명세서

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

기술분야

[1] 본 발명은 IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 이량체 및 면역관문 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] IL-2(Interleukin 2)는 T 세포 성장 인자(T-cell growth factors, TCGF)로도 불리며, 림프구 생성, 생존 및 항상성에서 중심 역할을 하는 구형의 당단백질이다. IL-2의 단백질 크기는 15.5 kDa 내지 16 kDa이며, 133개 아미노산으로 이루어져 있다. IL-2는 개별적 3개의 서브유닛으로 구성된 IL-2 수용체(IL-2 receptor)에 결합함으로써 각종 면역 작용을 매개한다.

[3] 또한, IL-2는 활성화된 T 세포 중 특히, CD4+ 헬퍼 T 세포(helper T cell)에 의해 주로 합성된다. IL-2는 T 세포의 증식 및 분화를 자극하고, 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte, CTL)의 생성, 말초혈 림프구의 세포독성 세포 및 림포카인-활성화 살해 세포(lymphokine activated killer cell, LAK cell)로의 분화를 유도한다.

[4] 한편, CD80은 B7-1로 알려져 있으며, 리간드와 결합하여 공동자극 반응(costimulatory responses) 및 공동억제 반응(coinhibitory responses)을 전달하여 면역 조절에 관여하는 막 단백질(membrane-bound proteins) 중 B7 패밀리의 하나이다. CD80은 T 세포, B 세포, 수지상세포 및 단핵구(monocyte)의 표면에 발현하는 막관통 단백질이다. CD80은 CD28, CTLA-4(CD152) 및 PD-L1(programmed cell death ligand 1)에 결합하는 것으로 알려져 있다. CD80, CD86, CTLA-4 및 CD28은 공동자극-공동억제 시스템에 관여한다. 예를 들어, T 세포의 활성을 조절하고, 증식, 분화 및 생존에 관여한다.

[5] 또한, 최근 키트루다(Keytruda®)와 같은 면역관문 억제제가 각광을 받고 있다. 면역관문 억제제는 우리 몸의 면역계를 활성화 시켜 암 세포를 공격하도록 도움을 주는 항암제이다. 현재까지 암 치료는 암세포의 특징인 빠르게 분열하는 세포를 죽이는데 초점을 맞추었기 때문에, 암세포뿐만 아니라 정상 세포 중 빠르게 분열하는 세포에도 작용하여 부작용이 나타났다. 그러나, 면역항암제는 암 환자의 면역체계를 활용해 암세포에 영향을 주므로 기존 항암제의 전형적인 부작용이 거의 없다고 알려져 있다. 키트루다와 같은 항 PD-1 항체는 T 세포의 특정 수용체(PD-1)에 결합하여 암세포가 활동성 T 세포의 감시체계를 피하는 경로를 차단하여, 인체 내 T 세포가 암세포를 공격할 수 있게 하는 면역 재활성을 통하여 항암효과를 나타내게 된다(KR10-2018-0030580A).

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 이에, 본 발명자들은 안전하고 효과적인 항암제를 개발하기 위해 연구한 결과, IL-2 단백질 또는 이의 변이체와 CD80 단백질 또는 이의 단편을 한 분자 내에 포함하는 신규한 융합단백질 이량체와 면역관문 억제제가 뛰어난 항암 효과를 나타낸다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

[7] 상기 목적 달성을 위해, 본 발명의 일 측면은, IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 이량체 및 면역관문 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[8] IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 이량체는 IL-2에 의해 면역세포를 활성화시킬 수 있다. 뿐만 아니라, 면역관문 억제제와 병용 투여할 경우, 시너지 효과가 나타남을 확인하였다. 따라서, 상기 IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 이량체 및 면역관문 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학 조성물은 암 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[9] 도 1은 융합단백질 이량체의 일 실시예를 도식화한 것이다.

[10] 도 2는 융합단백질 이량체가 림프절에서 나타내는 작용 기작을 도식화한 것이다.

[11] 도 3은 융합단백질 이량체가 종양미세환경에서 나타내는 작용 기작을 도식화한 것이다.

[12] 도 4는 융합단백질의 구조를 도식화한 것이다. 이때, GI101 및 mGI101은 융합단백질의 일 실시예이며, GI101C1, GI101C2 및 mGI101C1은 융합단백질의 활성을 비교하기 위한 비교예이다.

[13] 도 5는 융합단백질의 다양한 구체예를 나타낸 것이다. 인간 유래의 단백질과 마우스 유래의 단백질을 조합하여 융합단백질을 제조할 수 있으며, Fc 이외에도 다양한 링커를 통해 CD80 단백질과 IL-2 단백질이 결합될 수 있다.

[14] 도 6은 수득한 융합단백질 이량체(GI101)를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

[15] 도 7은 흡광도에 따른 융합단백질(GI101)의 함량을 나타낸 것이다.

[16] 도 8은 수득한 융합단백질 이량체(GI101)를 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로 분석한 것이다.

[17] 도 9는 수득한 mGI101 융합단백질 이량체를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

[18] 도 10은 수득한 GI101C1 융합단백질 이량체를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

[19] 도 11은 수득한 GI101C2 융합단백질 이량체를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

[20] 도 12는 수득한 mGI101C1 융합단백질 이량체를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

[21] 도 13은 수득한 GI102-M45 융합단백질 이량체를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

[22] 도 14는 수득한 GI102-M61 융합단백질 이량체를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

[23] 도 15는 수득한 GI102-M72 융합단백질 이량체를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

[24] 도 16은 hCTLA4와 GI101간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.

[25] 도 17은 hPD-L1과 GI101간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.

[26] 도 18은 hPD-L1과 hPD-1간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.

[27] 도 19는 mCTLA4와 mGI101간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.

[28] 도 20은 mPD-L1과 mGI101간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.

[29] 도 21은 GI101(hCD80-Fc-hIL-2v)과 CTLA-4의 결합력을 확인한 것이다. GI101(hCD80-Fc-hIL-2v)은 CTLA-4에 대해 높은 결합력을 가짐을 확인하였다.

[30] 도 22는 GI101과 IL-2Rα 또는 IL-2Rβ간의 결합 친화성을 확인한 것이다.

[31] 도 23은 GI101과 IL-2Rα간의 결합 친화성을 확인한 것이다.

[32] 도 24는 GI101과 IL-2Rβ간의 결합 친화성을 확인한 것이다.

[33] 도 25는 IL-2Rα와 GI102-M45간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.

[34] 도 26은 IL-2Rα와 GI102-M61간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.

[35] 도 27은 IL-2Rα와 GI102-M72간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.

[36] 도 28은 IL-2Rβ와 GI102-M45간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.

[37] 도 29는 IL-2Rβ와 GI102-M61간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.

[38] 도 30은 IL-2Rβ와 GI102-M72간의 결합 친화성을 나타낸 것이다.

[39] 도 31 및 도 32는 GI101, GI101C1, GI101C2 또는 IL-2를 농도 별로 세포에 처리하고 배양하였을 때의 세포에서 분비하는 IFN-γ 양을 측정한 것이다.

[40] 도 33은 GI101, GI101C1, GI101C2 및 IL-2(Proleukin)가 CD8+ T 세포의 증식에 미치는 영향을 확인한 것이다.

[41] 도 34는 GI101이 effector T 세포에 작용하는 기전을 도식화한 것이다.

[42] 도 35는 GI101 및 GI102가 CD8+ T 세포와 CD4+ T 세포의 증식에 미치는 영향을 확인한 것이다. 이때, (A)는 CD8+ T 세포와 CD4+ T 세포의 비율을 나타내며, (B)는 CD8+ T 세포의 증식능력을 나타내고, (C)는 CD4+/FoxP3+ Treg 세포의 비율을 나타낸다.

[43] 도 36 및 도 37은 GI101 및 GI101w가 CD8+ T 세포와 NK 세포의 증식에 미치는 영향을 확인한 것이다.

[44] 도 38 및 도 39는 GI101이 effector T 세포에 미치는 영향을 확인한 것이다.

[45] 도 40은 mGI101 및 mGI102-M61이 마우스의 면역세포에 미치는 영향을 확인한 것이다.

[46] 도 41 및 도 42는 GI101이 PD-L1 및 CTLA-4가 발현되는 암세포에 의한 T 세포 활성 억제에 미치는 영향을 확인한 것이다.

[47] 도 43은 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서 mGI101의 용량에 따른 종양 억제 효과를 확인한 것이다.

[48] 도 44는 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서 mGI101의 투여에 따른

마우스 생존율을 분석한 것이다.

[49] 도 45는 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서의 GI101의 종양 억제 효과를 확인한 것이다.

[50] 도 46은 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에 hIgG4, 항 PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 CD8+ T 세포, IFN-γ T 세포, CD4+ T 세포 및 Treg 세포를 FACS로 분석한 것이다.

[51] 도 47은 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에 hIgG4, 항 PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 CD8+ T 세포, IFN-γ T 세포, CD4+ T 세포 및 Treg 세포를 FACS로 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

[52] 도 48은 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에 hIgG4, 항 PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 대식세포를 FACS로 분석한 것이다.

[53] 도 49는 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에 hIgG4, 항 PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 대식세포를 FACS로 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

[54] 도 50은 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에 hIgG4, 항 PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 수지상세포를 FACS로 분석한 것이다.

[55] 도 51은 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에 hIgG4, 항 PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 수지상세포를 FACS로 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

[56] 도 52는 마우스 유래 폐암세포 식립 마우스에서의 GI101의 종양 억제 효과를 확인한 것이다.

[57] 도 53은 마우스 유래 폐암세포 식립 마우스에 hIgG4, 항 PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 CD8+ T 세포, IFN-γ T 세포, CD4+ T 세포 및 Treg 세포를 FACS로 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

[58] 도 54는 마우스 유래 폐암세포 식립 마우스에 hIgG4, 항 PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 대식세포를 FACS로 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

[59] 도 55는 마우스 유래 폐암세포 식립 마우스에 hIgG4, 항 PD-1 항체 또는 GI101을 처리한 후, 암 조직 내 수지상세포를 FACS로 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

[60] 도 56은 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서의 mGI102-M61의 종양 억제 효과를 확인한 것이다.

[61] 도 57은 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서 mGI102-M61 투여에 따른 마우스의 생존율을 분석한 것이다.

[62] 도 58은 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서의 mGI101의 종양 억제 효과를 확인한 것이다.

[63] 도 59는 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서의 mGI101의 종양 억제율을 나타낸 것이다.

[64] 도 60은 인간 유래 유방암세포 식립 마우스에서 GI101과 키트루다 병용시 종양 성장 그래프를 나타낸 것이다. 대조군(hIgG4)에 비하여 GI101과 키트루다 단독 처리군의 종양 성장이 저해되었다. 대조군에 비해 GI101과 키트루다 병용 처리군의 종양 성장이 저해되었다. GI101과 키투르다 단독 처리군에 비해 GI-101과 키트루다 병용 처리군의 종양 성장이 저해되었다.

[65] 도 61은 인간 유래 유방암세포 식립 마우스에서 GI-101과 키트루다 병용시 종양 성장 억제율을 나타낸 것이다. IgG4 처리군은 종양성장 억제율 30% 이상 2마리, 50% 이상 1마리, 80% 이상 1마리였다. GI101 처리군은 종양성장 억제율 30% 이상 5마리, 50% 이상 5마리, 80% 이상 2마리였다. 키트루다 처리군은 종양성장 억제율 30% 이상 7마리, 50% 이상 5마리, 80% 이상 3마리였다. GI101과 키트루다 병용 처리군은 종양성장 억제율 30% 이상 8마리, 50% 이상 8마리, 80% 이상 6마리였다.

[66] 도 62는 인간 유래 유방암세포 식립 마우스에서 GI101과 키트루다 병용시 각 처리군의 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.

[67] 도 63은 인간 유래 유방암세포 식립 마우스에서 hIgG4 처리군의 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.

[68] 도 64는 인간 유래 유방암세포 식립 마우스에서 GI101 처리군의 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.

[69] 도 65는 인간 유래 유방암세포 식립 마우스에서 키트루다 처리군의 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.

[70] 도 66은 인간 유래 유방암세포 식립 마우스에서 GI101과 키트루다 병용 처리군의 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.

[71] 도 67은 설치류 유래 대장암세포 식립 마우스에서 mGI101과 항 PD-1 항체 병용 투여시 종양 성장 그래프를 나타낸 것이다.

[72] 도 68은 설치류 유래 대장암세포 식립 마우스에서 mGI101과 항 PD-1 항체 병용 투여시 종양 성장 억제율을 나타낸 것이다.

[73] 도 69는 설치류 유래 대장암세포 식립 마우스에서 mGI101과 항 PD-1 항체 병용 투여시 각 처리군의 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.

[74] 도 70은 설치류 유래 대장암세포 식립 마우스에서 hIgG4 처리군의 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.

[75] 도 71은 설치류 유래 대장암세포 식립 마우스에서 mGI101 처리군의 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.

[76] 도 72는 설치류 유래 대장암세포 식립 마우스에서 항 PD-1 항체 처리군의 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.

[77] 도 73은 설치류 유래 대장암세포 식립 마우스에서 mGI101과 항 PD-1 항체 병용 처리군의 개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.

[78] 도 74는 설치류 유래 대장암세포 식립 마우스에서 mGI101과 항 PD-1 항체 병용 처리군 중 완전 관해를 보인 실험동물에 설치류 유래 대장암세포를 재주입한 후

개별 실험동물의 종양 성장 정도를 나타낸 것이다.

[79] 도 75는 설치류 유래 대장암세포 식립 마우스에서 mGI101과 항 PD-L1 항체 병용 투여시 종양 성장 그래프를 나타낸 것이다.

[80] 도 76은 설치류 유래 대장암세포 식립 마우스에서 mGI101과 항 TIGIT 항체 병용 투여시 종양 성장 그래프를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[81] 본 발명의 일 측면은, IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 이량체 및 면역관문 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[82] **면역관문 억제제**

[83] 본 명세서에서 사용하는 용어, "면역관문(immune checkpoint)"은 자기-관용을 유지하고 손상을 야기하는 과도한 면역 반응으로부터 조직을 보호하는 세포내 신호전달 체계를 말한다. 면역관문 단백질은 면역 관문을 조절하는 세포막 단백질로서 면역세포의 분화, 증식, 활성을 억제할 수 있다. 구체적으로, 면역관문 단백질은 활성화된 T 세포에서 발현되어, T 세포의 증식, 사이토카인 분비 및 세포독성을 감소시키고, T 세포의 과도한 활성을 억제하는 기능을 가진다. 일부 면역관문은 종양세포가 면역 회피를 초래하는 주요 메커니즘 중 하나로 알려져 있다. 따라서, "면역관문 억제제(immune checkpoint inhibitor)"는 면역관문 단백질을 표적으로 하여 면역관문을 저해하거나 차단함으로써 T 세포 활성화를 증가시켜 항 종양 면역을 강화하여 항암 효과를 나타낸다. 면역관문 억제제는 일반적인 세포 독성 항암제보다 구토나 탈모와 같은 부작용이 적고, 치료 효과가 크다는 장점 이외에도 기억능이 우수한 면역반응 체계를 이용하기 때문에 약물 투여를 중단한 후에도 치료효과가 오랫동안 지속되는 것으로 알려져 있다.

[84] 구체적으로, 면역관문 억제제는 CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, B7-H4, HVEM(Herpesvirus entry mediator), BTLA, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR 또는 TIGIT을 타겟으로 할 수 있다.

[85] 구체적으로, 상기 면역관문 억제제는 항 CTLA-4 항체, 항 PD-1 항체, 항 PD-L1 항체, 항 PD-L2 항체, 항 B7-H4 항체, 항 HVEM 항체, 항 BTLA 항체, 항 TIM3 항체, 항 GAL9 항체, 항 LAG3 항체, 항 VISTA 항체, 항 KIR 항체 및 항 TIGIT 항체 일 수 있으나, 이에 제한 되는 것은 아니다.

[86] 본 명세서에서 사용하는 용어, "CTLA-4(cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4)"는 CD152로 지칭되며, 활성화된 T 세포의 막표면에 발현된다. 항원제시세포의 CD80(B7-1) 및 CD86(B7-2)과 결합하여 T 세포의 활성을 억제한다. CTLA-4 억제제는 이필리무맙(여보이®) 및 트레멜리무맙일 수 있다.

[87] 본 명세서에서 사용하는 용어, "PD-1(programmed cell death protein 1)"은 CD279로 지칭되며, 활성화된 T 세포의 표면에 발현되는 단백질이다. 암세포

표면에 있는 단백질인 PD-L1(B7-H1) 및 PD-L2(B7-DC)과 반응하여 TCR(T cell receptor) 및 CD28로 매개된 T-세포 활성, 성장 인자 및 사이토카인 생성을 억제하여 음성 신호전달을 유도한다. PD-1 억제제는 예를 들어, 펨브롤리주맙(키트루다®), MK-3475, 니볼루맙(옵디보®), 세미플리맙(립타요®), JTX-4014, 스파르탈리주맙, 캄렐리주맙, 신틸리맙, 티슬레리주맙, 토리팔리맙, 도스탈리맙, INCMGA00012, AMP-224, 및 AMP-514이다.

[88] 본 명세서에서 사용하는 용어, "PD-L1(Programmed death-ligand 1)"은 CD274, B7-H1으로 지칭되며, 암세포의 표면이나 조혈세포에 있는 단백질이다. 암 표면에 있는 PD-L1은 T 세포 표면에 있는 PD-1과 결합할 수 있다. 상기 PD-L1 억제제는 예를 들어, 아테졸리주맙, 아벨루맙(바벤시오®), 더발루맙(임핀지®), KN035, CK-301, AUNP12, CA-170 및 BMS-986189일 수 있다.

[89] 본 명세서에서 사용하는 용어, "B7-H4"는 VTCN1(V-set domain-containing T-cell activation inhibitor 1)으로 지칭되며, 항원제시세포의 막표면에 발현된다. T 세포의 CD28 단백질과 결합하여 T 세포의 활성, 성장 및 사이토카인 생성을 억제하여 T 세포 매개의 면역 반응을 음성적으로 조절한다.

[90] 본 명세서에서 사용하는 용어, "HVEM(herpesvirus entry mediator)"는 CD270으로 지칭되며, 종양괴사인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 14(tumor necrosis factor receptor superfamily member 14, TNFRSF14)라고도 알려져 있다. T 세포를 포함한 다양한 면역세포의 막표면에 발현되고, 다양한 파트너 단백질과 결합하여 염증 및 면역 반응을 조절한다. T 세포의 BTLA(B and T lymphocyte attenuator, CD272) 또는 CD160와 결합하면 T 세포의 면역 활성을 저해한다. 반면, TNFSF14(LIGHT)와 결합하면 수지상세포의 성숙, T 세포 증식 및 사이토카인 생성을 유도하여 염증 및 면역 반응을 활성화시킨다.

[91] 본 명세서에서 사용하는 용어, "TIM3(T cell membrane protein 3)"는 hepatitis A virus cellular receptor 2 (HAVCR2)라고도 지칭되며, 다양한 면역 세포에서 발현된다. 수용성 단백질인 GAL9(galectin 9)과 결합하여 활성화되면 세포내 칼슘 유입이 증가하여 T 세포의 세포사가 유도되는데, 이는 결과적으로 면역 관용을 야기한다. 또한, TIM3는 GAL9과 함께 세포 표면 단백질인 CEACAM1(cell adhesion molecule 1)과 결합하여 T 세포의 면역 활성을 억제하며, 수용성 단백질인 HMGB1(high mobility group protein 1) 또는 PTdSer(phospatidyl serine)과 결합하여 면역 활성을 억제한다. TIM3 억제제는 LY3321367, MBG453 및 TSR-022일 수 있다.

[92] 본 명세서에서 사용하는 용어, "LAG3(lymphocyte activation gene 3)"는 CD223으로 지칭되며, MHC(major histocompatibility complex) class II와 결합하여 T 세포의 증식, 활성을 억제한다. LAG3 억제제는 IMP321, 릴라트리맙 및 GSK2831781일 수 있다.

[93] 본 명세서에서 사용하는 용어, "VISTA(V-domain Ig suppressor of T cell activation)"는 B7 패밀리에 속하며(B7-H5), 다양한 면역 세포에서 발현되어 T

세포의 증식, 활성 및 사이토카인 생산을 억제한다. VISTA 억제제는 JNJ-63723283일 수 있다.

[94] 본 명세서에서 사용하는 용어, "KIR(killer cell immunoglobulin-like receptor)"은 NK 세포와 T 세포에서 발현되는 막 단백질이며, 유전적 다양성과 상동성을 가지는 패밀리 단백질이다. 그 중 KIR2DL1, KIR2DL2/L3, KIR3DL1 및 KIR3DL2는 MHC class I과 결합하여 NK 세포의 세포 면역 활성을 억제할 수 있다.

[95] 본 명세서에서 사용하는 용어, "TIGIT(T cell immunoglobulin and ITIM domain)"는 NK 세포와 T 세포의 표면에 발현되는 막 단백질로, CD155, CD112 및 CD113과 결합하여 면역 활성을 억제한다.

[96] **IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 및 이의 이량체**

[97] 본 명세서에서 사용하는 용어, "IL-2" 또는 "인터루킨-2"는 달리 언급되지 않는 한, 포유동물, 예를 들어, 영장류(예, 인간) 및 설치류(예, 마우스 및 래트)를 포함하여 임의의 척추동물 공급원으로부터 수득한 임의의 야생형 IL-2를 의미한다. 상기 IL-2는 동물 세포에서 수득된 것일 수도 있으나, IL-2를 생산할 수 있는 재조합 세포로부터 수득된 것도 포함한다. 또한, 상기 IL-2는 야생형 IL-2 또는 이의 변이체일 수 있다.

[98] 본 명세서에서는 IL-2 또는 이의 변이체를 총칭하여 "IL-2 단백질" 혹은 "IL-2 폴리펩티드"의 용어로 표현하기도 한다. IL-2, IL-2 단백질, IL-2 폴리펩티드, 및 IL-2 변이체는 예를 들어 IL-2 수용체(receptor)에 특이적으로 결합한다. 이 특이적인 결합은 당업자에게 알려진 방법을 통해 확인할 수 있다.

[99] 상기 IL-2의 일 구체예는 서열번호 35 또는 서열번호 36의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, 이때, 상기 IL-2는 성숙된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 성숙된 IL-2는 신호서열을 포함하지 않는 것일 수 있으며, 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 이때, 상기 IL-2는 야생형 IL-2의 N-말단 또는 C-말단의 일부가 결실된(truncated) 단편을 포함하는 개념으로 이용될 수 있다.

[100] 또한, 상기 IL-2의 단편은 서열번호 35 또는 서열번호 36의 아미노산 서열을 가지는 단백질의 N 말단으로부터 연속적으로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개의 아미노산이 결실된 형태일 수 있다. 또한 상기 IL-2의 단편은 서열번호 35 또는 서열번호 36의 아미노산 서열을 가지는 단백질의 C 말단으로부터 연속적으로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개의 아미노산이 결실된 형태일 수 있다.

[101] 본 명세서에서 사용하는 용어, "IL-2 변이체"는 전장(full-length) IL-2 또는 상술한 IL-2의 단편의 아미노산 일부가 치환된 형태를 의미한다. 즉, IL-2 변이체는 야생형 IL-2 또는 이의 단편과 다른 아미노산 서열을 가질 수 있다.

그러나, 상기 IL-2 변이체는 야생형 IL-2와 동등하거나 유사한 활성을 가질 수 있다. 여기에서, "IL-2 활성"은 예를 들어 IL-2 수용체에 특이적으로 결합하는 것을 의미할 수 있으며, 이 특이적 결합은 당업자에게 알려진 방법을 통해 측정할 수 있다.

[102] 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 야생형 IL-2의 아미노산 일부가 치환된 것일 수 있다. 아미노산 치환에 의한 IL-2 변이체의 일 구체예로는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째, 45번째, 61번째 및 72번째 아미노산 중 적어도 하나가 치환된 것일 수 있다.

[103] 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째, 45번째, 61번째 또는 72번째 아미노산 중 적어도 어느 하나가 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다. 뿐만 아니라, IL-2가 서열번호 35의 아미노산 서열의 N 말단의 일 부분이 결실된 형태일 경우, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 상보적으로 대응되는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 예를 들어, IL-2가 서열번호 35의 아미노산을 서열을 가질 경우에, 상기 IL-2의 변이체는 서열번호 35의 아미노산 서열에서 58번째, 62번째, 65번째, 81번째 또는 92번째 아미노산 중 적어도 어느 하나가 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다. 이들은 각각 서열번호 10의 아미노산 서열의 38번째, 42번째, 45번째, 61번째 및 72번째 아미노산 잔기에 각각 해당한다. 일 구체예에 따르면, IL-2 활성이 유지되는 한, 한 개, 두 개, 세 개, 네 개, 다섯 개, 여섯 개, 일곱 개, 여덟 개, 아홉 개, 혹은 열 개의 아미노산이 치환될 수 있다. 또 다른 구체예에 따르면, 한 개에서 다섯 개까지의 아미노산이 치환될 수 있다.

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

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

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

[107] 나아가, 상기 IL-2 변이체는 다섯 군데의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째, 45번째, 61번째 및 72번째 아미노산이 모두 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다.

[108] 이때, 상기 치환에 의해 도입되는 "다른 아미노산"은 알라닌(alanine), 아르기닌(arginine), 아스파라긴(Asparagine), 아스파르트산(aspartic acid), 시스테인(cysteine), 글루탐산(glutamic acid), 글루타민(glutamine), 히스티딘(histidine), 이소루신(isoleucine), 루신(leucine), 리신(lysine), 메티오닌(methionine), 페닐알라닌(phenylalanine), 프롤린(proline), 세린(serine), 트레오닌(threonine), 트립토판(tryptophan), 티로신(tyrosine) 및 발린(valine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다. 단, 상기 IL-2 변이체의

아미노산 치환에 있어서, 상기 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째는 아르기닌으로 치환될 수 없으며, 42번째는 페닐알라닌으로 치환될 수 없고, 45번째는 티로신으로 치환될 수 없으며, 61번째는 글루탐산으로 치환될 수 없고, 72번째는 루신으로 치환될 수 없다.

[109] 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째 아미노산인 아르기닌은 아르기닌을 제외한 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째 아미노산인 아르기닌은 알라닌으로 치환(R38A)될 수 있다.

[110] 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 42번째 아미노산인 페닐알라닌은 페닐알라닌을 제외한 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 42번째 아미노산인 페닐알라닌은 알라닌으로 치환(F42A)될 수 있다.

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

[112] 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 61번째 아미노산인 글루탐산은 글루탐산을 제외한 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 61번째 아미노산인 글루탐산은 아르기닌으로 치환(E61A)될 수 있다.

[113] 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 72번째 아미노산인 루신은 루신을 제외한 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 72번째 아미노산인 루신은 글리신으로 치환(L72G)될 수 있다.

[114] 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 R38A, F42A, Y45A, E61R 및 L72G로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 치환이 일어난 것일 수 있다.

[115] 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A, Y45A, E61R 및 L72G로 구성된 군에서 선택되는 위치에서 두 군데, 세 군데, 네 군데 또는 다섯 군데의 위치에서 아미노산 치환이 일어날 수 있다.

[116] 또한, 상기 IL-2 변이체는 두 군데의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 R38A 및 F42A로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A 및 Y45A로 치환이 일어난 것일 수

있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A 및 E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A 및 Y45A로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A 및 E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다.

[117] 나아가, 상기 IL-2 변이체는 세 군데의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A 및 Y45A로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A 및 E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, Y45A, E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, Y45A 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A, Y45A 및 E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A, Y45A 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 Y45A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다.

[118] 또한, 상기 IL-2 변이체는 네 군데의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A, Y45A 및 E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A, Y45A 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, Y45A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A, Y45A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다.

[119] 나아가 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A, Y45A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다.

[120] 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 일 구체예는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 하기 (a) 내지 (d) 조합 중 선택되는 어느 하나의 조합의 치환이 일어난 것일 수 있다:

[121] (a) R38A/F42A

[122] (b) R38A/F42A/Y45A

[123] (c) R38A/F42A/E61R

[124] (d) R38A/F42A/L72G

[125] 이때, IL-2가 서열번호 35의 아미노산 서열을 가질 경우, 서열번호 10과 상보적으로 대응되는 위치에 아미노산 치환을 가질 수 있다. 또한, IL-2가

서열번호 35의 아미노산 서열의 단편인 경우에도, 서열번호 10과 상보적으로 대응되는 위치의 아미노산이 치환될 수 있다.

[126] 구체적으로, 상기 IL-2의 변이체는 서열번호 6, 22, 23 또는 24의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

[127] 또한, 상기 IL-2 변이체는 생체 내에서 낮은 독성을 가지는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다. 이때, 상기 생체 내에서 낮은 독성이란, IL-2가 IL-2 수용체의 알파체인(IL-2Rα)과 결합하여 유발되는 부작용일 수 있다. 상기 IL-2와 IL-2Rα 결합에 의한 부작용을 개선시키기 위해서 다양한 IL-2 변이체가 개발되었으며, 이러한 IL-2 변이체는 미국특허 5,229,109 및 대한민국특허 1667096에 개시된 것들을 사용할 수 있다. 특히, 본 출원에서 기술되는 IL-2의 변이체는 IL-2 수용체의 알파체인(IL-2Rα)과 결합력이 낮아 생체내 독성이 야생형 IL-2에 비해 낮다.

[128] 본 명세서에서 사용하는 용어, "CD80"은 "B7-1"로도 불리며, 수지상세포, 활성화된 B 세포 및 단핵구에 존재하는 막 단백질이다. CD80은 T 세포의 활성화와 생존에 필수적인 공자극 신호를 제공한다. CD80은 T 세포 표면에 존재하는 서로 다른 두 단백질인 CD28 및 CTLA-4에 대한 리간드로 알려져 있다. CD80은 288개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 구체적으로 서열번호 11의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 또한, 본 명세서에서 "CD80 단백질"은 전장 CD80 또는 CD80 단편을 의미한다.

[129] 본 명세서에서 사용하는 용어, "CD80 단편"이란, CD80의 절단형을 의미한다. 또한, 상기 CD80 단편은 CD80의 세포외도메인일 수 있다. CD80 단편의 일 구체예로는 CD80의 신호서열인 N-말단으로부터 1번째 내지 34번째의 아미노산이 제외된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 35번째 내지 288번째의 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 또한, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 35번째 내지 242번째 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 또한, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 35번째 내지 232번째 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 또한, 또한, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 35번째 내지 139번째 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 또한, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 142번째 내지 242번째 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 상기 일 실시예로 CD80 단편은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

[130] 또한, 상기 IL-2 단백질 및 상기 CD80 단백질은 링커 혹은 캐리어(carrier)에 의해 결합된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 또는 이의 변이체 및 상기 CD80(B7-1) 또는 이의 단편은 링커 혹은 캐리어에 의해 결합된 것일 수 있다. 본 명세서에서 링커와 캐리어는 호환적으로 사용되기도 한다.

[131] 상기 링커는 두 개의 단백질을 연결시켜준다. 링커의 일 구체예로는 1개 내지 50개의 아미노산, 알부민 또는 이의 단편, 또는 면역글로불린의 Fc 도메인 등을

포함할 수 있다. 이때, 상기 면역글로불린의 Fc 도메인은 면역글로불린의 중쇄 불변 영역 2(CH2) 및 중쇄 불변 영역 3(CH3)을 포함하며, 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 및 경쇄 불변 영역 1(CH1)은 포함하지 않는 단백질을 의미한다. 상기 면역글로불린은 IgG, IgA, IgE, IgD 또는 IgM 일 수 있으며, 바람직하게는 IgG4일 수 있다. 이때, 야생형 면역글로불린 G4의 Fc 도메인은 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

[132] 또한, 상기 면역글로불린의 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인 뿐만 아니라, Fc 도메인 변이체일 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용하는 용어 "Fc 도메인 변이체"는 야생형 Fc 도메인의 당쇄 형태(glycosylation pattern)와 다르거나, 야생형 Fc 도메인에 비해 증가된 당쇄, 야생형 Fc 도메인에 비해 감소한 당쇄, 또는 당쇄가 제거(deglycosylate)된 형태일 수 있다. 또한 무당쇄(aglycosylated) Fc 도메인도 포함된다. Fc 도메인 혹은 변이체는 배양조건 혹은 호스트의 유전자 조작을 통해 조정된 숫자의 시알산(sialic acid), 퓨코실화(fucosylation), 당화(glycosylation)를 갖도록 한 것일 수 있다.

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

[134] 융합단백질은 Fc 도메인을 링커(혹은 캐리어)로 하여 이의 N-말단과 C-말단에 각각 CD80과 IL-2 단백질이 연결되거나 혹은 IL-2와 CD80이 연결된 구조를 가질 수 있다. Fc 도메인의 N-말단 혹은 C-말단과 CD-80 혹은 IL-2의 연결은 임의적으로 링커 펩타이드에 의해 이루어질 수 있다.

[135] 구체적으로, 상기 융합단백질은 하기 구조식(I) 또는 (II)로 이루어진 것일 수 있다:

[136] N'-X-[링커(1)]n-Fc 도메인-[링커(2)]m-Y-C' (I)

[137] N'-Y-[링커(1)]n-Fc 도메인-[링커(2)]m-X-C' (II)

[138] 이때, 상기 구조식(I) 및 (II)에 있어서,

[139] 상기 N'은 융합단백질의 N-말단이고,

[140] 상기 C'는 융합단백질의 C-말단이며,

[141] 상기 X는 CD80 단백질이고,

[142] 상기 Y는 IL-2 단백질이며,

[143] 상기 링커(1) 및 링커(2)는 펩타이드 링커이고,

[144] 상기 n 및 m은 각각 독립적으로, O 또는 1이다.

[145] 바람직하게는, 상기 융합단백질은 구조식(I)로 이루어진 것일 수 있다. 상기 IL-2 단백질은 상술한 바와 같다. 또한, 상기 CD80 단백질은 상술한 바와 같다. 일

구체예에 따르면, IL-2 단백질은 야생형 IL-2와 비교하여 하나에서 다섯 개까지의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체일 수 있다. CD80 단백질은 야생형 CD80의 N-말단 혹은 C-말단으로부터 연속적으로 약 34개까지의 아미노산 잔기가 결실된(truncated) 단편일 수 있다. 혹은 CD 단백질은 T-세포 표면 수용체(T cell surface receptors) CTLA-4와 CD28에 결합하는 활성을 갖는 세포외 면역글로불린-유사 도메인일 수 있다.

[146] 구체적으로, 상기 융합단백질은 서열번호 9, 26, 28 또는 30의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 또 다른 구체예에 따르면, 융합단백질은 서열번호 9, 26, 28 또는 30의 아미노산 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 혹은 100%의 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이때, 동일성은, 예를 들어, 퍼센트 상동성, NCBI(National Center of Biotechnology Information)의 BlastN software과 같은 상동성 비교 소프트웨어를 통해 결정될 수 있다.

[147] 상기 CD80 단백질과 Fc 도메인의 사이에는 펩타이드 링커(1)가 포함될 수 있다. 상기 펩타이드 링커(1)은 5 내지 80개의 연속된 아미노산, 20 내지 60개의 연속된 아미노산, 또는 25 내지 50개의 연속된 아미노산, 또는 30 내지 40개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 일 구체예로 펩타이드 링커(1)은 30개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 또한, 펩타이드 링커(1)은 적어도 하나의 시스테인을 포함할 수 있다. 구체적으로, 하나, 두 개 또는 세 개의 시스테인을 포함할 수 있다. 또한, 상기 펩타이드 링커(1)는 면역글로불린의 힌지에서 유래된 것일 수 있다. 한 구체예에서는, 상기 펩타이드 링커(1)이 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커일 수 있다.

[148] 상기 펩타이드 링커(2)는 1 내지 50개의 연속된 아미노산, 또는 3 내지 30개의 연속된 아미노산, 또는 5 내지 15개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 일 구체예로 상기 펩타이드 링커(2)는 (G4S)n(이때, n은 1 내지 10의 정수) 일 수 있다. 이때, (G4S)n에서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10일 수 있다. 일 실시예로, 상기 펩타이드 링커(2)가 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커일 수 있다.

[149] 본 발명의 다른 측면은, 상기 IL-2 단백질 및 상기 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 두 개가 결합된 이량체를 제공한다. 상기 IL-2 또는 이의 변이체 및 CD80 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질은 상술한 바와 같다.

[150] 이때, 이량체를 구성하는 융합단백질 간의 결합은 링커 내에 존재하는 시스테인에 의해 이황화 결합에 의해 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이량체를 구성하는 융합단백질은 동일한 것일 수도 있으나, 서로 상이한 융합단백질일 수 있다. 바람직하게는, 상기 이량체는 동형이량체(homodimer)인 것일 수 있다. 상기 이량체를 구성하는 융합단백질의 일 실시예는 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 단백질일 수 있다.

[151] 본 발명의 IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편을

포함하는 융합단백질 이량체 및 면역관문 억제제를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 암에 대하여 예방 또는 치료 효능을 나타낸다.

[152] 상기 암은 위암, 간암, 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 자궁경부암, 갑상선암, 후두암, 급성 골수성 백혈병, 뇌종양, 신경모세포종, 망막모세포종, 두경부암, 침샘암 및 림프종으로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

[153] 상기 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 암 예방 또는 치료용 약학 조성물에서 그 유효성분은 항암 활성을 나타낼 수 있는 한, 용도, 제형, 배합 목적 등에 따라 임의의 양(유효량)으로 포함될 수 있는데, 통상적인 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001 중량 % 내지 20.0 중량% 범위 내에서 결정될 것이다. 여기서 "유효량"이란 항암 효과를 유도할 수 있는 유효성분의 양을 말한다. 이러한 유효량은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 실험적으로 결정될 수 있다.

[154] 본 명세서에서 사용된 용어, “치료”는 치료학적 처리 및 예방적 처리를 모두 포함하는 의미로 사용될 수 있다. 이때, 예방은 개체의 병리학적 상태 또는 질환을 완화시키거나 감소시키는 의미로 사용될 수 있다. 일 구체예에서, 용어 “치료”는 인간을 포함한 포유류에서 질환을 치료하기 위한 적용이나 어떠한 형태의 투약을 모두 포함한다. 또한, 상기 용어는 질환 또는 질환의 진행을 억제하거나 늦추는 것을 포함하며; 손상되거나, 결손된 기능을 회복시키거나, 수리하여, 질환을 부분적이거나 완전하게 완화시키거나; 또는 비효율적인 프로세스를 자극하거나; 심각한 질환을 완화하는 의미를 포함한다.

[155] 본 명세서에서 사용된 용어, “효능(efficacy)”은 1년, 5년, 또는 10년과 같이 일정 기간에 걸쳐 생존 또는 질병이 없는 상태에서 생존(disease-free survival)과 같은 하나 이상의 파라미터에 의해 결정될 수 있다. 뿐만 아니라, 상기 파라미터는 개체에서 적어도 하나의 종양의 크기가 억제되는 것을 포함할 수 있다.

[156] 생체이용률과 같은 약동학적 파라미터(Pharmacokinetic parameters) 및 클리어런스율(clearance rate)과 같은 기본적인 파라미터(underlying parameters)도 효능에 영향을 줄 수 있다. 따라서, “향상된 효능”(예를 들어, 효능의 개선)은 향상된 약동학적 파라미터 및 향상된 효능에 기인할 수 있으며, 시험 동물 또는 인간 대상체에서 클리어런스율 및 종양 성장을 비교하거나, 생존, 재발율 또는 질병이 없는 상태에서 생존과 같은 파라미터를 비교하여 측정될 수 있다.

[157] 여기서 "치료학적으로 유효한 양" 또는 "약학적으로 유효한 양"이란 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 화합물 또는 조성물의 양으로서, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미한다. 상기 유효량의 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 일

구체예에서 치료학적으로 유효한 양은 암을 치료하는데 효과적인 약물의 양을 의미한다.

[158] 이때, 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 환자에게 전달하기에 적절한 비-독성 물질이면 어떠한 담체라도 가능하다. 증류수, 알코올, 지방, 왁스 및 비활성 고체가 담체로 포함될 수 있다. 약물학적으로 허용되는 애쥬번트(완충제, 분산제) 또한 약학 조성물에 포함될 수 있다.

[159] 구체적으로, 상기 약학 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하여 당업계에 공지된 통상의 방법으로 투여 경로에 따라 비경구용 제형으로 제조될 수 있다. 여기서 "약제학적으로 허용되는" 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적응 가능한 이상의 독성을 지니지 않는다는 의미이다.

[160] 상기 약학 조성물이 비경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 주사제, 경피 투여제, 비강 흡입제 및 좌제의 형태로 제제화될 수 있다. 주사제로 제제화할 경우 적합한 담체로서는 멸균수, 에탄올, 글리세롤이나 프로필렌 글리콜 등의 폴리올 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline)나 주사용 멸균수, 5% 덱스트로스 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 약제학적 조성물의 제제화와 관련하여서는 당업계에 공지되어 있으며, 구체적으로 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)] 등을 참조할 수 있다. 상기 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주 된다.

[161] 상기 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 성별, 연령, 환자의 중증도, 투여 경로에 따라 1일 0.01 ug/kg 내지 10 g/kg 범위, 또는 0.01 mg/kg 내지 1 g/kg 범위일 수 있다. 투여는 1일 1회 또는 수회로 나누어 이루어질 수 있다. 이러한 투여량은 어떠한 측면으로든 본원 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 아니 된다.

[162] 상기 약학 조성물이 적용(처방)될 수 있는 대상은 포유동물 및 사람이며, 특히 사람인 경우가 바람직하다. 본원의 약학 조성물은 유효성분 이외에, 항암 활성의 상승·보강을 위하여 이미 안전성이 검증되고 항암 활성에 치료 효과를 갖는 것으로 공지된 임의의 화합물이나 천연 추출물을 추가로 포함할 수 있다.

[163] 본 발명의 또 다른 측면은, IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 이량체 및 면역관문 억제제를 포함하는 암 치료용 키트를 제공한다.

[164] 본 발명의 또 다른 측면은, 암을 예방 또는 치료하기 위한 IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 이량체 및 면역관문 억제제를 포함하는 병용 투여용 조성물의 용도를 제공한다.

[165] 본 발명의 또 다른 측면은, 암의 치료효과를 향상(enhance)시키기 위한 IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편을 포함하는

융합단백질 및 면역관문 억제제를 포함하는 병용 투여용 조성물의 용도를 제공한다.

[166] 본 발명의 또 다른 측면은, 암 치료용 약제를 제조하기 위한 IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 및 면역관문 억제제를 포함하는 병용 투여 조성물의 용도를 제공한다.

[167] 본 발명의 또 다른 측면은, IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 또는 상기 융합단백질 2개가 결합된 융합단백질 이량체 및 면역관문 억제제를 포함하는 병용 투여 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암을 예방 또는 치료하는 방법, 및/또는 치료효과를 향상시키는 방법을 제공한다.

[168] 상기 개체는 암을 앓고 있는 개체일 수 있다. 또한 상기 개체는 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다. 상기 IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 또는 상기 융합단백질 2개가 결합된 융합단백질 이량체는 상술한 바와 같다.

[169] 상기 융합 단백질 또는 융합단백질 이량체의 투여경로, 투여량 및 투여횟수는 환자의 상태 및 부작용의 유무에 따라 다양한 방법 및 양으로 대상에게 투여될 수 있고, 최적의 투여방법, 투여량 및 투여횟수는 통상의 기술자가 적절한 범위로 선택할 수 있다.

[170] 본 발명의 일 구체예의 융합단백질은 IL-2의 활성으로 인해 자연살해세포와 같은 면역세포를 활성화시킬 수 있다. 따라서, 암에 효과적으로 활용할 수 있다. 특히, 야생형과 비교하여 2개 내지 5개 위치의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체, 특히 서열번호 10의 아미노산 서열에서 R38A, F42A, Y45A, E61R 및 L72G로 구성된 군에서 선택되는 위치에서 두 군데, 세 군데, 네 군데 또는 다섯 군데의 위치의 아미노산 치환을 포함하는 IL-2 변이체는 IL-2 수용체의 알파 체인과의 결합력을 낮추어 종래 IL-2가 가지고 있는 약리학적 부작용을 개선된 특성을 보이는 것이 확인되었다. 따라서, 이런 IL-2 변이체는 단독으로 혹은 융합단백질의 형태로 사용할 경우 종래에 알려진 IL-2의 문제점인 혈관(또는 모세관) 누출 증후군(VLS)의 발생을 감소시킬 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[171] 이하, 본원 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본원 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본원 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[172] **I. 융합단백질 제조**

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

[174] 인간 CD80 단편, Fc 도메인 및 IL-2 변이체를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), CD80 단편(서열번호 2), Ig 힌지(서열번호 3), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 두 개의 아미노산이 치환된 IL-2

변이체(2M)(R38A, F42A)(서열번호 6)를 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 8)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO ™)에 도입하여 서열번호 9의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37℃, 125 rpm, CO_2 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질을 "GI101"로 명명하였다.

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

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

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

[178] 마우스 CD80, Fc 도메인 및 IL-2 변이체를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), mCD80(서열번호 13), Ig 힌지(서열번호 3), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 두 개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(2M)(R38A, F42A)(서열번호 6)를 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 14)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO ™)에 도입하여 서열번호 15의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37℃, 125rpm, CO_2 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합 단백질을 "mGI101"로 명명하였다.

[179] 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 분리 정제된 융합단백질은 reduced(R) 또는 non-reduced(NR) 조건하에서 SDS-PAGE를 실행하고, 코마시블루로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 9). NanoDrop을 사용하여 흡광도 280 nm로 검출시 1.95 ㎎/㎖의 농도로 융합단백질이 포함된 것을 확인하였다.

[180] **제조예 3. hCD80-Fc의 제조: GI101C1**

[181] 인간 CD80 단편 및 Fc 도메인를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여,

시그널 펩타이드(서열번호 1), CD80 단편(서열번호 2), Ig 힌지(서열번호 3) 및 Fc 도메인(서열번호 4)를 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 16)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 17의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37℃, 125rpm, CO2 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질을 "GI101C1"으로 명명하였다.

[182] 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 분리 정제된 융합단백질은 reduced(R) 또는 non-reduced(NR) 조건하에서 SDS-PAGE를 실행하고, 코마시블루로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 10). NanoDrop을 사용하여 흡광도 280 nm로 검출시 3.61 ㎎/㎖의 농도로 융합단백질이 포함된 것을 확인하였다.

[183] **제조예 4. Fc-IL-2 변이체(2M)의 제조: GI101C2**

[184] Fc 도메인 및 IL-2 변이체를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 두 개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(2M)(R38A, F42A)(서열번호 6)를 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 18)을 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 19의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37℃, 125rpm, CO_2 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질을 "GI101C2"으로 명명하였다.

[185] 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 분리 정제된 융합단백질은 reduced(R) 또는 non-reduced(NR) 조건하에서 SDS-PAGE를 실행하고, 코마시블루로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 11). NanoDrop을 사용하여 흡광도 280 nm로 검출시 4.79 ㎎/㎖의 농도로 융합단백질이 포함된 것을 확인하였다.

[186] **제조예 5. mCD80-Fc의 제조: mGI101C1**

[187] 마우스 CD80 및 Fc 도메인을 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), 마우스 CD80(서열번호 13), Ig 힌지(서열번호 3) 및 Fc 도메인(서열번호 4)을 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 20)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 21의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37℃, 125rpm, CO_2 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여

융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합 단백질을 "mGI101C1"으로 명명하였다.

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

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

[190] [표1]

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

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

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

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

[194] 인간 CD80 단편, Fc 도메인 및 세개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(3M)(R38A, F42A, Y45A)(GI102-M45)를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), CD80 단편(서열번호 2), Ig 힌지(서열번호 3), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 IL-2 변이체(서열번호 22)를 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 25)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher

Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 26의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37℃, 125rpm, CO_2 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질을 "GI102-M45"로 명명하였다.

[195] 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 분리 정제된 융합단백질은 reduced(R) 또는 non-reduced(NR) 조건하에서 SDS-PAGE를 실행하고, 코마시블루로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 13).

[196] **제조예 8. hCD80-Fc-IL-2 변이체(3M)의 제조: GI102-M61**

[197] 인간 CD80 단편, Fc 도메인 및 세 개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(3M)(R38A, F42A, E61R)(GI101-M61)를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), CD80 단편(서열번호 2), Ig 힌지(서열번호 3), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 IL-2 변이체(서열번호 23)를 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 27)을 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 28의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37℃, 125rpm, CO_2 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질을 "GI102-M61"로 명명하였다.

[198] 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 분리 정제된 융합단백질은 reduced(R) 또는 non-reduced(NR) 조건하에서 SDS-PAGE를 실행하고, 코마시블루로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 14).

[199] **제조예 9. hCD80-Fc-IL-3M의 제조: GI102-M72**

[200] 인간 CD80 단편, Fc 도메인 및 세 개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(3M)(R38A, F42A, L72G)(GI102-M72)를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), CD80 단편(서열번호 2), Ig 힌지(서열번호 3), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 IL-2 변이체(서열번호 24)를 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 29)을 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 30의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37℃, 125rpm, CO2 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질을 "GI102-M72"로 명명하였다.

[201] 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 분리 정제된 융합단백질은 reduced(R) 또는 non-reduced(NR) 조건하에서

SDS-PAGE를 실행하고, 코마시블루로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 15).

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

[203] 마우스 CD80 단편, Fc 도메인 및 세개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(3M)(R38A, F42A, E61R)(GI102-M61)를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), mCD80 단편(서열번호 13), Ig 힌지(서열번호 3), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 IL-2 변이체(서열번호 23)를 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 33)을 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 34의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37℃, 125rpm, CO_2 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질을 "mGI102-M61"로 명명하였다.

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

[205] **II. 융합단백질과 리간드의 결합 친화성 확인**

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

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

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

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

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

[211] Ni-NTA(Nickel charged Tris-NTA, Ni-NTA 바이오센서, ForteBio, 18-5101)를 Microplate-96-well에 1X Ni-NTA kinetic buffer(10X Kinetics buffer, ForteBio, 18-1042)를 200 ㎕씩 담고 미리 수화시켰다. Ni-NTA 바이오센서에 붙일 리간드(Human PD-L1/B7-H1 protein, His-tag, Sino biological, Cat: 10084-H08H)를 1X Ni-NTA kinetic buffer에 5 ㎍/㎖ 농도가 되도록 희석하였다. 리간드에 붙을

GI101을 1,000 nM, 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62.5 nM로 1X Ni-NTA kinetic buffer에 희석하였다. 또한, 리간드에 붙을 인간 PD-1/PDCD1(Human PD-1/PDCD1, Fc Tag, Sino Biological, Cat: 10377-H02H)을 2,000 nM, 1,000 nM, 500 nM, 250 nM 또는 125 nM 농도가 되도록 1X Ni-NTA kinetic buffer에 희석시켰다. 그 후, Microplate-384-well에 각 시약을 80 ㎕씩 넣고 프로그램을 세팅하였다.

[212] 그 결과, hPD-L1과 GI101 간의 결합 친화성은 도 17에 나타난 바와 같이 측정되었다. 또한, hPD-L1과 hPD-1 간의 결합 친화성은 도 18에 나타난 바와 같이 측정되었다.

[213] **실험예 3. mCTLA-4 및 mGI101 간의 결합 친화성 확인**

[214] 실험예 1과 동일한 방법으로 mCTLA-4 및 mGI101 간의 결합 친화성을 확인하였다. 이때, 사용한 장비는 다음과 같다: 바이오센서: AR2G, 리간드: mCTLA-4(재조합 마우스 CTLA-4 Fc 키메라, R&D systems, Cat: 434-CT-200), 분석물: mGI101(500 nM, 250 nM, 125 nM, 62.5 nM, 31.3 nM).

[215] 그 결과, mCTLA-4 및 mGI101 간의 결합 친화성은 도 19에 나타난 바와 같이 측정되었다.

[216] **실험예 4. mPD-L1 및 mGI101 간의 결합 친화성 확인**

[217] 실험예 1과 동일한 방법으로 mPD-L1 및 mGI101 간의 결합 친화성을 확인하였다. 이때, 사용한 장비는 다음과 같다. 바이오센서: AR2G, 리간드: mPD-L1(재조합 마우스 mGI101 B7-H1/PD-L1 Fc 키메라, R&D systems, Cat: 434-CT-200), 분석물: mGI101(500 nM, 250 nM, 125 nM, 62.5 nM, 31.3 nM).

[218] 그 결과, mPD-L1 및 mGI101 간의 결합 친화성은 도 20에 나타난 바와 같이 측정되었다.

[219] **실험예 5. GI-101(hCD80-Fc-hIL-2v)의 CTLA-4에 대한 결합력 확인**

[220] 결합 동역학 측정은 30℃ 및 1,000rpm의 교반을 통한 Octet RED 384 기기(ForteBio, Pall Life Science)를 이용하여 수행하였다. CTLA-4에 대한 결합력 측정은 Amine Reactive 2 generation(AR2G) 바이오센서칩을 사용하여 측정하고, PD-L1에 대한 결합력 측정은 Nickel charged Tris-NTA(Ni-NTA) 바이오센서칩을 사용하여 측정하였다. Human CTLA-4-His Tag(Sino Biological, Cat: 11159-H08H)은 AR2G 바이오센서칩을 400 mM EDC와 100 mM sulfo-NHS의 조합으로 활성시킨 후, 10 mM 아세테이트 완충액(pH 5)으로 5 ㎍/㎖로 희석하여 AR2G 바이오센서에 300초간 로딩해서 고정시켰다.

[221] 그런 다음, 다양한 농도의 GI-101(hCD80-Fc-hIL-2v), GI-101C1(hCD80-Fc), Ipilimumab(Bristol-Myers Squibb) 및 GI-101C2(Fc-hIL-2v)와의 결합을 300초 동안 측정하고 해리 역시도 300초 동안 측정하였다. 결합 동역학 분석은 Pall사에서 제공하는 Octet Data analysis HT software ver 10을 사용하였다. 그 결과는 도 21에 나타냈다.

[222] **실험예 6. IL-2Rα 또는 IL-2Rβ와 GI101 간의 결합 친화성 확인**

[223] IL-2Rα에 대한 결합력 측정은 AR2G 바이오센서를 사용하여 측정하였고, IL-2Rβ에 대한 결합력 측정은 Ni-NTA 바이오센서(Nickel charged Tris-NTA, Ni-NTA 바이오센서, ForteBio, 18-5101)를 사용하여 측정하였다.

[224] AR2G 바이오센서에 붙일 리간드(IL-2Rα-His Tag, Acro, Cat: ILA-H52H9)를 10 mM 농도의 아세테이트 버퍼(pH 5, AR2G reagent Kit, ForteBio, Cat: 18-5095)에 5 ㎍/㎖ 농도가 되도록 희석하였다. AR2G 바이오센서를 400 mM 농도의 EDC와 100 mM 농도의 sulfo-NHS를 혼합시켜 제조한 버퍼로 활성화시킨 후, 희석시켜둔 리간드를 AR2G 바이오센서에 300초 동안 로딩해서 고정시켰다.

[225] 한편, Ni-NTA 바이오센서에 붙일 리간드(IL-2Rβ-His Tag, Acro, Cat: CD2-H5221)를 1X Ni-NTA kinetic buffer에 5 ㎍/㎖ 농도가 되도록 희석하였다. 희석시킨 리간드를 Ni-NTA 바이오센서에 600초 동안 로딩해서 고정시켰다.

[226] 그 후, 리간드에 붙을 다양한 농도의 GI101, GI101w 또는 Proleukin(Novartis, hIL-2)을 300초 동안 로딩한 후, 결합을 측정하고, 해리도 300초 동안 측정하였다. 결합 동역학 분석은 Pall사에서 제공하는 Octet Data analysis HT software ver. 10을 사용하였다. 그 결과를 도 22 내지 도 24에 나타냈다.

[227] 그 결과, GI101이 GI101w 및 Proleukin에 비해 IL-2 수용체의 IL-2Rα에 대한 결합력은 낮고, IL-2Rβ에 대한 결합력이 높은 것을 확인하였다.

[228] **실험예 7. 융합단백질과 리간드의 결합 친화성 측정**

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

[230] **실험예 7.1. IL-2 alpha receptor와 GI101-M45, GI101-M61 및 GI101-M72의 결합 친화성 확인**

[231] AR2G 바이오센서(Amine Reactive 2nd gen, ForteBio, Cat: 18-5092)를 Microplate-96-well(GreinerBio-one, Cat:655209)에 증류수(DW)를 200 ㎕씩 담고 미리 수화시켰다. 바이오센서에 붙일 리간드(Ligand)(Human IL-2 R alpha protein, His Tag, Acro, ILA-H52H9)를 10 mM 아세테이트 pH 5 버퍼(AR2G reagent Kit, ForteBio, Cat: 18-5095)에 5 ㎍/㎖의 농도로 희석하였다. 리간드에 붙을 분석물(GI101-M45, GI101-M61, GI101-M72)을 각각 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62.5 nM로 1X AR2G kinetic buffer(AR2G reagent Kit, ForteBio, Cat: 18-5095)에 희석하였다. Activation buffer는 DW에 20 mM EDC, 10 mM s-NHS(AR2G reagent Kit, ForteBio, Cat: 18-5095)의 농도로 제작하였다. Microplate-384-well(GreinerBio-one, Cat:781209)에 각 시약을 80 ㎕씩 넣고 프로그램을 세팅하였다.

[232] 그 결과, IL-2 alpha receptor와 GI101-M45간의 결합 친화성은 도 25에 나타낸 바와 같다. 또한, IL-2 alpha receptor와 GI101-M61간의 결합 친화성은 도 26에, IL-2 alpha receptor와 GI101-M72 간의 결합 친화성은 도 27에 나타낸 바와 같다.

[233] **실험예 7.2. IL-2Rβ에 대한 GI102-M45, GI102-M61 및 GI102-M72의 결합 친화성 확인**

[234] Ni-NTA 바이오센서를 Microplate-96-well에 1X Ni-NTA kinetic buffer(10X Kinetics buffer, ForteBio, 18-1042)를 200 ㎕씩 담고 미리 수화시켰다. 바이오센서에 붙일 리간드(Human IL-2 R beta protein, His-Tag, Acro, CD2-H5221)를 1X Ni-NTA kinetic buffer에 2 ㎍/㎖ 농도가 되도록 희석하였다. 리간드에 붙을 GI102-M45, GI102-M61 또는 GI102-M72를 500 nM, 250 nM, 125 nM 또는 62.5 nM 농도가 되도록 1X Ni-NTA kinetic buffer에 희석시켰다. Microplate-384-well에 각 시약을 80 ㎕씩 넣고 프로그램을 세팅하였다.

[235] 그 결과, IL-2Rβ와 GI102-M45 간의 결합 친화성은 도 28에 나타난 바와 같이 측정되었으며, IL-2Rβ와 GI102-M61 간의 결합 친화성은 도 29에 나타난 바와 같이 측정되었다. 또한, IL-2Rβ와 GI102-M72 간의 결합 친화성은 도 30에 나타난 바와 같이 측정되었다.

[236] **III. 융합단백질의 면역 활성 확인**

[237] **실험예 8. 융합단백질에 의한IFN-γ 생산량 확인**

[238] **실험예 8.1. CFSE-labeled PBMC의 배양**

[239] 인간에게서 분리한 PBMC(Peripheral blood mononuclear cells)를 1 μM 농도의 CellTrace CFSE 염료와 37℃에서 20분간 반응을 시켜 CFSE(carboxyfluorescein succinimidyl ester)로 라벨링 시켰다. 세포에 결합하지 않은 CFSE는 염색 반응 용액의 5배 되는 배양 배지와 5분간 반응시킨 후, 1,300rpm에서 5분 동안 원심분리하여 제거하였다. CFSE가 라벨링된 PBMC는 배양 배지(10% 우태아 혈청(FBS), 10 mM HEPES, 100 U/㎖ 페니실린/스트렙토마이신, 1 mM sodium pyruvate, 55 μM 2-머캅토에탄올, 1 mM 비필수 아미노산 및 2 mM L-글루타민이 함유된 RPMI1640 배지)에 재현탁 시킨 후, Microplate-96-well에 각 웰 당 $1x10^5$ 세포수 만큼 넣고, 5 ㎍/㎖의 PHA(Lectin from Phaseolus Vulgaris, red kidney bean, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, cat No. L1668-5MG)와 GI101, GI101C1, GI101C2 또는 IL-2(Aldesleukin; 인간 재조합 IL-2, Novartis)를 처리하여 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 6일 동안 배양하였다.

[240] 이때, GI101, GI101C1, GI101C2 및 IL-2는 1 nM, 10 nM 또는 100 nM 농도로 처리하였다. 세포는 FACS로 분석하였고, ELISA kit(Biolegend, San Diego, CA, USA, cat No.430103)를 이용하여 배양배지에 존재하는 인간 IFN-γ를 측정하였다.

[241] **실험예 8.2. FACS 분석**

[242] 상층액이 제거된 세포 펠릿을 FACS 버퍼(3% 우태아 혈청, 10 mM EDTA, 1 M HEPES, 100 unit/㎖ 페니실린, 스트렙토마이신, 1 mM sodium pyruvate)로 씻어준 뒤, Fc blocker(Biolegend, cat NO. 422302)와 4℃에서 5분간 반응시켰다. 그 후, APC anti-CD3 Ab(Biolegend, cat NO. 300412)와 PE anti-CD8a Ab(Biolegend, cat NO. 300908)를 처리하고 4℃에서 20분간 반응시킨 후 FACS buffer로 세척하였다. 세포 펠릿은 FACS 버퍼에 재현탁 시킨 후, BD LSR Fortessa(BD biosciences, San Diego, CA, USA)와 FlowJo Software을 사용하여 분석하였다.

[243] **실험예8.3. Human IFN-γ ELISA**

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

[245] 반응이 끝난 후, 플레이트를 세척하여 2차 항체(detection antibody)를 넣고 상온에서 1시간 반응시켰다. 워싱버퍼로 세척한 후, Avidin-HRP 용액을 넣고 실온에서 30분간 반응시키고, 기질용액을 넣어 상온인 어두운 곳에서 20분간 발색반응을 유도시켰다. 마지막으로 H_2SO_4을 넣어 발색반응을 중지시켜 Epoch Microplate Spectrophotometer(BioTek instruments, Winooski, VT, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 농도계산을 하였다.

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

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

[248] 인간에서 분리한 PBMC(Peripheral blood mononuclear cells)를 1 μM 농도의 CellTrace CFSE 염료와 37℃에서 20분간 반응을 시켜 CFSE로 라벨링시켰다. 세포에 결합하지 않은 CFSE는 염색반응 용액의 5배되는 배양 배지와 5분간 반응시킨 후, 1,300rpm에서 5분 동안 원심분리하여 제거하였다. CFSE가 라벨링된 PBMC는 배양배지(10% 우태아 혈청, 10 mM HEPES, 100 U/㎖ 페니실린/스트렙토마이신, 1 mM sodium pyruvate, 55 μM 2-머캅토에탄올, 1 mM 비필수 아미노산 및 2 mM L-글루타민이 함유된 RPMI1640 배지)에 재현탁 시킨 후, Microplate-96-well에 각 웰 당 $1x10^5$ 세포수 만큼 넣었다.

[249] 그 후, 1 ㎍/㎖의 항 CD3ε 항체(Biolegend cat No. L1668-5MG) 및 GI101, GI101C1, GI101C2 또는 Proleukin(Novartis)을 처리하여, 37℃, 5% CO_2 배양기에서 6일동안 배양하였다. 이때, GI101, GI101C1, GI101C2 및 IL-2는 100 nM 농도로 세포에 처리하였다. 배양된 세포들은 APC-TCRαβ 항체와 PE-CD8α 항체를 사용한 FACS 분석방법으로 CD8+ T 세포들 중 CFSE로 라벨링 되지 않은 세포들의 비율 정도를 측정함으로써 이 세포들의 증식 정도를 조사하였다.

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

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

[252] 인간 PBMC를 Allcells(Lot#3014928, USA)에서 구입하였다. 1 M 농도의 CellTrace CFSE 염료를 이용하였으며, 이를 인간 PBMC와 상온에서 20분간 빛을 차단한 조건에서 반응시켰다. 1 μM 농도의 CellTrace CFSE 염료와 37℃에서 20분간 반응을 시켜 CFSE로 라벨링시켰다. 세포에 결합하지 않은 CFSE는 염색반응 용액의 5배되는 배양 배지와 5분간 반응시킨 후, 1,300rpm에서 5분 동안 원심분리하여 제거하였다. CFSE가 라벨링된 PBMC는 배양배지(10%

우태아 혈청, 10 mM HEPES, 100 U/㎖ 페니실린/스트렙토마이신, 1 mM sodium pyruvate, 55 μM 2-머캅토에탄올, 1 mM 비필수 아미노산 및 2 mM L-글루타민이 함유된 RPMI1640 배지)에 재현탁 시킨 후, Microplate-96-well에 각 웰 당 $1x10^5$ 세포수 만큼 넣었다.

[253] 그 후, 1 ㎍/㎖의 항 CD3ε 항체(OKT3, eBioscience, USA) 및 GI101, GI101C1, GI101C2 또는 Proleukin(Novartis)을 CFSE가 라벨링된 PBMC에 처리하여, 37℃, 5% CO_2 배양기에서 7일 동안 배양하였다. 이때, GI101, GI101C1, GI101C2 및 IL-2는 10 μM 농도로 세포에 처리하였다.

[254] 배양된 세포들은 항 인간 CD4-PE 항체(BioLegend, U.S.A.), 항 인간 CD8-PE/Cy7 항체(BioLegend, USA), 항 인간 FoxP3-APC 항체(BioLegend, U.S.A.)를 사용하여 FACS 분석방법으로 CD8+ T 세포들 중 CFSE로 라벨링 되지 않은 세포들의 비율 정도를 측정함으로써 이 세포들의 증식 정도를 조사하였다.

[255] 그 결과, GI101, GI102_M61, GI101C2, Proleukin 처리한 군은 대조군(No stimulus), 항 CD3 항체 단독, GI101C1 처리군에 비해 CD8+ T 세포의 비율을 유의미하게 증가하였다. 또한, 음성대조군(No stimulation)과 항 CD3 항체 단독 처리에 비해 GI101, GI101C2, Proleukin은 CD4+/FoxP3+ Treg 세포의 증식을 유의미하게 증가시키나, GI102와 GI101C1은 CD4+/FoxP3+ Treg 세포의 증식을 유의미하게 증가시키지 않았다(도 35).

[256] **실험예 11. GI101 또는 GI101w가 CD8+ T 세포 및 NK 세포의 증식에 미치는 영향 확인**

[257] 오리엔트 바이오(Orient Bio, Korea)에서 구입한 7주령 C57BL/6 마우스를 3 마리씩 3그룹으로 나누어 PBS, GI101 또는 GI101w를 복강 내로 주사를 하였다. 이 때, GI101와 GI101w는 각각 PBS 200 ㎕에 40.5 ㎍이 되도록 제조하여 복강 내로 주사를 하였다. 주사 5일 후, 각 그룹의 마우스에서 비장을 적출하여 세포를 분리하여 혈구 계수기(hematocytometer)를 사용하여 총 세포의 수를 측정하였다. 비장세포는 APC-CD3ε 항체(Biolegend; 145-2C11), PE-NK1.1 항체(Biolegend; PK136) 및 Pacific blue-CD8α 항체(BD; 53-6.7)로 염색한 FACS 분석방법으로 비장세포 중 CD8+ T 세포와 NK 세포의 비율을 조사하였다. 그래서, 비장에 존재하는 CD8+ T 세포와 NK 세포의 수를 계산하였다.

[258] 그 결과, GI101이 GI101w보다 생체 내에서 CD8+ T 세포와 NK 세포를 증식을 활성화 시키는 것을 확인하였다(도 36 및 도 37).

[259] **실험예 12.GI101이 T 세포의 기능에 미치는 영향 확인**

[260] CTLA-4 blockade bioassay kit(Promega cat No. JA4005)를 사용하여 실험을 진행하였으며, 실험을 간단히 설명하면 아래와 같다. 액체질소에서 보관 중인 CTLA-4 Effector 세포를 37℃ 항온수조에서 3분 동안 녹여, 0.8 ㎖의 CTLA-4 Effector 세포를 예열된 3.2 ㎖ assay buffer(90% RPMI+10% 우태아 혈청)와 잘 섞어준 후, 96-well-white cell culture plate(SPL, cat No. 30196)의 각 웰 당 25 ㎕씩 넣었다. 그리고, 다양한 농도의 GI101을 25 ㎕ 넣었다. 음성 대조군의 경우는

assay buffer를 25 ㎕ 넣었다. 그리고, aAPC/Raji cell을 준비하기 전까지 96-well-white cell culture plate를 커버를 씌운 뒤 상온에 두었다.

[261] 액체질소에서 보관 중인 aAPC/Raji 세포를 37℃ 항온수조에서 3분 동안 녹여 0.8 ㎖의 aAPC/Raji 세포를 예열된 3.2 ㎖ assay buffer와 잘 섞어준 다음 플레이트에 각 웰 당 25 ㎕씩 넣고, 37℃, 5% CO_2 배양기에서 16시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 상온에서 15분 동안 놓아둔 후 다음 거품이 생기지 않게 주의하여 Bio-Glo reagent를 넣었다. 가장 자리 바깥 웰 중 3군데에도 Bio-Glo reagent를 넣어 블랭크로 사용하여 백그라운드 신호(background signal)를 보정하였다. 10분간 상온에서 반응시킨 후, Cytation 3(BioTek instruments, Winooski, VT, USA)로 luminescence를 측정하였다. 최종적인 데이터 분석은 RLU(GI101-background)/ RLU(No treatment-background)로 계산하였다.

[262] 그 결과, GI101은 effector T 세포에 발현하는 CTLA-4와 결합하여 T 세포의 기능을 억제시키지 않고 오히려 활성화시키는 것을 확인하였다(도 38 및 도 39).

[263] **실험예 13. mGI101 및 mGI102가 면역세포에 미치는 영향 확인**

[264] 오리엔트(Korea)에서 구입한 7주령 C57BL/6 마우스를 3마리씩 3그룹으로 나누어 PBS, 3 ㎎/㎏, 6 ㎎/㎏, 12 ㎎/㎏의 GI101 또는 3 ㎎/㎏, 6 ㎎/㎏, 12 ㎎/㎏의 mGI102(mGI102-M61)를 정맥 내로 투여하였다. 주사 1일, 3일, 5일, 7일 및 14일째에 각 그룹의 마우스에서 비장조직을 적출하였다. 그 후, 비장조직을 각각의 항체를 이용하여 FACS 분석방법으로 effector CD8+ T 세포, NK 세포, Treg 세포의 수를 계산하고, Treg 세포에 대한 effector CD8+ T 세포와 NK 세포의 비율을 각각 계산하였다. 각각의 세포분석에 사용한 항체의 정보는 아래와 같다:

[265] Effector CD8+ T cell: PB anti-mouse CD3ε antibody(Biolegend, # 155612; KT3.1.1), FITC anti-mouse CD8α antibody(BD, # 553031, 53-6.7), PE/Cy7 anti-mouse CD44 antibody(Biolegend, # 103030; IM7), APC anti-mouse CD122 antibody(Biolegend, # 123214; TM-β1)

[266] NK cell: PB anti-mouse CD3ε antibody(Biolegend, # 155612; KT3.1.1), PE anti-mouse NK-1.1(Biolegend, # 108708; PK136)

[267] Treg cell: FITC anti-mouse CD3 antibody(Biolegend, # 100204; 17A2), PB anti-mouse CD4 antibody(Biolegend, # 100531; RM4-5), PE anti-mouse CD25 antibody(Biolegend, # 102008; PC61), APC anti-mouse Foxp3 antibody(Invitrogen, # FJK-16s, 17-5773-82).

[268] 그 결과, mGI101 또는 mGI102(mGI102-M61)를 투여한 군에서 CD8+ T 세포와 NK세포가 투여 3일 후부터 14일까지의 시점에서 PBS 투여군과 비교하여 유의하게 증가되었다. 또한, mGI102를 투여한 군에서 활성화된 CD8+ T 세포/Treg 세포 및 NK 세포/Treg 세포의 비율이 투여 3일 후부터 7일까지의 시점에서 PBS 투여군과 비교하여 유의하게 증가되었음을 확인하였다(도 40).

[269] **IV. 융합단백질의 항암효과 확인**

[270] **실험예 14. GI101이 PD-L1 및 CTLA-4가 발현되는 암세포에 의한 T 세포 활성**

억제에 미치는 영향 확인

[271] PD-L1 및 CTLA-4가 발현되는 NCl-H292 암세포주를 10 ㎍/㎖ Mitomycin C(Sigma)를 포함하는 배양배지에서 3시간 동안 배양한 후, Mitomycin C를 배양배지로 세척하여 제거하였다. 그 후, $5x10^4$ 세포수의 Mitomycin C를 처리한 NCl-H292 암세포주를 $1x10^5$ 세포수의 인간 PBMC와 Microplate-96-well에서 배양하였다. 이때, T 세포의 활성을 위해 5 ㎍/㎖의 PHA(Sigma)를 처리하였다. 또한, 50 nM 농도의 GI101C1와 GI101를 50 nM 농도의 IgG1-Fc(Biolegend) 또는 abatacept(=Orencia; Bristol-Myers Squibb)에 4℃에서 30분 동안 반응시킨 후, NCl-H292 암세포에 처리하였다. 3일 후에 세포 배양액의 상층액을 회수하여 ELISA kit(Biolegend)을 사용하여 IFN-γ의 양을 정량하였다.

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

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

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

[275] 오리엔트 바이오에서 분양 받은 BALB/c 마우스(암컷, 7주)를 7일의 적응기간을 거친 후에 $5x10^6$ 세포수의 CT-26 암세포주(ATCC, U.S.A.)를 0.05 ㎖ 페놀레드 무첨가 마트리겔 매트릭스(BD)와 혼합하여 마우스의 우측 등 부위의 피하에 0.1 ㎖ 씩 투여하여 동종이식하였다. 암세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 종양의 부피를 측정하여 약 28 mm^3에 도달한 개체들을 선별한 후, 선별한 마우스의 종양의 크기 및 체중을 기초로 하여 균등하도록 각 군당 10마리씩 분류하였다. 그 후, 일회용 주사기(31G, 1 ㎖)를 이용하여 음성대조군에는 6 ㎎/㎏ 용량으로 hIgG4를 투여하였다. 실험군으로는 3 ㎎/㎏, 6 ㎎/㎏ 또는 12 ㎎/㎏ 용량의 mGI101을 정맥투여 하였다. 첫 투여 이후 3일에 한 번씩 총 3번 투여를 진행하였다. 매일 종양의 크기를 측정하였다.

[276] 그 결과, 6 mg/kg 및 12 mg/kg 용량의 mGI101를 투여한 실험군에서 일부 측정시점 및 시험종료시점에서 음성대조군과 비교하여 유의하게 억제되었음을 확인하였다(도 43). 또한, 생존율을 측정한 결과, 6 mg/kg 용량의 mGI101를 투여한 실험군에서 일부 측정시점 및 시험종료시점에서 음성대조군과 비교하여 유의하게 개선되었음을 확인하였다(도 44).

[277] **실험예 16. 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서의 GI101의 항암효과 확인**

[278] **실험예 16.1. 종양 억제 효과 확인**

[279] 오리엔트 바이오에서 분양 받은 BALB/c 마우스(암컷, 7주)를 7일의

적응기간을 거친 후에 5x10^6 세포수의 CT-26 암세포주(ATCC, U.S.A.)를 0.1 ㎖ PBS에 부유하여 마우스의 우측 등 부위의 피하에 투여하여 동종이식하였다. 암세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 종양의 부피를 측정하여 약 50 mm^3 내지 200 mm^{3}에 도달한 개체들을 선별한 후, 선별한 마우스의 종양의 크기 및 체중을 기초로 하여 균등하도록 각 군당 10마리씩 분류하였다. 그 후, 일회용 주사기(31G, 1 ㎖)를 이용하여 음성대조군에는 약물을 투여하지 않았으며, 양성대조군으로는 5 ㎎/㎏ 용량의 항 PD-1 항체 또는 5 ㎎/㎏ 용량의 항 PD-1 항체와 5㎎/㎏ 용량의 항 CTLA-4 항체를 정맥투여하였다. 실험군으로는 0.1 ㎎/㎏ 또는 1 ㎎/㎏ 용량의 GI101를 정맥투여 하였다. 첫 투여 이후 3일에 한 번씩 총 3번 투여를 진행하였다. 매일 종양의 크기를 측정하였다.

[280] 그 결과, CT-26 암세포주 식립 마우스에서 음성대조군에 비해 항 PD-1 항체, 항 PD-1 항체와 항 CTLA-4 항체, 0.1 ㎎/㎏ 또는 1 ㎎/㎏ 용량의 GI101을 투여한 군 모두 유의미하게 종양의 성장을 억제했다. 특히, 항 PD-1 항체 처리군에 비해 0.1 ㎎/㎏ GI101를 투여한 실험군에서 유의미한 종양 억제 효과를 나타냈다(* $p < 0.05$)(도 45).

[281] **실험예 16.2. 암 조직 내 면역세포 분석**

[282] 상기 실험예 16.1의 각 군의 마우스를 종양의 부피가 평균적으로 200 mm^{3}에 도달하였을 때에 희생시켜, 암 조직을 채취하였다. 그 후, 암 조직 내 면역세포를 분석하기 위해 암조직을 단일 세포 수준으로 분리 후, 다음의 항체를 사용하여 암 조직 내 면역세포에 대한 FACS 분석을 수행하였다. 항체는 구체적으로, Anti-mouse-CD3(Biolegend, Cat. No. 100320), Anti-mouse-CD4(Biolegend, Cat. No. 100526), Anti-mouse-CD8(Biolegend, Cat. No. 100750), Anti-mouse-FoxP3(eBioscience, Cat. No. 12-5773-82), Anti-mouse-CD25(Biolegend, Cat. No. 102049), Anti-mouse-CD44(eBioscience, Cat. No. 61-0441-82), Anti-mouse-PD-1(Biolegend, Cat. No. 135218), Anti-mouse-IFN-gamma(Biolegend, Cat. No. 505832), Anti-mouse-CD49b(Biolegend, Cat. No. 108906), Anti-mouse-H2(Invitrogen, Cat. No. A15443), Anti-mouse-CD11c(Biolegend, Cat. No. 117343), Anti-mouse-CD80(eBioscience, Cat. No. 47-4801-82), Anti-mouse-CD86(Biolegend, Cat. No. 104729), Anti-mouse-F4/80(eBioscience, Cat. No. 47-4801-82) 및 Anti-mouse-CD206(eBioscience, Cat. No. 17-2061-80)을 사용하였다.

[283] 그 결과, 0.1 ㎎/㎏의 GI101을 투여한 실험군에서 5 ㎎/㎏ 용량의 항 PD-1 항체를 단독투여한 양성대조군에 비해 CD8+ T 세포가 유의미하게 증가했다(* $p < 0.05$, 도 46 및 도 47). 나아가, GI101을 투여한 실험군 모두에서 T 세포에서의 IFN-γ의 발현이 음성대조군에 비해 유의미하게 증가했다(* $p < 0.05$, 도 46 및 도 47). 또한, 0.1 ㎎/㎏의 GI101을 투여한 실험군에서 M1 대식세포가 음성대조군과 항 PD-1 항체를 단독투여한 양성대조군에 비해 증가했다(도 48 및 도 49). 또한, GI101을 투여한 실험군 모두에서 대식세포와 수지상세포의 CD86 발현이

증가했다(*p < 0.05, 도 48 내지 도 51).

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

[285] **실험예 17.1. 종양 억제 효과 확인**

[286] 오리엔트 바이오(Korea)에서 분양 받은 C57BL/6 마우스(암컷, 7주)를 7일의 적응기간을 거친 후에 5x10^6 세포수의 LLC2 암세포주(ATCC, U.S.A.)를 0.1 ㎖ PBS에 부유하여 마우스의 우측 등 부위의 피하에 투여하여 동종이식하였다. 암세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 종양의 부피를 측정하여 약 50 mm^3 내지 200 mm^{3}에 도달한 개체들을 선별한 후, 선별한 마우스의 종양의 크기 및 체중을 기초로 하여 균등하도록 각 군당 10마리씩 분류하였다. 그 후, 일회용 주사기(31G, 1 ㎖)를 이용하여 음성대조군에는 약물을 투여하지 않았으며, 양성대조군으로는 5 ㎎/㎏ 용량의 항 PD-1 항체 또는 5 ㎎/㎏ 용량의 항 PD-1 항체와 5 ㎎/㎏ 용량의 항 CTLA-4 항체를 정맥투여하였다. 실험군으로는 0.1 ㎎/㎏ 또는 1 ㎎/㎏ 용량의 GI101를 정맥투여 하였다. 첫 투여 이후 3일에 한 번씩 총 3번 투여를 진행하였다. 매일 종양의 크기를 측정하였다.

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

[288] **실험예 17.2. 암 조직 내 면역세포 분석**

[289] 상기 실험예 17.1의 각 군의 마우스를 종양의 부피가 평균적으로 200 ㎣에 도달하였을 때 희생시켜, 암 조직을 채취하였다. 그 후, 암 조직 내 면역세포를 분석하기 위해 실험예 16.2와 동일한 방법으로 FACS 분석을 수행하였다.

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

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

[292] 오리엔트 바이오에서 분양 받은 BALB/c 마우스(암컷, 7주)를 7일의 적응기간을 거친 후에 5x10^6 세포수의 CT-26 암세포주(ATCC, U.S.A.)를 0.05 ㎖ 페놀레드 무첨가 마트리겔 매트릭스(BD)와 혼합하여 마우스의 우측 등 부위의 피하에 0.1 ㎖씩 투여하여 동종이식하였다. 암세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 종양의 부피를 측정하여 약 28 ㎣에 도달한 개체들을 선별한 후, 선별한 마우스의 종양의 크기 및 체중을 기초로 하여 균등하도록 각 군당 10마리씩 분류하였다. 그 후, 일회용 주사기(31G, 1 ㎖)를 이용하여 음성대조군에는 6 ㎎/㎏ 용량으로 hIgG4를 투여하였다. 실험군으로는 3 ㎎/㎏, 6 ㎎/㎏ 또는 12 ㎎/㎏ 용량의 mGI102-M61을 정맥투여 하였다. 첫 투여 이후 3일에 한 번씩 총 3번 투여를 진행하였다. 매일 종양의 크기를 측정하였다.

[293] 그 결과, 12 mg/kg 용량의 mGI102-M61을 투여한 실험군에서 일부 측정시점 및

시험종료시점에서 음성대조군과 비교하여 유의하게 억제되었음을 확인하였다(도 56). 또한, 생존율을 측정한 결과, 12 mg/kg 용량의 mGI102-M61을 투여한 실험군에서 일부 측정시점 및 시험종료시점에서 음성대조군과 비교하여 유의하게 개선되었음을 확인하였다(도 57).

[294] **실험예 19. 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서의 mGI101의 항암효과 확인**

[295] 오리엔트 바이오(Korea)에서 분양 받은 BALB/c 마우스(암컷, 7주)를 7일의 적응기간을 거친 후에 $5x10^6$ 세포수의 CT-26 암세포주(ATCC, USA)를 0.05 ㎖ 페놀레드 무첨가 마트리겔 매트릭스(BD)와 혼합하여 마우스의 우측 등 부위의 피하에 0.1 ㎖씩 투여하여 동종이식하였다. 암세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 종양의 부피를 측정하여 약 200 ㎣ 내지 250 ㎣에 도달한 개체들을 선별한 후, 선별한 마우스의 종양의 크기 및 체중을 기초로 하여 균등하도록 각 군당 10마리씩 분류하였다.

[296] 그 후, 일회용 주사기(31G, 1 ㎖)를 이용하여 음성대조군에는 4 ㎎/㎏ 용량으로 hIgG4를 투여하였다. 실험군으로는 1 ㎎/㎏, 4 ㎎/㎏ 또는 6 ㎎/㎏ 용량의 mGI101를 정맥투여 하였다. 추가적으로, 4.9 mg/kg의 mCD80 또는 2.8 mg/kg의 Fc-IL-2v(GI101C2)를 투여한 군도 대조군으로 설정하였다. 뿐만 아니라, 4.9 mg/kg의 mCD80 및 2.8 mg/kg의 Fc-IL-2v(GI101C2)를 동시에 투여한 군도 대조군으로 설정하였다.

[297] 종양의 부피측정에서 6 mg/kg 용량의 mGI101 투여군에서 일부 측정시점 및 시험종료시점에서 음성대조군과 비교하여 유의하게 억제되었음을 확인하였다. mCD80 및 Fc-IL-2v(GI101C2)의 병용투여군과 비교하여 종양성장억제율이 병용투여군과 비교하여 우수한 것으로 나타났다(도 58 및 도 59).

[298] 결론적으로, BALB/c 마우스에 동종이식한 BALB/c 마우스 유래 대장암 세포주인 CT-26의 종양성장 억제 효능시험에서 시험물질인 mGI101은 본 시험 조건하에서 mCD80 및 IL-2v 단일제제에 대해 종양억제 효능이 입증되었고, mCD80과 IL-2v의 병용투여군 대비 우수한 항암효능을 확인되었다(도 58 및 도 59). 특히, 6 mg/kg 용량의 mGI101 투여군에서 음성대조군 및 mCD80 및 Fc-IL2v(GI101C2)의 병용투여군과 비교하여 종양의 크기가 유의하게 억제되었다.

[299] **V. 융합단백질 이량체 및 면역관문 억제제 병용 투여에 따른 항암효과 확인**

[300] **실험예 20. 인간 유래 유방암세포 식립 마우스에서 GI101 및 항 PD-1 항체 병용투여에 의한 항암 효과 확인**

[301] 본 시험은 NSGb2m 마우스에 human PBMC를 이종 이식하여 제작한 humanized mouse model을 이용하여, 인간 유래 유방암세포, MDA-MB-231 세포를 이종 이식한 종양모델에서 시험물질인 GI101과 양성 대조물질로서 항 PD-1 항체인 키트루다(Pmembrolizumab, MSD)를 단독 및 병용 복강내 투여한 후 종양의 성장 억제효과를 평가한 것이다.

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

[303] [표2]

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

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

[305] [표3]

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

[306] 시험에 사용할 세포는 해동하여 세포 배양용 플라스크에 넣고 37℃, 5% CO_2 incubator(MCO-170M, Panasonic, Japan)에서 배양하였다. Trypsin-EDTA(Cat. 25200-072, Thermofisher scientific, U.S.A.)를 이용하여 부유시켰다. 부유된 세포는 원심분리기를 이용하여 원심분리(125xg, 5분)하여 모으고, 새로운 배지와

새 플라스크에 옮겨 계대 배양했다. 세포주 이식 일에 배양된 세포를 원심분리 튜브에 넣은 후 회수한 다음, 원심분리(125xg, 5분)하여 상층 액을 버리고 PBS(Cat. LB 001-04, Welgene, KOREA)로 세포 부유액(5x10^6 세포수/0.05 ㎖)을 만들어 inoculation 전까지 ice에 보관했다.시험에는 8주령 암컷 NSGb2m(NOD.Cg-B2m^{tm1Unc}Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) 마우스를 중아바이오(Korea)에서 구입하여 이용하였다. 검역·순화기간 종료 후 익일에 체중을 측정한 후, 건강한 동물에 대하여 준비된 인간 유래 PBMC 세포부유액(5x10^6 세포수/0.2 ㎖)을 일회용 주사기에 충진하여 동물의 미정맥에 투여했다. 세포 이식 후 매일 1회 일반증상을 관찰했다.

[307] 준비된 MDA-MB-231 세포부유액(5x10^6 세포수/0.05 ㎖)에 페놀레드 무함유 마트리겔 매트릭스(0.05 ㎖, 356237, BD, U.S.A.)를 가하여 조제한 용액을 일회용 주사기에 충진하여 인간 PBMC를 이식한 동물의 우측 등 부위의 피하에 0.1 ㎖/head씩 투여하여 이식했다. 세포주의 이식 후 생착 및 성장기간 동안 매일 1회 일반증상을 관찰했다.

[308] 세포를 이식하고 일정기간 경과 후에 동물의 건강상태에 이상이 없는 동물에 대해 종양의 부피를 측정하여, 각 군의 평균이 40 ~ 80 ㎣에 도달하도록 개체 32마리를 선별했다. 선별된 동물은 종양의 부피 및 체중을 기초로 하여 가능한 균등하도록 군당 8마리 씩, 총 4군으로 군 분리했다.

[309] 표 4와 같이 시험군을 구성하였다. 시험물질은 일회용 주사기(31G, 1 ㎖)를 이용하여 동물에 투여하였으며, 투여 빈도는 2회/주로 총 4회 투여를 진행하였다.

[310] [표4]

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

[311] 관찰기간 동안 매일 1회 외관, 행동 및 배설물 등의 일반증상을 관찰하고, 사망동물을 확인했다. 체중은 세포주 이식일, 주 2회 및 동물 희생 당일에 측정했다.

[312] 관찰기간 동안 주 3회, 캘리퍼스(Digital caliper, mitutoyo, Japan)를 사용하여 종양의 장축(maximum length, L)과 단축(perpendicular width, W)을 측정하고, 다음의 계산식에 대입하여 종양의 부피(tumor volume, TV)를 계산했다.

[313] **<수학식 1>**

[314] $TV\ (㎣) = (W^2XL)/2$

[315] **<수학식 2>**

[316] %TGI(Tumor Growth Inhibition)= (1-(Ti-T0)/(Vi-V0))X100

[317] 각 개체의 투여 전의 종양의 부피는 군 분리 시 측정된 값으로 설정했다.

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

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

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

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

[322] 본 시험은 C57BL/6 마우스에 MC38(murine colon adenocarcinoma cells) 세포를 동종 이식한 종양모델에서 시험물질인 mGI101과 양성 대조물질로서 항 PD-1 항체를 단독 및 병용으로 복강내 투여한 후 종양의 성장 억제효과를 평가한 것이다.

[323] 설치류 유래 대장암 세포인 MC38(murine colon adenocarcinoma cells)를 Kerafast(USA)에서 구입하여 시험에 사용하였다. MC38 세포는 10% 우태아 혈청(Gibco) 및 1% 항생제/항진균제(Gibco)를 포함하는 RPMI1640 배지(Gibco)에서 배양하였다. 배양한 세포는 트립신을 이용하여 수확한 후 PBS에 현탁하였다. 동종 이식 종양모델을 확립하기 위해 C57BL/6 암컷 마우스(7주령) 오른쪽 옆구리에 s.c.로 $1x10^6$개의 MC38 세포를 주입하였다.

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

[325] [표5]

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

[326] 시험기간 동안 매일 1회 질병 및 행동변화 등의 임상증상을 관찰하고, 사망동물을 확인했다. 시험기간이 끝나고 동물을 희생하였다. MC38 고형암의 크기는 종양 3D 스캐너(TM900, Peria, belgium)를 이용하여 측정하였다. 각 실험군에 대해 평균 체중 감소 및 백분율 변화와 평균 종양 성장 저해를 계산하였다. 항 종양 효능은 vehicle 대조군과 비교하여 평가하였다.

[327] 모든 통계 계산은 Prism 8.0(Graph Pad Software Inc, USA)을 사용하여 수행하였다. 종양 부피 측정의 비교는 일원 분산 분석(종료 시간)에 이어 Bonferroni의 다중 비교 테스트를 통해 이루어졌다. 0.05 미만의 p 값은 유의미한 것으로 간주되었다.

[328] 모든 시험동물은 mGI101 투여 및 항 PD-1 항체와의 병용 투여 후 병리학적 이상 징후없이 건강한 상태를 유지하였다. MC38 종양에 대해 mGI101 및/또는 항 PD-1 항체를 사용한 병용 요법의 결과는 도 67 내지 도 73과 같다. 대조군과 비교하여 약물 처리 군에서 항암 효과가 관찰되었으며, 종양 크기 차이는 16일의 시험기간 동안 눈에 띄게 나타났다. MC38 종양은 이전 문헌에서 항 PD-1 항체에 대한 반응 모델로 알려져 있고 본 시험의 항 PD-1 항체 투여군에서도 항암 효과가 관찰되었다($p > 0.01$). 항 PD-1 항체 투여군 만큼 mGI101(6 mpk) 단독 투여군에서도 항암 효과가 나타났다($p > 0.01$). mGI101(0.6 mpk) + anti-PD-1(5 mpk) 병용 투여군은 현저히 우수한 항암 효과를 나타냈다($p > 0.0001$).

[329] 시험군별 개별 종양 크기는 도 69 내지 도 73과 같다. 개별 종양 크기 결과에 따르면, 항 PD-1 항체 투여군 중 일부 동물에서 경미한 종양 퇴행이 관찰되었다. mGI101(6 mpk) 단독 투여군은 항 PD-1 항체 투여군에 비해 더 우수한 종양 성장 저해 효과를 나타냈다. 종양 크기는 5-7일까지 같은 크기로 유지되었으나 7일 후에 재성장 하였다. 종양 크기는 5-7일까지 같은 크기로 유지되었으나 7일 후에 재성장하였다. 병용 투여군(GI101(0.6 mpk) + 항 PD-1 항체(5 mpk))은 현저히 우수한 종양 성장 저해를 나타냈다. 특히, 병용 투여군 중 2마리는 완전 관해(complete response, 종양 없음)를 보였다.

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

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

[332] [표6]

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

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

[333] **실험예 22. 마우스 유래 대장암세포 식립 마우스에서 mGI101 및 항 PD-L1 항체 병용투여에 의한 항암 효과 확인**

[334] 본 시험은 BALB/c 마우스에 CT26(murine colon carcinoma cells) 세포를 동종 이식한 종양모델에서 시험물질인 mGI101과 양성 대조물질로서 항 PD-L1 항체(BioXcell, Cat# BE0101)를 단독 및 병용으로 투여한 후 종양의 성장 억제효과를 평가한 것이다.

[335] CT26 세포는 10% 우태아 혈청(Gibco) 및 1% 항생제/항진균제(Gibco)를 포함하는 RPMI1640 배지(Gibco)에서 배양하였다. 배양한 세포는 트립신을 이용하여 수확한 후 PBS에 현탁하였다. 동종 이식 종양모델을 확립하기 위해 BALB/c 암컷 마우스(7주령) 오른쪽 옆구리에 피하로 $5x10^5$개의 CT26 세포를 주입하였다.

[336] 마우스는 종양 부피(50 ~ 120 mm^3)를 기준으로 그룹당 4마리를 무작위로 할당하였다. 종양 이식편은 세포 접종 후 약 2일째에 확인되었다. 표 7과 같이 시험군을 구성하고 시험물질을 투여하였다.

[337] [표7]

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

[338] 시험기간 동안 매일 1회 질병 및 행동변화 등의 임상증상을 관찰하고, 사망동물을 확인했다. 시험기간이 끝나고 동물을 희생하였다. CT26 고형암의 크기는 종양 3D 스캐너(TM900, Peria, belgium)를 이용하여 측정하였다. 각 실험군에 대해 평균 체중 감소 및 백분율 변화와 평균 종양 성장 저해를 계산하였다. 항 종양 효능은 vehicle 대조군과 비교하여 평가하였다.

[339] 모든 통계 계산은 Prism 8.0(Graph Pad Software Inc, USA)을 사용하여 수행하였다. 종양 부피 측정의 비교는 일원 분산 분석(종료 시간)에 이어 Bonferroni의 다중 비교 테스트를 통해 이루어졌다. 0.05 미만의 p 값은 유의미한 것으로 간주되었다.

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

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

[342] 본 시험은 BALB/c 마우스에 CT26(murine colon carcinoma cells) 세포를 동종 이식한 종양모델에서 시험물질인 mGI101과 양성 대조물질로서, 서열번호 39의 아미노산 서열을 가지는 TIGIT의 세포외도메인(ECD)에 특이적으로 결합하는 항 TIGIT 항체를 단독 및 병용으로 투여한 후 종양의 성장 억제효과를 평가한 것이다.

[343] CT26 세포는 10% 우태아 혈청(Gibco) 및 1% 항생제/항진균제(Gibco)를 포함하는 RPMI1640 배지(Gibco)에서 배양하였다. 배양한 세포는 트립신을 이용하여 수확한 후 PBS에 현탁하였다. 동종 이식 종양모델을 확립하기 위해 BALB/c 암컷 마우스(7주령) 오른쪽 옆구리에 피하로 $5x10^5$개의 CT26 세포를 주입하였다.

[344] 마우스는 종양 부피(50 ~ 120 mm^3)를 기준으로 그룹당 5마리를 무작위로 할당하였다. 종양 이식편은 세포 접종 후 약 2일째에 확인되었다. 표 8과 같이 시험군을 구성하고 시험물질을 투여하였다.

[345] [표8]

실험군		투여경로, 투여 주기	투여용량	동물 수
G1	Vehicle control(PBS)	*i.p.* BIW x 9 days	-	5
G2	mGI101	*i.v.* QW x 9 days	3 mg/kg	5
G3	Anti-TIGIT antibody (Merck, MK-7684)	*i.p.* BIW x 9 days	20 mg/kg	5
G4	mGI101 + anti-TIGIT antibody	*i.v.* QW x 9 days (mGI101)	3 mg/kg	5
		i.p. BIW x 9 days (anti-TIGIT antibody)	20 mg/kg	

[346] 시험기간 동안 매일 1회 질병 및 행동변화 등의 임상증상을 관찰하고, 사망동물을 확인했다. 시험기간이 끝나고 동물을 희생하였다. CT26 고형암의 크기는 종양 3D 스캐너(TM900, Peria, belgium)를 이용하여 측정하였다. 각 실험군에 대해 평균 체중 감소 및 백분율 변화와 평균 종양 성장 저해를

계산하였다. 항 종양 효능은 vehicle 대조군과 비교하여 평가하였다.

[347] 모든 통계 계산은 Prism 8.0(Graph Pad Software Inc, USA)을 사용하여 수행하였다. 종양 부피 측정의 비교는 일원 분산 분석(종료 시간)에 이어 Bonferroni의 다중 비교 테스트를 통해 이루어졌다. 0.05 미만의 p 값은 유의미한 것으로 간주되었다.

[348] CT26 동종 종양 모델에서 mGI101 단독 및 항 TIGIT 항체와의 조합에 대한 항 종양 효능을 시험한 결과, 병용 투여군(mGI101 (3 mpk) + anti-TIGIT (20 mpk))에서 가장 우수한 항 종양 효능이 나타났다(도 76). 항 TIGIT 항체 단독 투여군은 대조군과 비교하여 항 종양 효과가 관찰되지 않았으나 mGI101과의 병용 투여시 mGI101 단독 투여군과 비교하여 현저히 우수한 항 종양 효과를 나타냈다.