

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024년 2월 29일 (29.02.2024)



(10) 국제공개번호
WO 2024/043643 A1

- (51) 국제특허분류:
C07K 14/55 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2023/012348
- (22) 국제출원일: 2023년 8월 21일 (21.08.2023)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2022-0105643 2022년 8월 23일 (23.08.2022) KR
10-2023-0057361 2023년 5월 2일 (02.05.2023) KR
- (71) 출원인: 머스트바이오 주식회사 (MUSTBIO CO., LTD.) [KR/KR]; 08390 서울특별시 구로구 디지털로 26길 123, 6층, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 방효주 (BANG, Hyo Joo); 15578 경기도 안산시 상록구 성안1길 33, 204호, Gyeonggi-do (KR).

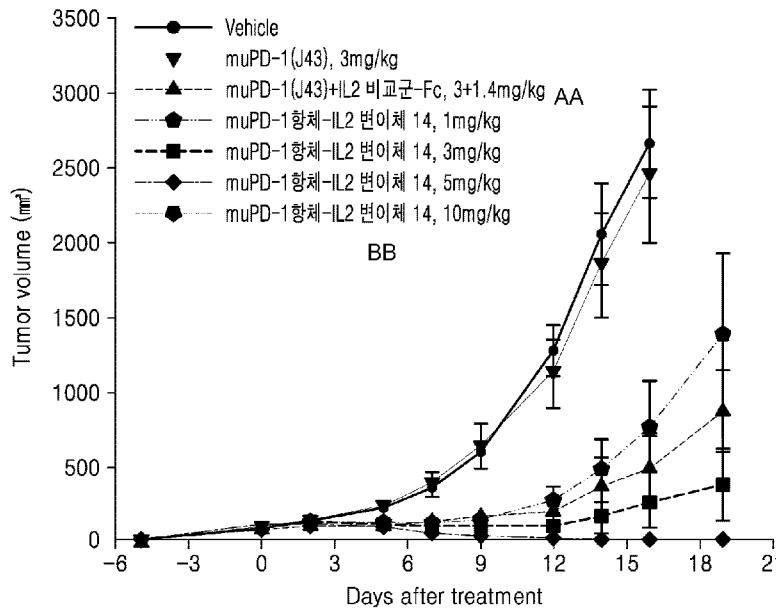
정용준 (JUNG, Yong Jun); 16509 경기도 수원시 영통구 에듀타운로 101, 102동 1508호, Gyeonggi-do (KR). 정성엽 (JUNG, Sung Youb); 16507 경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 107, 101동 904호, Gyeonggi-do (KR). 박영진 (PARK, Young Jin); 16509 경기도 수원시 영통구 도청로 65, 5413동 701호, Gyeonggi-do (KR). 강석찬 (KANG, Seok Chan); 14547 경기도 부천시 소향로 181, 106동 401호, Gyeonggi-do (KR). 박봄 (PARK, Bom); 16505 경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 76, 6103동 701호, Gyeonggi-do (KR). 박상현 (PARK, Sang Hyun); 16531 경기도 수원시 영통구 매여울로61번길 3, 202호, Gyeonggi-do (KR). 조선정 (CHO, Sun Jung); 13611 경기도 성남시 분당구 느티로 70, 407동 504호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 리앤목 특허법인 (Y.P.LEE, MOCK & PARTNERS); 06292 서울특별시 강남구 언주로 30길 13 대림아크로텔 12층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,

(54) Title: IL2 VARIANT AND PROTEIN COMPLEX COMPRISING SAME

(54) 발명의 명칭: IL2 변이체 및 이를 포함하는 단백질 복합체



AA ... muPD-1(J43)+IL2 comparison group-Fc
BB ... muPD-1 antibody-IL2 variant 14

(57) Abstract: The present invention relates to an IL2 variant and a protein complex comprising same, a production method therefor, and a use thereof, the protein complex selectively increasing effector T cell activity, thereby being capable of reducing side-effects and maximizing anticancer activity, and thus being usable for the prevention or treatment of various cancer-related immune disorders.

(57) 요약서: IL2 변이체 및 이를 포함하는 단백질 복합체, 이의 생산방법 및 용도에 관한 것으로, 상기 단백질 복합체는 효과 T 세포의 활성을 선택적으로 증가시킴으로써 부작용은 낮추고, 항암 활성은 극대화할 수 있는 바, 암과 관련된 다양한 면역 질환의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

[다음 쪽 계속]



WO 2024/043643 A1

AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: IL2 변이체 및 이를 포함하는 단백질 복합체 기술분야

- [1] 본 출원은 2022년 8월 23일 출원된 대한민국 특허출원 제10-2022-0105643호 및 2023년 5월 2일 출원된 대한민국 특허출원 제10-2023-0057361호를 우선권으로 주장하고, 상기 명세서 전체는 본 출원의 참고문헌이다.
- [2] IL2 변이체 및 이를 포함하는 단백질 복합체, 이의 생산방법 및 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [3] 면역 관문(immune checkpoints)은 암세포가 면역체계의 공격을 피하는데 이용하는 면역세포의 표면 단백질을 말하며, 암세포는 세포 표면에 PD-L1을 발현시켜 T 세포의 면역 관문의 일종인 PD-1과 결합함으로써 T 세포의 활성화 및 암세포 사멸 능력을 억제한다. 면역관문억제제는 인체 내 면역시스템을 활성화해 면역세포가 선택적으로 암세포를 공격하게 함으로써 암세포를 직접 공격하는 기존 항암제의 부작용 및 내성 문제를 일부 해결할 수 있다. 또한, 다양한 암 종에서 효력을 확인하여 다수의 면역관문억제제가 시판 승인을 받았다. 그러나, 그 치료율(overall response rate, ORR)이 평균 30% 내외로 여전히 극복해야 될 문제점이 많다. 이를 극복하기 위하여 면역관문억제제의 효력을 높이기 위한, 면역관문억제제와의 병용 투여 및 이중작용제의 하나로 인터루킨이 중요하게 여겨지고 있다.
- [4] 그 중 인터루킨 2(IL2: interleukin-2)는 133 아미노산 길이를 가지며, 림프구 생성, 생존 및 항상성에 중심 역할을 하는 15.5 kDa의 구상 당단백질이다. IL2는 활성화된 T 세포 중 특히, CD4+ 헬퍼 T 세포(helper T cell)에 의해 주로 생성되어 T 세포의 증식 및 분화를 자극하고 세포독성 T 림프구(Cytotoxic T lymphocyte, CTL)의 생성 및 자연살해세포(Natural Killer cell, NK cell)의 생성, 증식 활성을 자극한다. 따라서 IL2는 생체 내에서 림프구 개체군을 증대시키고, 상기 면역세포들의 기능을 증대시킬 수 있는 바, 현재 전이성 신세포암 및 악성 흑색종을 갖는 환자에서 IL2를 이용한 치료가 승인되어 사용되고 있다.
- [5] IL2의 림프구 세포 활성화는 IL-2 수용체 α (IL2 receptor α , IL2R α ; CD25), IL-2 수용체 β (IL2 receptor β , IL2R β ; CD122) 및 공통 사이토카인 수용체 γ (IL2R γ ; CD132)라 불리는 서로 다른 3개의 IL2 수용체 (IL2R) 조합들과의 결합에 의해 그의 작용이 매개되고 있다. 각각의 서브유닛 수용체의 분포는 세포마다 상이하며 IL2와의 결합력 또한 각 수용체마다 크게 다르다. 고친화성 IL2R는 3가지 서브유닛(α , β , γ)의 삼량체로 구성되며, β 및 γ 서브유닛으로 이루어지는 이량체성 IL2 수용체를 중간-친화성 IL2R이라 칭한다. 이량체성 중간-친화성 IL2R는 삼량체성 고친화성 수용체보다 대략 100배 더 낮은 친화성으로 IL2와 결합하지만, 상기 이량체

성 및 삼량체성 IL2R는 IL2 결합시 신호를 전달할 수 있다. 따라서, α -서브유닛, CD25는 IL2 신호전달에 필수적이지 않다. 상기 α -서브유닛은 그의 수용체에 고친화성 결합을 부여하는 반면, α -서브유닛, 및 α -서브유닛은 신호전달에 중요하다. CD25를 포함한 삼량체성 IL2는 조절 T 세포(regulatory T cell) 및 내피 세포에 의해 발현된다. 상기 삼량체성 IL2R는 또한 통상적인 활성화된 T 세포 상에서 일시적으로 유도되는 반면, 상기 T 세포는 휴지 상태에서 이량체성 IL2R만을 발현한다(Nature Review Immunology, 2012 12:180-190).

- [6] 조절 T 세포는 면역계를 조절하는 T 세포들 중 한 집단으로, 자가 항원에 대한 관용(Immune-tolerance)을 유지하고 자가면역 질병에 관여하며, 일반적으로 효과 T 세포(effector T cell)의 활성화 유도 및 증식을 억제하거나 하향조절하여 암 치료의 효력을 저해한다. 조절 T 세포는 최고 수준의 CD25를 지속적으로 발현하여 효과 T 세포보다 IL2의 결합력이 높으므로, IL2를 이용한 암 치료시 효력을 저해하는 문제로 대두되고 있다.
- [7] IL2 면역요법과 관련하여, 재조합 인간 IL2 치료에 의해 생성되는 부작용이 문제되고 있다. 고용량 IL2 치료를 받는 환자는 중증의 심혈관, 폐, 신장, 간, 위장, 신경, 피부, 혈액 질환 등의 전신 부작용을 흔히 경험하는데, 이는 집중적인 모니터링과 환자 입원 관리를 요한다. 이러한 부작용 발생의 주요 원인으로서는 다수의 장기에서 체액 혈관외유출(예를 들어 폐 및 피부 부종 및 간세포 손상을 일으킨다) 및 혈관내 체액 고갈(혈압 강하 및 보상성 심박수증가를 일으킨다)에 이르는 혈관 투과성의 병적인 증가인, 소위 혈관(또는 모세관) 누출 증후군 (vesicular leakage syndrome, VLS)의 발생에 의해 설명될 수 있다. 상기 VLS는 IL2의 투여 중단 외에 다른 치료 방법이 없다. IL2의 저용량 투여는 VLS를 피하기 위해 환자에서 시험되었으나, 암 치료 효율이 낮아지는 부적절한 치료 대가가 발생하였다. VLS는 IL2-활성화된 NK 세포로부터의 염증 사이토카인, 예를 들어 종양괴사인자 (TNF)- α 의 방출에 의해 야기되는 것으로 여겨졌으나, 최근, IL2에 의해 유발된 폐부종이 폐 내피세포(낮거나 또는 중간 수준의 삼량체성 IL2R을 발현하였다)에 의해 IL2의 직접적인 결합으로부터 생성됨이 입증되었다(International Immunology, 2006 vol. 18, no. 10 :1461-1471).
- [8] 따라서, IL2의 면역 항암의 치료제로서의 가능성에도 불구하고, 독성 및 부작용을 감소하고 치료학적 효능을 높이기 위하여 효과 T 세포(effector T cell)를 선택적으로 활성화시키는 IL2 변이체와 이에 대한 Fc(fragment crystallizable) 영역, 면역관문억제제 및 암세포 특이적 항원에 대한 항체 등을 활용하여 상기 IL2에 의한 암 치료의 부작용을 최소화하고, 효력을 높일 수 있는 새로운 치료 방법의 개발이 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 일 양상은 IL2 변이체를 포함하는 단백질을 제공하는 것이다.

- [10] 다른 양상은 IL2 변이체, 제1 CH3 항체 불변 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 및 제2 CH3 항체 불변 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드; 및 면역관문억제제 (immune checkpoint inhibitor)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 종양특이적항원(tumor associated antigen)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 단백질 복합체를 제공하는 것이다.
- [11] 또 다른 양상은 상기 단백질 또는 상기 단백질 복합체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [12] 또 다른 양상은 상기 단백질 또는 상기 단백질 복합체를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [13] 또 다른 양상은 상기 단백질 또는 상기 단백질 복합체를 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [14] 또 다른 양상은 암 치료제의 제조를 위한, 상기 단백질 또는 단백질 복합체의 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [15] 일 양상은 IL2 변이체를 포함하는 단백질로서, 상기 IL2 변이체는 35, 38, 42, 및 125로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 위치에, 글루탐산(E), 알라닌(A), 라이신(K), 및 세린(S)으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산을 포함하는, 단백질을 제공한다.
- [16] 상기 IL2 변이체는 서열번호 16의 아미노산을 포함하는 야생형 IL2의 아미노산 중 하나 이상이 치환된 것일 수 있다. 상기 IL2 변이체는 IL2의 활성이 유지되는 한, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개 이상의 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 IL2 변이체는 서열번호 16의 아미노산을 포함하는 야생형 IL2 아미노산의 18, 19, 35, 38, 42, 125 및 126으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 위치가 치환된 것일 수 있다.
- [17] 구체적으로, 상기 IL2 변이체는 18, 19, 35, 38, 42, 125 및 126으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 위치에, 메티오닌(M), 아르기닌(R), 알라닌(A), 류신(L), 세린(S), 페닐알라닌(F), 발린(V), 이소류신(I), 글루타민(Q), 트립토판(W), 아스파라긴(N), 트레오닌(T), 글루탐산(E), 및 라이신(K)으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [18] 상기 IL2 변이체는 아미노산의 치환에 의하여 IL2 수용체와의 결합력이 증가하거나 또는 감소하는 것일 수 있다. 예를 들어, IL2R α 및/또는 IL2R $\beta\gamma$ 와의 결합력을 감소시킬 수 있다. 따라서, 상기 IL2 변이체는 IL2R와의 결합력을 감소시킴으로써, IL2에 의한 면역 활성을 저해하는 조절 T 세포 대비 효과 T 세포를 선택적으로 활성화시킬 수 있다.
- [19] 일 구체예에 있어서, 상기 IL2 변이체는 35 위치에 글루탐산(E), 38 위치에 알라닌(A), 42 위치에 라이신(K), 및 125 위치에 세린(S)을 포함할 수 있다.

- [20] 다른 구체예에 있어서, 상기 IL2 변이체는 18 및 19로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 위치에, 류신(L), 메티오닌(M), 아르기닌(R), 알라닌(A), 세린(S), 페닐알라닌(F), 발린(V), 이소류신(I), 글루타민(Q), 트립토판(W), 아스파라긴(N), 및 트레오닌(T)으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산을 추가로 포함할 수 있다.
- [21] 또 다른 구체예에 있어서, 상기 IL2 변이체는 126 위치에 트레오닌(T) 및 이소류신(I)으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산을 추가로 포함할 수 있다.
- [22] 예를 들어, 상기 IL2 변이체는
- [23] 18 위치에 메티오닌(M), 아르기닌(R), 알라닌(A), 류신(L), 세린(S), 페닐알라닌(F), 발린(V), 이소류신(I) 및 글루타민(Q)으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산;
- [24] 19 위치에 세린(S), 류신(L), 트립토판(W), 아스파라긴(N), 이소류신(I), 트레오닌(T), 알라닌(A), 메티오닌(M) 및 페닐알라닌(F)으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산;
- [25] 35 위치에 글루탐산(E);
- [26] 38 위치에 알라닌(A);
- [27] 42 위치에 라이신(K);
- [28] 125 위치에 세린(S); 및
- [29] 126 위치에 트레오닌(T) 및 이소류신(I)으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산;으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산을 포함할 수 있다.
- [30] 구체적으로, 상기 IL2 변이체는
- [31] 35 위치에 글루탐산(E), 38 위치에 알라닌(A), 42 위치에 라이신(K) 및 125 위치에 세린(S);
- [32] 18 위치에 메티오닌(M), 19 위치에 세린(S), 35 위치에 글루탐산(E), 38 위치에 알라닌(A), 42 위치에 라이신(K) 및 125 위치에 세린(S);
- [33] 18 위치에 알라닌(A), 19 위치에 세린(S), 35 위치에 글루탐산(E), 38 위치에 알라닌(A), 42 위치에 라이신(K) 및 125 위치에 세린(S);
- [34] 18 위치에 아르기닌(R), 19 위치에 세린(S), 35 위치에 글루탐산(E), 38 위치에 알라닌(A), 42 위치에 라이신(K) 및 125 위치에 세린(S);
- [35] 18 위치에 메티오닌(M), 19 위치에 류신(L), 35 위치에 글루탐산(E), 38 위치에 알라닌(A), 42 위치에 라이신(K) 및 125 위치에 세린(S);
- [36] 18 위치에 류신(L), 19 위치에 세린(S), 35 위치에 글루탐산(E), 38 위치에 알라닌(A), 42 위치에 라이신(K) 및 125 위치에 세린(S);
- [37] 18 위치에 세린(S), 19 위치에 트립토판(W), 35 위치에 글루탐산(E), 38 위치에 알라닌(A), 42 위치에 라이신(K) 및 125 위치에 세린(S);
- [38] 18 위치에 페닐알라닌(F), 19 위치에 아스파라긴(N), 35 위치에 글루탐산(E), 38 위치에 알라닌(A), 42 위치에 라이신(K) 및 125 위치에 세린(S);

- [39] 18 위치에 발린(V), 19 위치에 이소류신(I), 35 위치에 글루탐산(E), 38 위치에 알라닌(A), 42 위치에 라이신(K) 및 125 위치에 세린(S);
- [40] 18 위치에 이소류신(I), 19 위치에 트레오닌(T), 35 위치에 글루탐산(E), 38 위치에 알라닌(A), 42 위치에 라이신(K) 및 125 위치에 세린(S);
- [41] 18 위치에 글루타민(Q), 19 위치에 알라닌(A), 35 위치에 글루탐산(E), 38 위치에 알라닌(A), 42 위치에 라이신(K) 및 125 위치에 세린(S);
- [42] 18 위치에 메티오닌(M), 19 위치에 메티오닌(M), 35 위치에 글루탐산(E), 38 위치에 알라닌(A), 42 위치에 라이신(K) 및 125 위치에 세린(S);
- [43] 18 위치에 메티오닌(M), 19 위치에 페닐알라닌(F), 35 위치에 글루탐산(E), 38 위치에 알라닌(A), 42 위치에 라이신(K) 및 125 위치에 세린(S);
- [44] 35 위치에 글루탐산(E), 38 위치에 알라닌(A), 42 위치에 라이신(K), 125 위치에 세린(S) 및 126 위치에 트레오닌(T); 및
- [45] 35 위치에 글루탐산(E), 38 위치에 알라닌(A), 42 위치에 라이신(K), 125 위치에 세린(S) 및 126 위치에 이소류신(I);으로 구성된 군에서 선택된 것을 포함할 수 있다.
- [46] 또 다른 구체예에 있어서, 상기 IL2 변이체는 서열번호 1 내지 15로 구성된 군에서 선택되는 아미노산을 포함할 수 있다. 또한, 상기 IL2 변이체는 상기 아미노산을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 56 내지 70으로 구성된 군에서 선택되는 것일 수 있다.
- [47] 또한, 상기 단백질은 링커 또는 캐리어에 의해 결합된 Fc 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 링커는 1 내지 50개의 아미노산, 알부민 또는 이의 단편, 폴리에틸렌글리콜과 같은 공중합체를 포함할 수 있다.
- [48] 일 구체예에 있어서, 상기 링커는 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [49] 다른 구체예에 있어서, 상기 Fc 영역은 서열번호 19 내지 21; 서열번호 22 내지 24; 서열번호 25 내지 27; 서열번호 28 내지 30; 서열번호 31 내지 33; 서열번호 34 내지 36; 서열번호 37 내지 39; 서열번호 40 내지 42; 서열번호 43 내지 45; 및 서열번호 46 내지 48;로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [50] 또한, 상기 단백질은 면역관문억제제(immune checkpoint inhibitor)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 추가로 포함할 수 있다. 상기 면역관문억제제는 예를 들어, PD-L1, PD-1, LAG3, VISTA, BTLA, TIM3, TIGIT, CTLA-4 등일 수 있다.
- [51] 또한, 상기 단백질은 종양특이적항원(tumor associated antigen)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 추가로 포함할 수 있다. 상기 종양특이적항원은 예를 들어, PD-L1, EGFR, HER-2, B7H3, GPC3, CEA, TROP, PSMA 등일 수 있다.
- [52] 따라서, 다른 양상은 IL2 변이체; 및 Fc 영역을 포함하는 단백질 복합체를 제공한다.

- [53] 또한, 다른 양상은 IL2 변이체; 및 면역관문억제제(immune checkpoint inhibitor)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 단백질 복합체를 제공한다.
- [54] 또한, 다른 양상은 IL2 변이체; 및 종양특이적항원(tumor associated antigen)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 단백질 복합체를 제공한다.
- [55] 본 명세서에서 용어, "단백질 복합체"는 2개 이상의 연관된 폴리펩티드로 구성된 복합체로서, 단백질에 한 개 이상의 다른 단백질의 유전자를 연결시킨 후 발현시킨 인공 재조합 단백질을 의미하며, "융합 단백질(fusion protein)"과 혼용하여 사용될 수 있다. 상기 단백질 복합체는 두 개 이상의 단백질을 연결함으로써 그 기능에 시너지효과를 기대할 수 있다. 따라서, 상기 단백질 복합체는 Fc 영역을 포함하는 결합체, 단백질 복합체 또는 융합 단백질로서, IL2의 특정 아미노산을 치환하여 조절 T 세포 대비 효과 T 세포의 활성을 선택적으로 증가시킬 수 있다. 또한, 상기 단백질 복합체는 종양 미세 환경에 특이적으로 분포하고, 면역관문을 억제하며, 면역세포를 활성화시킴으로써 암세포의 사멸을 효과적으로 유도할 수 있는 바 기존 치료제와 비교하여 부작용은 낮추고 항암 활성은 극대화된 치료제를 제공할 수 있다.
- [56]
- [57] 다른 양상은 제1 CH3 항체 불변 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 및 제2 CH3 항체 불변 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하고, 상기 제1 폴리펩티드와 상기 제2 폴리펩티드는 헤테로다이머(heterodimer)를 형성하는 단백질 복합체로서, 상기 제1 또는 제2 폴리펩티드 중 어느 하나 이상의 N-말단에는 면역관문억제제(immune checkpoint inhibitor)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 종양특이적항원(tumor associated antigen)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고, 상기 제1 또는 제2 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단 중 어느 하나 이상에는 IL2 변이체를 포함하는, 단백질 복합체를 제공한다.
- [58] 도 4는 일 구체예에 따른 IL2 변이체를 포함하는 단백질 복합체의 구조를 나타낸다.
- [59] 도 4를 참조하면, 상기 단백질 복합체는 제1 CH3 항체 불변 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드의 N-말단에 면역관문억제제에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 종양특이적항원에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고, 제2 CH3 항체 불변 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드의 N-말단에 IL2 변이체를 포함할 수 있다.
- [60] 또한, 상기 단백질 복합체는 제1 CH3 항체 불변 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 및 제2 CH3 항체 불변 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드의 N-말단에 면역관문억제제에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 종양특이적항원에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고, 제1 또는 제2 폴리펩티드의 C-말단에 IL2 변이체를 포함할 수 있다.
- [61] 상기 IL2 변이체, 면역관문억제제 및 종양특이적항원에 대한 구체적인 내용은 전술한 바와 같다. 상기 단백질 복합체에서, 상기 면역관문억제제에 대한 항체

또는 이의 항원 결합 단편과 암 세포 또는 T 세포 간의 결합력은 T 세포와 IL2 수용체 간의 결합력과 비교하여 우수하다. 따라서, 상기 면역관문억제제에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 일차적으로 암 세포 또는 암 세포 주변의 T 세포와 결합함으로써, 전신에 면역 세포의 활성화를 유도할 수 있는 IL2 수용체 결합에 의한 부작용을 감소시킬 수 있다. 또한, 상기 종양특이적항원에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 암 세포에 특이적으로 결합할 뿐만 아니라, IL2 수용체 결합 단백질 간의 결합력과 비교하여 암 세포에 대한 결합력이 보다 우수하다. 따라서, 상기 종양특이적항원에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 일차적으로 암 세포와 결합하여 전신에 면역 세포의 활성을 유도할 수 있는 IL2 수용체 결합에 의한 부작용을 감소시킬 수 있다.

- [62] 상기 면역관문억제제 및/또는 종양특이적항원에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 예를 들어, 항체, 항원-결합 단편(Fab), 단쇄 가변 단편(scFv), 나노바디(nanobody)인 것일 수 있다.
- [63] 본 명세서에서 용어, "항체(antibody)"는 "면역글로불린(immunoglobulin: Ig)"과 상호 교환적으로 사용된다. 완전한 항체는 2개의 전장(full length) 경쇄 및 2개의 전장 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합(disulfide bond: SS-bond)으로 결합한다. 상기 경쇄(light chain)는 λ , κ 2가지 종류가 있으며 대략 211 내지 217개의 아미노산으로 구성되어 있다. 사람의 항체 각각에는 모두 동일하게 1가지의 경쇄만이 존재한다. 경쇄는 불변 영역과 가변 영역이 연속적으로 이루어져 있다. 상기 중쇄(heavy chain)는 5가지(γ , δ , α , μ , ϵ) 종류가 있으며 중쇄가 항체의 종류를 결정짓는다. α 와 γ 는 450개, μ 와 ϵ 는 550개의 아미노산으로 구성되어 있다. 중쇄는 두 영역 즉 가변 영역과 불변 영역이 있다. 상기 가변 영역(variable region)은 항체에서 항원이 결합하는 영역을 의미한다. 상기 가변 영역은 항원과의 결합 특이성을 부여하는 상보성 결정 영역(complementarity determining region: CDR)을 포함할 수 있다.
- [64] 상기 항체는 항원에 결합하는 Fab(antigen-binding fragment) 영역과 세포 표면 수용체에 결합하는 Fc(fragment crystallizable) 영역을 포함할 수 있다. 파파인(papain)으로 절단할 경우, 완전한 항체는 2개의 Fab와 1개의 Fc 영역으로 절단될 수 있다. Fab 영역은 중쇄의 가변 영역(VH) 도메인과 중쇄의 불변 영역1(CH1) 도메인을 포함한 폴리펩티드와 경쇄의 가변 영역(VL) 도메인과 경쇄의 불변 영역(CL) 도메인의 폴리펩티드가 이황화 결합으로 연결된 것일 수 있다. Fc 영역은 중쇄의 불변 영역2(CH2) 도메인과 불변 영역3(CH3) 도메인을 포함하는 폴리펩티드 2개가 연결된 것일 수 있다. Fc 영역은 힌지 영역을 형성할 수 있다. 상기 CH3 항체 불변 영역은 항체의 중쇄 불변 영역3 도메인을 의미한다.
- [65] 일반적으로 항체의 효과기(effector) 기능은 Fc 영역이 그 수용체인 Fc γ 수용체 또는 보체(complement components) 분자인 C1q와 결합하여 ADCC(antibody dependent cell cytotoxicity)나 CDC(complement dependent cytotoxicity)를 일으킨다. 면역세포는 많은 Fc γ 수용체를 가지고 있어 바람직하지 않은 면역세포

의 사멸을 유도할 수 있으므로 효과기 기능을 제거하는 것이 바람직하다. 따라서, 상기 CH3 항체 불변 영역은 Fc γ 수용체에 대한 결합력을 감소시키거나, 효과기(effector) 기능이 없거나 크게 감소됨으로써 높은 안정성을 갖도록 변형된 것일 수 있다. 또한, 상기 CH3 항체 불변 영역은 항체-의존적인 세포-매개독성 (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC)가 감소되도록 변형된 것일 수 있다.

- [66] 일 구체예에 있어서, 상기 Fc 영역은 제1 CH3 항체 불변 영역의 366번째 위치에 트립토판(W)을 포함하고, 제2 CH3 항체 불변 영역의 366번째 위치에 세린(S), 368번째 위치에 알라닌(A), 및 407번째 위치에서 발린(V)을 포함하고; 및 제2 CH3 항체 불변 영역의 351번째 위치에 글리신(G) 또는 페닐알라닌(F)을 포함할 수 있다.
- [67] 또한, 상기 Fc 영역은 제1 CH3 항체 불변 영역의 366번째 위치에 세린(S), 368번째 위치에 알라닌(A), 및 407번째 위치에서 발린(V)을 포함하고, 상기 제2 CH3 항체 불변 영역의 366번째 위치에 트립토판(W)을 포함하고; 및 제1 CH3 항체 불변 영역의 351번째 위치에 글리신(G) 또는 페닐알라닌(F)을 포함할 수 있다.
- [68] 또한, 상기 Fc 영역은 제1 CH3 항체 불변 영역의 366번째 위치에 트립토판(W)을 포함하고, 상기 제2 CH3 항체 불변 영역의 351번째 위치에 글리신(G), 366번째 위치에 세린(S), 368번째 위치에 알라닌(A), 및 407번째 위치에 발린(V)을 포함하고; 및 제1 CH3 항체 불변 영역의 351번째 위치에 페닐알라닌(F), 또는 트립토판(W)을 포함할 수 있다.
- [69] 또한, 상기 Fc 영역은 제1 CH3 항체 불변 영역의 351번째 위치에 글리신(G), 366번째 위치에 세린(S), 368번째 위치에 알라닌(A), 및 407번째 위치에 발린(V)을 포함하고, 상기 제2 CH3 항체 불변 영역의 366번째 위치에 트립토판(W)을 포함하고; 및 제2 CH3 항체 불변 영역의 351번째 위치에 페닐알라닌(F), 또는 트립토판(W)을 포함할 수 있다.
- [70] 다른 구체예에 있어서, 상기 제1 CH 항체 불변 영역 및 제2 CH 항체 불변 영역은 234, 235, 329, 297, 331 및 265로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 위치에, 알라닌(A), 글리신(G), 글루타민(Q), 페닐알라닌(F), 글루탐산(E), 및 세린(S)으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산을 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 CH 항체 불변 영역을 CH2 항체 불변 영역일 수 있다.
- [71] 예를 들어, 상기 제1 CH2 항체 불변 영역 및 제2 CH2 항체 불변 영역은 234 및 235 위치의 류신(L)이 알라닌(A)으로 더 치환된 것(L234A/L235A)일 수 있다.
- [72] 또한, 상기 제1 CH2 항체 불변 영역 및 제2 CH2 항체 불변 영역은 234 및 235 위치의 류신(L)이 알라닌(A)으로 치환되고, 및 329 위치의 프롤린(P)이 글리신(G)으로 더 치환된 것(L234A/L235A/P329G)일 수 있다.
- [73] 또한, 상기 제1 CH2 항체 불변 영역 및 제2 CH2 항체 불변 영역은 297 위치의 아스파라진(N)이 알라닌(A), 글루타민(Q) 또는 글리신(G)으로 더 치환된 것(N297A, N297Q 또는 N297G)일 수 있다.

- [74] 또한, 상기 제1 CH2 항체 불변 영역 및 제2 CH2 항체 항체 불변 영역은 234 및 235 위치의 류신(L)이 페닐알라닌(F) 및 글루탐산(E)으로 치환되고, 및 331 위치의 프롤린(P)이 세린(S)으로 더 치환된 것(L234F/L235E/P331S)일 수 있다.
- [75] 또한, 상기 제1 CH2 항체 불변 영역 및 제2 CH2 항체 불변 영역은 234 및 235 위치의 류신(L)이 페닐알라닌(F) 및 글루탐산(E)으로 치환되고, 및 265 위치의 아스파르트산(D)이 알라닌(A)으로 더 치환된 것(L234F/L235E/D265A)일 수 있다.
- [76] 또한, 다른 구체예에 있어서, 상기 Fc 영역은 서열번호 19 내지 21; 서열번호 22 내지 24; 서열번호 25 내지 27; 서열번호 28 내지 30; 서열번호 31 내지 33; 서열번호 34 내지 36; 서열번호 37 내지 39; 서열번호 40 내지 42; 서열번호 43 내지 45; 및 서열번호 46 내지 48;로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [77] 또한, 다른 구체예에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드 또는 제2 폴리펩티드; 및 상기 IL2 변이체는 링커 또는 캐리어에 의해 결합될 수 있다. 상기 링커는 (GGGS)_n의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 "n"은 1 내지 10의 자연수일 수 있다. 구체적으로, 상기 링커는 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [78] 상기 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 항체의 Fc 영역을 형성할 수 있다.
- [79] 상기 헤테로다이머(heterodimer)는 아미노산 잔기의 순서, 개수, 또는 종류가 서로 다른 두 개의 폴리펩티드가 결합한 것을 의미한다. 상기 단백질 복합체는 서로 다른 표적에 특이적으로 결합하는 두 개의 폴리펩티드가 결합하여 형성된 단백질 복합체일 수 있다.
- [80] 상기 단백질 복합체는 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 수용체와 작용제(agonist)의 접합체, 수용체와 길항제(antagonist)의 접합체, 수용체와 리간드(ligand)의 접합체, 또는 리간드와 유인(decoy) 수용체의 접합체일 수 있다. 또한, 상기 단백질 복합체는 항원-결합 단편(Fab), 단쇄 가변 단편(scFv), 막 수용체의 세포외 도메인, 작용제(agonist), 길항제(antagonist), 리간드(ligand), 유인(decoy) 수용체, 사이토카인, 응고 인자 및 친화성 태그로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 포함하는 것일 수 있다.
- [81] 상기 항체는 예를 들면, IgA, IgD, IgE, IgG, 또는 IgM일 수 있다. 상기 항체는 모노클론 항체 또는 폴리클론 항체일 수 있다. 상기 항체는 동물 유래 항체, 마우스-인간 키메라 항체(chimeric antibody), 인간화 항체(humanized antibody), 또는 인간 항체일 수 있다.
- [82] 본 명세서에서 용어, "항원-결합 단편(antigen-binding fragment)"은 면역글로불린 전체 구조에 대한 그의 단편으로, 항원이 결합할 수 있는 부분을 포함하는 폴리펩티드의 일부를 의미한다. 예를 들어, 항원 결합 단편은 scFv, (scFv)₂, Fv, Fab, Fab', Fv F(ab')₂, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [83] 본 명세서에서 용어, "수용체(receptor)"는 생물학적 시스템으로 전달될 수 있는 신호를 받거나 전달하는 물질을 의미한다. 상기 수용체는 단백질 수용체일 수 있다. 상기 수용체는 작용제(agonist), 길항제(antagonist), 리간드(ligand) 또는 사이

토카인(cytokine)에 결합할 수 있다. 상기 작용제는 수용체와 결합하여 수용체를 활성화시켜 생물학적 반응을 유도하는 물질일 수 있다. 상기 길항제는 수용체와 결합하여 수용체를 억제하여 생물학적 반응을 억제하는 물질일 수 있다. 상기 리간드는 수용체에 결합하는 물질일 수 있다. 상기 리간드는 유인(decoy) 수용체와 결합할 수 있다. 유인 수용체는 리간드에 특이적으로 결합함으로써, 실제 수용체를 통한 신호전달을 저해하는 수용체를 의미한다. 상기 사이토카인은 세포의 신호전달, 염증 과정의 조절 및 유지에 작용하는 소형 단백질을 의미한다.

- [84] 상기 단백질 복합체는 변형된 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 단백질 복합체는 접합(conjugation) 또는 결합, 당화(glycosylation), 태그 부착, 또는 이들의 조합으로 변형된 것일 수 있다. 상기 항체는 항암제와 같은 다른 약물과 접합될 수 있다. 예를 들면, 상기 단백질 복합체는 호스라디쉬 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase: HRP), 알칼린 포스파타아제, 햅텐(hapten), 비오틴, 스트렙타비딘, 형광 물질, 방사성 물질, 양자점, 폴리에틸렌 글리콜(Polyethylene glycol: PEG), 히스티딘 태그, 또는 이들의 조합과 결합된 것일 수 있다. 상기 형광 물질은 Alexa Fluor®532, Alexa Fluor®546, Alexa Fluor®568, Alexa Fluor®680, Alexa Fluor®750, Alexa Fluor®790, 또는 Alexa Fluor®350일 수 있다.
- [85] 상기 Fc 영역 또는 CH2, 및 CH3 영역의 아미노산의 위치는 Kabat EU index ('Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)'에 기재된 EU-인덱스)에 따른다. 상기 CH3 도메인의 아미노산 위치 및 이에 해당하는 아미노산 종류는 인간 IgG1을 기준으로 한다.
- [86]
- [87] 다른 양상은 일 양상에 따른 단백질 또는 다른 양상에 따른 단백질 복합체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [88] 상기 단백질 또는 단백질 복합체의 구체적인 내용은 전술한 바와 같다.
- [89] 일 구체예에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 56 내지 70으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드; 및 서열번호 74 내지 76로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상이 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [90] 다른 구체예에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 56 내지 70으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드; 서열번호 73을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 및 서열번호 74 내지 76로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [91] 또 다른 구체예에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 56 내지 70으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드; 서열번호 73을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 서열번호 74 내지 76로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드; 및 서열번호 77 내지 82로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

- [92] 다른 양상은 일 양상에 따른 단백질 또는 다른 양상에 따른 단백질 복합체를 코딩하는 발현 벡터를 세포에 형질전환하여 상기 단백질 또는 상기 단백질 복합체를 발현시키는 단계를 포함하는 단백질 또는 단백질 복합체를 제조하는 방법을 제공한다. 또한, 다른 양상은 상기 방법에 의해 제조된, IL2 변이체를 포함하는 단백질 또는 단백질 복합체를 제공한다.
- [93] 상기 단백질 또는 단백질 복합체의 구체적인 내용은 전술한 바와 같다.
- [94] 발현 벡터는 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 삽입된 핵산 서열이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 벡터를 의미한다. 상기 "작동가능하게 연결된(operably linked)"은 일반적인 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적 단백질을 코딩하는 핵산이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다. 상기 발현 벡터는 상기 단백질 복합체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것일 수 있다. 상기 발현 벡터는 유전자의 발현에 필요한 조절 부위, 예를 들어, 인핸서(enhancer), 프로모터, 폴리(A) 서열 등을 포함할 수 있다.
- [95] 상기 세포는 암세포일 수 있다. 상기 세포는 시험관 내(in vitro) 세포일 수 있다. 상기 세포는 세균, 효모, 식물 세포, 또는 포유동물 세포일 수 있다. 상기 세균은 대장균일 수 있다. 상기 포유동물 세포는 마우스, 래트, 토끼, 개, 고양이, 양, 소, 말, 원숭이, 침팬지, 또는 인간으로부터 유래된 세포를 의미한다. 상기 세포는 세포주일 수 있다. 상기 세포는 예를 들어, 중국 햄스터 난소(chinese hamster ovary: CHO) 세포, 인간 배아 신장(human embryonic kidneyL HEK) 세포, 새끼 햄스터 신장(baby hamster kidney: BHK) 세포, NS0 세포, PER.C6 세포, HeLa 세포, MDCK(Madin-Darby Canine Kidney) 세포, SP2/0 마우스 골수종 세포, COS-7, 및 YB2/0 래트 골수종 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 상기 CHO 세포는 CHO DG44, CHO-K1, CHO-S, GS-CHO, 또는 CHO DUKX(DXB11) 세포일 수 있다. 상기 HEK 세포는 HEK 293 세포일 수 있다.
- [96] "형질전환(transformation)"은 특정 핵산 단편을 세포의 유전체 내로 삽입하여 삽입된 핵산이 발현되도록 하는 방법을 의미한다.
- [97] 일 구체예에 있어서, 상기 방법은 제1 또는 제2 폴리펩티드 중 어느 하나 이상의 N-말단에 면역관문억제제(immune checkpoint inhibitor)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 종양특이적항원(tumor associated antigen)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 제1 및/또는 제2 폴리펩티드를 코딩하는 발현 벡터와 상기 N-말단 또는 C-말단에 IL2 변이체를 포함하는 제1 또는 제2 폴리펩티드를 코딩하는 발현 벡터를 세포에 공형질전환(co-transfection)하는 단계를 포함할 수 있다. 또한, 상기 방법은 상기 N-말단에 면역관문억제제(immune checkpoint inhibitor)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 종양특이적항원(tumor associated antigen)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드를 코딩하는 발현 벡터와 상기 N-말단 또는

C-말단에 IL2 포함하는 제1 또는 제2 폴리펩티드를 코딩하는 발현 벡터를 2종 이상의 세포에 각각 형질전환시키는 단계를 포함할 수 있다.

- [98] 상기 세포는 세포 배양 배지에서 배양될 수 있다. 세포 배양 배지는 세포를 배양하는데 필요한 영양 성분을 함유한 용액을 의미한다. 상기 배지는 세포를 배양하는데 이용되는 상업화된 또는 제조된 배지를 포함한다. 상기 세포 배양 배지는 항생제를 함유할 수 있다. 상기 세포 배양 배지는 G418(제네티신(geneticin)), 푸로마이신(Puromycin), 블라스티시딘(Blasticidin), 제오신(Zeocin), 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 세포 배양 배지는 화학 조성 배지(chemically defined medium)를 포함할 수 있다.
- [99] 상기 세포는 세포의 생존 또는 증식을 허용하는 조건 하에서 배양될 수 있다. 상기 세포의 생존 또는 증식을 허용하는 조건은 세포의 종류에 따라 달라질 수 있다. 상기 세포는 약 25°C 내지 약 42°C, 약 25°C 내지 약 40°C, 약 30°C 내지 약 40°C, 약 30°C 내지 약 37°C, 또는 약 37°C에서 배양될 수 있다. 상기 세포는 약 1% CO₂ 내지 약 10% CO₂, 또는 약 5% CO₂ 내지 약 10% CO₂의 공기의 존재에서 배양될 수 있다. 상기 세포는 약 pH 6 내지 약 pH 8, 약 pH 6.2 내지 약 pH 7.8, 약 pH 6.4 내지 약 pH 7.6, 약 pH 6.6 내지 약 pH 7.4, 또는 약 pH 6.8 내지 약 pH 7.2의 배지에서 배양될 수 있다. 상기 세포는 용존 산소 약 10% 내지 약 80%, 약 15% 내지 약 70%, 또는 약 20% 내지 약 60%의 조건에서 배양될 수 있다.
- [100] 상기 배양은 세포의 종류에 따라 달라질 수 있다. 상기 배양은 알려진 방법을 이용할 수 있다. 상기 배양은 플레이트, 플라스크 등에서 수행될 수 있다. 상기 배양은 기질에 부착시키거나 또는 배양액에 부유시키는 방법으로 수행할 수 있다. 상기 배양은 계대 배양(subculture), 회분 배양(batch culture), 유가 배양(fed-batch culture), 관류 배양(perfusion culture), 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 배양 시 세포 배양 배지를 신선한 배지로 주기적으로 교환할 수 있다. 상기 세포를 약 1일 이상, 약 2일 이상, 약 3일 이상, 약 4일 이상, 약 5일 이상, 약 6일 이상, 약 1주일 이상, 약 10일 이상, 약 2주일 이상, 약 3주일 이상, 약 1개월 이상, 약 1일 내지 약 1개월, 약 1일 내지 약 3주, 약 1일 내지 약 2주, 약 2일 내지 약 2주, 약 3일 내지 약 2주, 약 4일 내지 약 2주, 약 5일 내지 약 2주, 약 6일 내지 약 2주, 또는 약 1주 내지 약 2주 동안 배양할 수 있다.
- [101] 상기 세포 또는 세포 배양액으로부터 단백질 복합체를 획득하는 단계를 포함할 수 있다.
- [102] 상기 세포 배양액은 상기 세포가 없는 배양액일 수 있다.
- [103] 상기 발현 벡터를 세포에 공형질전환할 경우, 상기 세포 또는 세포 배양액으로부터 N-말단에 면역관문억제제(immune checkpoint inhibitor)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 종양특이적항원(tumor associated antigen)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 제1 폴리펩티드와 N-말단 또는 C-말단에 IL2 변이체를 포함하는 제2 폴리펩티드의 단백질 복합체를 획득할 수 있다. 상기 N-말단에 면역관문억제제(immune checkpoint inhibitor)에 대한 항체 또는 이의 항원

결합 단편, 또는 종양특이적항원(tumor associated antigen)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 제1 폴리펩티드를 코딩하는 발현 벡터와 상기 N-말단 또는 C-말단에 IL2 변이체를 포함하는 제2 폴리펩티드를 코딩하는 발현 벡터를 2종 이상의 세포에 각각 형질전환할 경우, 상기 세포 또는 세포 배양액으로부터 N-말단에 면역관문억제제(immune checkpoint inhibitor)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 종양특이적항원(tumor associated antigen)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 N-말단 또는 C-말단에 IL2 변이체를 포함하는 제2 폴리펩티드를 각각 수득할 수 있다.

- [104] 상기 단백질 복합체를 수득하는 단계는 수득된 N-말단에 면역관문억제제(immune checkpoint inhibitor)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 종양특이적항원(tumor associated antigen)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 제1 폴리펩티드와 수득된 N-말단 또는 C-말단에 IL2 변이체를 포함하는 제2 폴리펩티드를 인큐베이션하여 단백질 복합체를 형성시키는 단계를 포함할 수 있다. 상기 인큐베이션은 환원 조건 하에서 수행될 수 있다. 상기 환원 조건은 2-머캅토에탄올(2-mercaptoethanol: 2-ME), 디티오프레이톨(dithiothreitol: DTT), 또는 이들의 조합의 존재 하일 수 있다.
- [105] 상기 단백질 복합체를 수득하는 단계는 단백질 복합체를 정제하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 정제는 여과, 원심분리, 크로마토그래피, 투석, 면역침강, 또는 이들의 조합에 의해 수행될 수 있다.
- [106]
- [107] 다른 양상은 일 양상에 따른 단백질 또는 다른 양상에 따른 단백질 복합체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 또 다른 양상은 암의 예방 또는 치료제의 제조를 위한 일 양상에 따른 단백질 또는 다른 양상에 따른 단백질 복합체의 용도를 제공한다.
- [108] 상기 단백질 또는 상기 단백질 복합체에 관한 구체적인 내용은 전술한 바와 같다.
- [109] 상기 암은 고형암 또는 비고형암일 수 있다. 고형암은 예를 들어 간, 폐, 유방, 피부 등 장기에 암 종양이 발생한 것을 의미한다. 비고형암은 혈액 내에서 발생한 암이고, 혈액암으로도 불린다. 상기 암은 암종(carcinoma), 육종(sarcoma), 조혈세포 유래의 암, 배세포 종양(germ cell tumor), 또는 모세포종(blastoma)일 수 있다. 상기 암은 유방암, 피부암, 두경부암, 췌장암, 폐암, 대장암, 결장직장암, 위암, 난소암, 전립선암, 방광암, 요도암, 간암, 신장암, 투명세포 육종, 흑색종, 뇌척수종양, 뇌암, 흉선종, 중피종, 식도암, 담도암, 고환암, 생식세포종, 갑상선암, 부갑상선암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 림프종, 골수형성이상 증후군(myelodysplastic syndromes: MDS), 골수섬유증(myelofibrosis), 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 호치킨병(Hodgkin's Disease), 내분비계암 및 육종으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

- [110] 상기 "예방"은 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 질환을 억제하거나 그의 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 용어 "치료"는 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [111] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 담체는 부형제, 희석제 또는 보조제를 포함하는 의미로 사용된다. 상기 담체는 예를 들면, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리트리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알기네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 생리식염수, PBS와 같은 완충액, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 및 미네랄 오일로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 상기 조성물은 충전제, 항응집제, 율활제, 습윤제, 풍미제, 유화제, 보존제, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [112] 상기 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 임의의 제형으로 준비될 수 있다. 상기 조성물은 예를 들면, 경구 투여 제형(예를 들면, 분말, 정제, 캡슐, 시럽, 알약, 또는 과립), 또는 비경구 제형(예를 들면, 주사제)으로 제형화될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 전신 제형, 또는 국부 제형으로 제조될 수 있다.
- [113] 상기 약학적 조성물은 다른 항암제를 더 포함할 수 있다. 상기 항암제는 세특시맵(cetuximab), 파니투무맵(Panitumumab), 엘로티닙(erlotinib), 게피티닙(Gefitinib), 트라스투주맵(trastuzumab), T-DM1, 페르제타(Perjeta), 라파티닙(lapatinib), 파클리탁셀, 탁솔, 타목시펜, 시스플라틴, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 약학적 조성물은 단일 조성물 또는 개별적인 조성물일 수 있다. 예를 들어, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 조성물은 비경구 투여 제형의 조성물이고, 항암제는 경구 투여 제형의 조성물일 수 있다.
- [114] 상기 약학적 조성물은 상기 단백질 복합체를 유효한 양으로 포함할 수 있다. 용어 "유효한 양"은 질환의 예방 또는 치료를 필요로 하는 개체에게 투여되는 경우 예방 또는 치료의 효과를 나타내기 위해 충분한 양을 의미한다. 상기 유효한 양은 당업자가 선택되는 세포 또는 개체에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 질환의 중증도, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 사용된 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 상기 유효한 양은 상기 약학적 조성물 당 약 0.5 μ g 내지 약 2 g, 약 1 μ g 내지 약 1 g, 약 10 μ g 내지 약 500 mg, 약 100 μ g 내지 약 100 mg, 또는 약 1 mg 내지 약 50 mg일 수 있다.
- [115] 상기 약학적 조성물의 투여량은 예를 들어, 성인 기준으로 약 0.001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 1 mg/kg의 범위 내일 수 있다. 상기 투여는 1일 1회, 1일 다회, 또는 1주일에 1회, 2주일에 1회, 3주일에 1회, 또는 4주일에 1회 내지 1년에 1회 투여될 수 있다.
- [116]

- [117] 다른 양상은 일 양상에 따른 단백질 또는 다른 양상에 따른 단백질 복합체를 세포 또는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [118] 상기 단백질, 단백질 복합체, 세포, 암, 예방, 또는 치료에 관한 구체적인 내용은 전술한 바와 같다.
- [119] 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 인간, 소, 말, 돼지, 개, 양, 염소 또는 고양이일 수 있다. 상기 개체는 암을 앓거나 앓을 가능성이 큰 개체일 수 있다.
- [120] 상기 방법은 상기 개체에게 제2의 유효 성분을 투여하는 단계를 더 포함할 수 있다. 제2의 유효 성분은 암의 예방 또는 치료를 위한 유효 성분일 수 있다. 상기 유효 성분은 상기 단백질 복합체와 동시, 개별, 또는 순차로 투여될 수 있다.
- [121] 상기 단백질 또는 단백질 복합체는 예를 들면, 경구, 정맥내, 근육내, 경구, 경피(transdermal), 점막, 코안(intranasal), 기관내(intratracheal) 또는 피하 투여와 같은, 임의의 수단에 의하여 개체로 직접적으로 투여될 수 있다. 상기 단백질 복합체는 전신적으로 또는 국부적으로 투여될 수 있고, 단독으로 또는 다른 약학적 활성 화합물과 함께 투여될 수 있다.
- [122] 상기 단백질 또는 단백질 복합체의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 상기 투여량은 예를 들어, 성인 기준으로 약 0.001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 1 mg/kg의 범위 내일 수 있다. 상기 투여는 1일 1회, 1일 다회, 또는 1주일에 1회, 2주일에 1회, 3주일에 1회, 또는 4주일에 1회 내지 1년에 1회 투여될 수 있다.

발명의 효과

- [123] 일 양상에 따른 단백질은 IL2의 특정 아미노산 서열을 치환하여 조절 T 세포 대비 효과 T 세포의 활성을 선택적으로 증가시킬 수 있다. 또한, 상기 단백질을 포함하는 약학적 조성물은 기존 치료제와 비교하여 부작용은 낮추고, 항암 활성은 극대화시킬 수 있는바, 암의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [124] 도 1a는 Protein-A 친화성 컬럼 정제방법을 이용하여 일 구체예에 따른 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체를 정제한 결과를 나타낸다.
- [125] 도 1b는 양이온 교환수지 컬럼 정제방법을 이용하여 일 구체예에 따른 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체를 정제한 결과를 나타낸다.
- [126] 도 1c는 SE-HPLC 분석을 통하여 일 구체예에 따른 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체의 순도 분석 결과를 나타낸다.
- [127] 도 2a는 일 구체예에 따른 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체 및 양성대조군(Avelumab, 및 Avelumab과 Aldesleukin의 병용투여)과 음성대조군의 대장암 이식 마우스에서의 항암 효과를 비교한 결과이다.

- [128] 도 2b는 일 구체예에 따른 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체의 대장암 이식 마우스에서의 개체별 암세포 성장 억제 및 완전 관해 활성을 확인한 결과이다.
- [129] 도 2c는 음성대조군 및 양성대조군(Avelumab, 및 Avelumab과 Aldesleukin의 병용투여)의 대장암 이식 마우스에서의 개체별 암세포 성장 억제 및 완전 관해 효과를 확인한 결과이다.
- [130] 도 3은 일 구체예에 따른 PD-L1 항체-IL2 변이체 4 단백질 복합체의 대장암 이식 마우스에서의 항암 효과를 확인한 결과이다.
- [131] 도 4는 일 구체예에 따른 IL2 변이체를 포함하는 단백질 복합체의 구조를 나타낸다.
- [132] 도 5a는 Protein-A 친화성 컬럼 정제방법을 이용하여 일 구체예에 따른 mousePD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(a+c)를 정제한 결과이다.
- [133] 도 5b는 소수성 상호작용 컬럼 정제방법을 이용하여 일 구체예에 따른 mousePD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(a+c)를 정제한 결과이다.
- [134] 도 5c는 일 구체예에 따른 mousePD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(a+c)의 순도 분석 결과를 나타낸다.
- [135] 도 6a는 일 구체예에 따른 mousePD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(a+c), 음성대조군 및 양성대조군의 대장암 이식 마우스 모델에서의 항암 효과를 비교한 결과이다.
- [136] 도 6b는 일 구체예에 따른 mousePD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(a+c), 음성대조군 및 양성대조군을 대장암 이식 마우스 모델에 투여한 후, 대장암 이식 마우스 모델의 몸무게 변화를 비교한 결과이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [137] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[138]

[139] [실시예]

[140] 실시예 1. IL2 변이체 단백질의 제조 및 활성 확인

[141] **1-1. IL2 변이체 단백질의 클로닝 및 배양**

[142] 야생형 IL2 아미노산(서열번호 16) 중 일부 위치의 아미노산을 치환하여 IL2 변이체를 제조하였다. 구체적으로, ThermoFisher Scientific사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 이용하여 6X His가 태깅(tagging)되어 있는 IL2 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 합성한 후, pcDNA3.1 발현벡터의 ApaII-NheI enzyme site에 삽입하여 IL2 변이체를 발현하는 발현 벡터를 제조하였다. 상기 IL2 변이체에서 각 아미노산 치환 부위 및 치환된 아미노산은 하기 표 1에 나타낸 바와 같다. 이후, ExpiFectamine™ CHO Transfection kit (ThermoFisher)를 사용하

여 상기 발현 벡터를 ExpiCHO-S™ 세포주에 형질감염시켰다. 형질감염된 세포를 32°C, 5% CO₂ incubator에서 120rpm으로 12일 동안 배양하였다. 12일 후, 배양액 상등액을 분리 및 회수하였고 멸균 필터를 통해 여과하여 IL2 변이체 단백질을 수득하였다.

[143] [표1]

	35	38	42	125	18	19	126
wt-IL2	K	R	F	C	L	L	Q
IL2 비교군	E			S			
IL2 변이체 1	E	A	K	S			
IL2 변이체 2	E	A	K	S	M	S	
IL2 변이체 3	E	A	K	S	A	S	
IL2 변이체 4	E	A	K	S	R	S	
IL2 변이체 5	E	A	K	S	M	L	
IL2 변이체 6	E	A	K	S	L	S	
IL2 변이체 7	E	A	K	S	S	W	
IL2 변이체 8	E	A	K	S	F	N	
IL2 변이체 9	E	A	K	S	V	I	
IL2 변이체 10	E	A	K	S	I	T	
IL2 변이체 11	E	A	K	S	Q	A	
IL2 변이체 12	E	A	K	S	M	M	
IL2 변이체 13	E	A	K	S	M	F	
IL2 변이체 14	E	A	K	S			T
IL2 변이체 15	E	A	K	S			I

[144] **1-2. IL2 변이체 단백질의 정제**

[145] 상기 실시예 1-1에서 수득한 배양액을 통해 확보된 IL-2 변이체 단백질에 태깅되어 있는 His를 이용하여 정제한 후, 순도 95% 이상의 고순도 물질을 확보하였다.

[146] 먼저, 상기 실시예 1-1에서 수득한 배양액을 원심 분리하여 배양 세포와 배지로 분리하였다. 이후, 분리된 배지 내 IL2 변이체 단백질을 0.22 μm 필터(Thermo Scientific사) 여과과정을 통해 미세한 잔해물을 제거하였다. 여과 과정을 거친 배지를 이미다졸 친화성 크로마토그래피(Ni-SepFast, Biotoolomics사)를 이용하여 1차 정제한 후, 탈염과정과 농축과정을 거쳐 정제물에 존재하는 이미다졸 버퍼 성분을 제거하였다. 이후, 최종 정제물의 함량 및 순도분석을 진행하였다. 구체

적으로, Phosphate buffer saline (pH 7.4) 버퍼로 안정화된 Ni-SepFast 컬럼에, 여과된 배지를 넣은 후, 비특이적으로 결합하지 않은 단백질을 동일 버퍼를 사용하여 씻어내고, Ni-SepFast 컬럼에 특이적으로 결합하는 단백질을 이미다졸 버퍼 용액 (0 M 및 0.5 M, pH 7.4)을 이용하여 이미다졸 농도 올림 구배 방식으로 용출하였다. 확보된 IL2 변이체 단백질을 Phosphate buffer saline (pH 7.4)로 탈염과정을 거쳐 안정화시킨 뒤, 크기 배제 HPLC(TSK-3000SWxL, 7.8 mm x 30 cm, Tosoh사)를 이용하여 상기 정제된 IL2 변이체 단백질의 순도 분석을 수행하였다. 또한, SDS-PAGE 분석을 통해 분자량을 확인하였다.

[147] **1-3. IL2 변이체 단백질의 인간면역세포에 대한 활성화 확인**

[148] 상기 실시예 1-2에서 정제한 IL2 변이체-단백질 복합체의 인간 면역세포에 대한 활성화를 확인하였다. 구체적으로, 인간 말초혈액 단핵세포(Stem cell 사)와 effector CD8+ T 세포 (CD3+, CD8+) 및 Treg 세포(CD4+, CD25+)를 특이적으로 형광 표지시키는 항체와 30분간 4°C에서 차광하여 반응시킨 뒤, 세포에 부착되지 않은 항체를 원심분리 하여 제거하였다. 이후, 상기 실시예 1-2에서 정제한 IL2 변이체 2, 4, 14 단백질을 처리하여 20분간 37°C에서 차광하여 반응시키고, 이를 1 mL의 Fixation buffer (BD, U.S.)로 12분간 고정시켰다. 이때 양성대조군으로 Aldesleukin(프로류킨주, Novartis, Switzerland)을 사용하였으며, 각각의 약물은 0.01~8,000 nM의 농도로 처리하였다. 이후, 고정(Fixation)이 끝난 인간 말초혈액 단핵세포의 세포질에 1.5 mL의 Perm3 buffer (BD, U.S.)를 처리하고 35분간 4°C에서 반응시켜 세포질 내부로 형광표지가 침투할 수 있게 한 뒤, 인산화 된 STAT-5 및 Treg 세포 마커인 Foxp3+ 단백질에 형광표지하여 30분간 반응시켰다. 이후, effector CD8+ T, Treg 세포에서 IL2 변이체 단백질 처리군의 STAT-5 인산화 정도를 유세포 분석을 통하여 비교하였다.

[149] [표2]

	STAT5 phosphorylation (EC ₅₀ , nM)	
	Treg 세포	CD8+ T 세포
Aldesleukin	0.048	0.78
IL2 변이체 2 단백질	0.91	0.55
IL2 변이체 4 단백질	2.16	1.22
IL2 변이체 14 단백질	0.30	1.7

[150] 그 결과, 표 2에 나타낸 바와 같이, 양성대조군(Aldesleukin)은 CD8+ T 세포/조절 T 세포의 EC₅₀ 값의 비율이 16.3을 나타냄으로써, CD8+ T 세포보다 Treg 세포의 활성을 더 강하게 유도하는 것을 확인할 수 있었다.

[151] 반면, IL2 변이체 2, 4, 14 단백질은 CD8+T 세포/조절 T 세포의 EC₅₀ 값의 비율이 각각 0.6, 0.56 및 5.6을 나타냄으로써, 양성대조군과 비교하여 CD8+ T 세포의 활성을 더 선택적으로 활성화시키는 것을 확인할 수 있었다.

[152]

[153] **실시예 2. IL2 변이체-Fc 단백질 복합체의 제조 및 특성 확인**[154] **2-1. IL2 변이체-Fc 단백질 복합체의 클로닝 및 배양**

[155] IL2 변이체를 포함하는 Fc 단백질 복합체를 제조하였다. 구체적으로, ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 이용하여 Fc 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 합성한 후, pCHO1.0 발현벡터의 AvrII-BstZ17I enzyme site에 삽입하여 Fc 영역을 발현하는 제1 발현 벡터를 제조하였다. 동일 서비스를 이용하여 상기 실시예 1에서 제조한 IL2 변이체 1, 2, 4, 및 14와 링커 및 Fc 영역을 포함하는 복합체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 합성한 후, pCHO1.0 발현벡터의 AvrII-BstZ17I enzyme site에 삽입하여 IL2 변이체-Fc를 발현하는 제2 발현 벡터를 제조하였다. 이후, ExpiFectamine™ CHO Transfection kit (ThermoFisher)를 사용하여 상기 제1 발현 벡터와 제2 발현 벡터를 1:1로 혼합한 뒤, ExpiCHO-STM 세포주에 형질감염시켰다. 형질감염된 세포를 32°C, 8% CO₂ incubator에서 125 rpm으로 12일 동안 배양하였다. 12일 후, 배양액 상등액을 분리 및 회수하였고 멸균 필터를 통해 여과하여 Fc와 IL2 변이체-Fc를 포함하는 단백질 복합체를 수득하였다.

[156] **2-2. IL2 변이체-Fc 단백질 복합체의 정제**

[157] 상기 실시예 2-1에서 제조한 세포주의 배양을 통해 확보된 IL2 변이체-Fc 단백질 복합체를 정제하여 고순도 물질을 확보하였다.

[158] 먼저, 상기 실시예 2-1에서 수득한 배양액을 원심 분리하여 배양 세포와 배지로 분리하였다. 이후, 분리된 배지 내 IL2 변이체-Fc 단백질 복합체를 0.22 μ m 필터 (Thermo Scientific사)를 이용하여 미세한 잔해물을 제거하였다. 여과 과정을 거친 배지를 Protein A 친화성 크로마토그래피 (MabSelect Prisma, Cytiva사)를 이용하여 1차 정제하였다. 구체적으로, Phosphate buffer saline(pH 7.4) 버퍼로 안정화된 Protein-A 컬럼에, 여과된 배지를 넣은 후, 비특이적으로 결합하지 않은 단백질을 동일 버퍼를 사용하여 씻어내고, 0.02M Citric acid가 포함된 pH5.0과 pH3.5의 두 용액을 이용하여 pH 구배에 따라 Protein-A 컬럼에 특이적으로 결합하는 단백질을 용출하였으며, 1 M Tris를 이용하여 pH 7.2로 시료를 중화시켰다. 이후, 확보된 IL2 변이체-Fc 단백질 복합체들을 Phosphate buffer saline(pH 7.4)로 안정화시킨 뒤, 크기 배제 HPLC(TSK-3000SWxL, 7.8 mm x 30 cm, Tosoh사)를 이용하여 상기 정제된 IL2 변이체-Fc 단백질 복합체의 순도 분석을 수행하였다.

[159] **2-3. IL2 변이체-Fc-단백질 복합체의 인간면역세포에 대한 활성화 확인**

[160] 상기 실시예 2-2에서 정제한 IL2 변이체-Fc 단백질 복합체의 인간 면역세포에 대한 활성화를 확인하였다. 구체적으로, 인간 말초혈액 단핵세포(Stem cell 사)와 effector CD8+ T 세포 (CD3+, CD8+) 및 Treg 세포(CD4+, CD25+)를 특이적으로 형광 표지시키는 항체와 30분간 4°C에서 차광하여 반응시킨 뒤, 세포에 부착되지 않은 항체를 원심분리 하여 제거하였다. 이후, 상기 실시예 2-2에서 정제한 IL2 변이체 1-Fc 단백질 복합체, IL2 변이체 2-Fc 단백질 복합체, IL2 변이체 4-Fc 단

백질 복합체 및 IL2 변이체 14-Fc 단백질 복합체를 처리하여 20분간 37°C에서 차광하여 반응시키고, 이를 1 mL의 Fixation buffer (BD, U.S.)로 12분간 고정시켰다. 이때 양성대조군으로 Aldesleukin(프로류킨주, Novartis, Switzerland)를 사용하였으며, 각각의 약물은 0.01~8,000 nM의 농도로 처리하였다. 이후, 고정(Fixation)이 끝난 인간 말초혈액 단핵세포의 세포질에 1.5 mL의 Perm3 buffer (BD, U.S.)를 처리하고 35분간 4°C에서 반응시켜 세포질 내부로 형광표지가 침투할 수 있게 한 뒤, 인산화 된 STAT-5 및 Treg 세포 마커인 Foxp3+ 단백질에 형광표지하여 30분간 반응시켰다. 이후, effector CD8+ T 세포 및 Treg 세포에서 IL2 변이체-Fc 단백질 복합체 처리군의 STAT-5 인산화 정도를 유세포 분석을 통하여 비교하였다.

[161] [표3]

	STAT5 phosphorylation (EC ₅₀ , nM)	
	Treg 세포	CD8+ T 세포
Aldesleukin	0.03	1
IL2 변이체 1-Fc 단백질 복합체	2.91	2.31
IL2 변이체 2-Fc 단백질 복합체	13.3	19.6
IL2 변이체 4-Fc 단백질 복합체	24.3	35
IL2 변이체 14-Fc 단백질 복합체	64.84	209.1

[162] 그 결과, 표 3에 나타낸 바와 같이, 양성대조군(Aldesleukin)은 CD8+ T 세포/조절 T 세포의 EC₅₀ 값의 비율이 33.3을 나타냄으로써, CD8+ T 세포보다 Treg 세포의 활성을 더 강하게 유도하는 것을 확인할 수 있었다.

[163] 반면, IL2 변이체 1-Fc 단백질 복합체, IL2 변이체 2-Fc 단백질 복합체, IL2 변이체 4-Fc 단백질 복합체 및 IL2 변이체 14-Fc 단백질 복합체는 CD8+T 세포/조절 T 세포의 EC₅₀ 값의 비율이 0.79 내지 3.2를 나타냄으로써, 양성대조군과 비교하여 CD8+ T 세포의 활성을 더 선택적으로 활성화시키는 것을 확인할 수 있었다.

[164] 즉, 일 양상에 따른 IL2 변이체는 Fc가 추가된 구조에서도 조절 T 세포보다 CD8+ 세포를 더욱 선택적으로 활성화시키는 특성을 유지할 수 있음을 알 수 있다.

[165]

[166] **실시예 3. PD-L1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체의 제조 및 특성 확인**

[167] **3-1. PD-L1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체의 클로닝 및 배양**

[168] PD-L1 항체 및 IL2 변이체를 포함하는 단백질 복합체를 제조하였다. 구체적으로, 상기 실시예 2-1과 동일한 서비스를 이용하여 PD-L1 항체 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 PD-L1 항체 경쇄 불변 영역-경쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 각각 합성하였다. 이후, 상기 PD-L1 항체 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 상기 PD-L1 항체 경쇄 불변 영역-경쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 각

각 pCHO1.0 발현 벡터의 AvrII-BstZ17I enzyme site와 EcoRV-PacI enzyme site에 삽입하여 PD-L1 항체를 발현하는 제1 발현 벡터를 제조하였다. 동일한 서비스를 이용하여 상기 실시예 1에서 제조한 IL2 변이체 1 내지 15 중 어느 하나와 링커 및 Fc 영역을 포함하는 복합체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 합성한 후, pCHO1.0 발현 벡터의 AvrII-BstZ17I enzyme site에 삽입하여 IL2 변이체-Fc를 발현하는 제2 발현 벡터를 제조하였다. 이후, 상기 제1 발현 벡터 및 제2 발현 벡터를 사용하였다는 점을 제외하고는 상기 실시예 2-1과 동일한 방법으로 항PD-L1 Fab-Fc와 IL2 변이체-Fc를 포함하는 PD-L1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체를 수득하였다.

[169] **3-2. PD-L1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체의 정제**

[170] 상기 실시예 3-1에서 제조한 세포주의 배양을 통해 확보된 PD-L1 항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체 내지 PD-L1 항체-IL2 변이체 15 단백질 복합체를 정제하여 고순도 물질을 확보하였다.

[171] 먼저, 상기 실시예 3-1에서 수득한 배양액을 원심 분리하여 배양 세포와 배지로 분리하였다. 이후, 분리된 배지 내 PD-L1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체를 0.22 μm 필터(Thermo Scientific사)를 이용하여 미세한 잔해물을 제거하였다. 여과 과정을 거친 배지를 Protein A 친화성 크로마토그래피 (MabSelect Prisma, Cytiva사)를 이용하여 1차 정제하였다. 구체적으로, Phosphate buffer saline(pH 7.4) 버퍼로 안정화된 Protein-A 컬럼에, 여과된 배지를 넣은 후, 비특이적으로 결합하지 않은 단백질을 동일 버퍼를 사용하여 씻어내고, 0.05 M Citric acid (pH 3.9)이 포함된 버퍼 용액을 이용해서 Protein-A 컬럼에 특이적으로 결합하는 단백질을 용출하였으며, 1 M Tris를 이용하여 pH 7.2로 시료를 중화시켰다. 이후, 친화성 컬럼을 통해 분리된 시료 내에 잔존하는 물질 유래 불순물을 제거하기 위해 양이온교환 크로마토그래피 (Source30S, Cytiva사)를 이용하여 2차 정제하였다. 구체적으로, Protein-A 컬럼에서 용출 및 중화된 시료에 1M Citric acid를 첨가하여 pH 6.0로 적정한 후, 20 mM sodium phosphate(pH 6.0) 버퍼로 안정화된 Source30S 컬럼에 넣어, 비특이적으로 결합하지 않은 단백질을 동일 버퍼를 사용하여 씻어내고, 0.3M NaCl (pH 6.0) 이 포함된 버퍼 용액을 이용하여 올림 구배 방식으로 용출하여 PD-L1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체들을 확보하였다. 이후, 확보된 PD-L1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체들을 Phosphate buffer saline(pH 7.4)로 안정화시킨 뒤, 크기 배제 HPLC(TSK-3000SWxL, 7.8 mm x 30 cm, Tosoh사)를 이용하여 상기 정제된 PD-L1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체의 순도 분석을 수행하였다.

[172] 도 1a는 Protein-A 친화성 컬럼 정제 방법을 이용하여 일 구체예에 따른 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체를 정제한 결과를 나타낸다.

[173] 도 1b는 양이온 교환수지 컬럼 정제 방법을 이용하여 일 구체예에 따른 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체를 정한 결과를 나타낸다.

[174] 도 1c는 SE-HPLC 분석을 통하여 일 구체예에 따른 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체의 순도 분석 결과를 나타낸다.

- [175] 그 결과, 도 1a에 나타낸 바와 같이, Protein-A 친화성 컬럼 정제에서 사용된 용출 버퍼에 의하여 상기 컬럼에 특이적으로 결합하는 단백질을 확인할 수 있었다. 구체적으로, 용출액 1500 내지 1550 ml에서 상기 컬럼에 특이적으로 결합하는 PD-L1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체를 확인할 수 있었다.
- [176] 또한, 도 1b에 나타낸 바와 같이, Protein-A 친화성 컬럼에서 사용된 용출액 내 잔존하는 불순물과 비특이적으로 결합하는 단백질이 제거된 것을 확인할 수 있었다.
- [177] 또한, 도 1c에 나타낸 바와 같이, Protein-A 친화성 컬럼 정제 및 양이온 교환 수지 정제를 통해 확보된 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체는 머무름 시간 16.717분에서 99%의 순도를 나타냄을 확인할 수 있었다.
- [178] 즉, 일 양상에 따른 PD-L1 항체-IL2 변이체 단백질은 높은 순도로 정제되는 것을 알 수 있다.

[179] **3-3. PD-L1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체의 수용체 결합력 확인**

- [180] 일 양상에 따른 PD-L1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체의 수용체 결합력을 SPR (Surface Plasmon Resonance) 분석을 통하여 확인하였다. 구체적으로, 인간 PD-L1 과 인간 IL2R α , IL2R $\beta\gamma$, 및 IL2R $\alpha\beta\gamma$ 를 CM5 sensor chip에 각각 공유 결합을 통해 고정화 시킨 뒤, 상기 실시예 3-2에서 제조한 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체 및 PD-L1 항체-IL2 변이체 4 단백질 복합체를 각각 다양한 농도(0.391~400 nM의 농도 범위에서 2배씩 연속 희석)로 전개하여 인간 PD-L1 및 IL2 수용체(IL2 receptor, IL2R)에 대한 동역학(binding kinetics)을 각각 확인하였다. 이후, 측정된 결합 상수(association constant, Ka)와 해리 상수(dissociation constant, Kd) 값을 이용하여 결합 친화도(binding affinity, KD)를 계산하였다. 이때, SPR sensogram 분석은 BIAlogue kinetics evaluation software를 이용하여 수행하였다. 양성대조군으로는 avelumab 및 aldesleukin을 각각 사용하였으며, 그 결과를 하기 표 4 및 표 5에 나타내었다.

- [181] [표4]

리간드	실험군	결합친화도(KD, nM)
hPD-L1	Avelumab	0.12
	PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체	0.48

- [182] [표5]

실험군	결합친화도(nM, SPR analysis)			
	Human IL2R α	Human IL2R $\beta\gamma$	Human IL2R $\alpha\beta\gamma$	$\beta\gamma / \alpha\beta\gamma$
Aldesleukin	15.8	0.25	0.05	5

PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체	No binding	37.9	17.3	2.19
PD-L1 항체-IL2 변이체 4 단백질 복합체	No binding	23.8	30.6	0.78

- [183] 도 2a는 일 구체예에 따른 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체의 인간 PD-L1 항원에 대한 결합력을 확인한 결과이다.
- [184] 도 2b는 Avelumab의 인간 PD-L1 항원에 대한 결합력을 확인한 결과이다.
- [185] 그 결과, 도 2a 및 표 4에 나타난 바와 같이, 실시예 3-2에서 제조한 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체 및 양성대조군은 인간 PD-L1 항원에 결합하는 것을 확인할 수 있었다. 구체적으로, 상기 단백질 변이체는 0.48 nM의 결합력을 나타내었고, 양성대조군은 0.12 nM의 결합력을 나타내어 약 4.1배 낮은 결합력을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.
- [186] 즉, 양성대조군은 단일 항체로서, 2가(bivalent) 형태의 항-PD-L1 암(arm)을 가지는 반면, 상기 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체는 1가(monovalent) 형태의 항-PD-L1 암(arm)을 가지기 때문에 결합력의 차이를 나타내는 것으로 사료된다.
- [187]
- [188] 또한, 표 5에 나타난 바와 같이, 실시예 2에서 제조한 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체는 각각 37.9 nM 및 17.3 nM의 결합친화도로 IL2R $\beta\gamma$ 및 IL2R $\alpha\beta\gamma$ 에 결합하나, IL2R α 와는 반응하지 않는 양상을 나타내었다. 뿐만 아니라, PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체는 각각 23.8 nM 및 30.6 nM의 결합친화도로 IL2R $\beta\gamma$ 및 IL2R $\alpha\beta\gamma$ 에 결합하나, IL2R α 와는 반응하지 않는 양상을 나타내었다.
- [189] 즉, 일 양상에 따른 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체 및 PD-L1 항체-IL2 변이체 4 단백질 복합체는 IL2 수용체 α 와 결합하지 않는 것을 확인할 수 있었다.
- [190] 반면, 표 5에 나타난 바와 같이, 양성대조군은 각각 35.7 nM, 1.55 nM 및 0.10 nM의 결합친화도로 IL2R α , IL2R $\beta\gamma$ 및 IL2R $\alpha\beta\gamma$ 에 결합하는 것을 확인할 수 있었다.
- [191] 한편, 상기 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체 및 PD-L1 항체-IL2 변이체 4 단백질 복합체는 양성대조군과 비교하여 IL2R $\beta\gamma$ 에 대한 결합력이 각각 약 24.5배 및 15.4배 감소한 것을 확인할 수 있었다. 또한, IL2R $\alpha\beta\gamma$ 에 대한 결합력 결과를 통해 $\beta\gamma/\alpha\beta\gamma$ 의 비율을 계산한 결과, 상기 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체 및 PD-L1 항체-IL2 변이체 4 단백질 복합체의 $\beta\gamma/\alpha\beta\gamma$ 의 비율은 각각 2.19 및 0.78로 나타났으며, 양성대조군은 15.5로 나타나 양성대조군과 비교하여 PD-L1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체의 IL2R $\beta\gamma/\alpha\beta\gamma$ 의 비율이 현저하게 낮아진 것을 확인할 수 있었다. 즉, 상기 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체 및 PD-L1 항체-IL2 변이체 4 단백질 복합체는 IL2R α 와 결합하지 않을 뿐만 아니라, IL2R $\beta\gamma$ 와의 결합 역시 약해진 것을 알 수 있다.

- [192] 따라서, 일 양상에 따른 PD-L1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체는 조절 T 세포와 비교하여 CD8+ T 세포에서의 높은 활성화를 유도하기 위한 것으로 IL2R $\beta\gamma$ 를 발현하는 CD8+T 세포의 활성화를 선택적으로 유도하기 위하여, IL2R α 에 대한 결합력은 제거하고, 상기 특정 아미노산의 치환을 통하여 IL2R $\beta\gamma$ 에 대한 결합력을 조절한 것을 특징으로 한다.
- [193] **3-4. PD-L1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체의 인간면역세포에 대한 활성 확인**
- [194] 일 양상에 따른 PD-L1 항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체 내지 PD-L1 항체-IL2 변이체 15 단백질 복합체가 인간 면역세포의 활성화에 미치는 영향을 확인하였다. 구체적으로, 인간 말초혈액 단핵세포(Stem cell 사)를 특이적으로 형광 표지된 효과 CD8+ T 세포(CD3+, CD8+) 및 조절 T 세포(CD4+, CD25+, FoxP3+) 항체와 각각 4°C에서 30분 동안 차광하여 반응시켰다. 이후, 세포와 부착되지 않은 항체를 원심 분리를 통해 제거한 뒤, 인간 말초혈액 단핵세포에 상기 실시예 3-2에서 제조한 PD-L1 항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체 내지 PD-L1 항체-IL2 변이체 15 단백질 복합체를 각각 농도별(0.001~8000 nM)로 처리하여 37°C에서 20분 동안 차광하여 반응시키고 이를 1 mL의 Fixation buffer (BD, U.S.)로 12분간 고정시켰다. 세포질에 있는 인산화 된 STAT-5를 형광 표지 시키기 위하여 1.5 mL의 Perm3 buffer (BD, U.S.)를 처리하여 40분간 4°C에서 반응시켜 형광표지가 침투할 수 있게 하였다. 이후, 인산화 된 STAT-5 단백질에 형광표지하여 30분간 반응시킨 뒤 FACS 분석을 통하여 효과 CD8+ T, 및 조절 T 세포 각각에서 STAT-5가 인산화 된 세포 비율을 확인하였다. 양성대조군으로는 Aldesleukin(프로류킨, Novartis, Switzerland)을 사용하였으며, 그 결과를 하기 표 6에 나타내었다.
- [195] [표6]

	STAT5 phosphorylation (EC ₅₀ , nM)	
	Treg 세포	CD8+T 세포
Aldesleukin	0.007	0.44
PD-L1 항체-IL2 비교군 단백질 복합체	0.01	0.22
PD-L1 항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체	0.12	0.3
PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체	0.59	0.33
PD-L1 항체-IL2 변이체 3 단백질 복합체	N.S	682.7
PD-L1 항체-IL2 변이체 4 단백질 복합체	0.9	0.4
PD-L1 항체-IL2 변이체 5 단백질 복합체	1.45	0.68
PD-L1 항체-IL2 변이체 6 단백질 복합체	0.28	0.28
PD-L1 항체-IL2 변이체 7 단백질 복합체	N.S	404.2
PD-L1 항체-IL2 변이체 8 단백질 복합체	18.11	52.15

PD-L1 항체-IL2 변이체 9 단백질 복합체	0.38	0.29
PD-L1 항체-IL2 변이체 10 단백질 복합체	1.78	1.01
PD-L1 항체-IL2 변이체 11 단백질 복합체	10.6	1.71
PD-L1 항체-IL2 변이체 12 단백질 복합체	0.27	0.37
PD-L1 항체-IL2 변이체 13 단백질 복합체	0.45	0.49
PD-L1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체	0.75	0.53
PD-L1 항체-IL2 변이체 15 단백질 복합체	11.57	3.25

- [196] * N.S: 고농도에서 포화되지 않음(Not Saturated at high concentration)
- [197] 그 결과, 표 6에 나타낸 바와 같이, 양성대조군 및 PD-L1 항체-IL2 비교군의 CD8+ T 세포/조절 T 세포의 EC₅₀ 값의 비율은 각각 62.9 및 22로 나타내었고, 상기 실시예 3-2에서 제조한 PD-L1 항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체 내지 PD-L1 항체-IL2 변이체 15 단백질 복합체의 CD8+ T 세포/조절 T 세포의 EC₅₀ 값의 비율은 0.16 내지 2.88를 나타내었다. 즉, 양성대조군 및 PD-L1 항체-IL2 비교군의 경우, 조절 T 세포를 강하게 활성화시키는 반면, 상기 실시예 3-2에서 제조한 PD-L1 항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체 내지 PD-L1 항체-IL2 변이체 15 단백질 복합체는 조절 T 세포 보다 효과 T 세포인 CD8+ T 세포를 좀 더 선택적으로 활성화시키는 것을 확인할 수 있었다.
- [198] 따라서, 일 양상에 따른 PD-L1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체는 조절 T 세포보다 효과 T 세포의 활성을 더 강하게 유도함으로써 항암 효과와 관련된 면역 반응에 관여할 수 있다.
- [199] **3-5. PD-L1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체의 항암 활성 확인 (1)**
- [200] 일 양상에 따른 PD-L1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체의 항암 활성을 확인하였다. 구체적으로, MC38 세포(1 X 10⁶ cell)를 C57BL/6 마우스(Female, 6주령, 자바이오) 옆구리에 0.2 mL/mouse의 용량으로 피하 투여하여 대장암 이식 마우스 모델(syngeneic mouse model)을 제조하였다. 접종 5일 후, 상기 실시예 3-2에서 제조한 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체를 8 mg/kg 및 16 mg/kg의 용량으로 각각 Q2D x 2회씩 복강 투여하였다. 상기 복합체 투여 후, 마우스의 종양 부피를 측정(3회/주)하여 항암 활성을 비교하였다. 양성대조군으로 Avelumab(Merck, Germany)을 10 mg/kg의 용량으로 복강 투여(Q2D x 2회)하고, Avelumab과 Aldesleukin을 병용투여 하였다(Aldesleukin 0.46 mg/kg, QD x 5 times, i.p.+ Avelumab 10 mg/kg, Day 5, 7, i.p.).
- [201]
- [202] 도 2a는 일 구체예에 따른 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체 및 양성대조군의 항암 활성을 비교한 결과이다.

- [203] 도 2b는 일 구체예에 따른 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체의 대장암 이식 마우스에 대한 개체별 암세포 성장 억제 효과 및 완전 관해 활성을 확인한 결과이다.
- [204] 도 2c는 음성대조군 및 양성대조군(Avelumab, 및 Avelumab과 Aldesleukin의 병용투여)의 대장암 이식 마우스에 대한 암세포 성장 억제 효과 및 완전 관해 활성을 확인한 결과이다.
- [205] 그 결과, 도 2a에 나타낸 바와 같이, 음성대조군(비히클) 및 양성대조군은 투여 후 시간이 지남에 따라 종양 부피가 증가하는 반면, 상기 실시예 3-2에서 제조한 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체는 강력한 암세포 성장 억제 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 구체적으로, 상기 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체는 16 mg/kg의 용량에서 종양이 대부분 사라진 것을 확인할 수 있었다. 또한, 상기 PD-L1 항체-IL2 비교군 단백질 복합체와 달리 상기 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체의 경우 투여 용량에 관계없이 체중 감소 및 사망 개체가 나타나지 않았다.
- [206]
- [207] 또한, 도 2b 및 도 2c에 나타낸 바와 같이, 음성대조군 및 양성대조군은 투여 후 시간이 지남에 따라 종양 부피가 증가하였으며, 완전 관해(complete response, CR)를 나타내는 마우스가 동일 투여 군의 10 마리 실험 동물 중 0~2 마리로 비교적 적은 것을 확인할 수 있었다. 반면, 상기 PD-L1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체의 경우, 완전 관해를 나타내는 마우스가 동일 투여 군의 10 마리 실험 동물 중 6~9 마리로 용량 의존적으로 증가하였으며, 음성대조군 및 양성대조군과 비교하여 현저한 항암 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.
- [208] 즉, 일 양상에 따른 PD-L1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체는 기존 항체 치료제인 Avelumab 및/또는 Avelumab과 Aldesleukin을 병용 투여한 경우와 비교하여 우수한 항암 활성을 나타내는 것을 알 수 있다.
- [209] **3-6. PD-L1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체의 항암 활성 확인 (2)**
- [210] 일 양상에 따른 PD-L1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체의 항암 활성을 확인하였다. PD-L1 항체-IL2 변이체 4 단백질 복합체를 사용하고, 양성대조군으로 Avelumab(Merck, Germany)을 10 mg/kg의 용량으로 복강 투여(Q2D x 2회)하였다는 점을 제외하고는 상기 실시예 3-5와 동일한 방법으로 항암 활성을 확인하였다.
- [211] 도 3은 일 구체예에 따른 PD-L1 항체-IL2 변이체 4 단백질 복합체의 항암 활성을 확인한 결과이다.
- [212] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 음성대조군(비히클)은 투여 후 시간이 지남에 따라 종양 부피가 증가하는 반면, 상기 실시예 3-2에서 제조한 PD-L1 항체-IL2 변이체 4 단백질 복합체는 음성대조군과 비교하여 강한 암세포 성장 억제 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 구체적으로, 상기 PD-L1 항체-IL2 변이체 4 단백질 복합체는 양성대조군 10 mg/kg의 용량을 투여한 경우와 비교하여 8 mg/kg,

16 mg/kg의 용량에서 종양의 부피 변화가 현저히 적은 것을 확인할 수 있었다. 또한, 양성대조군에서는 완전 관해를 나타내는 마우스가 동일 투여 군의 10 마리 실험 동물 중 1 마리인 반면, 상기 PD-L1 항체-IL2 변이체 4 단백질 복합체의 경우 동일 투여 군의 10 마리 실험 동물 중 4~5 마리로 증가하여 양성대조군과 비교하여 현저한 항암 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[213] 즉, 일 양상에 따른 PD-L1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체는 기존 면역항암항체 치료제와 비교하여 조절 T 세포 대비 효과 T세포의 활성을 선택적으로 증가시키는 바, 암을 포함한 다양한 면역 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[214] 따라서, 일 양상에 따른 PD-L1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체는 항암 활성이 우수할 뿐만 아니라, IL2에 의한 부작용을 감소시킴으로써 기존 면역항암치료제와 비교하여 보다 안전한 치료제를 제공할 수 있다.

[215]

[216] 실시예 4. mousePD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(a+b)의 제조 및 활성 확인

[217] **4-1. mousePD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(a+b)의 클로닝 및 배양**

[218] PD-1 항체 및 상기 실시예 1에서 제조한 IL2 변이체 1, 및 4를 사용하였다는 점을 제외하고는 상기 실시예 3-1과 동일한 방법으로 항 mousePD-1 Fab-Fc(이하, “a”라 한다)와 IL2 변이체-Fc(이하, “b”라 한다)를 포함하는 단백질 복합체(a+b)를 수득하였다(도 4a 참조).

[219] **4-2. mousePD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(a+b)의 정제**

[220] 상기 실시예 4-1에서 제조한 세포주의 배양을 통해 확보된 mousePD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(a+b)를 상기 실시예 3-2와 동일한 방법으로 정제하여 고순도 물질을 확보하였다.

[221] **4-3. mousePD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(a+b)의 인간면역세포에 대한 활성 확인**

[222] 상기 실시예 4-2에서 확보된 mousePD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(a+b)의 인간 면역세포의 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 상기 실시예 3-4와 동일한 방법으로 실험을 수행하였다.

[223] [표7]

	STAT5 phosphorylation (EC ₅₀ , nM)	
	Treg 세포	CD8+ T 세포
Aldesleukin	0.029	0.42
mousePD-1 항체-IL2 변이체 4 단백질 복합체	3.10	2.86

[224] 그 결과, 표 7에 나타낸 바와 같이, 양성대조군 및 mousePD-1 항체-IL2 변이체 4 단백질 복합체(a+b)의 CD8+ T 세포/조절 T 세포의 비율은 각각 14.5 및 0.92를 나

타내는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 양성대조군의 경우, 조절 T 세포를 강하게 활성화시키는 반면, 상기 실시예 4-2에서 제조한 mousePD-1 항체-IL2 변이체 4 단백질 복합체(a+b)는 조절 T 세포 보다 효과 T 세포인 CD8+ T 세포를 선택적으로 활성화시키는 것을 확인할 수 있었다.

[225] 따라서, 일 양상에 따른 IL2 변이체 단백질은 PD-L1 항체 뿐만 아니라 다른 면역관문억제제와 복합체를 형성한 경우에도 본래의 특성을 잘 유지하고 효과 T 세포의 활성을 촉진함으로써 면역 반응에 관여할 수 있음을 알 수 있다.

[226]

[227] 실시예 5. mousePD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(a+c)의 제조 및 활성 확인

[228] **5-1. mousePD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(a+c)의 클로닝 및 배양**

[229] mousePD-1 항체 및 IL2 변이체 1, 2, 3, 4, 7, 8, 14 및 15를 포함하는 단백질 복합체를 제조하였다. 구체적으로, ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 이용하여 mousePD-1 항체 중쇄 가변영역-불변 영역을 코딩하는 폴리 뉴클레오티드와 mousePD-1 항체 경쇄 불변 영역-경쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 각각 합성하였다. 이후, 상기 각 폴리뉴클레오티드를 pCHO1.0 발현벡터의 AvrII-Bstz17I enzyme site와 EcoRV-PacI enzyme site에 각각 삽입하여 mousePD-1 항체를 발현하는 제1 발현 벡터를 제조하였다. 동일한 서비스를 이용하여 mousePD-1 항체 중쇄 가변영역-불변 영역을 코딩하는 폴리 뉴클레오티드의 C 말단에 상기 실시예 1의 IL2 변이체 1, 2, 3, 4, 7, 8, 14 및 15 중 어느 하나와 링커를 포함하는 복합체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 합성한 후 pCHO1.0 발현벡터의 AvrII-BstZ17I enzyme site에 삽입하였고, 상기 mouse PD-1 항체 경쇄 불변 영역-경쇄 가변영역은 EcoRV-PacI enzyme site에 삽입하여 제2 발현 벡터를 제조하였다. 이후, 상기 실시예 2-1과 동일한 방법으로 항 mousePD-1 Fab-Fc(a)와 항 mousePD-1 Fab-Fc-C 말단 IL2 변이체(이하, "c"이라 한다)를 포함하는 단백질 복합체(a+c)를 수득하였다(도 4b 참조).

[230] **5-2. mousePD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(a+c)의 정제**

[231] 상기 실시예 5-1에서 제조한 세포주 배양을 통해서 확보된 mousePD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(a+c)를 정제하여 고순도 물질(순도 98% 이상)을 확보하였다.

[232] 먼저, mousePD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(a+c)를 사용하였다는 점을 제외하고는 상기 실시예 3-2와 동일한 방법으로 미세한 잔해물을 제거한 뒤, 1차 정제하였다. 이후, Phosphate buffer saline (pH 7.4) 버퍼로 안정화된 Protein A 컬럼에, 여과과정을 거친 배지를 넣은 후, 비특이적으로 결합하지 않은 단백질을 동일 버퍼를 사용하여 씻어내고, 0.05 M Citric acid(pH 5.0)가 포함된 버퍼 용액을 이용하여 한 번 더 씻어내었다. 이후, 0.02 M Citric acid(pH 5.0 및 pH 3.5)을 이용하여 Protein-A 컬럼에 특이적으로 결합하는 단백질을 pH 내림 구배 방식으로 용출하였으며, 1 M Tris를 이용하여 pH 7.2로 시료를 중화시켰다.

- [233] 이후, 친화성 컬럼을 통해 분리된 시료 내에 잔존하는 물질 유래 불순물을 제거하기 위해 소수성 상호작용 컬럼 (Phenyl HP, Cytiva사)를 이용하여 2차 정제하였다. 구체적으로, 0.02 M sodium phosphate (pH 7.0) 버퍼와 0.8 M Ammonium sulfate (pH 7.0)로 안정화된 Phenyl HP 컬럼에, Protein-A 컬럼에서 용출 및 중환된 시료에 1 M Citric acid를 첨가하여 pH 7.0 로 적정하여 넣은 후, 비특이적으로 결합하지 않은 단백질을 동일 버퍼를 사용하여 씻어내었다. 이후, 0.02 M sodium phosphate (pH 7.0)이 포함된 버퍼 용액을 이용하여 염농도 내림 구배 방식으로 용출하여 mousePD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(a+c)를 확보하였다. 확보된 mousePD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(a+c)를 Phosphate buffer saline (pH 7.4)로 안정화시킨 뒤, 크기 배제 HPLC (TSK-3000SWxL, 7.8 mm x 30 cm, Tosoh사)를 이용하여 순도분석을 수행하였다.
- [234] 도 5a는 Protein-A 친화성 컬럼 정제방법을 이용하여 일 구체예에 따른 mousePD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(a+c)를 정제한 결과이다.
- [235] 도 5b는 소수성 상호작용 컬럼 정제방법을 이용하여 일 구체예에 따른 mousePD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(a+c)를 정제한 결과이다.
- [236] 도 5c는 일 구체예에 따른 mousePD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(a+c)의 순도 분석 결과를 나타낸다.
- [237] 그 결과, 도 5a에 나타낸 바와 같이, Protein-A 친화성 컬럼 정제에서 사용된 용출 버퍼에 의하여 상기 컬럼에 특이적으로 결합하는 단백질을 확인할 수 있었다. 구체적으로, 용출액 2800 내지 2900 ml에서 상기 컬럼에 특이적으로 결합하는 mousePD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(a+c)를 확인할 수 있었다.
- [238] 또한, 도 5b에 나타낸 바와 같이, Protein A 친화성 컬럼에서 사용된 용출액 내 잔존하는 불순물과 비특이적으로 결합하는 단백질이 제거된 것을 확인할 수 있었다.
- [239] 또한, 도 5c에 나타낸 바와 같이, 상기 모든 정제과정을 통해 확보된 mousePD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(a+c)는 머무름 시간 15.639분에서 98.6%의 순도를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.
- [240] 즉, 일 양상에 따른 mousePD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(a+c)는 높은 순도로 정제되는 것을 알 수 있다.
- [241] **5-3. mousePD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(a+c)의 수용체 결합력 확인**
- [242] 상기 실시예 5-2에서 제조한 mousePD-1 항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체(a+c) 및 mousePD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(a+c)를 1.56~8000 nM의 농도 범위에서 2배씩 연속 희석하여 전개하였다는 점을 제외하고는 상기 실시예 3-3과 동일한 방법으로 mousePD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(a+c)의 수용체 결합력을 확인하였다.
- [243] [표8]

실험군	결합친화도(nM, SPR analysis)
-----	-------------------------

	Human IL2Rb	Human IL2Rbg	Human IL2Rabg
muPD-1항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체	5,610	4.51	1.01
muPD-1항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체	6,290	35.3	25.7
muPD-1항체-IL2 변이체 14/ muPD-1항체-IL2 변이체 1 (결합력 상대 비율)	1.1	7.8	25.4

[244] 그 결과, 표 8에 나타낸 바와 같이, mousePD-1 항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체 (a+c) 및 mousePD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(a+c)는 IL2Rb에 대하여 각각 5,610 nM 및 6,290 nM의 결합친화도를 나타내는 바, 유사한 수준으로 결합하는 것을 확인할 수 있었다. 반면, IL2Rbg와는 각각 4.51 nM 및 35.3 nM의 결합친화도를 나타내어 mousePD-1 항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체(a+c)와 비교하여 mousePD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(a+c)에서 약 7.8배 가량 결합력이 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

[245] 이는 mousePD-1 항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체(a+c) 및 mousePD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(a+c)의 IL2Rb에 대한 결합력이 유사한 상태에서 mousePD-1 항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체(a+c)와 비교하여 mousePD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(a+c)의 IL2Rg에 대한 결합력이 약 7.8배 감소한 것을 의미한다.

[246] **5-4. mousePD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(a+c)의 인간면역세포에 대한 활성 확인**

[247] 상기 실시예 5-2에서 제조한 mousePD-1 항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체, mousePD-1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체, mousePD-1 항체-IL2 변이체 3 단백질 복합체, mousePD-1 항체-IL2 변이체 4 단백질 복합체, mousePD-1 항체-IL2 변이체 7 단백질 복합체, mousePD-1 항체-IL2 변이체 8 단백질 복합체, mousePD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체 및 mousePD-1 항체-IL2 변이체 15 단백질 복합체와 mousePD-1항체-IL2 변이체 비교군을 사용하였다는 점을 제외하고는 상기 실시예 3-4와 동일한 방법으로 mousePD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(a+c)가 인간면역세포의 활성화에 미치는 영향을 확인하였다.

[248] [표9]

	STAT5 phosphorylation (EC ₅₀ , nM)	
	Treg 세포	CD8+ T 세포
Aldesleukin	0.035±0.02	0.75±0.5
muPD-1 항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체	11.91±8.02	9.61±1.44

muPD-1 항체-IL2 변이체 2 단백질 복합체	12.5±0.5	7.81±1.7
muPD-1 항체-IL2 변이체 3 단백질 복합체	124.2±62.4	135.9±121.9
muPD-1 항체-IL2 변이체 4 단백질 복합체	19.01±7.56	23.2±4.85
muPD-1 항체-IL2 변이체 7 단백질 복합체	104.5	125.4
muPD-1 항체-IL2 변이체 8 단백질 복합체	159.1	170.1
muPD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체	320.7±279.1	161.1±70.3
muPD-1 항체-IL2 변이체 15 단백질 복합체	772.2±43.6	576.5±361.6

[249] 그 결과, 표 9에 나타난 바와 같이, 양성대조군(Aldesleukin)의 경우 CD8+ T 세포/조절 T 세포의 EC₅₀ 값의 비율이 21.4로 나타난 반면, 상기 실시예 5-2에서 제조한 mousePD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(a+c)의 경우 0.5 내지 1.2를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 양성대조군은 조절 T 세포를 더 강하게 활성화시키는 반면, 일 구체에 따른 mousePD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(a+c)는 조절 T 세포보다 효과 T 세포인 CD8+ T 세포를 선택적으로 활성화시킨다는 것을 알 수 있다. 즉, IL2 변이체는 FC 영역의 C 말단에 연결되어 있는 구조에서도 CD8+ T 세포를 선택적으로 활성화시키는 고유한 특성을 잘 유지한다는 것을 알 수 있다.

[250] 또한, mousePD-1 항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체(a+c)의 T reg과 CD8+ T 세포에 대한 활성도는 각각 11.91±8.02 nM 및 9.61±1.44 nM인 반면, mousePD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(a+c)의 T reg과 CD8+ T 세포에 대한 활성도는 각각 320.7±279.1 nM 및 161.1±70.3 nM을 나타냄으로써 mousePD-1 항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체(a+c)와 비교하여 mousePD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(a+c)의 T reg과 CD8+ T 세포에 대한 활성도가 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이는 상기 실시예 5-3에서 확인한 바와 같이, IL2R γ 에 대한 결합력 감소(약 7.8배)에 의한 것임을 알 수 있다. 뿐만 아니라, 효과 T 세포/조절 T 세포의 EC₅₀ 값의 비율이 0.5로, 조절 T 세포와 비교하여 효과 T 세포(CD8+ T 세포)를 선택적으로 활성화시킨다는 것을 알 수 있다.

[251] 따라서, 일 양상에 따른 mousePD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(a+c)는 조절 T 세포 대비 효과 T 세포를 선택적으로 활성화시킴으로써 항암 효과와 관련된 면역 반응에 관여할 수 있다.

[252] **5-5. mousePD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(a+c)의 항암 활성 확인**

[253] 일 양상에 따른 mousePD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(a+c)의 항암 활성을 확인하였다. 구체적으로, MC38 세포(1.0 x 10⁶ cell/마리)를 1주의 순화 기간을 거친 C57BL/6 마우스(Female, 6주령, (주)코아텍)의 오른쪽 옆구리에 피하 주사하여 대장암 이식 마우스 모델(syngenerie mouse model)을 제조하였다. 이후, 마우스 내

종양 크기가 약 70~120 mm³가 되었을 때, 약물 투여군 별로 3~6 마리 씩 분류한 뒤, 상기 실시예 5-2에서 제조한 mousePD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(a+c)를 1, 3, 5 및 10 mg/kg 씩 각각 1주일에 한번씩 총 2회 복강 투여하였다. 이때, 음성대조군으로는 vehicle을 사용하고 양성대조군으로는 항-PD1 항체인 J43(clone) 3 mg/kg 및 J43 3 mg/kg + IL2 비교군-Fc 복합체 1.4 mg/kg을 사용하였다. 이후, 약물 투여에 의한 종양 성장 억제 효과를 첫번째 약물 투여 이후 19일까지 관찰하였다.

- [254] 도 6a는 일 구체예에 따른 mousePD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(a+c), 음성대조군 및 양성대조군의 대장암 이식 마우스 모델에서의 항암 활성을 비교한 결과이다.
- [255] 도 6b는 일 구체예에 따른 mousePD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(a+c), 음성대조군 및 양성대조군의 항암 활성에 따른 대장암 이식 마우스 모델의 몸무게 변화를 비교한 결과이다.
- [256] 그 결과, 도 6a 및 6b에 나타낸 바와 같이, 음성대조군 및 양성대조군은 시간이 지남에 따라 종양 부피가 증가하는 반면, 상기 실시예 5-2에서 제조한 mousePD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(a+c)는 투여 직후와 비교하여 용량 의존적으로 암세포 성장 억제 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 양성대조군 및 병용 투여군과 비교하여 상기 mousePD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(a+c) 5 mg/kg 및 10 mg/kg을 투여한 경우, 우수한 암세포 성장 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 상기 mousePD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(a+c)는 PD-1 단일 항체 및 IL2 비교군-Fc 단백질 복합체를 병용 투여한 경우와 비교하여 항암 활성이 현저히 우수한 것을 확인할 수 있었다.
- [257] 따라서, 일 양상에 따른 mousePD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(a+c)는 기존 면역항암 치료제와 비교하여 효과 T 세포를 특이적으로 활성화 시키는 바, 암과 관련된 다양한 면역 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[258]

[259] **실시예 6. humanPD-1 항체-IL-2 변이체 단백질 복합체 (A+C)의 제조**

[260] **6-1. humanPD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체 (A+C)의 클로닝 및 배양**

[261] humanPD-1 항체와 IL2 비교군, IL2 변이체 1 및 IL2 변이체 14를 포함하는 단백질 복합체를 각각 제조하였다. 구체적으로 humanPD-1 항체 중쇄 가변영역-불변 영역을 코딩하는 폴리 뉴클레오티드와 humanPD-1 항체 경쇄 불변 영역-경쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 사용하였다는 점을 제외하고는 상기 실시예 5-1과 동일한 방법으로 항 humanPD-1 Fab-Fc(이하, "A"라 한다.)와 항 humanPD-1 Fab-Fc-C 말단 IL2 변이체(이하, "C"라 한다.)를 포함하는 단백질 복합체(A+C)를 수득하였다.

[262] **6-2. humanPD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(A+C)의 정제**

[263] 상기 실시예 6-1에서 제조한 세포주 배양을 통해서 확보된 humanPD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(A+C)를 상기 실시예 5-2와 동일한 방법으로 정제한 후,

Phosphate buffer saline (pH 7.4)로 안정화시켜 고순도의 humanPD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(A+C)를 확보하였다. 이후, 상기 실시예 5-2와 동일한 방법으로 순도 분석을 수행하였다.

[264] **6-3 humanPD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(A+C)의 결합력 확인**

[265] 상기 실시예 6-2에서 제조한 humanPD-1 항체-IL2 비교군 단백질 복합체(A+C), humanPD-1 항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체(A+C), humanPD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(A+C)를 1.56~8000 nM의 농도 범위에서 2배씩 연속 희석하여 전개하였다는 점을 제외하고는 상기 실시예 3-3과 동일한 방법으로 humanPD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(A+C)의 수용체 결합력을 확인하였다. 이때 인간 PD-1에 대한 양성대조군으로 Pembrolizumab을 사용하였고, 대조군으로는 humanPD-1 항체-IL2 변이체 1을 사용하였으며, 그 결과를 하기 표 10 및 표 11에 나타내었다.

[266] [표10]

리간드	실험군	결합친화도(KD, nM)
hPD-1	Pembrolizumab	2.70
	huPD-1항체-IL2 비교군 단백질 복합체	2.95
	huPD-1항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체	2.25
	huPD-1항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체	2.60

[267] [표11]

실험군	결합친화도(nM, SPR analysis)			
	Human IL2R α	Human IL2R β	Human IL2R $\beta\lambda$	Human IL2R $\alpha\beta\lambda$
huPD-1항체-IL2 비교군 단백질 복합체	105	6.506	3.08	0.023
huPD-1항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체	No binding	5.462	2.92	0.782
huPD-1항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체	No binding	5.611	68.3	25.5
huPD-1항체-IL2 변이체 14/ huPD-1 항체-IL2 변이체 1 (결합력 상대 비율)	-	1.03	23.4	32.6

[268] 그 결과, 표 10에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 6-2에서 제조한 huPD-1항체-IL2 비교군 단백질 복합체(A+C), humanPD-1 항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체(A+C) 및 humanPD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(A+C)와 양성대조군은 2.25

내지 2.95 nM의 결합력을 나타내었고, 인간 PD-1에 대한 결합력이 모두 유사한 수준을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[269] 한편, 표 11에 나타낸 바와 같이, humanPD-1 항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체(A+C) 및 humanPD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(A+C)는 IL2R α 와는 반응하지 않는 양상을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 반면, IL2R β 에 대하여 humanPD-1 항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체(A+C) 및 humanPD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(A+C)는 각각 5.462 nM 및 5.611 nM의 결합친화도를 나타내어 유사한 수준의 결합력을 나타내고, IL2R $\beta\gamma$ 에 대하여 humanPD-1 항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체(A+C) 및 humanPD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(A+C)는 각각 2.92 nM 및 68.3 nM의 결합친화도로 결합하는 것을 확인할 수 있었다. 상기와 같은 결과로 보아, humanPD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(A+C)는 IL2R β 에 대한 결합력은 humanPD-1 항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체(A+C)와 유사한 반면, IL2R γ 에 대한 결합력은 감소되는 것을 알 수 있다. 구체적으로, humanPD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(A+C)는 humanPD-1 항체-IL2 변이체 1과 비교하여 IL2R $\beta\gamma$ 및 IL2R $\alpha\beta\gamma$ 에 대한 결합력이 각각 약 23.4배 및 32.6배 감소한 것을 확인할 수 있었다. 즉, humanPD-1 항체-IL2 변이체 1 단백질 복합체(A+C) 및 humanPD-1 항체-IL2 변이체 14 단백질 복합체(A+C)는 ILR α 와 결합하지 않을 뿐만 아니라, IL2R γ 와의 결합 역시 약해진 것을 알 수 있다.

[270] 따라서, 일 양상에 따른 humanPD-1 항체-IL2 변이체 단백질 복합체(A+C)는 조절 T 세포와 비교하여 CD8+ T 세포에서 높은 활성화를 유도하기 위한 것으로, IL2R $\beta\gamma$ 를 발현하는 CD8+ T 세포의 선택적 활성화를 유도하기 위해 IL2R α 에 대한 결합력은 제거하고, 특정 아미노산의 치환을 통하여 IL2R γ 에 대한 결합력을 조절하는 것을 특징으로 한다.

[271]

[272] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

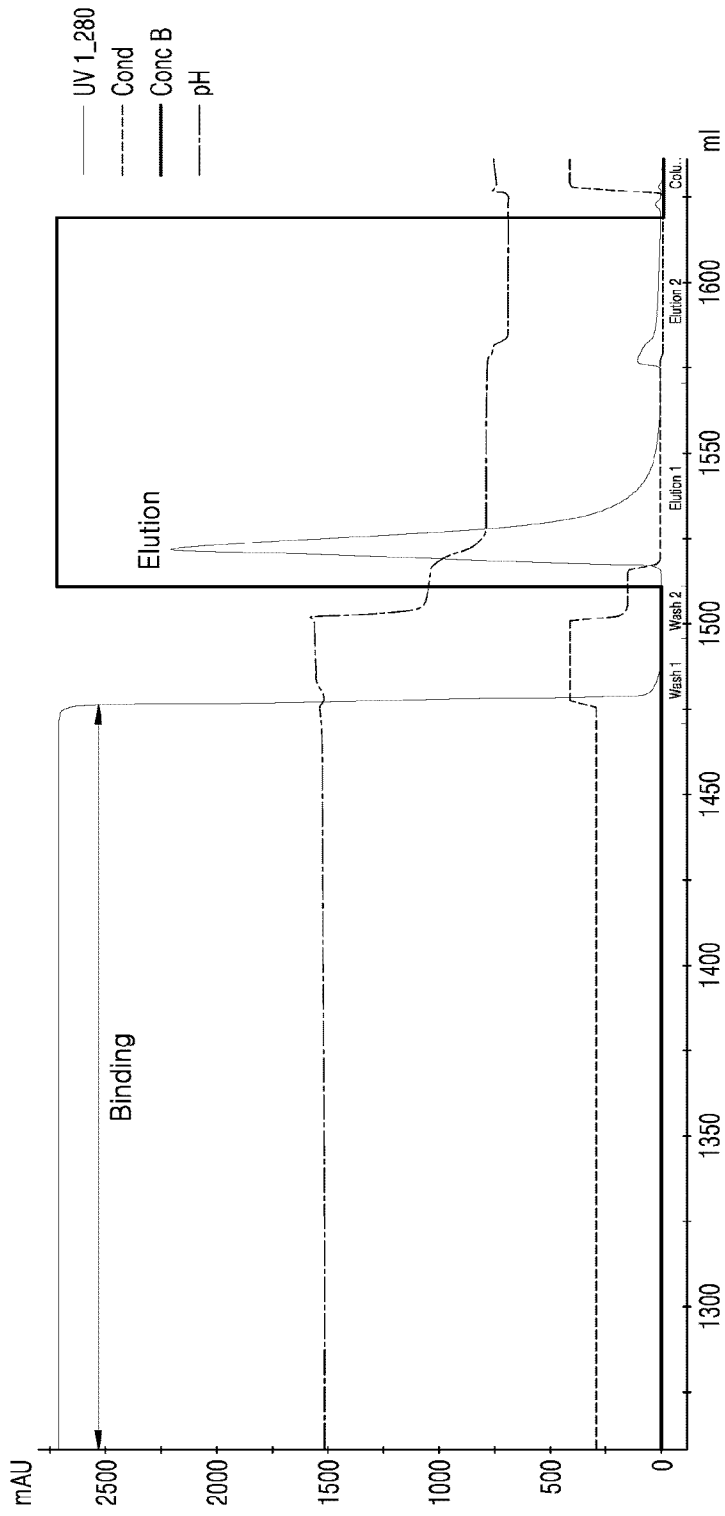
청구범위

- [청구항 1] IL2 변이체를 포함하는 단백질로서,
상기 IL2 변이체는 35 위치에 글루탐산(E), 38 위치에 알라닌(A), 42 위치에 라이신(K), 및 125 위치에 세린(S)을 포함하는, 단백질.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 IL2 변이체는
18 및 19로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상이 위치에, 메티오닌(M), 아르기닌(R), 알라닌(A), 류신(L), 세린(S), 페닐알라닌(F), 발린(V), 이소류신(I), 글루타민(Q), 트립토판(W), 아스파라긴(N), 및 트레오닌(T)으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산을 추가로 포함하는, 단백질.
- [청구항 3] 청구항 2에 있어서, 상기 IL2 변이체는
18번 위치에 메티오닌(M) 또는 아르기닌(R); 및
19번 위치에 세린(S)을 포함하는, 단백질.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 IL2 변이체는
126 위치에, 트레오닌(T), 및 이소류신(I)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산을 추가로 포함하는, 단백질.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 IL2 변이체는
서열번호 1 내지 15로 구성된 군에서 선택되는 아미노산을 포함하는, 단백질.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, 상기 단백질은 링커 또는 캐리어에 의해 결합된 Fc 영역을 포함하는, 단백질.
- [청구항 7] 제1 CH3 항체 불변 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 및 제2 CH3 항체 불변 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하고, 상기 제1 폴리펩티드와 상기 제2 폴리펩티드는 헤테로다이머(heterodimer)를 형성하는 단백질 복합체로서,
상기 제1 또는 제2 폴리펩티드 중 어느 하나 이상의 N-말단에는 면역관문 억제제(immune checkpoint inhibitor)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 종양특이적항원(tumor associated antigen)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고,
상기 제1 또는 제2 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단 중 어느 하나 이상에는 IL2 변이체를 포함하는, 단백질 복합체.
- [청구항 8] 청구항 7에 있어서, 상기 제1 CH3 항체 불변 영역은 366번째 위치에 트립토판(W)을 포함하고, 상기 제2 CH3 항체 불변 영역은 366번째 위치에 세린(S), 368번째 위치에 알라닌(A), 및 407번째 위치에서 발린(V)을 포함하고; 및
제2 CH3 항체 불변 영역의 351번째 위치에 글리신(G) 또는 페닐알라닌(F)을 포함하는, 단백질 복합체.
(단, 상기 아미노산의 위치는 Kabat EU index에 따른다)

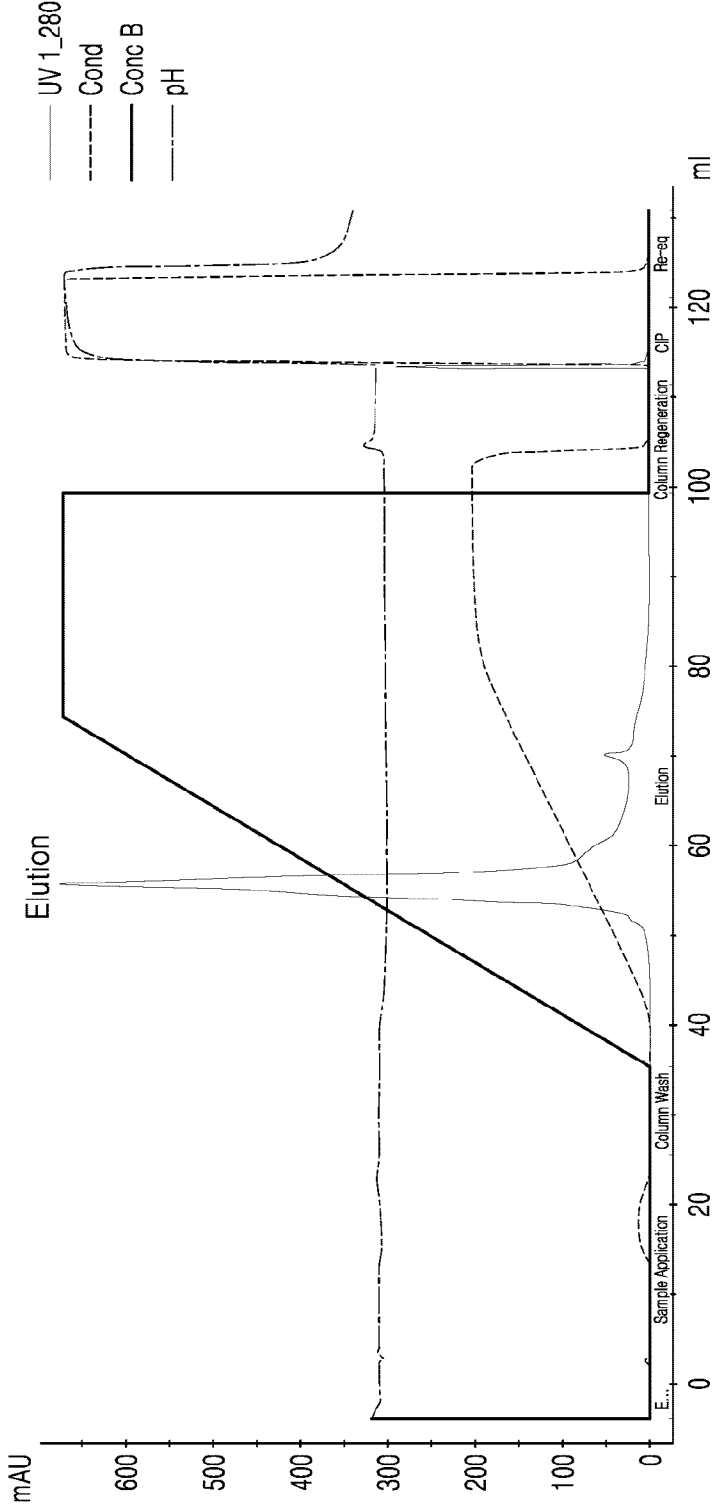
- [청구항 9] 청구항 7에 있어서, 상기 제1 CH3 항체 불변 영역은 366번째 위치에 세린(S), 368번째 위치에 알라닌(A), 및 407번째 위치에서 발린(V)을 포함하고, 상기 제2 CH3 항체 불변 영역은 366번째 위치에 트립토판(W)을 포함하고; 및
제1 CH3 항체 불변 영역의 351번째 위치에 글리신(G) 또는 페닐알라닌(F)을 포함하는, 단백질 복합체.
(단, 상기 아미노산의 위치는 Kabat EU index에 따른다)
- [청구항 10] 청구항 7에 있어서, 상기 제1 CH3 항체 불변 영역은 366번째 위치에 트립토판(W)을 포함하고, 상기 제2 CH3 항체 불변 영역은 351번째 위치에 글리신(G), 366번째 위치에 세린(S), 368번째 위치에 알라닌(A), 및 407번째 위치에 발린(V)을 포함하고; 및
제1 CH3 항체 불변 영역의 351번째 위치에 페닐알라닌(F), 또는 트립토판(W)을 포함하는, 단백질 복합체.
(단, 상기 아미노산의 위치는 Kabat EU index에 따른다)
- [청구항 11] 청구항 7에 있어서, 상기 제1 CH3 항체 불변 영역은 351번째 위치에 글리신(G), 366번째 위치에 세린(S), 368번째 위치에 알라닌(A), 및 407번째 위치에 발린(V)을 포함하고, 상기 제2 CH3 항체 불변 영역은 366번째 위치에 트립토판(W)을 포함하고; 및
제2 CH3 항체 불변 영역의 351번째 위치에 페닐알라닌(F), 또는 트립토판(W)을 포함하는, 단백질 복합체.
(단, 상기 아미노산의 위치는 Kabat EU index에 따른다)
- [청구항 12] 청구항 7에 있어서, 상기 제1 CH3 항체 불변 영역은 351번째 위치에 글리신(G), 366번째 위치에 세린(S), 368번째 위치에 알라닌(A), 및 407번째 위치에 발린(V)을 포함하고, 상기 제2 CH3 항체 불변 영역은 366번째 위치에 트립토판(W)을 포함하고; 및
제2 CH3 항체 불변 영역의 351번째 위치에 페닐알라닌(F), 또는 트립토판(W)을 포함하는, 단백질 복합체.
(단, 상기 아미노산의 위치는 Kabat EU index에 따른다)
- [청구항 13] 청구항 7에 있어서, 상기 면역관문억제제는 PD-L1, PD-1, LAG-3, VISTA, BTLA, TIM-3, TIGIT 및 CTLA-4로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인, 단백질 복합체.
- [청구항 14] 청구항 7에 있어서, 종양특이적항원은 PD-L1, EGFR, HER-2, B7H3, GPC3, CEA, TROP 및 PSMA로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인, 단백질 복합체.
- [청구항 15] 청구항 7에 있어서, 상기 제2 폴리펩티드; 및 상기 IL2 변이체는 1 이상의 링커 또는 캐리어에 의해 결합된, 단백질 복합체.
- [청구항 16] 청구항 15에 있어서, 상기 링커는 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

- [청구항 17] 청구항 1 내지 16 중 어느 한 항의 단백질 또는 단백질 복합체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 18] 청구항 1 내지 17 중 어느 한 항의 단백질 또는 단백질 복합체를 코딩하는 발현 벡터를 세포에 형질전환하는 단계를 포함하는 단백질 또는 단백질 복합체의 제조방법.
- [청구항 19] 청구항 18의 방법에 의해 제조된, IL2 변이체를 포함하는 단백질 복합체.
- [청구항 20] 청구항 1 내지 17 중 어느 한 항의 단백질 또는 단백질 복합체를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 21] 청구항 1 내지 17 중 어느 한 항의 단백질 또는 단백질 복합체를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 22] 암 치료제의 제조를 위한, 청구항 1 내지 17 중 어느 한 항의 단백질 또는 단백질 복합체의 용도.

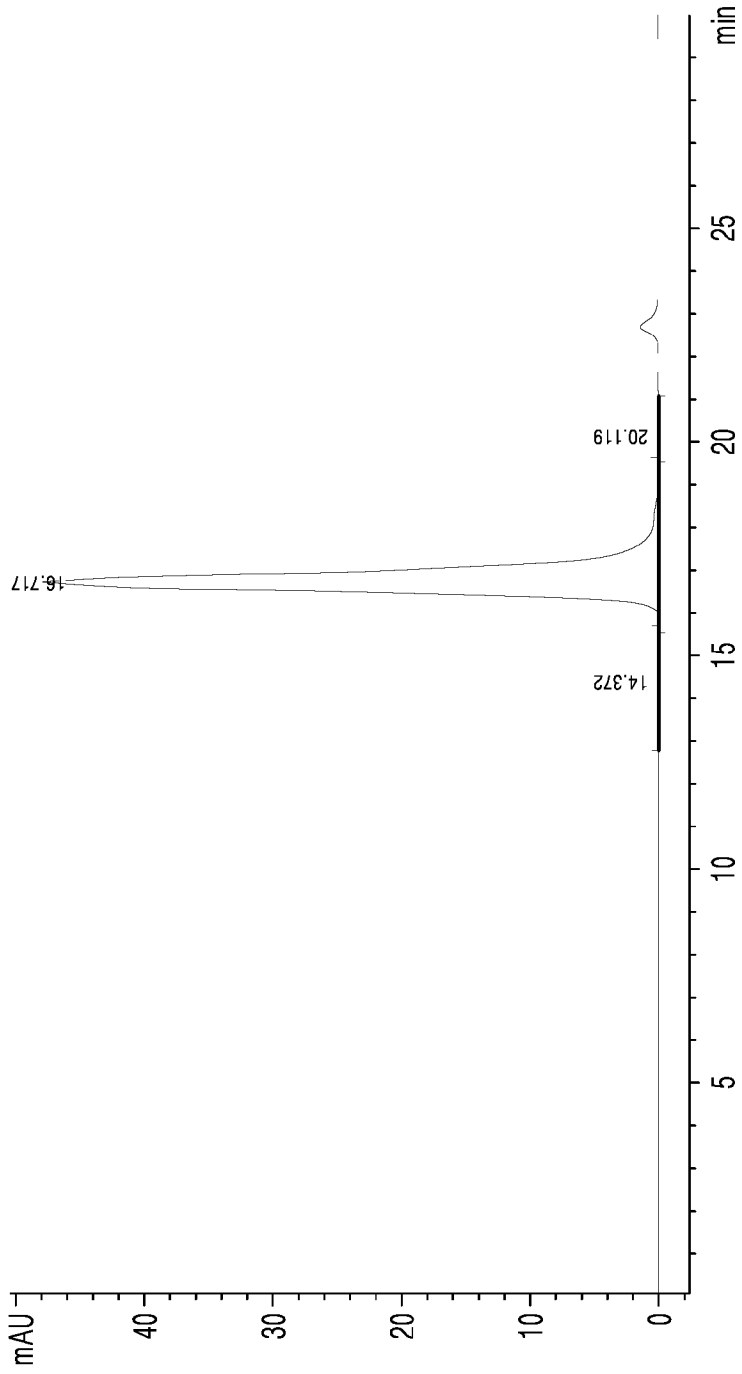
[Figure 1a]



[F1b]

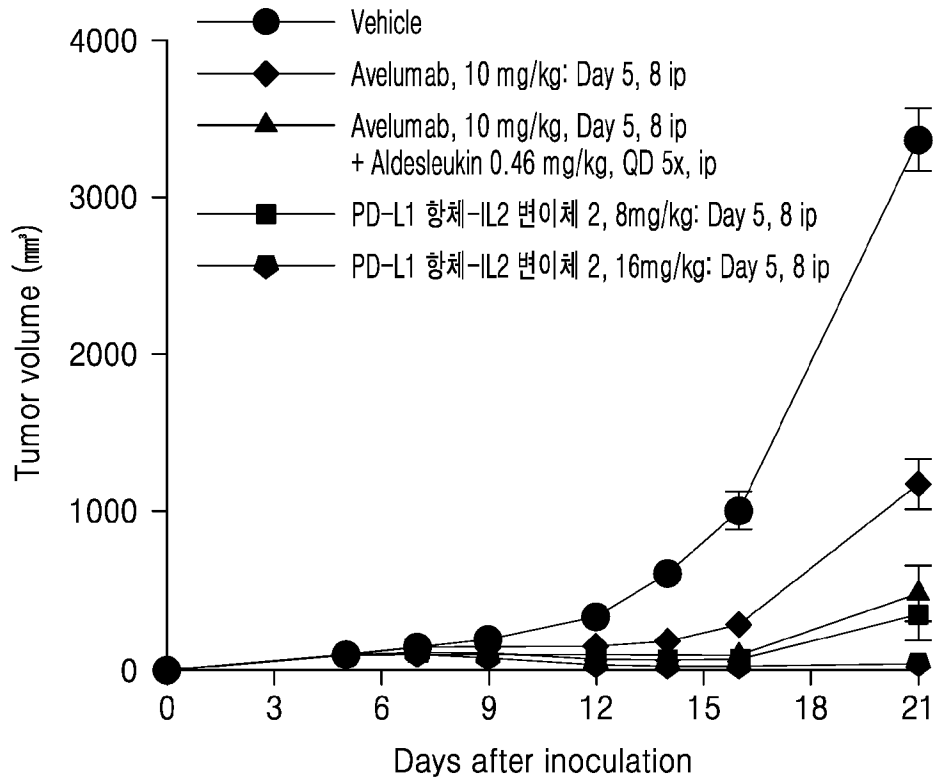


[도 1c]

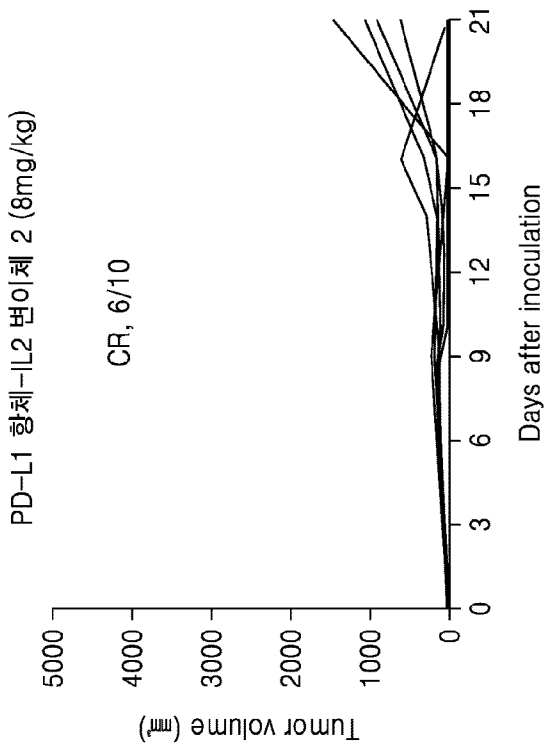
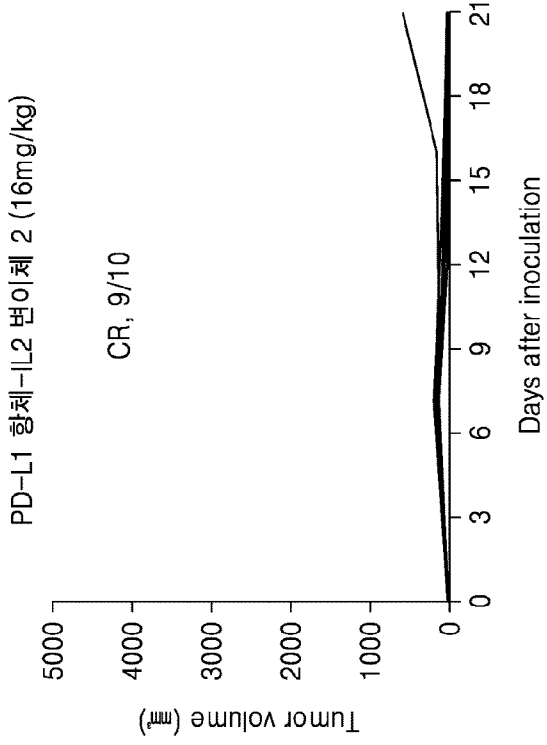


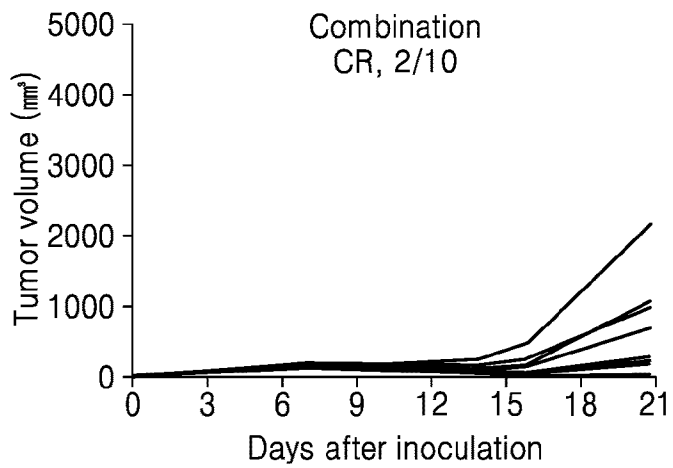
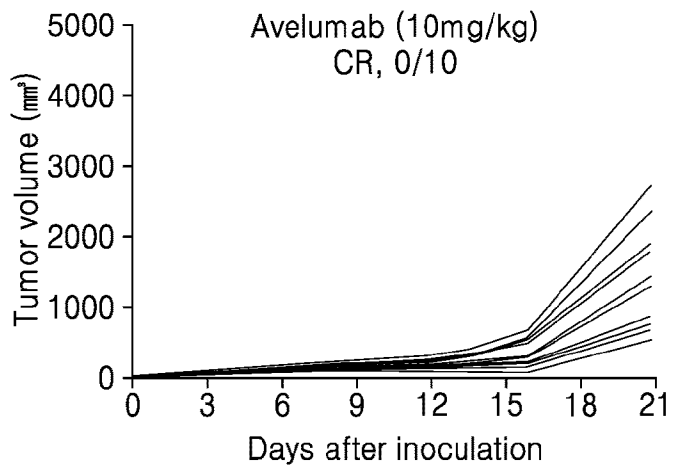
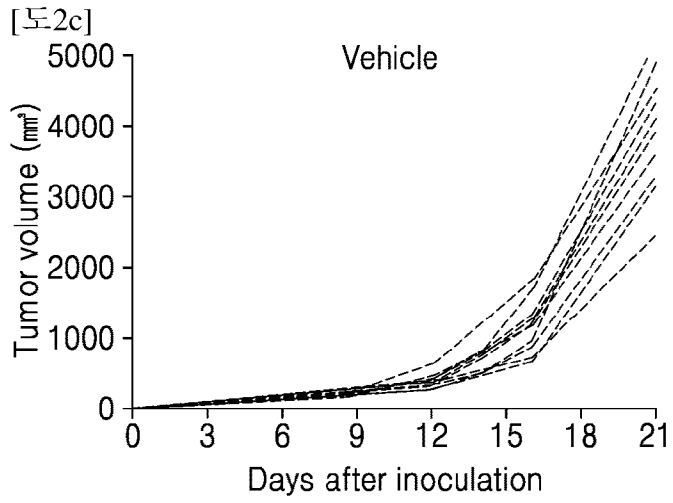
[도2a]

In vivo anti-tumor effect in MC38 syngeneic mice
(C57BL/6 mice inoculated with MC38, n=10, ip)



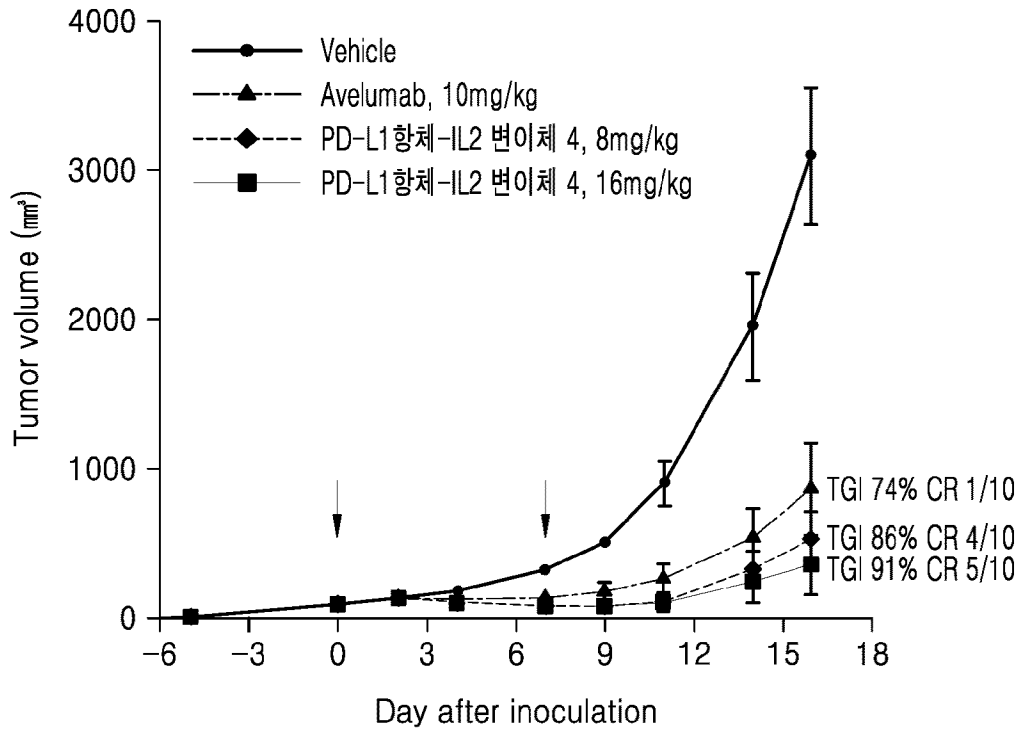
[도2b]





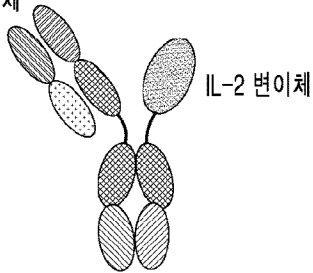
[도3]

Colon cancer syngeneic model
(C57BL/6 mice, MC38 inoculation, n=7~10, ip, QWx2)

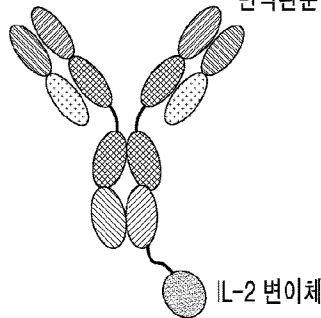


[도4]

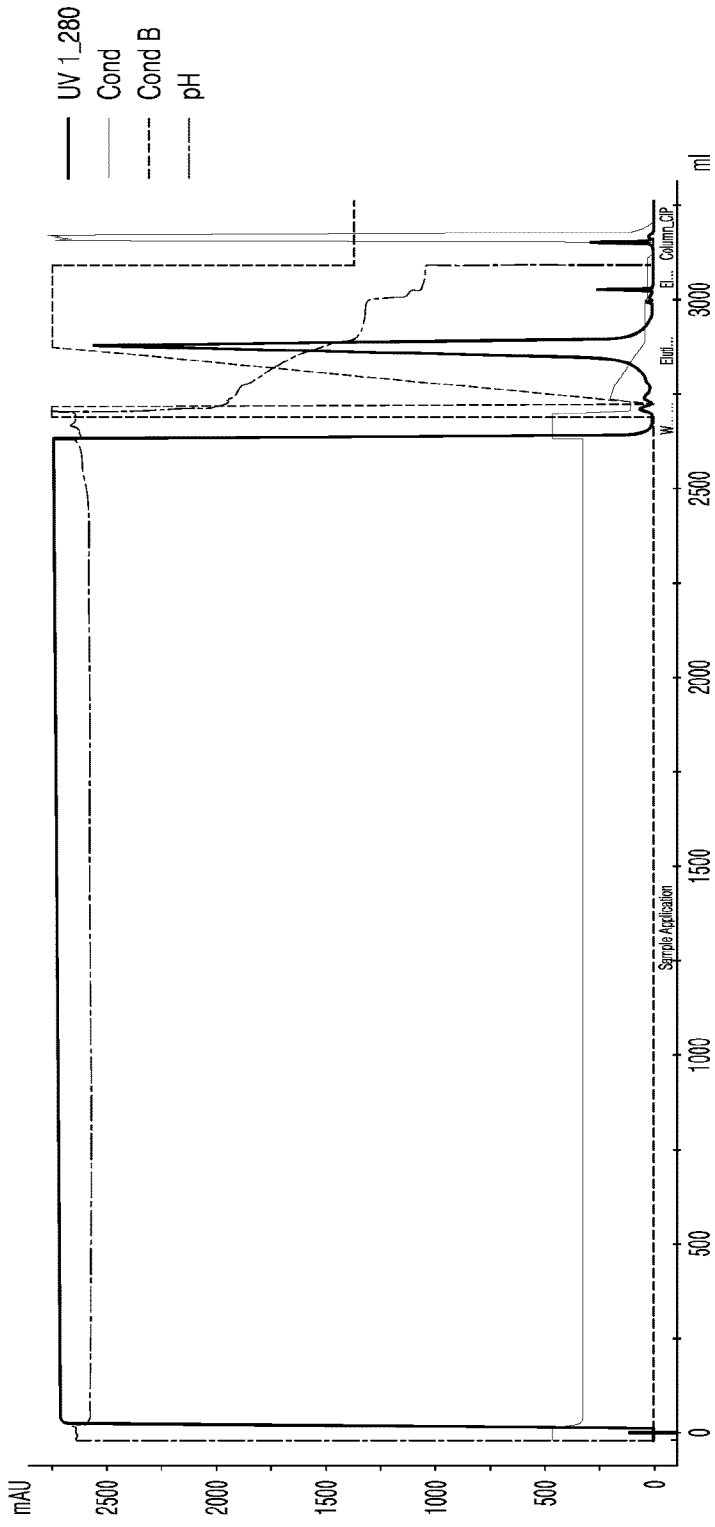
종양특이적항원 또는
면역관문억제제 항체



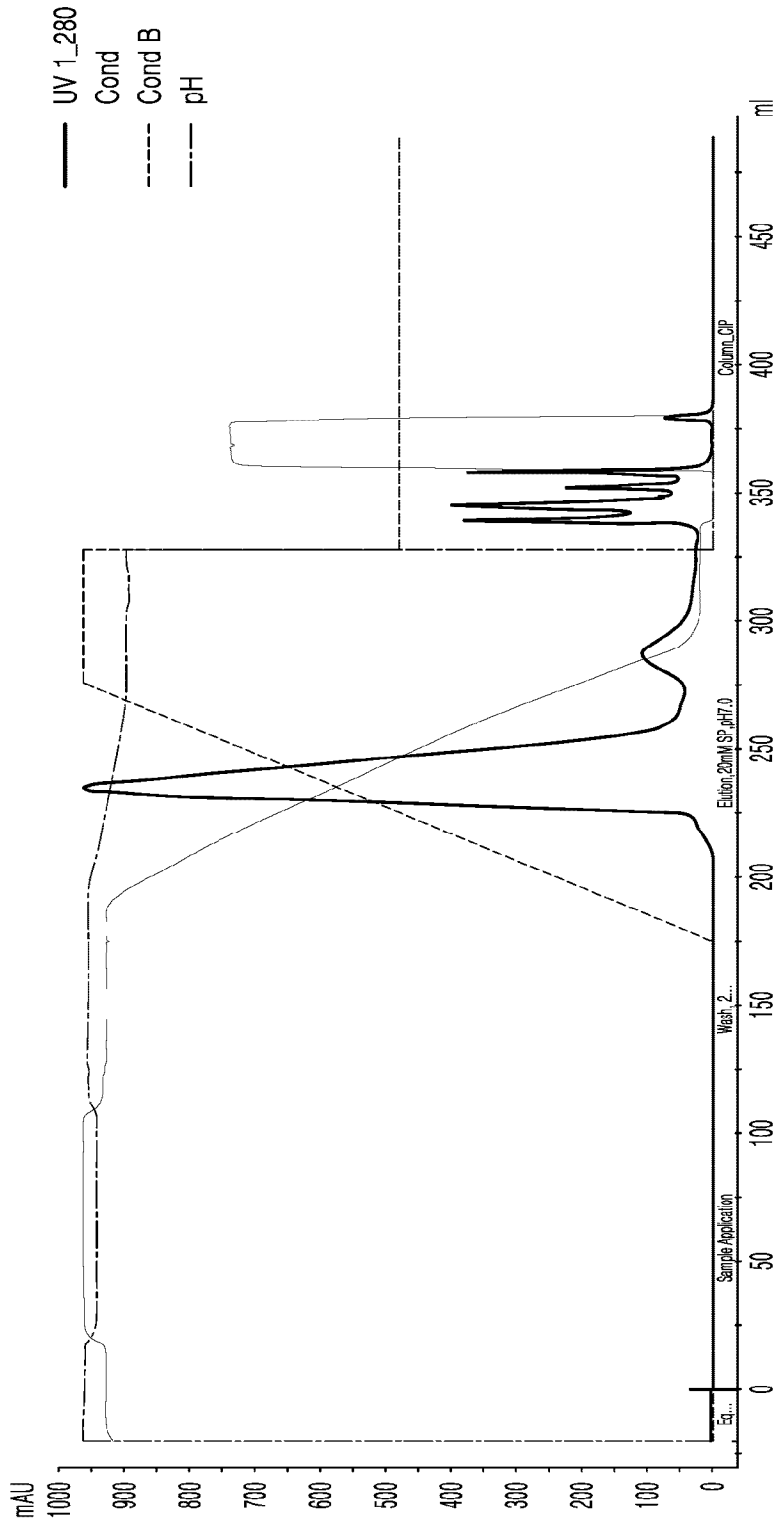
종양특이적항원 또는
면역관문억제제 항체



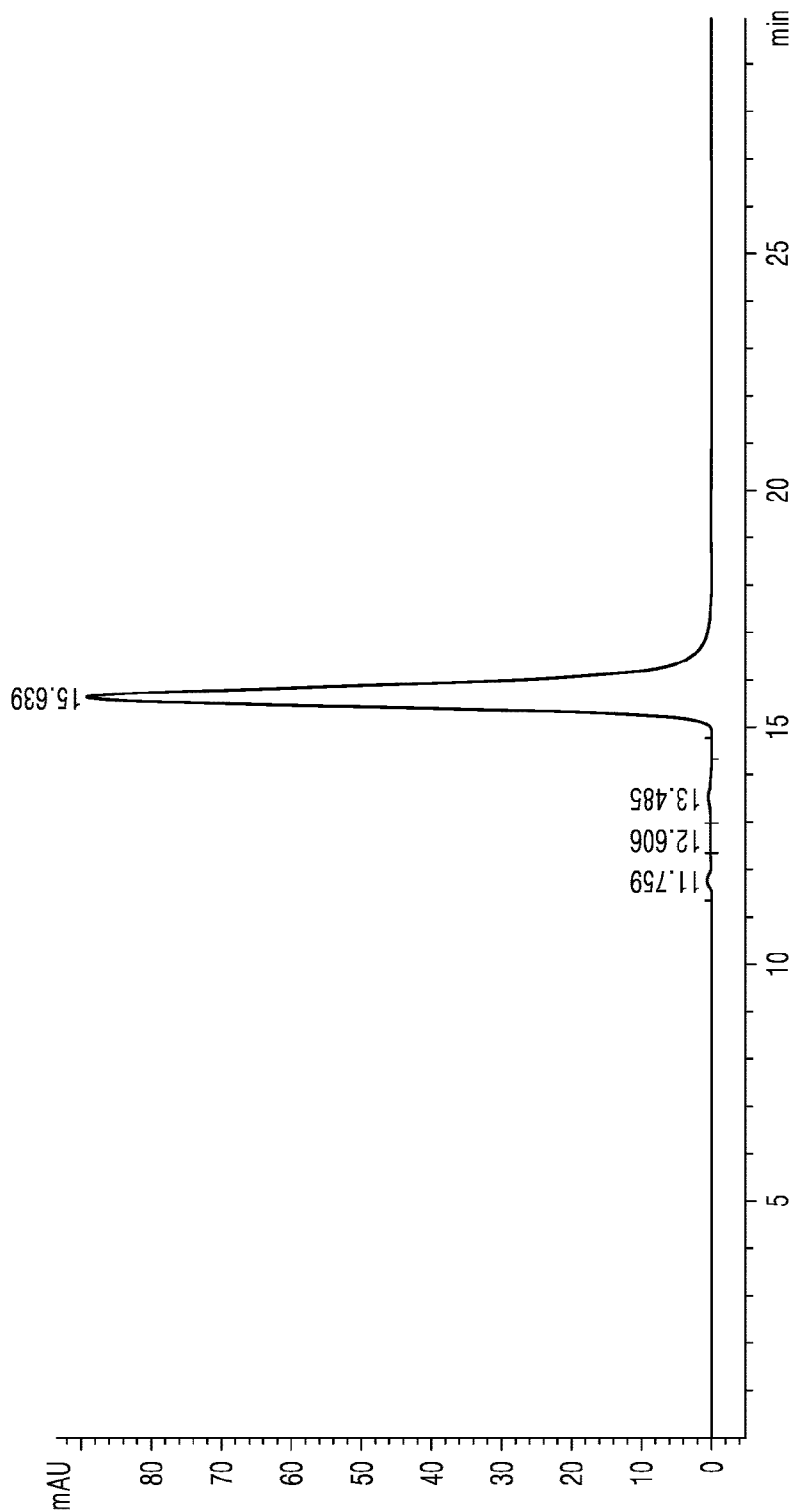
[도 5a]

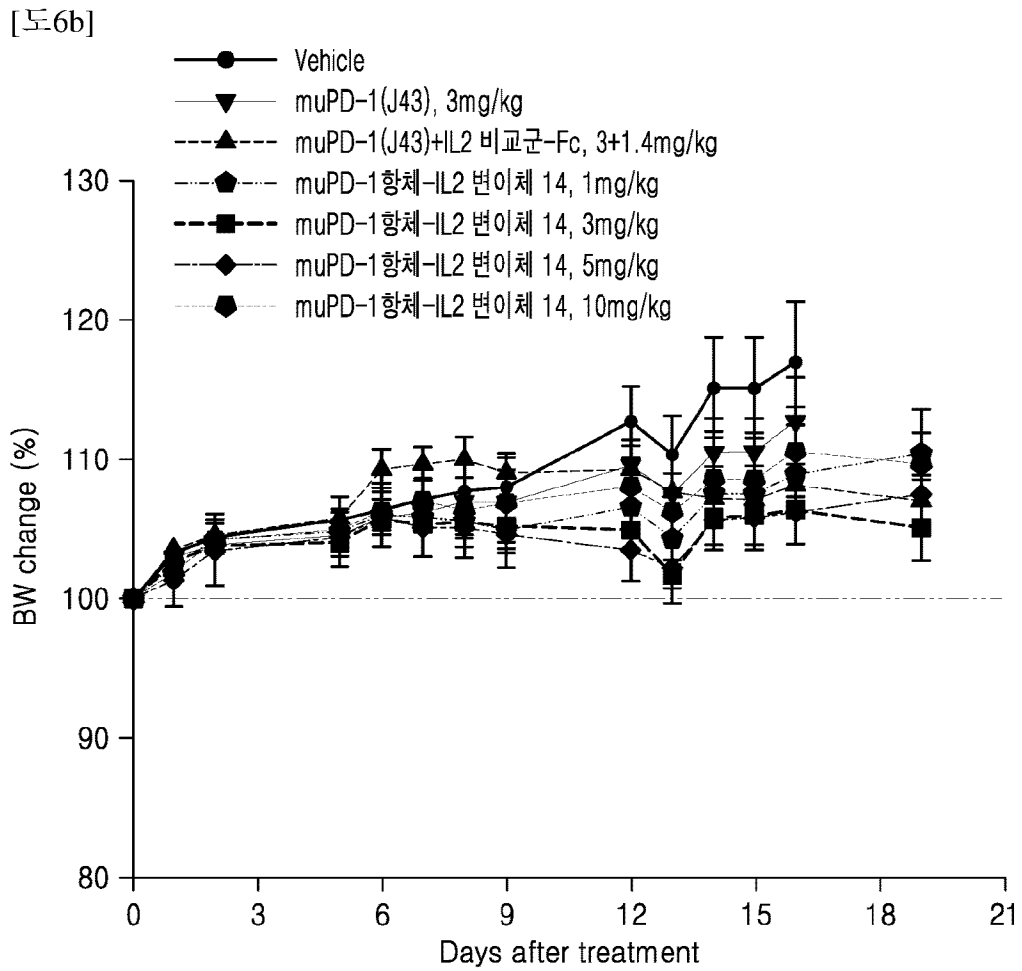
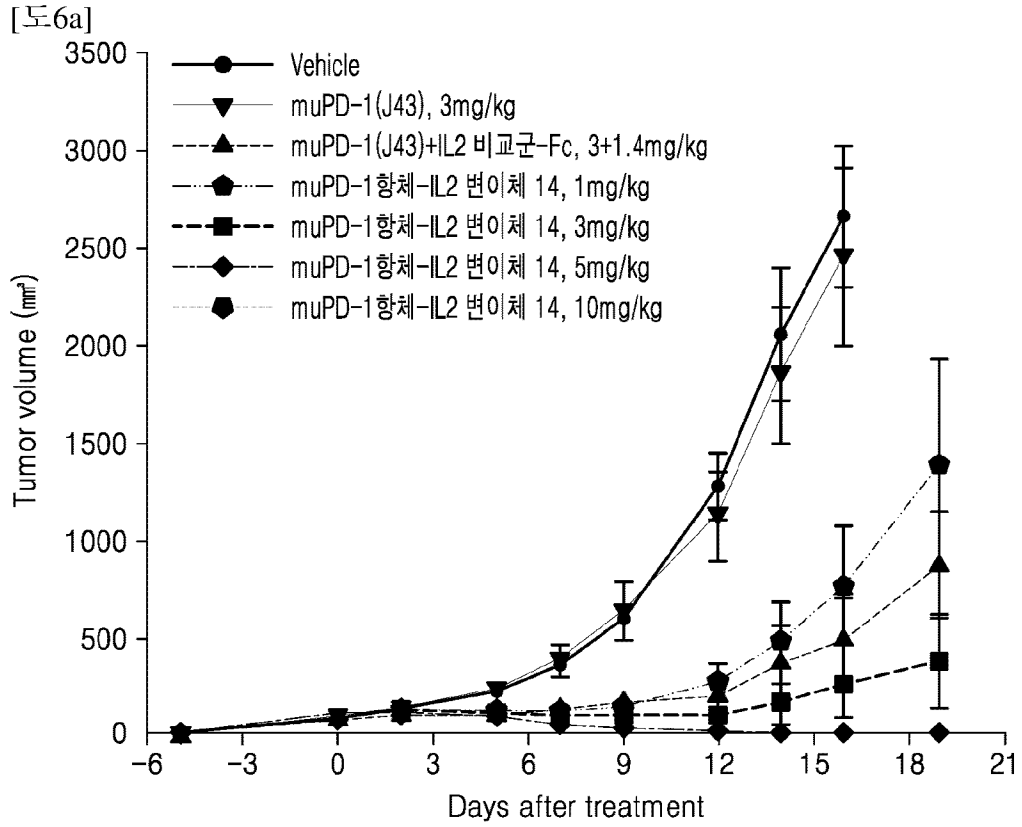


[도 5b]



[도5c]





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/012348

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 14/55(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/30(2006.01)i; A61K 38/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 14/55(2006.01); A61K 38/00(2006.01); A61K 38/20(2006.01); A61K 47/68(2017.01); C07K 14/52(2006.01); C07K 14/54(2006.01); C07K 16/24(2006.01); C12N 15/63(2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: IL2 변이체(IL variant), K35E, R38A, F42K, C125S, 치환(substitution), L18M, L18R, L19S, Q126T, Q126I, Fc 영역(Fc region), 링커(linker), 면역관문억제제(immune checkpoint inhibitor), 종양특이항원 (tumor associated antigen), 366W, 366S, 368A, 407V, 351G, 351F		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2018-0117116 A (WASHINGTON UNIVERSITY) 26 October 2018 (2018-10-26) See claim 1; paragraph [0050]; and SEQ ID NO: 6.	1-6
A		7-17
X	KR 10-2019-0121816 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 28 October 2019 (2019-10-28) See claims 1, 6, 8-9, 15, 17-18 and 24; and paragraphs [0100], [0144]-[0145], [0154], [0156], [0162]-[0163] and [0287]-[0289].	7-17
Y		1-6
Y	KR 10-2020-0100098 A (XENCOR INC.) 25 August 2020 (2020-08-25) See paragraphs [0193] and [0200].	2-4
X	KR 10-2021-0098148 A (GENEXINE, INC.) 10 August 2021 (2021-08-10) See claims 1, 7 and 9-12; and paragraphs [0035]-[0037], [0040] and [0043].	7,13-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 November 2023		Date of mailing of the international search report 21 November 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/012348

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2019-0057113 A (XOMA (US) LLC et al.) 27 May 2019 (2019-05-27) See entire document.	1-17
A	WO 2020-057646 A1 (INNOVENT BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.) 26 March 2020 (2020-03-26) See entire document.	1-17

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **21**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 21 pertains to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.: **19**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claim 19 refers to claims violating the manner of referring to dependent claims under PCT Rule 6.4(a), and thus is unclear.
3. Claims Nos.: **18,20-22**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/012348

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2018-0117116 A	26 October 2018	AU 2017-213659 A1	26 July 2018
		CA 3011374 A1	10 August 2017
		CN 109071679 A	21 December 2018
		CN 109071679 B	28 July 2023
		EP 3411414 A2	12 December 2018
		JP 2019-511905 A	09 May 2019
		JP 2023-024988 A	21 February 2023
		JP 7220458 B2	10 February 2023
		US 11053293 B2	06 July 2021
		US 2019-0119345 A1	25 April 2019
		US 2021-0284706 A1	16 September 2021
		WO 2017-136818 A2	10 August 2017
		WO 2017-136818 A3	07 June 2018
		KR 10-2019-0121816 A	28 October 2019
BR 112019017329 A2	14 April 2020		
CA 3053357 A1	11 October 2018		
CN 110392692 A	29 October 2019		
CN 110392692 B	21 July 2023		
EP 3606946 A1	12 February 2020		
EP 3606946 B1	24 August 2022		
EP 4201953 A1	28 June 2023		
JP 2020-515275 A	28 May 2020		
JP 2022-062001 A	19 April 2022		
KR 10-2021-0124518 A	14 October 2021		
KR 10-2461885 B1	03 November 2022		
US 11413331 B2	16 August 2022		
US 2018-0326010 A1	15 November 2018		
US 2023-0134606 A1	04 May 2023		
WO 2018-184964 A1	11 October 2018		
ZA 201905517 B	26 May 2021		
KR 10-2020-0100098 A	25 August 2020	AU 2018-390418 A1	09 July 2020
		CA 3086199 A1	27 June 2019
		CN 111655718 A	11 September 2020
		EP 3728302 A1	28 October 2020
		IL 275426 A	31 August 2020
		JP 2021-506291 A	22 February 2021
		US 11319355 B2	03 May 2022
		US 2019-0241638 A1	08 August 2019
		US 2022-0213162 A1	07 July 2022
		WO 2019-125732 A1	27 June 2019
KR 10-2021-0098148 A	10 August 2021	AU 2021-212558 A1	21 July 2022
		KR 10-2559355 B1	25 July 2023
		WO 2021-153979 A1	05 August 2021
KR 10-2019-0057113 A	27 May 2019	AU 2017-335771 A1	28 February 2019
		BR 112019005944 A2	11 June 2019
		CA 3038679 A1	05 April 2018
		CN 110087681 A	02 August 2019
		EP 3518969 A2	07 August 2019
		IL 265323 A	30 May 2019
		JP 2019-534710 A	05 December 2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/KR2023/012348

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		JP 2022-141693 A	29 September 2022
		US 10858428 B2	08 December 2020
		US 2018-0094053 A1	05 April 2018
		US 2021-0188969 A1	24 June 2021
		WO 2018-064255 A2	05 April 2018
		WO 2018-064255 A3	07 June 2018
		ZA 201901892 B	18 December 2019
-----	-----	-----	-----
WO 2020-057646 A1	26 March 2020	AU 2019-343251 A1	21 January 2021
		AU 2019-343251 B2	09 June 2022
		CA 3098930 A1	26 March 2020
		CN 112105633 A	18 December 2020
		EP 3854806 A1	28 July 2021
		JP 2022-500002 A	04 January 2022
		US 2021-0221863 A1	22 July 2021
-----	-----	-----	-----

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 14/55(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/30(2006.01)i; A61K 38/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야		
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 14/55(2006.01); A61K 38/00(2006.01); A61K 38/20(2006.01); A61K 47/68(2017.01); C07K 14/52(2006.01); C07K 14/54(2006.01); C07K 16/24(2006.01); C12N 15/63(2006.01)		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: IL2 변이체(IL variant), K35E, R38A, F42K, C125S, 치환(substitution), L18M, L18R, L19S, Q126T, Q126L, Fc 영역(Fc region), 링커(linker), 면역관문억제제(immune checkpoint inhibitor), 종양특이항원(tumor associated antigen), 366W, 366S, 368A, 407V, 351G, 351F		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2018-0117116 A (위징턴 유니버시티) 2018.10.26 청구항 1; 단락 [0050]; 서열번호 6	1-6
A		7-17
X	KR 10-2019-0121816 A (에프. 호프만-라 로슈 아게) 2019.10.28 청구항 1, 6, 8-9, 15, 17-18, 24; 단락 [0100], [0144]-[0145], [0154], [0156], [0162]-[0163], [0287]-[0289]	7-17
Y		1-6
Y	KR 10-2020-0100098 A (젠코어 인코포레이티드) 2020.08.25 단락 [0193], [0200]	2-4
X	KR 10-2021-0098148 A (주식회사 제넥신) 2021.08.10 청구항 1, 7, 9-12; 단락 [0035]-[0037], [0040], [0043]	7,13-17
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일	
2023년11월20일 (20.11.2023)	2023년11월21일 (21.11.2023)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)	허주형	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-5373	

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2019-0057113 A (조마 (유에스) 엔엘씨 등) 2019.05.27 전체 문헌	1-17
A	WO 2020-057646 A1 (INNOVENT BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.) 2020.03.26 전체 문헌	1-17

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))
 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. 청구항: **21**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 21은 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. 청구항: **19**
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 19는 종속항 기재방법(PCT 규칙 6.4(a))을 위반한 청구항을 인용하고 있어 불명료 합니다.

3. 청구항: **18,20-22**
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2018-0117116 A	2018/10/26	AU 2017-213659 A1	2018/07/26
		CA 3011374 A1	2017/08/10
		CN 109071679 A	2018/12/21
		CN 109071679 B	2023/07/28
		EP 3411414 A2	2018/12/12
		JP 2019-511905 A	2019/05/09
		JP 2023-024988 A	2023/02/21
		JP 7220458 B2	2023/02/10
		US 11053293 B2	2021/07/06
		US 2019-0119345 A1	2019/04/25
		US 2021-0284706 A1	2021/09/16
		WO 2017-136818 A2	2017/08/10
		WO 2017-136818 A3	2018/06/07
		KR 10-2019-0121816 A	2019/10/28
BR 112019017329 A2	2020/04/14		
CA 3053357 A1	2018/10/11		
CN 110392692 A	2019/10/29		
CN 110392692 B	2023/07/21		
EP 3606946 A1	2020/02/12		
EP 3606946 B1	2022/08/24		
EP 4201953 A1	2023/06/28		
JP 2020-515275 A	2020/05/28		
JP 2022-062001 A	2022/04/19		
KR 10-2021-0124518 A	2021/10/14		
KR 10-2461885 B1	2022/11/03		
US 11413331 B2	2022/08/16		
US 2018-0326010 A1	2018/11/15		
US 2023-0134606 A1	2023/05/04		
WO 2018-184964 A1	2018/10/11		
ZA 201905517 B	2021/05/26		
KR 10-2020-0100098 A	2020/08/25	AU 2018-390418 A1	2020/07/09
		CA 3086199 A1	2019/06/27
		CN 111655718 A	2020/09/11
		EP 3728302 A1	2020/10/28
		IL 275426 A	2020/08/31
		JP 2021-506291 A	2021/02/22
		US 11319355 B2	2022/05/03
		US 2019-0241638 A1	2019/08/08
		US 2022-0213162 A1	2022/07/07
		WO 2019-125732 A1	2019/06/27
KR 10-2021-0098148 A	2021/08/10	AU 2021-212558 A1	2022/07/21
		KR 10-2559355 B1	2023/07/25
		WO 2021-153979 A1	2021/08/05
KR 10-2019-0057113 A	2019/05/27	AU 2017-335771 A1	2019/02/28
		BR 112019005944 A2	2019/06/11
		CA 3038679 A1	2018/04/05
		CN 110087681 A	2019/08/02
		EP 3518969 A2	2019/08/07
		IL 265323 A	2019/05/30

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		JP 2019-534710 A	2019/12/05
		JP 2022-141693 A	2022/09/29
		US 10858428 B2	2020/12/08
		US 2018-0094053 A1	2018/04/05
		US 2021-0188969 A1	2021/06/24
		WO 2018-064255 A2	2018/04/05
		WO 2018-064255 A3	2018/06/07
		ZA 201901892 B	2019/12/18
-----		-----	
WO 2020-057646 A1	2020/03/26	AU 2019-343251 A1	2021/01/21
		AU 2019-343251 B2	2022/06/09
		CA 3098930 A1	2020/03/26
		CN 112105633 A	2020/12/18
		EP 3854806 A1	2021/07/28
		JP 2022-500002 A	2022/01/04
		US 2021-0221863 A1	2021/07/22
