

명세서

발명의 명칭: 변형된 융합 단백질과 scFv의 결합체 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 개시는 혈관내피성장인자, 태반성장인자 및 결합되는 scFv의 항원과 결합하는, 변형된 융합 단백질과 scFv의 결합체 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 혈관내피성장인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF)는 신호전달 단백질로써 순환계 형성(vasculogenesis) 및 혈관신생(angiogenesis)에 중요한 역할을 한다. 일반적인 기능으로는 배아 발달, 부상 또는 운동 후의 근육, 경색된 혈관을 우회하는 신생 혈관의 형성에 관여하나 VEGF의 비정상적 증가는 종양의 발생 및 전이와 밀접한 관련이 있다(Carmeliet, P. y Jain, RK. 2000. Nature 407: pp. 249-257).
- [3] VEGF는 VEGF-A, -B, -C, -D 및 PlGF(placenta growth factor)의 5종으로 분류되며, 이들은 혈관신생에 기여하는 것으로 알려져 있다(Carmeliet, P. y Jain, RK. 2000. Nature 407: pp. 249-257; Kuwano M, et al. 2001. Intern Med 40: pp. 565-572). 반면 VEGF 수용체는 VEGF R1, R2, R3의 3종이 있으며, 수용체의 종류에 따라 이에 결합하는 리간드의 종류 및 결합친화도에 차이가 있고, 이중 VEGFR-1/-2는 혈관신생에 관여하는 것으로 알려져 있다(Veikkola, et. al., 2000. Cancer research 60: pp. 203-212).
- [4] 종양 형성 과정에 주요한 요소로 알려진 혈관내피성장인자의 제거를 통하여 혈관신생 억제를 표적하는 약물들의 개발이 과거로부터 현재까지 이어져오고 있다. 대표적으로 VEGF-A를 표적하는 단클론 항체 형태의 약물인 베바시주맵(Stacker, et. al., 2013. Chinese Journal of Cancer Research. 32(6): pp. 297-302.; Kazazi-Hyseni, et. al., 2010. Oncologist. 15(8): pp. 819-825; DrugBank Accession Number: DB00112)이 있다. 단클론 항체 의약품의 경우 단일한 혈관내피성장인자와 결합하는 작용기작을 갖고 있으며, 암화(canceration)에는 다중의 성장인자들이 관여하므로 단클론 항체에 의한 괄목할 만한 효능을 나타내기에는 효과적이지 않은 약물이었다. 베바시주맵은 오히려 세포내 보상기전에 의해 표적되지 않은 다른 형태의 성장인자의 발현율을 증가시켜 내성이 생기는 부작용을 초래하였다(Bagley, et. al., 2011. Clinical cancer research 17(5): pp. 976-988; Lieu, et. al., 2013. Plos One 8: e77117; Cutsem, et. al., 2020 Clinical cancer research 26(3): pp. 717-725). 이러한 이유로 암화와 관련된 혈관성장인자들을 다중 표적하면서 동시에 암세포에 대한 표적 기능이 있는 약물에 대한 개발 필요성이 점진적으로 확대되었다.
- [5] 단클론 항체 약물의 단점을 해결하기 위하여, 혈관내피성장인자들을 다중 표적하는 약물들이 개발되었고, 대표적인 단백질 약물은 VEGF-Trap(Ciombor, et al.,

2013, Clinical cancer research. 19 (8): pp. 1920-1925. DrugBank Accession Number: DB08885) 및 VEGF-Grab (Lee. et al., 2015. Mol. Cancer. Ther. 14(2): pp. 470-479.) 이다. 이들은 모두 디코이 수용체의 일부를 모사하였으며 VEGF-Trap은 VEGFR1 D2-VEGFR2 D3의 이중 단백질 형태로, VEGF-Grab은 VEGFR1 D2-D3의 동종 단백질 형태로 면역글로불린의 Fc와 융합되어 있는 재조합 융합 단백질이다. 이러한 혈관내피성장인자들을 다중표적하는 융합 단백질의 물성을 개선하고자 하는 노력이 지속되어 왔다.

- [6] 한편, 이러한 융합 단백질에 추가적인 항원 표적화 scFv(single-chain variable fragment)를 결합시키는 것을 고려할 수 있고, 이 중 많은 암 조직에서 과다하게 발현되는 프로그래밍된 세포사 단백질 리간드 1(PD-L1)를 타겟팅하는 scFv를 고려해볼 수 있다(Dong, et al., 2002. Nat. Med 8:787-9). 프로그래밍된 세포사 1 (PD-1) 수용체 및 그것의 리간드인 프로그래밍된 세포사 리간드 1 (PD-L1)은 만성 감염, 임신, 조직 동종이식편, 자가면역 질환, 및 암과 관련한 면역계 반응의 억제에 연루된 면역 관문 단백질이다. PD-L1은, T-세포, B-세포, 및 단핵구의 표면 상에 발현되는 억제성 수용체 PD-1에 결합함에 의해 면역 반응을 조절한다. PD-L1은 또 다른 수용체, B7-1과 또한 상호작용을 통해 T-세포 기능을 음성으로 조절한다. PD-L1/PD-1 및 PD-L1/B7-1 복합체의 형성은 T-세포 수용체 신호화를 음성으로 조절하여, T-세포 활성화의 후속 하향조절 및 항-종양 면역성 활성화의 억제를 초래한다.
- [7] PD-L1을 과발현하는 암 조직으로는 흑색종, 피부 편평상피세포암(CSCC), 두부 경부의 편평상피세포암종(HNSCC), 비-소세포 폐암, 신장암, 두부경부암, 갑상샘암, 결장암, 간암, 난소암, 유방암, 췌장암 등이 있다.
- [8] 따라서, 암세포 내 표적물질에 대한 높은 결합력을 바탕으로 선택적인 표적화가 가능하고 증가된 체내 지속기간을 보유하면서도, 상업적 규모의 생산 측면에서, 단백질 치료제 수준의 높은 생산성을 충족할 수 있는 물리적 안정성 및 화학적 안정성을 가지면서 우수한 항암 효과를 내는 결합체의 개발에 대한 필요성이 있어 왔다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 단백질의 물성 개선은 발현 및 정제 시 단백질의 물리적 안정성 및 화학적 안정성을 증대시켜 생산 효율을 극대화하고, 단백질의 체내 도입 시 비특이적 결합, 응집 및 분해를 감소시켜 높은 체내 지속력에 도달하게 하며, 항암제인 경우에 암세포에 대한 선택적인 표적화를 증가시켜 우수한 항암 효과를 나타낸다.
- [10] 본 개시의 발명자들은 VEGFR1 도메인 D2 및 도메인 D3을 포함하는 융합 단백질에서, 도메인 D3의 특정 영역에서의 아미노산 변이, 링커의 길이 조절 및 변이, 융합 단백질 내에 이황화결합을 도입하여 변형된 융합 단백질을 개발하였고, 이러한 변형된 융합 단백질에 PD-L1 표적화 scFv를 결합한 결합체를 개발하여, 이

러한 결합체가 우수한 생산성, 안정성 및 항암 효능을 나타낸다는 점을 확인하였다.

과제 해결 수단

- [11] 1. 본 개시의 일 실시태양은, VEGFR 도메인에 PD-L1 표적화 scFv (항 PD-L1 scFv)가 결합된 결합체일 수 있다. 상기 결합체는 scFv를 통해 암세포 표면에 발현하는 표적과 결합함과 동시에 암세포 주변의 VEGF 및 PlGF에 결합하여 혈관 내피 세포의 분화를 저해할 수 있다. 이는 암세포 주변의 혈관신생을 선택적으로 억제함으로써 암의 성장 저해로 이어지게 된다. 본 개시의 일 실시태양인 상기 결합체는 VEGFR1(vascular endothelial growth factor receptor1) 세포의 도메인, 링커 및 다량체화 도메인을 포함하는 융합 단백질에 PD-L1 표적화 scFv를 포함하는 결합체이고, 상기 융합 단백질의 N-말단에 PD-L1 표적화 scFv가 융합되는 것을 특징으로 하는 결합체일 수 있다. 본 개시의 일 실시태양에서 상기 PD-L1 표적화 scFv는 구체적으로, 항 PD-L1 scFv인 아테졸리주맙 scFv 또는 별도 개발된 항 PD-L1 scFv(A167 scFv; 서열번호 40)일 수 있다.
- [12] 2. 본 개시의 "융합 단백질"의 일 실시태양은, VEGFR1 세포의 도메인, 링커 및 다량체화 도메인을 포함하고, 상기 VEGFR1 세포의 도메인은 VEGFR1의 면역글로불린(Ig) 유사 도메인 D2 및 Ig 유사 도메인 D3을 포함하며, 링커가 Ig 유사 도메인 D3과 다량체화 도메인 사이에 존재하고, 아래 특성 (a) 내지 특성 (c) 중 하나 이상을 가지는 것인, 변형된 융합 단백질에 관한 것일 수 있다: (a) 도메인 D3의 $\beta 1$ - $\beta 2$ 루프 상에서 K241E, L243S, R244V, 및 H246E 중 하나 이상의 아미노산 치환, 도메인 D3의 $\beta 2$ - $\beta 3$ 루프 상에서 L258A, L258S, 또는 L258D의 아미노산 치환, 및 도메인 D3의 $\beta 5$ - $\beta 6$ 루프 상에서 K300G, Q302T, 및 K304S 중 하나 이상의 아미노산 치환된 것이고, 여기서 도메인 D3의 $\beta 1$ - $\beta 2$ 루프는 VEGFR 1의 아미노산 서열(예를 들어, 표 2의 VEGFR1의 아미노산 서열; 서열번호 41)의 T236 내지 T247 아미노산 잔기를 포함하고, $\beta 2$ - $\beta 3$ 루프는 VEGFR 1의 아미노산 서열의 T256 내지 V262 아미노산 잔기를 포함하고, $\beta 5$ - $\beta 6$ 루프는 VEGFR 1의 아미노산 서열의 D299 내지 L308 아미노산 잔기를 포함함; (b) 링커가 약 14개 내지 약 35개의 아미노산 길이를 가지는 것임; 및 (c) 융합 단백질 내에 이황화결합이 존재하고, 도메인 D3의 $\beta 1$ - $\beta 2$ 루프 상의 아미노산 잔기 중 L243 및 도메인 D3의 Y329를 기준으로 -2, -1, 0, +1, +2, 및 +3 위치에 존재하는 아미노산 잔기 중 하나, 특히 +2 위치에 존재하는 331 아미노산 잔기가 시스테인으로 치환되는 것임.
- [13] 3. 일 실시태양에 있어서, 변형된 융합 단백질의 특성 (a)는, 도메인 D3의 $\beta 1$ - $\beta 2$ 루프 상에서 K241E, L243S, R244V, 및 H246E 아미노산 치환; 도메인 D3의 $\beta 2$ - $\beta 3$ 루프 상에서 L258A, L258S, 또는 L258D 아미노산 치환; 및 도메인 D3의 $\beta 5$ - $\beta 6$ 루프 상에서 K300G, Q302T, 및 K304S 아미노산 치환을 포함하는 것일 수 있다. 특성 (a)와 관련하여, 상기 치환은 치환 전 잔기에 비해, 단백질의 순 pI(net pI)를 감

소시키는 아미노산, 측쇄가 음전하를 띠는 아미노산, 또는 측쇄가 정전기적 음전하를 갖게 되는 아미노산으로 치환된 것일 수 있다.

- [14] 4. 일 실시태양에 있어서, 변형된 융합 단백질은 도메인 D2의 N 말단이 아미노산 서열 EF로 시작하는 것일 수 있다.
- [15] 5. 일 실시태양에 있어서, 변형된 융합 단백질은 특성 (b)와 관련하여, 링커가 GS 반복 서열을 포함하고, 상기 GS 반복 서열은 G 및 S로만 이루어진 2 내지 35 개 길이의 아미노산 서열일 수 있다.
- [16] 6. 일 실시태양에 있어서, 변형된 융합 단백질의 링커에 포함되는 GS 반복 서열에 포함된 하나 이상의 글리신(G)이 시스테인(C)으로 치환된 것일 수 있다.
- [17] 7. 일 실시태양에 있어서, 변형된 융합 단백질은 특성 (b)와 관련하여, 링커가 면역글로불린으로부터 유래한 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 힌지 영역의 아미노산 서열은 변형될 수 있다.
- [18] 8. 일 실시태양에 있어서, 상기 면역글로불린으로부터 유래한 힌지 영역은 인간 IgD, 및/또는 IgG로부터 유래한 것일 수 있다.
- [19] 9. 일 실시태양에 있어서, 변형된 융합 단백질은 특성 (b)와 관련하여, 면역글로불린으로부터 유래한 힌지 영역에 존재하는 파파인 인식 부위 또는 글리코실화 부위에서 아미노산 변이를 가지는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 파파인 인식 부위에서의 아미노산 변이는, 파파인 인식 부위에 존재하는 아미노산 잔기 중 하나 이상을 알라닌, 세린, 티로신, 프롤린, 또는 트레오닌으로 치환하거나 또는 파파인 인식 부위에 방향족 탄소 또는 사이클릭 탄소를 측쇄에 갖는 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 1개 내지 10개의 아미노산 서열을 삽입하는 것일 수 있고, 상기 글리코실화 부위에서의 아미노산 변이는, 면역글로불린으로부터 유래한 힌지 영역에 존재하는 세린 또는 트레오닌을, (i) 결실시키거나 또는 (ii) 세린, 아스파라긴 또는 트레오닌 외의 다른 아미노산으로 치환하는 것일 수 있다.
- [20] 10. 일 실시태양에 있어서, 변형된 융합 단백질은 특성 (b)와 관련하여, 링커가 (i) CS, CSSG, CS(GGGGS), CS(GGGGS)3, C(GSSG)2, GS, GSSG, (GSSG)2, GGGGS, (GGGGS)4, GS(GGGGS) 및 GS(GGGGS)3 로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 및 (ii) 인간 IgG1, IgG4 또는 IgD/G1으로 이루어진 군으로부터 선택된 면역글로불린으로부터 유래한 힌지 영역을 N 말단에서 C 말단 방향으로 순서대로 포함할 수 있고, 상기 힌지 영역의 아미노산 서열은 변형될 수 있다.
- [21] 11. 일 실시태양에 있어서, 변형된 융합 단백질은 특성 (b)와 관련하여, 상기 링커가 CSSGDATPTSPSP(서열번호 68), CSKVDKKVEPKSSDTPPTCPPCP(서열번호 69), CSGGGGSAEPKAGDATPPTCPPCP(서열번호 70), CSGGGGSGGGGSGGGGSAESKYGPPCPPCP(서열번호 71), CSNTGSGGEEKKKKEKEKEEQEERSSDTPPTCPPCP(서열번호 72), CSNTGSGGEEKKKKEKEKEEQEERSCDTPPTCPPCP(서열번호 73), CGSSGGSSGEPKSDATPTCPPCP(서열번호 74), 및

CSKVDDKKVEPKSSDKTYTCPPCP(서열번호 75)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열인 것일 수 있다.

- [22] 12. 일 실시태양에 있어서, 변형된 융합 단백질은 (a) 도메인 D3의 $\beta 1$ - $\beta 2$ 루프 상에서 K241E, L243S, R244V, 및 H246E 아미노산 치환, 도메인 D3의 $\beta 2$ - $\beta 3$ 루프 상에서 L258A, L258S, 또는 L258D 아미노산 치환, 및 도메인 D3의 $\beta 5$ - $\beta 6$ 루프 상에서 K300G, Q302T, 및 K304S 아미노산 치환을 포함하고; (b) 링커가 CSSGDATPTSPSP, CSKVDDKKVEPKSSDTPPTCPPCP, CSGGGGSAEPKAGDATPTTPCPPCP, CSGGGGSGGGGSGGGGSAES KYGPPCPPCP, CSNTGSGGEEKKKEKEKEEQEERSSDTP PTCPPCP, CSNTGSGGEEKKKEKEKEEQEERSCDTPPTTPCPPCP, CGSSGGSSGEPKSDATPTTPCPPCP, 및 CSKVDDKKVEPKSSDKTYTCPPCP로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열이고; (c) L243 및 도메인 D3의 Y329를 기준으로 +2 위치에 존재하는 아미노산 잔기가 시스테인으로 치환된 것일 수 있다.
- [23] 13. 일 실시태양에 있어서, 변형된 융합 단백질은 표 2의 C61 내지 C75의 아미노산 서열(서열번호 44 내지 58)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [24] 14. 일 실시태양에 있어서, 다량체화 도메인이, (a) 면역글로불린의 Fc 부위; (b) IgG1 또는 IgG4의 CH3 부위; (c) IgG1 또는 IgG4의 CH2 및 CH3 부위; (d) 표 2의 C88의 아미노산 서열(서열번호 59)과 적어도 85% 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린의 Fc 부위; 또는 (e) Fc 영역의 아미노산 서열(예를 들어, 서열번호 60)을 포함하는 면역글로불린의 Fc 부위일 수 있다.
- [25] 15. 일 실시태양에 있어서, 다량체화 도메인이 서열번호 60의 아미노산 서열로 이루어진 IgG1의 Fc 부위를 포함하거나 이루어지는 것일 수 있다. 한편, 상기 다량체화 도메인이 서열번호 60에 대해 i) T20Q 아미노산 치환, D126E 아미노산 치환, L128M 아미노산 치환, M198L 아미노산 치환 및 K217 아미노산 결실 중 하나 이상을 가지거나, ii) L4A 아미노산 치환, L5A 아미노산 치환, H38Q 아미노산 치환, K44Q 아미노산 치환, Y66F 아미노산 치환, A97G 아미노산 치환, A100S 아미노산 치환, P101S 아미노산 치환, R125Q 아미노산 치환, D126E 아미노산 치환, L128M 아미노산 치환, K179R 아미노산 치환, Q189E 아미노산 치환, P215L 아미노산 치환 및 K217 아미노산 결실 중 하나 이상을 가지는 것일 수 있다.
- [26] 16. 일 실시태양에 있어서, 변형된 융합 단백질은 이량체 또는 다량체 형태일 수 있다.
- [27] 17. 본 개시의 일 실시태양은, 본 개시의 실시태양에 따른 변형된 융합 단백질과 scFv의 결합체에 대한 것으로, 해당 scFv는 PD-L1에 결합하는 아테졸리주맙 scFv 또는 A167 scFv(표 9; 서열번호 39 또는 40)일 수 있다.
- [28] 18. 본 개시의 일 실시태양은, 본 개시의 일 실시태양에 따른 변형된 융합 단백질과 scFv의 결합체를 유효성분으로서 포함하는, 만성 감염, 조직 동종이식편, 자

가면역 질환, 염증성 질환, 신생물 형성 질환, 암, 혈관신생 관련 질환 또는 안질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물에 관한 것일 수 있다.

- [29] 19. 본 개시의 일 실시태양은, 본 개시의 일 실시태양에 따른 변형된 융합 단백질과 scFv의 결합체를 암호화하는 핵산 분자에 관한 것일 수 있다.
- [30] 20. 본 개시의 일 실시태양은, 본 개시의 일 실시태양에 따른 변형된 융합 단백질과 scFv의 결합체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 숙주 세포에 관한 것일 수 있다.
- [31] 21. 본 개시의 일 실시태양은, 본 개시의 일 실시태양에 따른 변형된 융합 단백질과 scFv의 결합체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터에 관한 것일 수 있다.
- [32] 22. 일 실시태양에 있어서, 벡터는 재조합 바이러스 벡터 일 수 있다.
- [33] 24. 본 개시의 일 실시태양은, 본 개시의 일 실시태양에 따른 재조합 바이러스 벡터를 포함하는, 바이러스 벡터를 대상체에 전달하기 위한 약학적 조성물이며, 여기서 상기 재조합 바이러스 벡터에 의해 암호화된 융합 단백질과 scFv의 결합체가 대상체 내에서 발현되며, 만성 감염, 조직 동종이식편, 자가면역 질환, 염증성 질환, 신생물 형성 질환, 암, 혈관신생 관련 질환 또는 안질환의 예방 또는 치료를 위한 것인, 약학적 조성물에 관한 것일 수 있다.
- [34] 25. 일 실시태양에 있어서, 재조합 바이러스 벡터는 재조합 아데노 관련 바이러스 벡터일 수 있다.
- [35] 26. 본 개시의 일 실시태양은, 본 개시의 일 실시태양에 따른 변형된 융합 단백질과 scFv의 결합체, 및/또는 본 개시의 일 실시태양에 따른 변형된 융합 단백질과 scFv의 결합체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 바이러스 벡터를 필요로 하는 대상체에 투여하여, 만성 감염, 조직 동종이식편, 자가면역 질환, 염증성 질환, 신생물 형성 질환, 암, 혈관신생 관련 질환 또는 안질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것일 수 있다.
- [36] 27. 본 개시의 일 실시태양은, 본 개시의 일 실시태양에 따른 변형된 융합 단백질과 scFv의 결합체, 및/또는 본 개시의 일 실시태양에 따른 변형된 융합 단백질과 scFv의 결합체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 바이러스 벡터의 만성 감염, 조직 동종이식편, 자가면역 질환, 염증성 질환, 신생물 형성 질환, 암, 혈관신생 관련 질환 또는 안질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 예방 또는 치료에 사용하기 위한 용도에 관한 것일 수 있다.

발명의 효과

- [37] 본 개시의 일 실시태양에 따른 변형된 융합 단백질과 항 PD-L1 scFv의 결합체는 우수한 생산성, 물리적 안정성 및 화학적 안정성을 나타낼 수 있다.
- [38] 본 개시의 일 실시태양에 따른 변형된 융합 단백질과 항 PD-L1 scFv의 결합체는 우수한 혈중 안정성을 나타낼 수 있다.

- [39] 본 개시의 일 실시태양에 따른 변형된 융합 단백질과 항 PD-L1 scFv의 결합체는 VEGF, PlGF, PD-L1에 대한 우수한 결합 친화력을 나타낼 수 있다.
- [40] 본 개시의 일 실시태양에 따른 변형된 융합 단백질과 항 PD-L1 scFv의 결합체는 변형된 융합 단백질 및 scFv 각각의 항원에 대해 우수한 동시 결합 친화력을 나타낼 수 있다.
- [41] 본 개시의 일 실시태양에 따른 변형된 융합 단백질과 항 PD-L1 scFv의 결합체는 변형된 융합 단백질 및 scFv 각각의 항원에 대해 우수한 억제 효과를 나타낼 수 있다.
- [42] 본 개시의 일 실시태양에 따른 변형된 융합 단백질과 항 PD-L1 scFv의 결합체는 산성(acidic) 성질을 가지며 pH 분포에서 산성 및 중성 영역의 전하 변이체 비율이 증가하는 성질을 나타낼 수 있다. 이에 따라 변형된 융합 단백질은 체내에서 매트릭스 및 세포 표면과의 비특이적 상호작용이 개선되는 효과를 나타낼 수 있다.
- [43] 본 개시의 일 실시태양에 따른 변형된 융합 단백질과 항 PD-L1 scFv의 결합체는 우수한 항암 효과를 나타낼 수 있다.
- [44] 본 개시의 일 실시태양에 따른 변형된 융합 단백질과 항 PD-L1 scFv의 결합체는 종양 미세 환경(Tumor microenvironment, TME)에서 PlGF 수준을 낮추는 것을 통해 CD141을 발현하는 섬유아세포 (Cancer-associated fibroblasts, CAFs)의 활성을 저해하고, 이를 통해 섬유조직형성을 저해할 수 있다. 이는 혈관의 압박을 낮추고, VEGF-A 수준을 낮추는 것과 함께 혈관을 정상화하게 되는데, 정상화된 혈관과 암주변 섬유화 개선은 약물 접근성을 높이고, 면역 세포 침윤을 증가시켜 종양 성장을 억제하는 효과를 나타낼 수 있다.
- [45] 본 개시의 일 실시태양에 따른 변형된 융합 단백질과 항 PD-L1 scFv의 결합체는 항-종양, 항-섬유화 및/또는 면역 세포 활성화 효과를 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [46] 도 1은 변형된 VEGFR1의 D2-D3 도메인(본 개시의 변형된 융합 단백질)에 항 PD-L1 scFv가 결합된 형태를 2D 구조로 나타낸 그림이다.
- [47] 도 2a 내지 도 2o는 항 PD-L1 scFv와 변형된 융합 단백질의 결합체의 생산성과 순도를 나타낸 그래프이다.
- [48] 도 3a 내지 도 3c는 혈관내피성장인자, 태반성장인자 및 PD-L1과 결합하는, 항 PD-L1 scFv와 변형된 융합 단백질의 결합체의 열적 안정성을 나타낸 그래프이다 (대조군: VEGF-Grab을 기반으로 한 융합 단백질 (H-12C08 또는 프로토타입) 및 PB101(VEGF-Grab)).
- [49] 도 4a 내지 도 4k는 혈관내피성장인자, 태반성장인자 및 PD-L1과 결합하는, 항 PD-L1 scFv와 변형된 융합 단백질의 결합체의 VEGF-A, PlGF, PD-L1에 대한 결합 친화력을 나타낸 그래프이다(대조군: 항 PD-L1 scFv와 VEGF-Grab을 기반으로 한 프로토타입 결합체).

- [50] 도 5a 내지 도 5f는 혈관내피성장인자, 태반성장인자 및 PD-L1과 결합하는, 항 PD-L1 scFv와 변형된 융합 단백질의 결합체의 타겟에 대한 동시 결합 친화력을 나타낸 그래프이다.
- [51] 도 6a 내지 도 6o는 혈관내피성장인자, 태반성장인자 및 PD-L1과 결합하는, 본 개시의 항 PD-L1 scFv와 변형된 융합 단백질의 결합체(PB203)의 VEGF-A와 PD-L1에 대한 세포 수준에서의 신호 전달 억제 효과를 나타낸 그래프이다(대조군: VEGF-Grab/PB101; H-12C18; H-30D01; 티셉트릭; 항-PD-1 항체; 변형된 융합 단백질/백본/PB102).
- [52] 도 7a 내지 도 7r은 본 개시에 따른 결합체의 등전점을 측정한 그래프이다(대조군: PB101/PD20A01).
- [53] 도 8a 내지 도 8d는 본 개시에 따른 결합체의 열안정성을 분석한 그래프이다.
- [54] 도 9a 및 도 9b는 본 개시에 따른 결합체의 PK 분석 그래프이다.
- [55] 도 10는 마우스 모델에서 혈관내피성장인자, 태반성장인자 및 PD-L1과 결합하는, 본 개시의 항 PD-L1 scFv와 변형된 융합 단백질의 결합체의 종양 성장 억제 효능을 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [56] 본 문서에 기재된 다양한 실시태양 또는 실시예들은, 본 개시의 기술적 사상을 명확히 설명하기 위한 목적으로 예시된 것이며, 이를 특정한 실시 형태로 한정하려는 것이 아니다. 본 개시의 기술적 사상은, 본 문서에 기재된 각 실시태양 또는 실시예의 다양한 변경(modifications), 균등물(equivalents), 대체물(alternatives) 및 각 실시태양 또는 실시예의 전부 또는 일부로부터 선택적으로 조합된 실시태양 또는 실시예를 포함한다.
- [57] 본 개시에 사용되는 모든 기술적 용어들 및 과학적 용어들은, 달리 정의되지 않는 한, 본 개시가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다.
- [58] 본 문서에서 사용되는 단수형의 표현은, 문맥상 다르게 뜻하지 않는 한 복수형의 의미를 포함할 수 있으며, 이는 청구범위에 기재된 단수형의 표현에도 마찬가지로 적용된다.

[59] I. 정의

- [60] 본 개시에서, 용어 "약"은 기술 분야의 숙련된 기술자에게 널리 공지된 바와 같이, 각각의 값에 대한 통상적인 오차 범위를 나타낼 수 있다. 이는 본 개시에 기재된 수치 값 또는 범위의 맥락에서, 일 실시태양에서 언급되거나 또는 청구된 수치 값 또는 범위의 $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 9\%$, $\pm 8\%$, $\pm 7\%$, $\pm 6\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$, 또는 $\pm 1\%$ 임을 의미할 수 있다. 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열의 길이에 있어서, "약"은 핵산 또는 단백질이 기재된 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 수로 제한되지 않음을 나타낼 수 있으며, 양 말단에 첨가 또는 제거된 몇몇의 뉴클레

오티드 또는 아미노산이 기능적 활성을 저해하지 않는 범위 내에서 포함될 수 있다.

- [61] 본 개시에서 사용되는 "포함하는", "구비하는", "갖는" 등과 같은 표현은, 해당 표현이 포함되는 어구 또는 문장에서 달리 언급되지 않는 한, "포함하는"과 유사한 방식으로 다른 실시예를 포함할 가능성을 내포하는 개방형 용어(open-ended terms)로 이해되어야 한다.
- [62] 본 개시에서 사용된 용어 "및/또는"은 해당 용어와 연관된 항목에 있어서, 항목들 중 임의의 하나 이상, 항목들의 임의의 조합 또는 항목들 전부를 의미할 수 있다.
- [63] 본 개시에서 사용된 용어 "아미노산"은 자연에 존재하는(naturally occurring) 모든 L- α 아미노산을 의미할 수 있다. 이 정의는 노르류신(norleucine; Nle), 오르니틴 및 호모시스테인을 포함할 수 있다.
- [64] 본 개시에서 사용된 용어 "변이" 또는 "아미노산 변이"는 참조(예: 천연 서열) 폴리펩티드 또는 단백질과 비교하여, 아미노산 서열의 치환, 삽입, 결실 또는 이들의 조합을 의미할 수 있으며, 용어 "변이체"는 이러한 변이로 인해 참조 폴리펩티드 또는 단백질과 비교하여 아미노산 서열에 일부 차이를 갖는 분자를 의미할 수 있다.
- [65] 또한, 본 개시의 변이체의 범위에는 동일하거나 유사한 생물학적 활성을 보인 단백질 또는 단편 또는 이들의 유도체 및 번역 동안 또는 번역 후에 예를 들어, 당화, 단백질 가수분해에 의한 절단, 항체 분자 또는 다른 세포 리간드로의 연결 등에 의하여 별도로 변형된 유도체가 포함될 수 있다.
- [66] 본 개시에서 사용된 용어 "담체(carriers)"는 적용된 투여량과 농도에서 세포 또는 포유동물에 비독성인 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함할 수 있다. 종종 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 수용성 pH 버퍼 용액이다. 약학적으로 허용 가능한 담체의 예는 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산과 같은 버퍼; 아스코르브산을 포함하는 항산화제; 저분자량(약 10개의 잔기 미만) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 폴리머; 글라이신, 글루타민, 아스파라긴, 알라닌 또는 라이신과 같은 아미노산; 글루코오스, 만노오스 또는 텍스트린을 포함하는 당당류, 이당류 및 다른 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이팅제; 만니톨 또는 솔비톨과 같은 당알코올; 나트륨과 같은 염-형성 반대이온; 및/또는 TWEEN®, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 및 PLURONICS®와 같은 비이온성 계면활성제를 포함할 수 있으며, 이에 의하여 제한되는 것은 아니다.
- [67] 본 개시에서 사용된 용어 "유효량"은 유익하거나 소망하는 임상 또는 생화학적 결과를 가져오는데 충분한 양을 의미할 수 있다. 유효량은 1회 이상으로 투여될 수 있다. 유효량은 질병 상태의 진행을 완화시키거나, 개선하거나, 안정화시키거나, 느리게 하거나 또는 지연시키는데 충분한 양을 의미할 수 있다.

- [68] 본 개시에서 사용된 용어 "리간드"는 변형된 융합 단백질에 높은 친화도로 결합되는 분자(예: VEGF-A, -B, -C, -D, 및 PlGF)를 의미할 수 있다. 다른 맥락에서 "리간드"는 폴리펩티드 또는 단백질과 같은 분자에 공유적으로 또는 일시적으로 특이적 결합하는 모든 분자 또는 제제, 또는 화합물을 의미할 수 있다.
- [69] 본 개시에서 사용된 용어 "개체" 또는 "대상체"는 포유동물을 의미할 수 있다. 포유동물에는 가축(예컨대, 소, 양, 고양이, 개 그리고 말), 영장류(예컨대, 인간 및 원숭이와 같은 비 인간 영장류), 토끼, 그리고 설치류(예컨대, 마우스와 랫트)가 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 일 실시태양에서, 개체 또는 대상체는 인간일 수 있다.
- [70] 본 개시에서 사용된 용어, "약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 희석제"는 모든 용매, 분산매, 코팅제, 항균제와 항진균제, 등장용 제제와 흡착지연제 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [71] 본 개시에 기술된 본 개시의 일 실시태양은, 일 실시태양을 "포함하는", 이로 "이루어지는" 및/또는 이로 "필수적으로 이루어지는" 것을 포함하는 것으로 이해된다.
- [72] **II. 변형된 융합 단백질 및 변형된 융합 단백질 구성 성분**
- [73] **1. 혈관내피성장인자 수용체(vascular endothelial growth factor receptor; VEGFR)**
- [74] 일 실시태양에서, 본 개시의 변형된 융합 단백질은 VEGFR1 세포외 도메인을 구성성분으로 포함할 수 있다. VEGFR1은 *fms* 관련 티로신 키나아제(FLT-1)라고도 알려져 있으며, *FLT1* 유전자에 의해 암호화된다. VEGFR1의 아미노산 서열은 표 2의 VEGFR 1의 아미노산 서열로 제시되며, UniProtKB. #P17948로 찾을 수 있다. 일 실시태양에서, VEGFR1은 인간과 같은 포유동물로부터 유래한다. VEGFR1에는 세포 외 영역의 N 말단부터 시작하여 C 말단까지 1, 2, 3, 4, 5, 6 및 7의 번호가 매겨진 일곱 개의 면역글로불린(Ig) 유사 도메인이 존재하며, 이는 VEGFR2 및 VEGFR3의 경우에도 동일하다.
- [75] 일 실시태양에서, VEGFR1 세포외 도메인은 Ig 유사 도메인 D2 및 Ig 유사 도메인 D3를 포함할 수 있다. 본 개시에서 사용된 용어 VEGFR1의 "Ig 유사 도메인 D2"는 VEGFR1의 세포 외 영역의 N 말단에서 발견되는 두 번째 Ig 유사 도메인을 지칭하고, VEGFR의 "Ig 유사 도메인 D3"는 VEGFR1의 세포 외 영역의 N 말단에서 발견되는 세 번째 Ig 유사 도메인을 지칭하되, 이들 도메인의 기능성(예: VEGF 리간드에 대한 결합 및/또는 VEGFR 경로의 활성화 저해)이 유지되는 범위 내에서의 변이체를 포함하는 개념이다. VEGFR1의 Ig 유사 도메인 D2 및 D3는 중에 따라 활성을 나타내는 단백질의 아미노산 서열에 차이가 존재하는 경우가 있으므로, 그 유래나 서열에 한정되지 않으며, 이의 야생형 또는 활성을 가지는 변이체를 포함할 수 있다.

- [76] 일 실시태양에서, 본 개시의 변형된 융합 단백질은 VEGFR1의 Ig 유사 도메인 D2 및 Ig 유사 도메인 D3외에 다른 VEGFR 세포외 도메인을 추가로 포함할 수 있다.
- [77] 이론에 얽매이지 않고, 본 개시에서는 VEGFR의 세포외 도메인이 VEGF 리간드와의 결합에 의해 VEGF 경로의 활성화를 저해하여, VEGF 리간드와 VEGFR과의 상호 작용을 차단하는 것으로 생각된다. 또한, 이론에 얽매이지 않고, 본 개시에서는 VEGFR의 세포외 도메인이 VEGF 신호 전달 경로의 음성 음성 저해를 위해 VEGFR과 결합할 수 있다고 생각된다. 일 실시태양에서, VEGFR의 세포외 도메인은 VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D 및 PlGF로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 VEGF 리간드와 결합할 수 있다.
- [78] 일 실시태양에서, VEGFR 세포외 도메인은 숙주 세포로부터 VEGFR 세포외 도메인 또는 이를 포함하는 변형된 융합 단백질의 분비를 위한 신호 서열로 작용하는 신호 펩티드를 포함할 수 있거나, 포함하지 않을 수 있다. 이러한 신호 펩티드는 관심 있는 단백질을 암호화하는 핵산(예컨대, VEGFR1의 세포외 도메인)에 작동 가능하게 연결될 수 있다.
- [79] **2. 링커**
- [80] 변형된 융합 단백질의 구성성분들(예: VEGFR1의 세포외 도메인 또는 다량체화 도메인)은 펩티드 링커와 같은 연결 모이어티에 의해 연결될 수 있다. 이러한 링커는 융합 단백질 구성성분들의 유연성을 증가시키며, 융합 단백질 내의 각 기능성 구성성분의 구조를 유의하게 방해하지 않는다.
- [81] 일 실시태양에서, 링커는 VEGFR1 세포외 도메인의 C 말단 끝(예: Ig 유사 도메인 D3의 C 말단)을 다량체화 도메인(예: IgG1 Fc 부위)의 N 말단 끝에 연결하는 데에 이용될 수 있다.
- [82] 일 실시태양에서, 링커는 면역글로불린으로부터 유래한 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 면역글로불린으로부터 유래한 힌지 영역은 면역글로불린의 Fc 부위의 N 말단 영역에 존재하는 힌지 영역을 포함할 수 있다. 일 실시태양에서, 면역글로불린으로부터 유래한 힌지 영역은 인간IgD 또는 IgG으로부터 유래한 것일 수 있다.
- [83] **3. 다량체화 도메인**
- [84] 본 개시는 임의의 변형된 융합 단백질의 구성성분이 될 수 있는 다량체화 도메인(예: 면역글로불린의 Fc 부위)을 제공한다. 다량체화 도메인은 서브유닛의 회합을 촉진하여 예를 들어, 이량체, 삼량체, 사량체 등을 형성하는 다량체 단백질의 부분이다. 본 개시에서 사용된 용어 "다량체화 도메인"은 이량체화 도메인, 삼량체화 도메인, 사량체화 도메인 등을 지칭하는 데 이용될 수 있다. 다량체화 도메인을 포함하는 융합 단백질은 다량체화 도메인을 포함하는 다른 융합 단백질과 상호 작용하여 융합 단백질 다량체(예컨대, 융합 단백질 이량체)를 생성할 수 있다. 예를 들어, IgG Fc 부위는 본 개시에 기술된 VEGFR1의 세포외 도메인과 융합될 수 있는 이량체화 도메인이다. VEGFR1의 세포외 도메인 및 IgG Fc 부위를

포함하는 융합 단백질은 IgG Fc 부위를 포함하는 또 다른 융합 단백질과 이량체화하여, VEGF 리간드와 PlGF 리간드에 동시에 결합할 수 있는 융합 단백질 이량체를 생성할 수 있다.

- [85] 일 실시태양에서, Fc 부위는 단백질 일부가 당화되어 있거나 혹은 전체가 당화되지 않은 형태일 수 있다.
- [86] 일 실시태양에서, Fc 부위는 서열번호 60을 기준으로 T20Q 아미노산 치환, D126E 아미노산 치환, L128M 아미노산 치환, M198L 아미노산 치환 및/또는 K217 아미노산 결실을 가질 수 있다. 이러한 아미노산 변이는 FcRn과의 상호작용을 통하여 융합 단백질의 반감기를 증가시킬 수 있다. 상기 아미노산 변이는 서열번호 60의 아미노산 서열에 상응하는 서열을 가지는 다른 면역글로불린 Fc 부위에서 동일하게 나타날 수 있으며, 본 개시의 변형된 융합 단백질은 상기 아미노산 변이를 가지는 다른 면역글로불린 Fc 부위를 다량체화 도메인 구성성분으로 포함할 수 있다.
- [87] 일 실시태양에서, Fc 부위는 서열번호 60을 기준으로 L4A 아미노산 치환, L5A 아미노산 치환, H38Q 아미노산 치환, K44Q 아미노산 치환, Y66F 아미노산 치환, A97G 아미노산 치환, A100S 아미노산 치환, P101S 아미노산 치환, R125Q 아미노산 치환, D126E 아미노산 치환, L128M 아미노산 치환, K179R 아미노산 치환, Q189E 아미노산 치환, P215L 아미노산 치환 및/또는 K217 아미노산 결실을 가질 수 있다. 이러한 아미노산 변이를 통해 Fc 부위의 작동체 기능(effector function)이 제거될 수 있다. 상기 아미노산 변이는 서열번호 60의 아미노산 서열에 상응하는 서열을 가지는 다른 면역글로불린 Fc 부위에서 동일하게 나타날 수 있으며, 본 개시의 변형된 융합 단백질은 상기 아미노산 변이를 가지는 다른 면역글로불린 Fc 부위를 다량체화 도메인 구성성분으로 포함할 수 있다.

[88] 이하에서는 본 개시의 변형된 융합 단백질이 가지는 특성에 대해 서술한다.

[89] **4. 표면 전하 전이 변이 특성**

- [90] 일 실시태양에서, 본 개시의 변형된 융합 단백질은 표면 전하 전이 변이 특성을 가질 수 있다. 본 개시에서, 표면 전하 전이 변이 특성을 가지는 변형된 융합 단백질은 "표면 전하 전이 변이체" 또는 "표면 전하 변이체"로 상호 교환적으로 사용될 수 있다.
- [91] 일 실시태양에 따른 표면 전하 전이 변이 특성에서, 변형된 융합 단백질은 Ig 유사 도메인 D3의 $\beta 1$ - $\beta 2$ 루프 상의 K241E, L243S, R244V, 및 H246E 아미노산의 치환, 도메인 D3의 $\beta 2$ - $\beta 3$ 루프 상의 L258A, L258S, 또는 L258D 아미노산 치환, 및/또는 도메인 D3의 $\beta 5$ - $\beta 6$ 루프 상의 K300G, Q302T, 및 K304S 아미노산 치환을 통해 단백질의 순 pI(net pI)를 감소시키는 아미노산, 측쇄가 음전하를 띠는(negatively charged) 아미노산, 또는 측쇄가 정전기적 음전하(electro-negative)를 갖게 되는 아미노산으로 치환된 것일 수 있다. 일 실시태양에서, 측쇄가 정전기적 음전하를 갖게 되는 아미노산은 치환 후 인접한 아미노산 잔기 혹은 분자의 특성에 따라 정전기적 음전하를 갖게 되는 것을 의미할 수 있으며, 분자 내 전자

분포에 따라 생기는 상대적인 개념을 의미할 수 있다. 예를 들어, 하이드록시(-OH)를 포함하는 아미노산 잔기는 산소 원자에 존재하는 비공유전자쌍으로 인해 정전기적 음전하 상태가 될 수 있고, 이러한 현상으로 단백질의 순 pI가 감소할 수 있다.

- [92] 일 실시태양에서, Ig 유사 도메인 D3의 $\beta 1$ - $\beta 2$ 루프는 표 2의 VEGFR 1의 아미노산 서열의 T236 내지 T247 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 일 실시태양에서, Ig 유사 도메인 D3의 $\beta 2$ - $\beta 3$ 루프는 표 2의 VEGFR 1의 아미노산 서열의 T256 내지 V262 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 일 실시태양에서, Ig 유사 도메인 D3의 $\beta 5$ - $\beta 6$ 루프는 표 2의 VEGFR 1의 아미노산 서열의 D299 내지 L308 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 본 개시에서, $\beta 1$ - $\beta 2$ 루프는 "Site 1," $\beta 2$ - $\beta 3$ 루프는 "Site 2," 및 $\beta 5$ - $\beta 6$ 루프는 "Site 3"으로 지칭될 수 있다. 본 개시의 발명자는 상기 루프에 존재하는 아미노산 잔기가 도메인 D3의 표면으로 노출된다는 점을 확인하고, 루프에 존재하는 아미노산 잔기의 변이를 통해 변형된 융합 단백질의 표면 전하 안정화 및 구조 안정화를 달성하였다.
- [93] 일 실시태양에서, Site 1 및 Site 3에 존재하는 아미노산 잔기는 그 구조적 위치로 인해 아미노산 잔기 간의 상호 작용을 통해 서로 영향을 주게 되고, 이에 따라 각 Site에서 2중, 3중 또는 4중 아미노산 변이(예: 아미노산 치환)가 도입될 수 있다.
- [94] 일 실시태양에서, 상기 3개 루프는 그 기능을 유지하는 범위 내의 아미노산 서열 변이체를 포괄하는 개념으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 일 실시태양에서, $\beta 1$ - $\beta 2$ 루프, $\beta 2$ - $\beta 3$ 루프 및 $\beta 5$ - $\beta 6$ 루프는 각각 아미노산 서열 TPRPVKLLRGHT, TPLNTRV 및 DKMQNKDKGL에 대해 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [95] 일 실시태양에 따른 링커 변이 특성에서, 변형된 융합 단백질은 Ig 유사 도메인 D3의 $\beta 1$ - $\beta 2$ 루프 상의 하나 이상의 아미노산 잔기, 및 도메인 D3의 $\beta 5$ - $\beta 6$ 루프 상의 하나 이상의 아미노산 잔기가 단백질의 순 pI(net pI)를 감소시키는 아미노산, 측쇄가 음전하를 띠는 아미노산, 또는 측쇄가 정전기적 음전하를 갖게 되는 아미노산으로 치환된 것일 수 있다.
- [96] 일 실시태양에서, 변형된 융합 단백질의 Ig 유사 도메인 D2의 N 말단은 추가로 변형될 수 있다. 본 개시의 변형된 융합 단백질은 이를 암호화하는 핵산 서열 또는 핵산 분자가 다양한 유래의 벡터에 삽입되어 생산될 수 있다. 이 경우 상기 핵산 서열 또는 핵산 분자가 삽입되는 벡터의 종류 또는 유래에 따라서 Ig 유사 도메인 D2의 N 말단은 G132로 시작하는 것이 아니라, 벡터로부터 유래된 아미노산 서열(예: 아미노산 서열 EF)부터 N 말단이 시작되어 도메인 D2의 N 말단의 아미노산 서열에 변이가 나타날 수 있다. 다만 이러한 벡터 유래 아미노산 서열에 의

한 N 말단 서열의 변이는 본 개시의 변형된 융합 단백질의 생산성 또는 물성에는 영향을 미치지 않을 수 있다.

[97] **5. 링커 변이 특성**

[98] 일 실시태양에서, 본 개시의 변형된 융합 단백질은 링커 변이 특성을 가질 수 있다. 본 개시에서, 링커 변이 특성을 가지는 변형된 융합 단백질은 "링커 변이체"로 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 본 개시의 변형된 융합 단백질은 링커 변이 특성에 의해, (i) 자연 상태의 VEGFR1 세포외 도메인 중 도메인 D2 및 도메인 D3가 리간드와 결합하는 구조를 유사하게 모사할 수 있으며, (ii) 자연 상태의 VEGFR1 세포외 도메인 중 도메인 D3가 원활한 리간드 결합을 위해 확보해야 할 구조적 특성으로 도메인 D4의 이량체 형성 부위까지의 길이를 가질 수 있고, (iii) 링커 자체가 우수한 구조적 안정성을 가질 수 있다.

[99] 일 실시태양에 따른 링커 변이 특성에서, 링커가 약 14개 내지 약 35개의 아미노산 길이를 가지는 것일 수 있다.

[100] 일 실시태양에 따른 링커 변이 특성에서, 링커가 GS 반복 서열을 포함할 수 있다.

[101] 일 실시태양에 따른 링커 변이 특성에서, GS 반복 서열이 GS, GSSG, (GSSG)₂, GGGGS, (GGGGS)₃, GS(GGGGS) 및 GS(GGGGS)₃로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[102] 일 실시태양에 따른 링커 변이 특성에서, 링커가 면역글로불린으로부터 유래한 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일 실시태양에서, 상기 힌지 영역의 아미노산 서열은 변형될 수 있다.

[103] 본 개시에서, 링커는 VEGFR1 도메인 D3의 C-말단과 파파인 분해에 의해 생성되는 인간 면역글로불린의 Fc영역 사이에 위치한 부위로 Fc가 함유하고 있는 CH2 영역(A244-K360)의 N-말단 부위에 위치한 P243으로부터 도메인 D3의 C-말단 사이에 위치한 전영역을 지칭할 수 있다. 여기서 Fc 영역 및 Fc에 함유되어 있는 CH2 영역의 아미노산 위치는 카바트 넘버링에 따른다(Kabat et. al., Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th Ed., US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991). 일 실시태양에서, 링커는 인간 면역글로불린으로부터 유래한 일부 영역을 포함할 수 있으며 해당 영역은 CH1(K218~V223) 혹은 힌지 영역(E226~P243)의 아미노산 서열 또는 이러한 아미노산 서열의 일부일 수 있다.

[104] 본 개시에서, 링커가 면역글로불린으로부터 유래한 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 경우, 포함된 힌지 영역의 특성을 그대로 포함하게 된다. 예를 들어, Fc 부위의 힌지 영역은 다양한 단백질 분해 효소(protease)에 대한 절단 위치(cleavage site)를 가지며, 힌지 영역이 융합 단백질에 도입 후 Ser/Thr 아미노산에서 발생하는 O-글리코실화에 의한 올리고머화를 유발할 수 있다(Song et. al., 2020. Comput Struct Biotechnol J. 18: pp. 3925-3935.). 본 개시의 링커 변이 특성을

가지는 변형된 융합 단백질의 경우, 면역글로불린으로부터 유래한 힌지 영역의 아미노산 서열을 변형하여, 링커 자체의 우수한 구조적 안정성을 달성하고 물성이 개선되도록 변형되었다.

- [105] 일 실시태양에 따른 링커 변이 특성에서, 면역글로불린으로부터 유래한 힌지 영역은 CH1 영역으로부터 유래한 서열, 어쩌 힌지(upper hinge) 및/또는 코어 힌지(core hinge)를 포함할 수 있다. 일 실시태양에서 면역글로불린의 CH1 영역으로부터 유래한 일부 아미노산 서열은 베타-스트랜드(β -strand) 또는 베타-시트(β -sheet)를 형성할 수 있다. 일 실시태양에서, 면역글로불린으로부터 유래한 힌지 영역은 인간 IgD, IgG, 또는 이들의 조합으로부터 유래한 것일 수 있다.
- [106] 일 실시태양에서, 상기 힌지 영역이 IgG1으로부터 유래된 경우, 변이를 가지는 파파인 인식 부위의 아미노산 서열 KTHT는 KTYT, TPP, ATPT, 및 ATPPTCP으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 변형된 것일 수 있다.
- [107] 일 실시태양에 따른 링커 변이 특성에서, 링커가 (i) GS, GSSG, (GSSG)₂, GGGGS, GS(GGGGS) 및 GS(GGGGS)₃ 로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 및 (ii) 인간 IgG1, IgG4 또는 IgD/G1으로 이루어진 군으로부터 선택된 면역글로불린으로부터 유래한 힌지 영역을 N 말단에서 C 말단 방향으로 순서대로 포함할 수 있고, 상기 힌지 영역의 아미노산 서열은 변형될 수 있다.
- [108] 본 개시에서 IgD/G1으로부터 유래한 힌지 영역은 IgD 및 IgG1의 힌지 서열의 조합을 의미할 수 있으며, 구체적으로 IgD/G1으로부터 유래한 힌지 영역은 NTGSGGEEKKKKEKEKEEQEERSSDKTHTCPPCP(서열번호 76)일 수 있다. 일 실시태양에서, IgD의 힌지 서열은 NTGSGGEEKKKKEKEKEEQEERSS(서열번호 77), NTGRGGEEKKKKEKEKEEQEER(서열번호 78), 또는 이들의 변이체일 수 있다. 일 실시태양에서, IgG1의 힌지 서열은 DKTHTCPPCP(서열번호 79) 또는 이들의 변이체일 수 있다.
- [109] 일 실시태양에 따른 링커 변이 특성에서, 링커가 CSSGDATPTSPPPSP(서열번호 68), CSKVDDKKVEPKSSDTPPTCPPCP(서열번호 69), CSGGGGSAEPKAGDATPPTCPPCP(서열번호 70), CSGGGGSGGGGSGGGGSAESKYGPPCPPCP(서열번호 71), CSNTGSGGEEKKKKEKEKEEQEERSSDTPPTCPPCP(서열번호 72), CSNTGSGGEEKKKKEKEKEEQEERSCDTPPTCPPCP(서열번호 73), CGSSGGSSGEPKSDATPTCPPCP(서열번호 74), 및 CSKVDDKKVEPKSSDKTYTCPPCP(서열번호 75)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열일 수 있다.
- [110] **6. 이황화결합 변이 특성**
- [111] 일 실시태양에서, 본 개시의 변형된 융합 단백질은 이황화결합 변이 특성을 가질 수 있다. 본 개시에서 이러한 이황화결합 변이 특성을 가지는 변형된 융합 단백질은 "이황화결합 변이체"로 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 본 개시의 변형된 융합 단백질은 이중 단백질의 융합체이므로, 서로 다른 종류의 단백질이 결합

되는 부위에서 안정성이 저하될 것으로 예상된다. 이에 변형된 융합 단백질의 물리적 절단을 방지하고 안정성을 개선하기 위해 이황화결합 변이 특성을 도입하였다.

- [112] 이황화결합 변이 특성을 도입하기 위해, 3차 구조 에너지 예측 프로그램(foldx in YASARA, Schymkowitz et al., 2005., Nucleic Acids Research. 33:W382-388)을 이용하여 후보 아미노산 잔기를 선정하고, 이러한 아미노산 잔기를 시스테인으로 치환하여 이황화결합에 따른 변형된 융합 단백질의 특성(예: 생산성, 물성, 리간드에 대한 결합력)이 개선됨을 확인하였다(실시예 2 참조).
- [113] 일 실시태양에서, 이황화결합 변이 특성을 위해 (i) Ig 유사 도메인 D3의 β 1- β 2 루프 상의 아미노산 잔기 중 하나 또는 β 5- β 6 루프 상의 아미노산 잔기 중 하나와, (ii) Ig 유사 도메인 D3의 Y329를 기준으로 +2 위치에 존재하는 아미노산 잔기가 시스테인으로 치환될 수 있다. 이러한 치환에 의해 본 개시의 변형된 융합 단백질은 단백질 내에 이황화결합을 가질 수 있다. 일 실시태양에서, 이황화결합 변이 특성의 도입을 위하여 상기 (i) 및 (ii)에 기재된 위치에 존재하는 아미노산 잔기의 선정은 상기 기준 (1) 내지 (3)에 따라 결정될 수 있다.
- [114] **7. 융합 단백질**
- [115] 본 개시의 일 실시태양에서, VEGF 리간드 및 PlGF 리간드에 동시에 결합할 수 있는 변형된 융합 단백질이 제공될 수 있다. 일 실시태양에서, 변형된 융합 단백질은 VEGF 리간드에 대한 제1 결합 특이성 및 PlGF 리간드에 대한 제2 결합 특이성을 포함할 수 있다. 여기서 VEGF 리간드는 VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, 및 VEGF-D 중 하나 이상일 수 있으며, 구체적으로 VEGF-A일 수 있다.
- [116] 본 개시에서 대조군으로 사용하는 VEGFR1 야생형 단백질을 기반으로 VEGFR1의 D2 및 D3을 포함하는 융합 단백질을 PB101(VEGFR1 야생형 단백질을 기반으로 VEGFR1의 D2 및 1개 내지 3개 아미노산이 당쇄화된 D3를 포함하는 융합 단백질) 또는 VEGF-Grab으로 지칭할 수 있다.
- [117] 일 실시태양에서, 변형된 융합 단백질은 VEGFR1 세포외 도메인, 링커 및 다량체화 도메인을 포함할 수 있다. 일 실시태양에서, 변형된 융합 단백질은 N 말단부터 C 말단까지 VEGFR1 세포외 도메인, 링커 및 다량체화 도메인의 순서로 정렬된 구성성분을 포함할 수 있다. 일 실시태양에서, VEGFR1 세포외 도메인은 VEGFR1의 Ig 유사 도메인 D2 및 Ig 유사 도메인 D3를 포함할 수 있다.
- [118] 일 실시태양에서, 변형된 융합 단백질은 (a) 표면 전하 전이 특성, (b) 링커 변이 특성, 및 (c) 이황화결합 변이 특성을 가지는 것일 수 있다.
- [119] (a) 도메인 D3의 β 1- β 2 루프 상에서 K241E, L243S, R244V, 및 H246E의 아미노산 치환, 도메인 D3의 β 2- β 3 루프 상에서 L258A, L258S, 또는 L258D의 아미노산 치환, 및/또는 도메인 D3의 β 5- β 6 루프 상에서 K300G, Q302T, 및 K304S의 아미노산 치환을 포함하고;
- [120] (b) 링커가 CSSGDATPTSPSPP(서열번호 68),
CSKVDDKKVEPKSSDTPPTCPPCP(서열번호 69),

CSGGGGS AEPKAGDATPPTCPPCP(서열번호 70),
 CSGGGGSGGGGSGGGGSAESKYGPPCPPCP(서열번호 71),
 CSNTGSGGEEKKKKEKEKEEQEERSSDTPPTCPPCP(서열번호 72), CSNTGSGGEEKKKKEKEKEEQEERSCDTPPTCPPCP(서열번호 73), CGSSGGSSGEPKSDATPTCPPCP(서열번호 74), 및
 CSKVDDKKVEPKSSDKTYTCPPCP(서열번호 75)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열이고,

- [121] (c) 도메인 D3의 $\beta 1$ - $\beta 2$ 루프 상의 L243 아미노산 잔기가 시스테인으로 치환되고, 도메인 D3의 Y329를 기준으로 +2 위치에 존재하는 아미노산 잔기가 시스테인으로 치환된 것임.
- [122] 일 실시태양에서, 변형된 융합 단백질은 표 2의 C61 내지 C75의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일 실시태양에서, 변형된 융합 단백질은 표 2의 C61 내지 C75의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [123] 일 실시태양에서, 변형된 융합 단백질은 표 2의 C61 내지 C75의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 포함할 수 있다. 이러한 변이체의 경우, 본 개시의 변형된 융합 단백질이 가지는 특성에서 나타나는 아미노산 변이를 그대로 포함 또는 유지하면서, 그 외의 아미노산 서열에서 나타나는 아미노산 변이(예: 보존적 아미노산 치환)를 포함할 수 있다.
- [124] 일 실시태양에서, 본 개시의 변형된 융합 단백질의 구성성분(VEGFR1 세포외 도메인, 링커 및 다량체화 도메인)들은 예를 들어, 글리코실화, 시알릴화, 아세틸화 및 포스포릴화를 포함하는 번역 후 변형을 보유할 수 있다.
- [125] 일 실시태양에서, 본 개시의 변형된 융합 단백질은 본 개시에 기술된 특성에서 나타나는 아미노산 변이 위치 외의 다른 위치에서 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 이러한 보존적 아미노산 치환은 본 개시의 변형된 융합 단백질의 각 구성성분들(예: VEGFR1의 세포외 도메인, 링커 및 다량체화 도메인) 중 임의의 것 안으로 도입될 수 있다.
- [126] 일 실시태양에서, 본 개시의 변형된 융합 단백질에 포함될 수 있는 보존적 치환은 아래 표 0과 같을 수 있다. 본 개시의 변형된 융합 단백질에 해당 보존적 치환을 통해 원하는 활성, 예를 들어, 유지된/개선된 타겟에 대한 결합 친화력, 감소된 면역 원성, 또는 개선된 혈청 내 안정성/열 안정성 등을 얻을 수 있다.

[127] [표0]

본래 잔기	보존적 치환의 예시 잔기
Ala (A)	Val; Leu; Ile

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

- [128] 일 실시태양에서, 본 개시의 변형된 융합 단백질은 표 2의 C61 내지 C75에 개시된 것일 수 있다.
- [129] **8. 융합 단백질과 scFv의 결합체**
- [130] 본 개시의 일 실시태양에서, 본 개시의 실시태양에 따른 변형된 융합 단백질과 scFv의 결합체가 제공될 수 있다. 일 실시태양에서, 해당 scFv는 PD-L1를 표적하는 scFv일 수 있고, 특히 표 9에 개시된 PD-L1에 결합하는 아테졸리주맵 scFv 또는 A167 scFv일 수 있다. 본 개시에서는 본 개시의 일 실시태양에 따른 PD-L1를 표적하는 scFv와 변형된 융합 단백질의 결합체를 PB203로 지칭할 수 있다.
- [131] 일 실시태양에서, 본 개시의 변형된 융합 단백질과 scFv의 결합체는 표 9의 서열번호 1 내지 32에 개시된 것일 수 있다.
- [132] 일 실시태양에서, 결합체는 표 9의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일

성을 포함할 수 있다. 이러한 변이체의 경우, 본 개시의 결합체가 가지는 특성에서 나타나는 아미노산 변이를 그대로 포함 또는 유지하면서, 그 외의 아미노산 서열에서 나타나는 아미노산 변이(예: 보존적 아미노산 치환)를 포함할 수 있다.

- [133] 일 실시태양에서, 본 개시의 결합체의 구성성분(scFv, VEGFR1 세포외 도메인, 링커 및 다량체화 도메인)들은 예를 들어, 글리코실화, 시알릴화, 아세틸화 및 포스포릴화를 포함하는 번역 후 변형을 보유할 수 있다.
- [134] 일 실시태양에서, 본 개시의 결합체는 본 개시에 기술된 특성에서 나타나는 아미노산 변이 위치 외의 다른 위치에서 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 이러한 보존적 아미노산 치환은 본 개시의 변형된 융합 단백질의 각 구성성분들(예: scFv, VEGFR1의 세포외 도메인, 링커 및 다량체화 도메인) 중 임의의 것 안으로 도입될 수 있다.
- [135] 일 실시태양에서, 본 개시의 결합체는 세포로부터의 단백질 분비를 위한 신호 펩티드 또는 신호 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 결합체는 이중 기원의 펩티드, 구체적으로 신호 서열 또는 성숙한 융합 단백질의 N 말단에 특이적인 절단 자리를 가지고 있는 기타 펩티드를 추가로 포함할 수 있다. 일 실시태양에서, 상기 이중 기원의 신호 서열은 진핵 숙주 세포에 의해 인식되고 가공되는(즉, 신호 펩티드 가수분해효소에 의해 절단되는) 것일 수 있다. 신호 펩티드에 관한 내용은 해당 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 한국 등록특허 제10-2228921호에 제시되어 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 실시태양에서, 신호 펩티드는 인간 인터루킨 신호 서열일 수 있다. 일 실시태양에서, 신호 펩티드는 MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSG(tPA), MEFGLSWVFLVALFRGVQC(H7), MKWVTFISLLFLFSSAYS(인간 혈청 알부민), MGWSCIILFLVATATGVHS(마우스 Ig 중쇄), MDWTWRVFCLLAVAPGAHS(인간 Ig 중쇄), 또는 MYRMQLLSICIALSLALVTNS(인간 인터루킨-2)인 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 통상의 기술자가 융합 단백질의 제조를 위해 사용할 수 있는 신호 펩티드라면 제안되지 않고 사용될 수 있다.
- [136] 일 실시태양에서, 본 개시의 결합체는 리간드 활성의 저해(예: VEGF 활성, PD-L1 활성 또는 PIGF 활성의 저해)에 대해 약 1 mg/ml, 500 ng/ml, 300 ng/ml, 100 ng/ml, 70 ng/ml, 50 ng/ml, 45 ng/ml, 40 ng/ml, 35 ng/ml, 30 ng/ml, 25 ng/ml, 20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 1 ng/ml, 100pg/ml, 70 pg/ml, 50 pg/mL, 45 pg/ml, 40 pg/ml, 35 pg/ml, 30 pg/ml, 25 pg/ml, 20 pg/ml, 10 pg/ml, 5 pg/ml 또는 1 pg/mL(포함적, 이들 숫자 사이의 임의의 값을 포함함) 이하의 IC₅₀을 가질 수 있다.
- [137] 일 실시태양에서, 본 개시의 결합체는 결합 파트너(예컨대, VEGF, PD-L1 및/또는 PIGF)에 대해 1.0 mM, 500 μM, 100 μM, 50 μM, 25 μM, 10 μM, 5 μM, 1 μM, 900 nM, 800 nM, 700 nM, 600 nM, 500 nM, 400 nM, 350 nM, 300 nM, 250 nM, 200 nM, 150 nM, 100 nM, 95 nM, 90 nM, 85 nM, 80 nM, 75 nM, 70 nM, 65 nM, 60 nM, 55 nM, 50 nM, 45 nM, 40 nM, 35 nM, 30 nM, 25 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 5 nM, 1

nM, 900 pM, 800 pM, 700 pM, 600 pM, 500 pM, 400 pM, 300 pM, 200 pM, 100 pM, 50 pM, 25 pM, 12.5 pM, 6.25 pM, 5 pM, 4 pM, 3 pM, 1 pM, 0.5 pM, 0.1 pM, 0.05 pM 또는 0.01 pM(포함적, 이들 숫자 사이의 임의의 값을 포함함) 중 임의의 것보다 작은 Kd를 가질 수 있다.

[138] **III. 핵산, 벡터 및 숙주 세포**

[139] **핵산**

[140] 본 개시의 일 실시태양에서, 항 PD-L1 scFv, VEGFR1 세포외 도메인 및/또는 다량체화 도메인과 같은, 본 개시의 임의의 변형된 융합 단백질과 scFv, 및 변형된 융합 단백질과 scFv의 결합체 구성성분을 암호화하는 단리된 핵산이 제공될 수 있다. 포유동물 VEGFR을 암호화하는 핵산이 모든 수용체 유형에 대하여 기술되어 있다. 예시적인 핵산 서열은, 이에 제한되지는 않으나, 미국 특허 번호 7,928,072 및 WO2006/113277에서 찾을 수 있다. 인간 VEGFR1 및 VEGFR2를 암호화하는 mRNA는, 각각, 진뱅크 수탁 번호 NM_002019.4 및 NM_002253.2에서 찾을 수 있다.

[141] 다량체화 도메인(예컨대, Fc 부위)을 암호화하는 단리된 핵산이 본 개시에 제공될 수 있다.

[142] 본 개시의 변형된 융합 단백질을 암호화하는 단리된 핵산이 제공될 수 있다.

[143] 본 개시의 변형된 융합 단백질 또는 융합 단백질의 구성성분(예: VEGFR1의 세포외 도메인 또는 다량체화 도메인)를 암호화하는 단리된 핵산 서열은 링커를 암호화하는 핵산 서열을 더 포함할 수 있다.

[144] 일 실시태양에서, 단리된 핵산은 숙주세포로부터 변형된 융합 단백질을 분비하는 신호 서열의 역할을 하는 신호 펩티드를 암호화하는 서열을 더 포함할 수 있다. 일 실시태양에서, 단리된 핵산은 신호 펩티드를 암호화하는 서열을 포함하지 않을 수 있다.

[145] 본 개시의 변형된 융합 단백질 또는 융합 단백질의 구성성분(예: VEGFR1 세포외 도메인, 링커 또는 다량체화 도메인)를 암호화하는 단리된 핵산 분자는 RNA의 형태, 예를 들어 mRNA, hnRNA, tRNA 또는 임의의 다른 형태, 또는 이에 제한되지는 않으나, 클로닝으로 얻거나 합성으로 생성된 cDNA 및 게놈 DNA를 포함하는 DNA의 형태 또는 이의 임의의 조합일 수 있다. 이러한 단리된 핵산 분자는 해당 분야에 알려진 다양한 방법으로 제조될 수 있다(문헌: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(Sambrook et al., 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012) 및 *Current Protocols in Molecular Biology*(F.M. Ausubel, et al. eds., 2003 참조).

[146] **벡터**

[147] 본 개시는 일 실시태양에서, 결합체 또는 결합체의 구성성분을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열을 상기 단백질을 발현하기 위한 세포 내로 도입하기 위한 핵산 전달 비히클 또는 이의 용도에 관한 것일 수 있다. 핵산 서열은 상기 단리된 핵산의 서열일 수 있다.

- [148] 일 실시태양에서, 핵산 전달 비히클의 예는, 리포좀, 생체적합 폴리머(천연 폴리머 및 합성 폴리머를 포함함); 지단백질; 폴리펩티드; 다당류; 지질다당류; 인공 바이러스 외피(envelope); 금속 입자; 및 박테리아, 바이러스, 예를 들어 배쿨로바이러스(baculovirus), 아데노바이러스(adenovirus) 및 레트로바이러스(retrovirus), 박테리오파지, 코스미드, 플라스미드, 진균류 벡터 및 다양한 진핵 및 원핵 숙주에서의 발현에 대해 기술된, 당해 분야에 통상적으로 사용되는 다른 재조합 비히클일 수 있다. 일 실시태양에서, 핵산 전달 비히클은 발현 벡터, 예를 들어 플라스미드일 수 있다. 일 실시태양에서, 발현 벡터에 포함된 상기 핵산 서열은 발현 조절 서열에 작동적으로 연결될 수 있다.
- [149] 일 실시태양에서, 벡터는 발현 벡터의 통상적인 기능을 수립하기 위한 임의의 요소, 예를 들어, 프로모터, 리보솜 결합 요소, 종결자, 인핸서, 선택 마커, 및 복제 원점을 포함할 수 있다. 프로모터는 구조적, 유도성 또는 억제성 프로모터일 수 있다. 예시적인 프로모터는 한국 등록특허 제10-0659477호에 제시되어 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [150] 핵산을 세포에 전달할 수 있는 다수의 발현 벡터(예컨대, 박테리아 세포, 효모 세포, 식물 세포, 또는 포유동물 세포 유래)가 당해 분야에 알려져 있고, 세포 내에서 결합체 또는 결합체 구성성분을 생성하기 위해 본 개시에서 사용될 수 있다. 예를 들어, E. 콜라이(*E. coli*)가 결합체를 암호화하는 핵산을 포함하도록 조작된 플라스미드, 예를 들어, pBR322(Mandel et al., *J. Mol. Biol.*, 1970, 53:154)로 형질전환되면 변형된 결합체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 발현된 결합체 또는 결합체 구성성분은 세포로부터 수확되고, 당해 분야에 공지되고 본 개시에 기술된 바와 같은 통상적인 기술에 따라 정제될 수 있다.
- [151] 일 실시태양에 있어서, 상술한 결합체를 암호화하는 핵산을 포함하고, 박테리아 또는 진핵 숙주에서 복제될 수 있는 발현 벡터는 숙주를 감염(transfect)시키는데 사용될 수 있고, 이에 의하여 생물학적으로 활성인 형태로 회수될 수 있는 결합체의 생산을 위한 상기 핵산이 직접적으로 발현될 수 있다. 본 개시에서, 생물학적으로 활성인 형태는 VEGF 리간드, PD-L1 또는 PIGF 리간드에 결합할 수 있는 형태를 포함한다.
- [152] 일 실시태양에 있어서, 결합체 또는 결합체 구성성분을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터는 적어도 세 가지 일반적인 방법인 (a) DNA-DNA 혼성화, (b) "마커" 유전자 기능의 존재 또는 부재, 및 (c) 삽입된 서열의 발현으로 확인될 수 있으나, 이에 의하여 제한되는 것은 아니다. 상기 세 가지 방법의 구체적인 내용은 한국 등록특허 제10-0659477호 또는 제10-2228921호에 제시되어 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [153] 숙주 세포
- [154] 본 개시의 일 실시태양에서, 본 개시의 결합체를 암호화하는 상기 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공될 수 있다. 이러한 숙주 세포는 본 개시의 결합체의 발현에 적합한 것이며, 결합체를 생산하기 위한 숙주-벡터계에 해당할 수 있다.

일 실시태양에서, 숙주 세포는 바이러스성 입자(예: 재조합 바이러스 벡터)를 생성하기 위해 사용될 수 있다.

- [155] 본 개시에서 사용된 용어 "숙주 세포"는 본 개시의 벡터(들) 및 이의 자손(progeny)에 대한 수여자가 되거나 될 수 있는 세포를 포함할 수 있다. 자연적, 우연한, 또는 정교한 돌연변이로 인해, 자손은 반드시(형태학 또는 전체 DNA 상보체의 계층에서) 원래의 모세포와 완전하게 동일하지 않을 수 있다. 일 실시태양에서, 숙주세포는 *E. coli*와 같은 박테리아 세포, *Pichia pastoris*와 같은 효모 세포, *Spodoptera frugiperda*와 같은 곤충 세포, 또는 COS, HEK 또는 CHO 세포와 같은 포유동물 세포일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [156] 일 실시태양에서, 본 개시의 결합체는 숙주세포에서 일시적으로, 계속적으로(constitutively) 또는 영구적으로 발현될 수 있다.
- [157] 본 개시의 일 실시태양에서, 결합체의 생산이 가능한 조건 하에서 상기 숙주 세포 또는 숙주-벡터계의 세포를 배양한 후, 생산된 결합체를 회수하여 본 개시의 결합체를 생산하는 방법을 제공할 수 있다. 본 개시의 실시예 유용한 결합체는 원핵 또는 진핵 발현 시스템에서 발현시켜 생산될 수 있다. 숙주 세포를 배양하는 방법 또는 숙주 세포로부터 결합체를 제조하는 방법은 해당 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 한국 등록특허 제10-2228921호에 제시되어 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [158] 일 실시태양에 있어서, 상기 숙주 세포로부터 생산된 본 개시의 결합체는 다양한 방법을 통해 정제되고 확인될 수 있다. 숙주 세포로부터 생산된 결합체를 정제 및 확인하는 방법은 해당 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 한국 등록특허 제10-2228921호에 제시되어 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 결합체의 추가적인 정제를 위하여, 종래의 이온 교환 크로마토그래피, 친화 크로마토그래피, 당 차이 크로마토그래피(different sugar chromatography), 소수성 상호작용 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피 또는 겔 여과를 포함하는 많은 정제 방법이 사용될 수 있으며, 이에 의하여 제한되는 것은 아니다.
- [159] **IV. 바이러스성 입자(viral particles) 및 바이러스성 입자를 생성하는 방법**
- [160] 본 개시의 일 실시태양에서, 본 개시의 결합체를 암호화하는 핵산을 포함하는 바이러스성 입자(또는 비리온)가 제공될 수 있다.
- [161] 바이러스 벡터는, 특정 표적 조직(예컨대, 질환을 가지는 조직) 내 표적 세포에서 단백질의 발현을 위해 결합체 또는 결합체 구성성분을 암호화하는 핵산을 전달하기 위해 사용될 수 있다. 많은 종류의 바이러스가 알려져 있고, 다수가 핵산을 표적 세포에 전달하기 위한 목적으로 연구되고 있다. 외인성 핵산은, 세포로의 전달을 위해, 벡터, 예를 들어 아데노바이러스, 부분적으로 결실된 아데노바이러스, 완전히 결실된 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스(AAV), 레트로바이러스, 렌티바이러스, 등 내로 삽입될 수 있다.
- [162] 일 실시태양에서, 세포는 개체 내에 존재하고, 바이러스가 정맥 내, 근육 내, 내분 또는 기타 투여 경로를 통해 전달될 수 있다. 일 실시태양에서, 바이러스 벡터

는 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스(AAV) 및 레트로바이러스(렌티바이러스, 예를 들어, 인간 면역결핍 바이러스(HIV)를 포함함)로부터 유래된 것들을 포함할 수 있다. 예시적인 바이러스 벡터에 대해서는, 그 전체가 참조로서 본원에 포함된, 미국 특허 번호 7,928,072 및 WO2006/113277를 참조하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 결합체를 암호화하는 핵산을 포함하는 바이러스 입자 및 이를 생성하는 방법은 해당 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 한국 등록특허 제 10-2228921호에 제시되어 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[163] **IV. 결합체 및 바이러스 입자를 이용한 처리법**

[164] 본 개시의 일 실시태양은, 본 개시의 결합체를 유효성분으로서 포함하는, VEGF 리간드, VEGF 수용체 또는 PD-L1과 관련된 질환 또는 이러한 질환의 증상 중 적어도 하나의 예방, 개선 또는 치료에 사용하기 위한 약학적 조성물에 관한 것일 수 있다.

[165] 본 개시의 일 실시태양은, 본 개시의 결합체를 투여하는 단계를 포함하는, VEGF 리간드, VEGF 수용체 또는 PD-L1과 관련된 질환 또는 이러한 질환의 증상 중 적어도 하나를 예방, 개선 또는 치료하는 방법에 관한 것일 수 있다.

[166] 본 개시의 일 실시태양은, 본 개시의 결합체의 VEGF 리간드, VEGF 수용체 또는 PD-L1과 관련된 질환 또는 이러한 질환의 증상 중 적어도 하나를 예방, 개선 또는 치료하기 위한 용도에 관한 것일 수 있다.

[167] 본 개시의 일 실시태양은, VEGF 리간드, VEGF 수용체 또는 PD-L1과 관련된 질환 또는 이러한 질환의 증상 중 적어도 하나를 예방, 개선 또는 치료하기 위한 방법에 사용하기 위한 본 개시의 결합체 또는 이를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것일 수 있다.

[168] 일 실시태양에서, 본 개시의 결합체는 이를 암호화 하는 핵산의 형태로 핵산 전달 비히클 또는 바이러스성 입자(예: 재조합 바이러스 벡터)로 VEGF 리간드, VEGF 수용체 또는 PD-L1과 관련된 질환 또는 이러한 질환의 증상 중 적어도 하나의 예방, 개선 또는 치료에 사용될 수 있다. 일 실시태양에서, 상기 핵산 전달 비히클 또는 바이러스성 입자는 VEGF 리간드, VEGF 수용체 또는 PD-L1과 관련된 질환 또는 이러한 질환의 증상 중 적어도 하나의 예방, 개선 또는 치료에 사용하기 위한 유전자 치료에 적용될 수 있다. 일 실시태양에서, 해당 분야에서 이용 가능한 모든 유전자 치료방법이 본 개시에 따라 사용될 수 있다. 일 실시태양에서, 상기 핵산은 최종적인 재조합 세포의 생체 내 투여에 앞서 세포로 도입된다. 유전자 치료 목적을 위하여 핵산이 도입되는 세포는 모든 이용 가능한 세포 유형을 포함하며, 예를 들어, 상피 세포, 내피 세포, 케라티노사이트, 섬유아 세포, 근육 세포, 간세포, 혈액 세포(예: T-림프구, B-림프구, 단핵구, 대식세포, 중성구, 호산구, 거핵구, 또는 과립구), 다양한 줄기세포 또는 선조세포(progenitor cell), 예를 들어 골수, 재대혈, 말초혈액, 태아 간에서 얻은 조혈 줄기 또는 선조세포 등이 포함될 수 있으며, 이에 의하여 제한되는 것은 아니다. 일 실시태양에서, 유전자 치료를 위하여 사용되는 세포는 환자의 자가 유래 세포일 수 있다.

- [169] 일 실시태양에서, 결합체는 VEGF 단백질, PlGF, 및/또는 PD-L1 단백질에 결합할 수 있다. 일 실시태양에서, 결합체는 다음의 특성 중 하나 이상을 가질 수 있다: (a) VEGF 패밀리를, 예를 들어 VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PlGF 및 PD-L1 중 하나 이상의 단백질에 결합; (b) VEGF 패밀리의 단백질의 VEGF 수용체에 대한 결합 및/또는 PD-L1 단백질의 PD-1 수용체에 대한 결합의 차단; (c) VEGF 신호 경로 및/또는 PD-L1 신호 경로의 활성화 저해; (d) 만성 감염, 조직 동종이식편, 안질환, 자가면역 질환, 염증성 질환, 신생물(neoplasm) 형성 질환, 또는 암과 같은 질환의 예방, 개선 및/또는 치료; (e) 신생물 또는 암 성장의 악화, 방지 또는 예방; (f) 신생물 또는 암 전이 억제. 결합체의 활성은 생체 내 및/또는 시험관 내에서 측정될 수 있다.
- [170] 일 실시태양에서, 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제를 포함할 수 있다. 일 실시태양에서, 약학적으로 허용가능한 담체는 땅콩유, 대두유, 광유 등과 같은, 석유, 동물, 식물, 또는 합성 유래의 것들을 포함하는, 물과 오일 같은, 멸균 액체일 수 있다. 식염수 및 수용성 텍스트로스, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 글리세롤 용액 또한 액체 담체로서, 특히 주사 가능한 용액을 위하여, 이용될 수 있다. 이러한 약학적 조성물은 추가적인 성분들, 예를 들어, 보존제, 완충액, 등장제, 항산화제 및 안정화제, 비이온성 습윤 또는 정화제, 점증제 등을 더 포함할 수 있다. 본 개시의 약학적 조성물은 단일 단위 투여량으로 또는 다회 투여량 형태로 포장될 수 있다. 이러한 조성물은 일반적으로 멸균성 및 실질적으로 등장성의 용액으로 제형화된다. 또한, 조성물은 눈 및 안과 조직의 수양액에 적합한 삼투값을 보유하도록 제형화될 수 있다. 이러한 삼투값은 일반적으로 물 킬로그램당 약 200 내지 400 밀리오스몰("mOsm/kg") 범위 또는 약 300 mOsm/kg일 수 있다. 망막은 약 283 mOsm/kg의 삼투값을 보유하는 것으로 여겨진다.
- [171] 일 실시태양에서, 약학적 조성물은 비경구용 조성물일 수 있다. 비경구용 조성물은 투여량의 균일성과 투여의 용이성을 위한 단위 제형(dosage unit form) 형태로 제형화 하는 것이 유리할 수 있다.
- [172] **질환 또는 질병**
- [173] 일 실시태양에서, VEGF 리간드, VEGF 수용체 또는 PD-L1과 관련된 질환은 만성 감염, 조직 동종이식편, 자가면역 질환(예: 류머티스성 관절염, 다발성 경화증, 면역 반응에 의한 습관성 유산 또는 전신 홍반성 루푸스), 염증성 질환(염증성 관절염, 골 관절염, 또는 건선), 신생물 형성 질환, 암(예: 유방암, 폐암, 위암, 췌장암 또는 백혈병), 혈관신생 관련 질환(예: 아테롬성 동맥 경화증) 또는 안질환(예: 노인성 황반 변성, 맥락막신혈관형성, 또는 포도막염)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [174] 일 실시태양에서, 암은 전립선암, 요도암, 음경암, 유방암, 폐암, 식도암, 소장암, 대장암, 직장암, 결장암, 간암, 요로암(예: 방광암), 신장암, 폐암(예: 비소세포 폐암), 난소암, 자궁경부암, 자궁내막암, 질암종, 음문암종, 췌장암, 위암, 내분비선

암, 두부경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 갑상샘암, 부신암, 피부암(예: 흑색종, 피부 편평상피세포암(CSCC), 두부경부의 편평상피세포암종(HNSCC)), 호지킨병(Hodgkin's disease), 골암, 림프 또는 골수의 조혈모세포암, 만성 또는 급성 백혈병, 두경부암, 비인두암종(nasopharyngeal carcinoma; NPC), 교아종, 기형암종, 신경아세포종, 선암종, 간엽 기원의 암(예: 섬유육종 또는 횡문근육종), 연조직 육종 및 암종, 유모암종, 간아세포종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종인, 카포시육종(Karposi's sarcoma) 또는 빌름(Wilm's) 종양을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 개시의 결합체는 항 PD-L1 및 항-혈관신생 제제 또는 항-VEGF 및 항 PD-L1 제제로 작용하여 암 또는 암의 증상을 개선, 예방 및/또는 치료할 수 있다.

[175] **투여 방법 및 투여 용량**

[176] 본 개시의 일 실시태양에서, 유효량의 결합체를 대상체에 전달하는 방법이 제공될 수 있다. 결합체는 조성물 내에서 대상체에 전달될 수 있다. 결합체는 또한 결합체를 암호화하는 핵산을 포함하는 핵산 전달 비히클 또는 바이러스성 입자(예: 재조합 바이러스 벡터)에 의해 대상체에 전달될 수 있다. 본 개시의 일 실시태양에서, 결합체 또는 결합체를 암호화하는 핵산을 포함하는 핵산 전달 비히클 또는 바이러스성 입자(예: 재조합 바이러스 벡터)를 포함하는 조성물이 제공될 수 있다.

[177] 일 실시태양에서, 본 개시의 조성물은, 개체에게, 이에 제한되지는 않으나, 다음을 포함하는 임의의 경로를 통하여 투여될 수 있다: (예컨대, 주입 펌프에 의해) 정맥 내, 복강 내, 안 내, 동맥 내, 폐 내, 경구, 흡입, 방광 내, 근육 내, 기관 내, 피하, 안 내, 척추강 내, 경피, 경흉막, 동맥 내, 국소, 흡입적(예컨대, 스프레이의 미스트), 점막(예를 들어 비강 점막을 통해), 피하, 경피, 위장관, 관절 내, 낭 내, 심실 내, 두개 내, 요도 내, 간 내 및 종양 내. 일 실시태양에서, 본 개시의 조성물은, 예를 들어, 인퓨전 주사 또는 볼루스 주사, 상피 또는 점막피부 내벽(mucocutaneous linings)(예를 들어, 구강 점막, 직장 점막과 장 점막 등)을 통한 흡수와 같은 모든 일반적인 경로로 투여될 수 있고, 다른 생물학적 유효성분과 함께 투여될 수도 있다. 투여는 전신적 또는 국소적일 수 있다. 일 실시태양에서, 본 개시의 조성물은 뇌실 내 주사와 척수 내 주사를 포함하는 모든 적합한 경로로 중추신경계로 도입될 수 있으며, 뇌실 내 주사는 뇌실 내 카테터, 예를 들어 Ommaya 저장고(reservoir)와 같은 저장고에 붙어 있는 카테터에 의하여 이루어질 수 있다.

[178] 일 실시태양에서, 결합체, 이를 암호화하는 핵산 전달 비히클 또는 이들을 포함하는 조성물의 최적 유효량은 실험적으로 결정할 수 있고, 질환의 유형 및 중증도, 투여의 경로, 질환 진행 및 건강, 개체의 체중 및 체면적에 따라 달라질 수 있다. 이러한 결정은 통상의 기술자의 기술 내에 포함된다.

[179] 일 실시태양에서, 결합체는, 예를 들어, 하루에 체중 kg 당 약 0.05 ng 내지 약 20 mg이 투여될 수 있다. 일 실시태양에서, 결합체의 투여량은 약 0.1 mg/kg 이상,

약 0.5 mg/kg 이상, 약 1.0 mg/kg 이상, 약 1.5 mg/kg 이상, 약 2.0 mg/kg 이상, 약 2.5 mg/kg 이상, 약 3.0 mg/kg 이상, 약 3.5 mg/kg 이상, 약 4.0 mg/kg 이상, 약 4.5 mg/kg 이상, 약 5.0 mg/kg 이상, 약 6.0 mg/kg 이상, 약 8.0 mg/kg 이상, 약 10.0 mg/kg 이상, 약 15.0 mg/kg 이상이거나, 약 20.0 mg/kg 이하, 약 17.0 mg/kg 이하, 약 14.0 mg/kg 이하, 약 11.0 mg/kg 이하, 약 9.0 mg/kg 이하, 약 7.0 mg/kg 이하, 약 5.5 mg/kg 이하, 약 5.0 mg/kg 이하, 약 4.5 mg/kg 이하, 약 4.0 mg/kg 이하, 약 3.5 mg/kg 이하, 약 3.0 mg/kg 이하, 약 2.5 mg/kg 이하, 약 2.0 mg/kg 이하, 약 1.5 mg/kg 이하, 또는 약 1.0 mg/kg 이하일 수 있다. 일 실시태양에서, 결합체의 투여량은 약 1.0 mg/kg 내지 약 10.0 mg/kg 또는 약 1.0 mg/kg 내지 약 5.0 mg/kg일 수 있다.

[180] 일 실시태양에서, 본 개시의 결합체 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 핵산 전달 비히클(예: 재조합 바이러스 벡터)의 양은 용량 당 약 10^4 내지 약 10^{14} drp의 DNase 입자 저항성(drp) 역가로 개체에 투여될 수 있다. 일 실시태양에서, 변형된 결합체 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 핵산 전달 비히클의 양은 용량 당 약 10^5 내지 약 10^{13} , 약 10^6 내지 약 10^{12} , 약 10^7 내지 약 10^{11} , 약 10^8 내지 약 10^{10} , 약 10^9 내지 약 10^{10} , 약 10^{10} 내지 약 10^{11} , 또는 약 10^{11} 내지 약 10^{12} drp로 개체에 투여될 수 있다.

[181] 일 실시태양에서, 본 개시의 결합체 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산전달 비히클을 포함하는 조성물은 단회 일일 용량으로 투여되거나, 총 일일 용량이 일일 2, 3, 또는 4회의 나누어진 투여량으로 투여될 수 있다. 일 실시태양에서, 본 개시의 결합체 단백질을 포함하는 조성물은, 주 6회, 주 5회, 주 4회, 주 3회, 주 2회, 주 1회, 격주마다 1회, 3주마다 1회, 매월 1회, 2개월마다 1회, 3개월마다 1회, 6개월마다 1회, 9개월마다 1회 또는 매년 1회 투여될 수 있다. 일 실시태양에서, 본 개시의 결합체 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 핵산 전달 비히클을 포함하는 조성물은 덜 잦은 빈도로, 예를 들어, 3개월마다 1회, 4개월마다 1회, 5개월마다 1회, 6개월마다 1회, 7개월마다 1회, 8개월마다 1회, 9개월마다 1회, 10개월마다 1회, 11개월마다 1회, 또는 매년 1회 투여될 수 있다.

[182] 진단 또는 검출

[183] 본 개시의 결합체 단백질은 리간드-수용체 결합 상호작용을 확인하기 위하여 방사성 동위원소, 형광 표지, 독소 표지, 효소 표지, 화학발광 표지 또는 핵자기 공명 조영제와 같은 검출 가능한 표지로 표지될 수 있다. 키메라 분자에 적용되는 어세이 시스템 또한 고려될 수 있다. 이러한 검출 가능한 표지는 해당 분야에 널리 알려져 있다.

[184] V. 제조 물품 및 키트

[185] 본 개시는 일 실시태양에 있어서, 본 개시의 결합체 단백질, 이를 발현하는 재조합 바이러스 벡터 또는 이를 포함하는 조성물을 적합한 포장 내에 포함하는 제조 물품 또는 키트에 관한 것일 수 있다. 일 실시태양에서, 상기 적합한 포장은 해당 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 바이알(예를 들어, 밀봉된 바이알), 용기, 앰

플, 병, 항아리, 유연한 포장(예컨대, 밀봉된 마일라 또는 플라스틱 백) 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 제조 물품은 추가적으로 멸균 및/또는 밀봉될 수 있다.

- [186] 일 실시태양에서, 키트는 상기 조성물을 본 개시에 기술된 용도로 사용하는 방법에 대한 설명서를 더 포함할 수 있다. 일 실시태양에서, 키트는 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 구성품을 더 포함할 수 있으며, 예를 들어, 기타 완충액, 희석제, 필터, 니들, 시린지, 및 본 개시에 기술된 임의의 방법을 수행하기 위한 설명서를 포함하는 패키지 인서트(package inserts; PI)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 일 실시태양에서, 키트는 (i) 본 개시에 기술된 결합체 단백질 및/또는 본 개시에 기술된 결합체 단백질을 암호화하는 재조합 바이러스 벡터, (ii) 약학적으로 허용가능한 담체, 및 (iii) 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 완충액, 희석제, 필터, 니들, 시린지, 및 투여를 수행하기 위한 설명서를 포함하는 패키지 인서트.
- [187] 이하, 실시예를 들어 본 개시의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 개시에 대한 이해를 돕기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 개시의 범주 및 범위가 하기 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [188] **실시예 1 - 발현 벡터의 제조**
- [189] 아래 실시예에서 디자인된 결합체의 코딩서열 영역(CDS, coding sequence)을 CHO 생산 세포에 적합한 형태로 핵산의 코돈 최적화(codon optimization)를 진행한 뒤, 유전자 합성을 통하여 최종 pcDNA3.1(+) 벡터(Invitrogen)에서 결합체를 제조하였다(Geneuniversal).
- [190] **실시예 2 - 변형된 융합 단백질의 디자인**
- [191] **실시예 2.1 - 표면 전하 전이(surface charge transition) 변이체의 제조 및 특성 평가**
- [192] 물성이 증가된 VEGFR 수용체 구성을 포함하는 융합 단백질을 확보하기 위해, 본 개시의 발명자들은 VEGFR1의 세포외 도메인(Extracellular domain) 전체가 포함된 구조(PDB entry. 5t89)를 주형으로 하여 단백질의 표면 전하 분포도(surface charge distribution)를 분석하고 양전하가 밀집된 부분 및 소수성 표면전하를 갖는 위치를 도출하였다.
- [193] 이를 통해 VEGFR1 도메인 D3에서 T236 내지 T247 아미노산 잔기에 해당하는 $\beta 1$ - $\beta 2$ 루프(Site 1으로 명명함), T256 내지 V262 아미노산 잔기에 해당하는 $\beta 2$ - $\beta 3$ 루프(Site 2로 명명함) 및 D299 내지 L308 아미노산 잔기에 해당하는 $\beta 5$ - $\beta 6$ 루프(Site 3로 명명함)에 존재하는 아미노산 잔기의 측쇄(side chain)가 융합 단백질의 표면으로 노출된다는 점을 확인하였다. 표면에 노출되어 있는 상기 가변 루프(flexible loop)에 위치하는 아미노산 잔기의 변이를 통하여 융합 단백질의 표면 전하 및 구조 안정화를 달성하고자 하였다. 예를 들어, 표면에 노출된 아미노산 잔기를 VEGFR2의 상동위치에 존재하는 아미노산 잔기로 치환하는 것을 시도하였다. 더불어 Site 2의 아미노산 잔기들은 리간드(VEGF 또는 PIGF)와 결합하는

측면의 단백질 표면에 노출되어 있으며, 해당 위치에서의 변이는 리간드와의 결합력 또는 표면 잔기 노출로 인한 용해도(solubility)에 영향을 미친다.

[194] 실시예 2.2. - 링커 변이체의 제조 및 특성 평가

[195] 인간 VEGF 수용체의 경우 면역글로불린 유사 도메인 D2 및 D3와의 상호작용에 의해 리간드인 VEGF 또는 PlGF와 결합하게 된다. 이러한 도메인 D2 및 도메인 D3를 이용한 융합 단백질의 경우, 리간드와 결합하기 전에는 도메인 D2 및 도메인 D3가 열린 구조를 가지다가 리간드와 결합하면서 닫힌 구조를 형성하게 된다. 도메인 D3와 다량체화 도메인의 결합 길이에 따라서 도메인 D2 및 도메인 D3의 구조체가 리간드와 결합하기에 충분한 공간을 확보하지 못하거나 또는 구조체간에 간섭이 발생할 경우 리간드에 대한 융합 단백질의 결합력이 저하되는 현상이 발생할 수 있다. 그러므로 융합 단백질에서 도메인 D3와 다량체화 도메인의 결합 길이와 결합 방식은 리간드와 결합하는 융합 단백질의 구조와 리간드에 대한 결합력에 영향을 미칠 수 있다.

[196] 따라서 본 발명자는 자연 상태의 인간 VEGF 수용체의 구조적 특성을 조사하고 확보하기 위하여, 본 개시의 변형된 융합 단백질에서 링커의 길이 및 종류를 변경하였다. 구체적으로 Gly-Ser 반복서열의 폴리펩타이드와 IgG1, IgG4, IgD에서 유래한 힌지 영역의 아미노산 서열 및 이들 힌지의 변이 서열을 포함하는 링커를 도입하였다. 이를 통해 리간드 결합시 도메인 D3와 다량체화 도메인(Fc 영역) 사이에 형성되는 루프(링커)에 형성되는 긴장도(tension)를 감소시켜 물리적 안정성을 증가시키고자 하였다.

[197] 더불어 면역글로불린의 힌지 영역으로부터 유래한 아미노산 서열의 경우, 그 자체의 특성으로 인하여 다양한 단백질 분해 효소(protease)에 대한 절단 위치(cleavage site)를 가지고 있으며(Vlasak and Ionescu. 2011. Mabs 3: pp. 253-263) 융합 단백질에 도입 후 글리코실화(aglycosylation), 예를 들어 O-글리코실화가 발생하여 올리고머화(oligomerization)가 발생할 수 있다(Song et. al. 2020. Computational and Structural Biotechnology Journal 18: pp. 3925-3935). 본 발명자는 본 개시의 변형된 융합 단백질의 체내 안정성을 개선하기 위하여 단백질 분해 효소에 의한 절단 위치, 예를 들어 과파인에 대한 절단 위치에서 아미노산 서열을 추가로 변형시키고, 글리코실화가 발생하는 Ser 또는 Thr 아미노산 잔기를 변형시키는 시도를 수행하였다. 또한 링커의 구조적 유연성을 증가시키기 위하여 Fc 힌지 영역의 코어 힌지로부터 유래한 서열(예: CPPCP)에 존재하는 시스테인을 치환하는 시도를 수행하였다. 본 개시의 일 실시태양에 따른 변형된 융합 단백질은 우수한 생산성과 우수한 물성을 나타내고 리간드에 대한 결합력에서도 우수한 특성을 나타낸다.

[198] 실시예 2.3. - 이황화결합 변이체의 제조 및 특성 평가

[199] 융합 단백질은 이종 단백질의 결합체이므로 결합 부위에서 비특이적 절단에 의한 안정성 저하가 예상된다. 도메인 D3의 말단은 루프를 형성하고 있는 부분으로 2차 구조가 결여되어 있을 수 있고, 이종 단백질인 다량체화 도메인과의 연결

이 시작되는 부위이므로 안정성이 약할 것으로 예상된다. 공유 결합인 이황화결합(disulfide bond)을 도입하여, 이중 단백질의 결합이 일어나는 부위 근처에서 도메인 간의 접합을 유도하여 단백질의 물리적 절단을 방지하고 안정성을 개선하고자 하였다.

- [200] 융합 단백질 상에서 이황화결합이 도입될 수 있는 위치를 3차 구조 기반 분석을 통하여 도출하였다. 도메인 D3 말단 영역에 인접한 가변화 루프에 위치한 잔기 중 측쇄의 방향이 링커를 향하고 있으며 측쇄 말단의 원자와 Y329 C α 원자의 거리가 6 Å 이내인 잔기를 이황화결합을 위한 변이잔기로 선정하였다. 구조 모델링 프로그램(Phyre2, Swiss model)을 통하여 융합 단백질의 3차원 구조를 확보한 후 도입부위의 인실리코(in-silico) 변이를 통하여 이황화결합이 도입된 구조 모델을 확보하였다. 이후 3차 구조 에너지 예측 프로그램(foldx in YASARA, Schymkowitz et al. 2005. Nucleic Acids Research. 33:W382-388)을 통하여 이황화결합 도입에 의한 융합 단백질의 에너지 준위 변화를 예측하였다.
- [201] 융합 단백질에서 도메인 D3 말단과 물리적으로 근접하고 이황화결합을 형성할 수 있는 위치로, 도메인 D3의 β 1- β 2 루프 상의 아미노산 잔기 또는 β 5- β 6 루프 상의 아미노산 잔기를 선정하였으며, 도메인 D3 말단의 경우 Y329를 기준으로 +2 위치에 존재하는 아미노산 잔기를 선정하였다.
- [202] 실시예 2.4. - 조합 변이체의 제조 및 특성 평가
- [203] 상기 실시예 2.1. 내지 2.3.의 우수한 특성을 나타내는 변이체의 특성을 조합하여 갖는 융합 단백질의 조합 변이체를 표 2와 같이 제조하였으며, 각 변이체가 가지는 특성은 표 1과 같다.
- [204] [표1]

단백질 코드	표면 전하 변이 위치	링커 서열	링커 서열 중 Fc 힌지 유래	이황화결합을 위한 아미노산 변이
C08 (대조군: VEGF-Grab)	-	DKTHTCPPCP	IgG1	-
C61	K241E/R244V/H246E/L258A/K300G/Q302T/K304S	CSSGDATPTSPSP	IgG1	L243C/331C
C62	K241E/R244V/H246E/L258A/K300G/Q302T/K304S	CSKVDKKVEPKSSDTPPTCPPCP	IgG1	L243C/331C

C63	K241E/R244V/H246E /L258A/K300G/Q302 T/K304S	CSGGGGSAEPKAGDAT PPTCPPCP	IgG1	L243C/331 C
C64	K241E/R244V/H246E /L258A/K300G/Q302 T/K304S	CSGGGGSGGGSGGGG SAESKYGPPCPPCP	IgG4	L243C/331 C
C65	K241E/R244V/H246E /L258A/K300G/Q302 T/K304S	CSNTGSGGEEKKKEKE KEEQEERSSDTPPTCPP CP	IgD/G1	L243C/331 C
C66	K241E/R244V/H246E /L258A/K300G/Q302 T/K304S	CGSSGGSSGEPKSDATP TCPPCP	IgG1	L243C/331 C
C67	K241E/R244V/H246E /L258A/K300G/Q302 T/K304S	CSKVDKKVEPKSSDKT YTCPPCP	IgG1	L243C/331 C
C68	K241E/R244V/H246E /L258S/K300G/Q302 T/K304S	CSKVDKKVEPKSSDTPP TCPPCP	IgG1	L243C/331 C
C69	K241E/R244V/H246E /L258D/K300G/Q302 T/K304S	CSKVDKKVEPKSSDTPP TCPPCP	IgG1	L243C/331 C
C70	K241E/R244V/H246E /L258S/K300G/Q302 T/K304S	CSGGGGSGGGSGGGG SAESKYGPPCPPCP	IgG4	L243C/331 C
C71	K241E/R244V/H246E /L258D/K300G/Q302 T/K304S	CSGGGGSGGGSGGGG SAESKYGPPCPPCP	IgG4	L243C/331 C
C72	K241E/R244V/H246E /L258S/K300G/Q302 T/K304S	CGSSGGSSGEPKSDATP TCPPCP	IgG1	L243C/331 C
C73	K241E/R244V/H246E /L258D/K300G/Q302 T/K304S	CGSSGGSSGEPKSDATP TCPPCP	IgG1	L243C/331 C

C74	K241E/R244V/H246E /L258D/K300G/Q302 T/K304S	CSSGDATPTSPSP	IgG1	L243C/331 C
C75	K241E/R244V/H246E /L258D/K300G/Q302 T/K304S	CSNTGSGGEEKKKEKE KEEQEERSSDTPPTCPP CP	IgD/G1	L243C/331 C
C94	L258A	CGSSGGSSGEPKSDATP TCPPCP	IgG1	-
C95	K300G/Q302T/K304S /K306Q	CGSSGGSSGEPKSDATP TCPPCP		-
C96	L243S/R244V/L258A	CSNTGSGGEEKKKEKE KEEQEERSCDTPPTCPP CP	IgG1	-
C97	L258A/K300G/Q302T /K304S	CSGGGSGGGSGGGG SAESKYGPCCPPCP	IgG1	-
C99	K241E/L243S/R244V/ H246E/K300G/Q302T /K304S/K306Q	CGSSGGSSGEPKSDATP TCPPCP	IgG1	-

[205] 표 1에 본 개시에 기술된 단백질들의 식별코드와 아미노산 서열 및 서열번호를 기재하였다.

[206] [표2]

단백질 코드	아미노산 서열
VEGFR1(FL T1) 서열번호 41	DLAARNILLSENN VVKICDFGLARDIYKNPDYVRKGDTRLPLK WMAPE SIFDKIYSTKSDVWSYGVLLWEIFSLGGSPYPGVQMDE DFCSRLREGMRMRAP EYSTPEIYQIMLDCWHRDPKERPRFAEL VEKLGDLLQANVQQDGKDYIPINAILTGNSGFTYSTPAFSEDF KESISAPKFNSGSSDDVRYVNAFKFMSLERIKTFEELLPNATSM FDDYQGDSTLLASPM LKRFTWTD SKPKASLKIDLRVTSKSKES GLSDVSRPSFCHSSCGHVSE GKRRFTYDHAELERKIACCSPPPD YNSVVLYSTPPI
VEGF-Grab 1(VEGFR1 야생형 단 백질을 기반 으로 VEGF	EFGRPFVEMYSEIPEI IHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLD TLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNY LTHRQTNTIIDVQISTPSPVTLRLGHTLVLNCTATTPLNTRVQMT WSYPDEKNKRASVRRRIDQSN SHANIFYSVLTIDKMQNKD KGL YTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKALEDKTHTCPPCPAPELLGGP

R1의 D2 및 2개 아미노산이 당쇄화된 D3를 포함하는 융합 단백질) 서열번호 42	SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
VEGF-Grab 3(VEGFR1을 기반으로 VEGFR1의 D2 및 3개 아미노산이 당쇄화된 D3를 포함하는 융합 단백질) 서열번호 43	EFGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLD TLIPDGKRIIWDSRKGFISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNY LTHRQTNTIIDVQISTPSPVTLRLGHTLVLNCTATTPLNTRVQMT WSYPDEKNKNASVRRRIDQNSHANIFYSVLTIDKMQNKDGL YTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKALEDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
C61 서열번호 44	EFGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLD TLIPDGKRIIWDSRKGFISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNY LTHRQTNTIIDVQISTPSPVELCVGETLVLNCTATTAPANTRVQM TWSYPDEKNKNASVRRRIDQNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKG LYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCSSGDATPTSPPPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
C62 서열번호 45	EFGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLD TLIPDGKRIIWDSRKGFISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNY LTHRQTNTIIDVQISTPSPVELCVGETLVLNCTATTAPANTRVQM TWSYPDEKNKNASVRRRIDQNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKG LYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCSKVDKKVEPKSSDTPPTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD

	DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
C63 서열번호 46	EFGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLD TLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNY LTHRQNTNIIDVQISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPANTRVQM TWSYPDEKNKNASVRRRIDQNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKG LYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCSGGGGSAEPKAGDATPPTCP PCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG
C64 서열번호 47	EFGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLD TLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNY LTHRQNTNIIDVQISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPANTRVQM TWSYPDEKNKNASVRRRIDQNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKG LYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCSGGGGSGGGGSGGGGSAES KYGPPCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG
C65 서열번호 48	EFGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLD TLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNY LTHRQNTNIIDVQISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPANTRVQM TWSYPDEKNKNASVRRRIDQNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKG LYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCSNTGSGGEEKKKEKEKEEQE ERSSDTPPTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG
C66 서열번호 49	EFGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLD TLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNY

	LTHRQNTNIIDVQISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPANTRVQM TWSYPDEKNKNASVRRRIDQNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKG LYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCGSSGGSSGEPKSDATPTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
C67 서열번호 50	EFGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLD TLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNY LTHRQNTNIIDVQISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPANTRVQM TWSYPDEKNKNASVRRRIDQNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKG LYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCSKVDKKVEPKSSDKTYTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
C68 서열번호 51	EFGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLD TLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNY LTHRQNTNIIDVQISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPSNTRVQMT WSYPDEKNKNASVRRRIDQNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKGL YTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCSKVDKKVEPKSSDTPPTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
C69 서열번호 52	EFGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLD TLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNY LTHRQNTNIIDVQISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPDNTRVQM TWSYPDEKNKNASVRRRIDQNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKG LYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCSKVDKKVEPKSSDTPPTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE

	VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
C70 서열번호 53	EFGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLD TLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNY LTHRQNTNIIDVQISTPSPVELCVGETLVNCTATTPSNTRVQMT WSYPDEKNKNASVRRRIDQNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKGL YTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCSGGGGSGGGGSGGGGSAESK YGPPCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
C71 서열번호 54	EFGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLD TLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNY LTHRQNTNIIDVQISTPSPVELCVGETLVNCTATTPDNTRVQM TWSYPDEKNKNASVRRRIDQNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKG LYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCSGGGGSGGGGSGGGGSAES KYGPPCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG
C72 서열번호 55	EFGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLD TLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNY LTHRQNTNIIDVQISTPSPVELCVGETLVNCTATTPSNTRVQMT WSYPDEKNKNASVRRRIDQNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKGL YTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCGSSGGSSGEPKSDATPTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG

	SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
C73 서열번호 56	EFGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLD TLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNY LTHRQNTNIIDVQISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPDNTRVQM TWSYPDEKNKNASVRRRIDQNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKG LYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCGSSGGSSGEPKSDATPTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
C74 서열번호 57	EFGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLD TLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNY LTHRQNTNIIDVQISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPDNTRVQM TWSYPDEKNKNASVRRRIDQNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKG LYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCSSGDATPTSPSPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
C75 서열번호 58	EFGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLD TLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNY LTHRQNTNIIDVQISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPDNTRVQM TWSYPDEKNKNASVRRRIDQNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKG LYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCSNTGSGGEEKKKEKEKEEQE ERSSDTPPTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG
C88 서열번호 59	EFGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLD TLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNY LTHRQNTNIIDVQISTPRPVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQM

	TWSPDEKNKRASVRRRIDQSNHANIFYSVLTIDKMQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKALEDKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
Fc 영역 서열번호 60	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
VEGFR1의 I g 유사 도메 인 D2 및 D3 서열번호 61	GRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQISTPRPVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEKNKRASVRRRIDQSNHANIFYSVLTIDKMQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKA
C08 (대조군: VEGF-Grab) 서열번호 62	GRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQISTPSPVTLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEKNKNASVRRRIDQSNHANIFYSVLTIDKMQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKDKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
C94 서열번호 63	GRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPDNTRVQMTWSYPDEKNKNASVRRRIDQSNHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCGSSGGSSGEPKSDATPTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN

	QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
C95 서열번호 64	GRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTL IPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLT HRQNTNIIDVQISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPDNTRVQMTW SYPDEKNKNASVRRRIDQSNHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYT CRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCGSSGGSSGEPKSDATPTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
C96 서열번호 65	GRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTL IPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLT HRQNTNIIDVQISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPDNTRVQMTW SYPDEKNKNASVRRRIDQSNHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYT CRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCSNTGSGGEEKKKEKEKEEQEERS CDTPPTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG
C97 서열번호 66	GRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTL IPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLT HRQNTNIIDVQISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPDNTRVQMTW SYPDEKNKNASVRRRIDQSNHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYT CRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCSGGGGSGGGGSGGGGSAESKYG PPCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
C99 서열번호 67	GRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTL IPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLT HRQNTNIIDVQISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPDNTRVQMTW

SYPDEKNKNASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYT CRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCGSSGGSSGEPKSDATPTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

- [207] 이하의 실시예 또는 표에 기재된 표면 전하 변이 위치 또는 이황화결합 위치는 표 2의 VEGF-Grab3의 아미노산 서열을 기준으로 변이된 위치 및 아미노산 잔기를 기재한 것이다. 상기 표 2와 같이 제조된 서로 다른 위치에서 변이가 도입된 조합 변이체의 그 물성 및 결합력을 평가하였다. VEGFR-야생형 단백질을 기초로 제조한 변이체와 야생형 단백질에 대한 물성 평가 결과를 표 3에 나타내고, 결합력 평가 결과를 표 4 내지 표 5에 나타내었다. VEGF-Grab3를 기초로 제조한 변이체의 물성 평가 결과는 표 6에 나타내고, 결합력 평가 결과는 표 7 및 표 8에 나타내었으며, 표 7은 VEGF-Grab3(파노로스바이오사이언스 제조)에 대한 상대적인 결합력 평가 결과를 나타내고 표 8은 VEGF-Grab3(삼성바이오로직스 제조)에 대한 상대적인 결합력 평가 결과를 나타낸다. VEGF-Grab3(파노로스바이오사이언스 제조)에 대한 상대적인 결합력 평가의 경우, 변이체와 동일한 조건 및 배치에서 생산한 것과 비교한 것이다.

- [208] [표3]

단백질 코드	역가 (g/L)	용출량(mg)	수율(%)	HMWS(%)	기능성 단백질 함량(%)	LMWS(%)
C65	0.185	6.9	123.1	36.1	62.9	1.1
C73	0.143	5.0	116.4	20.2	79.8	0.0

- [209] [표4]

단백질 코드	VEGF-A에 대한 결합력			VEGFR-야생형 단백질 C88 대비 VEGF-A에 대한 결합력 (증가배수)		
	KD(M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	fold(KD)	fold(kon)	fold(kdis)
C65	8.46E-11	5.16E+05	4.37E-05	0.72	0.89	0.80
C73	1.53E-13	6.52E+05	<1.0E-07	> 60.86	1.13	> 100

- [210] [표5]

단백 질 코 드	PIGF에 대한 결합력			VEGFR-야생형 단백질 C88 대비 PIGF에 대한 결합력 (증가배수)		
	KD(M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	fold(KD)	fold(kon)	fold(kdis)
C65	1.37E-10	2.41E+06	3.31E-04	1.49	1.99	0.75
C73	1.68E-10	2.22E+06	3.72E-04	1.22	1.83	0.67

[211] [표6]

단백질 코 드	역가 (g/L)	용출량(m g)	수율(%)	HMWS(%)	기능성 단 량체 함량() (%)	LMWS(%)
VEGF-Gr ab1	0.527	8.6	46.7	33.1	43.0	23.8
VEGF-Gr ab3	0.359	5.4	50.5	53.9	44.3	1.7
C61	0.537	10	62.2	10.2	89.8	0.0
C62	0.231	5.9	85.7	11.2	88.8	0.0
C63	0.505	9.6	63.4	9.5	90.5	0.0
C64	0.171	6.2	121.6	13.7	86.3	0.0
C65	0.66	8.5	42.7	9.7	90.3	0.0
C66	0.212	6.2	98.1	20.7	79.4	0.0
C67	0.437	5.8	43.9	5	95.1	0.0
C68	0.153	6.3	137.3	45	55.0	0.0
C69	0.378	5	44.4	2.6	97.4	0.0
C70	0.61	8	43.9	13.2	86.9	0.0
C71	0.698	7.1	33.8	4.6	95.4	0.0
C72	0.451	7.3	54.1	9.5	90.5	0.0
C73	0.408	7.1	58.3	3.1	96.9	0.0
C74	0.535	5.8	35.9	6.7	93.3	0.0
C75	0.295	8.2	92.2	0.4	99.6	0.0

[212] [표7]

단백 질 코 드	VEGF-A에 대한 결합력(증가배수)			PIGF에 대한 결합력(증가배수)		
	fold(KD)	fold(kon)	fold(kdis)	fold(KD)	fold(kon)	fold(kdis)
C61	1.35	0.74	1.83	1.24	0.76	1.62
C62	> 100	1.27	> 100	1.93	1.70	1.13
C63	1.54	0.70	2.21	1.38	0.89	1.56
C64	2.54	1.39	1.83	1.82	1.70	1.07
C65	2.12	0.72	2.93	1.83	0.91	2.00
C66	1.46	1.24	1.18	3.77	1.25	3.01
C67	1.95	0.94	2.06	1.03	0.96	1.07
C68	> 100	1.83	> 100	1.21	2.43	0.50
C69	> 100	1.37	> 100	0.83	1.24	0.67
C70	3.01	1.20	2.52	1.38	1.30	1.06
C71	3.06	0.99	3.10	1.43	0.82	1.75
C72	0.95	0.82	1.15	1.48	0.70	2.11
C73	> 100	1.29	> 100	2.10	0.66	3.18
C74	> 100	2.09	> 100	1.07	2.06	0.52
C75	0.27	1.38	0.20	0.88	2.07	0.42

[213] [표8]

단백 질 코 드	VEGF-A에 대한 결합력(증가배수)			PIGF에 대한 결합력(증가배수)		
	fold(KD)	fold(kon)	fold(kdis)	fold(KD)	fold(kon)	fold(kdis)
C61	< 0.01	0.94	< 0.01	1.53	1.14	1.35
C62	1.83	0.55	1.00	2.39	2.54	0.94
C63	< 0.01	0.99	< 0.01	1.71	1.32	1.30
C64	0.01	0.50	< 0.01	2.26	2.54	0.89
C65	< 0.01	0.96	< 0.01	2.26	1.36	1.66
C66	< 0.01	0.56	< 0.01	4.67	1.87	2.50
C67	< 0.01	0.73	< 0.01	1.27	1.43	0.89
C68	2.65	0.38	1.00	1.49	3.63	0.41
C69	0.42	0.51	0.21	1.03	1.86	0.56

C70	0.01	0.58	< 0.01	1.70	1.93	0.88
C71	0.01	0.70	< 0.01	1.77	1.22	1.45
C72	< 0.01	0.84	< 0.01	1.84	1.05	1.75
C73	1.87	0.54	1.00	2.60	0.99	2.64
C74	1.17	1.17	1.00	1.47	2.54	0.58
C75	< 0.01	0.77	< 0.01	1.20	2.56	0.47

[214] 표 3 내지 표 8의 결과에 따르면, 본 개시의 일 실시태양에 따른 변형된 융합 단백질은 역가 및 단백질 용출량 결과로부터 우수한 생산성을 나타내는 것을 확인할 수 있으며, 기능성 단량체 함량 결과로부터 우수한 물성을 나타내는 것을 확인할 수 있다. 또한 예를 들어, kon 등에 대한 결과로부터, 리간드에 대한 결합력에서도 우수한 특성을 나타냄을 확인할 수 있다. 이러한 결과로부터 실시예 2.1. 내지 2.3.에서 변형된 융합 단백질의 구조 디자인 시 도입한 특성들이 유효하게 나타나고 이러한 특성들이 조합되어 시너지 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[215] 실시예 3 - 결합체의 생산

[216] 상기 실시예 2에서 제조된 C61 내지 C75의 융합 단백질과 PD-L1에 결합하는 아테졸리주맙 및 A167 scFv를 결합시킨 결합체를 디자인하였다(도 1). 도 1에서 확인할 수 있듯이, 본 개시의 융합 단백질은 VEGF-A와 PIGF를 포획할 수 있는 조작된 VEGFR1 도메인 2 및 3을 포함하는 VEGF 디코이 수용체를 포함하고, 이의 N 말단 또는 C 말단에 새로운 기능성 모듈을 연결할 수 있다. 상기 본 개시의 융합 단백질의 N 말단에 항-PD-L1 scFv를 결합하여 본 개시에 따른 결합체를 제조하였다.

[217] [표9]

구성	서열
항 PD-L1 scFv (아테졸리주맙) 서열번호 39	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGL EWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFVLYSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYLYHPATFGQGTKVEI
항 PD-L1 scFv(A167 scFv) 서열번호 40	QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYPALKSRLTISRDNNSKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLCRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFGSGSGTDFTLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKR

코드명(구성 설명)	서열
H-12C08 (대조군: A167H G4SL-V EGF-Gra b) 서열번호 1	QVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVT LTCRASQSIGTNIHWFQQ KPGQSPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFLTINSVEAEDAATY YCQQSNSWPYTFGQGTKLEIKRTVGGGGSEFGRPFVEMYSEIPEIIH MTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFISN ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQISTPSPVTLL RGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEKNKNASVRRRIDQSN SH ANIFYSVLTIDKMQN KDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKALE DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
H-12C09 (대조군: A167L G4SH- V EGF-Gra b) 서열번호 2	EIVLTQSPDTLSVTPKEKVT LTCRASQSIGTNIHWFQQKPGQSPKLLI KYASESISGVPSRFSGSGSGTDFLTINSVEAEDAATYYCQQSNSWP YTFGQGTKLEIKRTVGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQL QESGPGLVKPSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEWLGVI WTGGATNYPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAVYYC VRDSNYRYDEPFTYWGQGT LVTVSSGGGGSEFGRPFVEMYSEIPEI IHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQISTPSPVT LLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEKNKNASVRRRIDQSN SHANIFYSVLTIDKMQN KDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKA LEDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP GK
H-12C18 (대조군: A167-3	QVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG

(G4S)-F c) 서열번 호 3	GGGSGGGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLTCRASQSIGTNIHWFQQ KPGQSPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSVEAEDAATY YCQQSNSWPYTFGQGTKLEIKRTVGGGGSGGGGSGGGGSDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNL GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
H-12C21 (대조군 : VEGF- Grab-3(G4S)-A1 67) 서열번 호 4	EFGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLI PDGKRRIWDSRKGFISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYTHRQ TNTIIDVQISTPSPVTLLRGHTLVNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEK NKNASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIDKMQNKDGLYTCRVRSGPS FKSVNTSVHIYDKALEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLV KPSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEWLGVIWTGGATNY NPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAVYYCVRDSNYRYD EPFTYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVL TQSPDTLSVTPKEKVTLT CRASQSIGTNIHWFQQKPGQSPKLLIKYA SESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSVEAEDAATYYCQQSNSWPYTF GQGTKLEIKRTV
H-12C70 (A167- V3-C66_ sur1) 서열번 호 5	QVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLT CRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGRPFVE MYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRRIW DSRKGFISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYTHRQTNTIIDVQ ISTPSPVTLCRGHTLVNCTATT PANTRVQMTWSYPDEKNKNASV RRRIDQSN SHANIFYSVLTIDGMTNSDQGLYTCRVRSGPSFKSVNTS VHIYDCGSSGGSSGEPKSDATPTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA

	KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
H-12C71 (A167- V1-C66_ sur1) 서열번 호 6	QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYNPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLCRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRGGGGSGGGGSDTGRPFVEMYSEIPEIIHM TEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWD SRKGFIISNA TYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQISTPSPVTLCR GHTLV LNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKNASVRRRIDQSN SH ANIFYSVLTIDGMTNSDQGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCGSS GGSSGEPKSDATPTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
H-12C72 (A167- V3-C65(Cys)_sur 1) 서열번 호 7	QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYNPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLCRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRSGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGRPFVE MYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQ ISTPSPVTLCRGHTLV LNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKNASV RRRIDQSN SHANIFYSVLTIDGMTNSDQGLYTCRVRSGPSFKSVNTS VHIYDCSNTGSGGEEKKKEKEKEEQEERSCDTPPTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
H-12C73 (A167-	QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYNPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAV

V3-C64_ sur1) 서열번 호 8	YYCVRDSNYRYDEPFTYWGGQTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLTCRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGRPFVE MYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQ ISTPSPVTLCRGHTLVLNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKNASV RRRIDQSNHANIFYSVLTIDGMTNSDQGLYTCRVRSGPSFKSVNTS VHIYDCSGGGGSGGGGSGGGGSAESKYGPPCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
H-12C74 (A167- V1-C61_ sur1) 서열번 호 9	QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYNPALKSRLTISRDNNSKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGGQTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLTCRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRGGGGSGGGGSDTGRPFVEMYSEIPEIIHM TEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNA TYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQISTPSPVTLCR GHTLVLNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKNASVRRRIDQSNSH ANIFYSVLTIDGMTNSDQGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCSSG DATPTSPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
H-12C75 (A167- V2-C66_ sur1) 서열번 호 10	QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYNPALKSRLTISRDNNSKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGGQTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLTCRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRGSAPKAGGGGSGGGGSGGGGSGRPFVE MYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQ

	ISTPSPVTLCRGHTLVLNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKNASV RRRIDQSNSHANIFYSVLTIDGMTNSDQGLYTCRVRSGPSFKSVNTS VHIYDCGSSGGSSGEPKSDATPTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
H-12C88 (A167- V3-C66) 서열번 호 11	QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYPALKSRLTISRDNNSKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLCRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGRPFVE MYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQ ISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKNASV RRRIDQSNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTS VHIYDCGSSGGSSGEPKSDATPTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
H-12C89 (A167- V1-C66) 서열번 호 12	QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYPALKSRLTISRDNNSKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLCRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRGGGGSGGGGSDTGRPFVEMYSEIPEIIHM TEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWD DSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQ ISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKNASV RRRIDQSNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTS VHIYDCGSSGGSSGEPKSDATPTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY

	TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG
H-12C90 (A167- V3-C65(Cys)) 서열번 호 13	QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYNPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGGQTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLCRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGRPFVE MYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQ ISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKNASV RRRIDQSN SHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTS VHIYDCSNTGSGGEEKKKEKEKEEQEERSCDTPPTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGDSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
H-12C91 (A167- V3-C64) 서열번 호 14	QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYNPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGGQTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLCRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGRPFVE MYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQ ISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKNASV RRRIDQSN SHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTS VHIYDCSGGGGSGGGGSGGGGSAESKYGPCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

H-12C92 (A167- V1-C61) 서열번 호 15	QVQLQESGPGGLVVKPSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLTCRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRGGGGSGGGGSDTGRPFVEMYSEIPEIIHM TEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWD SRKGFIISNA TYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQISTPSPVELCV GETLVLNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKNASVRRRIDQSN SHA NIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCSSGD ATPTSPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
H-12C93 (A167- V2-C66) 서열번 호 16	QVQLQESGPGGLVVKPSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLTCRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRGS AEPKAGGGGSGGGGSGGGGSGRPFVE MYSEIPEIIHMT EGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQ ISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKNASV RRRIDQSN SHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTS VHIYDCGSSGGSSGEPKSDATPTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
H-12C94 (A167- V3-C73) 서열번 호 17	QVQLQESGPGGLVVKPSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLTCRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGRPFVE

	MYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQ ISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPDNTRVQMTWSYPDEKNKNASV RRRIDQSNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTS VHIYDCGSSGSSGEPKSDATPTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
H-12C95 (A167- V1-C73) 서열번 호 18	QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLTCRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRGGGGSGGGGSDTGRPFVEMYSEIPEIIHM TEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNA TYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQISTPSPVELCV GETLVLNCTATTPDNTRVQMTWSYPDEKNKNASVRRRIDQSNSHA NIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCGSSG GSSGEPKSDATPTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG
H-12C96 (A167- V3-C75(Cys)) 서열번 호 19	QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLTCRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRSGGGGGSGGGGSGGGGGSGGGGSGRPFVE MYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQ ISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPDNTRVQMTWSYPDEKNKNASV RRRIDQSNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTS VHIYDCSNTGSGGEEKKKEKEKEEQEERSCDTPPTCPPCPAPELLG

	GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
H-12C97 (A167- V3-C71) 서열번 호 20	QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYNPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLTCRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGRPFVE MYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQ ISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPDNTRVQMTWSYPDEKNKNASV RRRIDQSN SHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTS VHIYDCSGGGGSGGGGSGGGGSAESKYGPPCPPCAPPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
H-12C98 (A167- V1-C74) 서열번 호 21	QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYNPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLTCRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRGGGGSGGGGSDTGRPFVEMYSEIPEIIH MTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWD SRKGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQISTPSPVELCV GETLVLNCTATTPDNTRVQMTWSYPDEKNKNASVRRRIDQSN SHA NIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDCSSGD ATPTSPSPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

H-12C99 (A167- V2-C73) 서열번 호 22	QVQLQESGPGGLVKPSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLTCRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRGS AEPKAGGGGSGGGGSGGGGSGRPFVE MYSEIPEIIHMT EGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVQ ISTPSPVELCVGETLV LNCTATTPDNTRVQMTWSYPDEKNKNASV RRRIDQSN SHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTS VHIYDCGSSGGSSGEPKSDATPTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
H-32D0 1 (A167- V2-C65) 서열번 호 23	QVQLQESGPGGLVKPSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLTCRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRGS AEPKAGGGGSGGGGSGGGGSGRPFVE MYSEIPEIIHMT EGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVQ ISTPSPVELCVGETLV LNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKNASV RRRIDQSN SHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTS VHIYDCSNTGSGGEEKKKEKEKEEQEERSSDTPPTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
H-32D0 2 (A167- V3-C65) 서열번 호 24	QVQLQESGPGGLVKPSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLTCRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSVEAEDAATYYCQQS

	NSWPYTFGQGTKLEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGRPFVE MYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQ ISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKNASV RRRIDQSNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTS VHIYDCSNTGSGGEEKKKEKEKEEQEERSSDTPPTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
H-32D0 3 (A167- V2-G4H -G4Fc) 서열번 호 25	QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLCRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRSGAEPKAGGGGSGGGGSGGGGSGRPFVE MYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQ ISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKNASV RRRIDQSNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTS VHIYDCSGGGGSGGGGSGGGGSAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSPDIA VEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
H-32D0 4 (A167- V3-G4H -G4Fc) 서열번 호 26	QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLCRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGRPFVE MYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQ ISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKNASV RRRIDQSNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTS

	VHIYDCSGGGGSGGGGSGGGGSAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
H-32D0 5 (A167- V2-C65 H-G4Fc) 서열번 호 27	QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYPALKSRLTISRDNNSKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLCRASQSIGTNIHWFQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRGSAPKAGGGGSGGGGSGGGGSGRPFVE MYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVQ ISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKNASV RRRIDQSNHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTS VHIYDCSNTGSGGEEKKKEKEKEEQEERSSDTPPTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
H-32D0 6 (A167- V3-C65 H-G4Fc) 서열번 호 28	QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYPALKSRLTISRDNNSKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLCRASQSIGTNIHWFQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRGSAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGRPFVE MYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVQ ISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKNASV RRRIDQSNHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTS VHIYDCSNTGSGGEEKKKEKEKEEQEERSSDTPPTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF

	YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
H-32D0 7 (A167- V2-C65 H-G4Fc +QL) 서열번 호 29	QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLTCRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRGS AEPKAGGGGSGGGGSGGGGSGRPFVE MYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQ ISTPSPVELCVGETLV LNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKNASV RRRIDQSNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTS VHIYDCSNTGSGGEEKKKEKEKEEQEERSSDTPPTCPPCAPEAAG GPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLGLG
H-32D0 8 (A167- V3-C65 H-G4Fc +QL) 서열번 호 30	QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLTCRASQSIGTNIHWFQQKPGQS PKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFLTINSVEAEDAATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIKRGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGRPFVE MYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQ ISTPSPVELCVGETLV LNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKNASV RRRIDQSNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTS VHIYDCSNTGSGGEEKKKEKEKEEQEERSSDTPPTCPPCAPEAAG GPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLGLG
H-32D0 9 (Ate-V 2-C65)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGL EWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AED TAVYYCARRHWPGGFDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG

서열번호 31	GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYLYHPATFGQGTKVEIKRGS AEPKAGGGGSGGGGSGGGGSGR FVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKR IIWDSRKGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIID VQISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKNA SVRRRIDQSN SHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKSV NTSVHIYDCSNTGSGGEEKKKEKEKEEQEERSSDTPPTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
H-32D10 (Ate-V3-C65) 서열번호 32	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGL EWVAVISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCARRHWPGGFDYWGQGT LTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYLYHPATFGQGTKVEIKRGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGR PFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGK RIIWDSRKGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTII DVQISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKN ASVRRRIDQSN SHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKS VNTSVHIYDCSNTGSGGEEKKKEKEKEEQEERSSDTPPTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
H-32D11 (Ate-V2-G4H-G4Fc+QL) 서열번호 33	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGL EWVAVISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCARRHWPGGFDYWGQGT LTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYLYHPATFGQGTKVEIKRGS AEPKAGGGGSGGGGSGGGGSGR FVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKR IIWDSRKGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIID

	VQISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKNA SVRRRIDQSNHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKSV NTSVHIYDCSGGGGSGGGGSGGGGSAESKYGPPCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLGLG
H-32D1 2 (Ate-V 3-G4H- G4Fc+Q L) 서열번 호 34	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGL EWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYLYHPATFGQGTKVEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGR PFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGK RIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQNTII DVQISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKN ASVRRRIDQSNHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKS VNTSVHIYDCSGGGGSGGGGSGGGGSAESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLGLG
H-32D1 3 (Ate-V 2-C65H- G4Fc+Q L) 서열번 호 35	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGL EWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYLYHPATFGQGTKVEIKRGS AEPKAGGGGSGGGGSGGGGSGR FVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKR IIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQNTIID VQISTPSPVELCVGETLVLNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKNA SVRRRIDQSNHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKSV NTSVHIYDCSNTGSGGEEKKKEKEKEEQEERSSDTPPTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV

	SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLGLG
H-32D1 4 (Ate-V 3-C65H- G4Fc+Q L) 서열번 호 36	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGL EWVAVISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYLYHPATFGQGTKVEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGR PFVEMYSEIPEIHMTEGRELVIPCRVTSPTNITVTLKKFPLDTLIPDGK RIIWDNRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQNTII DVQISTPSPVELCVGETLVNCTATTPANTRVQMTWSYPDEKNKN ASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIDGMTNSDKGLYTCRVRSGPSFKS VNTSVHIYDCSNTGSGGEEKKKEKEKEEQEERSSDTPPTCPPCAPE AAGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLGLG
H-12C18 (A167-3 (G4S)-F c) 서열번 호 37 - Full 항 체가 아 닌 scFv- Fc 결합 대조군	QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEW LGVIWTGGATNYPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAV YYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLCRASQSIGTNIHWFQQ KPGQSPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSVEAEDAATY YCQQSNSWPYTFGQGTKLEIKRTVGGGGSGGGGSGGGGSGDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNL GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
H-30D0 1 (Ate-Ig G1 Fc) 서열번 호 38 - Full 항 체가 아	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGL EWVAVISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYLYHPATFGQGTKVEIKRCPPELGGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ

닌 scFv- Fc 결합 대조군	YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG
-------------------------	--

- [218] *표 9의 구성 설명 부분에서 H 및 L은 scFv의 중쇄 및 경쇄를 나타내고; Cnn(n은 정수)는 위 표 2의 서열 명칭에 해당하고; G4S는 GGGGS 링커를 의미하고; scFv와 융합 단백질을 연결하는 링커는 V1, V2, V3이며, V1은 GGGSGGGSDT, V2는 GSAEPKAGGGSGGGSGGGGS, V3는 GSGGGSGGGSGGGSGGGGS의 서열을 가지고; C65H는 융합 단백질의 힌지 부분 중 표 2의 C65 힌지 부분을 사용한 것을 의미하고; G4H는 융합 단백질의 힌지 부분 중 IgG1 대신 IgG4를 사용한 것을 의미하고; G4Fc는 작동체 기능(effector function)을 제거한 IgG4 서열을 의미하고; QL은 FcRn 사이클을 높여 반감기를 늘린다고 알려진 FcRn과의 결합력을 높이는 변이를 도입한 것을 의미하고; Cys는 융합 단백질에서 Cys 변이를 도입한 것(C65의 경우 494, C75의 경우 493 위치 Ser → Cys)을 의미하고; sur1은 일부 표면 전하 변이의 역돌연변이를 진행한 변이체를 의미함.
- [219] 디자인된 결합체 생산에 사용된 ExpiCHO™ 세포(Gibco)는 계대 수(passage number) 10 이상 20이하에서 일시발현에 사용되었다. ExpiCHO™ 세포의 계대 배양은 3일 또는 4일 간격으로 수행하였으며, 3일 배양 시 0.3×10^6 세포/ml의 밀도로 계대배양하였고 4일 배양 시 0.15×10^6 세포/ml의 밀도로 계대배양하였다. 세포 밀도(cell density)와 생존율(viability)은 트리판 블루 염색법을 통해 CountessII(Invitrogen)기기를 이용하여 측정하였다. 결합체의 일시발현은 제조사(Gibco)에서 제공하는 Expifectamine™(Gibco)을 이용한 Max Titer protocol 배양 방법을 이용하였다. 트랜스펙션 하루 전날 ExpiCHO™ 세포를 3.5×10^6 세포/ml의 밀도로 계대배양하고, 다음날 세포의 밀도와 생존율을 다시 측정하여 세포 밀도가 7.0×10^6 세포/ml 이상이고 세포 생존율이 95% 이상인지 확인한 후 세포 밀도가 6.0×10^6 세포/ml이 되도록 ExpiCHO™ 발현 배지를 첨가하여 희석하였다. 25 ml의 세포배양액을 125 ml 에rlenmeyer(Erlenmeyer) 플라스크에 분주한 후 트랜스펙션 혼합물 제조 전까지 37 °C 인큐베이터에서 세포를 보관하였다. 20 µg에 해당하는 플라스미드 유전자를 1 ml의 OptiPro™ SFM 배지와 잘 섞어주었고, 80 µl의 Expifectamine™ CHO 시약을 920 µl의 OptiPro™ SFM 배지와 잘 섞어주었다. Expifectamine-OptiPro™ SFM 혼합물을 미리 준비한 플라스미드-OptiPro™ SFM에 첨가하여 잘 섞어준 후 상온에서 3분간 방치하였다. 혼합액을 미리 분주해 둔 세포배양액에 천천히 첨가한 후 37 °C, 8% CO₂, 130 rpm의 조건으로 설정된 인큐베이터에서 배양하였다. 트랜스펙션 후 18-22시간이 될 때, Expifectamine™ CHO 인핸서 150 µl와 ExpiCHO™ 피드 4 ml을 배양 중인 플라스크에 첨가하고 32 °C, 5% CO₂, 130 rpm의 조건으로 설정된 인큐베이터에서 세포 배양을 지속

하였다. 보다 많은 양의 결합체를 생산 시에는 200 ml의 세포배양액을 1 l 에를렌 마이어(Erlenmeyer) 플라스크에 분주한 후 트랜스펙션 혼합물 제조 전까지 37 °C 인큐베이터에서 세포를 보관하였다. 160 µg에 해당하는 플라스미드 유전자를 8 ml의 OptiPro™ SFM 배지와 잘 섞어주었고, 640 µl의 Expifectamine™ CHO 시약을 7.4 ml의 OptiPro™ SFM 배지와 잘 섞어주었다. Expifectamine-OptiPro™ SFM 혼합물을 미리 준비한 플라스미드-OptiPro™ SFM에 첨가하여 잘 섞어준 후 상온에서 3분간 방치하였다. 혼합액을 미리 분주해 둔 세포배양액에 천천히 첨가한 후 37 °C 8% CO₂, 130 rpm의 조건으로 설정된 인큐베이터에서 배양하였다. 트랜스펙션 후 18-22시간이 될 때, Expifectamine™ CHO 인헨서 1200 µl와 Expicho™ 피드 32 ml를 배양 중인 플라스크에 첨가하고 32 °C 5% CO₂, 130 rpm의 조건으로 설정된 인큐베이터에서 세포 배양을 지속하였다. 트랜스펙션 후 2일차와 5일차에 세포 밀도와 생존율을 측정하였으며, 5일차에 Cedex(Roche) 장비를 이용하여 최종 역가(titer)를 측정한 후 3000 x g로 30분간 원심분리하여 단백질이 포함된 세포 배양액을 회수하였다. 회수된 상층액을 0.22 µm 폴리에테르설폰 필터(Polyethersulfone (PES) filter)에 여과한 후 단기 보관 시 4 °C, 장기 보관 시 -80 °C에 보관하였다.

- [220] 실시예 4 - 결합체 단백질의 정제 (Protein A 친화 크로마토그래피 및 크기배제 크로마토그래피)
- [221] 배양액으로부터의 단백질 정제는 Amsphere a3 컬럼이 장착된 AKTA avant25 기기를 이용하여 친화 크로마토그래피로 수행되었다. 0.22 µm 바틀탑 필터로 여과한 배양액을 분당 13.33 ml의 속도로 흘려주었으며, 비특이적 결합을 제거하기 위해 일차적으로 50 mM Na-Pi, 0.5 M NaCl, pH 7.0 조건의 버퍼로, 이차적으로 50 mM Sodium acetate, pH 4.5 조건의 버퍼로 각각 8배 컬럼 부피만큼 흘려주었다. 비특이적 결합 제거 후 100 mM 글리신, pH 3.0 조건의 용출 버퍼를 10배 컬럼 부피만큼 흘려주어 결합되어 있는 단백질들을 용출시켰으며, 용출액은 50 ml 튜브에 수집하였다. 수집된 단백질들에 1 M Trizma® 염기 (pH 11.0) 용액을 수집된 단백질 부피의 1%만큼 첨가하여 단백질 용액을 중화시켜준 후 0.22 µm 시린지 필터를 이용하여 침전물을 제거해 주었다. 중화 전 및 중화 후의 시료를 각각 UV 측정법으로 정량하고 SEC-HPLC를 통하여 순도를 분석하였다. 1차적으로 정제한 물질은 90% 이상의 순도를 만족시키기 위해 추가적으로 Superdex200pg 26/600 컬럼을 이용한 크기배제 크로마토그래피를 수행하였다. 먼저 중화한 시료를 Millipore™ 스테드셀 250 mL 농축기와 Millipore™ Discs 50 kDa를 이용하여 13 mL 이하의 부피로 농축하였다. 농축한 시료는 PBS, pH 6.5로 완충되어 있는 컬럼에 주입하였으며, 용출되는 단백질은 튜브에 수집하여 SEC-HPLC를 통하여 순도를 확인한 후 농축을 수행하였다. 최종 농축된 단백질을 UV 정량법을 통해 분석하고, SEC-HPLC 및 SDS-PAGE 분석법을 통하여 순도를 확인하였다.

[222] 위 과정을 통해 각 결합체의 물성으로 역가, 용출량, 수율(step yield), 고분자량 중(high molecular weight species; HMWS)의 함량, 저분자량 중(low molecular weight species; LMWS)의 함량, 및 기능성 단량체 함량 중 하나 이상을 측정하였다. 여기서 역가는 세포 배양액 회수 시 측정된 배양액 중 존재하는 Fc-융합단백질의 농도를 의미하며, 용출량은 일차 정제 단계인 친화 크로마토그래피 수행 후 회수된 단백질의 총량을 의미하며, 수율은 일차 정제 후 회수된 총 단백질의 양을 배양액 중 측정된 단백질 총량으로 나눈 값으로 일차 정제 시 컬럼에 의해 회수된 단백질의 회수율을 의미한다. 고분자량 중(HMWS)은 예측된 단백질의 기능 유닛보다 큰 질량을 갖는 단백질종이며, 저분자량 중(LMWS)은 예측된 단백질의 기능 유닛보다 작은 질량을 갖는 단백질종으로 두 경우 모두 비정상적인 단백질 접힘(protein folding)을 갖는 분획을 의미한다. 기능성 단량체는 정상적인 단백질의 구조 및 기능을 갖는 분획을 의미한다. 도 2a 내지 도 2o에 항 PD-L1 scFv와 변형된 융합 단백질(변형된 VEGFR1-D2-D3)의 결합체의 생산성과 순도를 나타내었다. 즉, 본 개시의 변형된 융합 단백질을 기반으로 한 결합체인 H-12C94 내지 H-12C99가 변형되지 않은 융합 단백질로 제조한 대조군 결합체(H-12C08; A167 scFv-HG4SL-VEGF-Grab)에 비교하여 동일 조건으로 정제한 결과 순도가 높아지는 것을 확인할 수 있었다(순도 약 20% vs. 약 90%). 변형되지 않은 융합 단백질로 제조한 결합체에서는 고분자량 응집체(aggregate)가 많이 발생하는 것을 확인하였고(도 2c 및 2d), 변형된 융합 단백질로 제조된 결합체들의 경우 해당 응집체가 현저히 주는 것을 확인할 수 있었다(도 2e 내지 2n). 이는 본 개시의 결합체가 변형된 융합 단백질을 포함하는 것을 통해 물성이 개선되었음을 의미하고, 이는 곧 약물 제조에 있어 수율 향상을 의미한다.

[223] 실시예 5 - 결합체의 동결/해동 안정성 시험

[224] 생산한 결합체의 동결/해동에 따른 안정성을 확인하였다. 결합체 단백질 시료를 -70°C 초저온 냉동고에서 한 시간 정치시켜 얼린 후 상온에 꺼내어 30 분 정치시켜 녹여주는 과정을 5회 반복하여 수행하였으며, 각 회수마다 단백질 시료 50 μ l를 샘플링하여 SEC-HPLC 분석을 통해 순도 변화를 확인하였다(표 10: 2회차(2R); 표 11: 3회차(3R)).

[225] [표10]

단백질 코드	대조군	1차 F/T	2차 F/T	3차 F/T	4차 F/T	5차 F/T
H-32D01	92.01	86.54	83.92	83.65	83.11	83.48
H-32D02	94.78	89.64	88.36	87.87	87.59	87.56
H-32D09	96.17	96.46	95.09	94.52	94.22	93.81
H-32D10	96.29	95.05	94.01	93.62	93.4	92.94

[226] [표11]

단백질 코드	대조군	1차 F/T	2차 F/T	3차 F/T	4차 F/T	5차 F/T
H-32D02	94.03	93.73	93.24	93.06	92.96	92.84
H-32D04	93.57	92.78	92.28	92	91.81	91.79
H-32D06	93.24	92.6	92.45	92.18	92.04	91.98
H-32D08	95.89	94.9	94.5	94.05	93.91	93.82

- [227] 상기 표 10은 2회차 실험(2R)에서 동결/해동 안정성 결과를 확인한 것이고, 표 11은 3회차 실험(3R)에서 동결/해동 안정성 결과를 확인한 것이다. 표 10에서 나타나듯이 결합체의 동결/해동 안정성의 경우 링커 V2 및 V3에 따라 큰 차이는 없으나, V3가 약간 높은 안정성을 보였다. scFv의 경우 아테줄리주맵이 A167 대비 상대적으로 높은 안정성을 보였으나, 링커와 마찬가지로 유의미한 차이로 보기는 어려웠다. 전체적으로 링커 및 scFv와 관계없이 본 개시의 변형된 융합 단백질을 기반으로 한 결합체들에서 높은 동결/해동 안정성을 관찰하였다.
- [228] 이는 A167 scFv 및 V3 링커를 차용한 Fc 변형체들의 비교 결과에서도 나타났다. 표 11에서 보여지듯이 모든 변형체에서 다섯번의 동결/해동에도 순도가 2% 이내의 감소로 확인되었다.
- [229] 상기 결과들은 최적의 제형이 아닌 일반적인 버퍼에서 시험한 결과이며, 이는 향후 제형 연구를 통해 동결/해동 안정성을 향상시킬 수 있는 가능성을 말해준다.
- [230] 종합적으로 본 개시의 변형된 융합 단백질을 기반으로 한 결합체들의 경우 높은 동결/해동 안정성을 보여주었다.
- [231] 실시예 6 - 크기배제-고성능 액체 크로마토그래피 기법을 이용한 결합체 단백질의 순도 분석
- [232] Waters Arc HPLC 시스템에 Tosoh제 TSKgel G3000SWXL SEC 컬럼을 연결시켜 분석하였으며, 이동상은 PBS, pH 7.4를 이용하였다. 이동상을 분당 0.5 mL로 흘러주면서 30 ug 단백질 시료를 컬럼에 주입시키고 30 분 동안 280 nm로 검출하여 시료의 고분자량 종(high molecular weight species; HMWS)의 함량, 저분자량 종(low molecular weight species; LMWS)의 함량, 및 기능성 단량체 함량 중 하나 이상을 측정하였다.
- [233] 실시예 7 - VEGF-A, PIGF, PD-L1에 대한 결합력 평가
- [234] VEGF-A 및 PIGF 리간드에 대한 각 단백질의 결합 친화도를 이전에 문헌 (Kamat et al, 2017)에 따라 Octet®RED96c (ForteBIO) 기기를 이용하여 측정하였다.
- [235] 먼저 결합력 측정 전 AHC 센서를 1x KB 버퍼(ForteBIO)에 담가 안정화시켰다. 분석하고자 하는 물질인 결합체 단백질 PB203을 10 nM 농도로 센서에 결합시킨 후, 1X KB 버퍼로 세척하여 결합 후 남아있는 단백질을 제거하였다. 이후 VEGF-

A, PlGF, PD-L1을 각각 8 농도 구간으로 흘려주어 결합력을 측정하였다. 결합력 측정 결과 중 신뢰성 확보를 위한 지표, Full X^2 (3 이하)와 Full R^2 (0.95 이상)가 범위에 들어오는 3개 이상의 농도를 선정하여 Global fit로 설정한 뒤, 결합력(KD) 및 K_{on} , K_{dis} 값을 산출하였다. 그 결과를 도 4a 내지 도 4k에 나타내었다. 해당 도 4a 내지 4k에서 확인할 수 있듯이, 본 개시의 결합체는, 변형되지 않은 융합 단백질로 제조한 결합체와 비교해 VEGF-A 및 PlGF에 대한 결합속도가 증가한 것을 확인하였으며, scFv의 PD-L1 결합력은 감소 없이 잘 유지하고 있음을 확인할 수 있다.

[236] 다만, 본 개시의 변형된 융합 단백질과 특정 항원을 표적화하는 scFv와의 결합체를 제조함에 있어서, 융합 단백질이 가지고 있는 VEGF 및/또는 PlGF에의 결합력과 결합되는 scFv의 특정 항원에의 결합력이 서로 방해받지 않고 기능할 수 있을지는 미리 예측할 수 없다. 본 개시에서는 변형된 융합 단백질이 가지는 VEGF 및 PlGF에 대한 결합력과 항-PD-L1 scFv가 가지는 PD-L1에의 결합력이 서로 길항하지 않고 유지되는 것을 확인하였으며, 이는 쉽게 예상할 수 없는 효과이다.

[237] 실시예 8 - 혈중 모사 환경에서 안정성 평가

[238] PB203의 생체내 안정성을 간접적으로 분석하기 위해, 래트에서 채취한 공혈청과의 반응을 통하여 특정시간 이후 잔존하는 단백질 변이체의 농도를 ELISA 방법을 통해 측정하였다. 시험 수행 시간 기준 168시간, 144시간, 72시간, 48시간, 24시간, 4시간, 2시간, 0시간 PB203을 래트 공혈청과 혼합하여 최종농도 10 μ g/ml이 되도록 제조한 후, 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터에 넣어 보관하였다. 시험 수행 전날 4 $^{\circ}$ C에서의 오버나잇 배양(Overnight incubation)을 통해 플레이트에 인간 VEGF-A(R&D systems)를 코팅시키고, 이를 0.1% PBS-T 세척 버퍼로 세척하여 충분히 결합되지 않은 인간 VEGF-A를 제거한 후, 5% 탈지유(Skim milk)가 포함된 0.1% PBS-T를 처리하여 실온에서 1 시간의 블로킹(blocking) 과정을 수행하였다. 시간 대별로 준비했던 단백질-혈청 혼합물을 블로킹 버퍼에 50배로 희석한 뒤, 플레이트의 웰(well)에 100 μ l씩 넣어 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후 웰에 담긴 반응액을 모두 제거하고 세척 버퍼를 이용하여 플레이트를 세척하였다. 검출 항체(detection antibody)인 HRP 고트 항-인간 IgG Fc 교차-흡수 2차 항체(HRP Goat anti-human IgG Fc Cross-Absorbed Secondary antibody)(Invitrogen)를 실온에서 1 시간 반응시킨 후, 세척을 거쳐 반응하지 않은 검출 항체를 제거한 후, 3, 3', 5, 5'-테트라메틸벤지딘(TMB) 용액(Sigma)을 100 μ l씩 첨가하여 실온에서 10 분간 반응시킨 뒤 정지 용액(Sigma)을 가하여 반응을 멈추었다. 플레이트 리더(Plate reader)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 0시간의 흡광도를 기준으로 잔존량(%)을 산출하여 상대적으로 비교하였다. 그 결과를 도 3a 내지 도 3c에 나타내었다.

[239] 도 3a 및 도 3b에서 확인할 수 있듯이, 본 개시의 변형된 융합 단백질을 기반으로 한 결합체인 H-12C94 내지 H-12C99가 변형되지 않은 융합 단백질로 제조한 결합체(H-12C08)에 비교하여 혈중 모사 환경에서 현저히 우수한 혈청 내 안정성

을 보인다는 것을 확인할 수 있다. 또한, H-32D01, H-32D02, H-32D09 및 H-32D10에서 확인할 수 있듯이 V2 링커 또는 V3 링커의 사용 및 scFv의 종류와 관계없이 해당 혈중 모사 환경에서 현저히 우수한 혈청 내 안정성을 보인다는 것을 확인하였다(도 3c).

[240] 실시예 9 - 등전점 분석

[241] icIEF(image capillary isoelectric focusing, 이미지 모세관 등전점 시스템) 분석법을 통하여 PB203 단백질의 등전점을 분석하였다. 2 mg/ml의 농도로 희석된 변형된 융합 단백질 40 µl와 미리 준비된 160 µl의 마스터 혼합 용액(Master mix solution)(SERVALYT™ + 저 pI 마커(3.38)(ProteinSimple) + 고 pI 마커(9.5)(ProteinSimple) + 1 % 메틸 셀룰로오스(ProteinSimple) + DW + 500 mM 아르기닌(Sigma) + 200 mM 이미노디아세트산(Sigma) + 10 M 요소(Sigma))을 섞은 뒤 원심분리를 통하여 침전물 및 기포를 제거한 후 기기(Maurice, ProteinSimple) 내 각 웰에 삽입하였다. 양극 용액(Catholyte solution) 및 음극 용액(Anolyte solution)을 각각 2 ml씩 카트리지의 OH- 및 H+ 위치에 담고 카트리지를 기기에 장착하였다. 이 후 기기 사용 설명에 따라 등전점을 측정하였다. 측정된 pI가 단일 피크가 아닌, 특정 범위의 다중 피크로 나타나기 때문에 산성(pI 6~7), 중성(pI 7~8), 염기성(pI 8 <)의 세 구간으로 나누어 단백질의 pI 분포도를 정의하였으며, 가장 높은 비율의 분포도를 갖는 구간을 비교하였다. 그 결과를 도 7a 내지 도 7r에 나타내었다.

[242] 도 7g, 도 7m 및 도 7r에서 확인할 수 있듯이, 본 개시의 변형된 융합 단백질을 기반으로 한 결합체인 H-12C94 내지 H-12C99가 변형되지 않은 융합 단백질로 제조한 대조군 결합체(H-12C08; A167+VEGF-Grab)에 비교하여 산성/중성의 비율이 높아지는 것을 확인할 수 있다. 또한, 도 7m 및 7r에서 알 수 있듯이, 링커 V2 또는 V3, scFv의 종류, Fc의 변이 유무와 관계없이 변형되지 않은 융합 단백질 및 이들로 제조된 결합체와 비교하여 산성/중성의 비율이 높아지는 것을 확인할 수 있다. 이는 본 개시의 결합체가 체내 환경에서 음극을 띄는 경향성이 높아지는 것을 의미하여, 생체 내 순환 시 비특이적 결합 가능성이 낮아지는 것을 시사한다.

[243] 실시예 10 - 열안정성 분석

[244] PB203을 1x PBS 버퍼를 이용하여 최종 2 mg/ml의 농도로 희석하여 준비하였다. 12.5 µl의 단백질에 2.5 µl의 8X 프로틴 썬더 시프트™ 다이(Protein Thermal Shift™ dye)(Life Technologies)와 5.0 µl 프로틴 썬더 시프트™ 버퍼(Life Technologies)를 첨가하여 최종 반응액을 제조하였다. 준비된 20 µl의 반응액을 PCR 튜브에 담고 퀀트스튜디오™ 리얼-타임 PCR(QuantStudio™ Real-time PCR) 장비의 트레이에 정렬한 뒤 Tm 값을 측정하였다. 모든 분석은 4회 반복실험으로 수행되었다. 그 결과는 도 8a 내지 도 8d에 나타내었다.

- [245] 구체적으로, 도 8b를 통해 링커 V2 및 V3에 대한 열안정성 영향은 크지 않으며, 대신 사용한 scFv에 따라 바뀔 수 있음을 확인하였다. 또한, 도 8d를 통해 Fc 변이와 열안정성 역시 무관함을 확인하였다.
- [246] 생체 주입 시 온도는 40도씨 이내이며, 단백질 의약품의 경우 상온 및 생체 온도를 가정하여 25도씨 및 40도씨 보관 안정성을 평가한다. 상기 기준에서 본 개시의 변형된 융합 단백질을 기반으로 한 결합체들은 전체적으로 60도씨 이상의 높은 열안정성을 보여줌을 확인하였다.
- [247] 이는 본 개시의 변형된 융합 단백질을 기반으로 한 결합체들이 약물로 개발하기 적합한 물리화학적 특성을 갖고 있음을 보여주고 있다.
- [248] 실시예 11 - VEGF-A 억제능 분석
- [249] VEGF-A에 대한 억제능을 정량적으로 분석하기 위해, VEGFR-2(KDR)의 발현 및 VEGF-A/VEGFR-2 상호작용에 따른 루시퍼라제 리포터 시스템이 도입된 유전자 조작 세포주(KDR/NFAT-RE HEK293, Promega)를 사용하였다. 1.6×10^6 세포/ml 밀도의 세포 25 μ l를 96 웰 플레이트에 분주한 후, 25 μ l의 VEGF-A 용액(33.3 ng/ml 농도) 및 각기 다른 농도로 희석해 둔 25 μ l의 PB203을 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 6 시간 동안 반응시켰다. 이후 플레이트를 실온에 15분 동안 식힌 다음, 75 μ l의 Bio-Glo 시약(Promega, 루시퍼라제 검정 버퍼 + 기질 혼합물)를 첨가하였다. 10분 동안 빛이 차단된 상태에서 반응시킨 후 플레이트 리더기를 이용하여 발광을 측정하였다. GraphPad Prism을 통해 분석하여 각 물질에 대한 IC₅₀ 값을 산출하였다.
- [250] 도 6c 내지 도 6l 및 도 6n에서 확인할 수 있듯이, 본 개시의 변형된 융합 단백질을 기반으로 한 결합체들은 링커 및 scFv의 종류와 관계 없이, 결합 전 변형된 융합 단백질과 유사 정도의 세포 수준 VEGF-A 신호 전달 억제능을 가짐을 확인하였다. 또한 해당 억제능은 변형되지 않은 융합 단백질인 VEGF-Grab(PB101)과 비교하여 우수함을 확인하였다.
- [251] 실시예 12 - PD-1/PD-L1 신호 억제능 분석
- [252] PD-L1에 대한 억제능을 정량적으로 분석하기 위해, PD-1과 PD-L1의 발현 및 PD-1/PD-L1 상호작용에 따른 루시퍼라제 리포터 시스템이 도입된 유전자 조작 세포주 (Jurkat PD-1/U2OS PD-L1, Eurofins Discovery)를 사용하였다. 1×10^5 세포/ml 밀도의 U2OS PD-L1 세포 40 μ l를 96 웰 플레이트에 분주한 후, 20 μ l의 PB203 희석 용액 및 대조 물질들을 첨가한 뒤 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 1시간 동안 반응시켰다. 2.4×10^5 세포/ml 밀도의 Jurkat PD-1 세포 40 μ l를 96 웰 플레이트에 추가로 분주한 후 2시간동안 실온에서 반응시켰다. 이후 플레이트에 10 μ l의 Detection reagent 1을 첨가한 뒤 빛을 피해 15분간 실온에서 반응시켰다. 다음 40 μ l의 Detection reagent 2를 추가하여 빛을 피해 3시간동안 실온에서 반응시켰다. 최종적으로 플레이트 리더기를 이용하여 발광을 측정하였다. GraphPad Prism을 통해 분석하여 각 물질에 대한 IC₅₀ 값을 산출하였다.

- [253] 항 PD-L1 scFv와 변형된 융합 단백질(변형된 VEGFR1-D2-D3)의 결합체의 VEGF-A와 PD-L1에 대한 억제 효과는 도 6a 내지 도 6e에 나타내었다.
- [254] 도 6i 내지 도 6n 및 도 6o에서 확인할 수 있듯이, 본 개시의 변형된 융합 단백질을 기반으로 한 결합체들(H-32D01, H-32D02, H-32D04, H-32D06, H-32D08, H-32D09, H-32D10 등)은 링커 및 scFv의 종류와 관계 없이, 결합 전 항 PD-1 항체와 유사한 정도의 세포 수준 PD-L1 신호 전달 억제능을 가짐을 확인하였다.
- [255] 이는 본 개시의 변형된 융합 단백질을 기반으로 한 결합체들이 복잡해진 구조에도 불구하고, 구조적 설계를 통해 서로에 대한 간섭없이 각 기능들을 유지하고 있음을 보여준다.
- [256] 실시예 13 - VEGF-A, PIGF, PD-L1 리간드의 동시 결합능에 대한 평가
- [257] VEGF-A, PIGF, PD-L1 리간드에서 2종 이상이 결합되었을 때, 결합 순서에 따른 결합친화도를 평가하기 위해 Octet®RED96e (ForteBIO) 기기를 이용하였다.
- [258] 먼저 결합력 측정 전 AHC 센서를 1x KB 버퍼(ForteBIO)에 담가 안정화시켰다. 분석하고자 하는 물질인 PB203 단백질을 100 nM 농도로 센서에 결합시킨 후, 1X KB 버퍼로 세척하여 결합 후 남아있는 단백질을 제거하였다. 이후 VEGF-A, PIGF, PD-L1을 30nM (고농도)로 결합시킨 후 이전 결합 단백질과 다른 종류 (예: VEGF-A → PD-L1, PIGF → PD-L1, PD-L1 → VEGF-A, PD-L1 → PIGF)를 이전 단백질이 포함된 (30nM) 상태에서 8 농도 구간(30, 15, 7.5, 3.75, 1.875, 0.937, 0.468, 0nM)으로 결합시켜 그 신호를 측정하였다. 결합력 측정 결과 중 신뢰성 확보를 위한 지표, Full X²(3 이하)와 Full R²(0.95 이상)가 범위에 들어오는 4개 이상의 농도 구간을 확인하여 이들에 대한 Global fit를 통해 결합력 및 기타 지표들을 산출하였다. 그 결과로서 항 PD-L1 scFv와 변형된 VEGFR1-D2-D3 융합 단백질의 결합체의 타겟에 대한 동시 결합 친화력은 도 5a 내지 도 5f에 나타났다. 항원의 동시 결합 친화력을 측정한 결과, 항원 종류를 달리한 경우에도 거의 차이없이 유지되는 것을 확인할 수 있다. 구체적으로, 도 5a 및 도 5b에서 보여지듯이, 본 개시의 변형된 융합 단백질을 기반으로 한 결합체가 VEGF-A 및 PIGF 중 어떤 리간드와 결합한 상태임과 관계 없이 PD-L1에 대한 결합력이 유사하게 유지됨을 확인하였다. 또한 도 5c 내지 도 5f에서 확인할 수 있듯이, 본 개시의 변형된 융합 단백질을 기반으로 한 결합체는 표적하는 리간드들의 결합 순서나 결합 종류와 관계없이 단일 리간드와 결합할 때 수준의 결합력을 잘 유지하는 것을 보여주고 있다. 이는 본 개시의 변형된 융합 단백질을 기반으로 한 결합체들이 복잡해진 구조에도 불구하고, 구조적 설계를 통해 서로에 대한 간섭없이 각 기능들을 유지하고 있음을 보여준다.
- [259] 실시예 14 - SD rat에서의 단회 정맥 투여를 통한 약물 동태 평가
- [260] 7주령 수컷 SD rat을 1주 순화 후 시험에 이용하였으며 PB203 약물을 3mpk 농도로 단 회 정맥 투여하였다. 경정맥을 통해 시간 별 채혈 (0, 0.083, 2, 8, 24, 48, 96, 120, 168, 336시간)한 뒤 혈장 분리하였다.

[261] 시험 수행 전날 4 °C에서의 오버나잇 배양(Overnight incubation)을 통해 플레이트에 인간 PD-L1(R&D systems)를 코팅시키고, 이를 0.1% PBS-T 세척 버퍼로 세척하여 충분히 결합되지 않은 인간 PD-L1을 제거한 후, 5% 탈지유(Skim milk)가 포함된 0.1% PBS-T를 처리하여 실온에서 1 시간의 블로킹(blocking) 과정을 수행하였다. 위 준비된 혈장 샘플을 블로킹 버퍼에 20배로 희석한 뒤, 플레이트의 웰(well)에 100 µl씩 넣어 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후 웰에 담긴 반응액을 모두 제거하고 세척 버퍼를 이용하여 플레이트를 세척하였다. 검출 항체(detection antibody) 인 HRP 고트 항-인간 IgG Fc 교차-흡수 2차 항체(HRP Goat anti-human IgG Fc Cross-Absorbed Secondary antibody)(Invitrogen)를 실온에서 1 시간 반응시킨 후, 세척을 거쳐 반응하지 않은 검출 항체를 제거한 후, 3, 3', 5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB) 용액(Sigma)을 100 µl씩 첨가하여 실온에서 10 분간 반응시킨 뒤 정지 용액(Sigma)을 가하여 반응을 멈추었다. 플레이트 리더(Plate reader)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 정량 표준물질은 PB203 물질로 62.5 내지 0.48의 농도로 연속 희석법을 이용하여 제조하였으며 측정된 흡광도(OD450)를 기준으로 표준 곡선을 그려 산출된 방정식으로 혈장 내 PB203 농도를 역산하여 정량 평가하였다. 최종적으로 시간 별 농도 결과를 이용하여 PK Parameter를 산출하였다. 먼저, scFv에 따른 약물 동태 양상을 검증하기 위해, V3 링커를 공통으로 하고, 각각 A167 또는 아테졸리주맙 scFv가 결합된 H-32D02 및 H-32D10를 평가하였다. 도 9a에서와 같이, A167 결합체가 보다 우수한 체내 약물 동태 양상을 보였고, 이에 대한 Fc 변이체를 제작하였다. A167 결합체에 대한 자연형 Fc 포함 4종의 Fc 변이체를 제조하여 평가하였으며, 도 9b에서 확인할 수 있듯이, H-32D04, H-32D06 및 H-32D08 결합체가 H-32D02 결합체에 비교해 우수한 체내 약물 동태 양상을 나타내었다. 상기 3개 결합체 간의 체내 약물 동태 양상은 비슷한 수준을 보여주었다.

[262] 실시예 15 - 마우스 모델에서의 항암 효능 시험

[263] 유전자 변형 마우스 B6/JGpt-Cd274tm1(hCD274)/Gpt 모델에 유전자 변형 세포주인 MC-38-hPD-L1를 피하 이식하고 종양의 크기가 약 100mm³에 도달하였을 때 군 분리하였다. 이후 PB203 후보물질과 대조군 약물을 10mpk 용량으로 일주일에 세 번 복강 투여하였으며 3주간 종양 크기 및 무게를 측정하였다. 본 시험은 동물실험윤리규정을 준수하여 수행되었다. 그 결과는 도 10에 나타내었다. 도 10에서와 같이, 본 개시의 결합체들 중 Fc 자연형 및 ADCC/CDC 활성화 억제형 Fc가 기존 사용화 항체인 티센트릭 대비 약 10% 이상의 우수한 종양성장억제능(TGI, tumor growth inhibition)을 보였으며, 다른 2개의 Fc 변이형도 높은 수준의 종양성장억제능을 보였다. 특히 H-32D04의 경우, 약 40%의 개체에서 완전관해(complete regression)이 관찰되었으며, 이는 완전관해가 아예 관찰되지 않은 사용화 항체 티센트릭 대비하여 우수한 결과이다.

[264] 이상의 설명으로부터, 본 개시가 속하는 기술분야의 통상의 기술자는 본 개시의 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시

될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 개시의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 개시의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

- [청구항 1] VEGFR1(vascular endothelial growth factor receptor1) 세포외 도메인, 링커 및 다량체화 도메인을 포함하는 융합 단백질에 프로그래밍된 세포사 단백질 리간드 1(PD-L1) 표적화 scFv를 포함하는 결합체이고, 상기 융합 단백질의 N-말단에 PD-L1 표적화 scFv가 융합되는 것을 특징으로 하는 결합체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 VEGFR1 세포외 도메인, 링커 및 다량체화 도메인을 포함하고,
상기 VEGFR1 세포외 도메인은 VEGFR1의 면역글로불린(Ig) 유사 도메인 D2 및 Ig 유사 도메인 D3을 포함하며, 링커가 Ig 유사 도메인 D3와 다량체화 도메인 사이에 존재하고,
아래 특성 (a) 내지 특성 (c) 중 하나 이상을 가지는 변형된 융합 단백질인 것인, 결합체:
(a) 도메인 D3의 β 1- β 2 루프 상에서 K241E, L243S, R244V, 및 H246E 중 하나 이상의 아미노산 치환, 도메인 D3의 β 2- β 3 루프 상에서 L258A, L258S, 또는 L258D의 아미노산 치환, 및 도메인 D3의 β 5- β 6 루프 상에서 K300G, Q302T, 및 K304S 중 하나 이상의 아미노산 치환된 것이고, 여기서 도메인 D3의 β 1- β 2 루프는 서열번호 41을 포함하는 VEGFR 1의 아미노산 서열의 T236 내지 T247 아미노산 잔기를 포함하고, β 2- β 3 루프는 VEGFR 1의 아미노산 서열의 T256 내지 V262 아미노산 잔기를 포함하고, β 5- β 6 루프는 VEGFR 1의 아미노산 서열의 D299 내지 L308 아미노산 잔기를 포함함;
(b) 링커가 약 14개 내지 약 35개의 아미노산 길이를 가지는 것임; 및
(c) 융합 단백질 내에 이황화결합이 존재하고, 도메인 D3의 β 1- β 2 루프 상의 아미노산 잔기 중 L243 및 도메인 D3의 Y329를 기준으로 -2, -1, 0, +1, +2, 및 +3 위치에 존재하는 아미노산 잔기 중 하나가 시스테인으로 치환되는 것임.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 융합 단백질의 특성 (a)는,
도메인 D3의 β 1- β 2 루프 상에서 K241E, L243S, R244V, 및 H246E 아미노산 치환; 도메인 D3의 β 2- β 3 루프 상에서 L258A, L258S, 또는 L258D 아미노산 치환; 및 도메인 D3의 β 5- β 6 루프 상에서 K300G, Q302T, 및 K304S 아미노산 치환을 포함하는 것인, 결합체.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 변형된 융합 단백질은 도메인 D2의 N 말단이 아미노산 서열 EF로 시작하는 것인, 결합체.
- [청구항 5] 제2항에 있어서, 상기 변형된 융합 단백질의 특성 (b)에서, 링커가 글리신-세린(GS) 반복 서열을 포함하고, 상기 GS 반복 서열은 글리신(G) 및 세린(S)으로 이루어진 2 내지 35개 길이의 아미노산 서열인 것인, 결합체.

- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 GS 반복 서열에 포함된 하나 이상의 글리신(G)이 시스테인(C)으로 치환된 것인, 결합체.
- [청구항 7] 제2항에 있어서, 상기 변형된 융합 단백질의 특성 (b)에서, 면역글로불린으로부터 유래한 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 힌지 영역의 아미노산 서열은 변형될 수 있는 것인, 결합체.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 면역글로불린으로부터 유래한 힌지 영역은 인간 IgD, 및/또는 IgG로부터 유래한 것인, 결합체.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 변형된 융합 단백질의 특성 (b)에서, 면역글로불린으로부터 유래한 힌지 영역에 존재하는 과파인 인식 부위 또는 글리코실화 부위에서 아미노산 변이를 가지는 것인, 결합체.
- [청구항 10] 제2항에 있어서, 상기 변형된 융합 단백질의 특성 (b)에서, 링커가 (i) CS, CSSG, CS(GGGGS), CS(GGGGS)₃, C(GSSG)₂, GS, GSSG, (GSSG)₂, GGGGS, (GGGGS)₄, GS(GGGGS) 및 GS(GGGGS)₃ 로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 및 (ii) 인간 IgG1, IgG4 또는 IgD/G1으로 이루어진 군으로부터 선택된 면역글로불린으로부터 유래한 힌지 영역을 N 말단에서 C 말단 방향으로 순서대로 포함하고, 상기 힌지 영역의 아미노산 서열은 변형될 수 있는 것인, 결합체.
- [청구항 11] 제2항에 있어서, 상기 변형된 융합 단백질의 특성 (b)에서, 상기 링커가 CSSGDATPTSPSP, CSKVDKKVEPKSSDTPPTCPPCP, CSGGGGSAEPKAGDATPPTCPPCP, CSGGGGSGGGGSGGGGSAESKYGPPCPPCP, CSNTGSGGEEKKKEKEKEEQEERSSDTPPTCPPCP, CSNTGSGGEEKKKEKEKEEQEERSCDTPPTCPPCP, CGSSGSSGEPKSDATPTCPPCP, 및 CSKVDKKVEPKSSDKTYTCPPCP 로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열인 것인, 결합체.
- [청구항 12] 제2항에 있어서, 상기 변형된 융합 단백질은 (a) 도메인 D3의 β 1- β 2 루프 상에서 K241E, L243S, R244V, 및 H246E 아미노산 치환, 도메인 D3의 β 2- β 3 루프 상에서 L258A, L258S, 또는 L258D 아미노산 치환, 및 도메인 D3의 β 5- β 6 루프 상에서 K300G, Q302T, 및 K304S 아미노산 치환을 포함하고; (b) 링커가 CSSGDATPTSPSP, CSKVDKKVEPKSSDTPPTCPPCP, CSGGGGSAEPKAGDATPPTCPPCP, CSGGGGSGGGGSGGGGSAESKYGPPCPPCP, CSNTGSGGEEKKKEKEKEEQEERSSDTPPTCPPCP, CSNTGSGGEEKKKEKEKEEQEERSCDTPPTCPPCP, CGSSGSSGEPKSDATPTCPPCP, 및 CSKVDKKVEPKSSDKTYTCPPCP 로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열이고; (c) L243 및 도메인 D3의 Y329를 기준으로 +2 위치에 존재하는 아미노산 잔기가 시스테인으로 치환된 것인, 결합체.

- [청구항 13] 제2항에 있어서, 상기 변형된 융합 단백질은 서열번호 44 내지 58 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 것인, 결합체.
- [청구항 14] 제2항에 있어서, 상기 다량체화 도메인이 (a) 면역글로불린의 Fc 부위; (b) IgG1 또는 IgG4의 CH3 부위; (c) IgG1 또는 IgG4의 CH2 및 CH3 부위; (d) 서열번호 59의 아미노산 서열과 적어도 85% 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린의 Fc 부위; 또는 (e) 서열번호 60의 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린의 Fc 부위인 것인, 결합체.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 다량체화 도메인이 서열번호 60의 아미노산 서열로 이루어진 IgG1 Fc 부위를 포함하는 것인, 결합체.
- [청구항 16] 제2항에 있어서, 상기 다량체화 도메인이 서열번호 60에 대해
 i) T20Q 아미노산 치환, D126E 아미노산 치환, L128M 아미노산 치환, M198L 아미노산 치환 및 K217 아미노산 결실 중 하나 이상을 가지거나,
 ii) L4A 아미노산 치환, L5A 아미노산 치환, H38Q 아미노산 치환, K44Q 아미노산 치환, Y66F 아미노산 치환, A97G 아미노산 치환, A100S 아미노산 치환, P101S 아미노산 치환, R125Q 아미노산 치환, D126E 아미노산 치환, L128M 아미노산 치환, K179R 아미노산 치환, Q189E 아미노산 치환, P215L 아미노산 치환 및 K217 아미노산 결실 중 하나 이상을 가지는 것인, 결합체.
- [청구항 17] 제2항에 있어서, 상기 변형된 융합 단백질은 이량체 또는 다량체 형태인, 결합체.
- [청구항 18] 제1항에 있어서, 상기 PD-L1 표적화 scFv는 아테졸리주맙 scFv 또는 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 항 PD-L1 scFv인 것인, 결합체.
- [청구항 19] 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 결합체를 유효성분으로서 포함하는, 만성 감염, 조직 동종이식편, 자가면역 질환, 염증성 질환, 신생물 형성 질환, 암, 혈관신생 관련 질환 또는 안질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.
- [청구항 20] 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 결합체를 암호화하는 핵산 분자.
- [청구항 21] 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 결합체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 숙주 세포.
- [청구항 22] 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 결합체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터.
- [청구항 23] 제22항에 있어서, 재조합 바이러스 벡터인, 벡터.
- [청구항 24] 제23항의 재조합 바이러스 벡터를 포함하는, 바이러스 벡터를 대상체에 전달하기 위한 약학적 조성물이며, 여기서 상기 재조합 바이러스 벡터에 의해 암호화된 융합 단백질이 대상체 내에서 발현되며, 자가면역 질환, 염증성 질환, 신생물 형성 질환, 암, 혈관신생 관련 질환 또는 안질환의 예방 또는 치료를 위한 것인, 약학적 조성물.

- [청구항 25] 제24항에 있어서, 상기 재조합 바이러스 벡터는 재조합 아데노 관련 바이러스 벡터인, 약학적 조성물.
- [청구항 26] 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 결합체 및/또는 제23항의 재조합 바이러스 벡터를 필요로 하는 대상체에 투여하여, 만성 감염, 조직 동종이식편, 자가면역 질환, 염증성 질환, 신생물 형성 질환, 암, 혈관신생 관련 질환 또는 안질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 예방 또는 치료하는 방법.
- [청구항 27] 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 결합체 및/또는 제23항의 재조합 바이러스 벡터의 만성 감염, 조직 동종이식편, 자가면역 질환, 염증성 질환, 신생물 형성 질환, 암, 혈관신생 관련 질환 또는 안질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 예방 또는 치료에 사용하기 위한 용도.