

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2025-0065477
(43) 공개일자 2025년05월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/18 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2023-0150769

(22) 출원일자 2023년11월03일

심사청구일자 2024년09월13일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

정상택

서울특별시 강남구 선릉로69길 20, 112동 702호

김수연

서울특별시 영등포구 선유로 201, 601동 2104호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

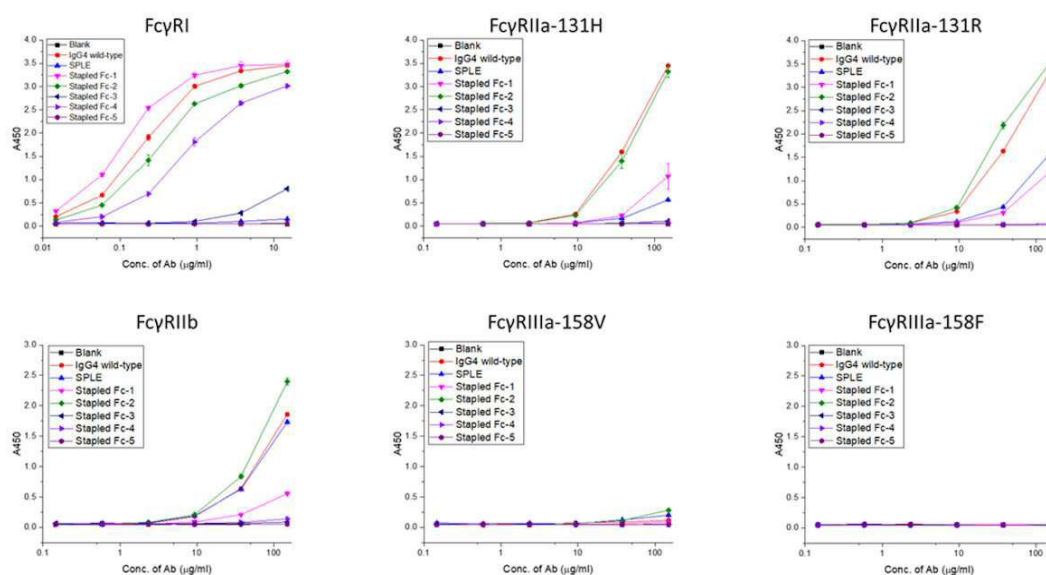
전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 작용기 기능이 제거된 Fab-arm 교환 방지 Fc 변이체들

(57) 요약

본 발명은 Fc γ Rs 및 C1q에 대한 결합력이 제거되어 작용기 기능이 감소된 Fab-arm 교환 방지 Fc 변이체들에 관한 것으로, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체들은 종래의 Fab-arm 교환 방지 변이체와 상이한 신규한 변이체로서, IgG4의 단점인 Fab-arm 교환 현상을 극복하면서 모든 인간 Fc γ Rs와 C1q에 결합하지 않으며, 마우스 및 원숭이 Fc γ Rs에도 결합하지 않고, 우수한 혈중 반감기 및 열 안정성을 가지므로, 치료용 항체 또는 Fc-융합단백질 의약품의 항체 Fc 영역에 의한 면역세포/정상세포 사멸 (독성) 방지 용도로 활용할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/70 (2013.01)
C07K 2319/30 (2013.01)

교우형

서울특별시 양천구 목동동로 130, 1432동 106호

(72) 발명자

조미경

서울특별시 성북구 보국문로 32-3, 다운빌 401호

경문수

경기도 김포시 봉화로 9-13, 103동 502호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711127806
과제번호	2020M3E5E2037775
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명	포유류 세포 디스플레이, 차세대 염기서열분석 및 Fc repertoire 분석을 기반으로
한 치료용 항체의 표적세포	살상 작용 기작 극대화 기반 기술 개발
기 여 율	1/3
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711197258
과제번호	00245059
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	암세포 사멸 효능 향상을 위한 CD89 결합 이중항체 개발 연구
기 여 율	1/3
과제수행기관명	고려대학교산학협력단
연구기간	2023.06.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711098515
과제번호	2019R1A4A1029000
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초연구지원사업 (기초연구실)
연구과제명	면역관문 억제 항체치료 불응암 통합 제어 연구실
기 여 율	1/3
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2019.09.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

야생형(Wild type) 인간 항체 Fc 도메인에서, 카바트 넘버링 시스템(Kabat numbering system)에 따라 넘버링된 231, 232, 234 및 235 위치의 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 위치의 아미노산이 야생형의 아미노산과 다른 서열로 치환된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.

청구항 2

제 1항에 있어서, A231C, P232C, F234C 및 L235C로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.

청구항 3

제 1항에 있어서, 인간 항체는 IgG4인, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.

청구항 4

제 1항에 있어서, 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 Fc 감마 수용체(Fc γ Rs)와의 결합력이 감소된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.

청구항 5

제 4항에 있어서, 인간, 마우스 또는 원숭이 Fc 감마 수용체(Fc γ Rs)인, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.

청구항 6

제 1항에 있어서, 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 C1q와의 결합력이 감소된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.

청구항 7

제 1항에 있어서, 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 작용기 기능(effector function)이 감소된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.

청구항 8

제 7항에 있어서, 작용기 기능은 C1q-결합, 보체 활성화, 보체 의존적 세포독성(complement dependent cytotoxicity, CDC), 항체-의존적 세포-매개된 세포독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC), Fc-감마 수용체 결합을 포함하는 Fc-수용체 결합, 단백질 A-결합, 단백질 G-결합, 항체-의존적 세포성 포식작용(antibody-dependent cell-mediated phagocytosis, ADCP), 보체-의존적 세포성 세포독성(complement dependent cell-mediated cytotoxicity, CDCC), 보체-증강 세포독성, 옵소닌화, Fc-함유 폴리펩티드 내재화, 표적 하향조절, ADC 흡수, 아포토시스의 유도, 세포 사멸, 세포 주기 정지, 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 Fc-매개된 작용기 기능인, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.

청구항 9

제 1항에 있어서, 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 열 안정성이 증가된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.

청구항 10

제 1항에 있어서, 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 생체 내 반감기(Half-life)가 증가된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.

청구항 11

제 1항의 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 포함하는, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 12

제 11항에 있어서, 야생형 인간 항체에 비해 Fc 감마 수용체(Fc γ Rs)와의 결합력이 감소된, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 13

제 11항에 있어서, 야생형 인간 항체에 비해 C1q와의 결합력이 감소된, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 14

제 11항에 있어서, 야생형 인간 항체에 비해 작용기 기능이 감소된, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 15

제 11항에 있어서, 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 미니바디(minibody), 도메인 항체, 이중특이적 항체(bispecific antibody), IgG 유사 이중특이항체, 면역세포 유도 이중 항체(Bispecific immune cell engager), 항체 모방체, 키메라 항체, 항체 접합체(conjugate), 인간항체, 인간화 항체(humanized antibody), 이가(bivalent) 항체 또는 양특이성 분자인, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 16

제 1항의 인간 항체 Fc 도메인 변이체, 제 11항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산 분자.

청구항 17

제 1항의 인간 항체 Fc 도메인 변이체와 단백질 치료제가 융합된, Fc-융합 단백질.

청구항 18

제 17항에 있어서, 단백질 치료제는 T-세포 조절 폴리펩타이드(T-cell modulatory polypeptide: TMP)인, 면역관문 단백질 또는 면역효능세포 특이적 표적분자, 면역관문억제 항체(Immune checkpoint inhibitor antibody), 면역세포 결합 이중 항체(Bispecific Immune cell engaging bispecific antibody), 작용제 항체 (agonist antibody) 또는 길항제 항체 (antagonist antibody)인, Fc-융합 단백질.

청구항 19

제 18항에 있어서, 면역관문 단백질은 CD27, CD28, CD40, CD122, CD96, CD73, CD47, OX40, GITR, CSF1R, JAK, PI3K 델타, PI3K 감마, TAM, 알기나제, CD137, ICOS, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, LAG3, TIM3, VISTA, CD96, TIGIT, CD122, PD-1, PD-L1 또는 PD-L2인, Fc-융합 단백질.

청구항 20

제 18항에 있어서, 면역관문억제 항체는 아테졸리주맙(atezolizumab), 아벨루맙(avelumab), 더발루맙(durvalumab), 이필리무맙(ipilimumab), IPH4102, IPH43, IPH33, 리틸루맙(lirimumab), 모날리주맙(monalizumab), 니볼루맙(nivolumab), 펌브롤리주맙(pembrolizumab), 및 이들의 유도체 또는 기능성 유사물인, Fc-융합 단백질.

청구항 21

제 11항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 및 약물 모이어티를 포함하는, 항체 치료제.

청구항 22

제 21항에 있어서, 약물 모이어티는, 면역조절 약물(immunomodulatory drug: IMiD), 면역원성 세포사멸 유도제,

마이크로튜불린(microtubulin) 구조 형성 억제제, 유사분열(meiosis) 억제제, 토포아이소머라아제(topoisomerase) 억제제, DNA 인터칼레이터(DNA intercalators), 독소(toxin), 키메라 항원 수용체(CAR) 세포 치료제, 종양세포붕괴성 약물(oncolytic drug), 면역요법제, 세포 독성제, 혈관신생 억제제, 키나아제 억제제, 공자극 분자 차단제, 부착 분자 차단제, 항-사이토카인 제제, 항-CTLA-4 제제, 항-PD-1 제제, 항-PD-L1 제제, 항-PD-L2 제제, TNF- α 교차-결합 제제, TRAIL 교차-결합 제제, 항-CD27 제제, 항-CD30 제제, 항-CD40 제제, 항-4-1BB 제제, 항-GITR 제제, 항-OX40 제제, 항-TRAILR1 제제, 항-TRAILR2 제제, 타그레틴, 인터페론-알파, 클로베타솔, 페그 인터페론, 프레드니손, 로미렙신, 백사로텐, 메토틱세이트, 트리암시놀론 크림, 항-케모카인, 보리노스타트, 가바펜틴, 사이클로스포린, 라파마이신, FK506, 검출 가능한 표지 또는 리포터, TNF 길항제, 항류마티스제, 근육 이완제, 마약, 비스테로이드성 항염증제(NSAID: non-steroid anti-inflammatory drug), 진통제, 마취제, 진정제, 국소 마취제, 신경근 차단제, 항균제, 건선 치료제, 코르티코스테로이드, 단백 동화 스테로이드, 에리트르포이에틴, 면역화, 면역글로불린, 면역 억제제, 성장 호르몬, 호르몬 대체 약물, 방사성 의약품, 항우울제, 정신병 치료제, 각성제, 천식약, 베타 아고니스트, 흡입 스테로이드, 에피네프린 또는 이의 유사체, 사이토카인, 사이토카인 길항제, PD-1 길항제, 아테노신 A2AR 길항제, CD73 저해제, CTLA-4 저해제, TIM-3 저해제, LAG-3 저해제, 안트라사이클린 또는 이들의 임의의 조합인, 항체 치료제.

청구항 23

제 21항에 있어서, 감소된 작용기 기능을 갖는 항체 치료제.

청구항 24

제 1항의 인간 항체 Fc 도메인 변이체, 제 11항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 제 17항의 Fc-융합 단백질, 또는 제 21항의 항체 치료제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 25

- 제 1항의 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및
- 숙주세포에 의해 발현된 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체의 제조방법.

청구항 26

- 제 11항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및
- 숙주세포로부터 발현된 항체를 정제하는 단계를 포함하는 작용기 기능이 감소된 항체의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 Fc γ Rs 및 C1q에 대한 결합력이 제거되어 작용기 기능이 감소된 Fab-arm 교환 방지 Fc 변이체들에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 단백질 치료제들은 질병 타겟들에 아주 높은 특이성과 낮은 부작용과 독성을 보이기 때문에 비특이적인 저분자 화합물 치료제들을 아주 빠른 속도로 대체하여 임상에서 널리 이용되고 있으며, 현재 임상에 이용되고 있는 단백질 치료제들 중 항체 치료제들과 항체 Fc 영역을 융합된 Fc-융합 단백질 치료제들이 주종을 이루고 있다. 치료용 항체는 기존의 저분자 약물에 비해 타겟에 매우 높은 특이성을 보이며, 생체 독성이 낮고 부작용이 적을 뿐만 아니라, 약 3주의 우수한 혈중 반감기를 가지기 때문에 가장 효과적인 암 치료방법 중의 하나로 여겨지고 있다. 실제로 전 세계의 거대 제약회사들과 연구소들에서 암 발병 원인인자를 비롯한 암세포에 특이적으로 결합하여 효과적으로 제거하는 치료용 항체의 연구 개발에 박차를 가하고 있다. 치료용 항체 의약품 개발 기업으로는 로슈, 암젠, 존슨앤존슨, 애보트, 비엠에스 등의 제약 기업이 주를 이루고 있으며, 특히 로슈는 항암 치료

목적의 허셉틴 (Herceptin), 아바스틴 (Avastin), 리투산 (Rituxan) 등이 대표적 상품으로 이 세 가지 치료용 항체로 2012년 세계시장에서 약 195억 달러의 매출을 달성하는 등 큰 이윤을 창출하고 있을 뿐 아니라, 세계의 항체 의약품 시장을 이끌고 있다. 레미케이드(Remicade)를 개발한 존슨앤존슨 역시 매출의 증가로 세계 항체 시장에서 빠르게 성장해나가고 있으며, 애보트와 비엠에스 등의 제약 기업 역시 개발 막바지 단계의 치료용 항체를 다수 보유하고 있는 것으로 알려져 있다. 이에 따른 결과로 저분자 의약품이 주도권을 가지고 있던 세계 제약 시장에서 질병 타깃에 특이적이고 부작용이 낮은 치료용 항체를 포함한 바이오 의약품이 빠르게 그 자리를 대체해 나가고 있다. 항체는 체액성 및 세포성 면역계 사이의 연결고리를 제공하며, 항체의 Fab 영역이 항원을 인식하는 반면, Fc 도메인 부분은 모든 면역 적격 세포에 의해 차별적으로 발현되는 세포 상의 항체(면역글로불린)에 대한 수용체 (Fc 수용체 또는 FcR)에 결합하며, 결합하는 면역세포 표면에 발현된 Fc γ R의 종류에 따라 다른 기작을 가진다. 항체 Fc 영역 상의 Fc 수용체 결합 부위가 세포 상의 Fc 수용체 (FcR)에 결합함으로써 Fc 영역을 통해 항체가 세포 표면 상의 Fc 수용체에 결합하면 항체-코팅 입자의 포식 및 파괴, 면역 복합체의 제거, 살세포에 의한 항체-코팅 표적 세포의 용해 (항체-의존적 세포-매개 세포독성, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity 또는 ADCC), 염증 매개체의 방출, 태반 이동 및 면역글로불린 생성의 제어를 포함하여 중요하고도 다양한 여러 생물학적 반응을 촉발한다 (Deo, Y.M. et al., Immunol. Today 18(3):127-135 (1997)). 이와 같이, Fc 도메인은 면역세포의 모집과 ADCC(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) 및 ADCP(antibody-dependent cell-mediated phagocytosis)에 결정적인 역할을 하며, 특히, 항체의 작용기 기능 (effector function)인 ADCC 및 ADCP 기능은 많은 세포의 표면에 존재하는 Fc 수용체와의 상호작용에 의존한다. 사람의 Fc 수용체는 5가지로 분류되며, 항체가 어떠한 Fc 수용체에 결합되는지에 따라 모집되는 면역세포의 종류가 결정된다. 예를 들어, 항체의 Fc 도메인이 Fc γ RIIIa와 결합하여 ADCC, Fc γ RI 또는 Fc γ RIIa와 결합하여 ADCP, 그리고 C1q와 결합하여 CDC(complement dependent cytotoxicity)의 작용기 기능을 유발하여 Fab 영역에 결합한 표적 항원으로 독성을 가짐으로써 치료용 항체의 주요한 치료 효과를 담당한다.

[0003] 그러나, 치료학적 맥락에서, 항체의 작용기 기능은 종종 바람직하지 않으며, 숙주 면역 방어를 활성화시킴으로써 안전성 문제 및 원치 않는 부작용을 일으킬 수 있다. 이의 예로, 면역세포와 결합하는 면역관문억제제 (Immune checkpoint inhibitor), 면역세포 유도 이중 항체(Bispecific immune cell engager)와 같은 일부 치료용 항체들은 표적하고 있는 면역세포로 면역 작용기작이 나타나 면역세포가 파괴되는 부작용을 가지는 문제가 있어왔다. T-세포와 같이 면역세포 표면에 발현된 면역관문 단백질에 표적하는 면역관문억제제는 Fc 매개 면역 작용기작으로 인해 면역 반응 활성화로 암세포를 제거해야 할 면역세포가 파괴되는 부작용을 가져 항체의 본래 효과를 낮추는 단점이 있다. 또한 Fc γ R들 중 면역세포 활성화 저해 수용체(Fc γ RIIb)는 T-세포에 발현되고, 항체 Fc와의 상호작용으로 면역관문억제 항체의 효능을 감소시킨다는 사실이 보고되어 (Bennion et al., Sci Transl Med., 2023), 면역세포 표면과 Fc γ R의 항체 Fc와의 상호작용은 면역관문 항체의 부작용 발생뿐만 아니라 효능 감소에도 관여하는 것이 알려져 있다. 또한, 한쪽에는 암세포 표면의 항원과 결합하고, 다른 한쪽은 면역세포와 결합하는 항체 치료제로 면역세포를 암세포로 이끌어서 보다 효과적으로 암세포가 제거할 수 있도록 작용하는 항체 치료제인 면역세포 유도 이중 항체는 해당 항체에 Fc 매개 면역 작용기작이 존재할 경우 면역세포가 파괴되어 암세포를 효과적으로 제거하지 못하여 부작용이 나타난다. 또한, 표적 세포에 결합하여 세포의 활성화를 유도하는 작용제 항체나 표적 항원과 리간드의 상호작용을 막는 길항제 항체도 Fc 매개 면역 작용기작으로 인해 표적 세포 및 항원에 독성을 가지게 되어 항체의 본래 효과를 낮추는 문제점이 있다. 아울러, 치료용 또는 진단, 연구용 목적에 따라 단백질이나 화합물과 같은 활성 물질의 반감기를 증가시키고자 Fc 영역을 융합한 Fc-융합 단백질을 개발할 때 Fc 매개 면역 작용기작으로 인한 독성이 나타나는 문제가 있다.

[0004] 따라서, 항체의 면역 작용기작으로 인한 항체의 목표에서 벗어난 독성(off-target toxicity)을 막고 효과적인 항체 치료 효과를 가지기 위해서는 Fc 매개 면역 작용기작이 제거되는 것이 필수적이다. 이를 위해 항체를 개발할 때 인간 IgG 하위분류 중 Fc γ R와 가장 결합력이 낮아 매우 낮은 면역 작용기작을 가지는 IgG2 항체가 고려되나, IgG2 항체는 힌지(hinge) 영역의 이황화 결합 교환(exchange)으로 인해 여러 아이소타입(isotype)들이 존재하고, 안정성 감소로 인한 응집(aggregation)이 발생하는 물성 문제가 존재하므로, 그 다음으로 결합력이 낮은 IgG4 항체가 고려되어 현재 임상 개발에 사용 중이다. 이와 관련하여, T-세포에 발현된 면역관문 단백질 PD-1(Programmed cell death-1)을 표적 하는 항-PD-1 항체 (Merck & Co.사의 pembrolizumab(Keytruda), Bristol-Myers Squibb사의 nivolumab(Opdivo), Regeneron사의 cemiplimab(Libtayo))는 모두 인간 IgG4 항체 형태로 FDA 승인을 받아 임상에서 많은 수요를 통해 사용되고 있으며, 펌브로리주맵(pembrolizumab)은 다양한 암 종류에 대해 임상 허가를 받아 2020년 기준 전 세계 의약품 매출 2위로 143억 달러의 매출을 냈고, 니볼루맵(nivolumab)은 8위로 79억 달러의 매출을 냈다. 하지만, IgG4 항체도 모든 Fc γ Rs에 대해 결합력을 가지며, 특히 Fc γ RI에 대해 수 nM의 강한 결합력을 가지고 있어 다양한 면역 작용기작이 활성화되는 문제가 있어, 항체의 면역 작용기

작으로 인해 표적 세포가 파괴되는 것을 방지하기 위해 Fc γ Rs에 대한 결합력이 제거된 Fc를 제작하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 또한, 야생형 인간 IgG4는 CH₂ 영역인 228번째 아미노산이 인간 IgG1과 다르게 세린(serine)으로 존재하고, 유연한 코어 힌지(core hinge)를 통해 사슬 내(intrachain) 이황화 결합이 형성되어 비-공유적(non-covalent) 연결로 인한 half-항체가 생성된다. 이렇게 half-항체 형태로 존재하는 IgG4는 서로 다른 항원을 표적하는 2개의 IgG4의 half-항체 형태가 합쳐지는 Fab-arm 교환(Fab-arm exchange, FAE) 현상이 나타나므로, 이를 방지하기 위해 IgG4의 228번째 아미노산을 인간 IgG1의 228번째 아미노산인 프롤린(proline)으로 치환하면 힌지 영역이 안정화되어 Fab-arm 교환이 나타나지 않아, 해당 S228P 변이체는 IgG4 임상 항체에 범용적으로 적용되어 개발되고 있다. 그러나, 이와 같은 종래의 S228P 변이체는 야생형 IgG4와 동일한 Fc γ Rs 결합력을 가지고 있어 여전히 면역세포 사멸 부작용/정상세포에 목표에서 벗어난 독성(off-target toxicity) 유발 문제를 가진다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명의 목적은 신규한 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 제공하는 것이다.
- [0006] 또한, 본 발명의 목적은 작용기 기능이 감소된 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 제공하는 것이다.
- [0007] 또한, 본 발명의 목적은 Fc-융합 단백질을 제공하는 것이다.
- [0008] 또한, 본 발명의 목적은 항체 치료제를 제공하는 것이다.
- [0009] 또한, 본 발명의 목적은 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 또한, 본 발명의 목적은 인간 항체 Fc 도메인 변이체의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 아울러, 본 발명의 목적은 작용기 기능이 감소된 항체의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 작용기 기능이 감소된 신규한 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 신규한 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 인간 항체 Fc 도메인 변이체와 단백질 치료제가 융합된 Fc-융합 단백질을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 및 약물 모이어티를 포함하는 항체 치료제를 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 인간 항체 Fc 도메인 변이체, 상기항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 상기 항체 치료제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 인간 항체 Fc 도메인 변이체의 제조방법을 제공한다.
- [0018] 아울러, 본 발명은 작용기 기능이 감소된 항체의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체들은 종래의 Fab-arm 교환 방지 변이체와 상이한 신규한 변이체로서, IgG4의 단점인 Fab-arm 교환 현상을 극복하면서 모든 인간 Fc γ Rs와 C1q에 결합하지 않으며, 마우스 및 원숭이 Fc γ Rs에도 결합하지 않고, 우수한 혈중 반감기 및 열 안정성을 가지므로, 치료용 항체 또는 Fc-융합단백질의 약품의 항체 Fc 영역에 의한 면역세포/정상세포 사멸(독성) 방지 용도로 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 Fab-arm 교환 방지, Fc γ Rs 및 C1q 결합력 제거 당화 Fc 변이체들(Stapled Fc-1, Stapled Fc-2, Stapled Fc-3, Stapled Fc-4, Stapled Fc-5)을 정제한 후 SDS-PAGE 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 정제된 Fc γ RI-GST, Fc γ RIIa-131H-GST, Fc γ RIIa-131R-GST, Fc γ RIIb-GST, Fc γ RIIIa-158V-GST 및 Fc γ RIIIa-158F-GST의 발현 및 정제 후 SDS-PAGE 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 당화 펩티도그래피 Fc 변이체들의 Fc γ RI, Fc γ RIIa-131H, Fc γ RIIa-131R, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa-158V 및 Fc γ RIIIa-158F에 대한 결합력을 ELISA로 분석한 결과이다.

도 4는 정제된 마우스 Fc γ RI-GST, 마우스 Fc γ RIIb-GST, 마우스 Fc γ RIII-GST 및 마우스 Fc γ RIV-GST의 발현 및 정제 후 SDS-PAGE 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 당화 펩티도그래피 Fc 변이체들의 마우스 Fc γ RI, 마우스 Fc γ RIIb, 마우스 Fc γ RIII 및 마우스 Fc γ RIV에 대한 결합력을 ELISA로 분석한 결과이다.

도 6은 정제된 시노물구스 원숭이 Fc γ RI-GST, 시노물구스 원숭이 Fc γ RIIa-GST, 시노물구스 원숭이 Fc γ RIIb-GST 및 시노물구스 원숭이 Fc γ RIII-GST의 발현 및 정제 후 SDS-PAGE 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 당화 펩티도그래피 Fc 변이체들의 시노물구스 원숭이 Fc γ RI, 시노물구스 원숭이 Fc γ RIIa, 시노물구스 원숭이 Fc γ RIIb 및 시노물구스 원숭이 Fc γ RIII에 대한 결합력을 ELISA로 분석한 결과이다.

도 8은 본 발명의 당화 펩티도그래피 Fc 변이체들의 C1q 결합력을 ELISA로 분석한 결과이다.

도 9는 정제된 FcRn-GST의 발현 및 정제 후 SDS-PAGE 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 본 발명의 당화 펩티도그래피 Fc 변이체들의 pH-의존적 FcRn 결합력을 ELISA로 분석한 결과이다.

도 11은 인간 FcRn 발현 마우스에서 본 발명의 당화 펩티도그래피 Fc 변이체들의 혈중 반감기를 *in vivo* 분석한 결과이다.

도 12는 본 발명의 당화 펩티도그래피 Fc 변이체들의 열 안정성을 DSF로 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0022] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0023] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 통합된다.

[0024] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib(α -아미노이소부티르산), Sar(N-methylglycine) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 발명에서 약어로 언급된 아미노산은 하기와 같이 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다:

[0025] 알라닌: A, 아르기닌: R, 아스파라긴: N, 아스파르트산: D, 시스테인: C, 글루탐산: E, 글루타민: Q, 글리신: G, 히스티딘: H, 이소류신: I, 류신: L, 리신: K, 메티오닌: M, 페닐알라닌: F, 프롤린: P, 세린: S, 트레오닌: T, 트립토판: W, 티로신: Y 및 발린: V.

[0027] 일 측면에서, 본 발명은 야생형(Wild type) 인간 항체 Fc 도메인에서, 카밧 넘버링 시스템(Kabat numbering system)에 따라 넘버링된 231, 232, 234 및 235 위치의 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나

이상의 위치의 아미노산이 야생형의 아미노산과 다른 서열로 치환된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체에 관한 것이다.

- [0028] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 A231C, P232C, F234C 및 L235C로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [0029] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 A231C의 아미노산 치환을 포함하는 인간 항체 Fc 도메인 변이체 Stapled Fc-1일 수 있으며, 상기 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 서열번호 2의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [0030] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 P232C의 아미노산 치환을 포함하는 인간 항체 Fc 도메인 변이체 Stapled Fc-2일 수 있으며, 상기 변이체는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 서열번호 4의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [0031] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 F234C의 아미노산 치환을 포함하는 인간 항체 Fc 도메인 변이체 Stapled Fc-4일 수 있으며, 상기 변이체는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 서열번호 6의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [0032] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 L235C의 아미노산 치환을 포함하는 인간 항체 Fc 도메인 변이체 Stapled Fc-5일 수 있으며, 상기 변이체는 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 서열번호 8의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [0033] 일 구현예에서, 인간 항체 (면역글로불린)는 IgA, IgM, IgE, IgD 또는 IgG, 또는 이들의 변형일 수 있으며, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4일 수 있고, IgG4인 것이 더욱 바람직하다.
- [0034] 일 구현예에서, 인간 항체 (면역글로불린)는 IgG4 또는 이들의 변형일 수 있으며, 항-PD 항체 또는 켈브로리주 맵인 것이 더욱 바람직하다.
- [0035] 일 구현예에서, 인간 항체 (면역글로불린)는 IgG4 또는 이의 변형일 수 있으며, hinge, CH2 및 CH3를 포함하는 야생형 IgG4의 Fc 도메인은 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 서열번호 10의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [0036] 본 발명에서, 상기 서열번호 9의 인간 항체 IgG4는 야생형 IgG4의 전체 서열 중 Fc 도메인, 즉, hinge (서열번호 9의 1 내지 12번째 아미노산), CH2 (서열번호 9의 13 내지 122번째 아미노산) 및 CH3 (서열번호 9의 123 내지 229번째 아미노산)를 포함하며, 상기 변이체들은 야생형 IgG4의 CH2의 아미노산이 치환된 변이체이다. 예를 들어, 서열번호 9의 아미노산에서 17번째 아미노산 L이 카밧 넘버링 시스템(Kabat numbering system)에 따라 넘버링되면 235번째 아미노산이며, 이는 Stapled Fc-5 (L235C) 변이체에서 C로 치환된다.
- [0037] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 Fc 감마 수용체 (Fc γ Rs)와의 결합력이 감소할 수 있으며, 상기 Fc 감마 수용체는 인간, 마우스(mouse) 또는 원숭이 Fc 감마 수용체(Fc γ Rs)일 수 있고, Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIII, Fc γ RIIIa 또는 Fc γ RIV일 수 있다.
- [0038] 일 구현예에서, 상기 인간 Fc γ R는 Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb 또는 Fc γ RIIIa일 수 있으며, 상기 Fc γ RIIa는 Fc γ RIIa-131H 또는 Fc γ RIIa-131R일 수 있고, 상기 Fc γ RIIIa는 Fc γ RIIIa-158V 또는 Fc γ RIIIa-158F일 수 있으며; 마우스 Fc γ R는 마우스 Fc γ RI, 마우스 Fc γ RIIb, 마우스 Fc γ RIII 또는 마우스 Fc γ IV일 수 있으며; 및 원숭이 Fc γ R는 시노몰구스 원숭이 Fc γ RIIa, 시노몰구스 원숭이 Fc γ RIIb 또는 원숭이 Fc γ RIII일 수 있다.
- [0039] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 C1q와의 결합력이 감소할 수 있다.
- [0040] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 작용기 기능(effector function)이 감소할 수 있다.
- [0041] 일 구현예에서, 작용기 기능은 C1q-결합, 보체 활성화, 보체 의존적 세포독성(complement dependent cytotoxicity, CDC), 항체-의존적 세포-매개된 세포독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC), Fc-감마 수용체 결합을 포함하는 Fc-수용체 결합, 단백질 A-결합, 단백질 G-결합, 항체-의존적 세포성 포식작용(antibody-dependent cell-mediated phagocytosis, ADCP), 보체-의존적 세포성 세포독성(complement dependent cell-mediated cytotoxicity, CDCC), 보체-중강 세포독성, 옴소닌화, Fc-함유 폴리펩티드 내재화, 표적 하향조절, ADC 흡수, 아포토시스의 유도, 세포 사멸, 세포 주기 정지, 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 Fc-매

개된 작용기 기능일 수 있으며, ADCC 또는 CDC인 것이 바람직하다.

- [0042] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 열 안정성이 증가할 수 있다.
- [0043] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 생체 내 반감기(Half-life)가 증가할 수 있다.
- [0044] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체의 반감기는 야생형 인간 항체 Fc 도메인과 비교하여 3% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 100% 이상 증가되거나, 야생형 Fc 도메인 보다 2배 이상, 3배 이상, 4배 이상, 5배 이상, 6배 이상, 7배 이상, 8배 이상, 9배 이상 또는 10배 이상 증가될 수 있다.
- [0045] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 pH 5.6 내지 6.5에서 FcRn에 높은 결합 친화력을 가질 수 있으며, 엔도솜 내 약산성 조건일 수 있고, pH 5.8 내지 6.0일 수 있다. 본 발명의 pH 감응성 Fc 변이체는 상기 pH 범위에서 FcRn에 대한 결합 친화도가 야생형 Fc 도메인과 비교하여 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 100% 이상 증가되거나, 야생형 Fc 도메인 보다 2배 이상, 3배 이상, 4배 이상, 5배 이상, 6배 이상, 7배 이상, 8배 이상, 9배 이상, 10배 이상, 20배 이상, 30배 이상, 40배 이상, 50배 이상, 60배 이상, 70배 이상, 80배 이상, 90배 이상 또는 100배 이상 증가일 구현예에서, 본 발명의 Fc 변이체는 pH 7.0 내지 7.8에서 야생형 면역글로불린 Fc 영역에 비해 FcRn에 낮은 결합 친화력을 나타낼 수 있으며, 혈액의 정상 pH 범위일 수 있고, pH 7.2 내지 7.6일 수 있다. 본 발명의 Fc 변이체는 상기 pH 범위에서 FcRn에서 해리(dissociation)되는 정도가 야생형 Fc 도메인과 비교하여 동일하거나 실질적으로 변화되지 않을 수 있다. 될 수 있다.
- [0046] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체들은 결합하는 세포를 사멸시키지 않기 위한 목적에 이용될 수 있다.
- [0047] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체들은 면역세포 혹은 정상세포를 표적화하는 항체에 적용할 수 있다.
- [0048] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체들은 면역관문억제 항체(Immune checkpoint inhibitor antibody) 또는 면역세포 유도 이중 항체(Bispecific Immune cell engaging bispecific antibody)에 사용될 수 있다.
- [0049] 본 발명에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 영역에서 아미노산의 변이를 포함하는 변이체는 모 항체 Fc 영역을 구성하는 아미노산 변형에 따라 정의되고, 통상의 항체 넘버링은 카밧에 의한 EU 인덱스에 따른다 (Kabat et al., Sequence of proteins of immunological interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, 1991).
- [0050] 본 발명에서 사용된, 용어 "Fc 도메인 변이체"는 "Fc 변이체"와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0051] 본 발명에서 사용된, 용어 "야생형 (wild-type) 폴리펩타이드"는 후에 변형되어 유도체를 생산하는 비변형 폴리펩타이드를 의미한다. 야생형 폴리펩타이드는 자연에서 발견되는 폴리펩타이드 또는 자연에서 발견되는 폴리펩타이드의 유도체 또는 조작된 것일 수 있다. 야생형 폴리펩타이드는 폴리펩타이드 그 자체, 상기 야생형 폴리펩타이드를 포함하는 조성물, 또는 이를 코딩하는 아미노산 서열을 언급하는 것일 수 있다. 따라서, 본 발명에서 사용된 용어 "야생형 항체"는 아미노산 잔기가 변형되어 유도체를 생성하게 되는 비변형된 항체 폴리펩타이드를 의미한다. 상기 용어와 호환적으로, 아미노산 변형이 도입되어 유도체를 생성하게 되는 비변형된 항체 폴리펩타이드를 의미하는 "모(parent) 항체"이 사용될 수 있다.
- [0052] 본 발명에서 사용된, 용어 "아미노산 변형/변이"는 폴리펩타이드 서열의 아미노산의 치환, 삽입 및/또는 결실, 바람직하게는 치환을 의미한다. 본 발명에서 사용된, 용어 "아미노산 치환" 또는 "치환"은 야생형 인간 항체 Fc 도메인의 폴리펩타이드 서열의 특정 위치에서의 아미노산이 다른 아미노산으로 대체되는 것을 의미한다. 예를 들면, A231C 치환을 포함하는 Fc 변이체는 야생형 항체의 Fc 도메인의 아미노산 서열에서 231번째 아미노산 잔기인 알라닌이 시스테인으로 대체된 것을 의미한다.
- [0053] 본 명세서에 사용된 용어 "Fc 변이체"는 야생형 항체 Fc 도메인과 비교하여 하나 이상의 아미노산 잔기의 변형을 포함하는 것을 의미한다.
- [0054] 본 발명의 Fc 변이체는 야생형 항체 Fc 도메인 (영역 또는 단편)과 비교하여 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하며, 그로 인해 아미노산 서열에 있어 차이를 갖는다. 본 발명에 따른 Fc 변이체의 아미노산 서열은 야생형 항

체 Fc 도메인의 아미노산 서열과 실질적으로 상동하다. 예를 들면, 본 발명에 따른 Fc 변이체의 아미노산 서열은 야생형 항체 Fc 도메인의 아미노산 서열과 비교하여 약 80% 이상, 바람직하게는 약 90% 이상, 가장 바람직하게는 약 95% 이상의 상동성을 가질 것이다. 아미노산 변형은 분자생물학적 방법을 사용하여 유전적으로 수행될 수 있거나, 또는 효소적 또는 화학적 방법을 이용하여 수행될 수도 있다.

[0055] 본 발명의 Fc 변이체는 당해 기술분야에 공지된 임의의 방법으로 제조될 수 있다. 일 실시예에서, 본 발명에 따른 인간 항체의 Fc 변이체는 특정 아미노산 변형을 포함하는 폴리펩타이드 서열을 코딩한 후, 원하는 경우, 숙주세포 내로 클로닝되고, 발현 및 검정되는 핵산 형성에 이용된다. 이를 위한 다양한 방법이 문헌 (Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3rd Ed., Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001; Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons)에 기재되어 있다.

[0056] 본 발명에 따른 Fc 변이체를 코딩하는 핵산은 단백질 발현을 위해 발현벡터에 삽입될 수 있다. 발현벡터는, 통상 조절 또는 제어(regulatory) 서열, 선별마커, 임의의 융합 파트너, 및/또는 추가적 요소와 작동가능하게 연결된, 즉, 기능적 관계에 놓인 단백질을 포함한다. 적절한 상태에서, 핵산으로 형질전환된 숙주세포, 바람직하게는, 본 발명에 따른 Fc 변이체를 코딩하는 핵산 함유 발현벡터를 배양하여 단백질 발현을 유도하는 방법에 의해 본 발명에 따른 Fc 변이체가 생산될 수 있다. 포유류 세포, 박테리아, 곤충 세포, 및 효모를 포함하는 다양한 적절한 숙주세포가 사용될 수 있으나, 이에 제한하는 것은 아니다. 외인성 핵산을 숙주세포에 도입하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 사용되는 숙주세포에 따라 달라질 것이다. 바람직하게는, 생산비가 저렴하여 산업적 이용가치가 높은 대장균을 숙주세포로 하여 본 발명에 따른 Fc 변이체를 생산한다.

[0057] 따라서, 본 발명의 범위에는 Fc 변이체를 코딩하는 핵산이 도입된 숙주세포를 단백질 발현에 적합한 조건 하에서 배양하는 단계; 및 숙주세포로부터 발현된 Fc 변이체를 정제 또는 분리하는 단계를 포함하는 Fc 변이체의 제조방법이 포함된다.

[0058] 본 발명에서 사용된, 용어 "FcRn" 또는 "신생아 Fc 수용체"는 IgG 항체 Fc 영역에 결합하는 단백질을 의미하며, 이는 적어도 부분적으로는 FcRn 유전자에 의해 코딩된다. 상기 FcRn은, 이로 제한하는 것은 아니나, 인간, 마우스, 래트, 토끼 및 원숭이를 포함하는 임의의 유기체 유래일 수 있다. 당해 기술분야에 공지된 바와 같이, 기능적 FcRn 단백질은 종종 경쇄 및 중쇄로 불리는 2개의 폴리펩타이드를 포함한다. 경쇄는 베타-2-마이크로글로불린 (β -2-microglobulin)이며, 중쇄는 FcRn 유전자에 의해 코딩된다. 본 명세서에서 달리 언급되지 않는 한, FcRn 또는 하나의 FcRn 단백질은 FcRn 중쇄와 베타-2-마이크로글로불린의 복합체를 언급하는 것이다.

[0059] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편에 관한 것이다.

[0060] 일 구현예에서, 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 Fc γ Rs에 대한 결합력이 제거되어, 야생형 인간 항체에 비해 Fc 감마 수용체(Fc γ Rs) 또는 C1q와의 결합력이 감소될 수 있다.

[0061] 일 구현예에서, Fc 감마 수용체는 인간, 마우스(mouse) 또는 원숭이 Fc 감마 수용체(Fc γ Rs)일 수 있고, Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIII, Fc γ RIIIa 또는 Fc γ RIV일 수 있다.

[0062] 일 구현예에서, 상기 인간 Fc γ R는 Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb 또는 Fc γ RIIIa일 수 있으며, 상기 Fc γ RIIa는 Fc γ RIIa-131H 또는 Fc γ RIIa-131R일 수 있고, 상기 Fc γ RIIIa는 Fc γ RIIIa-158V 또는 Fc γ RIIIa-158F일 수 있으며; 마우스 Fc γ R는 마우스 Fc γ RI, 마우스 Fc γ RIIb, 마우스 Fc γ RIII 또는 마우스 Fc γ IV일 수 있으며; 및 원숭이 Fc γ R는 시노물구스 원숭이 Fc γ RIIa, 시노물구스 원숭이 Fc γ RIIb 또는 원숭이 Fc γ RIII일 수 있다.

[0063] 일 구현예에서, 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 야생형 인간 항체에 비해 작용기 기능이 감소될 수 있다.

[0064] 일 구현예에서, 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 미니바디(minibody), 도메인 항체, 이중특이적 항체(bispecific antibody), IgG 유사 이중특이항체, 면역세포 유도 이중 항체(Bispecific immune cell engager), 항체 모방체, 키메라 항체, 항체 접합체(conjugate), 인간항체, 인간화 항체(humanized antibody), 이가(bivalent) 항체 또는 양특이성 분자일 수 있으며, 면역학적 활성을 가진 단편은 상기 항체의 Fab, Fd, Fab', dAb, F(ab'), F(ab')₂, scFv(single chain fragment variable), Fv, 단일쇄 항체, Fv 이량체, 상보성 결정 영역 단편 또는 디아바디(diabody)일 수 있다.

[0065] 항체는 당해 기술분야에서 공지된 다양한 방법으로 분리 또는 정제될 수 있다. 표준 정제방법은 크로마토그래피 기술, 전기영동, 면역, 침강, 투석, 여과, 농축, 및 크로마토포커싱(chromatofocusing) 기술을 포함한다. 당해

기술분야에 공지된 바와 같이, 예를 들어 박테리아 단백질 A, G, 및 L과 같은 다양한 천연 단백질이 항체와 결합하며, 상기 단백질은 정제에 이용될 수 있다. 종종, 특정 용합 파트너에 의한 정제가 가능할 수 있다.

[0066] 상기 항체는 전체(whole) 항체 형태일 뿐 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 전체 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄(light chain) 및 2개의 전체 길이의 중쇄(heavy chain)를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합(disulfide bond)으로 연결되어 있다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, 항체 단편의 예는 (i) 경쇄의 가변영역(VL) 및 중쇄의 가변영역(VH)과 경쇄의 불변영역(CL) 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(CH1)으로 이루어진 Fab 단편; (ii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iii) 단일 항체의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (iv) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편(Ward et al., Nature 341:544-546 (1989)); (v) 분리된 CDR 영역; (vi) 2개의 연결된 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (vii) VH 도메인 및 VL 도메인이 항원 결합 부위를 형성하도록 결합시키는 펩타이드 링커에 의해 결합된 단일쇄 Fv 분자(scFv); (viii) 이특이적인 단일쇄 Fv 이량체(PCT/US92/09965) 및 (ix) 유전자 융합에 의해 제작된 다가 또는 다특이적인 단편인 디아바디(diabody) W094/13804 등을 포함한다.

[0067] 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 동물 유래 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 및 이들의 면역학적 활성을 가진 단편으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 상기 항체는 재조합적 또는 합성적으로 생산된 것일 수 있다.

[0068] 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 생체에서 분리된 (생체에 존재하지 않는) 것 또는 비자연적으로 생산(non-naturally occurring)된 것일 수 있으며, 예컨대, 합성적 또는 재조합적으로 생산된 것일 수 있다.

[0069] 본 발명에서 "항체"라 함은, 면역계 내에서 항원의 자극에 의하여 만들어지는 물질을 의미하는 것으로서, 그 종류는 특별히 제한되지 않으며, 자연적 또는 비자연적(예컨대, 합성적 또는 재조합적)으로 얻어질 수 있다. 항체는 생체 외뿐 아니라 생체 내에서도 매우 안정하고 반감기가 길기 때문에 대량 발현 및 생산에 유리하다. 또한, 항체는 본질적으로 다이머(dimer) 구조를 가지므로 접착능(avidity)이 매우 높다. 완전한 항체는 2개의 전장(full length) 경쇄 및 2개의 전장 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합으로 연결되어 있다. 항체의 불변 영역은 중쇄 불변 영역과 경쇄 불변 영역으로 나뉘어지며, 중쇄 불변 영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고, 서브클래스로 감마1(γ 1), 감마2(γ 2), 감마3(γ 3), 감마4(γ 4), 알파1(α 1) 및 알파2(α 2)를 가진다. 경쇄의 불변 영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.

[0070] 본 발명에서 용어, "중쇄(heavy chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위해 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 V_H 및 3개의 불변 영역 도메인 C_H1, C_H2 및 C_H3과 힌지(hinge)를 포함하는 전장 중쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다. 또한, 용어 "경쇄(light chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 V_L 및 불변 영역 도메인 C_L을 포함하는 전장 경쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다.

[0071] 본 발명에서 용어, "Fc 도메인", "Fc 단편" 또는 "Fc 영역"은 Fab 도메인/단편과 함께 항체를 이루며, Fab 도메인/단편은 경쇄의 가변영역(V_L) 및 중쇄의 가변영역(V_H)과, 경쇄의 불변영역(C_L) 및 중쇄의 첫번째 불변 영역(C_H1)으로 이루어지고, Fc 도메인/단편은 중쇄의 두 번째 불변 영역(C_H2) 및 세 번째 불변 영역(C_H3)로 이루어진다.

[0072] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 도메인 변이체, 또는 이를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산분자에 관한 것이다.

[0073] 일 측면에서, 본 발명은 상기 핵산분자를 포함하는 벡터, 상기 벡터를 포함하는 숙주세포에 관한 것이다.

[0074] 본 발명의 핵산분자는 단리된 것이거나 재조합된 것일 수 있으며, 단일쇄 및 이중쇄 형태의 DNA 및 RNA뿐만 아니라 대응하는 상보성 서열이 포함된다. 단리된 핵산은 천연 생성 원천에서 단리된 핵산의 경우, 핵산이 단리된 개체의 게놈에 존재하는 주변 유전 서열로부터 단리된 핵산이다. 주형으로부터 효소적으로 또는 화학적으로 합성된 핵산, 예컨대 PCR 산물, cDNA 분자, 또는 올리고뉴클레오타이드의 경우, 이러한 절차로부터 생성된 핵산이 단리된 핵산분자로 이해될 수 있다. 단리된 핵산분자는 별도 단편의 형태 또는 더 큰 핵산 구축물의 성분으로서의 핵산 분자를 나타낸다. 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 작동가능하게 연결된다. 예를 들면, 전서열 또는 분비 리더(leader)의 DNA는 폴리펩타이드가 분비되기 전의 형태인 전단백질(preprotein)로서 발현되는 경우 폴리펩타이드의 DNA에 작동가능하게 연결되고, 프로모터 또는 인핸서는 폴리펩타이드 서열의 전

사에 영향을 주는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되며, 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 촉진하도록 배치될 때 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로 작동가능하게 연결된 연결된 DNA 서열들이 인접하여 위치함을 의미하며, 분비 리더의 경우 인접하여 동일한 리더 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나 인핸서는 인접하여 위치할 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커를 통상적인 방법에 따라 사용한다.

[0075] 본 발명의 Fc 도메인 변이체, 또는 이를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 단리된 핵산 분자는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 이를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 코딩영역으로부터 발현되는 Fc 도메인 변이체, 또는 이를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고, 코딩영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있으며, 그러한 변형 유전자 역시 본 발명의 범위에 포함됨을 당업자는 잘 이해할 수 있을 것이다. 즉, 본 발명의 핵산 분자는 이와 동등한 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 한, 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 이들 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 이러한 핵산 분자의 서열은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자 또는 RNA(mRNA)분자일 수 있다.

[0076] 본 발명에 따른 본 발명의 Fc 도메인 변이체, 또는 이를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 단리된 핵산 분자는 단백질 발현을 위해 발현벡터에 삽입될 수 있다. 발현벡터는, 통상 조절 또는 제어(regulatory) 서열, 선별마커, 임의의 융합 파트너, 및/또는 추가적 요소와 작동가능하게 연결된, 즉, 기능적 관계에 놓인 단백질을 포함한다. 적절한 상태에서, 핵산으로 형질전환된 숙주세포, 바람직하게는, 본 발명의 Fc 도메인 변이체, 또는 이를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 단리된 핵산 분자 함유 발현벡터를 배양하여 단백질 발현을 유도하는 방법에 의해 본 발명의 Fc 도메인 변이체, 또는 이를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편이 생산될 수 있다. 포유류 세포, 박테리아, 곤충 세포, 및 효모를 포함하는 다양한 적절한 숙주세포가 사용될 수 있으나, 이에 제한하는 것은 아니다. 외인성 핵산을 숙주세포에 도입하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 사용되는 숙주세포에 따라 달라질 것이다. 바람직하게는, 생산비가 저렴하여 산업적 이용가치가 높은 대장균을 숙주세포로 생산할 수 있다.

[0077] 본 발명의 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 상기 시그널 서열에는 숙주가 에شري키아속(*Escherichia* sp.)균인 경우에는 PhoA 시그널 서열, OmpA 시그널 서열 등이, 숙주가 바실러스속(*Bacillus* sp.)균인 경우에는 α -아밀라아제 시그널 서열, 서브틸리신 시그널 서열 등이, 숙주가 효모(yeast)인 경우에는 MF α 시그널 서열, SUC2 시그널 서열 등이, 숙주가 동물세포인 경우에는 인슐린 시그널 서열, α -인터페론 시그널 서열, 항체 분자 시그널 서열 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함할 수 있고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.

[0078] 본 발명에서 용어, "벡터"는 핵산 서열을 복제할 수 있는 세포로의 도입을 위해서 핵산 서열을 삽입할 수 있는 전달체를 의미한다. 핵산 서열은 외생(exogenous) 또는 이종(heterologous)일 수 있다. 벡터로서는 플라스미드, 코즈미드 및 바이러스(예를 들면 박테리오파지)를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 당업자는 표준적인 재조합 기술에 의해 벡터를 구축할 수 있다(Maniatis, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; 및 Ausubel et al., In: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994 등).

[0079] 일 구현예에서, 상기 벡터의 제작 시, 상기 Fc 도메인 변이체, 또는 이를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 생산하고자 하는 숙주세포의 종류에 따라 프로모터(promoter), 종결자(terminator), 인핸서(enhancer) 등과 같은 발현조절 서열, 막 표적화 또는 분비를 위한 서열 등을 적절히 선택하고 목적에 따라 다양하게 조합할 수 있다.

[0080] 본 발명에서, 용어 "발현 벡터"는 전사되는 유전자 산물 중 적어도 일부분을 코딩하는 핵산 서열을 포함한 벡터를 의미한다. 일부의 경우에는 그 후 RNA 분자가 단백질, 폴리펩타이드, 또는 펩타이드로 번역된다. 발현 벡터에는 다양한 조절서열을 포함할 수 있다. 전사 및 번역을 조절하는 조절서열과 함께 벡터 및 발현 벡터에는 또 다른 기능도 제공하는 핵산 서열도 포함될 수 있다.

- [0081] 본 발명에서, 용어 "숙주세포"는 진핵생물 및 원핵생물을 포함하며, 상기 벡터를 복제할 수 있거나 벡터에 의해 코딩되는 유전자를 발현할 수 있는 임의의 형질 전환 가능한 생물을 의미한다. 숙주세포는 상기 벡터에 의해 형질감염(transfected) 또는 형질전환(transformed) 될 수 있으며, 이는 외생의 핵산분자가 숙주세포 내에 전달되거나 도입되는 과정을 의미한다.
- [0082] 일 구현예에서, 상기 숙주 세포는 박테리아 또는 동물세포일 수 있으며, 동물 세포주는 CHO 세포, HEK 세포 또는 NSO 세포일 수 있고, 박테리아는 대장균일 수 있다.
- [0083] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 인간 Fc 도메인 변이체, 또는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편이 화물 분자에 연결된 융합 단백질에 관한 것이다.
- [0084] 일 구현예에서, 화물 분자는 검출제, 치료제, 약물, 펩티드, 성장 인자, 시토카인, 수용체 트랩, 화학 화합물, 탄수화물 모이어티, 효소, 항체 또는 그의 단편, DNA-기재 분자, 바이러스 벡터, 또는 세포독성제; 검출제, 치료제, 약물, 펩티드, 효소, 항체 또는 그의 단편, DNA-기재 분자, 바이러스 벡터, 또는 세포독성제가 로딩된 1종 이상의 리포솜 또는 나노운반체; 또는 1종 이상의 나노입자, 나노와이어, 나노튜브, 또는 양자점일 수 있다.
- [0085] 일 구현예에서, 상기 융합 단백질은 작용제(agonist) 항체, 길항제(antagonist) 항체 또는 항체 치료제일 수 있다.
- [0086] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체와 단백질 치료제가 융합된 Fc-융합 단백질에 관한 것이다.
- [0087] 일 구현예에서, 단백질 치료제는 T-세포 조절 폴리펩타이드(T-cell modulatory polypeptide: TMP)인, 면역관문 단백질 또는 면역효능세포 특이적 표적분자, 면역관문억제 항체(Immune checkpoint inhibitor antibody), 면역세포 결합 이중 항체(Bispecific Immune cell engaging bispecific antibody), 작용제 항체 (agonist antibody) 또는 길항제 항체 (antagonist antibody)일 수 있다.
- [0088] 일 구현예에서, 상기 면역효능세포는 이펙터 T 세포, 조절성 T 세포, 자연 살해 (NK) 세포, 자연 살해 T (NKT) 세포, 수지상 세포 또는 B 세포일 수 있다.
- [0089] 일 구현예에서, 면역관문 단백질은 CD27, CD28, CD40, CD122, CD96, CD73, CD47, OX40, GITR, CSF1R, JAK, PI3K 델타, PI3K 감마, TAM, 알기나제, CD137, ICOS, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, LAG3, TIM3, VISTA, CD96, TIGIT, CD122, PD-1, PD-L1 또는 PD-L2일 수 있다.
- [0090] 일 구현예에서, 면역관문억제 항체는 아테졸리주맙(atezolizumab), 아벨루맙(avelumab), 더발루맙(durvalumab), 이필리무맙(ipilimumab), IPH4102, IPH43, IPH33, 리틸루맙(lirimumab), 모날리주맙(monalizumab), 니볼루맙(nivolumab), 펄브롤리주맙(pembrolizumab), 및 이들의 유도체 또는 기능성 등가물일 수 있다.
- [0091] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 및 약물 모이어티를 포함하는, 항체 치료제
- [0092] 일 구현예에서, 약물 모이어티는, 면역조절 약물(immunomodulatory drug: IMiD), 면역원성 세포사멸 유도제, 마이크로튜불린(microtubulin) 구조 형성 억제제, 유사분열(meiosis) 억제제, 토포아이스오머라아제(topoisomerase) 억제제, DNA 인터칼레이터(DNA intercalators), 독소(toxin), 키메라 항원 수용체(CAR) 세포 치료제, 종양세포붕괴성 약물(oncolytic drug), 면역요법제, 세포 독성제, 혈관신생 억제제, 키나아제 억제제, 공자극 분자 차단제, 부착 분자 차단제, 항-사이토카인 제제, 항-CTLA-4 제제, 항-PD-1 제제, 항-PD-L1 제제, 항-PD-L2 제제, TNF- α 교차-결합 제제, TRAIL 교차-결합 제제, 항-CD27 제제, 항-CD30 제제, 항-CD40 제제, 항-4-1BB 제제, 항-GITR 제제, 항-OX40 제제, 항-TRAILR1 제제, 항-TRAILR2 제제, 타그레틴, 인터페론-알파, 클로베타솔, 페그 인터페론, 프레드니손, 로미덱신, 백사로텐, 메토크세이트, 트리암시놀론 크림, 항-케모카인, 보리노스타트, 가바펜틴, 사이클로스포린, 라파마이신, FK506, 검출 가능한 표지 또는 리포터, TNF 길항제, 항류마티스제, 근육 이완제, 마약, 비스테로이드성 항염증제(NSAID: non-steroid anti-inflammatory drug), 진통제, 마취제, 진정제, 국소 마취제, 신경근 차단제, 항균제, 건선 치료제, 코르티코스테로이드, 단백 동화 스테로이드, 에리트로포이에틴, 면역화, 면역글로불린, 면역 억제제, 성장 호르몬, 호르몬 대체 약물, 방사성 의약품, 항우울제, 정신병 치료제, 각성제, 천식약, 베타 아고니스트, 흡입 스테로이드, 에피네프린 또는 이의 유사체, 사이토카인, 사이토카인 길항제, PD-1 길항제, 아데노신 A2AR 길항제, CD73 저해제, CTLA-4 저해제, TIM-3 저해제, LAG-3 저해제, 안트라사이클린 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다.

- [0093] 일 구현예에서, 상기 항체 치료제는 감소된 작용기 기능을 가질 수 있다.
- [0094] 일 구현예에서, 항체 치료제는 면역관문억제제(Immune checkpoint inhibitor) 또는 면역세포 유도 이중 항체(Bispecific immune cell engager)일 수 있다.
- [0095] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체, 이를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, Fc-융합 단백질 또는 항체 치료제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0096] 일 구현예에서, 암은 뇌종양, 흑색종, 골수종, 비소세포성폐암, 구강암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장 또는 수노관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0097] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 면역원성 세포사멸 유도제를 추가로 포함할 수 있으며, 면역원성 세포사멸 유도제는 안트라사이클린계열 항암제, 탁산 계열 항암제, 항-EGFR 항체, BK 채널 작용제, 보르테조미(Bortezomib), 강심성 배당체(cardiac glycoside), 사이클로포스마이드 계열 항암제, GADD34/PP1 저해제, LV-tSMAC, Measles 바이러스, 블레오마이신(bleomycin), 미토잔트론(mitoxantrone) 또는 옥살리플라틴(oxaliplatin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 안트라사이클린 계열 항암제는 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 이다루비신(idarubicin), 픽산트론(pixantrone), 사바루비신(sabarubicin) 또는 발루비신(valrubicin)일 수 있고, 탁산계열 항암제는 파클리탁셀(paclitaxel) 또는 도세탁셀(docetaxel)일 수 있다.
- [0098] 본 발명의 약학적 조성물은 단독의 요법으로 이용될 수 있으나, 다른 통상적인 생물학적 요법, 화학 요법 또는 방사 요법과 함께 이용될 수도 있으며, 이러한 병행 요법을 실시하는 경우에는 보다 효과적으로 암을 치료할 수 있다.
- [0099] 본 발명의 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 화학적 항암 약물(항암제) 등과 함께 투여함으로써, 암세포의 사멸 효과를 통해 종래의 항암제의 암치료 효과를 증가시킬 수 있다. 병용 투여는 상기 항암제와 동시에 또는 순차적으로 이루어질 수 있다. 상기 항암제의 예시에는 DNA 알킬화제(DNA alkylating agents)로 메클로에타민(mechloethamine), 클로람부칠(chlorambucil), 페닐알라닌(phenylalanine), 무스타드(mustard), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 카르무스틴(carmustine: BCNU), 로무스틴(lomustine: CCNU), 스트렙토조토신(streptozotocin), 부술판(busulfan), 티오테파(thiotepa), 시스플라틴(cisplatin) 및 카보플라틴(carboplatin); 항암 항생제(anti-cancer antibiotics)로 닥티노마이신(dactinomycin: actinomycin D), 플리카마이신(plicamycin) 및 마이토마이신 C(mitomycin C); 및 식물 알칼로이드(plant alkaloids)로 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 에토포시드(etoposide), 테니포시드(teniposide), 토포테칸(topotecan) 및 이리도테칸(iridotecan) 등이 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0100] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 암의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0101] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"란 본 발명의 조성물의 투여로 암세포의 사멸 또는 암의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학 협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.
- [0102] 본 발명에서 유효성분과 결합하여 사용된 "치료학적으로 유효한 양"이란 용어는 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 조성물의 약학적으로 허용가능한 염의 양을 의미하며, 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack Publishing Co.에 기술되어있다.

- [0103] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 암의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0104] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0105] 본 발명의 조성물은 또한 생물학적 체제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0106] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 주사 제형으로 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명에 따른 조성물의 일일 투여량은 0.0001 ~ 10 mg/ml이며, 바람직하게는 0.0001 ~ 5 mg/ml이며, 하루 일 회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0107] 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다.
- [0108] 일 측면에서, 본 발명은 a) 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및 b) 숙주세포에 의해 발현된 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체의 제조방법에 관한 것이다.
- [0109] 일 측면에서, 본 발명은 a) 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및 b) 숙주세포로부터 발현된 항체를 정제하는 단계를 포함하는 작용기 기능이 감소된 항체의 제조방법에 관한 것이다.
- [0110] 일 구현예에서, 항체의 정제는 여과, HPLC, 음이온 교환 또는 양이온 교환, 고속 액체 크로마토그래피(HPLC), 친화도 크로마토그래피, 또는 이들의 조합을 하는 것이 포함될 수 있으며, 바람직하게는 Protein A를 사용하는 친화 크로마토그래피를 이용할 수 있다.
- [0112] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0114] 실시예 1. Fab-arm 교환 방지 및 Fc γ Rs 결합력 제거 Fc 변이체 제작

[0115] 야생형 인간 IgG4의 half-항체 형태가 합쳐지는 Fab-arm 교환 현상을 방지하고, 종래의 S228P Fc 변이체의 독성 유발 문제를 회피하기 위한 Fc γ Rs 및 C1q 결합력 제거 Fc 변이체를 제작하기 위해, 본 발명자의 선행 연구 (특허 출원번호 10-2023-0077425)의 Fc γ Rs 결합력 제거 당화 Fc 변이체 SL001(E233C)에서 시스테인(cystein)을 lower 힌지에 도입하여 다양한 Fab-arm 교환 방지 변이체들을 제작하였다 (표 1).

표 1

Fc variants	Mutations
IgG1 wild-type	-
IgG4 wild-type	-
IgG4-S228P	S228P
IgG4-SPLE	S228P/L235E
Stapled Fc-1	A231C
Stapled Fc-2	P232C
Stapled Fc-3	E233C
Stapled Fc-4	F234C
Stapled Fc-5	L235C

[0116]

[0118] 실시예 2. Fc 변이체 포함 당화 펌브로리주맵 Fc 변이체들의 발현 및 정제

[0119] 상기 실시예 1에서 제작한 당화 Fc 변이체들을 모델항체인 Fab-arm 교환 변이체를 가지지 않는 펌브로리주맵 (pembrolizumab) 중쇄 유전자에 클로닝하여 발현 배터를 제조하였다. 그 후, Freestyle 293 expression 배양액 (Gibco, 12338-018) 3 ml에 변이체들의 중쇄유전자와 경쇄유전자를 1:1의 비율로 먼저 섞고 PEI:변이체유전자 =4:1의 비율로 섞어 상온에서 20 분간 두었다가 전날 2×10^6 cells/ml의 밀도로 계대배양해 놓은 Expi293F 세포에 섞은 뒤, CO₂ 진탕배양기에서 37 °C, 125 rpm 및 8 % CO₂의 조건으로 7일간 배양하고 원심분리하여 상등액만 취하였다. 상등액은 25× PBS로 평형을 맞춘 후 0.2 μm 시린지 필터로 여과하여 준비하였다. 이 후, 펌브로리주맵 Fc 변이체들이 포함된 배양액에 Protein A resin을 넣어 4°C에서 16시간 교반한 후 스핀 다운(spin down)하여 레진을 회수하고 2 ml PBS로 세척한 뒤, 600 μl의 100 mM 글라이신(glycine) (pH 2.7) 버퍼로 용출하였다. 용출액을 200 μl의 1 M Tris-HCl (pH 8.0)을 이용하여 중화하고 Amicon Ultra-4 centrifugal filter units 30K(Merck Millipore, UFC503096)을 사용하여 버퍼를 교환한 뒤, SDS-PAGE 젤 분석을 통해 당화 항체 펌브로리주맵 Fc 변이체들이 높은 순도로 정제되었음을 확인하였으며, 특히, 야생형 IgG4 항체는 half-항체(75 kDa)가 생성된 반면, 본 발명의 당화 펌브로리주맵 Fc 변이체들은 모두 half-항체가 생성되지 않아 Fab-arm 교환이 방지되는 것을 확인하였다 (도 1).

[0121] 실시예 3. 당화 펌브로리주맵 Fc 변이체들의 인간 Fc γ Rs에 대한 결합력 분석

[0122] 3-1. 인간 Fc γ Rs 발현 및 정제

[0123] ELISA를 이용하여 본 발명의 당화 Fc 변이체들의 Fc γ Rs에 대한 결합력을 분석하기 위해, Fc γ RI-GST, Fc γ RIIa-131H-GST, Fc γ RIIa-131R-GST, Fc γ RIIb-GST, Fc γ RIIIa-158V-GST 및 Fc γ RIIIa-158F-GST를 각각 동물세포 발

현용 벡터에 클로닝하고, PEI를 이용해 Expi293F 세포에 트랜스펙션한 뒤, 37℃, 125 rpm, 8% CO₂ 조건에서 7일간 배양하였다. 배양이 끝난 후, 상등액을 회수하여 25× PBS로 평형을 맞추고 anti-GST 친화도 크로마토그래피를 이용하여 각 수용체 단백질을 정제하였다. 이 후, SDS-PAGE 분석을 수행하여 Fc γ RI-GST, Fc γ RIIa-131H-GST, Fc γ RIIa-131R-GST, Fc γ RIIb-GST, Fc γ RIIIa-158V-GST 및 Fc γ RIIIa-158F-GST가 고순도로 정제된 것을 확인하였다 (도 2).

[0125] 3-2. Fc γ Rs에 대한 결합력 분석

[0126] 상기 실시예 2에서 정제한 당화 펩브리주맵 Fc 변이체들의 Fc γ Rs 결합력을 확인하기 위해 ELISA 분석을 진행하였다. 구체적으로, 상기 실시예 3-1에서 정제한 Fc γ Rs-GST (Fc γ RI-GST, Fc γ RIIa-131H-GST, Fc γ RIIa-131R-GST, Fc γ RIIb-GST, Fc γ RIIIa-158V-GST 및 Fc γ RIIIa-158F-GST)를 0.05 M Na₂CO₃ pH 9.6에 4 μ g/ml로 희석하여 각각 50 μ l씩 flat bottom polystyrene high bind 96 well microplate (Costar, 3590)에 4℃에서 16시간 동안 고정화한 후, 100 μ l의 4% 스킵 밀크(skim milk) (GenomicBase, SKI400)로 상온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST 180 μ l로 4회 세척한 뒤 1% 스킵 밀크로 연속 희석된 당화 펩브리주맵 Fc 변이체들을 50 μ l씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 후 HRP-Protein L (GenScript, M00098) 50 μ l을 이용해 상온에서 1시간 동안 항체 반응을 진행하고 다시 세척하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA substrate solution (Thermo Fisher Scientific, 34028)을 50 μ l씩 첨가해 발색한 뒤 2 M H₂SO₄ 50 μ l씩 첨가하여 반응을 종료시킨 다음 Epoch microplate spectrophotometer (BioTek)을 이용해 흡광도를 분석하였다.

[0127] 그 결과, Stapled Fc-1 (A231C) 변이체는 야생형 IgG4 항체에 비해 Fc γ RI를 제외한 모든 Fc γ Rs에 대한 결합력이 감소되었으며, Stapled Fc-2 (P232C) 변이체는 야생형 IgG4 항체와 유사한 Fc γ Rs 결합력을 가지고, Stapled Fc-4 (F234C) 변이체는 Fc γ RI를 제외한 모든 Fc γ Rs에 대한 결합력이 제거된 것으로 나타났다 (도 3). 특히, Stapled Fc-5 (L235C) 변이체는 모든 Fc γ Rs에 대한 결합력이 제거된 것으로 나타났으며, 종래에 임상에서 사용되던 변이체에서 Fab-arm 교환 방지 및 Fc γ Rs 결합력을 낮춘 선행 S228P/L235E 변이체 (SPLE)보다도 현저하게 낮은 Fc γ Rs 결합력을 가지는 것으로 나타났다 (도 3).

[0129] 실시예 4. 당화 펩브리주맵 Fc 변이체들의 마우스 Fc γ Rs에 대한 결합력 분석

[0130] 4-1. 마우스 Fc γ Rs의 발현 및 정제

[0131] ELISA를 이용하여 본 발명의 당화 Fc 변이체들의 전임상 동물 모델로 많이 사용되는 마우스의 Fc γ Rs에 대한 결합력을 분석하기 위해, 마우스 Fc γ RI-GST, 마우스 Fc γ RIIb-GST, 마우스 Fc γ RIII-GST 및 마우스 Fc γ RIV-GST를 각각 동물세포 발현용 벡터에 클로닝하고, PEI를 이용해 Expi293F 세포에 트랜스펙션한 뒤, 37℃, 125 rpm, 8% CO₂ 조건에서 7일간 배양하였다. 배양이 끝난 후, 상등액을 회수하여 1× PBS로 평형을 맞추고 anti-GST 친화도 크로마토그래피를 이용하여 각 수용체 단백질을 정제하였다. 이 후, SDS-PAGE 분석을 수행하여 마우스 Fc γ RI-GST, 마우스 Fc γ RIIb-GST, 마우스 Fc γ RIII-GST 및 마우스 Fc γ RIV-GST가 고순도로 정제된 것을 확인하였다 (도 4).

[0133] 4-2. 마우스 Fc γ Rs에 대한 결합력 분석

[0134] 상기 실시예 2에서 정제한 당화 펩브리주맵 Fc 변이체들의 마우스 Fc γ Rs에 대한 결합력을 확인하기 위해 ELISA 분석을 진행하였다. 구체적으로, 상기 실시예 4-1에서 정제한 마우스 Fc γ RI-GST, 마우스 Fc γ RIIb-GST, 마우스 Fc γ RIII-GST 및 마우스 Fc γ RIV-GST를 0.05 M Na₂CO₃ pH 9.6에 4 μ g/ml로 희석하여 각각 50 μ l씩 flat bottom polystyrene high bind 96 well microplate (Costar, 3590)에 4℃에서 16시간 동안 고정화한 후, 100 μ l의 4% 스킵 밀크(skim milk) (GenomicBase, SKI400)로 상온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST 180 μ l로 4회 세척한 뒤 1% 스킵 밀크로 연속 희석된 당화 펩브리주맵 Fc 변이체들을 50 μ l씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 후 HRP-Protein L (GenScript, M00098) 50 μ l을 이용해 상온에서 1시간 동안 항체 반응을 진행하고 다시 세척하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA substrate solution (Thermo Fisher Scientific, 34028)을 50 μ l씩 첨가해 발색한 뒤 2 M H₂SO₄ 50 μ l씩 첨가하여 반응을 종료시킨 다음

Epoch microplate spectrophotometer (BioTek)을 이용해 흡광도를 분석하였다.

[0135] 그 결과, Stapled Fc-5 (L235C) 변이체는 야생형 IgG4 항체와 종래의 선행 S228P/L235E 변이체 (SPLE)보다 현저하게 낮은 Fc γ Rs 결합력을 가지는 것으로 나타났으며, 특히, 모든 마우스 Fc γ Rs에 대한 결합력이 완전히 제거된 것으로 나타났다 (도 5).

[0137] **실시예 5. 당화 펩브리주맵 Fc 변이체들의 원숭이 Fc γ Rs에 대한 결합력 분석**

[0138] 5-1. 시노몰구스 원숭이 Fc γ Rs의 발현 및 정제

[0139] ELISA를 이용하여 본 발명의 당화 Fc 변이체들의 전임상 동물 모델로 많이 사용되는 시노몰구스 원숭이 (cynomolgus monkey)의 Fc γ Rs에 대한 결합력을 분석하기 위해, 시노몰구스 원숭이 Fc γ RI-GST, 시노몰구스 원숭이 Fc γ RIIa-GST, 시노몰구스 원숭이 Fc γ RIIb-GST 및 시노몰구스 원숭이 Fc γ RIII-GST를 각각 동물세포 발현용 벡터에 클로닝하고, PEI를 이용해 Expi293F 세포에 트랜스펙션한 뒤, 37℃, 125 rpm, 8% CO₂ 조건에서 7일간 배양하였다. 배양이 끝난 후, 상등액을 회수하여 25× PBS로 평형을 맞추고 anti-GST 친화도 크로마토그래피를 이용하여 각 수용체 단백질을 정제하였다. 이 후, SDS-PAGE 분석을 수행하여 시노몰구스 원숭이 Fc γ RI-GST, 시노몰구스 원숭이 Fc γ RIIa-GST, 시노몰구스 원숭이 Fc γ RIIb-GST 및 시노몰구스 원숭이 Fc γ RIII-GST가 고순도로 정제된 것을 확인하였다 (도 6).

[0141] 5-2. 시노몰구스 원숭이 Fc γ Rs에 대한 결합력 분석

[0142] 상기 실시예 2에서 정제한 당화 펩브리주맵 Fc 변이체들의 시노몰구스 원숭이 Fc γ Rs에 대한 결합력을 확인하기 위해 ELISA 분석을 진행하였다. 구체적으로, 상기 실시예 5-1에서 정제한 시노몰구스 원숭이 Fc γ RI-GST, 시노몰구스 원숭이 Fc γ RIIa-GST, 시노몰구스 원숭이 Fc γ RIIb-GST 및 시노몰구스 원숭이 Fc γ RIII-GST를 0.05 M Na₂CO₃ pH 9.6에 4 μg/ml로 희석하여 각각 50 μl씩 flat bottom polystyrene high bind 96 well microplate (Costar, 3590)에 4℃에서 16시간 동안 고정화한 후, 100 μl의 4% 스킵 밀크(skim milk) (GenomicBase, SKI400)로 상온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST 180 μl로 4 회 세척한 뒤 1% 스킵 밀크로 연속 희석된 당화 펩브리주맵 Fc 변이체들을 50 μl씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 후 HRP-Protein L (GenScript, M00098) 50 μl을 이용해 상온에서 1시간 동안 항체 반응을 진행하고 다시 세척하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA substrate solution (Thermo Fisher Scientific, 34028)을 50 μl씩 첨가해 발색한 뒤 2 M H₂SO₄ 50 μl씩 첨가하여 반응을 종료시킨 다음 Epoch microplate spectrophotometer (BioTek)을 이용해 흡광도를 분석하였다.

[0143] 그 결과, Stapled Fc-5 (L235C) 변이체는 야생형 IgG4 항체와 종래의 선행 S228P/L235E 변이체 (SPLE)보다 현저하게 낮은 Fc γ Rs 결합력을 가지는 것으로 나타났으며, 특히, 모든 시노몰구스 원숭이 Fc γ Rs에 대한 결합력이 완전히 제거된 것으로 나타났다 (도 7).

[0145] **실시예 6. 당화 펩브리주맵 Fc 변이체들의 인간 C1q에 대한 결합력 분석**

[0146] 상기 실시예 2에서 정제한 당화 펩브리주맵 Fc 변이체들의 C1q 결합력을 확인하기 위해 ELISA 분석을 수행하였다. 0.05 M Na₂CO₃ (pH 9.6)에 4 μg/ml로 희석한 당화 펩브리주맵 Fc 변이체들을 각각 50 μl씩 flat bottom polystyrene high bind 96 well microplate (Costar, 3590)에 4℃에서 16시간 동안 고정화한 후, 100 μl의 4% 스킵 밀크(skim milk) (GenomicBase, SKI400)로 상온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST 180 μl로 4 회 세척한 뒤 1% 스킵 밀크로 연속 희석된 C1q (Quidel, A400) 단백질을 50 μl씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 후 항-C1q-HRP (Invitrogen, PA1-84324) 50 μl을 이용해 상온에서 1시간 동안 항체 반응을 진행하고 다시 세척하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA substrate solution (Thermo Fisher Scientific, 34028)을 50 μl씩 첨가해 발색한 뒤 2 M H₂SO₄를 50 μl씩 첨가하여 반응을 종료시킨 다음 Epoch microplate spectrophotometer (BioTek)을 이용해 흡광도를 분석하였다.

[0147] 그 결과, 본 발명의 당화 펩트로리주맵 Fc 변이체들 모두 C1q에 대한 결합력이 없는 것으로 나타났다 (도 8).

[0149] 실시예 7. 당화 펩트로리주맵 Fc 변이체들의 생체 내 반감기 분석

[0150] 7-1. 인간 FcRn에 대한 결합력 분석

[0151] 본 발명의 당화 Fc 변이체들의 생체 내 반감기에 관여하는 인간 FcRn에 대한 결합력을 확인하기 위해, pH에 따른 ELISA 분석을 진행하였다. 우선, FcRn-GST를 동물세포 발현용 벡터에 클로닝하여 준비하고, PEI를 이용해 Expi293F 세포에 트랜스펙션한 뒤, 37℃, 125 rpm, 8% CO₂ 조건에서 7일간 배양하였다. 배양이 끝난 후, 상등액을 회수하여 25× PBS로 평형을 맞추고, anti-GST 친화도 크로마토그래피를 이용하여 FcRn-GST를 정제한 뒤, 이의 고순도 정제를 SDS-PAGE 분석으로 확인하였다 (도 9). 또한, 상기 실시예 2에서 정제한 당화 펩트로리주맵 Fc 변이체들을 0.05 M Na₂CO₃ pH 9.6에 4 µg/ml로 희석하여 각각 50 µl씩 flat bottom polystyrene high bind 96 well microplate (Costar, 3590)에 4℃에서 16시간 동안 고정화한 후, 100 µl의 4% 스킴 밀크(skim milk) (GenomicBase, SKI400)로 상온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST 180 µl로 4 회 세척한 뒤, 상기에서 정제한 FcRn-GST를 1% 스킴 밀크 (pH 6.0/pH 7.4)로 각각 연속 희석하여 50 µl씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 후 anti-GST-HRP 컨주게이트(Conjugate) (GE Healthcare, RPN1236V)를 50 µl씩 각 웰에 처리하여 상온에서 1시간 동안 항체 반응을 진행하고 다시 세척하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA substrate solution(Thermo Fisher Scientific, 34028)을 50 µl씩 첨가해 발색한 뒤 2 M H₂SO₄ 50 µl씩 첨가하여 반응을 종료시킨 다음 Epoch microplate spectrophotometer (BioTek)을 이용해 흡광도를 분석하였다.

[0152] 그 결과, 본 발명의 당화 펩트로리주맵 Fc 변이체들 모두 야생형 IgG4 항체의 FcRn 특성을 유지하는 것으로 나타났으며, 특히 Stapled Fc-5 (L235C) 변이체는 야생형 IgG4 항체보다 pH 6.0에서 FcRn에 대해 현저하게 향상된 결합력을 가지는 것으로 나타나 (도 10), 야생형에 비해 반감기가 증가한 것을 확인하였다.

[0154] 7-2. 인간 FcRn 발현 마우스에서의 *in vivo* 반감기 분석

[0155] pH-의존적 인간 FcRn에 대한 결합력이 증가한 것으로 확인된 Stapled Fc-5 (L235C) 변이체와 종래의 변이체 S228P의 *in vivo* 반감기를 비교 분석하기 위해, 인간 FcRn을 가지는 Tg276 암컷 마우스(female mice)를 이용하여 약동학 분석을 수행하였다. 구체적으로, 각 변이체 당 2마리 또는 3마리의 마우스에 5 mg/kg으로 각 변이체를 포함하는 펩트로리주맵을 각각 i.v. 주입한 뒤, 0.5, 24, 168, 336, 504 및 696 시간 후에 각 마우스에서 채혈하고 1000 × g로 15분 동안 원심분리하여 혈청(serum)을 확보하였다. ELISA를 이용하여 혈청 내 항체 농도를 측정하기 위해, 0.05 M Na₂CO₃ pH 9.6에 4 µg/ml로 희석한 HER2-His를 각각 50 µl씩 flat bottom polystyrene high bind 96 well microplate (Costar, 3590)에 4℃에서 16시간 동안 고정화한 후, 100 µl의 4% 스킴 밀크(skim milk) (GenomicBase, SKI400)로 상온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST 180 µl로 4 회 세척한 뒤 각 변이체를 포함하는 펩트로리주맵을 1 µg/ml부터 1% 스킴 밀크로 연속 희석하여 표준 커브 (standard curve)를 만들고, 혈청을 50 µl씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 후 고트 항-인간(goat anti-human) IgG H+L (Jackson Immunoresearch, 109-036-003) 50 µl을 이용해 상온에서 1시간 동안 항체 반응을 진행하고 다시 세척하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA substrate solution (Thermo Fisher Scientific, 34028)을 50 µl씩 첨가해 발색한 뒤 2 M H₂SO₄ 50 µl씩 첨가하여 반응을 종료시킨 다음 Epoch microplate spectrophotometer (BioTek)을 이용해 흡광도를 분석하였다. 항체 농도는 표준 커브(standard curve)로 분석하였다.

[0156] 그 결과, Stapled Fc-5 (L235C) 변이체는 기존에 임상에서 사용되던 Fab-arm 교환 방지 변이체인 S228P보다 높은 혈중 반감기를 가지는 것으로 나타났다 (도 11).

[0158] 실시예 8. 당화 펩트로리주맵 Fc 변이체들의 열 안정성 분석

[0159] 상기 실시예 2에서 정제한 당화 펩트로리주맵 Fc 변이체들의 온도에 따른 열 안정성을 확인하기 위해 DSF(differential scanning fluorimetry) 분석을 수행하였다. 구체적으로, 1× PBS에 5 µM로 각각 희석한 당화 펩트로리주맵 Fc 변이체 45 µl 및 200×로 희석한 SYPRO Orange (Invitrogen, S6651) dye 5 µl를 섞어

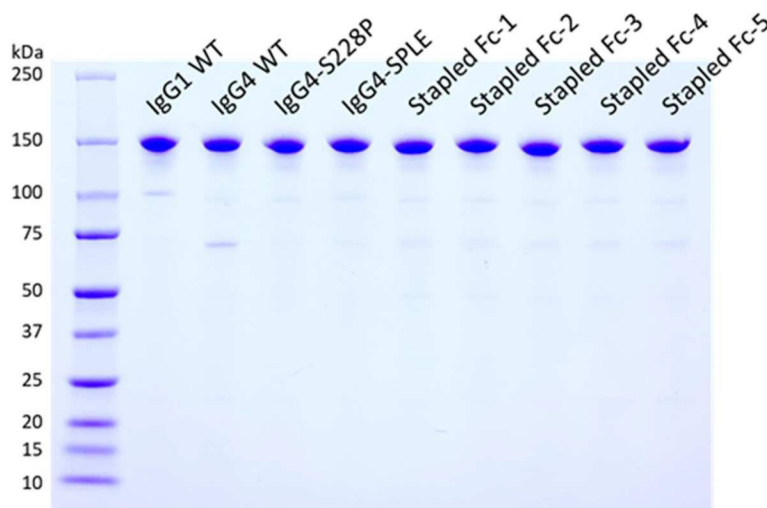
PCR plate (Thermo Scientific, AB0900W)에 각각 분주하고, 대조군으로 1× PBS도 같은 방법으로 준비하였다 (모든 시료는 triplicate으로 진행함). 시료가 담긴 플레이트에 optically clear sealing film (Thermo Scientific, AB1170)을 부착하고, QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, A28567)을 이용하여 25℃부터 99.9℃까지 초 당 0.03℃씩 증가시키며 발생하는 형광 세기를 측정하였다. 각 온도에 따른 형광 값은 OriginPro software를 이용하여 볼츠만 모델로 피팅(fitting)한 후 sigmoidal transition curve의 중간점을 구하였다.

[0160]

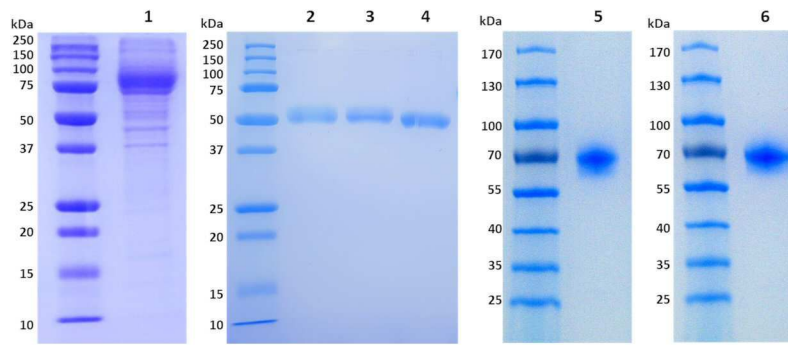
그 결과, 본 발명의 당화 펩브로리주맵 Fc 변이체들은 야생형 IgG4 항체, 종래의 Fab-arm 교환 방지 변이체 (S228P) 및 종래의 선행 변이체 SPLE (S228P/L235E)보다 높은 분해 온도를 가지는 것으로 나타났으며, 특히, Stapled Fc-5 (L235C) 변이체가 가장 높은 분해 온도를 가지는 것으로 나타나 (도 12), 열 안정성이 우수한 것을 확인하였다.

도면

도면1



도면2



1: FcγRI-GST

2: FcγRIIa-131H-GST

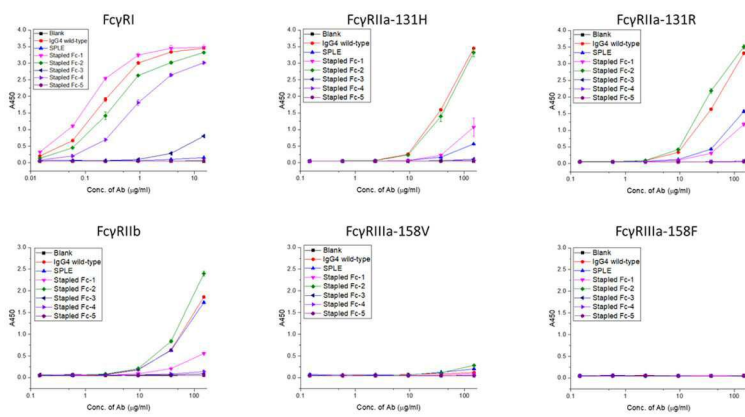
3: FcγRIIa-131R-GST

4: FcγRIIb-GST

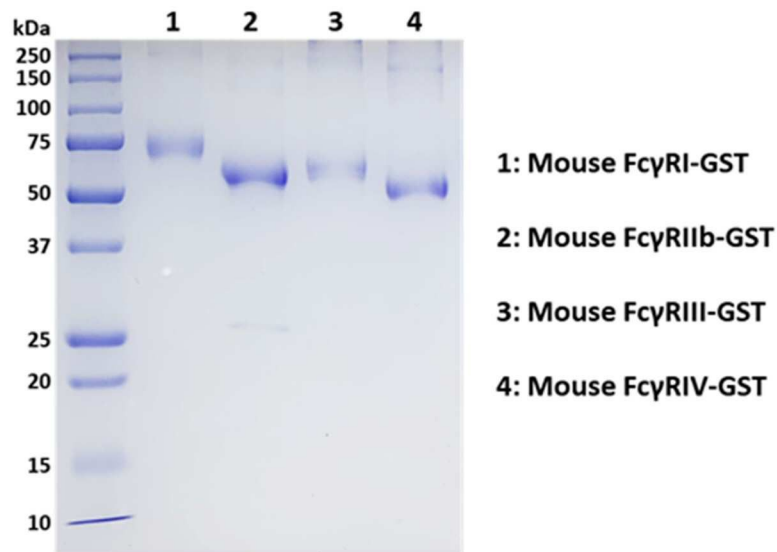
5: FcγRIIa-158V-GST

6: FcγRIIa-158F-GST

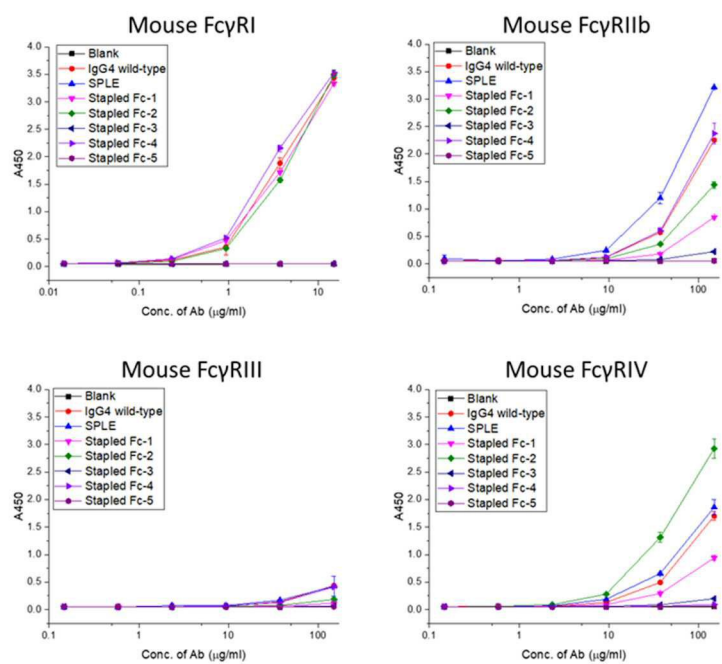
도면3



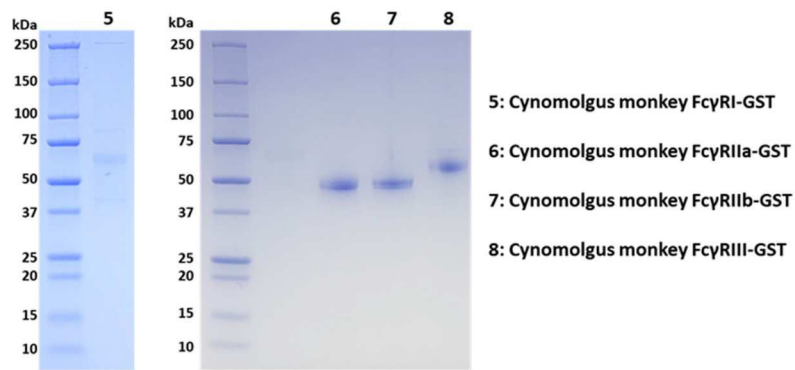
도면4



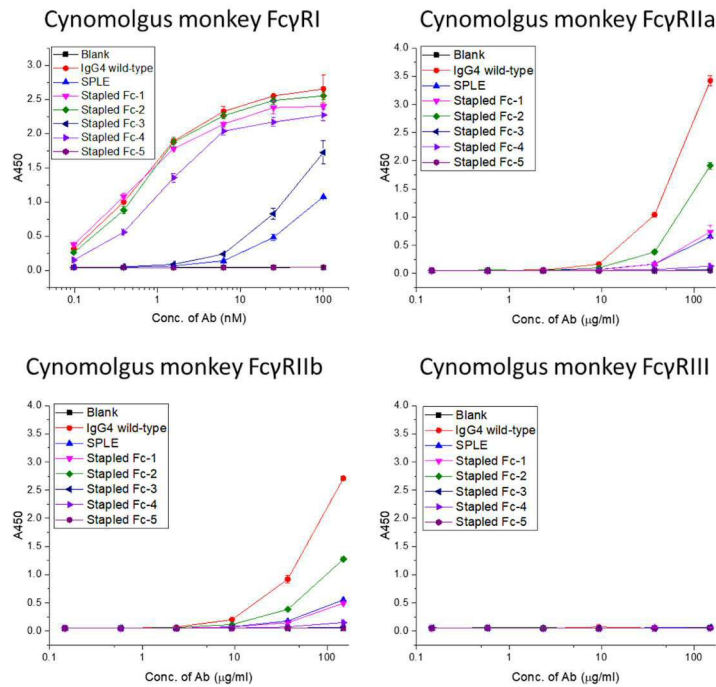
도면5



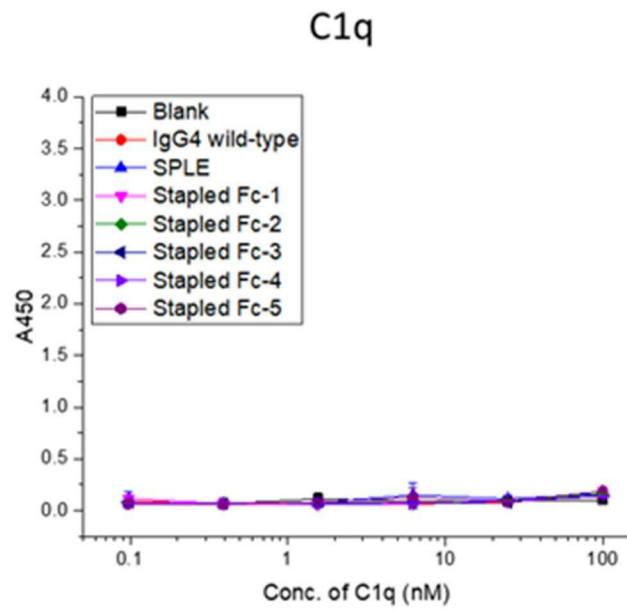
도면6



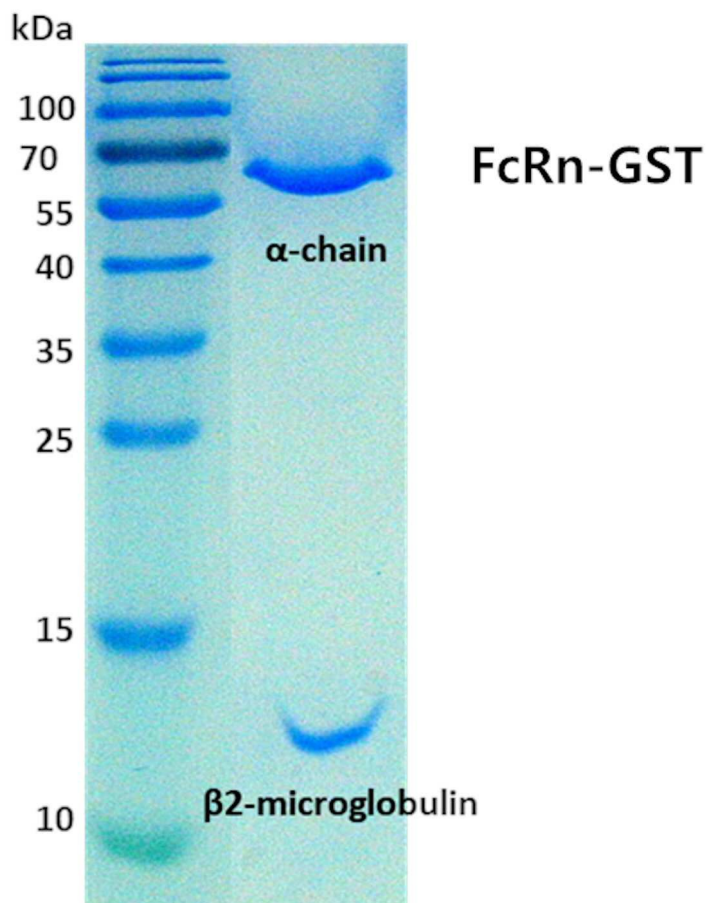
도면7



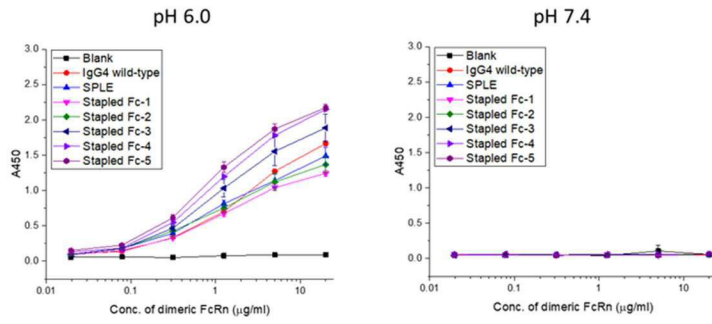
도면8



도면9

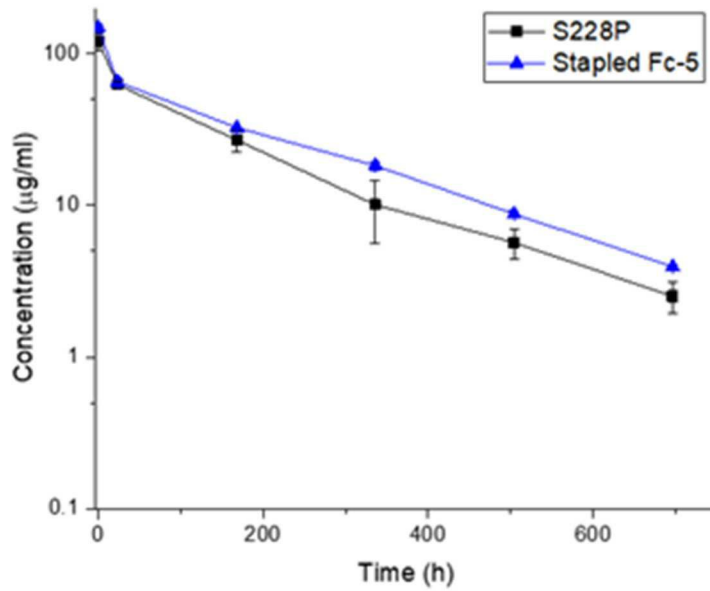


도면10

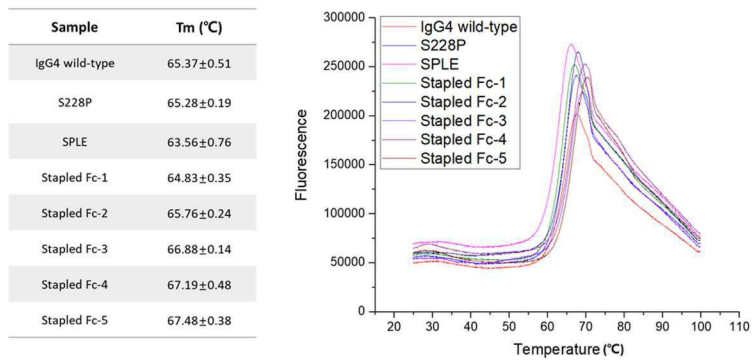


도면11

PK analysis



도면12



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.