ml 씩 투여하여 동종이식하였다. 암세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 종양의 부피를 측정하여 약 28 mm^3 에 도달한 개체들을 선별한 후, 선별한 마우스의 종양의 크기 및 체중을 기초로 하여 균등하도록 각 군당 10마리씩 분류하였다. 그 후, 일회용 주사기(31G, 1 ml)를 이용하여 음성대조군에는 6 mg/kg 용량으로 hIgG4를 투여하였다. 실험군으로는 3 mg/kg, 6 mg/kg 또는 12 mg/kg 용량의 mGI101을 정맥투여 하였다. 첫 투여 이후 3일에 한 번씩 총 3번 투여를 진행하였다. 매일 종양의 크기를 측정하였다.

[370] 그 결과, 6 mg/kg 및 12 mg/kg 용량의 mGI101를 투여한 실험군에서 일부 측정시점 및 시험종료시점에서 음성대조군과 비교하여 유의하게 억제되었음을 확인하였다(도 43). 또한, 생존율을 측정한 결과, 6 mg/kg 용량의 mGI101를 투여한 실험군에서 일부 측정시점 및 시험종료시점에서 음성대조군과 비교하여

유의하게 개선되었음을 확인하였다(도 44).

- [371] 실험예 16. 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서의 GI101의 항암효과 확인
- [372] 실험예 16.1. 종양 억제 효과 확인
- [373] 오리엔트 바이오에서 분양 받은 BALB/c 마우스(암컷, 7주)를 7일의 적응기간을 거친 후에 5×10^6 세포수의 CT-26 암세포주(ATCC, U.S.A.)를 0.1 ml PBS에 부유하여 마우스의 우측 등 부위의 피하에 투여하여 동종이식하였다. 암세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 종양의 부피를 측정하여 약 50 mm³ 내지 200 mm³에 도달한 개체들을 선별한 후, 선별한 마우스의 종양의 크기 및 체중을 기초로 하여 균등하도록 각 군당 10마리씩 분류하였다. 그 후, 일회용 주사기(31G, 1 ml)를 이용하여 음성대조군에는 약물을 투여하지 않았으며, 양성대조군으로는 5 mg/kg 용량의 항 PD-1 항체 또는 5 mg/kg 용량의 항 PD-1 항체와 5mg/kg 용량의 항 CTLA-4 항체를 정맥투여하였다. 실험군으로는 0.1 mg/kg 또는 1 mg/kg 용량의 GI101을 정맥투여 하였다. 첫 투여 이후 3일에 한 번씩 총 3번 투여를 진행하였다. 매일 종양의 크기를 측정하였다.
- [374] 그 결과, CT-26 암세포주 식립 마우스에서 음성대조군에 비해 항 PD-1 항체, 항 PD-1 항체와 항 CTLA-4 항체, 0.1 mg/kg 또는 1 mg/kg 용량의 GI101을 투여한 군 모두 유의미하게 종양의 성장을 억제했다. 특히, 항 PD-1 항체 처리군에 비해 0.1 mg/kg GI101을 투여한 실험군에서 유의미한 종양 억제 효과를 나타냈다(* $p < 0.05$)(도 45).
- [375] 실험예 16.2. 암 조직 내 면역세포 분석
- [376] 상기 실험예 16.1의 각 군의 마우스를 종양의 부피가 평균적으로 200 mm³에 도달하였을 때에 희생시켜, 암 조직을 채취하였다. 그 후, 암 조직 내 면역세포를 분석하기 위해 암조직을 단일 세포 수준으로 분리 후, 다음의 항체를 사용하여 암 조직 내 면역세포에 대한 FACS 분석을 수행하였다. 항체는 구체적으로, Anti-mouse-CD3(Biolegend, Cat. No. 100320), Anti-mouse-CD4(Biolegend, Cat. No. 100526), Anti-mouse-CD8(Biolegend, Cat. No. 100750), Anti-mouse-FoxP3(eBioscience, Cat. No. 12-5773-82), Anti-mouse-CD25(Biolegend, Cat. No. 102049), Anti-mouse-CD44(eBioscience, Cat. No. 61-0441-82), Anti-mouse-PD-1(Biolegend, Cat. No. 135218), Anti-mouse-IFN-gamma(Biolegend, Cat. No. 505832), Anti-mouse-CD49b(Biolegend, Cat. No. 108906), Anti-mouse-H2(Invitrogen, Cat. No. A15443), Anti-mouse-CD11c(Biolegend, Cat. No. 117343), Anti-mouse-CD80(eBioscience, Cat. No. 47-4801-82), Anti-mouse-CD86(Biolegend, Cat. No. 104729), Anti-mouse-F4/80(eBioscience, Cat. No. 47-4801-82) 및 Anti-mouse-CD206(eBioscience, Cat. No. 17-2061-80)을 사용하였다.
- [377] 그 결과, 0.1 mg/kg의 GI101을 투여한 실험군에서 5 mg/kg 용량의 항 PD-1 항체를 단독투여한 양성대조군에 비해 CD8+ T 세포가 유의미하게 증가했다(* $p < 0.05$, 도 46 및 도 47). 나아가, GI101을 투여한 실험군 모두에서 T 세포에서의 IFN- γ 의

발현이 음성대조군에 비해 유의미하게 증가했다(* $p < 0.05$, 도 46 및 도 47). 또한, 0.1 mg/kg의 GI101을 투여한 실험군에서 M1 대식세포가 음성대조군과 항 PD-1 항체를 단독투여한 양성대조군에 비해 증가했다(도 48 및 도 49). 또한, GI101을 투여한 실험군 모두에서 대식세포와 수지상세포의 CD86 발현이 증가했다(* $p < 0.05$, 도 48 내지 도 51).

[378] 실험예 17. 마우스 유래 폐암세포 식립 마우스에서의 GI101의 항암효과 확인

[379] 실험예 17.1. 종양 억제 효과 확인

[380] 오리엔트 바이오(Korea)에서 분양 받은 C57BL/6 마우스(암컷, 7주)를 7일의 적응기간을 거친 후에 5×10^6 세포수의 LL/2 암세포주(ATCC, U.S.A.)를 0.1 ml PBS에 부유하여 마우스의 우측 등 부위의 피하에 투여하여 동종이식하였다. 암세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 종양의 부피를 측정하여 약 50 mm³ 내지 200 mm³에 도달한 개체들을 선별한 후, 선별한 마우스의 종양의 크기 및 체중을 기초로 하여 균등하도록 각 군당 10마리씩 분류하였다. 그 후, 일회용 주사기(31G, 1 ml)를 이용하여 음성대조군에는 약물을 투여하지 않았으며, 양성대조군으로는 5 mg/kg 용량의 항 PD-1 항체 또는 5 mg/kg 용량의 항 PD-1 항체와 5 mg/kg 용량의 항 CTLA-4 항체를 정맥투여하였다. 실험군으로는 0.1 mg/kg 또는 1 mg/kg 용량의 GI101을 정맥투여 하였다. 첫 투여 이후 3일에 한 번씩 총 3번 투여를 진행하였다. 매일 종양의 크기를 측정하였다.

[381] 그 결과, 음성대조군에 비해 실험군 모두에서 유의미한 종양 억제 효과가 나타났다(* $p < 0.05$)(도 52).

[382] 실험예 17.2. 암 조직 내 면역세포 분석

[383] 상기 실험예 17.1의 각 군의 마우스를 종양의 부피가 평균적으로 200 mm³에 도달하였을 때 희생시켜, 암 조직을 채취하였다. 그 후, 암 조직 내 면역세포를 분석하기 위해 실험예 16.2와 동일한 방법으로 FACS 분석을 수행하였다.

[384] 그 결과, 0.1 mg/kg의 GI101을 투여한 실험군에서 항 PD-1 항체를 단독투여한 양성대조군에 비해 CD8+ T 세포가 유의미하게 증가했다(* $p < 0.05$, 도 59). 나아가, GI101을 투여한 실험군 모두에서 IFN- γ 의 발현이 음성대조군에 비해 유의미하게 증가했다(* $p < 0.05$, 도 59). 또한, GI101을 투여한 실험군 모두에서 대식세포와 수지상세포의 CD86 발현이 증가했다(* $p < 0.05$, 도 53 내지 도 55).

[385] 실험예 18. 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서의 mGI102-M61의 항암효과 확인

[386] 오리엔트 바이오에서 분양 받은 BALB/c 마우스(암컷, 7주)를 7일의 적응기간을 거친 후에 5×10^6 세포수의 CT26 암세포주(ATCC, U.S.A.)를 0.05 ml 페놀레드 무첨가 매트릭스 매트릭스(BD)와 혼합하여 마우스의 우측 등 부위의 피하에 0.1 ml씩 투여하여 동종이식하였다. 암세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 종양의 부피를 측정하여 약 28 mm³에 도달한 개체들을 선별한 후, 선별한 마우스의 종양의 크기 및 체중을 기초로 하여 균등하도록 각 군당 10마리씩 분류하였다. 그 후, 일회용 주사기(31G, 1 ml)를 이용하여 음성대조군에는 6 mg/kg

용량으로 hIgG4를 투여하였다. 실험군으로는 3 mg/kg, 6 mg/kg 또는 12 mg/kg 용량의 mGI102-M61을 정맥투여 하였다. 첫 투여 이후 3일에 한 번씩 총 3번 투여를 진행하였다. 매일 종양의 크기를 측정하였다.

- [387] 그 결과, 12 mg/kg 용량의 mGI102-M61을 투여한 실험군에서 일부 측정시점 및 시험종료시점에서 음성대조군과 비교하여 유의하게 억제되었음을 확인하였다(도 56). 또한, 생존율을 측정한 결과, 12 mg/kg 용량의 mGI102-M61을 투여한 실험군에서 일부 측정시점 및 시험종료시점에서 음성대조군과 비교하여 유의하게 개선되었음을 확인하였다(도 57).
- [388] **실험예 19. 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서의 mGI101의 항암효과 확인**
- [389] 오리엔트 바이오(Korea)에서 분양 받은 BALB/c 마우스(암컷, 7주)를 7일의 적응기간을 거친 후에 5×10^6 세포수의 CT26 암세포주(ATCC, USA)를 0.05 ml 페놀레드 무첨가 매트릭스(BD)와 혼합하여 마우스의 우측 등 부위의 피하에 0.1 ml씩 투여하여 동종이식하였다. 암세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 종양의 부피를 측정하여 약 200 mm³ 내지 250 mm³에 도달한 개체들을 선별한 후, 선별한 마우스의 종양의 크기 및 체중을 기초로 하여 균등하도록 각 군당 10마리씩 분류하였다.
- [390] 그 후, 일회용 주사기(31G, 1 ml)를 이용하여 음성대조군에는 4 mg/kg 용량으로 hIgG4를 투여하였다. 실험군으로는 1 mg/kg, 4 mg/kg 또는 6 mg/kg 용량의 mGI101을 정맥투여 하였다. 추가적으로, 4.9 mg/kg의 mCD80 또는 2.8 mg/kg의 Fc-IL-2v(GI101C2)를 투여한 군도 대조군으로 설정하였다. 뿐만 아니라, 4.9 mg/kg의 mCD80 및 2.8 mg/kg의 Fc-IL-2v(GI101C2)를 동시에 투여한 군도 대조군으로 설정하였다.
- [391] 종양의 부피측정에서 6 mg/kg 용량의 mGI101 투여군에서 일부 측정시점 및 시험종료시점에서 음성대조군과 비교하여 유의하게 억제되었음을 확인하였다. mCD80 및 Fc-IL-2v(GI101C2)의 병용투여군과 비교하여 종양성장억제율이 병용투여군과 비교하여 우수한 것으로 나타났다(도 58 및 도 59).
- [392] 결론적으로, BALB/c 마우스에 동종이식한 BALB/c 마우스 유래 대장암 세포주인 CT26의 종양성장 억제 효능시험에서 시험물질인 mGI101은 본 시험 조건하에서 mCD80 및 IL-2v 단일제제에 대해 종양억제 효능이 입증되었고, mCD80과 IL-2v의 병용투여군 대비 우수한 항암 효능을 확인되었다(도 58 및 도 59). 특히, 6 mg/kg 용량의 mGI101 투여군에서 음성대조군 및 mCD80 및 Fc-IL2v(GI101C2)의 병용투여군과 비교하여 종양의 크기가 유의하게 억제되었다.
- [393] **V. 융합단백질 이량체 및 면역관문 억제제 병용 투여에 따른 항암효과 확인**
- [394] **실험예 20. 인간 유래 유방암세포 식립 마우스에서 GI101 및 항 PD-1 항체 병용투여에 의한 항암 효과 확인**
- [395] 본 시험은 NSGb2m 마우스에 human PBMC를 이종 이식하여 제작한 humanized

mouse model을 이용하여, 인간 유래 유방암세포인 MDA-MB-231 세포를 이종 이식한 종양모델에서 시험물질인 GI101과 양성 대조물질로서 항 PD-1 항체인 키트루다(Pembrolizumab, MSD)를 단독 및 병용 복강내 투여한 후 종양의 성장 억제효과를 평가한 것이다.

[396] 표 2에 기재된 시험물질, 음성 대조물질, 양성 대조물질 원액을 각 용량에 맞게 부형제를 가하여 희석하였다.

[397] [표2]

-	시험물질	양성 대조물질	음성 대조물질	부형제
물질명	GI101	키트루다	hIgG4	PBS
성상	투명 액체	투명 액체	투명 액체	투명 액체
성분	Fc 융합 단백질	항 PD-1 항체	-	-
pH	7.5	-	-	-
보관 조건	냉장 보관(4°C)	냉장 보관(4°C)	냉장 보관(4°C)	냉장 보관(4°C)
취급 시 주의 사항	투여시까지 냉장 보관하며, 투여당일 조제하여 사용	투여시까지 냉장 보관하며, 투여당일 조제하여 사용	투여시까지 냉장 보관하며, 투여당일 조제하여 사용	-

[398] 인간 유래 유방암 세포인 MDA-MB-231(*Homo sapiens*, human mammary gland/breast; 전의 부위에서 유래됨: pleural effusion)를 Korea cell line bank(Korea)에서 구입하여 시험에 사용하였다. 세포 배양 배지는 아래의 표와 같은 조성으로 100 ml 당 우태아 혈청(FBS, 16000-044, Thermofisher scientific, U.S.A.), 페니실린-스트렙토마이신; 10,000 units/ml 페니실린 및 10,000 µg/ml 스트렙토마이신(15140122, Thermofisher scientific, U.S.A.) 및 RPMI1640(A1049101, Thermofisher scientific, U.S.A.)를 혼합하여 사용하였다.

[399] [표3]

명칭	조성(ml)
FBS	10
Penicillin-Streptomycin	1
RPMI1640	89
Total volume	100

- [400] 시험에 사용할 세포는 해동하여 세포 배양용 플라스크에 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator(MCO-170M, Panasonic, Japan)에서 배양하였다. Trypsin-EDTA(Cat. 25200-072, Thermofisher scientific, U.S.A.)를 이용하여 부유시켰다. 부유된 세포는 원심분리기를 이용하여 원심분리(125xg, 5분)하여 모으고, 새로운 배지와 새 플라스크에 옮겨 계대 배양했다. 세포주 이식 일에 배양된 세포를 원심분리 튜브에 넣은 후 회수한 다음, 원심분리(125xg, 5분)하여 상층액을 버리고 PBS(Cat. LB 001-04, Welgene, KOREA)로 세포 부유액(5x10⁶ 세포수/0.05 ml)을 만들어 inoculation 전까지 ice에 보관하였다. 시험에는 8주령 암컷 NSG^{B2m}(NOD.Cg-B2m^{tm1UncPrkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) 마우스를 중아바이오(Korea)에서 구입하여 이용하였다. 검역·순화기간 종료 후 익일에 체중을 측정 한 후, 건강한 동물에 대하여 준비된 인간 유래 PBMC 세포부유액(5x10⁶ 세포수/0.2 ml)을 일회용 주사기에 충전하여 동물의 미정맥에 투여하였다. 세포 이식 후 매일 1회 일반증상을 관찰하였다.}
- [401] 준비된 MDA-MB-231 세포부유액(5x10⁶ 세포수/0.05 ml)에 페놀레드 무함유 매트릭스(0.05 ml, 356237, BD, U.S.A.)를 가하여 조제한 용액을 일회용 주사기에 충전하여 인간 PBMC를 이식한 동물의 우측 등 부위의 피하에 0.1 ml/head씩 투여하여 이식하였다. 세포주의 이식 후 생착 및 성장기간 동안 매일 1회 일반증상을 관찰하였다.
- [402] 세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 동물의 건강상태에 이상이 없는 동물에 대해 중앙의 부피를 측정하여, 각 군의 평균이 40 내지 80 mm³에 도달하도록 개체 32마리를 선별하였다. 선별된 동물은 중앙의 부피 및 체중을 기초로 하여 가능한 균등하도록 군당 8마리 씩, 총 4군으로 군 분리를 하였다.
- [403] 표 4와 같이 시험군을 구성하였다. 시험물질은 일회용 주사기(31G, 1 ml)를 이용하여 동물에 투여하였으며, 투여 빈도는 2회/주로 총 4회 투여를 진행하였다.

[표4]

군		투여용량 (mg/kg)	투여 액 량 (ml/kg)	동물 수
G1	hIgG4	6	10	8
G2	GI101	6	10	8
G3	키트루다	5	10	8
G7	GI101 + 키트루다	6 + 5	10	8

- [405] 관찰기간 동안 매일 1회 외관, 행동 및 배설물 등의 일반증상을 관찰하고, 사망동물을 확인했다. 체중은 세포주 이식일, 주 2회 및 동물 희생 당일에 측정하였다. 관찰기간 동안 주 3회, 캘리퍼스(Digital caliper, mitutoyo, Japan)를

사용하여 종양의 장축(maximum length, L)과 단축(perpendicular width, W)을 측정하고, 다음의 계산식에 대입하여 종양의 부피(tumor volume, TV)를 계산하였다.

[406] <수학식 1>

[407] $TV(mm^3) = (W^2 \times L)/2$

[408] <수학식 2>

[409] $\%TGI(\text{Tumor Growth Inhibition}) = (1 - (Ti - T0)/(Vi - V0)) \times 100$

[410] 각 개체의 투여 전의 종양의 부피는 군 분리 시 측정된 값으로 설정하였다.

[411] 종양 이식 후, 21, 25, 28, 그리고 31일 차에 표 4에 표기된 약물을 각각 투여한 결과, 대조군(hIgG4)에 비하여 GI101과 키트루다 단독 처리군의 종양 성장이 저해되었다. 대조군에 비해 GI101과 키트루다 병용 처리군의 종양 성장이 저해되었다. GI101과 키트루다 단독 처리군에 비해 GI101과 키트루다 병용 처리군의 종양 성장이 저해되었다(도 60).

[412] 약물 처리 1일차(종양 이식 후, 21일차) 대비 실험 종료 시점(종양 이식 후, 42일차)에 종양성장 억제율을 계산한 결과, hIgG4 처리군은 종양성장 억제율 30% 이상 2마리, 50% 이상 1마리, 80% 이상 1마리였다. 또한, GI101 처리군은 종양성장 억제율 30% 이상 5마리, 50% 이상 5마리, 80% 이상 2마리였으며, 키트루다 처리군은 종양성장 억제율 30% 이상 7마리, 50% 이상 5마리, 80% 이상 3마리였다. 또한, GI101과 키트루다 병용 처리군은 종양성장 억제율 30% 이상 8마리, 50% 이상 8마리, 80% 이상 6마리였다(도 61).

[413] 또한, 인간 유래 유방암세포 식립 마우스에서 GI101과 키트루다 병용시 각 처리군의 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 도 62 내지 도 66에 나타내었다.

[414] 실험예 21. 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서 mGI101 및 항 PD-1 항체 병용투여에 의한 항암 효과 확인

[415] 본 시험은 C57BL/6 마우스에 MC38을 동종 이식한 종양모델에서 시험물질인 mGI101과 양성 대조물질로서 항 PD-1 항체를 단독 및 병용으로 복강내 투여한 후 종양의 성장 억제효과를 평가한 것이다.

[416] 설치류 유래 대장암 세포인 MC38을 Kerafast(USA)에서 구입하여 시험에 사용하였다. MC38 세포는 10% 우태아 혈청(Gibco) 및 1% 항생제/항진균제(Gibco)를 포함하는 RPMI1640 배지(Gibco)에서 배양하였다. 배양한 세포는 트립신을 이용하여 수확한 후 PBS에 현탁하였다. 동종 이식 종양모델을 확립하기 위해 C57BL/6 암컷 마우스(7주령) 오른쪽 옆구리에 s.c.로 1×10^6 개의 MC38 세포를 주입하였다.

[417] 마우스는 종양 부피(30 mm^3)를 기준으로 그룹 당 5마리를 무작위로 할당하였다. 종양 이식편은 세포 접종 후 약 2일째에 확인되었다. 표 5와 같이 시험군을 구성하고 시험물질을 투여하였다.

[418] [표5]

실험군		투여경로, 투여 주기	투여용량	동물 수
G1	Vehicle control(hIgG4)	<i>i.p.</i> BIW x 16 days	10 mg/kg	5
G2	mGI101	<i>i.p.</i> day 1, 5, 9	6 mg/kg	6
G3	Anti-PD-1 antibody (cloneRMP1-14, InVivoMab)	<i>i.p.</i> BIW x 16 days	5 mg/kg	5
G4	mGI101 + anti-PD-1 antibody	<i>i.p.</i> day 1, 5, 9 (mGI101)	0.6 mg/kg	5
		<i>i.p.</i> BIW x 16 days (anti-PD-1 antibody)	5 mg/kg	

[419] 시험기간 동안 매일 1회 질병 및 행동변화 등의 임상증상을 관찰하고, 사망동물을 확인했다. 시험기간이 끝나고 동물을 희생하였다. MC38 고형암의 크기는 종양 3D 스캐너(TM900, Peria, belgium)를 이용하여 측정하였다. 각 실험군에 대해 평균 체중 감소 및 백분율 변화와 평균 종양 성장 저해를 계산하였다. 항 종양 효능은 vehicle 대조군과 비교하여 평가하였다. 모든 통계 계산은 Prism 8.0(Graph Pad Software Inc, USA)을 사용하여 수행하였다. 종양 부피 측정의 비교는 일원 분산 분석(종료 시간)에 이어 Bonferroni의 다중 비교 테스트를 통해 이루어졌다. 0.05 미만의 p 값은 유의미한 것으로 간주되었다.

[420] 모든 시험동물은 mGI101 투여 및 항 PD-1 항체와의 병용 투여 후 병리학적 이상 징후없이 건강한 상태를 유지하였다. MC38 종양에 대해 mGI101 및/또는 항 PD-1 항체를 사용한 병용 요법의 결과는 도 67과 같다. 대조군과 비교하여 약물 처리 군에서 항암 효과가 관찰되었으며, 종양 크기 차이는 16일의 시험기간 동안 눈에 띄게 나타났다. MC38 종양은 이전 문헌에서 항 PD-1 항체에 대한 반응 모델로 알려져 있고, 본 시험의 항 PD-1 항체 투여군에서도 항암 효과가 관찰되었다($p > 0.01$). 항 PD-1 항체 투여군 만큼 mGI101(6 mpk) 단독 투여군에서도 항암 효과가 나타났다($p > 0.01$). mGI101(0.6 mpk) + anti-PD-1(5 mpk) 병용 투여군은 현저히 우수한 항암 효과를 나타내었다($p > 0.0001$).

[421] 시험군별 개별 종양 크기는 도 69 내지 도 73과 같다. 개별 종양 크기 결과에 따르면, 항 PD-1 항체 투여군 중 일부 동물에서 경미한 종양 퇴행이 관찰되었다. mGI101(6 mpk) 단독 투여군은 항 PD-1 항체 투여군에 비해 더 우수한 종양 성장 저해 효과를 나타내었다. 종양 크기는 5일에서 7일까지 같은 크기로 유지되었으나 7일 후에 재성장 하였다. 종양 크기는 5일에서 7일까지 같은 크기로 유지되었으나 7일 후에 재성장하였다. 병용 투여군(GI101(0.6 mpk) + 항 PD-1 항체(5 mpk))은 현저히 우수한 종양 성장 저해를 나타내었다. 특히, 병용

투여군 중 2마리는 완전 관해(complete response, 종양 없음)를 보였다.

[422] 완전 관해를 보인 병용 투여군의 2마리 마우스 왼쪽 옆구리(암세포 최초 주입 위치의 반대 부위)에 MC38 세포를 재주입하였다. 이들 마우스는 32일까지 항 PD-1 항체 투여(5 mpk, BIW)를 유지하였다(도 74). 두 마우스 중 하나에서 작은 크기의 종양(> 30 mm³)이 관찰되었지만, 종양 크기는 35일까지 더 이상 성장하지 않았다(도 69). 또 다른 마우스는 종양이 재주입된 후 종양이 관찰되지 않았다(도 69 및 도 74).

[423] 결론적으로 MC38 동종 종양 모델에서 mGI101 단독 및 항 PD-1 항체와의 조합에 대한 항 종양 효능을 시험한 결과, 병용 투여군(GI101(0.6 mpk) + anti-PD-1(5 mpk))에서 가장 우수한 항 종양 효능이 나타났다. 병용 투여군 실험 동물 중 2마리에서 완전 관해(complete response)가 나타났으며, MC38 재주입한 완전 관해 마우스는 암 내성 효과를 보였다(표 6).

[424] [표6]

Days After treatment	CR mouse	
	No.1 Tumor Vol.(mm ³)	No.2 Tumor Vol.(mm ³)
D1	78.2	23.6
D2	84.5	13.5
D3	36.3	0
D4	0	0
D5	0	0
D6	0	0
D7	0	0
D8	0	0
D9	0	0
D10	0	0
D11	0	0
D12	0	0
D13	0	0
D14	0	0
D15	0	0
D16	0	0
D17	0	0
D18	0	0
D19	0	0
D20	0	0
D21	0	0
D22	0	0
D23	0	0
D24	0	0
*D25	0	0
D26	0	0
D27	0	0

D28	0	0
D29	0	0
D30	0	0
D31	0	0
D32	12.8	0

- [425] 실험예 22. 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서 mGI101 및 항 PD-L1 항체 병용투여에 의한 항암 효과 확인
- [426] 본 시험은 BALB/c 마우스에 CT26(murine colon carcinoma cells) 세포를 동종 이식한 종양모델에서 시험물질인 mGI101과 양성 대조물질로서 항 PD-L1 항체(BioXcell, Cat# BE0101)를 단독 및 병용으로 투여한 후 종양의 성장 억제효과를 평가한 것이다.
- [427] CT26 세포는 10% 우태아 혈청(Gibco) 및 1% 항생제/항진균제(Gibco)를 포함하는 RPMI1640 배지(Gibco)에서 배양하였다. 배양한 세포는 트립신을 이용하여 수확한 후 PBS에 현탁하였다. 동종 이식 종양모델을 확립하기 위해 BALB/c 암컷 마우스(7주령) 오른쪽 옆구리에 피하로 5×10^5 개의 CT26 세포를 주입하였다.
- [428] 마우스는 종양 부피(50 내지 120 mm^3)를 기준으로 그룹당 4마리를 무작위로 할당하였다. 종양 이식편은 세포 접종 후 약 2일째에 확인되었다. 표 7과 같이 시험군을 구성하고 시험물질을 투여하였다.
- [429] [표7]

시험군		투여경로, 투여 주기	투여용량	동물 수
G1	Vehicle control(PBS)	<i>i.p.</i> BIW x 9 days	-	4
G2	mGI101	<i>i.v.</i> QW x 9 days	3 mg/kg	4
G3	Anti-PD-L1 antibody (BioXcell, Cat# BE0101)	<i>i.p.</i> BIW x 9 days	10 mg/kg	4
G4	mGI101 + anti-PD-L1 antibody	<i>i.v.</i> QW x 9 days (mGI101)	3 mg/kg	4
		<i>i.p.</i> BIW x 9 days (anti-PD-L1 antibody)	10 mg/kg	

- [430] 시험기간 동안 매일 1회 질병 및 행동변화 등의 임상증상을 관찰하고, 사망동물을 확인했다. 시험기간이 끝나고 동물을 희생하였다. CT26 고형암의

크기는 종양 3D 스캐너(TM900, Peria, belgium)를 이용하여 측정하였다. 각 실험군에 대해 평균 체중 감소 및 백분율 변화와 평균 종양 성장 저해를 계산하였다. 항 종양 효능은 vehicle 대조군과 비교하여 평가하였다. 모든 통계 계산은 Prism 8.0(Graph Pad Software Inc, USA)을 사용하여 수행하였다. 종양 부피 측정의 비교는 일원 분산 분석(종료 시간)에 이어 Bonferroni의 다중 비교 테스트를 통해 이루어졌다. 0.05 미만의 p 값은 유의미한 것으로 간주되었다.

[431] CT26 동종 종양 모델에서 mGI101 단독 및 항 PD-L1 항체와의 조합에 대한 항 종양 효능을 시험한 결과, 병용 투여군(mGI101(3 mpk) + anti-PD-L1(10 mpk))에서 가장 우수한 항 종양 효능이 나타났다(도 75).

[432] 실험예 23. 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서 mGI101 및 항 TIGIT 항체 병용투여에 의한 항암 효과 확인

[433] 본 시험은 BALB/c 마우스에 CT26(murine colon carcinoma cells) 세포를 동종 이식한 종양모델에서 시험물질인 mGI101과 양성 대조물질로서, TIGIT의 세포외도메인(ECD)에 특이적으로 결합하는 항 TIGIT 항체를 단독 및 병용으로 투여한 후 종양의 성장 억제효과를 평가한 것이다.

[434] CT26 세포는 10% 우태아 혈청(Gibco) 및 1% 항생제/항진균제(Gibco)를 포함하는 RPMI1640 배지(Gibco)에서 배양하였다. 배양한 세포는 트립신을 이용하여 수확한 후 PBS에 현탁하였다. 동종 이식 종양모델을 확립하기 위해 BALB/c 암컷 마우스(7주령) 오른쪽 옆구리에 피하로 5×10^5 개의 CT26 세포를 주입하였다.

[435] 마우스는 종양 부피($50 \text{ 내지 } 120 \text{ mm}^3$)를 기준으로 그룹당 5마리를 무작위로 할당하였다. 종양 이식편은 세포 접종 후 약 2일째에 확인되었다. 표 8과 같이 실험군을 구성하고 시험물질을 투여하였다.

[436] [표8]

실험군		투여경로, 투여 주기	투여용량	동물 수
G1	Vehicle control(PBS)	<i>i.p.</i> BIW x 9 days	-	5
G2	mGI101	<i>i.v.</i> QW x 9 days	3 mg/kg	5
G3	Anti-TIGIT antibody	<i>i.p.</i> BIW x 9 days	20 mg/kg	5
G4	mGI101 + anti-TIGIT antibody	<i>i.v.</i> QW x 9 days (mGI101)	3 mg/kg	5
		<i>i.p.</i> BIW x 9 days (anti-TIGIT antibody)	20 mg/kg	

[437] 시험기간 동안 매일 1회 질병 및 행동변화 등의 임상증상을 관찰하고, 사망동물을 확인했다. 시험기간이 끝나고 동물을 희생하였다. CT26 고형암의

크기는 종양 3D 스캐너(TM900, Peria, belgium)를 이용하여 측정하였다. 각 실험군에 대해 평균 체중 감소 및 백분율 변화와 평균 종양 성장 저해를 계산하였다. 항 종양 효능은 vehicle 대조군과 비교하여 평가하였다. 모든 통계 계산은 Prism 8.0(Graph Pad Software Inc, USA)을 사용하여 수행하였다. 종양 부피 측정의 비교는 일원 분산 분석(종료 시간)에 이어 Bonferroni의 다중 비교 테스트를 통해 이루어졌다. 0.05 미만의 p 값은 유의미한 것으로 간주되었다.

- [438] CT26 동종 종양 모델에서 mGI101 단독 및 항 TIGIT 항체와의 조합에 대한 항 종양 효능을 시험한 결과, 병용 투여군(mGI101(3 mpk) + anti-TIGIT(20 mpk))에서 가장 우수한 항 종양 효능이 나타났다(도 76). 항 TIGIT 항체 단독 투여군은 대조군과 비교하여 항 종양 효과가 관찰되지 않았으나, mGI101과의 병용 투여시 mGI101 단독 투여군과 비교하여 현저히 우수한 항 종양 효과를 나타내었다.
- [439] **VI. 융합단백질 이량체 및 TGF- β R 억제제 병용 투여에 따른 항암효과 확인**
- [440] 실험예 24. 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서 **mGI-101 및 TGF- β R 억제제(Galunisertib) 병용투여에 의한 항암 효과 확인**
- [441] 본 시험은 마우스에 CT26(mouse colon carcinoma) 세포를 동종 이식한 종양모델에서 시험물질인 mGI-101과 양성 대조물질인 Galunisertib을 단독 및 병용 투여한 후 종양의 성장 억제효과를 평가한 것이다.
- [442] 표 9에 기재된 시험물질, 음성 대조물질, 양성 대조물질 원액을 각 용량에 맞게 부형제를 가하여 희석하였다.

[443] [표9]

-	시험물질	양성 대조물질	음성 대조물질
물질명	mGI-101	Galunisertib	hIgG4
성상	투명 액체	투명 액체	투명 액체
성분	Fc 융합 단백질	TGF- β 억제제	-
부형제	히스티딘 버퍼(20 mM), pH 7.0, 폴록사머188 0.07 w/w%, 아르기닌-HCl 15 mg/mL, 수크로오스 150 mg/mL	1% CMC(carboxymethylcellulose)-Na	PBS
pH	7.5	-	-
보관조건	냉장 보관 (4°C)	냉장 보관 (4°C)	냉장 보관 (4°C)
취급시주의사항	투여시까지 냉장 보관하며, 투여당일 조제하여 사용	투여시까지 냉장 보관하며, 투여당일 조제하여 사용	투여시까지 냉장 보관하며, 투여당일 조제하여 사용

[444] 마우스 유래 대장암 세포인 CT26(*Mus musculus*, Colon adenocarcinoma)를 ATCC(USA)에서 구입하여 시험에 사용하였다. 시험에 사용할 세포는 해동하여 10% FBS(fetal bovine serum, Gibco, 10082-147)를 포함하는 RPMI1640(A1049101, Thermofisher scientific) 배지와 혼합한 다음, 세포 배양용 플라스크에 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. PBS로 세척한 다음 Trypsin-EDTA(15090, Gibco)를 이용하여 세포를 분리하고 원심분리(125 x g, 5 분)하여 상층액을 버린 뒤, 새로운 배지로 세포를 부유하여 세포 부유액을 얻었다. 세포의 viability를 확인한 다음, 5.0x10⁶ cells/mL의 농도로 배지에 희석하여 세포주를 준비하였다.

[445] 시험에는 6주령 수컷 BALB/cAnHsd 마우스를 구입하여 이용하였다. 7일간의 순화기간 종료 후 건강한 동물에 대하여 세포를 이식하였다. 세포부유액(5x10⁶ cells/mL)을 분주하고 일회용 주사기에 충전하여 동물의 우측 등 부위의 피하에 0.1 mL/head씩 투여하여 이식하였다. 세포주의 이식 후 생착 및 성장기간 동안 매일 1회 일반증상을 관찰하였다.

[446] 세포주 접종을 실시한 뒤, 세포주를 이식한 부위의 종양 크기가 약 50 mm³에 도달하였을 때, 종양의 크기에 따라 각 군의 종양 크기가 최대한 균일하게 분포하도록 분배하였다.

[447] 표 10과 같이 시험군을 구성하였다. 시험물질을 경구 또는 복강 투여하였으며 시험군 구성에 따라 3주간 투여하였다. 경구투여의 경우, 동물을 경배부 피부 고정법으로 고정하고, 경구투여용 존데를 이용하여 위 내 직접 투여하였다. 복강투여의 경우, 동물을 경배부 피부 고정법으로 고정하고, 26 gauge needle이 장착된 주사기를 이용하여 복강 내 투여하였다. 투여속도는 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 을 넘지 않도록 하였다.

[448] [표10]

군	성 별	투여물질	투여횟 수	투여경 로	투여량 (mg/kg/day)	투여액량 (mL/kg/day)
G1	M	Vehicle	2 회/주	<i>i.p.</i>	-	5
G2	M	mGI-101	2 회/주	<i>i.p.</i>	3	5
G3	M	Galunisertib	3 회/주	<i>p.o.</i>	75	10
G4	M	mGI-101	2 회/주	<i>i.p.</i>	3	5
		Galunisertib	3 회/주	<i>p.o.</i>	75	10

[449] 투여 및 관찰기간 동안 사망을 포함한 일반증상의 종류, 발현일 및 증상의 정도를 1일 1회 관찰하고, 개체별로 기록하였다. 체중은 군분리일 또는 시험물질 투여개시일, 그 이후에는 주 1회 측정하였다.

[450] 종양 크기는 시험물질 투여개시일부터 주 3회, 3주간 측정하였다. 캘리퍼스(calipers)를 이용하여 종양의 장축 및 단축을 측정하고 다음의 계산식을 이용하여 종양 크기(tumor volume, TV)를 산출하였다.

[451] <수학식 1>

[452] $TV(\text{mm}^3) = (W^2 \times L) / 2$

[453] 종양 크기 측정 결과를 이용하여 종양 성장 저해율을 계산하였다. 종양 성장 저해율은 다음과 같이 계산하였다.

[454] <수학식 2>

[455] $\%TGI(\text{Tumor Growth Inhibition}) = (1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)) \times 100$

[456] 종양 크기 측정 결과, 시험물질 투여개시 후 4일째에 G2, G4의 종양 크기 수준은 G1에 비하여 통계학적으로 유의하게 낮았으며($p < 0.01$, $p < 0.001$), 시험물질 투여개시 후 7일째에 G2, G4의 종양 크기 수준은 G1에 비하여 통계적으로 유의하게 낮았다($p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$).

[457] 시험물질 투여개시 후 2일째부터 7일째까지 G2 및 G4의 종양 크기 수준은 G1에 비하여 낮은 경향을 보였다. 또한, 시험물질 투여개시 후 7일째까지 G4에서 G2 또는 G3에 비하여 낮은 종양 크기 수준을 보였다(도 77 및 도 79).

[458] [표11]

종양 크기				단위: mm ³
Day	실험군			
	G1	G2	G3	G4
0	61.97 ± 12.41	61.96 ± 11.81	61.98 ± 12.23	61.98 ± 12.16
2	210.34 ± 32.30	177.83 ± 78.22	187.20 ± 55.14	149.16 ± 43.02
4	363.47 ± 36.18	224.56 ± 105.31**	260.69 ± 78.70	187.35 ± 60.13***
7	488.92 ± 81.97	291.81 ± 155.23(9) *	398.78 ± 146.30	232.95 ± 99.73**
N	10	10	10	10

[459] 결과는 평균±표준편차로 표시하였다. N: 동물수, G1: Vehicle control IP, G2: mGI-101 3 mg/kg IP, G3: Galunisertib 75 mg/kg PO, G4: mGI-101 3 mg/kg IP + Galunisertib 75 mg/kg PO

[460] ****/* A significant difference at p<0.001/p<0.01/p<0.05 level compared to the G1

[461] 종양 성장 저해율 계산 결과, 시험물질 투여개시 후 4일째부터 7일째까지 G2의 종양 성장 저해 수준은 G1에 비하여 통계학적으로 유의하게 높았다. 시험물질 투여개시 후 2일째부터 7일째까지 G4의 종양 성장 저해 수준은 G1 대비 통계학적으로 유의하게 높았다. 또한, 7일째에 G4의 종양 성장 저해 수준은 G3 대비 통계학적으로 유의하게 높았다.

[462] 실험 종료 시점에서 종양 성장 저해율 30%, 50%, 80% 이상인 마우스는 도 78에 나타낸 것과 같다.

[463] [표12]

종양 성장 저해				단위: %
Day	실험군			
	G1	G2	G3	G4
2	0.00 ± 20.74	21.91 ± 53.41	15.60 ± 38.26	41.24 ± 25.98*
4	0.00 ± 10.50	46.07 ± 35.1**	34.09 ± 27.14	58.42 ± 17.88***
7	0.00 ± 19.21	46.48 ± 36.39(9)**	21.12 ± 34.98	59.96 ± 21.45***\$
N	10	10	10	10

[464] 결과는 평균±표준편차로 표시하였다. N: 동물수, G1: Vehicle control IP, G2: mGI-101 3 mg/kg IP, G3: Galunisertib 75 mg/kg PO, G4: mGI-101 3 mg/kg IP + Galunisertib 75 mg/kg PO

- [465] **** A significant difference at $p < 0.001/p < 0.01/p < 0.05$ level compared to the G1
- [466] \$ A significant difference at $p < 0.05$ level compared to the G3
- [467] 실험예 25. 유방암 세포주에서 mGI-101 및 TGF- β R 억제제(Vactosertib) 병용에 의한 항암 효과 확인
- [468] 본 실험은 시험관 내 환경에서 MDA-MB-231(human breast cancer cells) 세포에 시험물질 GI-101 단독 처리 또는 TGF-beta 신호 억제제 Vactosertib 물질과 병용 처리하고 이에 의한 암세포의 사멸 효과를 평가한 것이다.
- [469] MDA-MB-231 세포는 한국 세포주 은행으로부터 분양 받아 10% FBS(Gibco) 및 1% 항생제/항진균제(Gibco)를 포함하는 RPMI1640 배지(Gibco)에서 배양하였다. 암세포 사멸시험에 사용하기 위해 세포는 트립신(Gibco)을 이용하여 수확한 후 RPMI1640 배지에 현탁 후, Ficoll(GE Healthcare Life Sciences) 용액을 이용하여 죽은 세포 및 debris 제거를 해 주었다. RPMI1640 배지에 현탁한 세포는 ficoll 용액 위에 조심스럽게 중층하였다. 실온에서 350g로 20분간 원심분리하여 형성된 저비중의 세포층을 파이펫으로 모으고, PBS(Gibco)으로 세척한 후 실온에서 350g으로 5분간 원심분리 하였다. 분리된 세포층은 FBS free RPMI1640 배지로 2×10^5 cells/mL이 되도록 부유액을 만들었다. 암세포 현탁액은 암세포 증식 혹은 증식 억제 추적에 위해 CellTracker™ Deep Red Dye(Thermo)를 사용하여 37°C에서 1시간 동안 염색하였다. 염색 후 1300rpm에서 5분간 원심분리 후 FBS free RPMI1640 배지로 세척한 후, 2×10^5 cells/mL이 되도록 5% human AB serum(Sigma)을 포함하는 RPMI1640 배지로 현탁 하였다. 암세포 현탁액은 96-well microplate(Corning)의 각 well에 $50 \mu\text{l}$ (1×10^4 cells)씩 가한 후, 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 1시간 동안 안정화시킨다.
- [470] GI-101에 의한 암세포 사멸 확인을 위해 사람 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 사용하였다. 사람 PBMC는 Zen-Bio를 통해 구매하였으며, 냉동 보관된 PBMC는 37°C water bath에 넣어서 최대한 빨리 해동시킨 후, 10% FBS(Gibco) 및 1% 항생제/항진균제(Gibco)를 포함하는 RPMI1640 배지(Gibco)에 옮겨주어 1300 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 분리된 세포층은 RPMI1640 배지로 현탁 후, 암세포주와 동일한 방식으로 Ficoll(GE Healthcare Life Sciences) 용액을 이용하여 죽은 세포 및 debris 제거를 해 주었다. RPMI1640 배지에 현탁한 세포는 ficoll 용액 위에 조심스럽게 중층하였다. 실온에서 350 g로 20분간 원심분리하여 형성된 저비중의 세포층을 파이펫으로 모으고, PBS(Gibco)으로 세척한 후 실온에서 350 g로 5분간 원심분리 하였다. 분리된 세포층은 5×10^5 cells/mL이 되도록 5% human AB serum(Sigma)을 포함하는 RPMI1640 배지로 현탁 하였다. PBMCs 현탁액은 암세포주가 분주 된 96-well microplate(Corning)의 각 well에 조건에 따라 $50 \mu\text{l}$ 씩 분주해 준다.
- [471] 세포의 사멸을 확인하기 위해 사멸하는 세포의 DNA에 결합하는 CytoTox Green reagent (IncuCyte™ CytoTox Green, Satorius)를 5% human AB serum(Sigma)을 포함하는 RPMI1640 배지 1 mL 당 $1 \mu\text{l}$ 으로 준비한다. 준비된

배지는 시험물질의 희석에 사용하며, 시험물질과 암세포주 및 PBMCs의 공동배양 시 사멸되는 세포를 염색함으로써 세포의 사멸효과를 정량적으로 확인할 수 있다.

- [472] Vactosertib power는 48.4 mM 농도가 되도록 DMSO(Sigma)에 용해하였으며, CytoTox Green reagent가 포함된 RPMI1640 배지를 이용하여 희석 후, 96-well microplate의 well당 최종 농도 12.1 nM(50 μ L)으로 실험에 사용하였다.
- [473] GI-101은 CytoTox Green reagent가 포함된 RPMI1640 배지를 이용하여 1/3씩 희석 후, 96-well microplate의 well당 50 μ L씩 최종농도 0.4 nM, 1.2 nM, 3.7 nM, 11.1 nM, 33.3 nM, 100 nM으로 실험에 사용하였다.
- [474] 준비된 시험물질은 암세포주와 PBMCs가 분주되어 있는 96-well microplate의 각 well에 조건에 맞게 넣어주고, 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 24시간 동안 배양하며 실시간 세포 이미징 분석 장비 IncuCyte S3(Satorious)를 통해 암세포의 증식 또는 사멸을 관찰하였다. 암세포의 사멸은 CytoTox Green reagent에 의해 초록색으로 염색되는 세포의 통합 강도(integrated intensity)로 정량화 하였다.
- [475] 그 결과, GI-101 및 Vactosertib 병용 투여 군이 각각의 약물을 투여한 군보다 암세포 사멸 효과가 우수함을 확인하였다.
- [476] **VII. 융합단백질 이량체 및 VEGFR 억제제 병용 투여에 따른 항암효과 확인**
- [477] **실험예 26. mGI-101 및 VEGFR 억제제(Axitinib) 병용투여에 의한 항암 효과 확인**
- [478] 본 시험은 마우스에 CT26(mouse colon carcinoma) 세포 또는 LL2(mouse lung carcinoma)를 동종 이식한 종양모델에서 시험물질인 mGI-101과 양성 대조물질인 Axitinib을 단독 및 병용 투여한 후 종양의 성장 억제효과를 평가한 것이다.
- [479] 표 13에 기재된 시험물질, 음성 대조물질, 양성 대조물질 원액을 각 용량에 맞게 부형제를 가하여 희석하였다.

[480] [표13]

-	시험물질	양성 대조물질	음성 대조물질
물질명	mGI-101	Axitinib	hIgG4
성상	투명 액체	투명 액체	투명 액체
성분	Fc 융합 단백질	VEGFR 억제제	-
부형제	히스티딘 버퍼(20 mM), pH 7.0, 폴록사머188 0.07 w/w%, 아르기닌-HCl 15 mg/mL, 수크로오스 150 mg/mL	0.5 % CMC(carboxymethylcellulose)	PBS
pH	7.5	-	-
보관 조건	냉장 보관 (4°C)	냉장 보관 (4°C)	냉장 보관 (4°C)
취급 시 주의 사항	투여시까지 냉장 보관하며, 투여당일 조제하여 사용	투여시까지 냉장 보관하며, 투여당일 조제하여 사용	투여시까지 냉장 보관하며, 투여당일 조제하여 사용

[481] 마우스 유래 대장암 세포인 CT26(*Mus musculus*, Colon adenocarcinoma) 및 마우스 유래 폐암 세포인 LL/2(*Mus musculus*, Lung adenocarcinoma)를 ATCC(USA)에서 구입하여 시험에 사용하였다. 시험에 사용할 세포는 해동하여 10% FBS(fetal bovine serum, Gibco, 10082-147)를 포함하는 RPMI1640(A1049101, Thermofisher scientific) 배지와 혼합한 다음, 세포 배양용 플라스크에 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. PBS로 세척한 다음 Trypsin-EDTA(15090, Gibco)를 이용하여 세포를 분리하고 원심분리(125 xg, 5 분)하여 상층액을 버린 뒤, 새로운 배지로 세포를 부유하여 세포 부유액을 얻었다. 세포의 viability를 확인한 다음, 5.0 x 10⁶ cells/mL의 농도로 배지에 희석하여 세포주를 준비하였다.

[482] 시험에는 6주령 수컷 BALB/cAnHsd 마우스 또는 C57BL/6NHsd 마우스를 구입하여 이용하였다. 7일간의 순화기간 종료 후 건강한 동물에 대하여 세포를 이식하였다. 세포부유액(5x10⁶ cells/mL)을 분주하고 일회용 주사기에 충전하여 동물의 우측 등 부위의 피하에 0.1 mL/head씩 투여하여 이식하였다. 세포주의 이식 후 생착 및 성장기간 동안 매일 1회 일반증상을 관찰하였다.

[483] 세포주 접종을 실시한 뒤, 세포주를 이식한 부위의 종양 크기가 약 50 mm³에

도달하였을 때, 순위화한 종양의 크기에 따라 각 군의 종양 크기가 최대한 균일하게 분포하도록 분배하였다.

[484] 표 14와 같이 시험군을 구성하였다. 시험물질을 경구 또는 복강 투여하였으며 시험군 구성에 따라 3주간 투여하였다. 경구투여의 경우, 동물을 경배부 피부 고정법으로 고정하고, 경구투여용 존데를 이용하여 위 내 직접 투여하였다. 복강투여의 경우, 동물을 경배부 피부 고정법으로 고정하고, 26 gauge needle이 장착된 주사기를 이용하여 복강내 투여하였다. 투여속도는 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ 을 넘지 않도록 하였다.

[485] [표14]

군	성별	투여물질	투여횟수	투여경로	투여량 (mg/kg/day)	투여액량 (mL/kg/day)
G1	M	Vehicle	2 회/주	IP	3	5
G2	M	mGI-101	2 회/주	IP	3	5
G3	M	Axitinib	3 회/주	PO	30	10
G4	M	mGI-101	2 회/주	IP	3	5
		Axitinib	3 회/주	PO	30	10

[486] 종양 크기는 실험예 24에 기재한 것과 동일한 방법으로 측정하였다.

[487] 실험예 26.1. 대장암 동종이식 마우스 종양 모델(CT26)

[488] Balb/c 마우스에 CT26 cell line을 피하 이식하여 Syngeneic model을 제작한 후, 시험물질을 투여하여 항암효과를 평가하였다.

[489] 종양 크기 측정 결과, 시험물질 투여개시 후 18일째 및 21일째에 G4의 종양 크기 수준은 G1, G2에 비하여 통계학적으로 유의하게 낮았다($p<0.0001$, $p<0.01$, 또는 $p<0.05$). 시험물질 투여개시 후 21일째에 G4의 종양 크기 수준은 G3에 비하여 통계학적으로 유의하게 낮았다($p<0.01$). 또한, 시험물질 투여개시 후 21일째에 G3의 종양 크기 수준은 G1, G2에 비하여 통계학적으로 유의하게 낮았다($p<0.001$, $p<0.01$)(도 80 및 도 82).

[490] [표15]

종양 크기				단위: mm ³
Da y	실험군			
	G1	G2	G3	G4
0	59.15 ± 11.65	63.53 ± 11.56	61.67 ± 12.58	59.58 ± 11.14
2	205.25 ± 31.92	148.98 ± 55.26	169.28 ± 32.19	127.90 ± 24.99
5	354.24 ± 32.53	186.53 ± 76.61	261.76 ± 61.86	178.53 ± 84.43
7	468.75 ± 75.04	249.93 ± 149.08	354.05 ± 104.90	224.92 ± 158.21
9	573.13 ± 101.41	290.71 ± 165.17	442.98 ± 148.70	235.75 ± 158.35
12	789.72 ± 88.58	352.46 ± 195.64	529.85 ± 206.76	254.91 ± 176.31*
14	1206.38 ± 229.96	520.04 ± 307.47**	671.72 ± 303.14*	254.76 ± 159.31****
16	1693.18 ± 210.83	962.28 ± 634.90**	970.72 ± 475.99**	381.38 ± 235.37 ***, #, \$
19	2037.27 ± 341.20	1395.48 ± 982.61**	1129.12 ± 639.16 ****	465.02 ± 285.88 ***, ####, \$\$
21	3082.01 ± 462.37	1987.45 ± 1320.62 ****	1710.57 ± 1133.79 ****	880.10 ± 632.96 ***, ####, \$\$
N	8	8	8	8

[491] 결과는 평균±표준편차로 표시하였다. N: 동물수, G1: Vehicle control IP, G2: mGI-101 3 mg/kg IP, G3: Axitinib 30 mg/kg PO, G4: mGI-101 3 mg/kg IP + Axitinib 30 mg/kg PO

[492] ***/*/*/* A significant difference at p<0.0001/p<0.01/p<0.05 level compared to the Vehicle

[493] #### A significant difference at p<0.0001/p<0.05 level compared to the mGI-101

[494] \$\$\$/\$/\$ A significant difference at p<0.001/p<0.01/p<0.05 level compared to the Axitinib

[495] 종양 성장 저해율 계산 결과, 시험물질 투여개시 후 2일째부터 21일째까지 G2, G4의 종양 성장 저해 수준은 G1에 비하여 통계학적으로 유의하게 높았으며(p<0.0001, p<0.001, p<0.01 또는 p<0.05), 시험물질 투여개시 후 9 일째부터 14일째까지 G4의 종양 성장 저해 수준은 G3에 비하여 통계적으로 유의하게 높았다(p<0.05). 또한, 시험물질 투여개시 후 19 일째에 G4의 종양 성장 저해 수준은 G2에 비하여 통계적으로 유의하게 높았다(p<0.05).

[496] 실험 종료 시점에서 종양 성장 저해율 30%, 50%, 80% 이상인 마우스는 도 81에 나타낸 것과 같다.

[497] [표16]

종양 성장 저해				단위: %
Day	실험군			
	G1	G2	G3	G4
2	0.00 ± 22.76	41.51 ± 36.11*	26.34 ± 20.47	53.24 ± 19.71***
5	0.00 ± 10.69	58.32 ± 24.95***	32.19 ± 18.64	59.69 ± 29.99***
7	0.00 ± 19.60	62.12 ± 38.89****	28.62 ± 24.35	59.63 ± 39.68***
9	0.00 ± 20.29	62.87 ± 34.95****	25.81 ± 27.77	65.72 ± 31.54****,#,\$
12	0.00 ± 11.98	66.48 ± 29.50****	35.92 ± 27.44	73.26 ± 24.71****,\$
14	0.00 ± 20.33	65.87 ± 29.12****	46.82 ± 25.79**	82.99 ± 14.19****,\$
16	0.00 ± 13.20	52.36 ± 41.33**	44.37 ± 28.66**	80.31 ± 14.77****
19	0.00 ± 17.31	41.48 ± 52.17*	46.04 ± 31.96**	79.50 ± 14.72****,#
21	0.00 ± 15.45	44.57 ± 46.55**	45.45 ± 37.30**	72.86 ± 21.07****
N	8	8	8	8

[498] 결과는 평균±표준편차로 표시하였다. N: 동물수, G1: Vehicle control IP, G2: mGI-101 3 mg/kg IP, G3: Axitinib 30 mg/kg PO, G4: mGI-101 3 mg/kg IP + Axitinib 30 mg/kg PO

[499] ****/***/*/*/*/* A significant difference at p<0.0001/p<0.001/p<0.01/p<0.05 level compared to the Vehicle

[500] # A significant difference at p<0.05 level compared to the mGI-101 3 mg/kg

[501] \$ A significant difference at p<0.05 level compared to the mGI-101 3 mg/kg + Axitinib 30 mg/kg

[502] 실험예 26.2. 폐암 동종이식 마우스 종양 모델(LL/2)

[503] C57BL/6 마우스에 LL/2 cell line을 피하 이식하여 Syngeneic model을 제작한 후, 시험물질을 투여하여 항암효과를 평가하였다.

[504] 종양 크기 측정 결과, G3 및 G4의 경우 시험종료시까지 G1 대비 낮은 종양 크기 수준을 유지하였다. 또한, G4의 종양 크기 수준은 전 시험기간동안 모든 시험군 중 가장 낮은 수준을 나타냈고, 시험물질 투여개시 후 19 일째에 G4의 종양 크기 수준은 G1(p<0.05), G2(p<0.01)에 비하여 통계학적으로 유의하게 낮았다.

[505] 시험물질 투여개시 후 21 일째에 G4의 종양 크기 수준은 G1(p<0.0001), G2(p<0.0001), G3(p<0.01)의 모든 군에 비하여 통계학적으로 유의하게 낮았다. 또한, 시험물질 투여개시 후 21 일째에 G3의 종양 크기 수준은 G1(p<0.01),

G2($p<0.001$)에 비하여 통계학적으로 유의하게 낮았다(도 83 및 도 85).

[506] [표17]

종양 크기				단위: mm ³
Day	실험군			
	G1	G2	G3	G4
0	55.75 ± 12.29	55.70 ± 11.48	55.77 ± 11.25	55.73 ± 9.99
2	96.34 ± 25.87	99.18 ± 19.96	88.73 ± 21.26	98.80 ± 24.93
5	181.94 ± 40.25	179.58 ± 39.71	179.31 ± 52.62	179.21 ± 58.26
7	460.71 ± 126.65	409.37 ± 72.98	362.30 ± 97.92	341.77 ± 91.55
9	791.60 ± 247.83	749.00 ± 174.47	584.17 ± 172.94	544.37 ± 155.89
12	1141.58 ± 236.27	1066.72 ± 307.18	892.90 ± 256.88	841.86 ± 267.92
14	1637.35 ± 402.07	1608.00 ± 572.50	1292.27 ± 385.43	1242.66 ± 424.70
16	2219.74 ± 442.05	2200.03 ± 850.12	1775.26 ± 462.50(9)	1693.31 ± 579.80
19	3044.87 ± 518.05	3223.87 ± 1191.11	2551.08 ± 695.31(9)	2215.02 ± 667.76 *,##
21	5285.56 ± 1120.41	5431.08 ± 1673.60	4236.33 ± 1060.18(9) **,##	3255.38 ± 819.52 ****,####,\$\$
N	10	10	10	10

[507] 결과는 평균±표준편차로 표시하였다. N: 동물수, G1: Vehicle control IP, G2: mGI-101 3 mg/kg IP, G3: Axitinib 30 mg/kg PO, G4: mGI-101 3 mg/kg IP + Axitinib 30 mg/kg PO

[508] ****/* A significant difference at $p<0.0001/p<0.05$ level compared to the Vehicle

[509] ##### A significant difference at $p<0.0001/p<0.01$ level compared to the mGI-101 3 mg/kg

[510] \$\$ A significant difference at $p<0.01$ level compared to the mGI-101 3 mg/kg + Axitinib 30 mg/kg

[511] 종양 성장 저해율 계산 결과, 시험물질 투여개시 후 19일째 및 21일째에 G4의 종양 성장 저해 수준은 G2에 비하여 통계학적으로 유의하게 높았으며($p<0.01$, $p<0.05$), 시험물질 투여개시 후 21일째에 G4의 종양 성장 저해 수준은 G1에 비하여 통계적으로 유의하게 높았다($p<0.05$). G4에서 가장 낮은 종양 크기 수준이 관찰되었으며, 종양 성장 저해율 역시 가장 높은 경향을 보였다.

[512] 실험 종료 시점에서 종양 성장 저해율 30%, 50%, 80%이상인 마우스는 도 84에

나타낸 것과 같다.

[513] [표18]

종양 성장 저해				단위: %
Day	실험군			
	G1	G2	G3	G4
2	0.00 ± 46.91	-7.12 ± 34.31	18.79 ± 28.38	-6.12 ± 53.19
5	0.00 ± 26.04	1.83 ± 27.19	2.10 ± 36.27	2.15 ± 43.77
7	0.00 ± 29.89	12.67 ± 19.15	24.30 ± 23.63	29.36 ± 21.69*
9	0.00 ± 33.79	5.78 ± 24.08	28.19 ± 23.46	33.59 ± 20.83
12	0.00 ± 21.78	6.89 ± 28.47	22.90 ± 23.42	27.60 ± 24.47
14	0.00 ± 25.38	1.85 ± 36.39	21.82 ± 24.12	24.95 ± 26.67
16	0.00 ± 20.30	0.91 ± 39.37	20.58 ± 21.15(9)	24.33 ± 26.59
19	0.00 ± 17.10	-5.99 ± 39.91	16.55 ± 23.06(9)	27.76 ± 22.20#
21	0.00 ± 21.32	-2.78 ± 32.04	20.08 ± 20.18(9)	38.82 ± 15.63*##
N	10	10	10	10

[514] 결과는 평균±표준편차로 표시하였다. N: 동물수, G1: Vehicle control IP, G2: mGI-101 3 mg/kg IP, G3: Axitinib 30 mg/kg PO, G4: mGI-101 3 mg/kg IP + Axitinib 30 mg/kg PO

[515] * A significant difference at p<0.05 level compared to the Vehicle

[516] ### A significant difference at p<0.01/p<0.05 level compared to the mGI-101 3 mg/kg

[517] 실험예 27. mGI-101 및 VEGFR 억제제(Lenvatinib) 병용투여에 의한 항암 효과 확인

[518] 실험예 27.1. 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서 mGI-101 및 Lenvatinib 병용투여에 의한 항암 효과 확인

[519] 본 실험은 BALB/c 마우스에 CT26(murine colon carcinoma cells) 세포를 동종 이식한 종양모델에서 시험물질 mGI-101 단독 또는 Lenvatinib 물질과 병용으로 투여한 후 종양의 성장 억제효과를 평가한 것이다.

[520] CT26 세포는 ATCC(USA)로부터 분양 받아 10% FBS(Gibco) 및 1% 항생제/항진균제(Gibco)를 포함하는 RPMI1640 배지(Gibco)에서 배양하였다. 배양한 세포는 트립신(Gibco)을 이용하여 수확한 후 PBS에 현탁하였다. 동종이식 종양모델을 확립하기 위해 BALB/c 암컷 마우스(7주령) 오른쪽 옆구리에 s.c.로 1x10⁶개의 CT26 세포를 주입하였다. 세포주의 이식 후 생착 및 성장기간 동안 매일 1회 일반증상을 관찰하였다.

[521] 세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 동물의 건강상태에 이상이 없는 동물에

대해 종양의 부피를 측정하여, 각 군의 종양부피 평균이 70-100 mm³ 미만인 되도록 그룹 당 10마리씩 할당하였다. 표 19와 같이 시험군을 구성하고 시험물질을 투여하였다.

[522] Lenvatinib powder의 경우 투여량을 산출하여 칭량하고, 0.5% methyl cellulose 부형제를 이용하여 투여 농도로 조제하였으며, 시험물질의 loss를 최소화하기 위하여 3일 또는 4일치를 칭량하고, 투여 당일 부형제를 이용하여 조제하여 주사하였다.

[523] [표19]

시험군		투여경로	투여 주기	투여용량	동물 수
G1	Vehicle control (PBS)	i.v.	QW (1회/주)	- mg/kg	10
G2	mGI-101	i.v.	QW (1회/주)	3 mg/kg	10
G3	Lenvatinib	p.o.	매일	3 mg/kg	10
G4	mGI-101 + Lenvatinib	i.v. + p.o.	mGI-101: QW (1회/주), Lenvatinib: 매일	3 mg/kg + 3 mg/kg	10

[524] 시험기간 동안 매일 1회 질병 및 행동변화 등의 임상증상을 관찰하고, 사망동물을 확인했으며, 암종의 크기가 4,000 mm³ 크기에 도달하는 마우스는 희생하였다. CT26 고형암의 크기는 관찰기간 동안 주 2회, 캘리퍼스 (Digital caliper, Mitutoyo, Japan)를 사용하여 종양의 장축 (maximum length, L)과 단축 (perpendicular width, W)을 아래의 계산식에 대입하여 종양의 부피(tumor volume, TV)와 종양 성장 저해율 (Tumor growth inhibition, TGI)을 측정하였다.

[525] <수학식 1>

[526] $TV(mm^3) = (W^2 \times L) / 2$

[527] <수학식 2>

[528] $\%TGI(Tumor\ Growth\ Inhibition) = (1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)) \times 100$

[529] 각 개체의 투여 전의 종양의 부피는 군분리 시 측정된 값으로 설정하였다.

[530] 모든 통계 계산은 Prism 8.0 (Graph Pad Software Inc, USA)을 사용하여 수행하였다. 종양 부피 측정이 비교는 이원 분산 분석에 이어 Tukey의 다중 비교 테스트를 통해 이루어졌다. 0.05 미만의 *p* 값은 유의미한 것으로 간주되었다.

[531] CT26 종양에 대해 mGI-101 단독투여 혹은 Lenvatinib 물질과 병용 투여 시 종양 크기 결과는 도 86과 같다. 종양 크기 측정 결과, 대조군과 비교하여 Lenvatinib 단독 및 mGI-101+Lenvatinib 병용 투여 군에서 통계학적으로 유의미한 항암 효과가 관찰되었다. Lenvatinib 단독 처리군의 종양 크기 수준은 시험물질 투여 개시 후 18일 및 21일째에 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 낮았다 (*p*<0.5,

$p<0.1$). mGI-101+Lenvatinib 병용투여 군의 종양 크기 수준은 시험물질 투여 개시 후 16일, 18일, 21일째에 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 낮았으며 ($p<0.5$, $p<0.001$, $p<0.0001$), mGI-101 단독 투여군에 비하여 18일, 21일째에 통계적으로 유의하게 낮았다 ($p<0.01$, $p<0.0001$).

- [532] 시험군별 개별 종양 크기는 도 88과 같다. 개별 종양 크기 결과에 따르면, mGI-101+Lenvatinib 병용투여 시 mGI-101 단독 투여군에 비하여 우수한 종양 성장 저해 효과를 나타냈다.
- [533] 실험 종료 시점에서 종양 성장 저해율 30%, 50%, 80% 이상인 마우스는 도 87과 같다. Vehicle 대조군은 종양성장 억제율 30% 이상 4마리, 50% 이상 3마리였으며, 80% 이상 마우스는 1마리였다. mGI-101 단독 투여군은 종양성장 억제율 30% 이상 6마리, 50% 이상 2마리, 80% 이상 1마리였다. Lenvatinib 단독 투여군은 종양성장 억제율 30% 이상 6마리, 50% 이상 4마리, 80% 이상 1마리였다. mGI-101+Lenvatinib 병용투여군은 종양성장 억제율 30% 이상 10마리, 50% 이상 6마리, 80% 이상은 없었다.
- [534] 실험예 27.2. 마우스 유래 신장 암세포주 식립 마우스에서 mGI-101 및 Lenvatinib 병용투여에 의한 항암 효과 확인
- [535] 본 실험은 BALB/c 마우스에 Renca(mouse renal cancer cells) 세포를 동종 이식한 종양모델에서 시험물질 mGI-101 단독 또는 Lenvatinib 물질과 병용으로 투여한 후 종양의 성장 억제효과를 평가한 것이다.
- [536] Renca 세포는 ATCC(USA)로부터 분양 받아 10% FBS(Gibco) 및 1% 항생제/항진균제(Gibco)를 포함하는 RPMI1640 배지(Gibco)에서 배양하였다. 배양한 세포는 트립신(Gibco)을 이용하여 수확한 후 PBS에 현탁하였다. 동종이식 종양모델을 확립하기 위해 BALB/c 암컷 마우스(8주령) 등에 s.c.로 5×10^6 개의 Renca 세포를 주입하였다. 세포주의 이식 후 생착 및 성장기간 동안 매일 1회 일반증상을 관찰하였다.
- [537] 마우스의 종양 이식편은 세포 접종 후 일정기간 경과 후에 동물의 건강상태에 이상이 없는 동물에 대해 종양의 부피를 측정하여 무작위로 선별하여 그룹 당 10마리씩 할당하였다. 표 20과 같이 시험군을 구성하고 시험물질을 투여하였다.

[538] [표20]

실험군		투여경로	투여 주기	투여용량	동물 수
G1	Vehicle control (PBS)	i.p.	QW (1회/주)	- mg/kg	10
G2	mGI-101	i.p.	BIW (2회/주)	3 mg/kg	10
G3	Lenvatinib	p.o.	매일	3 mg/kg	10
G4	mGI-101 + Lenvatinib	i.p. + p.o.	mGI-101: BIW (2회/주), Lenvatinib: 매일	3 mg/kg + 3 mg/kg	10

[539] 시험기간 동안 마우스의 사망여부, 일반증상의 종류, 발현일 및 증상의 정도를 1일 1회 관찰하고 개체별로 기록하였다. Renca 고형암의 크기는 관찰기간 동안 주 2회, 버니어캘리퍼스를 사용하여 종양의 장축(maximum length, L)과 단축(perpendicular width, W)을 측정하였고, 아래의 계산식에 대입하여 종양의 부피(tumor volume, TV)와 종양 성장 저해율(Tumor growth inhibition, TGI)을 측정하였다.

[540] <수학식 1>

[541] $TV(mm^3) = (W^2 \times L)/2$

[542] <수학식 2>

[543] $\%TGI(Tumor\ Growth\ Inhibition) = (1 - (T_i - T_0)/(V_i - V_0)) \times 100$

[544] 각 개체의 투여 전의 종양의 부피는 군분리 시 측정된 값으로 설정하였으며, 항종양 효능은 vehicle 대조군과 비교하여 평가하였다.

[545] 모든 통계 계산은 Prism 8.0(Graph Pad Software Inc, USA)을 사용하여 수행하였다. 종양 부피 측정이 비교는 이원 분산 분석에 이어 Tukey의 다중 비교 테스트를 통해 이루어졌다. 0.05 미만의 p 값은 유의미한 것으로 간주되었다.

[546] Renca 종양에 대해 mGI-101 단독투여 혹은 Lenvatinib 물질과 병용 투여 시 종양 크기 결과는 도 89와 같다. 종양 크기 측정 결과, mGI-101(BIW)+Lenvatinib 병용 투여 군의 경우 vehicle 대조군 및 mGI-101(BIW) 단독 투여 군에 비하여 시험물질 투여 개시 후 15일 째에 통계적으로 유의하게 낮았다($p < 0.05$).

[547] 시험군별 개별 종양 크기는 도 91과 같다. 개별 종양 크기 결과에 따르면, mGI-101(BIW)+Lenvatinib 병용 투여 군의 경우 우수한 종양 성장 저해 효과를 나타내었다.

[548] 도 90은 Renca 식립 마우스에서 mGI-101과 Lenvatinib 병용 시 종양 성장 억제율을 나타낸 것이다. Vehicle 대조군은 종양성장 억제율 30% 이상 4마리, 50% 이상 3마리였으며, 80% 이상 2마리였다. mGI-101 주 1회 단독 투여군은 종양성장 억제율 30% 이상 5마리, 50% 이상 2마리, 80% 이상 1마리였다. mGI-101 주 2회 단독 투여군은 종양성장 억제율 30% 이상 3마리, 50% 이상

1마리, 80% 이상의 마우스는 없었다. Lenvatinib 단독 투여군은 종양성장 억제율 30% 이상 4마리, 50% 이상 2마리, 80% 이상의 마우스는 없었다.

mGI-101(BIW)+Lenvatinib 병용 투여군은 종양성장 억제율 30% 이상 8마리, 50% 이상 6마리, 80% 이상 1마리였다.

- [549] **VIII. 융합단백질 이량체 및 EGFR 억제제 병용 투여에 따른 항암효과 확인**
- [550] **실험예 28. mGI-101 및 EGFR 억제제(Cetuximab) 병용치리에 의한 항암 효과 확인**
- [551] 본 실험은 시험관 내 환경에서 HCT116(human colon cancer cells) 세포에 시험물질 GI-101 단독 처리 또는 Cetuximab 물질과 병용 처리하고 이에 의한 암세포의 사멸 효과를 평가한 것이다.
- [552] HCT116 세포는 한국 세포주 은행으로부터 분양 받아 10% FBS(Gibco) 및 1% 항생제/항진균제(Gibco)를 포함하는 McCoy's 5A 배지(ATCC)에서 배양하였다. 암세포 사멸시험에 사용하기 위해 세포는 트립신(Gibco)을 이용하여 수확한 후 McCoy's 5A 배지에 현탁 후, Ficoll(GE Healthcare Life Sciences) 용액을 이용하여 죽은 세포 및 debris 제거를 해주었다. McCoy's 5A 배지에 현탁한 세포는 ficoll 용액 위에 조심스럽게 중층하였다. 실온에서 350g로 20분간 원심분리하여 형성된 저비중의 세포층을 파이펫으로 모으고, PBS(Gibco)으로 세척한 후 실온에서 350g으로 5분간 원심분리 하였다. 분리된 세포층은 FBS free RPMI1640 배지로 2×10^5 cells/mL이 되도록 부유액을 만들었다. 암세포 현탁액은 암세포 증식 혹은 증식 억제 추적에 위해 CellTracker™ Deep Red Dye(Thermo)를 사용하여 37°C에서 1시간 동안 염색하였다. 염색 후 1300 rpm에서 5분간 원심분리 후 FBS free RPMI1640 배지로 세척한 후, 2×10^5 cells/mL이 되도록 5% human AB serum(Sigma)을 포함하는 RPMI1640 배지로 현탁 하였다. 암세포 현탁액은 96-well microplate(Corning)의 각 well에 50 μ L(1×10^4 cells)씩 가한 후, 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 1시간 동안 안정화시켰다.
- [553] 시험물질에 의한 항체-의존적 세포-매개 세포독성(Antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC)을 통한 암세포 사멸 확인을 위해 사람 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)에서 CD56+CD16+ NK cell isolation kit(Miltenyi Biotec)를 이용하여 자연살해세포(natural killer cell, NK cell)를 분리하여 사용하였다. 분리한 NK 세포는 암세포주와 동일한 방식으로 Ficoll(GE Healthcare Life Sciences) 용액을 이용하여 죽은 세포 및 debris 제거를 해주었다. RPMI1640 배지에 현탁한 세포는 ficoll 용액 위에 조심스럽게 중층하였다. 실온에서 350xg로 20분간 원심분리하여 형성된 저비중의 세포층을 파이펫으로 모으고, PBS(Gibco)으로 세척한 후 실온에서 350xg으로 5분간 원심분리 하였다. 분리된 세포층은 2×10^5 cells/mL이 되도록 5% human AB serum(Sigma)을 포함하는 RPMI1640 배지로 현탁 하였다. PBMCs 현탁액은 암세포주가 분주 된 96-well microplate(Corning)의 각 well에 조건에 따라 50 μ L씩 분주해 주었다.

- [554] 세포의 사멸을 확인하기 위해 사멸하는 세포의 DNA에 결합하는 CytoTox Green reagent (IncuCyte™ CytoTox Green, Satorius)를 5% human AB serum(Sigma)을 포함하는 RPMI1640 배지 1 mL 당 1 μ L으로 준비하였다. 준비된 배지는 시험물질의 희석에 사용하며, 시험물질과 암세포주 및 PBMCs의 공동배양 시 사멸되는 세포를 염색함으로써 세포의 사멸효과를 정량적으로 확인할 수 있다.
- [555] Cetuximab은 CytoTox Green reagent가 포함된 RPMI1640 배지를 이용하여 희석 후, 96-well microplate의 well당 최종 농도 68.6 nM (50 μ l)으로 실험에 사용하였다. GI-101은 CytoTox Green reagent가 포함된 RPMI1640 배지를 이용하여 1/3씩 희석 후, 96-well microplate의 well당 50 μ l씩 최종농도 100 nM으로 실험에 사용하였다.
- [556] 준비된 시험물질은 암세포주와 PBMCs가 분주되어 있는 96-well microplate의 각 well에 조건에 맞게 넣어주고, 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 24시간 동안 배양하며 실시간 세포 이미징 분석 장비 IncuCyte S3(Satorious)를 통해 암세포의 증식 또는 사멸을 관찰하였다. 암세포의 사멸은 CytoTox Green reagent에 의해 초록색으로 염색되는 세포의 통합 강도 (integrated intensity)로 정량화 하였다.
- [557] 도 92는 GI-101을 100 nM 농도로 암세포에 처리하고 암세포 사멸 정도를 측정한 것이다. GI-101 단독, Cetuximab 단독 및 GI-101+Cetuximab 병용 처리한 조건 모두 높은 수준의 암세포 사멸을 보였으며, GI-101+Cetuximab 병용 처리한 군에서 가장 우수한 암세포 사멸을 나타내었다.
- [558] **IX. 융합단백질 이량체 및 PARP 억제제 병용 투여에 따른 항암효과 확인**
- [559] **실험예 29. mGI-101 및 PARP 억제제(Olaparib) 병용투여에 의한 항암 효과 확인**
- [560] 본 실험은 BALB/c 마우스에 4T1(mouse breast cancer cells) 세포를 동종 이식한 종양모델에서 시험물질 mGI-101의 단독 또는 PARP 억제제인 Olaparib과의 병용투여 후 종양의 성장 억제효과를 평가한 것이다.
- [561] 4T1 세포는 ATCC(USA)로부터 분양 받아 10% FBS(Gibco) 및 1% 항생제/항진균제(Gibco)를 포함하는 RPMI1640 배지(Gibco)에서 배양하였다. 배양한 세포는 트립신(Gibco)을 이용하여 수확한 후 PBS에 현탁하였다. 동종이식 종양모델을 확립하기 위해 BALB/c 암컷 마우스(8주령) 등에 s.c.로 1x10⁵개의 4T1 세포를 주입하였다. 세포주의 이식 후 생착 및 성장기간 동안 매일 1회 일반증상을 관찰하였다.
- [562] 마우스의 종양 이식편은 세포 접종 후 일정기간 경과 후에 동물의 건강상태에 이상이 없는 동물에 대해 종양의 부피를 측정하여 무작위로 선별하여 그룹 당 11마리씩 할당하였다. 표 21과 같이 시험군을 구성하고 시험물질을 투여하였다.

[563] [표21]

실험군		투여경로	투여 주기	투여용량	동물 수
G1	Vehicle control (PBS)	i.p.	QW (1회/주)	- mg/kg	11
G2	mGI-101	i.p.	BIW (2회/주)	3 mg/kg	11
G3	Olaparib	P.O.	5회/주	30 mg/kg	11
G4	mGI-101 + Olaparib	i.p. + P.O.	mGI-101: BIW (2회/주), Olaparib: 5회/주	3 mg/kg + 30 mg/kg	11

[564] 시험기간 동안 매일 1회 질병 및 행동변화 등의 임상증상을 관찰하고, 사망동물을 확인했으며, 종양의 크기가 4,000 mm³ 크기에 도달하는 마우스는 희생하였다. 4T1 고형암의 크기는 관찰기간 동안 주 2회, 캘리퍼스 (Digital caliper, Mitutoyo, Japan)를 사용하여 종양의 장축 (maximum length, L)과 단축 (perpendicular width, W)을 아래의 계산식에 대입하여 종양의 부피(tumor volume, TV)와 종양 성장 저해율(Tumor growth inhibition, TGI)을 측정하였다.

[565] <수학식 1>

[566] $TV(mm^3) = (W^2 \times L)/2$

[567] <수학식 2>

[568] $\%TGI(Tumor\ Growth\ Inhibition) = (1 - (T_i - T_0)/(V_i - V_0)) \times 100$

[569] 각 개체의 투여 전의 종양의 부피는 군분리 시 측정된 값으로 설정하였으며, 항종양 효능은 vehicle 대조군과 비교하여 평가하였다.

[570] 모든 통계 계산은 Prism 8.0(Graph Pad Software Inc, USA)을 사용하여 수행하였다. 종양 부피 측정이 비교는 이원 분산 분석에 이어 Tukey의 다중 비교 테스트를 통해 이루어졌다. 0.05 미만의 p 값은 유의미한 것으로 간주되었다.

[571] 4T1 종양에 대해 mGI-101 단독투여 혹은 Olaparib 물질과 병용 투여 시 종양 크기 결과는 도 94와 같다. 종양 크기 측정 결과, 대조군과 비교하여 약물 처리 군에서 항암 효과가 관찰되었으며, mGI-101 단독 및 Olaparib 물질과 병용투여 시 종양 크기 수준은 단독투여군에 비하여 우수한 종양 성장 억제 효과를 나타냈다.

[572] 실험예 30. mGI-101 및 PARP 억제제(Talazoparib) 병용투여에 의한 항암 효과 확인

[573] 본 실험은 시험관 내 환경에서 MDA-MB-231(human breast cancer cells) 세포에 시험물질 GI-101 단독 처리 또는 PARP 억제제인 Talazoparib 물질과의 병용 처리에 의한 암세포의 사멸 효과를 평가한 것이다.

[574] MDA-MB-231 세포는 한국 세포주 은행으로부터 분양 받아 10% FBS(Gibco) 및 1% 항생제/항진균제(Gibco)를 포함하는 RPMI1640 배지(Gibco)에서 배양하였다. 암세포 사멸시험에 사용하기 위해 세포는 트립신(Gibco)을 이용하여 수확한 후

RPMI1640 배지에 현탁 후, Ficoll(GE Healthcare Life Sciences) 용액을 이용하여 죽은 세포 및 debris 제거를 해 주었다. RPMI1640 배지에 현탁한 세포는 ficoll 용액 위에 조심스럽게 중층하였다. 실온에서 350 g로 20분간 원심분리하여 형성된 저비중의 세포층을 파이펫으로 모으고, PBS(Gibco)으로 세척한 후 실온에서 350g으로 5분간 원심분리 하였다. 분리된 세포층은 FBS free RPMI1640 배지로 2×10^5 cells/mL이 되도록 부유액을 만들었다. 암세포 현탁액은 암세포 증식 혹은 증식 억제 추적에 위해 CellTracker™ Deep Red Dye(Thermo)를 사용하여 37°C에서 1시간 동안 염색하였다. 염색 후 1300rpm에서 5분간 원심분리 후 FBS free RPMI1640 배지로 세척한 후, 2×10^5 cells/mL이 되도록 5% human AB serum(Sigma)을 포함하는 RPMI1640 배지로 현탁 하였다. 암세포 현탁액은 96-well microplate(Corning)의 각 well에 $50 \mu\text{l}$ (1×10^4 cells)씩 가한 후, 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 1시간 동안 안정화시킨다.

- [575] GI-101에 의한 암세포 사멸 확인을 위해 사람 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 사용하였다. 사람 PBMC는 Zen-Bio를 통해 구매하였으며, 냉동 보관된 PBMC는 37°C water bath에 넣어서 최대한 빨리 해동시킨 후, 10% FBS(Gibco) 및 1% 항생제/항진균제(Gibco)를 포함하는 RPMI1640 배지(Gibco)에 옮겨주어 1300rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 분리된 세포층은 RPMI1640 배지로 현탁 후, 암세포주와 동일한 방식으로 Ficoll(GE Healthcare Life Sciences) 용액을 이용하여 죽은 세포 및 debris 제거를 해 주었다. RPMI1640 배지에 현탁한 세포는 ficoll 용액 위에 조심스럽게 중층하였다. 실온에서 350xg로 20분간 원심분리하여 형성된 저비중의 세포층을 파이펫으로 모으고, PBS(Gibco)으로 세척한 후 실온에서 350 g으로 5분간 원심분리 하였다. 분리된 세포층은 5×10^5 cells/mL이 되도록 5% human AB serum(Sigma)을 포함하는 RPMI1640 배지로 현탁 하였다. PBMCs 현탁액은 암세포주가 분주된 96-well microplate(Corning)의 각 well에 조건에 따라 $50 \mu\text{l}$ 씩 분주해 주었다.
- [576] 세포의 사멸을 확인하기 위해 사멸하는 세포의 DNA에 결합하는 CytoTox Green reagent (IncuCyte™ CytoTox Green, Satorius)를 5% human AB serum(Sigma)을 포함하는 RPMI1640 배지 1 mL 당 $1 \mu\text{l}$ 으로 준비하였다. 준비된 배지는 시험물질의 희석에 사용하며, 시험물질과 암세포주 및 PBMCs의 공동배양 시 사멸되는 세포를 염색함으로써 세포의 사멸효과를 정량적으로 확인할 수 있다.
- [577] Talazoparib 시험물질은 CytoTox Green reagent가 포함된 RPMI1640 배지를 이용하여 희석 후, 96-well microplate의 well당 최종 농도 0.57 nM($50 \mu\text{l}$)으로 실험에 사용하였다. GI-101은 CytoTox Green reagent가 포함된 RPMI1640 배지를 이용하여 1/3씩 희석 후, 96-well microplate의 well당 $50 \mu\text{l}$ 씩 최종농도 0.4 nM, 1.2 nM, 3.7 nM, 11.1 nM, 33.3 nM, 100 nM으로 실험에 사용하였다.
- [578] 준비된 시험물질은 암세포주와 PBMCs가 분주되어 있는 96-well microplate의 각 well에 조건에 맞게 넣어주고, 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 24시간 동안

배양하며 실시간 세포 이미징 분석 장비 IncuCyte S3(Satorious)를 통해 암세포의 증식 또는 사멸을 관찰하였다. 암세포의 사멸은 CytoTox Green reagent에 의해 초록색으로 염색되는 세포의 통합 강도(integrated intensity)로 정량화 하였다.

[579] 그 결과, GO-101 및 Talazoparib 병용 투여 군이 각각의 약물을 투여한 군보다 암세포 사멸 효과가 우수함을 확인하였다.

[580] **X. 융합단백질 이량체 및 DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제 병용 투여에 따른 항암효과 확인**

[581] **실험예 31. 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서 mGI-101 및 Guadecitabine 병용투여에 의한 항암 효과 확인**

[582] 본 실험은 BALB/c 마우스에 CT26(murine colon carcinoma cells) 세포를 동종 이식한 종양모델에서 시험물질 mGI-101의 단독 또는 DNA 메틸화를 저해하는 Guadecitabine 물질과 병용 투여한 후 종양의 성장 억제효과를 평가한 것이다.

[583] CT26 세포는 ATCC(USA)로부터 분양 받아 10% FBS(Gibco) 및 1% 항생제/항진균제(Gibco)를 포함하는 RPMI1640 배지(Gibco)에서 배양하였다. 배양한 세포는 트립신(Gibco)을 이용하여 수확한 후 PBS에 현탁하였다. 동종이식 종양모델을 확립하기 위해 BALB/c 암컷 마우스(8주령) 오른쪽 옆구리에 s.c.로 5×10^5 개의 CT26 세포를 주입하였다(도 97).

[584] 마우스의 종양 이식편은 세포 접종 후 약 7일째에 확인되었으며, 종양부피($50-120 \text{ mm}^3$)를 기준으로 그룹 당 13마리를 무작위로 할당하였다. 표 22와 같이 시험군을 구성하고 시험물질을 투여하였다.

[585] [표22]

실험군		투여경로	투여 주기	투여용량	동물 수
G1	Vehicle control (PBS)	i.p.	QW (1회/주)	- mg/kg	13
G2	mGI-101	i.v.	QW (1회/주)	0.6 mg/kg	13
G3	mGI-101	i.v.	QW (1회/주)	3 mg/kg	13
G4	Guadecitabine	i.p.	총 4회, 4일 연속	50 μg	13
G5	mGI-101 + Guadecitabine	i.v. + i.p.	mGI-101: QW (1회/주), Guadecitabine: 총 4회, 4일 연속	0.6 mg/kg + 50 μg	13
G6	mGI-101 + Guadecitabine	i.v. + i.p.		3 mg/kg + 50 μg	13

[586] 시험기간 동안 매일 1회 질병 및 행동변화 등의 임상증상을 관찰하고, 사망동물을 확인했으며, 암종의 크기가 $4,000 \text{ mm}^3$ 크기에 도달하는 마우스는 희생시켰다. CT26 고형암의 크기는 종양 3D 스캐너(TM900, Peria, Belgium)를 이용하여 측정하였다. 각 실험군에 대해 평균 체중 감소 및 백분율 변화와 평균

종양 성장 저해를 계산하였다. 항종양 효능은 vehicle 대조군과 비교하여 평가하였다. 모든 통계 계산은 Prism 8.0(Graph Pad Software Inc, USA)을 사용하여 수행하였다. 종양 부피 측정이 비교는 이원 분산 분석에 이어 Tukey의 다중 비교 테스트를 통해 이루어졌다. 0.05 미만의 p 값은 유의미한 것으로 간주되었다.

- [587] CT26 종양에 대해 mGI-101 단독투여 혹은 Guadecitabine 물질과 병용 투여 시 종양 크기 결과는 도 97 및 도 100과 같다. 종양 크기 측정 결과, 대조군과 비교하여 약물 처리 군에서 항암 효과가 관찰되었으며, mGI-101 단독 투여군에 비해 Guadecitabine 병용투여 시 더 우수한 종양 성장 저해 효과를 나타냈다. mGI-101(3 mg/kg) + Guadecitabine 병용 투여군의 종양 크기는 시험물질 투여 개시 후 7일째에 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 낮았다($p<0.05$). 시험물질 투여 개시 후 10일 째는 mGI-101(0.6 mg/kg) 단독 투여 군의 종양 크기 수준은 대조군에 비해 낮은 경향을 보였으며, mGI-101(3 mg/kg) 단독 투여 군의 종양 크기 수준은 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 낮았다($p<0.05$). mGI-101(0.6 mg/kg) + Guadecitabine 병용 투여 군과 mGI-101(3 mg/kg) + Guadecitabine 병용 투여 군의 종양 크기 수준은 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 낮았다($p<0.01$, $p<0.001$).
- [588] 시험군별 개별 종양 크기는 도 99 및 도 102와 같다. 개별 종양 크기 결과에 따르면, mGI-101 단독투여 시에도 종양 성장 저해 효과를 보였으며, Guadecitabine 물질과 병용 투여군에서 가장 우수한 종양 성장 저해 효과를 나타냈다.
- [589] 실험 종료 시점에서 종양 성장 저해율 30%, 50%, 80% 이상인 마우스는 도 99 및 도 101과 같다. mGI-101(3 mg/kg) + Guadecitabine 병용 투여 군에서 종양 성장 저해율 30%, 50%, 80% 이상의 개체수가 가장 많은 것을 확인할 수 있었다.
- [590] **XI. 융합단백질 이량체 및 화학항암제(antineoplastic 또는 cytotoxic agent) 병용 투여에 따른 항암효과 확인**
- [591] **실험예 32. 마우스 유래 유방암세포 식립 마우스에서 mGI-101 및 anti-PD-L1 항체와 Docetaxel 병용투여에 의한 항암 효과 확인**
- [592] 본 실험은 BALB/c 마우스에 4T1(mouse breast cancer cells) 세포를 동종 이식한 종양모델에서 시험물질 mGI-101과 Docetaxel(Selleck Chemicals, cat.no. S1148) 및 anti-PD-L1 항체(BioXcell, cat.no. BE0101)를 단독 혹은 병용 투여하고 그에 따른 항암 효능을 평가한 것이다.
- [593] 4T1 세포는 ATCC(USA)로부터 분양 받아 10% FBS(Gibco) 및 1% 항생제/항진균제(Gibco)를 포함하는 RPMI1640 배지(Gibco)에서 배양하였다. 배양한 세포는 트립신(Gibco)을 이용하여 수확한 후 PBS로 세포 부유액을 만들어 마우스에 주입 전까지 ice에 보관하였다. 동종이식 종양모델을 확립하기 위해 BALB/c 암컷 마우스(8주령)의 배면 우측 상부로부터 2번째 mammary fat pad의 위치를 확인 후, mammary fat pad의 내부에 준비된 4T1 세포주를 4×10^4

cells/40 μ l/head으로 주입하였다.

[594] 마우스의 종양 이식편은 세포 접종 후 일정기간 경과 후에 동물의 건강상태에 이상이 없는 동물에 대해 종양의 부피를 측정하여, 각 군의 평균이 70-100 mm³ 미만인 되도록 선별하여, 선별된 동물은 종양의 부피 및 체중을 기초로 하여 가능한 균등하도록 그룹 당 10마리씩 할당하였다. 표 23과 같이 시험군을 구성하고 시험물질을 투여하였다.

[595] Docetaxel의 경우 100% DMSO에 녹인 후 DMSO 5%, PEG300 30%, Tween 80 5% 및 주사용 증류수 60%로 volume을 맞추어 (DMSO : PEG300 : Tween 80 : 주사용 증류수 = 5% : 30% : 5% : 60% (v:v:v)) 조제하였다.

[596] Anti-PD-L1 항체의 경우 1X PBS를 이용하여 투여용량과 volume을 고려하여 조제하여 투여하였다.

[597] [표23]

시험군		투여경로	투여 주기	투여용량	동물 수
G1	Vehicle control (PBS)	i.p.	QW (1회/주)	- mg/kg	10
G2	mGI-101 + aPD-L1	i.p. + i.p.	mGI-101: QW (1회/주), aPD-L1: QW (1회/주), Docetaxel: QW (1회/주)	3 mg/kg + 10 mg/kg	10
G3	Docetaxel	i.p.		15 mg/kg	10
G4	Docetaxel + mGI-101 + aPD-L1	i.p. + i.p. + i.p.		15 mg/kg + 3 mg/kg + 10 mg/kg	10

[598] 시험기간 동안 매일 1회 질병 및 행동변화 등의 임상증상을 관찰하고, 사망동물을 확인했으며, 암종의 크기가 4,000 mm³ 크기에 도달하는 마우스는 희생하였다. 4T1 고형암의 크기는 관찰기간 동안 주 2회, 캘리퍼스(Digital caliper, Mitutoyo, Japan)를 사용하여 종양의 장축(maximum length, L)과 단축(perpendicular width, W)을 아래의 계산식에 대입하여 종양의 부피(tumor volume, TV)와 종양 성장 저해율(Tumor growth inhibition, TGI)을 측정하였다.

[599] <수학식 1>

[600] $TV(mm^3) = (W^2 \times L) / 2$

[601] <수학식 2>

[602] $\%TGI(Tumor\ Growth\ Inhibition) = (1 - (Ti - T0) / (Vi - V0)) \times 100$

[603] 각 개체의 투여 전의 종양의 부피는 군분리 시 측정된 값으로 설정하였으며, 항종양 효능은 vehicle 대조군과 비교하여 평가하였다.

[604] 모든 통계 계산은 Prism 8.0(Graph Pad Software Inc, USA)을 사용하여 수행하였다. 종양 부피 측정이 비교는 이원 분산 분석에 이어 Tukey의 다중 비교

- 테스트를 통해 이루어졌다. 0.05 미만의 p 값은 유의미한 것으로 간주되었다.
- [605] 마우스 유래 유방암세포 식립 마우스에 mGI-101과 Docetaxel 및 anti-PD-L1 항체를 단독 혹은 병용 투여한 후 종양 크기를 측정한 결과는 도 103과 같다. 종양 크기 측정 결과, Docetaxel 투여 군 및 Docetaxel+mGI-101+aPD-L1 병용 투여 군에서 시험물질 투여 개시 후 14일 제에 대조군에 비하여 통계학적으로 유의미한 항암 효과가 관찰되었다($p<0.05$, $p<0.01$).
- [606] 시험군별 개별 종양 크기는 도 105와 같다.
- [607] 도 104는 4T1 식립 마우스에서 시험 종료 시점에서의 mGI-101과 Docetaxel 및 anti-PD-L1 항체를 단독 혹은 병용 투여 시 종양 성장 억제율을 나타낸 것이다. Vehicle 대조군의 경우, 종양성장 억제율 30% 이상, 50% 이상을 나타내는 마우스는 없었다. mGI-101+aPD-L1 병용 투여군은 종양성장 억제율 30% 이상의 마우스는 1마리였으며, 50% 이상을 나타내는 마우스는 없었다. Docetaxel 투여군은 종양성장 억제율 30% 이상 5마리, 50% 이상 1마리였다. Docetaxel +mGI-101+aPD-L1 병용투여군은 종양성장 억제율 30% 이상 6마리, 50% 이상 2마리였다.
- [608] **실험예 32. 마우스 유래 유방암세포 식립 마우스에서 mGI-101 및 Paclitaxel 병용투여에 의한 항암 효과 확인**
- [609] 본 실험은 BALB/c 마우스에 EMT6(mouse breast cancer cells) 세포를 동종 이식한 종양모델에서 시험물질 mGI-101의 단독 또는 Paclitaxel 물질과 병용으로 투여한 후 종양의 성장 억제효과를 평가한 것이다.
- [610] EMT6 세포는 ATCC(USA)로부터 분양 받아 10% FBS(Gibco) 및 1% 항생제/항진균제(Gibco)를 포함하는 Waymouth MB 751/1 배지(WELGENE)에서 배양하였다. 배양한 세포는 트립신(Gibco)을 이용하여 수확한 후 PBS로 10마리 분량의 고농도 세포 부유액(2×10^6 cells/0.4 mL)을 만들어 마우스에 주입 전까지 ice에 보관하였다. 동종이식 종양모델을 확립하기 위해 BALB/c 암컷 마우스(7주령)의 배면 우측 상부로부터 4번째 니플 위치에서 조금 벗어난 곳의 피부를 절개하고, 절개부위에서 mammary fat pad의 위치를 확인 후, mammary fat pad의 내부에 준비된 EMT6 세포주를 2×10^5 개/40 uL/head으로 주입하였다.
- [611] 마우스의 종양 이식편은 세포 접종 후 일정기간 경과 후에 동물의 건강상태에 이상이 없는 동물에 대해 종양의 부피를 측정하여, 각 군의 평균이 70-100 mm³ 미만이 되도록 선별하여, 선별된 동물은 종양의 부피 및 체중을 기초로 하여 가능한 균등하도록 그룹 당 10마리씩 할당하였다. 표 24와 도 106과 같이 시험군을 구성하고 시험물질을 투여하였다.

[612] [표24]

실험군		투여경로	투여 주기	투여용량	동물 수
G1	Vehicle control (PBS)	i.v.	QW (1회/주)	- mg/kg	10
G2	mGI-101	i.v.	QW (1회/주)	3 mg/kg	10
G3	Paclitaxel (PTX)	i.p.	총 7회, 7일 연속	10 mg/kg	10
G4	mGI-101 + Paclitaxel	i.v. + i.p.	QW (1회/주) + 총 7회, 7일 연속	3 mg/kg + 10 mg/kg	10

[613] 시험기간 동안 매일 1회 질병 및 행동변화 등의 임상증상을 관찰하고, 사망동물을 확인했으며, 암종의 크기가 4,000 mm³ 크기에 도달하는 마우스는 희생하였다. EMT6 고형암의 크기는 관찰기간 동안 주 2회, 캘리퍼스 (Digital caliper, Mitutoyo, Japan)를 사용하여 종양의 장축(maximum length, L)과 단축(perpendicular width, W)을 아래의 계산식에 대입하여 종양의 부피(tumor volume, TV)와 종양 성장 저해율(Tumor growth inhibition, TGI)을 측정하였다.

[614] <수학식 1>

[615] $TV(mm^3) = (W^2 \times L)/2$

[616] <수학식 2>

[617] $\%TGI(Tumor\ Growth\ Inhibition) = (1 - (Ti - T0)/(Vi - V0)) \times 100$

[618] 각 개체의 투여 전의 종양의 부피는 군분리 시 측정된 값으로 설정하였으며, 항종양 효능은 vehicle 대조군과 비교하여 평가하였다.

[619] 모든 통계 계산은 Prism 8.0(Graph Pad Software Inc, USA)을 사용하여 수행하였다. 종양 부피 측정이 비교는 이원 분산 분석에 이어 Tukey의 다중 비교 테스트를 통해 이루어졌다. 0.05 미만의 *p* 값은 유의미한 것으로 간주되었다.

[620] EMT6 종양에 대해 mGI-101 단독투여 혹은 Paclitaxel 물질과 병용 투여 시 종양 크기 결과는 도 107과 같다. 종양 크기 측정 결과, 대조군과 비교하여 약물 처리 군에서 항암 효과가 관찰되었으며, 물질투여 개시 후 11일 차에 mGI-101 단독 및 Paclitaxel 물질과 병용투여군의 종양 크기 수준은 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 낮았다($p < 0.01$, $p < 0.001$). 물질투여 개시 후 13일 차에 Paclitaxel 투여 군과 mGI-101 단독 및 Paclitaxel 물질과 병용투여군 모두 대조군에 비하여 종양 크기가 통계적으로 유의하게 낮았다($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.0001$).

[621] 시험군별 개별 종양 크기는 도 109와 같다. 개별 종양 크기 결과에 따르면, 시험물질 투여 개시 후 13일차에 mGI-101 단독투여 군은 2마리의 완전 관해를, Paclitaxel과 병용투여 군에서 1마리의 완전 관해를 보였다.

[622] 도 108은 EMT6 식립 마우스에서 mGI-101과 Paclitaxel 병용 시 종양 성장 억제율을 나타낸 것이다. Vehicle 대조군은 종양성장 억제율 30% 이상 2마리, 50% 이상 1마리였으며, 80% 이상 마우스는 없었다. mGI-101 투여군은 종양성장

억제율 30% 이상 6마리, 50% 이상 5마리, 80% 이상 5마리였다. Paclitaxel 투여군은 종양성장 억제율 30% 이상 7마리, 50% 이상 4마리, 80% 이상 2마리였다. mGI-101+Paclitaxel 병용투여군은 종양성장 억제율 30% 이상 7마리, 50% 이상 5마리, 80% 이상 4마리였다.

- [623] **XII. 병용 투여에 따른 항암효과 확인: mGI-101 + anti-PD-1 + Pemetrexed + Cisplatin(Chemotherapy, Maintaining therapy)**
- [624] 실험예 31. 마우스 유래 폐암세포 식립 마우스에서 **mGI-101** 및 화학항암제와 항 **PD-1** 항체 병용투여에 의한 항암 효과 확인
- [625] 본 실험은 C57BL/6 마우스에 폐암 세포주인 TC1 세포를 동종 이식한 종양모델에 시험물질 mGI-101 단독 또는 표준 치료인 화학항암제 Cisplatin(Selleck Chemicals, cat.no. S1166), Pemetrexed(Selleck Chemicals, cat.no. S1135) 및 항 PD-1 항체(BioXcell, cat.no. BE0146)와 병용으로 복강 내 투여한 후 종양의 성장 억제효과를 평가한 것이다. 마우스 유래 폐암 세포주인 TC1은 ATCC(USA)에서 구입하여 시험에 사용하였다.
- [626] TC1 세포는 10% FBS(Gibco) 및 1% 항생제/항진균제(Gibco)를 포함하는 RPMI1640 배지(Gibco)에서 배양하였다. 배양한 세포는 트립신(Gibco)을 이용하여 수확한 후, 동종이식 종양모델을 확립하기 위해 C57BL/6 암컷 마우스(7주령) 오른쪽 옆구리에 s.c.로 1×10^6 개의 TC1 세포를 주입하였다.
- [627] 마우스는 종양부피(-100 mm^3)를 기준으로 그룹 당 13 내지 19마리를 무작위로 할당하였다. 종양 이식편은 세포 접종 후 약 2일째에 확인되었다. 표 25와 같이 시험군을 구성하고 도 110에 기재된 스케줄로 시험물질을 투여하였다.
- [628] 시험은 1차 치료와 항암 유지 요법으로 나누어 진행하였으며, 1차 치료를 위해 시스플라틴(Cisplatin, CDDP)은 5 mg/kg으로, 페메트렉시드(Pemetrexed)는 100 mg/kg으로, 항 PD-1 항체는 10 mg/kg으로 각각 일주일에 2회씩 복강 투여하였으며, mGI-101 병용 투여 그룹의 경우 3 mg/kg으로 일주일에 1회 복강 투여하는 주기로 총 3회 투여하였다.
- [629] 항암 유지 요법 시, mGI-101 단독투여 혹은 화학항암제 및 항 PD-1 항체와 mGI-101을 병용 투여하였다.

[630] [표25]

실험군		투여경로, 투여주기	투여용	동물수
G1	mouse IgG4	i.p. BIW	3 mg/kg	13
G2	1) 1 st line: Cisplatin + Pemetrexed +anti-PD-1 antibody 2) Maintenance therapy: Pemetrexed + anti-PD-1 antibody	mGI-101: i.p. QW Cisplatin: i.p. BIW Pemetrexed: i.p. BIW anti-PD-1 antibody: i.p. BI	mGI-101: 3 mg/kg Cisplatin: 5 mg/kg Pemetrexed: 100 mg/kg anti-PD-1 antibody: 10 mg/k	19
G3	1) 1 st line: Cisplatin + Pemetrexed + anti-PD-1 antibody 2) Maintenance therapy: Pemetrexed + anti-PD-1 antibody + mGI-101			13
G4	1) 1 st line: Cisplatin + Pemetrexed + anti-PD-1 antibody2) Maintenance therapy: mGI-101			13
G5	1) 1 st line: Cisplatin + Pemetrexed + anti-PD-1 antibody + mGI-1012) Maintenance therapy: Pemetrexed + anti-PD-1 antibody + mGI-101			15

[631] 시험기간 동안 매일 1회 질병 및 행동변화 등의 임상증상을 관찰하고, 사망동물을 확인했으며, 암종의 크기가 4,000 mm³ 크기에 도달하는 마우스는 희생하였다. TC1 고형암의 크기는 종양 3D 스캐너(TM900, Peria, Belgium)를 이용하여 측정하였다. 각 실험군에 대해 평균 체중 감소 및 백분율 변화와 평균 종양 성장 저해를 계산하였다. 항종양 효능은 mouse IgG4 대조군과 비교하여 평가하였다. 모든 통계 계산은 Prism 8.0(Graph Pad Software Inc, USA)을

사용하여 수행하였다. 종양 부피 측정 비교는 이원 분산 분석에 이어 Bonferroni의 다중 비교 테스트를 통해 이루어졌다. 0.05 미만의 p 값은 유의미한 것으로 간주되었다.

- [632] TC1 종양에 대해 mGI-101 단독투여 혹은 화학항암제 및 항 PD-1 항체와 mGI-101을 병용 투여한 결과는 도 111과 같다. 대조군과 비교하여 약물 처리 군에서 항암 효과가 관찰되었으며, 종양 크기 차이는 24일의 시험기간 동안 눈에 띄게 나타났다. 1차 치료의 경우 mGI-101을 화학항암제와 항 PD-1 항체와 병용투여 시, 화학항암제와 항 PD-1 항체만 투여한 그룹에 비해 더 우수한 종양 성장 저해 효과를 나타냈다. 항암 유지 요법의 경우, mGI-101 단독 투여군은 화학항암제와 항 PD-1 항체를 투여한 그룹만큼 항암 효과를 나타냈으며, 화학항암제 및 항 PD-1 항체와 mGI-101을 병용 투여한 군은 더 우수한 종양 성장 저해 효과를 나타내었다.
- [633] 시험군별 개별 종양 크기는 도 112 내지 도 117과 같다. 개별 종양 크기 결과에 따르면, 1차 치료 및 항암 유지 요법에서 mGI-101의 병용 투여군이 가장 우수한 종양 성장 저해 효과를 나타내었다.
- [634] 도 118은 TC1 세포 식립 마우스에서 1차 치료 및 항암 유지 요법 시 mGI-101 병용 투여에 따른 마우스의 생존율을 분석한 것이다. 1차 치료 및 항암 유지 요법 시 mGI-101 병용 투여군에서 생존율 100%를 확인하였다. 각 시험군의 평균 체중은 표 26과 같다.

[635] [표 26]

	Treatment		Body weight (g) on days											
			-2	1	3	5	7	10	12	13	15	20	23	26
1	mouse IgG4	Mea n	17.5 8	17. 74	18. 24	17. 58	17. 80	18. 23	18. 02	18. 94	19. 62	20. 30	21. 26	20.4 8
		SE M	1.00 7	1.0 7	0.9 5	1.1 4	1.0 8	1.0 9	1.0 1	1.0 8	1.3 2	1.3 5	1.6 1	1.71
2	1 st line: Cisplatin + Pemetrexed +anti-PD-1 Maintenanc e: Pemetrexed + anti-PD-1	Mea n	17.5 8	17. 81	18. 13	17. 24	17. 41	18. 10	17. 77	18. 57	19. 29	20. 42	20. 69	20.6 1
		SE M	0.82 7	0.7 7	0.9 8	0.9 4	1.1 5	1.5 6	1.4 7	1.5 6	1.7 1	1.9 1	2.0 1	1.61
3	1 st line: Cisplatin + Pemetrexed + anti-PD-1 Maintenanc e: Pemetrexed + anti-PD-1 + mGI-101	Mea n	17.4 2	17. 73	18. 06	17. 42	17. 78	18. 54	18. 11	19. 01	19. 23	19. 72	20. 28	20.1 8
		SE M	1.25 8	1.0 8	1.3 9	1.6 6	1.7 0	1.5 7	1.4 2	1.7 0	1.4 4	1.8 8	1.8 8	1.90
4	1 st line: Cisplatin + Pemetrexed + anti-PD-1 Maintenanc e: mGI-101	Mea n	17.1 0	17. 70	17. 58	16. 58	16. 83	17. 41	17. 49	18. 06	18. 67	19. 29	19. 18	19.1 5
		SE M	1.05 4	1.0 4	1.0 4	1.1 8	1.1 9	1.0 2	1.0 2	1.2 2	1.3 9	1.2 3	1.6 3	1.59

5	1 st line: Cisplatin +	Mea	17.5	18.	18.	18.	18.	19.	19.	20.	20.	21.	21.	20.5
	Pemetrexed + anti-PD-1 + mGI-101 Maintenance: Pemetrexed + anti-PD-1 + mGI-101	n SE M	3 0.99 M	64 0.8 5	92 1.0 1	72 0.9 6	71 0.8 9	82 1.1 8	67 1.1 5	59 0.9 4	76 1.3 4	56 1.6 7	85 1.6 9	0 0.71

- [636] **XIII. 융합단백질 이량체 및 HER 항체 병용 투여에 따른 항암효과 확인**
- [637] **실험예 33. GI-101 및 Trastuzumab 병용투여에 의한 항암 효과 확인**
- [638] 본 실험은 BALB/c nu/nu 마우스에 BT-474(human breast cancer cells) 세포를 이종 이식한 종양모델에서 시험물질 mGI-101 단독 또는 Herceptin (Trastuzumab) 물질과 병용으로 투여한 후 종양의 성장 억제효과를 평가한 것이다.
- [639] BT-474 세포는 ATCC(USA)로부터 분양 받아 10% FBS(Gibco) 및 1% 항생제/항진균제(Gibco)를 포함하는 RPMI1640 배지(Welgene)에서 배양하였다. 배양한 세포는 트립신(Gibco)을 이용하여 수확한 후 5.0×10^6 cells/0.05 mL의 농도로 배지에 희석하여 세포주를 준비하였다.
- [640] BT-474 세포에 대한 이종이식 종양모델을 확립하기 위해 BALB/c nu/nu 암컷 마우스(7주령) 왼쪽 옆구리에 pellet이식용 trochar(MP-182, Innovative research of america, U.S.A.)을 이용하여 마우스의 가슴 스킨을 잡아당겨 공간을 만들고 left flank의 피하에 위치하도록 s.c.로 주입하였다. Estrogen pellet 주입 후 7일 후, 준비된 BT-474 세포부유액(5×10^6 cells/0.05 mL)을 분주하고 0.05 mL Matrigel matrix phenol red-free(356237, BD)를 가하여 조제한 용액을 일회용 주사기에 충전하여 동물의 우측 등 부위의 피하에 0.1 mL/head씩 투여하여 이식하였다.
- [641] 마우스의 종양 이식편은 세포 접종 후 일정기간 경과 후에 동물의 건강상태에 이상이 없는 동물에 대해 종양의 부피를 측정하여, 각 군의 평균이 60-120 mm³ 미만인 되도록 선별하여, 선별된 동물은 종양의 부피 및 체중을 기초로 하여 가능한 균등하도록 그룹 당 10마리씩 할당하였다. 표 27과 같이 시험군을 구성하고 시험물질을 투여하였다.

[642] [표27]

실험군		투여경로	투여 주기	투여용량	동물 수
G1	Vehicle control (PBS)	i.v.	QW (1회/주)	- mg/kg	10
G2	mGI-101	i.v.	QW (1회/주)	3 mg/kg	10
G3	Herceptin	i.p.	QW (1회/주)	1 mg/kg	10
G4	mGI-101 + Herceptin	i.v. + i.p.	mGI-101: QW (1회/주), Herceptin: QW (1회/주)	3 mg/kg + 1 mg/kg	10

[643] 시험기간 동안 매일 1회 질병 및 행동변화 등의 임상증상을 관찰하고, 사망동물을 확인했으며, 암종의 크기가 4,000 mm³ 크기에 도달하는 마우스는 희생하였다. 고형암의 크기는 관찰기간 동안 주 2회, 캘리퍼스(Digital caliper, Mitutoyo, Japan)를 사용하여 종양의 장축(maximum length, L)과 단축(perpendicular width, W)을 아래의 계산식에 대입하여 종양의 부피(tumor volume, TV)와 종양 성장 저해율(Tumor growth inhibition, TGI)을 측정하였다.

[644] <수학식 1>

[645] $TV(mm^3) = (W^2 \times L)/2$

[646] <수학식 2>

[647] $\%TGI(Tumor\ Growth\ Inhibition) = (1 - (Ti - T0)/(Vi - V0)) \times 100$

[648] 각 개체의 투여 전의 종양의 부피는 군분리 시 측정된 값으로 설정하였다.

[649] 모든 통계 계산은 Prism 8.0(Graph Pad Software Inc, USA)을 사용하여 수행하였다. 종양 부피 측정이 비교는 이원 분산 분석에 이어 Tukey의 다중 비교 테스트를 통해 이루어졌다. 0.05 미만의 p 값은 유의미한 것으로 간주되었다.

[650] 인간 유래 유방암 세포 식립 마우스에 mGI-101 단독 투여 혹은 Herceptin과 병용 투여한 후 종양 크기를 측정한 결과는 도 119와 같다. mGI-101 단독 투여 군의 경우, 시험물질 투여 개시 후 28일 차에 vehicle 대조군에 비하여 통계학적으로 유의미한 종양 크기 감소가 나타났다($p < 0.05$). Herceptin 단독 투여 군의 경우, 시험물질 투여 개시 후 14일, 18일, 21일 차에 vehicle 대조군에 미하여 통계학적으로 유의미한 종양 크기 감소가 나타났지만(14일과 18일의 경우, $p < 0.05$; 21일의 경우, $p < 0.01$), 25일, 28일차의 경우 종양 크기가 급격하게 증가하는 경향을 나타냈다. mGI-101+Herceptin 병용 투여 군의 경우, 시험물질 투여 개시 후 14일 차부터 28일차까지 vehicle 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의미한 종양 크기 감소를 보였으며, 시험물질 투여 개시 후 28일차에는 Herceptin 단독 투여 군과 비교하여 통계학적으로 유의미한 종양 크기 감소를 나타냈다($p < 0.01$).

- [651] 시험군별 개별 종양 크기는 도 121과 같다. 개별 종양 크기 결과에 따르면, vehicle 대조군에 비하여 시험물질 투여 그룹에서 종양 성장 저해 효과를 나타냈으며, 특히 mGI-101+Herceptin 병용투여 시 mGI-101 단독 투여군에 비하여 우수한 종양 성장 저해 효과를 나타냈다.
- [652] 도 120은 BT-474 이종이식 종양 마우스에서 시험 종료 시점에서의 mGI-101과 Herceptin 단독 혹은 병용 투여 시 종양 성장 억제율을 나타낸 것이다. Vehicle 대조군은 종양성장 억제율 30% 이상 3마리, 50% 이상 3마리였으며, 80% 이상 마우스는 없었다. mGI-101 단독 투여군은 종양성장 억제율 30% 이상 5마리, 50% 이상 1마리였으며, 80% 이상 마우스는 없었다. Herceptin 단독 투여군은 종양성장 억제율 30% 이상 3마리, 50% 이상 2마리, 80% 이상 1마리였다. mGI-101+Herceptin 병용투여군은 종양성장 억제율 30% 이상 5마리, 50% 이상 4마리였으며, 80% 이상은 없었다.
- [653] 실험예 34. GI-101 및 Pertuzumab 병용투여에 의한 항암 효과 확인
- [654] 본 실험은 시험관 내 환경에서 HCT116(human colon cancer cells) 세포에 시험물질 GI-101 단독 처리 또는 Pertuzumab 물질과 병용 처리에 따른 암세포의 사멸 효과를 평가한 것이다.
- [655] HCT116 세포는 한국 세포주 은행으로부터 분양 받아 10% FBS(Gibco) 및 1% 항생제/항진균제(Gibco)를 포함하는 McCoy's 5A 배지(ATCC)에서 배양하였다. 암세포 사멸시험에 사용하기 위해 세포는 트립신(Gibco)을 이용하여 수확한 후 McCoy's 5A 배지에 현탁 후, Ficoll(GE Healthcare Life Sciences) 용액을 이용하여 죽은 세포 및 debris 제거를 해 주었다. McCoy's 5A 배지에 현탁한 세포는 ficoll 용액 위에 조심스럽게 중층하였다. 실온에서 350g로 20분간 원심분리하여 형성된 저비중의 세포층을 파이펫으로 모으고, PBS(Gibco)으로 세척한 후 실온에서 350g으로 5분간 원심분리 하였다. 분리된 세포층은 FBS free RPMI1640 배지로 2×10^5 cells/mL이 되도록 부유액을 만들었다. 암세포 현탁액은 암세포 증식 혹은 증식 억제 추적에 CellTracker™ Deep Red Dye(Thermo)를 사용하여 37°C에서 1시간 동안 염색하였다. 염색 후 1300rpm에서 5분간 원심분리 후 FBS free RPMI1640 배지로 세척한 후, 2×10^5 cells/mL이 되도록 5% human AB serum(Sigma)을 포함하는 RPMI1640 배지로 현탁 하였다. 암세포 현탁액은 96-well microplate(Corning)의 각 well에 50 μ L(1×10^4 cells)씩 가한 후, 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 1시간 동안 안정화시켰다.
- [656] 시험물질에 의한 항체-의존적 세포-매개 세포독성(Antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC)을 통한 암세포 사멸 확인을 위해 사람 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)에서 CD56+CD16+ NK cell isolation kit(Miltenyi Biotec)를 이용하여 자연살해세포(natural killer cell, NK cell)를 분리하여 사용하였다. 분리한 NK 세포는 암세포주와 동일한 방식으로 Ficoll(GE Healthcare Life Sciences) 용액을 이용하여 죽은 세포 및 debris 제거를 해 주었다. RPMI1640 배지에 현탁한 세포는 ficoll 용액 위에 조심스럽게

중충하였다. 실온에서 350g로 20분간 원심분리하여 형성된 저비중의 세포층을 파이펫으로 모으고, PBS(Gibco)으로 세척한 후 실온에서 350g으로 5분간 원심분리 하였다. 분리된 세포층은 2×10^5 cells/mL이 되도록 5% human AB serum(Sigma)을 포함하는 RPMI1640 배지로 현탁 하였다. PBMCs 현탁액은 암세포주가 분주된 96-well microplate(Corning)의 각 well에 조건에 따라 50 μ l씩 분주해 주었다.

- [657] 세포의 사멸을 확인하기 위해 사멸하는 세포의 DNA에 결합하는 CytoTox Green reagent(Incucyte™ CytoTox Green, Satorius)를 5% human AB serum(Sigma)을 포함하는 RPMI1640 배지 1 mL 당 1 μ l로 준비하였다. 준비된 배지는 시험물질의 희석에 사용하며, 시험물질과 암세포주 및 PBMCs의 공동배양 시 사멸되는 세포를 염색함으로써 세포의 사멸효과를 정량적으로 확인할 수 있다.
- [658] Pertuzumab 은 CytoTox Green reagent가 포함된 RPMI1640 배지를 이용하여 희석 후, 96-well microplate의 well당 최종 농도 16.9 nM(50 μ l)으로 실험에 사용하였다.
- [659] GI-101은 CytoTox Green reagent가 포함된 RPMI1640 배지를 이용하여 1/3씩 희석 후, 96-well microplate의 well당 50 μ l씩 최종농도 0.4 nM, 1.2 nM, 3.7 nM, 11.1 nM, 33.3 nM, 100 nM으로 실험에 사용하였다.
- [660] 준비된 시험물질은 암세포주와 PBMCs가 분주되어 있는 96-well microplate의 각 well에 조건에 맞게 넣어주고, 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 24시간 동안 배양하며 실시간 세포 이미징 분석 장비 Incucyte S3(Satorious)를 통해 암세포의 증식 또는 사멸을 관찰하였다. 암세포의 사멸은 CytoTox Green reagent에 의해 초록색으로 염색되는 세포의 통합 강도(integrated intensity)로 정량화 하였다.
- [661] 도 122는 HCT116 세포에 GI-101을 각각 0.4 nM, 1.2 nM, 3.7 nM, 11.1 nM, 33.3 nM 및 100 nM 농도로 처리한 후 암세포 사멸 정도를 측정한 결과이다. 암세포와 NK 세포만 공동배양 한 조건 및 Pertuzumab 단독 처리 조건의 경우, 암세포만 배양한 조건과 같이 암세포의 사멸이 나타나지 않았다. GI-101 단독 및 GI-101+Pertuzumab 병용 처리 조건의 경우 우수한 암세포 사멸을 보였으며, GI-101+Pertuzumab 병용 처리 조건에서 가장 우수한 암세포 사멸 효과를 나타냈다.
- [662] **XIV. 융합단백질 이량체 및 CDK4/6 억제제 병용 투여에 따른 항암효과 확인**
- [663] **실험예 33. GI-101 및 Abemaciclib 병용투여에 의한 항암 효과 확인**
- [664] 본 실험은 BALB/c 마우스에 4T1(mouse breast cancer cells) 세포를 동종 이식한 종양모델에서 시험물질 mGI-101의 단독 또는 Abemaciclib 물질과 병용으로 투여한 후 종양의 성장 억제효과를 평가한 것이다.
- [665] 4T1 세포는 ATCC(USA)로부터 분양 받아 10% FBS(Gibco) 및 1% 항생제/항진균제(Gibco)를 포함하는 RPMI1640 배지(Gibco)에서 배양하였다. 배양한 세포는 트립신(Gibco)을 이용하여 수확한 후 PBS에 현탁하였다.

동종이식 종양모델을 확립하기 위해 BALB/c 암컷 마우스(8주령) 등에 s.c.로 1×10^5 개의 4T1 세포를 주입하였다. 세포주의 이식 후 생착 및 성장기간 동안 매일 1회 일반증상을 관찰하였다.

[666] 마우스의 종양 이식편은 세포 접종 후 일정기간 경과 후에 동물의 건강상태에 이상이 없는 동물에 대해 종양의 부피를 측정하여 무작위로 선별하여 그룹 당 11마리씩 할당하였다. 표 28과 같이 시험군을 구성하고 시험물질을 투여하였다.

[667] [표28]

시험군		투여경로	투여 주기	투여용량	동물 수
G1	Vehicle control (PBS)	i.p.	QW (1회/주)	- mg/kg	11
G2	mGI-101	i.p.	BIW (2회/주)	3 mg/kg	11
G3	Abemaciclib	p.o.	6회/주	50 mg/kg	11
G4	mGI-101 + Abemaciclib	i.p. + p.o.	mGI-101: BIW (2회/주), Abemaciclib: 6회/주	3 mg/kg + 50 mg/kg	11

[668] 시험기간 동안 마우스의 사망여부, 일반증상의 종류, 발현일 및 증상의 정도를 1일 1회 관찰하고 개체별로 기록하였다. Renca 고형암의 크기는 관찰기간 동안 주 2회, 버니어캘리퍼스를 사용하여 종양의 장축(maximum length, L)과 단축(perpendicular width, W)을 측정하였고, 아래의 계산식에 대입하여 종양의 부피(tumor volume, TV)와 종양 성장 저해율(Tumor growth inhibition, TGI)을 측정하였다.

[669] <수학식 1>

[670] $TV(\text{mm}^3) = (W^2 \times L) / 2$

[671] <수학식 2>

[672] $\%TGI(\text{Tumor Growth Inhibition}) = (1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)) \times 100$

[673] 각 개체의 투여 전의 종양의 부피는 군분리 시 측정된 값으로 설정하였으며, 항종양 효능은 vehicle 대조군과 비교하여 평가하였다.

[674] 모든 통계 계산은 Prism 8.0(Graph Pad Software Inc, USA)을 사용하여 수행하였다. 종양 부피 측정이 비교는 이원 분산 분석에 이어 Tukey의 다중 비교 테스트를 통해 이루어졌다. 0.05 미만의 p 값은 유의미한 것으로 간주되었다.

[675] 마우스 유래 유방암 세포 식립 마우스에 mGI-101을 단독 또는 Abemaciclib 물질과 병용 투여한 후 종양 크기를 측정한 결과는 도 123과 같다. mGI-101 (BIW)+Abemaciclib 병용 투여 군의 경우 종양 성장이 저해되는 경향성이 가장 크게 나타났다.

[676] 시험군별 개별 종양 크기는 도 125와 같다. 개별 종양 크기 결과에 따르면, mGI-101(BIW)+Abemaciclib 병용 투여 군의 종양 성장 억제 효과가 가장 큰 것이

관찰되었다.

- [677] 도 124는 4T1 식립 마우스에서 mGI-101과 Abemaciclib 병용 시 종양 성장 억제율을 나타낸 것이다. Vehicle 대조군은 종양성장 억제율 30% 이상이 3마리였으며, 50% 이상 및 80% 이상 마우스는 없었다. mGI-101(BIW) 투여군은 종양성장 억제율 30% 이상 3마리, 50% 이상 1마리, 80% 이상 마우스는 없었다. Abemaciclib 투여군은 종양성장 억제율 30% 이상 4마리, 50% 이상 1마리, 80% 이상 1마리였다. mGI-101(BIW)+Abemaciclib 병용투여군은 종양성장 억제율 30% 이상 7마리, 50% 이상 5마리, 80% 이상 1마리였다.
- [678] **실험예 33. GI-101 및 Ribociclib 병용투여에 의한 항암 효과 확인**
- [679] 본 실험은 시험관 내 환경에서 MDA-MB-231(human breast cancer cells) 세포에 시험물질 GI-101 단독 처리 또는 Ribociclib 물질과 병용 처리하고 그에 따른 암세포의 사멸 효과를 평가한 것이다.
- [680] MDA-MB-231 세포는 한국 세포주 은행으로부터 분양 받아 10% FBS(Gibco) 및 1% 항생제/항진균제(Gibco)를 포함하는 RPMI1640 배지(Gibco)에서 배양하였다. 암세포 사멸시험에 사용하기 위해 세포는 트립신(Gibco)을 이용하여 수확한 후 RPMI1640 배지에 현탁 후, Ficoll(GE Healthcare Life Sciences) 용액을 이용하여 죽은 세포 및 debris 제거를 해주었다. RPMI1640 배지에 현탁한 세포는 ficoll 용액 위에 조심스럽게 중층하였다. 실온에서 350xg로 20분간 원심분리하여 형성된 저비중의 세포층을 파이펫으로 모으고, PBS(Gibco)으로 세척한 후 실온에서 350 g으로 5분간 원심분리 하였다. 분리된 세포층은 FBS free RPMI1640 배지로 2×10^5 cells/mL이 되도록 부유액을 만들었다. 암세포 현탁액은 암세포 증식 혹은 증식 억제 추적에 위해 CellTracker™ Deep Red Dye(Thermo)를 사용하여 37°C에서 1시간 동안 염색하였다. 염색 후 1300rpm에서 5분간 원심분리 후 FBS free RPMI1640 배지로 세척한 후, 2×10^5 cells/mL이 되도록 5% human AB serum(Sigma)을 포함하는 RPMI1640 배지로 현탁 하였다. 암세포 현탁액은 96-well microplate(Corning)의 각 well에 $50 \mu\text{l}$ (1×10^4 cells)씩 가한 후, 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 1시간 동안 안정화시켰다.
- [681] GI-101에 의한 암세포 사멸 확인을 위해 사람 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 사용하였다. 사람 PBMC는 Zen-Bio를 통해 구매하였으며, 냉동 보관된 PBMC는 37°C water bath에 넣어서 최대한 빨리 해동시킨 후, 10% FBS(Gibco) 및 1% 항생제/항진균제(Gibco)를 포함하는 RPMI1640 배지(Gibco)에 옮겨주어 1300 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 분리된 세포층은 RPMI1640 배지로 현탁 후, 암세포주와 동일한 방식으로 Ficoll(GE Healthcare Life Sciences) 용액을 이용하여 죽은 세포 및 debris 제거를 해주었다. RPMI1640 배지에 현탁한 세포는 ficoll 용액 위에 조심스럽게 중층하였다. 실온에서 350 g로 20분간 원심분리하여 형성된 저비중의 세포층을 파이펫으로 모으고, PBS(Gibco)으로 세척한 후 실온에서 350 g으로 5분간 원심분리 하였다. 분리된 세포층은 5×10^5 cells/mL이 되도록 5% human AB serum(Sigma)을

- 포함하는 RPMI1640 배지로 현탁 하였다. PBMCs 현탁액은 암세포주가 분주 된 96-well microplate(Corning)의 각 well에 조건에 따라 50 μ L씩 분주해 주었다.
- [682] 세포의 사멸을 확인하기 위해 사멸하는 세포의 DNA에 결합하는 CytoTox Green reagent(IncuCyte™ CytoTox Green, Satorius)를 5% human AB serum(Sigma)을 포함하는 RPMI1640 배지 1 mL 당 1 μ L으로 준비하였다. 준비된 배지는 시험물질의 희석에 사용하며, 시험물질과 암세포주 및 PBMCs의 공동배양 시 사멸되는 세포를 염색함으로써 세포의 사멸효과를 정량적으로 확인할 수 있었다.
- [683] Ribociclib 시험물질은 CytoTox Green reagent가 포함된 RPMI1640 배지를 이용하여 희석 후, 96-well microplate의 well당 최종 농도 913 nM(50 μ L)으로 실험에 사용하였다. GI-101은 CytoTox Green reagent가 포함된 RPMI1640 배지를 이용하여 1/3씩 희석 후, 96-well microplate의 well당 50 μ L씩 최종농도 100 nM으로 실험에 사용하였다.
- [684] 준비된 시험물질은 암세포주와 PBMCs가 분주되어 있는 96-well microplate의 각 well에 조건에 맞게 넣어주고, 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 24시간 동안 배양하며 실시간 세포 이미징 분석 장비 IncuCyte S3(Satorious)를 통해 암세포의 증식 또는 사멸을 관찰하였다. 암세포의 사멸은 CytoTox Green reagent에 의해 초록색으로 염색되는 세포의 통합 강도(integrated intensity)로 정량화 하였다.
- [685] 도 126은 GI-101 100 nM 조건에서의 암세포 사멸을 나타낸 것이다. 암세포와 PBMC만 공동배양 한 조건에서도 암세포의 사멸이 확인되었으며, GI-101 단독 처리 조건에 비하여 더 높게 나타나는 경향을 보였다. Ribociclib 단독 및 GI-101+Ribociclib 병용 처리 조건의 경우 암세포와 PBMC만 공동배양 한 조건에 비하여 우수한 암세포 사멸 효과를 나타냈으며, GI-101+Ribociclib 병용 처리 조건에서 가장 우수한 암세포 사멸 효과를 나타냈다.
- [686] **XV. 융합단백질 이량체 및 STING agonist 병용 투여에 따른 항암효과 확인**
- [687] **실험예 33. mGI-101 및 DMXAA 병용투여에 의한 항암 효과 확인**
- [688] 본 실험은 C57BL/6 마우스에 MC38(mouse colon cancer cells) 세포를 동종 이식한 종양모델에서 시험물질 mGI-101과 STING agonist인 DMXAA 물질과의 단독 혹은 병용 투여에 따른 항암 효능을 평가한 것이다.
- [689] 동종이식 종양모델을 확립하기 위해 C57BL/6 마우스에 s.c.로 5x10⁵개의 MC38 세포를 주입하였다. 마우스의 종양 이식편은 세포 접종 후 약 10일째에 100-200 mm³의 크기로 확인되었으며, 그룹 당 5마리씩 할당하였다. 표 29와 같이 시험군을 구성하고 도 127에 기재된 스케줄로 시험물질을 투여하였다.

[690] [표29]

실험군		투여경로	투여 주기	투여용량	동물 수
G1	Vehicle control (PBS)		mGI-101: BIW (2회/주), DMXAA: Day 10 and 13	- mg/kg	5
G2	mGI-101	i.p.		6 mg/kg	5
G3	DMXAA	I.T.		450 µg	5
G4	mGI-101 + DMXAA	i.p. + I.T.		6 mg/kg + 450 µg	5

[691] MC38 고형암의 크기는 관찰기간 동안 주 3회, 캘리퍼스 종양의 장축 (maximum length, L)과 단축 (perpendicular width, W)을 아래의 계산식에 대입하여 종양의 부피(tumor volume, TV)를 측정하였으며, 종양이 2 cm 이상일 경우 희생하였다.

[692] <수학식 1>

[693] $TV(mm^3) = (W^2 \times L)/2$

[694] MC38 종양에 대해 mGI-101과 DMXAA 물질의 단독 혹은 병용 투여 시 생존율은 도 128과 같다. Vehicle 대조군의 경우, tumor 주입 후 40일 전에 모든 마우스가 사망하였으며, mGI-101 단독 투여군의 경우, tumor 주입 후 60일차의 생존율은 20%, STING agonist인 DMXAA 단독 투여 군의 경우, tumor 주입 후 60일차의 생존율은 60%, mGI-101+DMXAA 병용 투여 군의 경우, tumor 주입 후 60일차의 생존율 80%으로 다른 군에 비해 생존율이 높은 것을 나타냈다.

[695] 도 129 내지 도 133은 시험군별 개별 종양 크기를 나타냈으며, mGI-101+DMXAA 병용 투여 군의 종양 성장 억제 효과가 가장 큰 것을 보여준다.

청구범위

- [청구항 1] CD80 단백질 또는 이의 단편 및 IL-2 단백질 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질 이량체; 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 CD80 단백질 또는 이의 단편 및 IL-2 단백질 또는 이의 변이체는 링커에 의해 결합된 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 IL-2 단백질은 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 CD80은 서열번호 11의 아미노산 서열을 갖는 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 항암제는 화학항암제, 표적항암제, 항암 바이러스, 항체치료제, 세포치료제 및 면역관문 억제제로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 화학항암제는 Alyklating Agent, Microtubule Inhibitor, Anti metabolite 및 Topoisomerase Inhibitor로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 화학항암제는 Mechlorethamine, Cyclophosphamide, Ifosfamide, Melphalan, Chlorambucil, Thiopeta, Altretamine, Procarbazine, Busulfan, Streptozocin, Carmustine, Iomustine, Dacarbazine, Cisplatin, Carboplatin, Oxaliplatin, Docetaxel, Velban, Oncovin, Navelbine, Fluorouracil, Capecitabine, Cytarabine, Gemcitabine, Fludarabine, Methotrexate, Pemetrexed, Hycamtin, Camptosar, Vepesid, Paclitaxel, Blenoxane, Adriamycin 및 Cerubidine으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 8] 제5항에 있어서, 상기 표적항암제는 EGFR, VEGFR, CD20, CD38, RNAK-L, BTK, Bcr-abl, PDGFR/FGFR 계열, MEK/RAF, HER2/Neu, Ubiquitin, JAK, ALK, PARP, TGFβR, Proteasome, Bcl-2, C-Met, VR1, VR2, VR3, c-kit, AXL, RET, Braf, DNMT, CDK4/6, STING으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 단백질을 표적으로 하는 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,

상기 표적항암제는 Cetuximab, Trastuzumab, Pertuzumab, Axitinib, Lenvatinib, Bevacizumab, Ramucirumab, Aflibercept, Rituximab, Obinutuzumab, Daratumumab, Denosumab, Ibrutinib, Dasatinib, Nilotinib, Imatinib, Bosutinib, Galunisertib, Vactosertib, Nintedanib, Sunitinib, Sorafenib, Cabozantinib, Regorafenib, Masitinib, Semaxanib, Tivozanib, Vandetanib, Pazopanib, Trametinib, Dabrafenib, Afatinib, Lapatinib, Neratinib, Lenalidomide, Lxazomib, Ruxolitinib, Lestaurtinib, Pacritinib, Cobimethinib, Selumetinib, Trametinib, Binimetinib, Alectinib, Crizotinib, Venetoclax, Crizotinib, Cabozantinib, Bemcentinib, Gilteritinib, Selpercatinib, Pralsetinib, Vemurafenib, Olaparib, Talazoparib, Niraparib, Rucaparib, Azacitidine, Decitabine, Guadecitabine, Abemaciclib, Ribociclib, Palbociclib, CDNs, SB11285 및 DMXAA로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 10]

제5항에 있어서,
상기 항암 바이러스는 Talimogenem 및 Laherparepvec으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 11]

제5항에 있어서,
상기 항체치료제는 Cetuximab, Trastuzumab, Pertuzumab, Panitumumab, Emtansine, Rituximab, Daratumumab, Denosumab, Ibritumomab, Tositumomab, Brentuximab, Ofatumumab, Obinutuzumab, Necitumumab, Bevacizumab, Ramucirumab, Nivolumab, Pembrolizumab, Atezolizumab, Durvalumab 및 Ipilimumab으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 12]

제5항에 있어서,
상기 세포치료제는 Tisagenlecleucel 및 Axicabtagene Ciloleucel로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 13]

제5항에 있어서,
상기 면역관문 억제제는 항 CTLA-4 항체, 항 PD-1 항체, 항 PD-L1 항체, 항체 PD-L2 항체, 항 B7-H4 항체, 항 HVEM 항체, 항 TIM3 항체, 항 GAL9 항체, 항 LAG3 항체, 항 VISTA 항체, 항 KIR 항체, 항 BTLA 항체 및 항 TIGIT 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 14]

제13항에 있어서,
상기 면역관문 억제제는 Ipilimumab, Pembrolizumab, Nivolumab, Cemiplimab, Atezolizumab, Avelumab 및 Durvalumab로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 15]

제1항에 있어서,
상기 암은 위암, 간암, 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암,

- 자궁경부암, 갑상선암, 후두암, 급성 골수성 백혈병, 뇌종양, 신경모세포종, 망막모세포종, 두경부암, 침샘암 및 림프종으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 16] 제1항에 있어서,
상기 항암제는 화학항암제 및 표적항암제; 화학항암제 및 면역관문 억제제; 또는 화학항암제, 표적항암제 및 면역관문 억제제인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 17] CD80 단백질 또는 이의 단편 및 IL-2 단백질 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질 이량체를 유효성분으로 항암 유지 요법용 조성물.
- [청구항 18] 제17항에 있어서,
상기 조성물은 항암제를 더 포함하는 것인, 항암 유지 요법용 조성물.
- [청구항 19] CD80 단백질 또는 이의 단편 및 IL-2 단백질 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질 이량체 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 키트.
- [청구항 20] CD80 단백질 또는 이의 단편 및 IL-2 단백질 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질 이량체 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 항암 유지 요법용 키트.
- [청구항 21] CD80 단백질 또는 이의 단편 및 IL-2 단백질 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질 이량체 및 항암제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 22] 제21항에 있어서,
상기 융합단백질 이량체 및 항암제는 동시 및/또는 순차로 투여되는 것인, 암 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 23] CD80 단백질 또는 이의 단편 및 IL-2 단백질 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질 이량체 및 항암제를 포함하는 조성물의 암 예방 또는 치료 용도.