

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

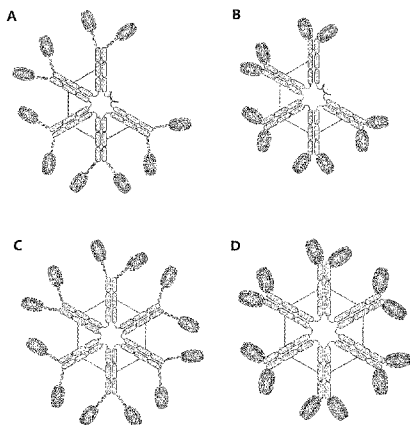
(43) 국제공개일
2022년 4월 21일 (21.04.2022) WIPO | PCT

WO 2022/080912 A1

- (51) 국제특허분류: C07K 16/42 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/74 (2006.01)
 - (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/014289
 - (22) 국제출원일: 2021년 10월 14일 (14.10.2021)
 - (25) 출원언어: 한국어
 - (26) 공개언어: 한국어
 - (30) 우선권정보: 10-2020-0133957 2020년 10월 16일 (16.10.2020)KR
 - (71) 출원인: 주식회사 아이엠바이오로지스 (IM-BIOLOGICS) [KR/KR]; 16229 경기도 수원시 영통구 창릉대로 260, 11층, Gyeonggi-do (KR).
 - (72) 발명자: 하경식 (HA, Gyongsik); 07287 서울시 영등포구 도림로143길 27, 202동 401호, Seoul (KR). 이정민 (LEE, Chungmin); 13629 경기도 성남시 분당구 미금로 184, 101동 2202호, Gyeonggi-do (KR). 이홍재 (LEE, Hong Jai); 15231 경기도 안산시 단원구 석수로 6, 1006동 207호, Gyeonggi-do (KR). 강성목 (KANG, Sungmuk); 07279 서울시 영등포구 영등포로12길 8, 3동 1003호, Seoul (KR).
 - (74) 대리인: 특허법인아이피센트 (IPSCENT); 06135 서울시 강남구 봉은사로 224, 401호., Seoul (KR).
 - (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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))

(54) Title: FUSION PROTEIN PLATFORM USING IGM REGION

(54) 발명의 명칭: IgM 영역을 이용한 융합단백질 플랫폼



(57) Abstract: The present invention relates to a fusion protein platform using an IgM region. Also, the present invention relates to a fusion protein comprising biologically active molecules and an IgM region. The fusion protein platform according to the present invention enables 10 to 12 target binding domains to be formed by means of an IgM Fc region. Also, the problem of steric hindrance occurring in the existing IgM antibody can be solved by means of a linker region. Therefore, the platform can include 10 to 12 biologically active molecules in one fusion protein, thereby maximizing the avidity of the biologically active molecules and the therapeutic effects and disease diagnosis due to same. Also, since various biologically active molecules can be selected in accordance with the purpose, and various types of biologically active molecules can also be combined and used, the fusion protein prepared by means of the platform exhibits notably enhanced effects of target recognition and control.

(57) 요약서: 본 발명은 IgM 영역을 이용한 융합단백질 플랫폼에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 생물학적 활성분자 및 IgM 영역을 포함하는 융합단백질에 관한 것이다. 본 발명에 따른 융합단백질 플랫폼은 IgM Fc 영역을 통해 10 내지 12 개의 타겟 결합 부위를 형성할 수 있다. 또한, 링커 영역을 통해 기존 IgM 항체에서 발생하는 입체 장애 문제를 해결할 수 있다. 따라서, 상기 플랫폼은 하나의 융합단백질에 생물학적 활성분자를 10개 내지 12개로 포함시킬 수 있으며, 이를 통해 생물학적 활성분자의 결합활성(avidity)과 이에 따른 치료 효과 및 질병 진단을 극대화할 수 있다. 또한, 목적에 따라 다양한 생물학적 활성분자를 선택하고, 여러 종류의 생물학적 활성분자를 조합하여 사용하는 것도 가능하므로, 상기 플랫폼을 통해 제조된 융합단백질은 타겟을 인식하고 조절하는 효과가 현저히 향상될 수 있다.

WO 2022/080912 A1

명세서

발명의 명칭: IgM 영역을 이용한 융합단백질 플랫폼

기술분야

- [1] 본 발명은 IgM 영역을 이용한 융합단백질 플랫폼에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 생물학적 활성분자 및 IgM 영역을 포함하는 융합단백질에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 생물학적 활성분자는 치료학적으로 매우 중요하다. 그러나 용해성 단백질(soluble protein), 막-결합 단백질(membrane-bound protein), 리간드, 수용체를 포함한 생물학적 활성분자는 생체 내 안정성이 낮고, 원하는 활성을 얻기 위해 높은 체내 농도를 유지해야 한다는 약점을 지녀 치료 효과를 높이기 위하여 생물학적 활성분자의 활성을 높이는 것이 요구된다.
- [3] 생물학적 활성분자 중 용해성 단백질, 막-결합 단백질, 리간드, 수용체는 생체 내에서 신호를 전달하는 자연적인 단백질 전체 혹은 일부를 재조합하여 생산한 것이다. 그러나 이러한 단백질들은 대부분 낮은 결합력을 가져 충분한 치료 효과를 위하여 높은 생체 내 농도가 확보되어야 한다. 특히 재조합 리간드와 수용체의 경우 세포막 표면에 존재하는 자연적인 형태에 비해 높은 농도에서도 충분한 치료 효과를 발휘하지 못 하는 경우가 다수 존재한다. 이는 자연적인 형태의 리간드와 수용체의 경우 각자가 세포 표면에 다수 존재하여 세포 간 접근에 의해 다수의 결합부가 생성되어 높은 결합력을 가지게 되나, 재조합하여 생산한 리간드와 수용체는 각자 한 개의 결합부만을 만들 수 있어 각 결합부의 결합력이 자연 상태와 차이가 없다고 하더라도 자연적으로 이루어지는 결합에 비해 낮은 결합력을 가지게 되기 때문이다(Mammen et al., *Angew. Chem., Int. Ed.*, *Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors*, 1998, 37, 2755.)
- [4] 생물학적 활성분자의 치료 효과를 높이기 위한 하나의 방법으로, 자연적인 리간드와 수용체 대신 타겟 물질에 특이적으로 결합하는 인간 면역글로불린 혹은 그 절편을 이용할 수 있다. 인간 면역글로불린(Immunoglobulin; Ig)은 혈액을 구성하는 주요 단백질로서 IgG, IgM, IgA, IgD, IgE와 같이 다양한 아이소타입(isotype)으로 구분된다. Ig 단량체는 두 개의 중쇄(heavy chain)와 두 개의 경쇄(light chain)로 분류되는 네 개의 폴리펩타이드 사슬이 이황화 결합으로 연결되어 이루어져 있으며, 각 사슬은 가변 영역(variable region) 및 불변 영역(constant region)으로 구성되어 있다. 중쇄 불변 영역은 아이소타입에 따라 셋 또는 네 부위로 더 나뉘어질 수 있다.
- [5] Ig의 가변 영역은 타겟 물질 표면의 특정한 구조(epitope)에 특이적이고 높은 결합력으로 결합하므로, 생물학적 활성분자로 리간드와 수용체 대신 타겟에 특이적인 Ig를 사용할 수 있다. 일반적으로 Ig는 리간드나 수용체간의

결합력보다 훨씬 큰 결합력을 가지고 있어, 타겟 리간드-수용체 결합을 효과적으로 저해할 수 있는데, 이와 같은 작용을 길항제(antagonist)라 한다. 한편, 일부의 Ig는 타겟 리간드-수용체 결합을 저해하는 대신, 타겟 리간드 혹은 수용체를 활성화시킬 수 있는데, 이와 같은 작용을 작용제(agonist)라 한다.

- [6] 재조합 리간드와 수용체를 대신하여 재조합 Ig를 생물학적 활성분자로 사용하여 치료 효과를 높일 수 있으나, 무작위적인 다수의 Ig로부터 타겟 분자에 특이적으로 결합하는 Ig를 선별하는 패닝 작업이 필요하며, 친화도를 높이기 위해서는 추가적인 기간이 많이 소요된다.
- [7] 생물학적 활성분자의 치료 효과를 높이기 위한 다른 하나의 방법으로, 한 분자에 여러 개의 생물학적 활성분자를 결합시켜 높은 결합활성(avidity)을 지니는 물질을 이용할 수 있다. 예를 들어, Ig의 아이소타입 중 하나인 IgG의 경우 한 분자당 두 개의 결합 부위를 가져 단량체에 비해 높은 결합활성을 가지므로, IgG의 중쇄불변영역인 Fc 영역(Fragment crystallizable region)을 단백질에 융합시켜 단백질의 안정성과 결합 활성을 높인 물질을 만들 수 있다. 또한 바이오틴 네 분자가 스트렙타비딘 한 분자에 높은 결합력으로 결합하는 것을 이용하여, 바이오틴으로 생물학적 활성분자를 표지하여 네 개의 결합 부위를 가진 높은 결합활성을 지니는 물질을 만들 수 있다. 그러나 Fc 융합 단백질의 결합활성 증대 효과는 크지 않으며, 바이오틴-스트렙타비딘 결합을 위해 바이오틴을 생물학적 활성 분자에 화학적으로 표지하고, 그 중 네 개의 결합 부위를 가지는 물질을 제조하여 약물로 사용하기 위해 정제하는 과정 또한 어려운 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명자들은 생물학적 활성분자의 치료 효과를 높이기 위한 방법을 연구한 결과, IgM의 불변 영역(constant region), 즉 IgM의 Fc 영역(Fragment crystallizable region)에 생물학적 활성분자를 결합하는 경우, 생물학적 활성분자의 결합활성(avidity)이 향상되어 이에 따른 치료 효과 또한 증대됨을 실험적으로 입증함에 따라 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

기술적 해결방법

- [9] 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [10] 또한, 본 명세서에서 특별히 정의되지 않은 용어들에 대해서는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것으로 이해되어야 할 것이다. 또한, 문맥상 특별히 정의하지 않은 경우라면, 단수는 복수를 포함하며, 복수는 단수를 포함한다.

- [11]
- [12] 본 발명의 하나의 양태는 하기 구조식으로 표시되는, 융합단백질을 제공한다:
- [13] $[(X)_a-(Y)_b-(\text{IgM Fc 영역})]_m-(Z)_n$
- [14] 이때, 상기 구조식에 있어서,
- [15] 상기 X는 생물학적 활성분자이고,
- [16] 상기 Y는 링커이고,
- [17] 상기 IgM Fc 영역은 단량체이고,
- [18] 상기 Z는 J 사슬이고,
- [19] 상기 a는 1 또는 2이고, 상기 b는 0, 1 또는 2이고, 상기 m은 5 또는 6이고, 상기 n은 0 또는 1임.
- [20] 본 발명에 따른 일 구현예에서, 상기 a가 1인 경우, 상기 b는 0 또는 1일 수 있다. 예를 들어, 상기 a가 1이고, 상기 b가 0인 경우, 융합단백질은 $[(X)-(Y)_0-(\text{IgM Fc 영역})]_m-(Z)_n$, $[(X)-(\text{IgM Fc 영역})]_m-(Z)_n$ 또는 $[(X)_1-(Y)_0-(\text{IgM Fc 영역})]_m-(Z)_n$ 로 상호교환적으로 표시될 수 있다.
- [21] 다른 일 구현예에서, 상기 a가 2인 경우, 상기 b는 0 또는 2일 수 있다.
- [22] 또한, 다른 일 구현예에서, 상기 m이 5인 경우, 상기 n은 1일 수 있다. 다른 일 구현예에서, 상기 m이 6인 경우, 상기 n은 0일 수 있다. 예를 들어, 상기 m이 5이고, 상기 n이 1인 경우, 융합단백질은 첫 번째 IgM Fc 영역 단량체와 다섯 번째 IgM Fc 영역 단량체에 J 사슬이 이황화결합(disulfide bond)에 의해 결합되는 형태일 수 있으며, 이의 대표적인 구조는 도 1의 A 및 B에 도시하였다.
- [23] 본 발명에서 제공하는 융합단백질은 IgM Fc 영역을 통해 10개 내지 12개의 결합 도메인을 구비하여 생물학적 활성분자의 결합활성(avidity)을 극대화하였고, 링커를 통해 기존 IgM 항체가 갖는 입체 장애 문제를 해결하였다.
- [24] 본 명세서에서 사용되는 용어, "융합단백질"은 서로 다른 2개 이상의 단백질의 일부 또는 전부가 결합된 단백질을 의미한다. 상기 융합단백질은 이를 구성하는 단백질의 아미노산 서열을 포함하며, 이외에 단백질을 세포 밖으로 분비시킬 수 있도록 하는 아미노산 서열, 예를 들어 시그널 펩타이드와 같은 아미노산 서열을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [25] 또한, 상기 융합단백질은 이를 구성하는 일부 아미노산 서열이 변이된 형태일 수 있다. 단백질 및 폴리펩타이드에서, 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 아미노산 치환은 당해 분야에 공지되어 있다. 가장 통상적으로 일어나는 치환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 치환이며, 이러한 치환에 의하여 본 발명에서 제공하는 융합단백질의 아미노산 서열로부터 변이된 서열의 융합단백질은 본 발명의 범주에 포함된다. 또한, 아미노산 서열상의 변이 또는 수식에 의해 융합단백질의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성이 증가하거나 항체 활성이 증가한 변이된 융합단백질 역시 본 발명의 범주에 포함된다.

- [26] 본 명세서에서 사용되는 용어, "IgM Fc 영역"은 면역글로불린 M (Immunoglobulin M; IgM)의 Fc 영역(fragment crystallizable region)으로서, IgM에서 Fab 영역(fragment, antigen binding region)을 제외한 나머지 부분을 의미한다. 상기 IgM Fc 영역은 용합단백질 내에서 생물학적 활성분자와 직접 또는 간접적으로 연결되며, 여기서 용합단백질은 상기 생물학적 활성분자를 1 또는 2 이상 포함할 수 있도록 생물학적 활성분자의 연결체, 지지체, 담체 등의 역할을 수행할 수 있다. 본 명세서에서, 상기 'IgM Fc 영역(IgM Fc region)'은 'IgM Fc 단편(IgM Fc fragment)'과 동일한 의미로 혼용되어 사용될 수 있다.
- [27] 구체적으로, 상기 IgM Fc 영역 단량체는 2개의 중쇄로 구성될 수 있다. 1개의 중쇄는 C μ 2 도메인, C μ 3 도메인 및 C μ 4 도메인으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, 1개의 중쇄는 C μ 2 도메인, C μ 3 도메인 및 C μ 4 도메인을 포함하거나 또는 C μ 2 도메인, C μ 3 도메인 및 C μ 4 도메인으로 구성될 수 있다. 또다른 예로서, 1개의 중쇄는 C μ 3 도메인 및 C μ 4 도메인을 포함하거나 또는 C μ 3 도메인 및 C μ 4 도메인으로 구성될 수 있다. 또다른 예로서, 상기 IgM Fc 영역은 서열번호 1의 핵산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 서열로 이루어질 수 있다.
- [28] 또한, 상기 IgM Fc 영역 단량체는 오합체(pentamer) 또는 육합체(hexamer)를 형성할 수 있으며, 이때 각 단량체는 이황화 결합(disulfide bond)을 통해 연결될 수 있다. 상기 오합체는 단량체 5개를 포함하는 구조를 나타내며, 상기 육합체는 단량체 6개를 포함하는 구조를 나타낸다. 상기 오합체의 예는 도 1의 A 및 B에 도시되어 있으며, 상기 육합체의 예는 도 1의 C 및 D에 도시되어 있다.
- [29] 본 명세서에서 사용되는 용어, "링커"는 단백질의 각 도메인 사이에 존재하는 아미노산을 의미한다. 상기 링커는 용합단백질 내에서 생물학적 활성분자와 IgM Fc 영역 사이에 존재할 수 있고, 이들을 연결하는 역할을 수행할 수 있다. 구체적인 예로, 상기 링커는 IgD 힌지 영역, IgA 힌지 영역, IgG 힌지 영역 및 GS 링커로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [30] 상기 "힌지(hinge) 영역"은 항체의 중쇄 중앙 부분에 위치하여 중쇄의 두 영역을 이황화 결합으로 연결하고 있는 부분을 의미한다. 힌지 영역은 중쇄의 CH1 도메인과 CH2 도메인 사이에 위치하며, 이들과 연결되어 있다. 짧은 힌지 부위를 가지는 면역글로불린이 Y 형태를 갖는 것과 달리, 구체적으로 IgD는 긴 힌지 부위를 가지고 있어 양쪽의 타겟 결합부위가 벌어져 T자 형태를 이룰 수 있을 정도의 큰 유연성을 가지는 것이 가능하다. 이러한 유연성이 IgD가 자가 항원에 거의 결합하지 않으면서도 다량체 외부 항원에 결합할 수 있는 결합활성을 가질 수 있게 한다.
- [31] 이때, 상기 힌지 영역은 힌지 영역의 일부 또는 전체, CH1 도메인의 일부 또는 전체, CH2 도메인의 일부 또는 전체, 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 힌지 영역은 IgD 힌지의 일부 또는 전체(이하, '일부 또는 전체'는 '일부/전체'로 표시함)를 포함하는 것일 수 있다. 또다른 예로서, 상기 힌지

영역은 IgD 힌지의 일부/전체 및 IgD CH1 도메인의 일부/전체를 포함하는 것일 수 있다. 또다른 예로서, 상기 힌지 영역은 IgD 힌지의 일부/전체 및 IgD CH2 도메인의 일부/전체를 포함하는 것일 수 있다. 또다른 예로서, 상기 힌지 영역은 IgD 힌지의 일부/전체, IgD CH1 도메인의 일부/전체 및 IgD CH2 도메인의 일부/전체를 포함하는 것일 수 있다. 또다른 예로서, 상기 힌지 영역은 IgA 힌지의 일부/전체를 포함하는 것일 수 있다. 또다른 예로서, 상기 힌지 영역은 IgA 힌지의 일부/전체 및 IgA CH1 도메인의 일부/전체를 포함하는 것일 수 있다. 또다른 예로서, 상기 힌지 영역은 IgA 힌지의 일부/전체 및 IgA CH2 도메인의 일부/전체를 포함하는 것일 수 있다. 또다른 예로서, 상기 힌지 영역은 IgA 힌지의 일부/전체, IgA CH1 도메인의 일부/전체 및 IgA CH2 도메인의 일부/전체를 포함하는 것일 수 있다. 또다른 예로서, 상기 힌지 영역은 IgG 힌지의 일부/전체를 포함하는 것일 수 있다. 또다른 예로서, 상기 힌지 영역은 IgG 힌지의 일부/전체 및 IgG CH1 도메인의 일부/전체를 포함하는 것일 수 있다. 또다른 예로서, 상기 힌지 영역은 IgG 힌지의 일부/전체 및 IgG CH2 도메인의 일부/전체를 포함하는 것일 수 있다. 또다른 예로서, 상기 힌지 영역은 IgG 힌지의 일부/전체, IgG CH1 도메인의 일부/전체 및 IgG CH2 도메인의 일부/전체를 포함하는 것일 수 있다. 본 명세서에서, '힌지 영역'은 '힌지 도메인'과 동일한 의미로 혼용되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 IgD 힌지 영역은 서열번호 5의 핵산 서열 또는 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 서열로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 IgA 힌지 영역은 서열번호 7의 핵산 서열 또는 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 서열로 이루어질 수 있다.

- [32] 상기 "GS 링커"는 (GS)_c, (SG)_c, (GGGS)_c, (GGGG)_c, GCGS(GGG)_c 및 GCGGS(GGGG)_c로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 이때 상기 c는 2 내지 6의 정수이다. 구체적으로, 글라이신(Gly; G) 및 세린(Ser; S)으로 구성된 아미노산을 4 내지 35개 미만으로 포함할 수 있으며, 이황화결합을 통해 안정성을 높이기 위하여 글라이신, 세린 및 시스테인(Cys; C)로 구성된 아미노산을 4 내지 35개 미만으로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 GS 링커는 서열번호 9의 핵산 서열 또는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 서열로 이루어질 수 있다.
- [33] 본 명세서에서 사용되는 용어, "생물학적 활성분자"는 생물체 내에서 특정 작용 또는 효과를 나타낼 수 있는 물질로서, 예를 들어 특정 신호전달 경로를 활성화 또는 비활성화시킴으로써, 특정 유전자의 발현을 촉진 또는 억제하거나, 특정 단백질의 기능을 강화 또는 억제하거나, 또는 세포의 사멸을 유도 또는 억제하는 등의 기능을 수행할 수 있는 물질을 의미한다. 바람직하게, 상기 생물학적 활성분자는 면역조절(Immune regulation) 및/또는 항암(anticancer) 활성을 나타낼 수 있다. 상기 생물학적 활성분자는 융합단백질 내에서 IgM Fc 영역과 직접 또는 간접적으로 연결되며, 융합단백질이 목적하는 효과를 나타낼

수 있는 작용기 또는 활성 모이어티 역할을 수행할 수 있다.

[34] 구체적으로, 항체, 항체의 항원-결합 단편(antigen-binding fragments of antibody), 항체-약물 접합체(antibody-drug conjugate), 항체-유사 분자(antibody-like molecule), 항체-유사 분자의 항원-결합 단편(antigen-binding fragments of antibody-like molecule), 용해성 단백질(soluble protein), 막-결합 단백질(membrane-bound protein), 리간드, 수용체, 바이러스-유사 입자, 단백질 독신, 케모카인, 사이토카인 및 효소로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이때, 상기 수용체는 사이토카인 수용체 및/또는 면역관문 수용체(immune checkpoint receptor)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 본 발명에 따른 융합단백질은 원하는 목적, 타겟 또는 효과에 따라 두 종류 이상의 생물학적 활성분자를 포함할 수 있다.

[35] 구체적인 예로, 상기 항체의 항원-결합 단편은 Fab, F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab₂, Fab₃, Fv, scFv, Bis-scFv, 미니바디(Minibody), 트리아바디(Triabody), 다이아바디(Diabody), 텐덤다이아바디(Tandem Diabody; TandAb), 나노바디(Nanobody), 테트라바디(Tetrabody)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 항체의 항원-결합 단편은 HLA-G에 결합하는 것일 수 있다. HLA-G는 1형 HLA의 한 종류로, 임산부의 태반에서 발현되어 태아의 면역 관용에 관여한다. HLA-G는 NK (natural killer) 세포의 저해 수용체인 ILT2, ILT4, KIR2DL4에 결합하여 NK 세포를 저해하고, 조절 T-세포(regulatory T cell, T_{reg})의 분화를 촉진시키는 역할을 한다. 또한 암세포가 표면에 HLA-G를 과발현할 경우, 세포독성에 관여하는 세포독성 T-세포, 보조 T-세포 및 NK 세포의 활성을 저해하여 암 치료를 위한 면역치료 효과가 반감된다. 따라서, HLA-G에 선택적으로 결합하여 HLA-G가 저해 수용체에 결합하는 것을 저해하는 항원-결합 단편은 항암 치료 물질로 활용될 수 있다. 예를 들어, 상기 항체의 항원-결합 단편은 Fab 또는 scFv일 수 있다. 또한, 상기 Fab 또는 scFv를 구성하는 경쇄 가변영역(VL)은 서열번호 15의 핵산 서열 또는 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 서열로 이루어지거나; 중쇄 가변영역(VH) 및 CH1 도메인은 서열번호 17의 핵산 서열 또는 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 서열로 이루어지거나; 및/또는 중쇄 가변영역(VH)은 서열번호 19의 핵산 서열 또는 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 서열로 이루어질 수 있다.

[36] 다른 구체적인 예로, 상기 막-결합 단백질은 HLA(Human Leukocyte Antigen)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 용어, 'HLA'는 인간의 주요 조직 적합성 복합체(major histocompatibility complex; MHC) 유전자 복합체에 의해 암호화되는 단백질을 의미하며, 주로 막에 결합된 형태로 존재하여 면역 체계의 조절을 담당하는 중요한 면역학적 분자이다. HLA는 외래 혹은 자가 단백질의 펩타이드 단편을 세포 내부로부터 세포 표면에 제시하고 이를 세포독성 T-세포의 T-세포 항원 수용체(T Cell Receptor; TCR)가 인지, 결합하도록 하여

세포독성 T-세포를 활성화시킨다. HLA는 크게 2가지의 유형으로 나누어지는데, 1형 HLA는 모든 세포 표면에 존재하는 반면, 2형 HLA는 NK 세포(NK cell), 마크로파지(macrophage), 수지상 세포(dendritic cell) 등의 특정 항원제시세포(Antigen Presenting Cell; APC)에만 존재한다. HLA 유전자는 고도의 다형성 특성을 가지며, 6가지의 상이한 HLA 단백질 α 쇄들(2개의 HLA-A, 2개의 HLA-B 및 2개의 HLA-C)을 발현시킨다. 상기 1형 HLA는 이에 특정 펩타이드 단편이 로딩(loading)되면 TCR을 발현하는 세포독성 T-세포를 선택적으로 활성화시킬 수 있으므로, 경막 도메인(membrane-bound domain) 부분이 제거된 재조합 1형 HLA는 암이나 감염성 질환 등의 치료에 활용되기도 한다. 또한, 대부분의 1형 HLA는 2형 HLA와 달리, 그루브(groove)에 펩타이드가 로딩되지 않은 빈 상태일 경우에는 불안정하기 때문에 재조합 1형 HLA의 생산 시 대상 합성 펩타이드를 로딩하거나, α 쇄에 융합된 형태로 재조합 HLA 단백질을 제조하며, 미생물을 이용하여 발현시키는 경우에는 리폴딩(refolding)이 제대로 이루어지지 않을 우려가 있으므로, 동물세포를 이용하여 발현하는 것이 일반적이다. 당업계에서 HLA와 MHC는 동일한 의미로 혼용되어 사용되며, 인간에서는 MHC 대신 HLA를 사용한다. 본 명세서에서는, 상기 'HLA' 및 'MHC'는 동일한 의미로 혼용되어 사용될 수 있다.

[37] 상기 HLA는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F 및 HLA-G와 같은 1형 HLA; 또는 HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ 및 HLA-DR과 같은 2형 HLA일 수 있다. 상기 1형 HLA는 $\beta 2m$ 도메인, $\alpha 1$ 도메인, $\alpha 2$ 도메인 및 $\alpha 3$ 도메인으로 이루어져 있으며, 상기 2형 HLA는 $\alpha 1$ 도메인, $\alpha 2$ 도메인, $\beta 1$ 도메인 및 $\beta 2$ 도메인으로 이루어져 있다. 본 발명의 HLA는 $\beta 2m$ 도메인, $\alpha 1$ 도메인, $\alpha 2$ 도메인 또는 $\alpha 3$ 도메인을 포함하는 것일 수 있으며, $\alpha 1$ 도메인, $\alpha 2$ 도메인, $\beta 1$ 도메인 및 $\beta 2$ 도메인을 포함하는 것일 수 있다. 이때, 상기 $\alpha 2$ 도메인은 115번 위치가 Gln(글루타민; Q)에서 Glu(글루탐산; E)로 치환된 것일 수 있다. 상기 $\alpha 1$ 도메인은 84번 위치가 Tyr(티로신; Y)에서 Cys(시스테인; C)로 치환된 것일 수 있다. 상기 $\alpha 2$ 도메인의 115번 위치에 존재하는 Gln을 Glu로 치환하는 경우에는, HLA의 CD8+ T-세포에 존재하는 TCR과의 결합력이 치환하지 않는 경우에 비하여 약 1.5배 증가하게 된다. 상기 $\alpha 1$ 도메인의 84번 위치에 존재하는 Tyr을 Cys로 치환하는 경우에는, HLA가 이에 결합된 펩타이드와 이황화결합을 하도록 하므로, HLA의 안정성을 높일 수 있다.

[38] 또한, 상기 HLA는 표적 T-세포의 활성화부위에 특이적으로 결합하는 물질을 포함할 수 있다. 상기 물질은 TCR을 발현하는 표적 T-세포를 선택적으로 활성화시킬 수 있거나, 및/또는 HLA의 안정성을 높일 수도 있다. 상기 용어, '표적 T-세포'는 본 발명의 융합단백질이 결합하는 T-세포일 수 있으며, 세포독성 T-세포(Cytotoxic T cell; killer T cell; Tc) 또는 보조 T-세포(Helper T cell; Th)일 수 있다. 상기 세포독성 T-세포는 암세포, 바이러스 등에 감염된 세포, 또는 손상된 세포 등을 사멸시킬 수 있는 세포이며, 예를 들어 CD8+ T-세포이다. CD8+

T-세포의 단백질 수용체인 CD8은 세포 표면에 위치하여 1형 HLA와 결합한다. 상기 보조 T-세포는 세포를 직접 사멸시키지는 않지만 다른 면역 세포들을 활성화시키는 역할을 수행하며, 예를 들어 B-세포의 항체 생산, 세포독성 T-세포의 활성화 등을 촉진시키는 세포이며, CD4+ T-세포가 이에 해당한다. CD4+ T-세포의 단백질 수용체인 CD4는 세포 표면에 위치하여 2형 HLA와 결합한다.

[39] 상기 표적 T-세포의 활성화부위에 특이적으로 결합하는 물질의 구체적인 예로는 펩타이드일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 펩타이드는 바이러스 유래 또는 동물 세포 유래일 수 있다. 이때, 상기 바이러스는 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus; CMV)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. CMV는 인간 면역 시스템에 대한 가장 강한 면역원성 항원 중 하나이며, 인체 감염 시 매우 강한 CD8+ T-세포 반응을 자극한다. CD8+ T-세포 면역 반응은 CMV 단백질 pp65, IE-1에 의해 주로 활성화되며, 개별 펩타이드에 대한 CMV 특이적 T-세포의 빈도는 총 CD8+ T-세포 레퍼토리의 약 최대 1% 내지 2%의 빈도로 매우 높다고 알려져 있다. 예를 들어, 상기 CMV를 포함하는 HLA는 서열번호 11 및/또는 13의 핵산 서열 또는 서열번호 12 및/또는 14의 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 서열로 이루어질 수 있다.

[40] 또다른 구체적인 예로, 상기 리간드는 EPO (erythropoietin) 또는 EPO 유사체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 용어, 'EPO'는 적혈구 생성에 필수적인 호르몬 단백질로서, 골수에서 조혈모세포에 작용하여 적혈구의 분화와 성장을 촉진하여 빈혈을 치료하며, 뇌졸중과 같은 저산소 환경에서 신경을 보호하며 상처 회복과정에 관여한다. 또한 뇌의 해마반응과 시냅스 연결, 뉴런 네트워크에 관여하여 기억증진을 돕고 우울증 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 상기 'EPO 유사체'는 EPO와 동일 기능을 수행하고 구조가 다른 재조합 단백질로서, 인간 EPO가 가진 3개의 당쇄 이외에 2개의 당쇄를 추가적으로 가지며, 기존 인간 EPO에 비하여 3배 이상 향상된 혈중 반감기를 갖는다. 상기 EPO 유사체는 EPO 수용체에 결합하여 활성화시킬 수 있는 리간드, 항체 또는 항체 단편일 수 있으며, 구체적인 예로 NESP (Novel erythropoiesis stimulating protein)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 상기 EPO 유사체는 서열번호 21의 핵산 서열 또는 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 서열로 이루어질 수 있다.

[41] 본 명세서에서 사용되는 용어, "J 사슬(joining chain)"은 IgM 또는 IgA 항체의 구성 요소로서, IgM 또는 IgA 단량체를 결합하여 다합체를 형성시키는 폴리펩타이드를 의미한다. 상기 J 사슬은 융합단백질 내에서 IgM Fc 영역 단량체 사이에 존재할 수 있고, 이들을 연결하는 역할을 수행할 수 있다. 구체적으로, 상기 J 사슬은 IgM Fc 영역 단량체가 오합체를 형성하는 경우에 포함될 수 있으며, IgM Fc 영역 단량체가 육합체를 형성하는 경우에는 포함되지 않을 수 있다. 더욱 구체적으로, IgM Fc 영역 단량체가 오합체를 형성하는 경우, 상기 J 사슬은 첫 번째 IgM Fc 영역 단량체와 다섯 번째 IgM Fc 영역 단량체에

이황화결합(disulfide bond)을 통해 결합될 수 있으며, 이러한 구조는 도 1의 A 및 B에 도시하였다. 예를 들어, 상기 J 사슬은 서열번호 3의 핵산 서열 또는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 서열로 이루어질 수 있다.

- [42] 또한, 상기 J 사슬은 단백질 분자가 추가로 결합된 것일 수 있다. 이때, 상기 단백질 분자는 본 발명의 융합단백질이 목적하는 효과에 대해 시너지 효과를 나타내는 것일 수 있다. 구체적으로, 항체, 항체의 항원-결합 단편(antigen-binding fragments of antibody), 항체-약물 접합체(antibody-drug conjugate), 항체-유사 분자(antibody-like molecule), 항체-유사 분자의 항원-결합 단편(antigen-binding fragments of antibody-like molecule), 용해성 단백질(soluble protein), 막-결합 단백질(membrane-bound protein), 리간드, 수용체, 바이러스-유사 입자, 단백질 독신 및 효소로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 더욱 구체적으로, 상기 단백질 분자는 공동자극 수용체(co-stimulatory receptor), 사이토카인, 세포관여자(cell engager)로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상일 수 있다. 이때, 상기 세포관여자는 항체일 수 있으며, 구체적으로 암세포 또는 면역세포 특이적 표지 단백질에 결합하는 항체, 예를 들어 T 세포 관여항체(T-cell engager)일 수 있다. 또한, 상기 면역세포는 호중구(neutrophil), 호산구(eosinophil), 호염구(basophil), 비만세포(mast cell), 단핵구(monocyte), 대식세포(macrophage), 수지상세포(dendritic cell), NK 세포(natural killer cell), 및 B 세포(B cell), T 세포(T cell) 등의 림프구(lymphocyte)를 포함할 수 있다.

[43]

- [44] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 융합단백질을 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.

- [45] 본 발명에 따른 핵산 분자에서, 각 용어는 특별히 언급하지 않는 한 상기 융합단백질에서 설명한 바와 같다.

- [46] 본 명세서에서 사용되는 용어, "핵산 분자"는 DNA 및 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 상기 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오티드는 자연의 뉴클레오티드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다. 본 발명의 융합단백질을 코딩하는 핵산 분자의 서열은 변형될 수 있으며, 상기 변형은 뉴클레오티드의 추가, 결실, 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.

- [47] 또한, 핵산 서열 및 아미노산 서열을 포함한, 본 발명에서 이용되는 모든 서열은 생물학적으로 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기 용어, '실질적인 동일성'은 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인(aligned)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 더욱 구체적으로 70%의 상동성, 더더욱 구체적으로 80%의 상동성, 가장 구체적으로

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.

[48] 따라서, 본 발명의 서열번호 1 내지 22로 표시되는 서열과 높은 상동성을 갖는 서열, 예를 들면 그 상동성이 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 더욱 구체적으로 90% 이상의 높은 상동성을 갖는 서열도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[49]

[50] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 핵산 분자를 포함하는, 융합단백질 발현용 벡터를 제공한다.

[51] 본 발명에 따른 융합단백질 발현용 벡터에서, 각 용어는 특별히 언급하지 않는 한 상기 융합단백질 및 핵산 분자에서 설명한 바와 같다.

[52] 본 명세서에서 사용되는 용어, "벡터"는 본 발명의 융합단백질을 발현시키기 위한 수단으로서, 상기 융합단백질을 코딩하는 핵산 분자를 숙주 세포에 삽입 또는 도입할 수 있는, 당업계에 공지된 플라스미드(plasmid), 바이러스 또는 기타 매개체를 의미한다. 상기 벡터는 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 구체적인 예로, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터 등의 바이러스 벡터일 수 있고, 더욱 구체적인 예로, 플라스미드(예컨대, pcDNA3 또는 pcDNA3.1 등의 pcDNA 시리즈, pCL, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지(예컨대, λ gt4- λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예컨대, SV40 등)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[53] 본 발명의 벡터는, 상기 융합단백질을 코딩하는 핵산 분자가 프로모터와 작동 가능하게 연결된 것일 수 있다. 상기 용어, "작동 가능하게 연결된"은 핵산 발현조절서열(예컨대, 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.

[54] 본 발명의 벡터가 발현벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터(예컨대, 메탈로티오닌 프로모터, β 액틴 프로모터, 인간 헤로글로빈 프로모터 및 인간 근육 크레아틴 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예컨대, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터, 엡스타인바 바이러스(EBV)의 프로모터 및 로우스 사코마 바이러스(RSV)의 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 재조합 벡터는 CMV 프로모터를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [55] 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pLλ 프로모터, pRλ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 리보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포로서 대장균(예컨대, HB101, BL21, DH5α 등)이 이용되는 경우, 대장균 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위, 또는 파지 λ의 좌향 프로모터(pLλ 프로모터)가 조절부위로서 이용될 수 있고; 숙주 세포로서 바실러스 균이 이용되는 경우, 바실러스 튜린젠시스(*Bacillus thuringiensis*)의 독소단백질 유전자의 프로모터 또는 바실러스균에서 발현 가능한 어떠한 프로모터라도 조절부위로 이용될 수 있다.
- [56] 본 발명의 재조합 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 선택 표지로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자(예컨대, 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자)를 포함할 수 있다.
- [57]
- [58] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 융합단백질 발현용 벡터가 도입된 숙주 세포를 제공한다.
- [59] 본 발명에 따른 숙주세포에서, 각 용어는 특별히 언급하지 않는 한 상기 융합단백질, 핵산 분자 및 융합단백질 발현용 벡터에서 설명한 바와 같다.
- [60] 본 명세서에서 사용되는 용어, "숙주 세포"는 상기 융합단백질 발현용 벡터를 포함하며, 본 발명의 융합단백질을 안정적이고 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 세포를 의미한다. 예를 들어, 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 및 바실러스 튜린젠시스(*Bacillus thuringiensis*) 등의 바실러스 속 균주, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)와 같은 원핵 숙주 세포; 아스페르길러스 속(*Aspergillus species*) 등의 진균, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*) 또는 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)와 같은 진핵 숙주 세포; 하등 진핵 세포; 곤충 유래 세포와 같은 고등 진핵 세포; 식물 세포; 또는 COS7 세포(monkey kidney cell), NSO 세포, SP2/0, 차이나이즈 햄스터 난소(Chinese hamster ovary; CHO) 세포, W138, 어린 햄스터 신장(baby hamster kidney; BHK) 세포, MDCK, 골수종 세포주, HuT 78 세포 또는 293 세포와 같은 포유 동물로부터 유래한 세포일 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 당업계에서 통상적으로 사용되는 숙주 세포가 제한 없이 사용될 수 있다.

[61]

- [62] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 융합단백질 발현용 벡터를 숙주 세포에 도입하는 단계를 포함하는, 상기 융합단백질을 제조하는 방법을 제공한다.
- [63] 본 발명에 따른 융합단백질을 제조하는 방법에서, 각 용어는 특별히 언급하지 않는 한 상기 융합단백질, 핵산 분자, 융합단백질 발현용 벡터 및 숙주세포에서 설명한 바와 같다.
- [64] 구체적으로, 본 발명의 융합단백질을 제조하는 방법은,
- [65] (a) 본 발명의 벡터를 숙주 세포에 도입하는 단계;
- [66] (b) 상기 숙주 세포를 배양하는 단계; 및
- [67] (c) 상기 숙주 세포에서 융합단백질을 수득하는 단계를 포함할 수 있다.
- [68] 본 발명의 벡터를 숙주 세포에 도입하는 상기 (a) 단계는, 상기 융합단백질 발현용 벡터를 포함하는 형질전환체를 제조하는 단계일 수 있으며, 상기 형질전환체를 제조하는 단계는 숙주 세포를 형질전환 시키는 것일 수 있다.
- [69] 상기 용어, "형질전환체"는 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것으로 외부의 DNA를 세포 내로 도입하여 인위적으로 유전적인 변화가 일어난 생물을 의미한다.
- [70] 전술한 숙주 세포를 형질전환시키는 것은 임의의 형질전환 방법을 사용하여 수행될 수 있으며, 당업계의 통상적인 방법에 따라 용이하게 수행할 수 있다. 예를 들어, CaCl_2 침전법, CaCl_2 방법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 사용함으로써 효율을 높인 하나한(Hanahan) 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 당업계에서 통상적으로 사용되는 형질전환 또는 형질감염 방법이 제한 없이 사용될 수 있다.
- [71] 본 발명의 숙주 세포를 배양하는 상기 (b) 단계는, 당업계에 알려진 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양과정은 당업자라면 선택되는 균주에 따라 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 세포의 성장방식에 따라 현탁배양 또는 부착배양; 배양방법에 따라 회분식, 유가식 또는 연속배양식의 방법을 사용할 수 있다.
- [72] 동물 세포 배양에 있어, 상기 배지는 다양한 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함할 수 있다. 탄소원의 예로는, 포도당, 자당, 유당, 과당, 말토오스, 전분 또는 셀룰로오스와 같은 탄수화물; 대두유, 해바라기유, 피마자유 또는 코코넛유와 같은 지방; 팔미트산, 스테아린산 또는 리놀레산과 같은 지방산; 글라이세롤 또는 에탄올과 같은 알코올; 또는 아세트산과 같은 유기산을 포함할 수 있으며, 이들 탄소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 질소원의 예로는, 예컨대 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액 또는 대두밀과 같은 유기 질소원; 또는 요소, 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 또는

질산암모늄과 같은 무기 질소원을 포함할 수 있으며, 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 미량성분의 예로는, 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 등의 인원; 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 포함할 수 있다. 외에, 아미노산, 비타민, 또는 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다.

[73] 또한, 배양물의 pH를 조정하기 위하여 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 또는 황산과 같은 화합물을 배양물에 적절한 방식으로 첨가할 수 있고, 기포 생성을 억제하기 위하여 배양 중에 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 할 수 있으며, 배양물의 호기상태를 유지하기 위하여 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예컨대, 공기)를 주입할 수 있다.

[74] 또한, 배양물의 온도를 20°C 내지 45°C, 구체적으로 25°C 내지 40°C로 유지하여 배양할 수 있다.

[75] 본 발명의 숙주 세포에서 융합단백질을 발현시키는 상기 (c) 단계는, 상기 (b) 단계를 통해 수득한 배양액에서 본 발명의 융합단백질을 회수, 정제 및 농축하는 단계일 수 있다.

[76] 상기 융합단백질은 정제하지 않은 상태로 사용될 수 있고, 또는 추가로 회수, 정제 및 농축하여 사용될 수 있다. 구체적으로, 당업계에서 통상적으로 이용되는 방법(예컨대, 투석, 염 침전, 크로마토그래피 등)을 사용할 수 있으며, 이를 통해 회수, 정제 및 농축을 동시에 수행할 수 있다. 더욱 구체적으로, 크로마토그래피(예컨대, 이온교환 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피, 또는 친화성 크로마토그래피)를 이용하여 회수, 정제 및 농축될 수 있으며, 이에 사용되는 컬럼의 종류와 순서는 융합단백질의 특성, 배양방법 등에 따라 적절히 선택할 수 있다.

발명의 효과

[77] 본 발명에 따른 융합단백질 플랫폼은 IgM Fc 영역을 통해 10 내지 12개의 타겟 결합 부위를 형성할 수 있다. 또한, 링커 영역을 통해 기존 IgM 항체에서 발생하는 입체 장애 문제를 해결할 수 있다.

[78] 따라서, 상기 플랫폼은 하나의 융합단백질에 생물학적 활성분자를 10개 내지 12개로 포함시킬 수 있으며, 이를 통해 생물학적 활성분자의 결합활성(avidity)과 이에 따른 치료 효과 및 질병 진단을 극대화할 수 있다. 또한, 목적에 따라 다양한 생물학적 활성분자를 선택하고, 여러 종류의 생물학적 활성분자를 조합하여 사용하는 것도 가능하므로, 상기 플랫폼을 통해 제조된 융합단백질은 타겟을 인식하고 조절하는 효과가 현저히 향상될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[79] 도 1은 본 발명에 따른 융합단백질의 모식도이다. A는 생물학적 활성분자, 링커, IgM Fc 영역 및 J 사슬을 포함하며, 상기 IgM Fc 영역이 오합체(pentamer)를 형성하는 융합단백질에 관한 것이고, B는 생물학적 활성분자, IgM Fc 영역 및 J 사슬을 포함하되 링커는 포함하지 않으며, 상기 IgM Fc 영역이

오합체(pentamer)를 형성하는 융합단백질에 관한 것이고, C는 생물학적 활성분자, 링커 및 IgM Fc 영역을 포함하되 J 사슬은 포함하지 않으며, 상기 IgM Fc 영역이 육합체(hexamer)를 형성하는 융합단백질에 관한 것이고, D는 생물학적 활성분자 및 IgM Fc 영역을 포함하되 링커 및 J 사슬은 포함하지 않으며, 상기 IgM Fc 영역이 육합체(hexamer)를 형성하는 융합단백질에 관한 것이다.

- [80] 도 2a는 생물학적 활성분자로서 HLA(CMVpHLA)를 포함하는 융합단백질의 reducing SDS-PAGE 분석 결과를 보여주는 이미지이다. 'Ladder'는 단백질 사이즈 마커; '1'은 $[(\text{CMVpHLA})_2\text{-(IgD 힌지 영역)}_2\text{-(IgM Fc 영역)}]_5\text{-(J사슬)}$ 의 구조를 갖는 융합단백질; '2'는 $[(\text{CMVpHLA})_2\text{-(링커)}_0\text{-(IgM Fc 영역)}]_5\text{-(J사슬)}$ 의 구조를 갖는 융합단백질; '3'은 $[(\text{CMVpHLA})_2\text{-((GGGS)}_3)_2\text{-(IgM Fc 영역)}]_5\text{-(J사슬)}$ 의 구조를 갖는 융합단백질; '4'는 $[(\text{CMVpHLA})_2\text{-(IgA 힌지 영역)}_2\text{-(IgM Fc 영역)}]_5\text{-(J사슬)}$ 의 구조를 갖는 융합단백질; '5'는 $[(\text{CMVpHLA})_2\text{-(IgD 힌지 영역)}_2\text{-(IgM Fc 영역)}]_6\text{-(J사슬)}_0$ 의 구조를 갖는 융합단백질; '6'은 대조군인 CMVpHLA 단백질을 가리킨다.
- [81] 도 2b는 생물학적 활성분자로서 항체 단편(IgG Fab; A2014)을 포함하는 융합단백질의 reducing SDS-PAGE 분석 결과를 보여주는 이미지이다. 'Ladder'는 단백질 사이즈 마커; '1'은 $[(\text{A2014})_2\text{-(IgD 힌지 영역)}_2\text{-(IgM Fc 영역)}]_5\text{-(J사슬)}$ 의 구조를 갖는 융합단백질; '2'는 $[(\text{A2014})_2\text{-(링커)}_0\text{-(IgM Fc 영역)}]_5\text{-(J사슬)}$ 의 구조를 갖는 융합단백질; '3'은 $[(\text{A2014})_2\text{-((GGGS)}_3)_2\text{-(IgM Fc 영역)}]_5\text{-(J사슬)}$ 의 구조를 갖는 융합단백질; '4'는 $[(\text{A2014})_2\text{-(IgA 힌지 영역)}_2\text{-(IgM Fc 영역)}]_5\text{-(J사슬)}$ 의 구조를 갖는 융합단백질; '5'는 $[(\text{A2014})_2\text{-(IgD 힌지 영역)}_2\text{-(IgM Fc 영역)}]_6\text{-(J사슬)}_0$ 의 구조를 갖는 융합단백질; '6'은 대조군인 (A2014)-(IgG Fc) 융합단백질을 가리킨다.
- [82] 도 2c는 생물학적 활성분자로서 EPO 유사체(NESP)를 포함하는 융합단백질의 reducing SDS-PAGE 분석 결과를 보여주는 이미지이다. 'Ladder'는 단백질 사이즈 마커; '1'은 $[(\text{NESP})_2\text{-(IgD 힌지 영역)}_2\text{-(IgM Fc 영역)}]_5\text{-(J사슬)}$ 의 구조를 갖는 융합단백질; '2'는 $[(\text{NESP})_2\text{-(링커)}_0\text{-(IgM Fc 영역)}]_5\text{-(J사슬)}$ 의 구조를 갖는 융합단백질; '3'은 대조군인 NESP를 가리킨다.
- [83] 도 3a는 생물학적 활성분자로서 HLA(CMVpHLA)를 포함하는, 융합단백질의 타겟 결합능을 분석한 ELISA 결과 그래프이다.
- [84] 도 3b는 생물학적 활성분자로서 항체 단편(IgG Fab; A2014)을 포함하는, 융합단백질의 타겟 결합능을 분석한 ELISA 결과 그래프이다.
- [85] 도 3c는 생물학적 활성분자로서 EPO 유사체(NESP)를 포함하는, 융합단백질의 타겟 결합능을 분석한 ELISA 결과 그래프이다.
- [86] 도 4는 본 발명에 따른 융합단백질에 의한 IFN- γ 분비량을 분석한 ELISPOT 분석 결과 그래프로서, 상기 융합단백질이 CD8⁺ T 세포의 활성화를 유도할 수 있음을 보여준다.

- [87] 도 5a는 본 발명에 따른 융합단백질에 의한 CD8⁺ T 세포 증식 정도를 분석한 FACS 결과 그래프로서, 상기 융합단백질이 CD8⁺ T 세포의 증식을 유도할 수 있음을 보여준다. A는 [(CMVpHLA)₂-(링커)₀-(IgM Fc 영역)]₅-(J사슬)에 관한 것이고, B는 [(CMVpHLA)₂-(IgD 힌지 영역)₂-(IgM Fc 영역)]₅-(J사슬)에 관한 것이다.
- [88] 도 5b는 본 발명에 따른 융합단백질에 의한 CD8⁺ T 세포 증식 정도를 분석한 FACS 결과 그래프로서, 상기 융합단백질이 CD8⁺ T 세포의 증식을 유도할 수 있음을 보여준다. A는 [(CMVpHLA)₂-(IgD 힌지 영역)₂-(IgM Fc 영역)]₅-(J사슬)에 관한 것이고, B는 [(CMVpHLA)₂-((GGGS)₃)-(IgM Fc 영역)]₅-(J사슬)에 관한 것이고, C는 [(CMVpHLA)₂-(IgA 힌지 영역)₂-(IgM Fc 영역)]₅-(J사슬)에 관한 것이고, D는 [(CMVpHLA)₂-(IgD 힌지 영역)₂-(IgM Fc 영역)]₆-(J사슬)₀에 관한 것이고, E는 대조군인 CMVpHLA에 관한 것이다.
- [89] 도 6은 본 발명에 따른 융합단백질에 의한 세포 독성을 분석한 FACS 결과 그래프로서, 상기 융합단백질이 CD8⁺ T 세포를 활성화하여 암세포 사멸을 유도할 수 있음을 보여준다.
- [90] 도 7은 본 발명에 따른 융합단백질의 HLA-G 발현 세포와의 결합 활성을 분석한 어세이 결과 그래프로서, 상기 융합단백질이 세포 내 HLA-G 수용체와 결합할 수 있음을 보여준다.
- [91] 도 8은 본 발명에 따른 융합단백질에 의한 재조합 HLA-G 단백질과 재조합 ILT-2 단백질과의 결합 정도를 분석한 ELISA 어세이 결과 그래프로서, 상기 융합단백질은 HLA-G 및 ILT-2 단백질의 결합을 차단할 수 있음을 보여준다.
- [92] 도 9는 본 발명에 따른 융합단백질에 의한 재조합 HLA-G 단백질과 세포 내 발현된 ILT-2 단백질과의 결합 정도를 분석한 FACS 결과 그래프로서, 상기 융합단백질은 HLA-G 단백질과 세포 내 발현된 ILT-2 수용체 단백질의 결합을 차단할 수 있음을 보여준다.
- [93] 도 10은 본 발명에 따른 융합단백질에 의한 EPO 발현 세포의 증식능을 분석한 어세이 결과 그래프로서, 상기 융합단백질은 세포 내 발현된 EPO 수용체와 결합하며, 이를 발현하는 세포의 증식을 촉진할 수 있음을 보여준다.

발명의 실시를 위한 형태

- [94] 이하 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[95]

[96] 실시예 1. 융합단백질의 제조

- [97] 본 실시예 1에서는 IgM Fc 영역, 생물학적 활성분자, J 사슬 및/또는 링커를 포함하는 융합단백질을 제조하였다

[98]

- [99] **실시예 1-1. IgM Fc 영역, J 사슬 및 링커의 재조합 플라스미드 제조**
- [100] 본 실시예 1-1에서는 IgM Fc 영역, J 사슬 및/또는 링커의 재조합 플라스미드를 제조하였다. 상기 IgM Fc 영역으로는 야생형 IgM의 $c\mu 2$ 도메인, $c\mu 3$ 도메인 및 $c\mu 4$ 도메인을 사용하였다.
- [101] 구체적으로, 상기 $c\mu 2$ 도메인, $c\mu 3$ 도메인 및 $c\mu 4$ 도메인을 포함하는 IgM Fc 영역(서열번호 1 또는 2) 및 오합체 형성에 필요한 J 사슬(서열번호 3 또는 4)을 발현하기 위한 재조합 플라스미드를 구축하였다. 또한 기존 IgM 항체가 가지는 입체 장애 문제를 해결하기 위하여, 인간 IgD 힌지 영역(서열번호 5 또는 6), 인간 IgA 힌지 영역(서열번호 7 또는 8) 및 (GGGG)₃ 링커(서열번호 9 또는 10)를 상기 IgM Fc 영역에 연결한 융합단백질 재조합 플라스미드를 구축하였다.
- [102] 유전자 클로닝을 위하여, 상기 물질들 각각을 코돈 최적화(codon optimization)한 후, 코스모진텍(Seoul, Korea)에 의뢰하여 코돈 최적화된 뉴클레오타이드 분자들을 합성하였다.
- [103] 상기 최적화된 뉴클레오타이드와 프라이머를 이용해 pcDNA 3.1(제조사: Thermo Scientific) 벡터의 MCS(multiple cloning site)에 overlap PCR을 진행할 수 있게 PCR을 진행하여 insert DNA를 준비하였다. 얻어진 각각의 insert DNA와 pcDNA 3.1 벡터를 overlap PCR 후 DpnI 제한효소를 처리하여 template를 제거하고 각 물질이 삽입된 벡터를 각각 제작하였다.
- [104] 상기 벡터를 Stella[®] competent cell(제조사: Clontech)에 삽입한 뒤 벡터 내에 있는 항생제 내성 유전자에 맞는 암피실린 항생제를 첨가한 아가(agar) 플레이트에 도말하여 콜로니를 선별하였고, Applied biosystems 3730xl DNA analyzer(제조사: Thermo Scientific)를 사용하여 DNA 시퀀싱(sequencing)을 통해 염기서열을 확인하였다.
- [105]
- [106] **실시예 1-2. 생물학적 활성분자를 포함하는 융합단백질의 제조**
- [107] 본 실시예 1-2에서는 생물학적 활성분자의 재조합 플라스미드를 제조하였고, 이를 상기 실시예 1-1에서 제조한 IgM Fc 영역, J 사슬 및/또는 링커의 재조합 플라스미드와 연결하여, 이들을 포함하는 융합단백질을 발현 및 정제하였다.
- [108] 생물학적 활성분자로는 HLA-A, IgG 항체단편(IgG Fab) 또는 EPO 유사체를 사용하였다.
- [109]
- [110] **실시예 1-2-1. HLA-A 포함 융합단백질의 제조**
- [111] 생물학적 활성분자로서 HLA-A를 포함하고, IgM Fc 영역, J 사슬 및/또는 링커를 포함하는 융합단백질을 제조하였다.
- [112] 구체적으로, 상기 HLA-A 단백질의 안정성을 증가시키기 위하여, CMV(cytomegalovirus) 유래 펩타이드를 추가로 결합(로딩)하였으며, 추가적으로 $\beta 2m$ (Beta-2 microglobulin)을 상기 CMV 유래 펩타이드에 이어서 결합하였다. 이를 통해, 안정성이 향상된 HLA-A 단백질(이하, 'CMVpHLA'로 명명함)을

- 구축하였고, 이의 구체적인 서열은 서열번호 11 또는 12에 기재하였다. 그리고 추후 단백질 정제를 용이하게 하기 위하여, C-말단에 FLAG 태그를 부착하였으며, 상세 수행방법은 실시예 1-1에 따른 클로닝 방법을 이용하였다.
- [113] 상기 구축한 CMVpHLA 재조합 플라스미드에서 FLAG 태그를 제외한 HLA-A 단백질 서열을 IgM Fc 영역 서열에 연결하였으며, 이렇게 구축된 최종 재조합 플라스미드 벡터를 Expi293 (Thermo Scientific) 동물 세포에 도입하여, 융합단백질을 빠른 시간 내에 확보하기 위한 임시발현(transient expression) 시스템을 확립하였다.
- [114] 구체적으로, 형질전환 하루 전, 플라스크에 3.0×10^6 세포/mL 농도의 세포를 분주한 후 24시간 배양하였다. 형질도입 당일 Expi293[®] expression 배지를 첨가하여 3.0×10^6 세포/mL 농도로 희석하였다. 이후, 각각의 재조합 플라스미드 벡터 $1 \mu\text{g/mL}$ 를 Opti-MEM[®] 배지와 혼합하였고, ExpiFectamine[®] 시약과 Opti-MEM[®] 배지를 부피에 맞춰 혼합한 후 상온에서 5분간 두었다. 이후, 15분간 DNA와 ExpiFectamine[®] 시약을 반응시키고 플라스크에 첨가하였으며, 16 내지 22시간 후에 enhancer1과 2를 처리하고, 4 내지 5일차에 세포의 생존율(viability)이 75% 이상일 때를 확인하고 융합단백질을 회수하였다.
- [115] 이후, IgM 친화성 크로마토그래피를 이용하여 발현된 융합단백질을 정제하였다. 구체적으로, 상기 실시예 5의 임시발현 시스템으로부터 얻은 배양액을 $0.2 \mu\text{m}$ 의 기공 크기를 갖는 PES 여과 막에 여과하여 불순물을 제거하였다. 상기 회수된 여과액을 IgM 친화성 매트릭스 POROS[™] CaptureSelect[™] IgM Affinity Matrix[®](Thermo Scientific)에 적재하여 융합단백질을 정제하였다. 아래와 같은 조건으로 IgM 친화성 크로마토그래피를 수행하였다.
- [116] <크로마토그래피 조건>
- [117] - 수지: POROS[™] CaptureSelect[™] IgM Affinity Matrix[®]
- [118] - 유속: 480 cm/h
- [119] - 평형: PBS (Phosphate-buffered saline) 완충액
- [120] - 적재: 최대 6 g 단백질/L 수지 부피
- [121] - 재생 및 멸균: 0.01 M NaOH 용액
- [122] - 용출: 0.1 M glycine-HCl, pH 2.7 완충액
- [123] - 보관: 20% EtOH
- [124] 이후, 용출액의 부피의 1/10만큼 1.0 M Tris-HCl, pH 8.5 완충액으로 중화하였다. 회수한 융합단백질을 한외여과방식을 이용하여 농축한 후 PBS로 투석하여 -20°C에 보관하였다.
- [125] 한편, IgM Fc 영역을 포함하지 않는 CMVpHLA 대조군 단백질의 정제 및 농축은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 상기 임시발현 시스템으로부터 얻은 배양액을 $0.2 \mu\text{m}$ 의 기공 크기를 갖는 PES 여과 막에 여과하여 불순물을 제거하였다. 상기 회수된 여과액을 DYKDDDDK (FLAG-tag) 친화성 매트릭스 Pierce Anti-DYKDDDDK Affinity Resin[®] (Thermo Scientific)에 적재하여

정제하였다.

[126] 아래와 같은 조건으로 FLAG-tag 친화성 크로마토그래피를 수행하였다.

[127] <크로마토그래피 조건>

[128] - 수지: Pierce Anti-DYKDDDDK Affinity Resin®

[129] - 유속: 300 cm/h

[130] - 평형: PBS (Phosphate-buffered saline) 완충액

[131] - 적재: 최대 3 g 단백질/L 수지 부피

[132] - 재생 및 멸균: 0.1 M glycine-HCl, pH 2.7 완충액

[133] - 용출: 0.1 M glycine-HCl, pH 2.7 완충액

[134] - 보관: 20% EtOH

[135] FLAG-tag 친화성 크로마토그래피를 진행한 후, 용출액의 부피의 1/10만큼 1.0 M Tris-HCl, pH 8.5 완충액으로 중화하였다. 이후, 회수한 융합단백질을 한외여과방식을 이용해 농축한 후 PBS로 투석하여 -20°C에 보관하였다.

[136] 전술한 방법으로 제조한 융합단백질은 다음과 같은 구조식으로 표시하였다: [(생물학적 활성분자)-(링커)-(IgM Fc 영역)]-(J 사슬). 이때, 하나의 융합단백질에 포함되는 생물학적 활성분자, 링커, IgM Fc 영역 및/또는 J 사슬의 갯수는 아래 첨자로 표시하였으며, 1개의 경우에는 표시하지 않았다.

[137] [표1]

융합단백질	비고
$[(\text{CMVpHLA})_2\text{-(IgD 힌지 영역)}_2\text{-(IgM Fc 영역)}]_5\text{-(J사슬)}$	링커는 IgD 힌지 영역이며, IgM Fc 영역은 오합체를 형성함
$[(\text{CMVpHLA})_2\text{-(IgA 힌지 영역)}_2\text{-(IgM Fc 영역)}]_5\text{-(J사슬)}$	링커는 IgA 힌지 영역이며, IgM Fc 영역은 오합체를 형성함
$[(\text{CMVpHLA})_2\text{-((GGGGS)}_3)_2\text{-(IgM Fc 영역)}]_5\text{-(J사슬)}$	링커는 (GGGGS) ₃ 이며, IgM Fc 영역은 오합체를 형성함
$[(\text{CMVpHLA})_2\text{-(링커)}_0\text{-(IgM Fc 영역)}]_5\text{-(J사슬)}$	링커를 포함하지 않으며, IgM Fc 영역은 오합체를 형성함
$[(\text{CMVpHLA})_2\text{-(IgD 힌지 영역)}_2\text{-(IgM Fc 영역)}]_6\text{-(J사슬)}_0$	링커는 IgD 힌지 영역이며, IgM Fc 영역은 육합체를 형성함
CMVpHLA	링커, IgM Fc 영역 및 J 사슬을 포함하지 않음
CMVpHLAK ^b	링커, IgM Fc 영역 및 J 사슬을 포함하지 않으며 α3 영역이 mouse K ^f 로 치환됨

[138] 이를 상기 표 1에 나열하였다. 예를 들어, " $[(\text{CMVpHLA})_2\text{-(IgD 힌지 영역)}_2\text{-(IgM Fc 영역)}]_5\text{-(J사슬)}$ "은 생물학적 활성분자로서 CMVpHLA 2개가 IgD 힌지 영역 2개를 통해 IgM Fc 영역 단량체에 각각 결합되어 있고, 상기 IgM Fc 영역 단량체는 5개가 결합된 오합체로서, 상기 오합체를 형성하기 위하여 J 사슬 1개를 포함하는 융합단백질을 의미한다. 이러한 융합단백질의 오합체 구조는 도 1의 A에 도시되어 있는 형태를 참조할 수 있다.

[139] 또한, " $[(\text{CMVpHLA})_2\text{-(링커)}_0\text{-(IgM Fc 영역)}]_5\text{-(J사슬)}$ "은 생물학적 활성분자로서 CMVpHLA 2개 각각이 링커를 통하지 않고 IgM Fc 영역 단량체에 직접 결합되어 있고, 상기 IgM Fc 영역 단량체는 5개가 결합된 오합체로서, 상기 오합체를 형성하기 위하여 J 사슬 1개를 포함하는 융합단백질을 의미한다. 이러한 융합단백질의 오합체 구조는 도 1의 B에 도시되어 있는 형태를 참조할 수 있다.

[140] 또한, " $[(\text{CMVpHLA})_2\text{-(IgD 힌지 영역)}_2\text{-(IgM Fc 영역)}]_6\text{-(J사슬)}_0$ "은 생물학적 활성분자로서 CMVpHLA 2개가 IgD 힌지 영역 2개를 통해 IgM Fc 영역 단량체에

각각 결합되어 있고, 상기 IgM Fc 영역 단량체는 6개가 결합된 육합체로서, 상기 육합체를 형성하기 위하여 J 사슬은 포함하지 않는 융합단백질을 의미한다. 이러한 융합단백질의 육합체 구조는 도 1의 C에 도시되어 있는 형태를 참조할 수 있다.

[141]

[142] **실시예 1-2-2. IgG 항체단편 포함 융합단백질의 제조**

[143] 생물학적 활성분자로서 IgG 항체단편을 포함하고, IgM Fc 영역, J 사슬 및/또는 링커를 포함하는 융합단백질을 제조하였다.

[144] 구체적으로, HLA-G 단백질에 결합하는 항체 일부(IgG Fab; 이하, 'A2014'로 명명함)를 사용하였다. 상기 A2014는 IgG Fab의 모이어티 중에서 경쇄(서열번호 15 또는 16), 및 중쇄의 일부인 VH 및 CH1 (서열번호 17 또는 18)을 상기 실시예 1-1에 따른 클로닝 방법을 이용하여 구축하였다.

[145] 또한, IgM Fc 영역이 아니라 IgG Fc 영역을 포함하는 융합단백질을 대조군으로서 제조하였다. 상기 IgG Fc 영역(서열번호 19 또는 20)으로는 IgG의 CH2 및 CH3 도메인을 사용하였다.

[146] 상기 구축한 A2014 제조합 플라스미드 서열을 IgM Fc 영역 또는 IgG Fc 영역 서열에 연결하였으며, 이렇게 구축된 최종 제조합 플라스미드 벡터를 상기 실시예 1-2-1에서 시행한 방법으로 세포에 도입하였고, 융합단백질을 발현시켰다.

[147] 이후, 배양액을 상기 1-2-1과 동일한 방법으로 정제 및 농축한 후 PBS로 투석하여 -20°C에 보관하였다.

[148] 한편, IgG Fc 영역을 포함하는 융합단백질의 정제 및 농축은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 상기 임시발현 시스템으로부터 얻은 배양액을 상기 1-2-1의 방법에 따라, IgG 친화성 매트릭스 MabSelect SuRe® (Cytiva)에 적재하여 정제하였다.

[149] 아래와 같은 조건으로 IgG 친화성 크로마토그래피를 수행하였다.

[150] <크로마토그래피 조건>

[151] - 수지: MabSelect SuRe®

[152] - 유속: 300 cm/h

[153] - 평형: PBS (Phosphate-buffered saline) 완충액

[154] - 적재: 최대 35 g 단백질/L 수지 부피

[155] - 재생 및 멸균: 0.01 M NaOH 용액

[156] - 용출: 0.1 M glycine-HCl, pH 2.7 완충액

[157] - 보관: 20% EtOH

[158] IgG 친화성 크로마토그래피를 진행한 후, 용출액의 부피의 1/10만큼 1.0 M Tris-HCl, pH 8.5 완충액으로 중화하였다. 이후, 회수한 융합단백질을 한외여과방식을 이용해 농축한 후 PBS로 투석하여 -20°C에 보관하였다.

[159] [표2]

융합단백질	비고
$[(A2014)_2-(IgD \text{ 힌지 영역})_2-(IgM \text{ Fc 영역})]_5$ -(J사슬)	링커는 IgD 힌지 영역이며, IgM Fc 영역은 오합체를 형성함
$[(A2014)_2-(IgA \text{ 힌지 영역})_2-(IgM \text{ Fc 영역})]_5$ -(J사슬)	링커는 IgA 힌지 영역이며, IgM Fc 영역은 오합체를 형성함
$[(A2014)_2-((GGGGS)_3)_2-(IgM \text{ Fc 영역})]_5$ -(J사슬)	링커는 (GGGGS) ₃ 이며, IgM Fc 영역은 오합체를 형성함
$[(A2014)_2-(링커)_0-(IgM \text{ Fc 영역})]_5$ -(J사슬)	링커를 포함하지 않으며, IgM Fc 영역은 오합체를 형성함
$[(A2014)_2-(IgD \text{ 힌지 영역})_2-(IgM \text{ Fc 영역})]_6$ -(J사슬) ₀	링커는 IgD 힌지 영역이며, IgM Fc 영역은 육합체를 형성함
(A2014)-(IgG Fc 영역)	링커, IgM Fc 영역 및 J 사슬을 포함하지 않으며, IgG Fc 영역을 포함함

[160] 전술한 방법으로 제조한 융합단백질은 상기 표 2에 나열하였다.

[161] 예를 들어, " $[(A2014)_2-(IgD \text{ 힌지 영역})_2-(IgM \text{ Fc 영역})]_5$ -(J사슬)"은 생물학적 활성분자로서 A2014 2개가 IgD 힌지 영역 2개를 통해 IgM Fc 영역 단량체에 각각 결합되어 있고, 상기 IgM Fc 영역 단량체는 5개가 결합된 오합체로서, 상기 오합체를 형성하기 위하여 J 사슬 1개를 포함하는 융합단백질을 의미한다. 이러한 융합단백질의 오합체 구조는 도 1의 A에 도시되어 있는 형태를 참조할 수 있다.

[162] 또한, " $[(A2014)_2-(링커)_0-(IgM \text{ Fc 영역})]_5$ -(J사슬)"은 생물학적 활성분자로서 A2014 2개 각각이 링커를 통하지 않고 IgM Fc 영역 단량체에 직접 결합되어 있고, 상기 IgM Fc 영역 단량체는 5개가 결합된 오합체로서, 상기 오합체를 형성하기 위하여 J 사슬 1개를 포함하는 융합단백질을 의미한다. 이러한 융합단백질의 오합체 구조는 도 1의 B에 도시되어 있는 형태를 참조할 수 있다.

[163] 또한, " $[(A2014)_2-(IgD \text{ 힌지 영역})_2-(IgM \text{ Fc 영역})]_6$ -(J사슬)₀"은 생물학적 활성분자로서 A2014 2개가 IgD 힌지 영역 2개를 통해 IgM Fc 영역 단량체에 각각 결합되어 있고, 상기 IgM Fc 영역 단량체는 6개가 결합된 육합체로서, 상기 육합체를 형성하기 위하여 J 사슬은 포함하지 않는 융합단백질을 의미한다. 이러한 융합단백질의 육합체 구조는 도 1의 C에 도시되어 있는 형태를 참조할 수 있다.

[164]

[165] 실시예 1-2-3. EPO 유사체 포함 융합단백질의 제조

[166] 생물학적 활성분자로서 EPO 유사체를 포함하고, IgM Fc 영역, J 사슬 및/또는 링커를 포함하는 융합단백질을 제조하였다.

[167] 구체적으로, EPO 유사체로서 NESP (Novel erythropoiesis stimulating protein) 단백질을 사용하였다. 상기 NESP(서열번호 21 또는 22)를 IgM Fc 영역 서열에 연결하였으며, 상기 실시예 1에 따른 클로닝 방법을 이용하여 플라스미드 벡터를 구축하였다. 상기 구축된 재조합 플라스미드 벡터를 상기 실시예 1-2-1에서 시행한 방법으로 세포에 도입하였고, 융합단백질을 발현시켰으며, 정제 및 농축한 후 PBS로 투석하여 -20°C에 보관하였다.

[168] [표3]

융합단백질	비고
$[(\text{NESP})_2-(\text{IgD 힌지 영역})_2-(\text{IgM Fc 영역})]_5-(\text{J사슬})$	링커는 IgD 힌지 영역이며, IgM Fc 영역은 오합체를 형성함
$[(\text{NESP})_2-(\text{링커})_0-(\text{IgM Fc 영역})]_5-(\text{J사슬})$	링커를 포함하지 않으며, IgM Fc 영역은 오합체를 형성함
NESP	링커, IgM Fc 영역 및 J 사슬을 포함하지 않음

[169] 전술한 방법으로 제조한 융합단백질은 상기 표 3에 나열하였다.

[170] 예를 들어, " $[(\text{NESP})_2-(\text{IgD 힌지 영역})_2-(\text{IgM Fc 영역})]_5-(\text{J사슬})$ "은 생물학적 활성분자로서 NESP 2개가 IgD 힌지 영역 2개를 통해 IgM Fc 영역 단량체에 각각 결합되어 있고, 상기 IgM Fc 영역 단량체는 5개가 결합된 오합체로서, 상기 오합체를 형성하기 위하여 J 사슬 1개를 포함하는 융합단백질을 의미한다. 이러한 융합단백질의 오합체 구조는 도 1의 A에 도시되어 있는 형태를 참조할 수 있다.

[171] 또한, " $[(\text{NESP})_2-(\text{링커})_0-(\text{IgM Fc 영역})]_5-(\text{J사슬})$ "은 생물학적 활성분자로서 NESP 2개 각각이 링커를 통하지 않고 IgM Fc 영역 단량체에 직접 결합되어 있고, 상기 IgM Fc 영역 단량체는 5개가 결합된 오합체로서, 상기 오합체를 형성하기 위하여 J 사슬 1개를 포함하는 융합단백질을 의미한다. 이러한 융합단백질의 오합체 구조는 도 1의 B에 도시되어 있는 형태를 참조할 수 있다.

[172]

[173] **실시예 1-3. 제조된 융합단백질의 구조 확인**

[174] 상기 실시예 1-1 및 1-2에서 제조한 융합단백질이 목적하는 구조를 갖는지 여부를 확인하였다. 한편, 생물학적 활성분자, 링커, IgM Fc 영역 단량체 및 J 사슬을 포함하며, 상기 IgM Fc 영역이 오합체를 형성하는 융합단백질의 모식도는 도 1의 A에 나타내었다. 또한, 생물학적 활성분자, IgM Fc 영역 단량체

및 J 사슬을 포함하되 링커는 포함하지 않으며, 상기 IgM Fc 영역이 오합체를 형성하는 융합단백질의 모식도는 도 1의 B에 나타내었다. 또한, 생물학적 활성분자, 링커 및 IgM Fc 영역 단량체를 포함하되 J 사슬은 포함하지 않으며, 상기 IgM Fc 영역이 육합체를 형성하는 융합단백질의 모식도는 도 1의 C에 나타내었다. 또한, 생물학적 활성분자 및 IgM Fc 영역 단량체를 포함하되 링커 및 J 사슬은 포함하지 않으며, 상기 IgM Fc 영역이 육합체를 형성하는 융합단백질의 모식도는 도 1의 D에 나타내었다.

- [175] 구체적으로, 융합단백질의 구조는 Reducing SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다. 각 융합단백질 2 μ g에 5x reducing-PAGE 샘플 버퍼를 섞은 후, 100°C에서 5분간 가열하였으며, 이후 실온에 20분 방치하였다. 폴리아마이드 젤(12~20%, Invitrogen)을 젤 키트에 삽입 후 샘플을 로딩하여 200V에서 30분 동안 전기영동 한 후, 젤을 키트에서 분리하여 염색 용액(Coomassie Brilliant Blue staining solution)을 가하고 1시간 동안 방치하였다. 방치된 젤을 버퍼(destaining buffer; 70% 3차 증류수, 20% 메탄올, 10% 아세트산)로 옮기고 overnight 후 결과를 확인하였다.
- [176] 그 결과, 도 2a, 도 2b 및 도 2c에 나타낸 바와 같이, IgM Fc 영역, 생물학적 활성분자, J 사슬 및/또는 링커를 포함하는 각 융합단백질은 이를 구성하는 해당 물질의 사이즈를 모두 포함하는 것을 확인하였다.
- [177] 상기 결과를 통해, 상기 실시예 1에서 제조한 융합단백질은 원하는 구조를 가지며 제대로 발현됨을 알 수 있었다.

[178]

[179] **실시예 2. 융합단백질의 타겟 결합능**

- [180] 본 실시예 2에서는 상기 실시예 1에서 제조한 융합단백질의 타겟에 대한 결합능을 분석하였다. 이때, 타겟으로는 각 융합단백질이 포함하고 있는 생물학적 활성분자(HLA-A, IgG 항체단편 또는 EPO 유사체)에 따라 각기 다르게 설정하였다.

[181]

[182] **실시예 2-1. HLA-A 포함 융합단백질**

- [183] 생물학적 활성분자로서 HLA(CMVpHLA)를 포함하는 융합단백질의 타겟으로서, anti-CMVpHLA 항체에 대한 결합능을 확인하였다.
- [184] 구체적으로, ELISA 어세이 및 SPR (Surface Plasmon Resonance)을 통해 분석하였다.
- [185] ELISA 어세이는 다음과 같이 수행하였다. 96웰 플레이트에 anti-CMVpHLA 항체(아주대학교)를 10 ng/웰로 4°C에서 16시간동안 코팅하였다. 이어서, 플레이트를 0.05% PBS-트윈으로 세척하고, 3% 탈지분유로 블로킹하였다. 블로킹 후, 각 융합단백질 또는 대조군 단백질을 포함하는 희석액을 웰에 첨가하고, 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 플레이트를 세척하고, HRP가 연결된 anti-IgM(F5 μ) 항체 (MERCK) 혹은 HRP가 연결된

anti-FLAG 항체 (Abcam)를 1:5000으로 희석하고 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이후, 플레이트를 0.05% PBS-트윈으로 9회 세척하고 TMB 용액(Sigma)으로 발색한 후 1N 황산(대정화금)으로 반응을 종결하여 VARIOSKAN LUX (Thermo Scientific)으로 분석하였다.

- [186] SPR 분석법은 다음과 같이 수행하였다. SPR 분석기기는 Cytiva사의 Biacore T200을 사용하였다. Anti-CMVpHLA mouse Fc 항체(아주대학교)를 CM5 chip (Cytiva)에 표지하기 위해 recombinant protein G (Abcam)를 EDC/NHS 반응을 이용하여 붙여주고 1M 에탄올아민(Ethanolamine)으로 블로킹하였다. 이어서, CMVpHLA mouse Fc 항체를 흘려주어 방향성 있게 칩에 코팅해주었다. 이어서, 각 융합단백질 또는 대조군 단백질을 포함하는 희석액을 흘려주었으며, 10mM glycine-HCl, pH 1.5로 해리 반응을 시켰다.
- [187] 그 결과, 도 3a에 나타낸 바와 같이, IgM Fc 영역을 포함하지 않는 CMVpHLA 대조군 단백질은 타겟(anti-CMVpHLA 항체)에 대한 결합 활성이 현저히 낮음을 확인하였다. 반면, IgM Fc 영역을 포함하는 융합단백질은 타겟(anti-CMVpHLA 항체)에 결합 활성이 매우 높으며, EC₅₀ 값은 상기 CMVpHLA 대조군 단백질에 비하여 수십배 향상되었음을 확인하였다.

[188] [표4]

융합단백질	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax	Avidity score
[(CMVpHLA) ₂ -(IgD 힌지 영역) ₂ -(IgM Fc 영역)] ₅ -(J사슬)	5.56×10 ⁶	3.78×10 ⁻⁵	6.81×10 ⁻¹²	33.72	8.92×10 ⁵
[(CMVpHLA) ₂ -(링커) ₀ -(IgM Fc 영역)] ₅ -(J사슬)	5.44×10 ⁶	5.56×10 ⁻⁵	1.02×10 ⁻¹¹	33.6	6.05×10 ⁵
[(CMVpHLA) ₂ -((GGGGS) ₃) ₂ -(IgM Fc 영역)] ₅ -(J사슬)	4.74×10 ⁶	2.94×10 ⁻⁵	6.22×10 ⁻¹²	32.06	1.09×10 ⁶
[(CMVpHLA) ₂ -(IgA 힌지 영역) ₂ -(IgM Fc 영역)] ₅ -(J사슬)	5.43×10 ⁶	3.18×10 ⁻⁵	5.86×10 ⁻¹²	30.2	9.50×10 ⁵
[(CMVpHLA) ₂ -(IgD 힌지 영역) ₂ -(IgM Fc 영역)] ₆ -(J사슬) ₀	8.44×10 ⁶	1.97×10 ⁻⁴	2.33×10 ⁻¹¹	29.88	1.52×10 ⁵
CMVpHLA	2.52×10 ⁶	0.004645	1.84×10 ⁻⁹	10.33	2.22×10 ³

- [189] (표 4에서, ka는 두 물질이 붙는 속도(association rate constant), kd는 두 물질이 해리되는 속도(dissociation rate constant), KD는 결합력, Rmax는 두 물질이 붙었을

때 SPR에서의 각도가 달라지는 최대 RU 값, Avidity score는 R_{max}/kd 값으로서 SPR에서 avidity가 높은 정도를 나타내는 값을 의미함.)

[190] 또한, 상기 표 4에 나타낸 바와 같이, IgM Fc 영역을 포함하지 않는 CMVpHLA 대조군 단백질은 타겟(CMVpHLA mouse Fc 항체)에 대한 KD 값 및 avidity score (R_{max}/Kd)가 현저히 낮음을 확인하였다. 반면, IgM Fc 영역을 포함하는 융합단백질은 타겟(CMVpHLA mouse Fc 항체)에 대한 KD 값 및 avidity score (R_{max}/Kd)가 현저히 높으며, 상기 CMVpHLA 대조군 단백질과 비교 시 100배 내지 1000배 향상된 결합능을 나타냄을 확인하였다.

[191] 상기 결과를 통해, IgM Fc 영역은 생물학적 활성분자의 타겟에 대한 결합능을 향상시킬 수 있으므로, 본 발명에 따른 IgM Fc 영역 및 생물학적 활성분자를 포함하는 융합단백질은 세포 내에서 목적하는 생물학적 활성을 높은 수준으로 나타낼 수 있음을 알 수 있었다.

[192]

[193] **실시예 2-2. IgG 항체단편 포함 융합단백질**

[194] 생물학적 활성분자로서 항체 단편(IgG Fab; A2014)을 포함하는 융합단백질의 타겟으로서, HLA-G 단백질 항원에 대한 결합능을 확인하였다.

[195] 구체적으로, 상기 실시예 2-1에 따른 ELISA 어세이 및 SPR을 통해 분석하였다.

[196] 그 결과, 도 3b에 나타낸 바와 같이, IgG Fc 영역을 포함하는 (A2014)-(IgGFC) 대조군 단백질은 HLA-G 항원에 대한 결합 활성이 현저히 낮음을 확인하였다. 반면, IgM Fc 영역을 포함하는 융합단백질은 HLA-G 항원에 대한 결합 활성이 매우 높으며, EC_{50} 값은 상기 (A2014)-(IgGFC) 대조군 단백질에 비하여 약 1000배 이상 향상되었음을 확인하였다.

[197] [표5]

융합단백질	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax	Avidity score
[(A2014) ₂ -(IgD 힌지 영역) ₂ -(IgM Fc 영역)] ₅ -(J사슬)	9.58×10 ⁻⁶	4.25×10 ⁻⁵	4.44×10 ⁻¹²	93.38	2.20×10 ⁻⁶
[(A2014) ₂ -(링커) ₀ -(IgM Fc 영역)] ₅ -(J사슬)	2.63×10 ⁻⁷	1.12×10 ⁻⁴	4.25×10 ⁻¹²	59.87	5.36×10 ⁻⁵
[(A2014) ₂ -((GGGS) ₃) ₂ -(IgM Fc 영역)] ₅ -(J사슬)	1.96×10 ⁻⁷	9.66×10 ⁻⁵	4.94×10 ⁻¹²	56.68	5.87×10 ⁻⁵
[(A2014) ₂ -(IgA 힌지 영역) ₂ -(IgM Fc 영역)] ₅ -(J사슬)	1.39×10 ⁻⁷	5.05×10 ⁻⁵	3.63×10 ⁻¹²	73.38	1.45×10 ⁻⁶
[(A2014) ₂ -(IgD 힌지 영역) ₂ -(IgM Fc 영역)] ₆ -(J사슬) ₀	1.48×10 ⁻⁷	3.51×10 ⁻⁵	2.32×10 ⁻¹²	86.71	2.47×10 ⁻⁶
(A2014)-(IgG Fc)	1.18×10 ⁻⁷	3.05×10 ⁻⁴	2.59×10 ⁻¹¹	17.44	5.71×10 ⁻⁴

[198] (표 5에서, ka는 두 물질이 붙는 속도(association rate constant), kd는 두 물질이 해리되는 속도(dissociation rate constant), KD는 결합력, Rmax는 두 물질이 붙었을 때 SPR에서의 각도가 달라지는 최대 RU 값, Avidity score는 Rmax/kd 값으로서 SPR에서 avidity가 높은 정도를 나타내는 값을 의미함.)

[199] 또한, 상기 표 5에 나타낸 바와 같이, IgG Fc 영역을 포함하는 (A2014)-(IgGFc) 대조군 단백질은 HLA-G 항원에 대한 KD 값 및 avidity score (Rmax/Kd)가 현저히 낮음을 확인하였다. 반면, IgM Fc 영역을 포함하는 융합단백질은 HLA-G 항원에 대한 KD 값 및 avidity score (Rmax/Kd)가 현저히 높으며, 상기 (A2014)-(IgGFc) 대조군 단백질과 비교 시 10배 내지 500배 향상된 결합능을 나타냄을 확인하였다.

[200] 상기 결과를 통해, IgM Fc 영역은 생물학적 활성분자의 타겟에 대한 결합능을 향상시킬 수 있으므로, 본 발명에 따른 IgM Fc 영역 및 생물학적 활성분자를 포함하는 융합단백질은 세포 내에서 목적하는 생물학적 활성을 높은 수준으로 나타낼 수 있음을 알 수 있었다.

[201]

[202] **실시예 2-3. EPO 유사체 포함 융합단백질**

[203] 생물학적 활성분자로서 EPO 유사체(NESP)를 포함하는 융합단백질의 타겟으로서 EPO 수용체에 대한 결합능을 확인하였다.

[204] 구체적으로, 상기 실시예 2-1에 따른 ELISA 어세이 및 SPR을 통해 분석하였다.

[205] 그 결과, 도 3c에 나타낸 바와 같이, IgM Fc 영역 및 NESP를 포함하는 융합단백질은 EPO 수용체에 결합 활성이 매우 높음을 확인하였다.

[206] [표6]

융합단백질	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax	Avidity score
[(NESP) ₂ -(IgD 힌지 영역) ₂ -(IgM Fc 영역)] ₅ -(J사슬)	1.383×10 ⁻⁶	1.240×10 ⁻⁵	8.968×10 ⁻¹²	402.0	3.24×10 ⁷
[(NESP) ₂ -(링커) ₀ -(IgM Fc 영역)] ₅ -(J사슬)	1.612×10 ⁻⁶	4.051×10 ⁻⁵	2.513×10 ⁻¹¹	354.8	8.76×10 ⁶
NESP	1.241×10 ⁻⁶	1.456×10 ⁻³	1.173×10 ⁻⁹	111.2	7.64×10 ⁴

[207] (표 6에서, ka는 두 물질이 붙는 속도(association rate constant), kd는 두 물질이 해리되는 속도(dissociation rate constant), KD는 결합력, Rmax는 두 물질이 붙었을 때 SPR에서의 각도가 달라지는 최대 RU 값, Avidity score는 Rmax/kd 값으로서 SPR에서 avidity가 높은 정도를 나타내는 값을 의미함.)

[208] 또한, 상기 표 6에 나타낸 바와 같이, IgM Fc 영역을 포함하지 않는 NESP 대조군 단백질은 EPO 수용체에 대한 KD 값 및 avidity score (Rmax/Kd)가 현저히

낮음을 확인하였다. 반면, IgM Fc 영역 및 NESP를 포함하는 융합단백질은 EPO 수용체에 대한 KD 값 및 avidity score (Rmax/Kd)가 현저히 높으며, 상기 NESP 대조군 단백질과 비교 시 100배 내지 400배 향상된 결합능을 나타냄을 확인하였다.

[209] 상기 결과를 통해, IgM Fc 영역은 생물학적 활성분자의 타겟에 대한 결합능을 향상시킬 수 있으므로, 본 발명에 따른 IgM Fc 영역 및 생물학적 활성분자를 포함하는 융합단백질은 세포 내에서 목적하는 생물학적 활성을 높은 수준으로 나타낼 수 있음을 알 수 있었다.

[210] 특히, 상기 실시예 2-1 내지 2-3의 결과를 종합한 결과, 전술한 효과는 생물학적 활성분자가 IgM Fc 영역에 결합하는 경우라면 생물학적 활성분자의 종류 또는 MoA (Mode of Action)에 상관없이 나타남을 알 수 있었다.

[211]

[212] 실시예 3. 융합단백질의 생물학적 활성

[213] 실시예 3-1. CD8+ T 세포의 활성화, 증식 유도능 및 세포독성 분석

[214] 상기 실시예 1에서 제조한 융합단백질의 생물학적 활성을 확인하기 위하여, CD8+ T 세포에 대한 활성화 및 증식 유도능을 분석하였다.

[215] 먼저, CD8+ T 세포에 대한 활성화는 IFN- γ ELISPOT 분석을 통해 확인하였다. PBMC는 Immunospot으로부터 구매하여 사용하였고, CD8+ T세포는 CD8+ T세포 분리 키트(Miltenyi Biotec)를 이용하여 수득하였으며, ELISPOT 분석은 ELISPOT 키트(Immunospot)를 이용하여 진행하였다. 이후, IFN- γ 항체로 코팅된 플레이트를 PBS로 세척한 후 RPMI-1640(10% FBS)를 넣어 상기 항체를 안정화하였으며, RPMI-1640을 제거한 후 각 융합단백질 또는 대조군 단백질을 포함하는 희석액을 플레이트에 각각 넣어주었다. 이후, PBMC(6×10^5 세포/웰) 및 CD8+ T 세포(2×10^5 세포/웰)를 각 융합단백질이 들어있는 웰에 각각 넣어주고 37°C 5% CO₂ 인큐베이터에서 48시간 동안 반응하였다. 반응한 플레이트를 PBS로 세척하여 세포 및 물질을 제거한 후, Biotinylated IFN- γ 항체로 2시간 상온에서 반응하였다. PBS로 세척 후 Strep-AP를 넣고 1시간 상온에서 반응한 후, PBS로 세척하여 기질과 10분간 반응하여 발색을 유도하였다. 이후, ELISPOT reader (AID)로 분석하여 GraphPad Prism Version 5.0 (GraphPad software) 분석프로그램을 이용하여 통계처리를 진행하였다.

[216] 한편, CD8+ T 세포에 대한 증식 유도능은 FACS를 통해 확인하였다.

Immunospot으로부터 구매한 PBMC 1×10^6 세포/mL을 RPMI-1640(10% FBS)로 현탁하였고, 이를 12웰에 1×10^6 세포/웰의 밀도로 시딩하였다. 이후, 각 융합단백질 또는 대조군 단백질을 웰 당 2 nM의 농도로 처리하고, IL-2(Peprotech)를 20 U/mL씩 첨가하여 배양하였다. 3일 내지 4일 후, IL-2 20 U/mL, IL-7(Peprotech) 25 ng/mL, IL-15(Peprotech) 25 ng/mL을 첨가하고 배양 7일 내지 8일째에 상기 3종의 사이토카인을 혼합하였고, 최초 시작한 부피만큼의 배양배지를 추가하였다. 10 내지 11일 혹은 19 내지 20일에 각각의 세포를

수득하여 FACS 완충액(5% FBS in PBS)로 세척하였다. 이후, 세포 현탁액에 아이소타입 항체(Biolegend)를 처리하여 Fc 블로킹을 진행한 후 FACS 완충액으로 세척하였다. 이후, PerCP cy5.5 anti-human CD8 항체(BD bioscience)를 처리한 후 세척하였고, HLA-A*02:01 CMV pp65 tetramer (MBL)를 처리한 후 세척하였다. 과정을 완료한 후 유세포분석기(BD bioscience, FACSLyric™)를 이용하여 CMV 특이적 CD8⁺ T 세포의 증식정도를 확인하였다.

[217] 또한, CD8⁺ T 세포의 세포독성 분석은 FACS를 통해 확인하였다.

Immunospot으로부터 구매한 PBMC 6×10^5 cell/mL을 RPMI-1640(10% FBS)로 현탁하였고, 이를 6웰에 1.8×10^6 세포/웰의 밀도로 시딩하였다. 시딩 후, 각 융합단백질 또는 대조군 단백질을 웰당 100 nM의 농도로 처리하고, IL-2(Peprotech)를 20 U/mL, Anti-human CD28 antibody (Ebioscience)를 2 μ g/mL씩 첨가하여 배양하였다. 3일 내지 4일 후, IL-2 20 U/mL, IL-7(Peprotech) 25 ng/mL, IL-15(Peprotech) 25 ng/mL, Anti-human CD28 antibody 2 μ g/mL을 첨가하고 배양 7일 내지 8일째에 상기 3종의 사이토카인과 1종의 항체를 혼합하였고, 최초 시작한 부피만큼의 배양배지를 추가함과 동시에 각 융합단백질 또는 대조군 단백질을 첨가하였다. 그런 후 3일 내지 4일 후마다 상기 3종의 사이토카인과 1종의 항체를 혼합하여 첨가하였으며, 19일 내지 20일에 각각의 세포를 FACS 완충액으로 세척한 후, CD8⁺ T세포를 CD8⁺ T세포 분리 키트(Miltenyi Biotec)를 이용하여 수득하였다. 그런 후, 타겟 세포인 T2 세포(ATCC)에 CMVpp65 peptide 50 μ g/mL과 3 μ g/mL의 B2M (Sino)을 37°C 5% CO₂ 인큐베이터에서 1시간 동안 반응하였다. FACS 완충액으로 세척 후 1×10^6 세포/4 μ M DiO (Invitrogen)을 처리 후 37°C 5% CO₂ 인큐베이터에서 반응 후 세척하였다. 그런 후, DiO가 표지된 T2 세포와 상기 CD8⁺ T세포를 비울별로 섞어주고 각 융합단백질 또는 대조군 단백질을 넣어준 후 4 시간 반응하였다. 그리고 7AAD (Invitrogen)를 처리하고 10분 반응 후, 유세포분석기로 T2 세포의 사멸정도를 분석하였다.

[218] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, IgM Fc 영역을 포함하지 않는 CMVpHLA 대조군 단백질에 비하여, IgM Fc 영역 및 CMVpHLA을 포함하는 융합단백질은 생성된 IFN- γ 의 양이 약 2배 이상 증가함을 확인하였으며, 이는 IgM Fc로 인해 결합능이 높은 것을 다시 한번 확인할 수 있었다. 또한, IgM Fc 영역 및 링커를 모두 포함하는 융합단백질이 IgM Fc 영역은 포함하되 링커를 포함하지 않는 융합단백질에 비해 생성된 IFN- γ 양이 높은 것을 보아 링커가 연결된 경우에 더 우수한 생물학적 활성을 보이는 것을 알 수 있었다.

[219] 또한, 도 5a에 나타낸 바와 같이, IgM Fc 영역은 포함하되 링커를 포함하지 않는 융합단백질에 비하여, IgM Fc 영역 및 링커를 모두 포함하는 융합단백질은 CD8⁺ T 세포의 증식을 유도하는 효과가 3배 이상 우수함을 확인하였다.

[220] 또한, 도 5b에 나타낸 바와 같이 IgM Fc 영역을 포함하지 않는 CMVpHLA 대조군 단백질에 비하여, IgM Fc 영역 및 링커와 CMVpHLA을 포함하는 융합단백질은 CD8⁺ T 세포의 증식을 유도하는 효과가 30배 이상 우수함을

확인하였다. 나아가, 도 6에 나타낸 바와 같이, IgM Fc 영역을 포함하지 않는 CMVpHLA 대조군 단백질에 비하여, IgM Fc 영역 및 CMVpHLA를 포함하는 융합단백질은 암세포에 대한 독성이 더 높음을 확인하였다.

[221] 상기 결과를 통해, IgM Fc 영역을 포함하는 융합단백질은 이를 포함하지 않는 단백질에 비하여, 높은 수준으로 CD8⁺ T 세포의 활성화, 증식 및 암세포의 사멸을 유도할 수 있고, 특히 상기 IgM Fc 영역 및 생물학적 활성분자가 링커로 연결된 경우에는 더 우수한 생물학적 활성을 나타낼 수 있음을 알 수 있었다.

[222]

[223] **실시예 3-2. HLA-G 발현 세포에 대한 결합 활성**

[224] 상기 실시예 1에서 제조한 융합단백질의 생물학적 활성을 확인하기 위하여, HLA-G를 발현하는 JEG-3 세포에 대한 결합 활성도를 분석하였다.

[225] 구체적으로, 자연적으로 HLA-G를 발현하는 JEG-3 세포(ATCC, 3.5×10^5 세포/100 μ l)에 각 융합단백질 또는 대조군 단백질을 포함하는 희석액을 각각 넣어주고 4°C에서 1시간 반응하였다. 이후, FACS 완충액(5% FBS in PBS)으로 세척한 후 anti-IgM-PE (ebioscience) 혹은 anti-IgG Fc-FITC (Biolegend)를 처리하고 4°C에서 30분동안 반응하였다. 마지막으로 FACS 완충액으로 세척 후, 유세포분석기(BD bioscience, FACSLyric™)를 이용하여 JEG-3 세포에 결합하는 융합단백질 및 대조군의 정도를 확인하였다.

[226] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, IgG Fc 영역을 포함하는 (A2014)-(IgGFc) 대조군 단백질은 HLA-G 발현 세포에 대한 결합 활성이 현저히 낮음을 확인하였다. 반면, IgM Fc 영역을 포함하는 융합단백질은 상기 세포에 대한 결합 활성이 매우 높으며, 최대 MFI (median fluorescence intensity) 값은 상기 (A2014)-(IgGFc) 대조군 단백질에 비하여 약 2.5배 이상 향상됨을 확인하였다.

[227] 상기 결과를 통해, IgM Fc 영역을 포함하는 융합단백질은 이를 포함하지 않는 단백질에 비하여, 세포 내 수용체와 결합하는 활성이 더 높음을 알 수 있었다. 따라서, 본 발명에 따른 IgM Fc 영역 및 생물학적 활성분자를 포함하는 융합단백질은 세포 내에서 목적하는 생물학적 활성을 높은 수준으로 나타낼 수 있음을 알 수 있었다.

[228]

[229] **실시예 3-3. ILT-2 단백질의 결합 차단 활성**

[230] 상기 실시예 1에서 제조한 융합단백질의 생물학적 활성을 확인하기 위하여, HLA-G 단백질과 ILT-2 (LILRB1) 단백질의 결합 차단 활성을 분석하였다. 상기 ILT-2 단백질은 면역세포에서 발현되는 수용체 단백질로서, HLA-G 단백질이 결합하는 경우 세포독성 T 세포, NK 세포 및 B 세포의 활성이 억제되어 정상적인 면역반응이 야기되지 않는다.

[231] 먼저, 제조한 HLA-G 단백질과 제조한 ILT-2 단백질과의 결합 차단 활성은 ELISA 어세이로 분석하였다. 96웰 플레이트에 ILT-2 항원(R&D systems)을 150 ng/웰로 넣은 후 4°C에서 16시간동안 코팅하였다. 이어서, 플레이트를 0.05%

PBS-트윈으로 세척하고, 3% 탈지분유로 블로킹하였다. 블로킹 후 각 융합단백질 또는 대조군 단백질을 포함하는 희석액을 웰에 첨가하고, 각 웰에 HLA-G-6x his tag (아이엠바이오로직스)을 일정한 농도로 처리하고 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 플레이트를 세척하고, HRP가 연결된 anti-6x his 항체 (abcam)를 1:10,000으로 희석하고 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이후, 플레이트를 0.05% PBS-트윈으로 9회 세척하고 TMB 용액(Sigma)으로 발색한 후 1N 황산(대정화금)으로 반응을 종결하여 VARIOSKAN LUX (Thermo Scientific)으로 분석하였다.

[232] 한편, 세포에서 자연적으로 발현된 HLA-G 단백질과 ILT-2 단백질과의 결합 차단 활성은 JEG-3 세포를 이용하여 분석하였다. ATCC로부터 구매한 JEG-3 세포(3×10^5 세포/튜브)를 10% FBS가 포함된 MEM로 풀어주었다. 이후, 각 융합단백질 또는 대조군 단백질을 포함하는 희석액을 튜브에 첨가하고, 4°C에서 30분 동안 반응하였다. FACS 완충액(5% FBS in PBS)로 세척한 후 ILT-2 Fc chimera (R&D systems)를 1.5 μ g씩 처리하여 4°C에서 30분 동안 반응하였다. FACS 완충액으로 세척하고, PE-anti-human IgG Fc (Biolegend)를 처리한 후 4°C에서 20분 동안 반응하였다. 마지막으로 FACS 완충액으로 세척한 후, 유세포분석기(BD bioscience, FACSLyric™)를 이용하여 ILT-2 단백질과 세포 내 발현된 HLA-G 단백질과의 결합 차단 정도를 확인하였다.

[233] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, IgG Fc 영역을 포함하는 (A2014)-(IgGFc) 대조군 단백질은 제조합 HLA-G 단백질 및 ILT-2 단백질의 결합 차단 활성이 현저히 낮음을 확인하였다. 반면, IgM Fc 영역을 포함하는 융합단백질은 상기 단백질들의 결합 차단 활성이 매우 높으며, IC₅₀ 값은 상기 (A2014)-(IgGFc) 대조군 단백질에 비하여 약 5 내지 7배 이상 향상됨을 확인하였다.

[234] 또한, 도 9에 나타낸 바와 같이, IgM Fc 영역을 포함하는 융합단백질은 세포에서 발현된 HLA-G 단백질에 대한 결합 차단 활성이 매우 높음을 확인하였다. 이는, 체내에서 암세포 표면에 발현된 HLA-G가 면역세포의 저해수용체인 ILT-2에 결합하는 것을 효과적으로 저해할 수 있으며, 이에 따라 암세포의 사멸이 증가할 수 있음을 시사하는 것이다.

[235] 상기 결과를 통해, IgM Fc 영역을 포함하는 융합단백질은 이를 포함하지 않는 단백질에 비하여, 세포 내 발현된 수용체 단백질과 항원의 결합을 차단하는 활성이 더 높음을 알 수 있었다. 따라서, 본 발명에 따른 IgM Fc 영역 및 생물학적 활성분자를 포함하는 융합단백질은 세포 내에서 목적하는 생물학적 활성을 높은 수준으로 나타낼 수 있음을 알 수 있었다.

[236]

[237] 실시예 3-4. 세포 내 EPO 수용체와의 결합 활성

[238] 상기 실시예 1에서 제조한 융합단백질의 생물학적 활성을 확인하기 위하여, EPO 수용체를 발현하는 세포에 대한 결합 활성도를 분석하였다.

[239] 구체적으로, Indigobioscience로부터 구매한 EPOR reporter assay를 이용하여

결합활성 능력을 확인하였다. 96웰 세포 배양 플레이트 (Corning)에 세포를 150 uL/웰의 밀도로 시딩한 후, 4 내지 6시간 동안 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이후, 각 융합단백질 또는 대조군 단백질을 포함하는 희석액을 웰에 첨가하였고, 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 하루 동안 배양하였다. 이후, 제조사의 프로토콜에 따라, 100 uL의 반응용액을 넣어주고 상온에서 5분 발색 후 VARIOSKAN LUX (Thermo Scientific)으로 분석하였다.

[240] 그 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이, IgM Fc 영역을 포함하지 않는 NESP 대조군 단백질에 비하여, IgM Fc 영역 및 링커를 포함하는 융합단백질은 EPOR이 과발현된 세포의 증식을 더 높은 수준으로 유도함을 확인하였다. 즉, IgM Fc 영역을 포함하는 융합단백질은 세포 내 EPO 수용체와의 우수한 결합 활성을 나타내며, EPO 수용체 자극에 의한 신호전달 경로가 활성화되어 결국 세포의 증식능이 향상되는 효과를 나타냄을 확인하였다.

[241] 상기 결과를 통해, IgM Fc 영역을 포함하는 융합단백질은 이를 포함하지 않는 단백질에 비하여, 세포 내 수용체와의 결합능 및 이에 따른 생물학적 활성 유도능이 더 높음을 알 수 있었다. 따라서, 본 발명에 따른 IgM Fc 영역 및 생물학적 활성분자를 포함하는 융합단백질은 세포 내에서 목적하는 생물학적 활성을 높은 수준으로 나타낼 수 있음을 알 수 있었다.

[242] 특히, 상기 실시예 3-1 내지 3-4의 결과를 종합한 결과, 전술한 IgM Fc 영역에 의한 융합단백질의 생물학적 활성 유도 효과는 생물학적 활성분자가 IgM Fc 영역에 결합하는 경우라면 생물학적 활성분자의 종류 또는 MoA에 상관없이 나타남을 알 수 있었다.

[243]

[244] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 이에 한정되지 않는 것으로 이해해야 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

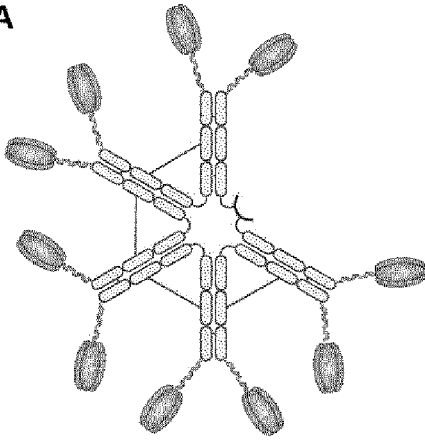
청구범위

- [청구항 1] 하기 구조식으로 표시되는, 융합단백질:
 $[(X)_a-(Y)_b-(\text{IgM Fc 영역})]_m-(Z)_n$
 이때, 상기 구조식에 있어서,
 상기 X는 생물학적 활성분자이고,
 상기 Y는 링커이고,
 상기 IgM Fc 영역은 단량체이고,
 상기 Z는 J 사슬이고,
 상기 a는 1 또는 2이고, 상기 b는 0, 1 또는 2이고, 상기 m은 5 또는 6이고,
 상기 n은 0 또는 1임.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 상기 IgM Fc 영역은 C μ 2 도메인, C μ 3 도메인 및 C μ 4 도메인으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 것인, 융합단백질.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
 상기 링커는 IgD 힌지 영역, IgA 힌지 영역, IgG 힌지 영역 및 GS 링커로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상인, 융합단백질.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
 상기 힌지 영역은 힌지 영역의 일부 또는 전체, CH1 도메인의 일부 또는 전체, CH2 도메인의 일부 또는 전체, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인, 융합단백질.
- [청구항 5] 제3항에 있어서,
 상기 GS 링커는 (GS)_c, (SG)_c, (GGGS)_c, (GGGGS)_c, GCGS(GGGGS)_c, 및 GCGGS(GGGGS)_c로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상이며, 이때 상기 c는 2 내지 6의 정수인, 융합 단백질.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
 상기 생물학적 활성분자는 항체, 항체의 항원-결합 단편, 항체-약물 접합체, 항체-유사 분자, 항체-유사 분자의 항원-결합 단편, 용해성 단백질, 막-결합 단백질, 리간드, 수용체, 바이러스-유사 입자, 단백질 독신, 케모카인, 사이토카인 및 효소로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상인, 융합단백질.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
 상기 항체의 항원-결합 단편은 Fab, F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab₂, Fab₃, Fv, scFv, Bis-scFv, 미니바디, 트리아바디, 다이아바디, 탠덤다이아바디, 나노바디 및 테트라바디로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상인, 융합단백질.
- [청구항 8] 제6항에 있어서,
 상기 막-결합 단백질은 HLA인, 융합단백질.
- [청구항 9] 제6항에 있어서,

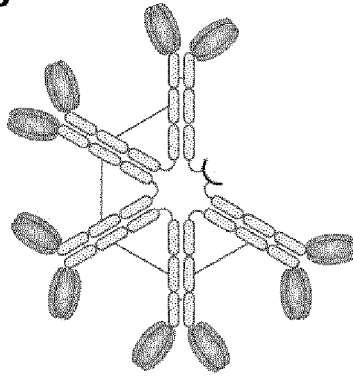
- 상기 리간드는 EPO 또는 EPO 유사체인, 융합단백질.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 J 사슬은 단백질 분자가 추가로 결합된 것인, 융합단백질.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 단백질 분자는 항체, 항체의 항원-결합 단편, 항체-약물 접합체,
항체-유사 분자, 항체-유사 분자의 항원-결합 단편, 용해성 단백질,
막-결합 단백질, 리간드, 수용체, 바이러스-유사 입자, 단백질 독신 및
효소로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상인, 융합단백질.
- [청구항 12] 제10항에 있어서,
상기 단백질 분자는 공동자극 수용체(co-stimulatory receptor), 사이토카인
및 세포관여자(cell engager)로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상인,
융합단백질.
- [청구항 13] 제1항의 융합단백질을 코딩하는 핵산 분자.
- [청구항 14] 제13항의 핵산 분자를 포함하는, 융합단백질 발현용 벡터.
- [청구항 15] 제14항의 융합단백질 발현용 벡터가 도입된 숙주 세포.
- [청구항 16] 제15항의 융합단백질 발현용 벡터를 숙주 세포에 도입하는 단계를
포함하는, 제1항의 융합단백질을 제조하는 방법.

[도 1]

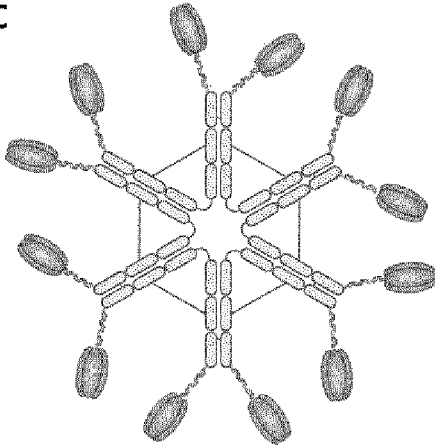
A



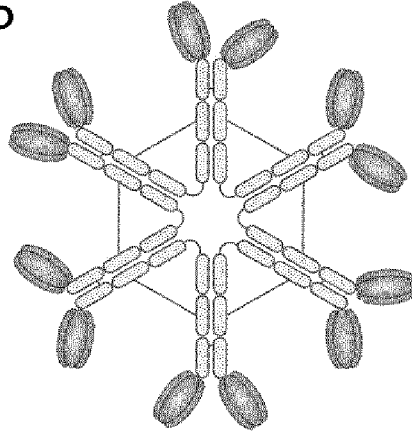
B



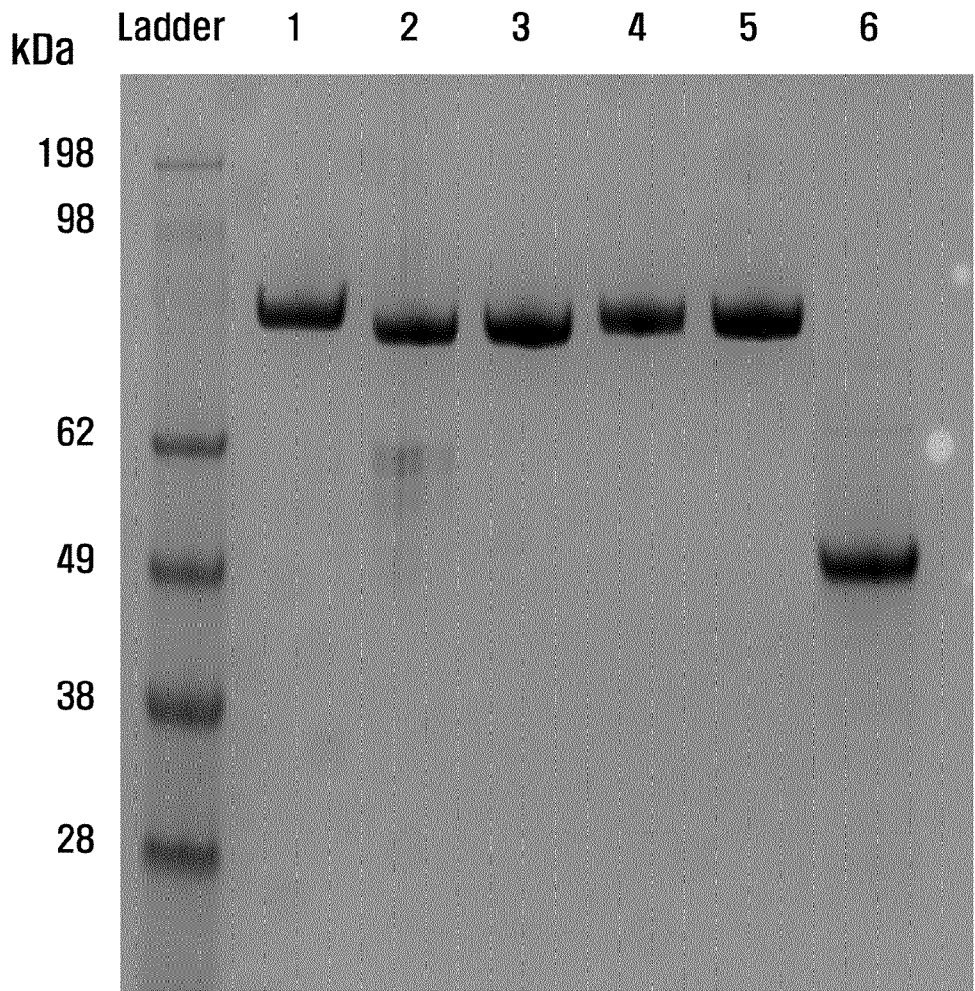
C



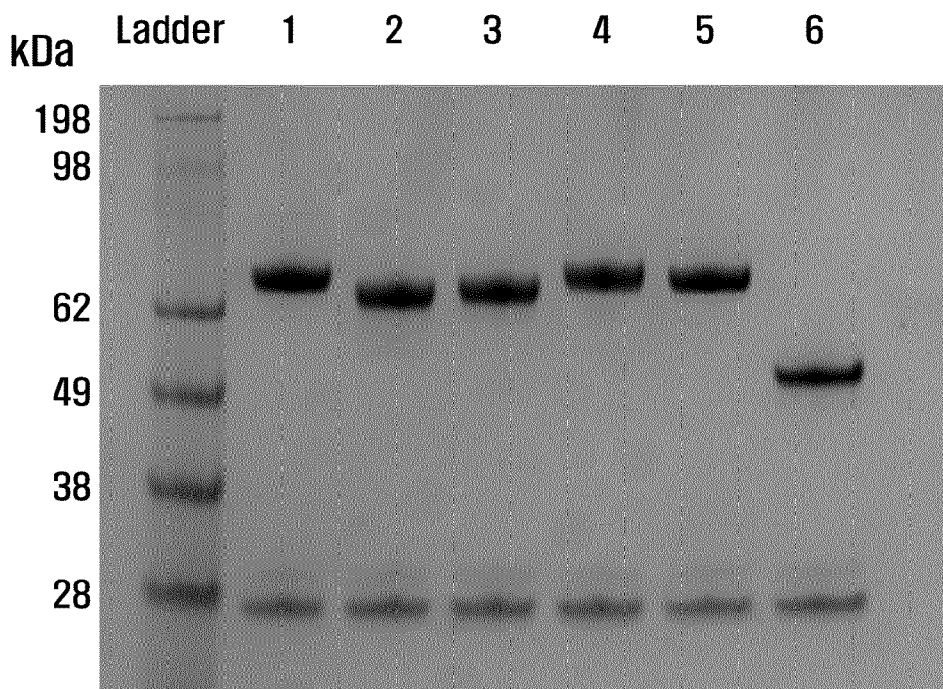
D



[도2a]

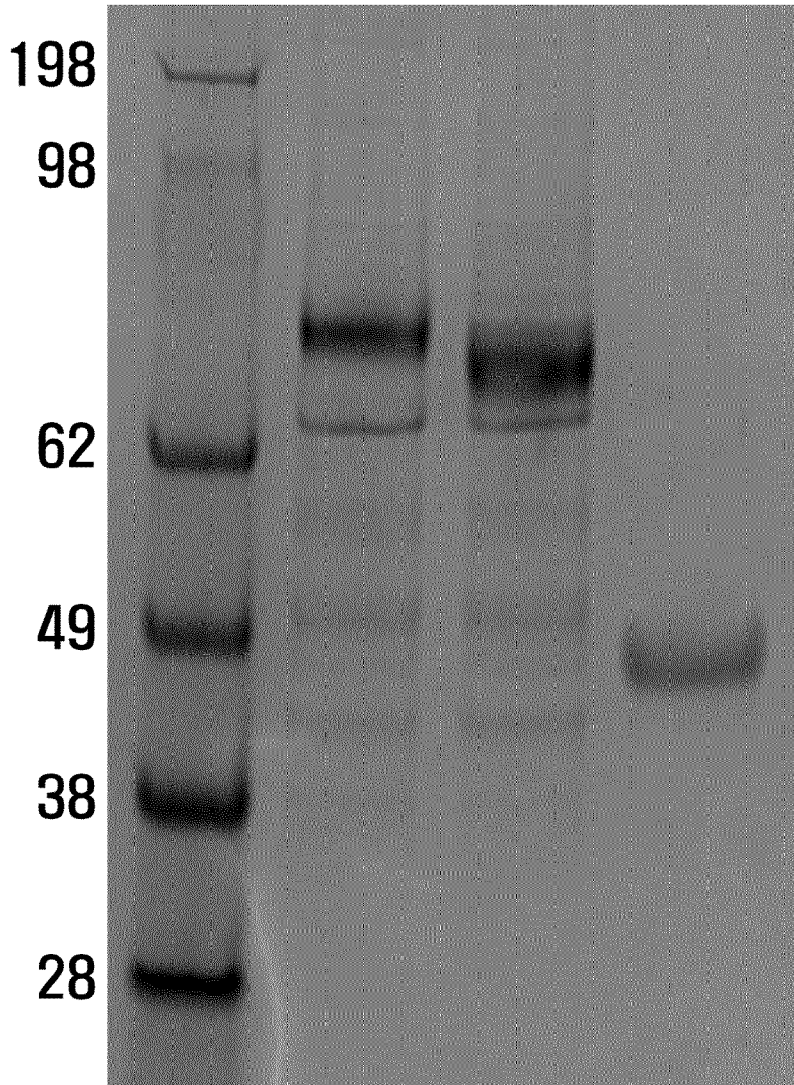


[도2b]



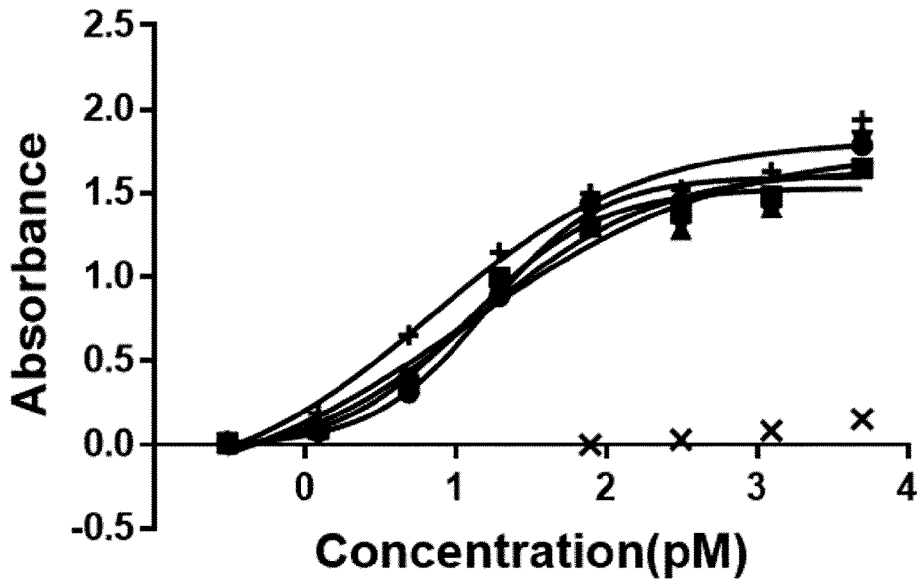
[도2c]

kDa **Ladder** **1** **2** **3**



[도3a]

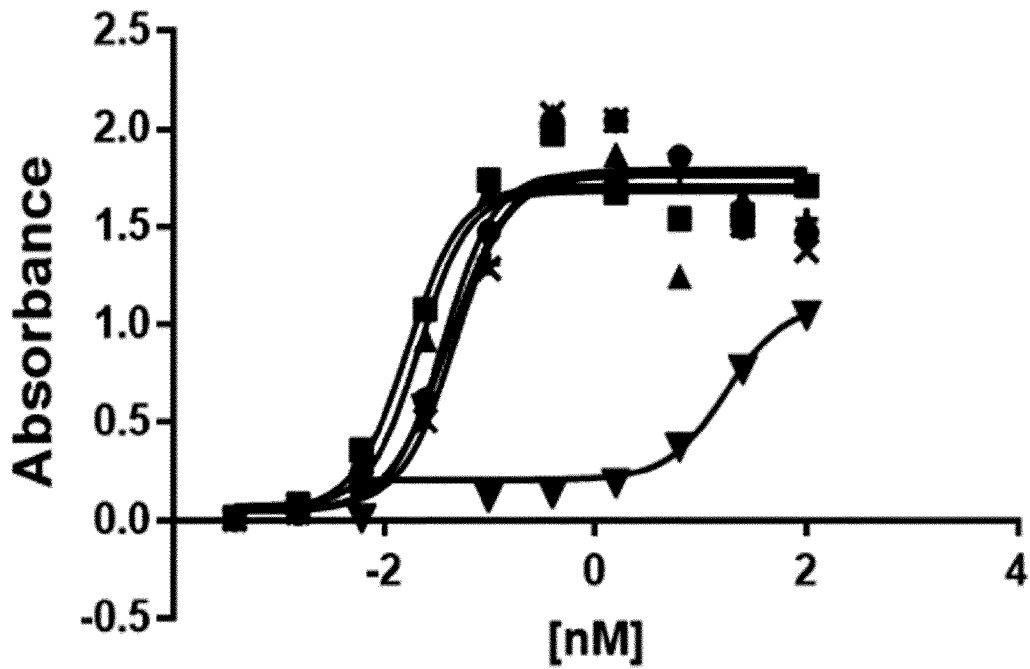
Anti-CMV IgG binding



- [(CMVpHLA)₂-(IgD hinge)₂-(IgM Fc)₅]₅-(J사슬)
- [(CMVpHLA)₂-(linker)₀-(IgM Fc)₅]₅-(J사슬)
- ▲ [(CMVpHLA)₂-(IgA hinge)₂-(IgM Fc)₅]₅-(J사슬)
- ▼ [(CMVpHLA)₂-((GGGGS)₃)₂-(IgM Fc)₅]₅-(J사슬)
- + [(CMVpHLA)₂-(IgD hinge)₂-(IgM Fc)₆]₆-(J사슬)₀
- × CMVpHLA

[도3b]

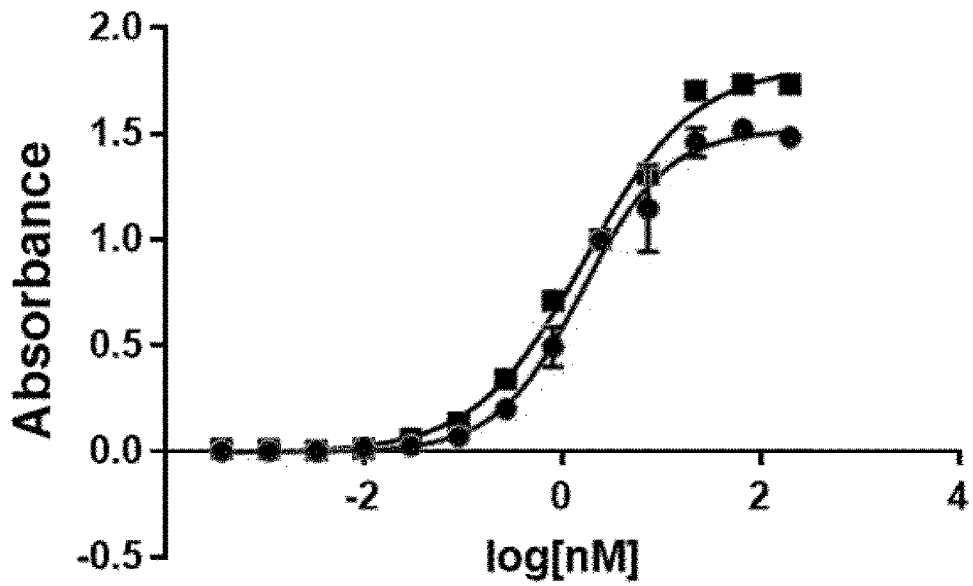
HLA-G binding affinity



- [(A2014)₂-(IgD 힌지 영역)₂-(IgM Fc 영역)]₅-(J사슬)
- [(A2014)₂-(링커)₀-(IgM Fc 영역)]₅-(J사슬)
- ▲ [(A2014)₂-((GGGS)₃)₂-(IgM Fc 영역)]₅-(J사슬)
- ✕ [(A2014)₂-(IgA 힌지 영역)₂-(IgM Fc 영역)]₅-(J사슬)
- + [(A2014)₂-(IgD 힌지 영역)₂-(IgM Fc 영역)]₆-(J사슬)₀
- ▼ (A2014)-(IgG Fc 영역)

[도3c]

EPO receptor binding assay

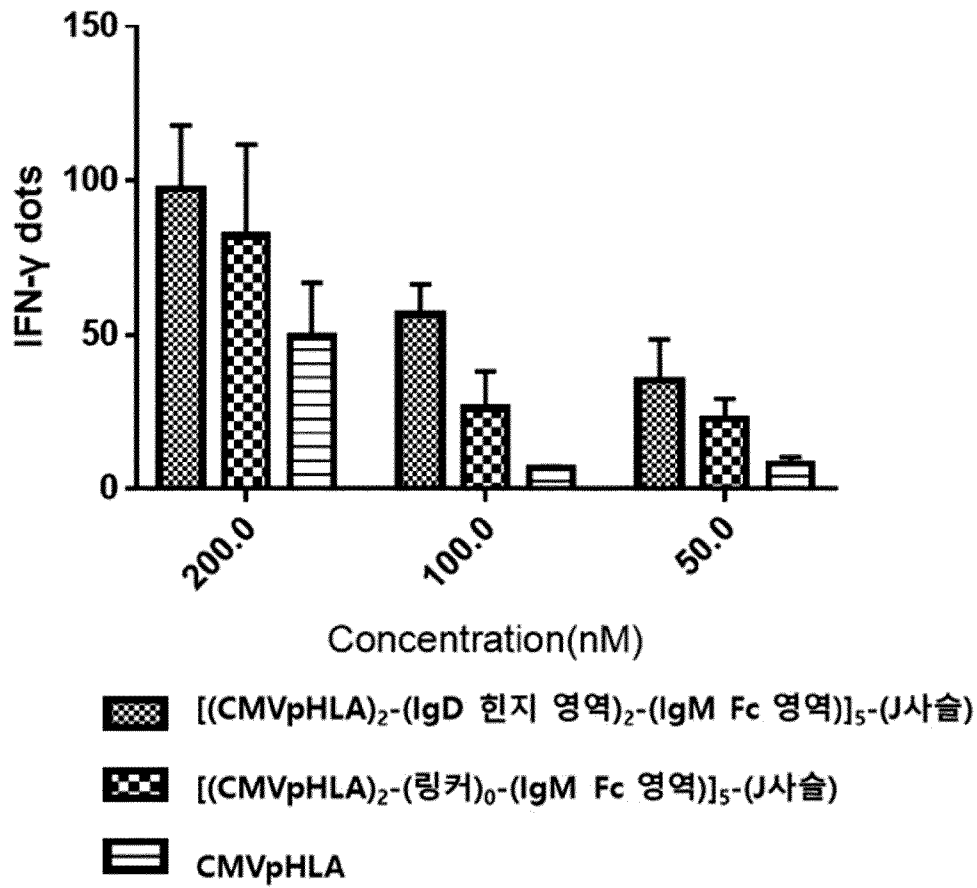


● $[(\text{NESP})_2-(\text{IgD}$ 힌지 영역) $_2-(\text{IgM}$ Fc 영역) $]]_5-(\text{J사슬})$

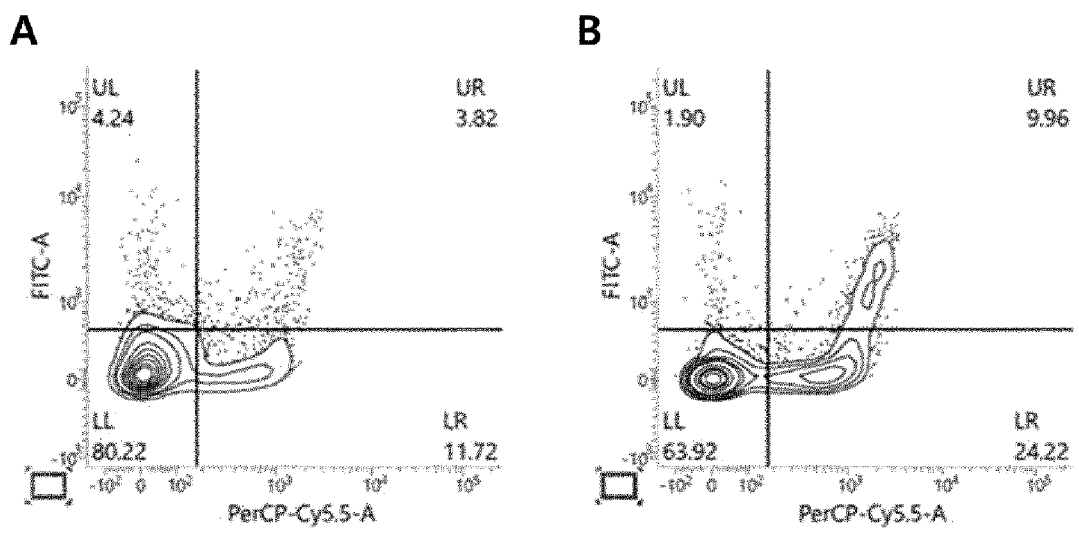
■ $[(\text{NESP})_2-(\text{링커})_0-(\text{IgM}$ Fc 영역) $]]_5-(\text{J사슬})$

[도4]

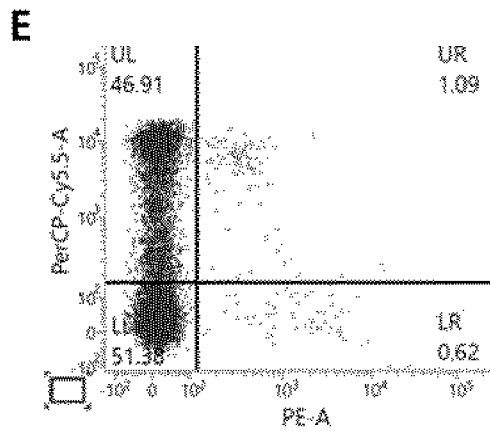
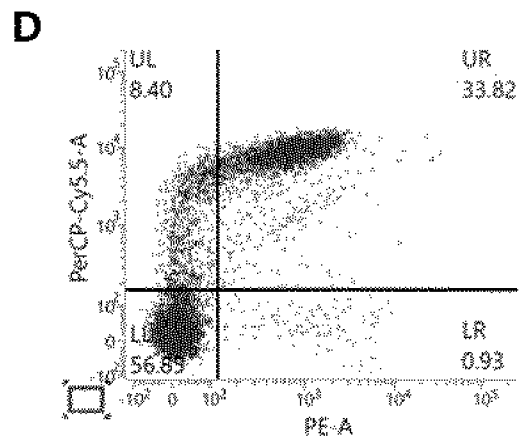
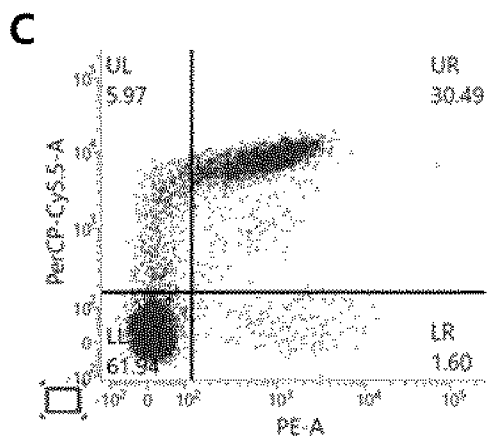
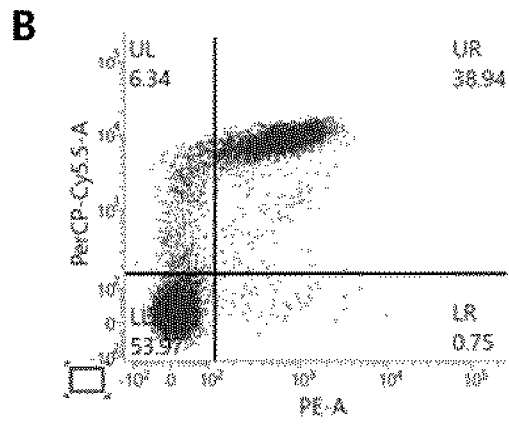
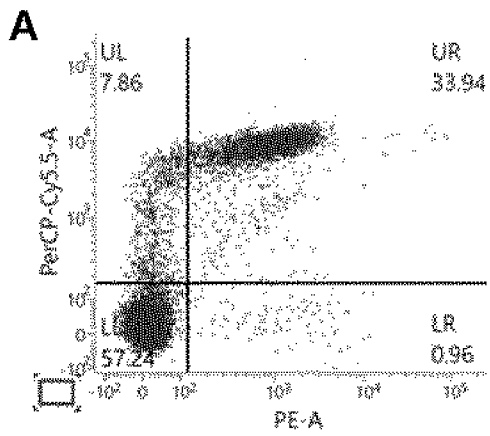
ELISPOT (CD8+ T cell)



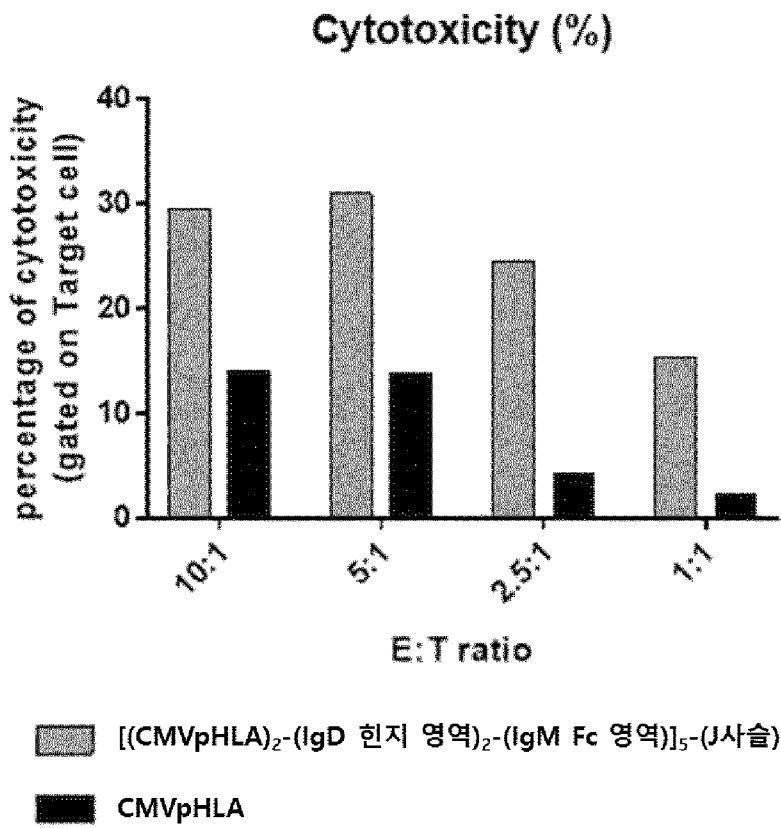
[도5a]



[도5b]

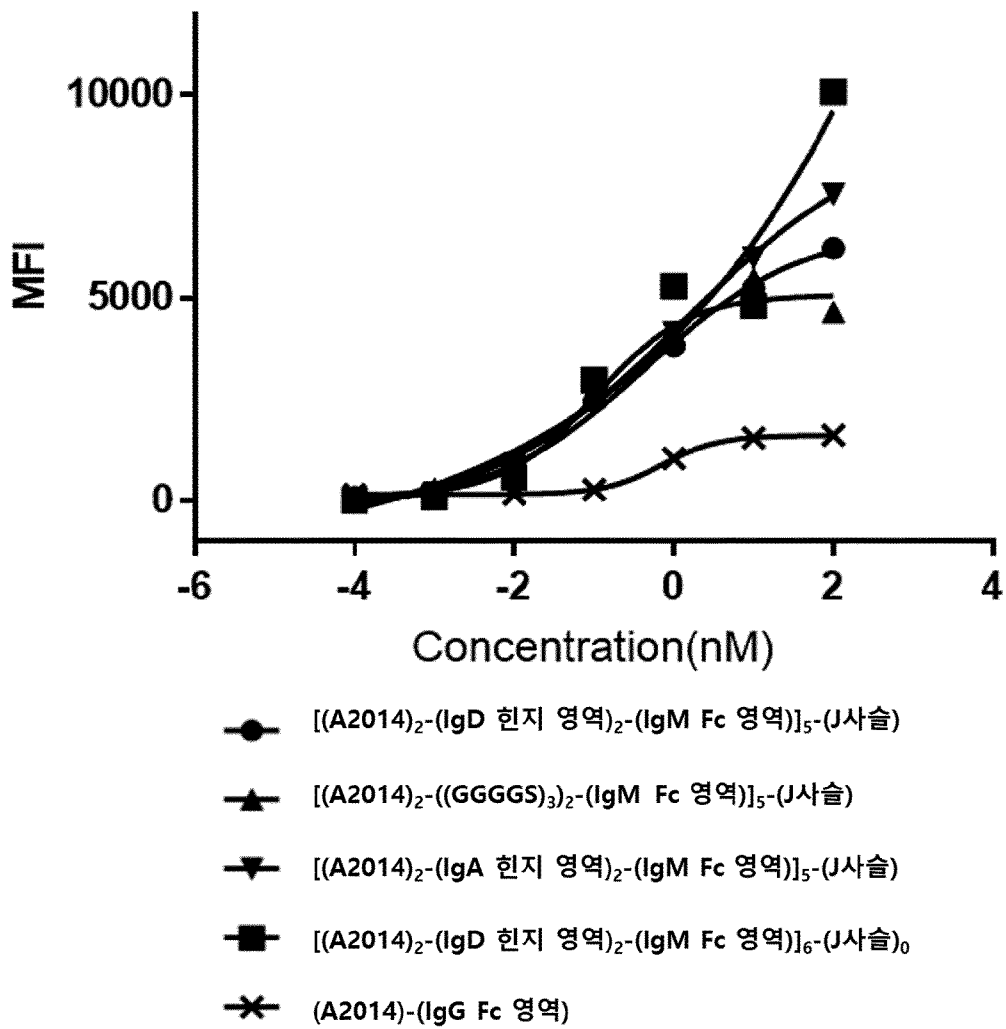


[도6]



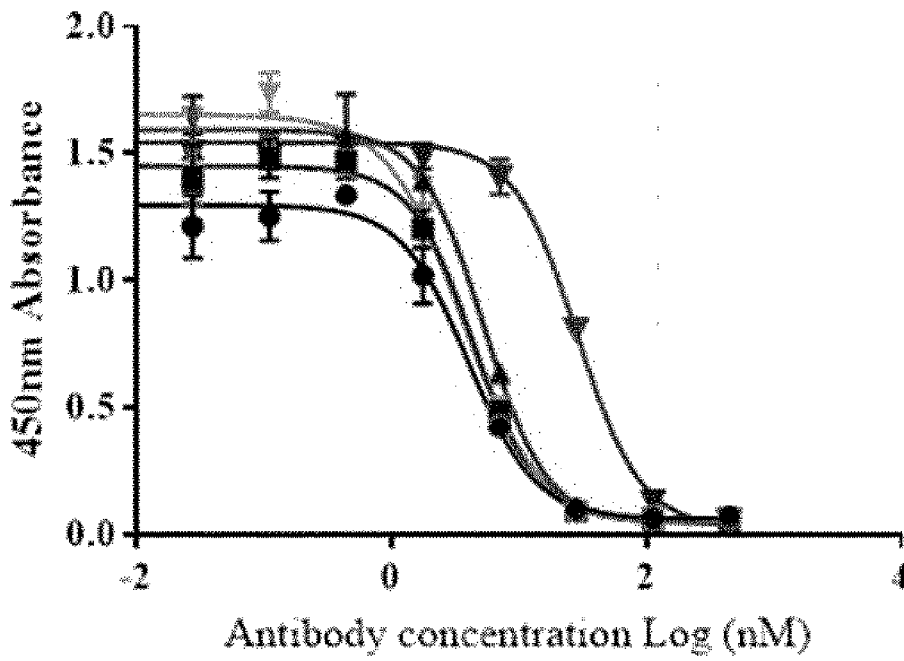
[도7]

JEG-3 cell binding assay



[도8]

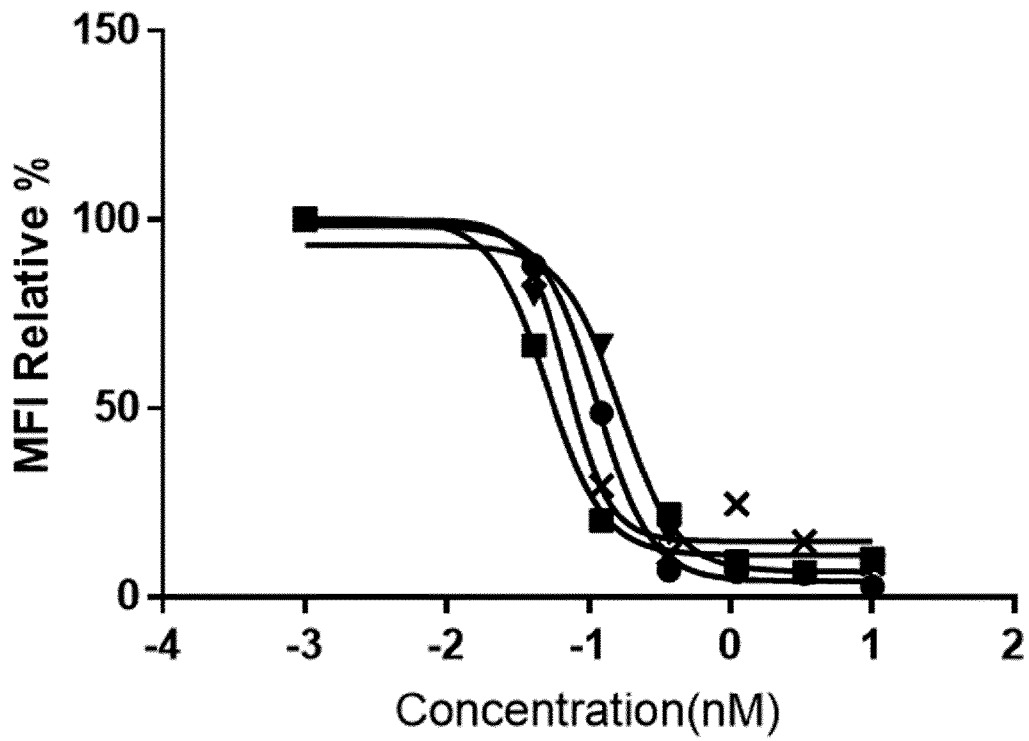
ILT-2 blockade assay



- [(A2014)₂-(IgD hinge)₂-(IgM Fc)₅-(J사슬)]
- [(A2014)₂-((GGGS)₃)₂-(IgM Fc)₅-(J사슬)]
- ★ [(A2014)₂-(IgA hinge)₂-(IgM Fc)₅-(J사슬)]
- ⊙ [(A2014)₂-(IgD hinge)₂-(IgM Fc)₆-(J사슬)₀]
- ▼ (A2014)-(IgG Fc)

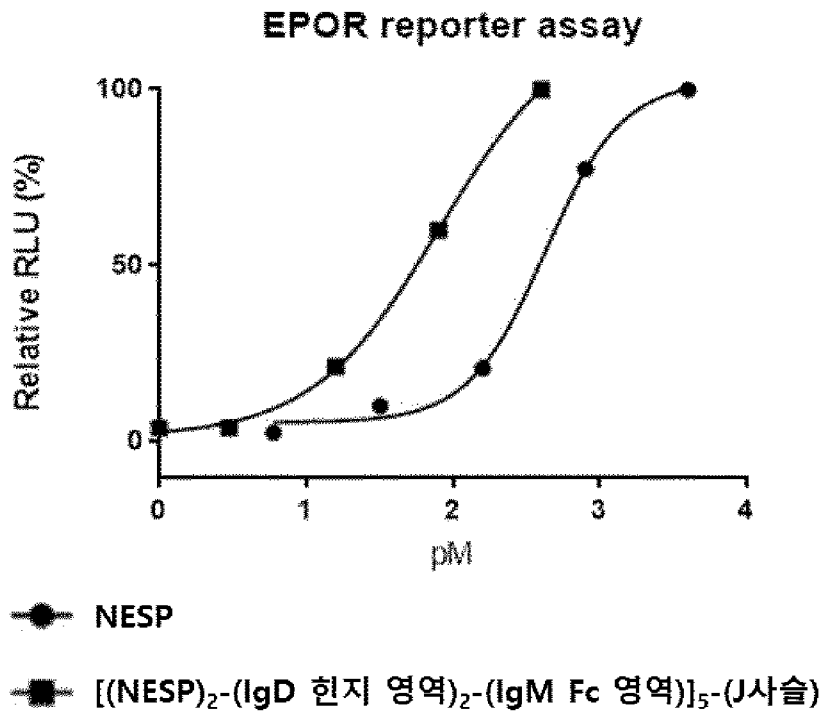
[도9]

ILT-2 blockade assay



- [(A2014)₂-(IgD 힌지 영역)₂-(IgM Fc 영역)]₅-(J사슬)
- [(A2014)₂-(IgA 힌지 영역)₂-(IgM Fc 영역)]₅-(J사슬)
- ▼ [(A2014)₂-((GGGS)₃)₂-(IgM Fc 영역)]₅-(J사슬)
- ✕ [(A2014)₂-(IgD 힌지 영역)₂-(IgM Fc 영역)]₆-(J사슬)₀

[도10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/014289

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/42(2006.01)i; C07K 14/74(2006.01)i; C12N 15/62(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 16/42(2006.01); A61K 39/395(2006.01); C07K 1/02(2006.01); C07K 16/00(2006.01); C07K 16/46(2006.01); C07K 19/00(2006.01); C12N 15/62(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: IgM Fc, 융합(fusion), J 사슬(J chain), 결합활성(avidity), HLA-A, IgG Fab, EPO		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2008-0094781 A (GENEXINE, INC. et al.) 24 October 2008 (2008-10-24) See abstract; and claims 44-90.	1-16
A	BETTONI, S. et al. C4BP-IgM protein as a therapeutic approach to treat Neisseria gonorrhoeae infections. JCI insight. 2019, vol. 4, no. 23, thesis no.:e131886, pp. 1-15. See abstract; figure 2; and page 5.	1-16
A	WO 2019-169314 A1 (IGM BIOSCIENCES, INC.) 06 September 2019 (2019-09-06) See entire document.	1-16
A	KR 10-2008-0109739 A (NOVAGEN HOLDING CORPORATION) 17 December 2008 (2008-12-17) See abstract; and claims 1-48.	1-16
A	KR 10-2015-0113934 A (HANMI PHARM. CO., LTD.) 08 October 2015 (2015-10-08) See abstract; and claims 1-15.	1-16
<input 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 21 January 2022		Date of mailing of the international search report 21 January 2022
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.

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:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/014289

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2008-0094781 A	24 October 2008	AU 2008-257923 A1	04 December 2008
		AU 2008-257923 B2	21 March 2013
		BR PI0811637 A2	18 November 2014
		BR PI0811637 B1	24 November 2020
		BR PI0811637 B8	25 May 2021
		CA 2687377 A1	04 December 2008
		CA 2687377 C	14 May 2013
		CN 101687933 A	31 March 2010
		CN 101687933 B	25 November 2015
		CN 103626875 A	12 March 2014
		CN 103626875 B	13 January 2016
		CN 103641919 A	19 March 2014
		CN 103641919 B	05 April 2017
		CN 105131127 A	09 December 2015
		CN 105131127 B	07 September 2018
		CN 105175553 A	23 December 2015
		CN 105175553 B	22 November 2019
		CN 105198998 A	30 December 2015
		DK 2662449 T3	15 May 2017
		EP 2162472 A2	17 March 2010
		EP 2162472 B1	27 February 2013
		EP 2662449 A2	13 November 2013
		EP 2662449 A3	18 November 2015
		EP 2662449 B1	15 February 2017
		EP 3173484 A1	31 May 2017
		EP 3173484 B1	26 September 2018
		EP 3176264 A1	07 June 2017
		EP 3176264 B1	26 September 2018
		ES 2415604 T3	26 July 2013
		ES 2623925 T3	12 July 2017
		HK 1141303 A1	05 November 2010
		HK 1191959 A1	08 August 2014
		HK 1218127 A1	03 February 2017
		HK 1219284 A1	31 March 2017
		HK 1219490 A1	07 April 2017
		IL 202128 B	29 November 2012
		JP 2010-531134 A	24 September 2010
		JP 5577243 B2	20 August 2014
		KR 10-1380729 B1	10 April 2014
		KR 10-1380732 B1	10 April 2014
		KR 10-2009-0045953 A	08 May 2009
		KR 10-2014-0037961 A	27 March 2014
		RU 2009141975 A	20 May 2011
		RU 2530168 C2	10 October 2014
		US 2008-0300188 A1	04 December 2008
		US 2011-0091416 A1	21 April 2011
		US 2012-0276043 A1	01 November 2012
		US 2012-0276096 A1	01 November 2012
		US 2012-0276097 A1	01 November 2012
		US 7867491 B2	11 January 2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/014289

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
				US	8529899 B2	10 September 2013
				US	8586038 B2	19 November 2013
				US	8586048 B2	19 November 2013
				US	8586531 B2	19 November 2013
				WO	2008-147143 A2	04 December 2008
				WO	2008-147143 A3	26 February 2009
WO	2019-169314	A1	06 September 2019	AU	2019-227984 A1	10 September 2020
				BR	112020017296 A2	29 December 2020
				CA	3091144 A1	06 September 2019
				CN	111787951 A	16 October 2020
				EP	3758752 A1	06 January 2021
				IL	276590 A	30 September 2020
				JP	2021-514618 A	17 June 2021
				KR	10-2020-0128391 A	12 November 2020
				SG	11202008343 A	29 September 2020
				US	10899835 B2	26 January 2021
				US	2020-0239572 A1	30 July 2020
				US	2021-0087273 A1	25 March 2021
KR	10-2008-0109739	A	17 December 2008	AU	2007-209722 A1	02 August 2007
				AU	2007-209722 B2	26 July 2012
				BR	PI0706742 A2	05 April 2011
				BR	PI0706742 B1	03 December 2019
				BR	PI0706742 B8	24 December 2019
				BR	PI0706742 C1	25 May 2021
				CA	2650072 A1	02 August 2007
				CA	2650072 C	24 November 2015
				CN	101321870 A	10 December 2008
				CN	101321870 B	04 July 2012
				CN	102516399 A	27 June 2012
				CN	102516399 B	22 March 2017
				CN	102816242 A	12 December 2012
				CN	102816242 B	20 October 2017
				DK	1994157 T3	22 June 2015
				DK	2450373 T3	22 June 2015
				EP	1994157 A1	26 November 2008
				EP	1994157 B1	18 March 2015
				EP	2450373 A2	09 May 2012
				EP	2450373 A3	26 September 2012
				EP	2450373 B1	18 March 2015
				ES	2539759 T3	03 July 2015
				ES	2539778 T3	06 July 2015
				HK	1125673 A1	14 August 2009
				HK	1170507 A1	01 March 2013
				IL	192801 A	11 February 2009
				IL	192801 B	31 May 2016
				JP	2009-524415 A	02 July 2009
				JP	2013-066477 A	18 April 2013
				JP	2016-006116 A	14 January 2016
				JP	5222153 B2	26 June 2013
				JP	6103579 B2	29 March 2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/014289

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		KR 10-2012-0014936 A	20 February 2012
		MX 2008009322 A	17 October 2008
		NZ 569702 A	30 March 2012
		PL 1994157 T3	31 August 2015
		PL 2450373 T3	31 August 2015
		PT 1994157 E	22 July 2015
		PT 2450373 E	27 July 2015
		RU 2008134389 A	10 March 2010
		RU 2433181 C2	10 November 2011
		SG 10201404308 A	30 October 2014
		SG 169351 A1	30 March 2011
		TW 200904829 A	01 February 2009
		TW I454482 B	01 October 2014
		US 10117949 B2	06 November 2018
		US 10233223 B2	19 March 2019
		US 2007-0178112 A1	02 August 2007
		US 2009-0297522 A1	03 December 2009
		US 2010-0098716 A1	22 April 2010
		US 2010-0099145 A1	22 April 2010
		US 2013-0224198 A1	29 August 2013
		US 2017-0114110 A1	27 April 2017
		US 2019-0070307 A1	07 March 2019
		US 7625564 B2	01 December 2009
		US 7964375 B2	21 June 2011
		US 8431132 B2	30 April 2013
		US 9375487 B2	28 June 2016
		WO 2007-085084 A1	02 August 2007
		ZA 200805920 B	26 August 2009
KR 10-2015-0113934 A	08 October 2015	AU 2015-242657 A1	27 October 2016
		AU 2015-242657 B2	21 May 2020
		BR 112016022844 A2	17 October 2017
		CA 2944138 A1	08 October 2015
		CN 106488933 A	08 March 2017
		EA 201691795 A1	31 March 2017
		EP 3127923 A1	08 February 2017
		EP 3127923 B1	18 August 2021
		EP 3889185 A2	06 October 2021
		HU 1600621 A2	30 January 2017
		JP 2017-511335 A	20 April 2017
		JP 2020-040983 A	19 March 2020
		JP 2021-167352 A	21 October 2021
		MX 2016012788 A	12 December 2016
		NO 20161667 A	19 October 2016
		NO 20161667 A1	19 October 2016
		PH 12016501937 A1	06 February 2017
		SG 10202107752 A	29 September 2021
		SG 11201608120 A	29 November 2016
		UA 124182 C2	04 August 2021
		US 2017-0128589 A1	11 May 2017
		WO 2015-152618 A1	08 October 2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/014289

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
<p style="text-align: center;">..... ZA 201607344 B 24 April 2019</p>			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 16/42(2006.01)i; C07K 14/74(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 16/42(2006.01); A61K 39/395(2006.01); C07K 1/02(2006.01); C07K 16/00(2006.01); C07K 16/46(2006.01); C07K 19/00(2006.01); C12N 15/62(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: IgM Fc, 융합(fusion), J 사슬(J chain), 결합활성(avidity), HLA-A, IgG Fab, EPO		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2008-0094781 A (주식회사 제백신 등) 2008.10.24 요약; 청구항 44-90	1-16
A	BETTONI, S. 등, 'C4BP-IgM protein as a therapeutic approach to treat Neisseria gonorrhoeae infections', JCI insight, 2019, 4권, 23호, 논문번호:e131886, 페이지 1-15 초록; 도면 2; 페이지 5	1-16
A	WO 2019-169314 A1 (IGM BIOSCIENCES, INC.) 2019.09.06 전체 문헌	1-16
A	KR 10-2008-0109739 A (노바젠 홀딩 코퍼레이션) 2008.12.17 요약; 청구항 1-48	1-16
A	KR 10-2015-0113934 A (한미약품 주식회사) 2015.10.08 요약; 청구항 1-15	1-16
<input 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	
2022년01월21일 (21.01.2022)	2022년01월21일 (21.01.2022)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대 전청사)	허주형	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-5373	

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. 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - 서면 혹은 이미지 파일
 - b. PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
 - c. 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2008-0094781 A	2008/10/24	AU 2008-257923 A1	2008/12/04
		AU 2008-257923 B2	2013/03/21
		BR PI0811637 A2	2014/11/18
		BR PI0811637 B1	2020/11/24
		BR PI0811637 B8	2021/05/25
		CA 2687377 A1	2008/12/04
		CA 2687377 C	2013/05/14
		CN 101687933 A	2010/03/31
		CN 101687933 B	2015/11/25
		CN 103626875 A	2014/03/12
		CN 103626875 B	2016/01/13
		CN 103641919 A	2014/03/19
		CN 103641919 B	2017/04/05
		CN 105131127 A	2015/12/09
		CN 105131127 B	2018/09/07
		CN 105175553 A	2015/12/23
		CN 105175553 B	2019/11/22
		CN 105198998 A	2015/12/30
		DK 2662449 T3	2017/05/15
		EP 2162472 A2	2010/03/17
		EP 2162472 B1	2013/02/27
		EP 2662449 A2	2013/11/13
		EP 2662449 A3	2015/11/18
		EP 2662449 B1	2017/02/15
		EP 3173484 A1	2017/05/31
		EP 3173484 B1	2018/09/26
		EP 3176264 A1	2017/06/07
		EP 3176264 B1	2018/09/26
		ES 2415604 T3	2013/07/26
		ES 2623925 T3	2017/07/12
		HK 1141303 A1	2010/11/05
		HK 1191959 A1	2014/08/08
		HK 1218127 A1	2017/02/03
		HK 1219284 A1	2017/03/31
		HK 1219490 A1	2017/04/07
		IL 202128 B	2012/11/29
		JP 2010-531134 A	2010/09/24
		JP 5577243 B2	2014/08/20
		KR 10-1380729 B1	2014/04/10
		KR 10-1380732 B1	2014/04/10
		KR 10-2009-0045953 A	2009/05/08
		KR 10-2014-0037961 A	2014/03/27
		RU 2009141975 A	2011/05/20
RU 2530168 C2	2014/10/10		
US 2008-0300188 A1	2008/12/04		
US 2011-0091416 A1	2011/04/21		
US 2012-0276043 A1	2012/11/01		
US 2012-0276096 A1	2012/11/01		
US 2012-0276097 A1	2012/11/01		
US 7867491 B2	2011/01/11		

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 8529899 B2	2013/09/10
		US 8586038 B2	2013/11/19
		US 8586048 B2	2013/11/19
		US 8586531 B2	2013/11/19
		WO 2008-147143 A2	2008/12/04
		WO 2008-147143 A3	2009/02/26
WO 2019-169314 A1	2019/09/06	AU 2019-227984 A1	2020/09/10
		BR 112020017296 A2	2020/12/29
		CA 3091144 A1	2019/09/06
		CN 111787951 A	2020/10/16
		EP 3758752 A1	2021/01/06
		IL 276590 A	2020/09/30
		JP 2021-514618 A	2021/06/17
		KR 10-2020-0128391 A	2020/11/12
		SG 11202008343 A	2020/09/29
		US 10899835 B2	2021/01/26
		US 2020-0239572 A1	2020/07/30
		US 2021-0087273 A1	2021/03/25
KR 10-2008-0109739 A	2008/12/17	AU 2007-209722 A1	2007/08/02
		AU 2007-209722 B2	2012/07/26
		BR PI0706742 A2	2011/04/05
		BR PI0706742 B1	2019/12/03
		BR PI0706742 B8	2019/12/24
		BR PI0706742 C1	2021/05/25
		CA 2650072 A1	2007/08/02
		CA 2650072 C	2015/11/24
		CN 101321870 A	2008/12/10
		CN 101321870 B	2012/07/04
		CN 102516399 A	2012/06/27
		CN 102516399 B	2017/03/22
		CN 102816242 A	2012/12/12
		CN 102816242 B	2017/10/20
		DK 1994157 T3	2015/06/22
		DK 2450373 T3	2015/06/22
		EP 1994157 A1	2008/11/26
		EP 1994157 B1	2015/03/18
		EP 2450373 A2	2012/05/09
		EP 2450373 A3	2012/09/26
		EP 2450373 B1	2015/03/18
		ES 2539759 T3	2015/07/03
		ES 2539778 T3	2015/07/06
		HK 1125673 A1	2009/08/14
		HK 1170507 A1	2013/03/01
		IL 192801 A	2009/02/11
		IL 192801 B	2016/05/31
		JP 2009-524415 A	2009/07/02
		JP 2013-066477 A	2013/04/18
		JP 2016-006116 A	2016/01/14
		JP 5222153 B2	2013/06/26
		JP 6103579 B2	2017/03/29

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		KR 10-2012-0014936 A	2012/02/20
		MX 2008009322 A	2008/10/17
		NZ 569702 A	2012/03/30
		PL 1994157 T3	2015/08/31
		PL 2450373 T3	2015/08/31
		PT 1994157 E	2015/07/22
		PT 2450373 E	2015/07/27
		RU 2008134389 A	2010/03/10
		RU 2433181 C2	2011/11/10
		SG 10201404308 A	2014/10/30
		SG 169351 A1	2011/03/30
		TW 200904829 A	2009/02/01
		TW I454482 B	2014/10/01
		US 10117949 B2	2018/11/06
		US 10233223 B2	2019/03/19
		US 2007-0178112 A1	2007/08/02
		US 2009-0297522 A1	2009/12/03
		US 2010-0098716 A1	2010/04/22
		US 2010-0099145 A1	2010/04/22
		US 2013-0224198 A1	2013/08/29
		US 2017-0114110 A1	2017/04/27
		US 2019-0070307 A1	2019/03/07
		US 7625564 B2	2009/12/01
		US 7964375 B2	2011/06/21
		US 8431132 B2	2013/04/30
		US 9375487 B2	2016/06/28
		WO 2007-085084 A1	2007/08/02
		ZA 200805920 B	2009/08/26
KR 10-2015-0113934 A	2015/10/08	AU 2015-242657 A1	2016/10/27
		AU 2015-242657 B2	2020/05/21
		BR 112016022844 A2	2017/10/17
		CA 2944138 A1	2015/10/08
		CN 106488933 A	2017/03/08
		EA 201691795 A1	2017/03/31
		EP 3127923 A1	2017/02/08
		EP 3127923 B1	2021/08/18
		EP 3889185 A2	2021/10/06
		HU 1600621 A2	2017/01/30
		JP 2017-511335 A	2017/04/20
		JP 2020-040983 A	2020/03/19
		JP 2021-167352 A	2021/10/21
		MX 2016012788 A	2016/12/12
		NO 20161667 A	2016/10/19
		NO 20161667 A1	2016/10/19
		PH 12016501937 A1	2017/02/06
		SG 10202107752 A	2021/09/29
		SG 11201608120 A	2016/11/29
		UA 124182 C2	2021/08/04
		US 2017-0128589 A1	2017/05/11
		WO 2015-152618 A1	2015/10/08

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

ZA 201607344 B

2019/04/24