

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일

2024 년 10 월 10 일 (10.10.2024)



WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2024/210362 A1

(51) 국제특허분류:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2024/003485

(22) 국제출원일:

2024 년 3 월 20 일 (20.03.2024)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2023-0045116 2023 년 4 월 6 일 (06.04.2023) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)  
[KR/KR]: 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: 정상택 (JUNG, Sang-Taek); 06217 서울특별시 강남구 선릉로69길 20, 112동 702호, Seoul (KR). 이원주 (LEE, Won-Ju); 02855 서울특별시 성북구 안암로

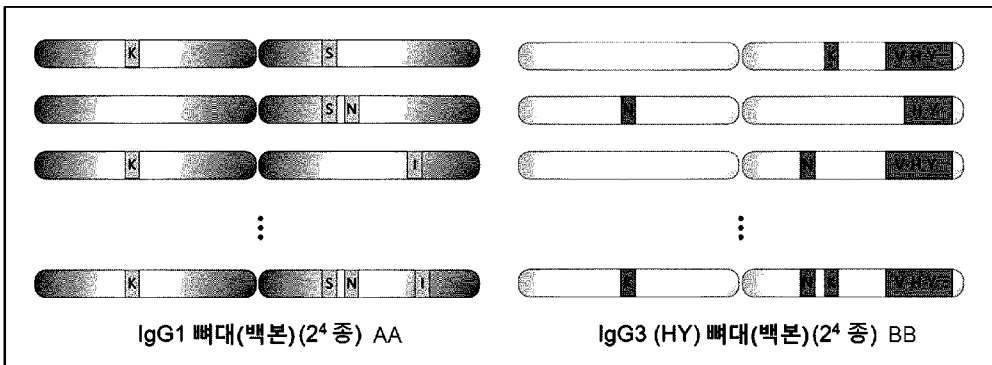
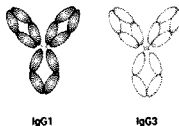
9가길 94, 205호, Seoul (KR). 조미경 (JO, Mi-Gyeong); 02717 서울특별시 성북구 보국문로 32-3, 401호, Seoul (KR). 경문수 (KYUNG, Mun-Su); 10109 경기도 김포시 봉화로 9-13, 103동 502호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 위병갑 (WIE, Byoung-Gap); 06141 서울특별시 강남구 테헤란로33길7, 대영빌딩 7층, 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: FC VARIANTS WITH IMPROVED HUMAN CIQ BINDING AFFINITY

(54) 발명의 명칭: 인간 CIQ 결합력이 향상된 FC 변이체들



AA ... IgG1 skeleton (backbone) (2<sup>4</sup> types)

BB ... IgG3 (HY) skeleton (backbone) (2<sup>4</sup> types)

(57) Abstract: The present invention relates to a glycosylated Fc variant with improved selective binding affinity to FcγRIIIa. Compared to conventional antibodies approved as antibody therapeutic agents, novel human antibody Fc domain variants of the present invention have reduced binding affinity to FcγRIIb, which is an immuno-inhibitory receptor, have improved binding affinity to FcγRIIIa (an increase in the A/I ratio), which is an immuno-activating receptor, thereby having a remarkably improved ability to induce ADCC, and have the effect of maximizing the immune action mechanism of therapeutic protein drugs, and thus can be effectively used in antibody drugs.

[다음 쪽 계속]

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

공개:

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

(57) 요약서: 본 발명은 FcγRIIIa에 대한 선택적 결합력이 향상된 당화 Fc 변이체에 관한 것으로, 본 발명의 신규한 인간 항체 Fc 도메인 변이체들은 종래의 항체 치료제로서 승인받은 항체들보다 면역 저해 수용체인 FcγRIIIb와의 결합력이 감소되고, 면역 활성화 수용체인 FcγRIIIa와의 결합력이 향상되어 (A/I 비율 증가), 현저히 향상된 ADCC 유도능을 가지며, 치료용 단백질 의약품의 면역 작용 기작을 극대화할 수 있는 효과가 있으므로 항체 의약품으로 유용하게 이용될 수 있다.

## 명세서

### 발명의 명칭: 인간 C1q 결합력이 향상된 Fc 변이체들 기술분야

- [1] 본 발명은 인간 C1q에 대한 결합력이 향상된 당화 Fc 변이체에 관한 것이다.

### 배경기술

- [2] 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. 치료용 항체의 가장 중요한 기작 중 하나는 타겟 항원으로 보체 분자들을 모집하여 타겟 세포를 사멸하는 기작인데, 항체의 Fc 도메인이 보체 분자 모집과 CDC (complement-dependent cytotoxicity)에 결정적인 역할을 한다. 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), 리툭산 (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 타겟에 특이적이고 부작용이 낮은 치료용 항체를 포함한 바이오 의약품이 빠르게 그 자리를 대체해 나가고 있다.
- [3] 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 FcγR의 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 면역 글로불린 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 $\gamma$ RIIIa와 결합하여 ADCC, Fc $\gamma$ RI 또는 Fc $\gamma$ 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. CDC를 비롯한 면역 작용기작을 나타내기 위해 항체의 Fc 도메인은 혈중 C1 복합체와 상호작용 하며, 이때 C1 복합체를 구성하는 C1q 분자와 직접적으로 결합하여 C1 복합체의 프로테아제(C1r<sub>2</sub>s<sub>2</sub>)를 활성화한다. 이어서 보체 경로가 활성화되고, 최종적으로 타겟 세포 표면에 막공격복합체(membrane attack complex)가 형성되어 표적 세포가 사멸된다. 또한, 보체 경로 과정에서 생성된 아나필라톡신, 옵소닌은 주변 면역세포를 모집하여 CDCC(complement-dependent cellular cytotoxicity)와 CDCP(complement-dependent cellular phagocytosis)를 유도함으로써 보다 다채로운 면역 반응을 일으키며 효율적으로 타겟 세포를 제거한다. 항체의 CDC는 항체의 Fc 도메인과 C1q간 결합력에 크게 의존하며, IgG3는 IgG1에 비해 높은 C1q 결합력과 CDC 활성을 가지나, IgG3는 혈중 항체 반감기에 필수적인 FcRn 결합력과 항체 의약품과 Fc-융합 단백질 생산 과정에 필수적인 protein A 결합력이 IgG1에 비해 매우 떨어지는 단점이 있다.

- [4] 한편, 리톡시맵은 chimeric anti-CD20 단일클론 항체로서 종양 치료목적으로 상용화되어 미국 FDA로부터 최초로 승인된 단일클론 항체 치료제이다. 1980년대 초기의 CD20 항원의 항체는 마우스로부터 만들어진 단일클론 항체로서 항원과의 반응성은 우수하지만 생체 반감기가 짧고 이종 항원으로 인한 항원성(HAMA, human anti-mouse antibody)이 유발되는 단점이 있었다. 이러한 마우스 기원 항체의 결점을 보완하고 생물학적 효과를 높이기 위하여 항원 인식이 이루어지는 가변부위(variable region)는 마우스 기원이고 항체의 불변부위(constant region)는 인간 기원인 키메라 항체인 리톡시맵이 유전자 재조합 기술을 통하여 합성되었다. CD20 항원은 B세포 계열이 세포주기(cell-cycle entry)에 들어가거나 B세포로 분화하는데 관여하는 것으로 알려져 있다. CD20 항원은 세포 표면으로부터 쉽게 탈각되거나 변형 혹은 함입되지 않는 특성을 지니고 있어 표적 분자로서 활용하기에 적당한 특징을 갖고 있다. CD20 항원의 분포는 정상 세포의 경우, pre-B 세포 단계에서 활성화된 B 세포(activated B cell) 단계까지 광범위하게 분포하지만 조혈모세포, 형질세포와 다른 계열의 세포

에는 분포하지 않으며 림프종의 경우는 B 세포 림프종과 만성 림프구성 백혈병의 대부분과 pre-B cell 급성림프구성 백혈병의 50%에서 CD20 항원이 발현되어 단일클론 항체를 이용한 종양특이적 면역반응을 유도하는데 적절한 표적이 될 수 있다 (Maloney DG et al., IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed lowgrade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 90:2188-2195, 1997; McLaughlin P et al., Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*, 16:2825-2833, 1998). 하지만, 리툽시맙이 약 절반 정도의 저도 림프종 환자 및 약 60-70% 정도의 고도 림프종 환자에서 내성을 보이며, CD55 또는 CD59 등의 발현이 많은 경우 보체 매개성 세포독성이 감소한다는 일부 보고가 있다. 또한, *in vivo* 마우스 모델을 이용한 리툽시맙의 작용기전 연구 결과, NK 세포, PMNs 또는 T 세포가 제거된 마우스 모델에서는 리툽시맙의 효능이 유지되었지만, C1q 낙아웃(knock out) 마우스 모델에서는 리툽시맙의 효능이 완전히 제거된 것을 확인함으로써, 항체치료제에서 보체 활성화가 치료 효능을 위해 매우 중요한 것이 보고되었다 (Di Gaetano et al 2003 *J Immunol*). 따라서, 치료용 항체와 단백질 치료제의 치료 효과를 극대화하기 위해서는 항체의 CDC를 향상시키려는 시도가 매우 절실하다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [5] 본 발명의 목적은 신규한 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 제공하는 것이다.
- [6] 또한, 본 발명의 목적은 C1q와의 결합력이 증가된 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 제공하는 것이다.
- [7] 또한, 본 발명의 목적은 상기 Fc 도메인 변이체, 또는 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산분자, 이를 포함하는 벡터, 및 이를 포함하는 숙주세포를 제공하는 것이다.
- [8] 또한, 본 발명의 목적은 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [9] 또한, 본 발명의 목적은 인간 항체 Fc 도메인 변이체의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [10] 또한, 본 발명의 목적은 항체 치료제의 제조에 사용하기 위한 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 용도를 제공하는 것이다.
- [11] 또한, 본 발명의 목적은 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 암의 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.
- [12] 아울러, 본 발명의 목적은 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 약학적으로 유효한 양으로 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법을 제공하는 것이다.

## 과제 해결 수단

- [13] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 C1q와의 결합력이 증가된 신규한 인간 항체 Fc 도메인 변이체들을 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 상기 신규한 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 상기 Fc 도메인 변이체, 또는 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산분자, 이를 포함하는 벡터, 및 이를 포함하는 숙주세포를 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 상기 Fc 도메인 변이체, 또는 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 인간 항체 Fc 도메인 변이체의 제조방법을 제공한다.
- [18] 또한, 본 발명은 항체 치료제의 제조에 사용하기 위한 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 용도를 제공한다.
- [19] 또한, 본 발명은 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 암의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [20] 아울러, 본 발명은 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 약학적으로 유효한 양으로 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법을 제공한다.

## 발명의 효과

- [21] 본 발명의 신규한 인간 항체 Fc 도메인 변이체들은 야생형 인간 항체 Fc 도메인 및 기존에 알려져 있는 C1q 결합력 향상 Fc 변이체들에 비해 뛰어난 C1q 결합력을 나타내고, CDC 활성이 현저히 증가하였으며, 혈중 항체 반감기에 필수적인 FcRn 결합력과 Fc-융합 단백질 생산 과정에 필수적인 protein A 결합력은 유지하고 있으므로, 이를 항체 의약품 및 Fc-융합 단백질 의약에 적용하면 CDC를 극대화하여 치료 효율을 획기적으로 개선할 수 있는 효과가 있다.

## 도면의 간단한 설명

- [22] 도 1은 hFcRn-GST의 발현 및 정제 후 SDS-PAGE 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [23] 도 2는 2종의 뼈대(backbone) 야생형 리톡시맵 및 리톡시맵-3HY 클론을 이용하여 30종의 리톡시맵-Fc 변이체를 제작하는 전략을 모식도로 나타낸 도이다.
- [24] 도 3a 및 b는 야생형 IgG1 (IgG1 Fc), 야생형 IgG3 (IgG3 Fc), IgG3-HY (IgG3-HY Fc), 113F 변이체 (113F Fc) 및 본 발명의 30종 리톡시맵-Fc 변이체들의 Fc 도메인의 아미노산 서열정보를 나타낸 도이다.
- [25] 도 4는 리톡시맵-Fc 변이체들을 발현 및 정제한 후 SDS-PAGE 분석한 결과를 나타낸 도이다.

- [26] 도 5는 본 발명의 리톡시맵-Fc 변이체들 Sv1-1 내지 15의 C1q 결합력을 ELISA로 분석한 결과를 나타낸 도이다:
- [27] RTX-1: 야생형 리톡시맵.
- [28] 도 6은 본 발명의 리톡시맵-Fc 변이체들 Sv3-1 내지 15의 C1q 결합력을 ELISA로 분석한 결과를 나타낸 도이다:
- [29] RTX-3(HY): IgG3의 R435H 및 F436Y 변이체인 리톡시맵-3HY.
- [30] 도 7은 도 5 및 6의 결과를 바탕으로 우수한 C1q 결합력을 가지는 선별된 리톡시맵-Fc 변이체들의 C1q 결합력을 ELISA로 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [31] 도 8은 도면 7의 결과를 바탕으로 가장 우수한 C1q 결합력을 가지는 리톡시맵-Fc 변이체들 SV3-8, SV3-10 및 SV3-11의 C1q 결합력을 ELISA로 분석한 결과를 나타낸 도이다:
- [32] RTX-WT: 야생형 리톡시맵; 및
- [33] RTX-113F: 종래의 113F Fc 변이체를 포함하는 리톡시맵.
- [34] 도 9는 리톡시맵-Fc 변이체들의 pH 6.0 및 7.4에서의 FcRn 결합력을 ELISA로 분석한 결과를 나타낸 도이다:
- [35] RTX-1: 야생형 리톡시맵; 및
- [36] RTX-3: IgG3의 R435H 및 F436Y 변이체인 리톡시맵-3HY.
- [37] 도 10은 암세포주 Daudi에 대한 리톡시맵-Fc 변이체들의 CDC 활성을 분석한 도이다:
- [38] RTX-WT: 야생형 리톡시맵;
- [39] RTX-TL: IgG1의 T299L 변이체인 리톡시맵;
- [40] RTX-SV3-8: 리톡시맵-Fc 변이체 SV3-8;
- [41] RTX-SV3-10: 리톡시맵-Fc 변이체 SV3-10; 및
- [42] RTX-SV3-11: 리톡시맵-Fc 변이체 SV3-11.
- [43] 도 11은 암세포주 Ramos에 대한 리톡시맵-Fc 변이체들의 CDC 활성을 분석한 도이다:
- [44] RTX-WT: 야생형 리톡시맵;
- [45] RTX-TL: IgG1의 T299L 변이체인 리톡시맵;
- [46] RTX-SV3-8: 리톡시맵-Fc 변이체 SV3-8;
- [47] RTX-SV3-10: 리톡시맵-Fc 변이체 SV3-10; 및
- [48] RTX-SV3-11: 리톡시맵-Fc 변이체 SV3-11.
- [49] 도 12는 SV3-8 과 SV3-10 변이체를 바탕으로 2종류의 라이브러리를 제작하는 전략을 모식도로 나타낸 도이다.
- [50] 도 13은 본 발명에서 이용한 CHO 세포 디스플레이 기술에 대한 모식도이다.
- [51] 도 14는 CHO 세포 디스플레이 기술을 이용한 스크리닝을 통해 각 라이브러리가 총 4R에 걸쳐 enrich된 세포 집단(population)을 선별한 도이다.

- [52] 도 15는 CHO 세포 Fc 디스플레이 시스템을 통해 C1q 결합력이 더욱 향상된 당화 Fc 변이체로서 최종 선별된 Fc 변이체 EFS11 및 EFS16와 종래의 Fc 변이체 EFTAE 및 KWES의 아미노산 변이 서열정보를 나타낸 도이다.
- [53] 도 16은 CD20<sup>+</sup> 표적 암세포주(Daudi)에 대한 리툭시맙-Fc 변이체들 (RTX-EFS11 및 RTX-EFS16)의 C1q 결합능을 분석한 도이다:
- [54] RTX-IgG1: 야생형 IgG1;
- [55] RTX-EFS11: EFS11 변이체가 포함된 리툭시맙-Fc 변이체;
- [56] RTX-EFS16: EFS16 변이체가 포함된 리툭시맙-Fc 변이체;
- [57] RTX-KWES: KWES 변이체가 포함된 리툭시맙-Fc 변이체; 및
- [58] RTX-EFTAE: EFTAE 변이체가 포함된 리툭시맙-Fc 변이체.
- [59] 도 17은 CD20<sup>+</sup> 표적 암세포주(Daudi)에 대한 리툭시맙-Fc 변이체들 (RTX-EFS11 및 RTX-EFS16)의 CDC 활성을 분석한 도이다:
- [60] RTX-IgG1: 야생형 IgG1;
- [61] RTX-EFS11: EFS11 변이체가 포함된 리툭시맙-Fc 변이체;
- [62] RTX-EFS16: EFS16 변이체가 포함된 리툭시맙-Fc 변이체;
- [63] RTX-KWES: KWES 변이체가 포함된 리툭시맙-Fc 변이체; 및
- [64] RTX-EFTAE: EFTAE 변이체가 포함된 리툭시맙-Fc 변이체.
- [65] 도 18은 리툭시맙-Fc 변이체들 (RTX-EFS11 및 RTX-EFS16)의 FcγRIIIa 결합력을 분석한 도이다:
- [66] RTX-IgG1: 야생형 IgG1;
- [67] RTX-EFS11: EFS11 변이체가 포함된 리툭시맙-Fc 변이체;
- [68] RTX-EFS16: EFS16 변이체가 포함된 리툭시맙-Fc 변이체;
- [69] RTX-KWES: KWES 변이체가 포함된 리툭시맙-Fc 변이체; 및
- [70] RTX-EFTAE: EFTAE 변이체가 포함된 리툭시맙-Fc 변이체.
- [71] 도 19는 리툭시맙-Fc 변이체들 (RTX-EFS11 및 RTX-EFS16)의 FcγRIIIa 결합력을 분석한 도이다:
- [72] RTX-IgG1: 야생형 IgG1;
- [73] RTX-EFS11: EFS11 변이체가 포함된 리툭시맙-Fc 변이체;
- [74] RTX-EFS16: EFS16 변이체가 포함된 리툭시맙-Fc 변이체;
- [75] RTX-KWES: KWES 변이체가 포함된 리툭시맙-Fc 변이체; 및
- [76] RTX-EFTAE: EFTAE 변이체가 포함된 리툭시맙-Fc 변이체.

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [77] 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, 이

에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

- [78] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 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.
- [79] 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.
- [80] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1 문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib( $\alpha$ -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:
- [81] 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.
- [82]
- [83] 일 측면에서, 본 발명은 야생형(Wild type) 인간 항체 Fc 도메인에서, 카밧 넘버링 시스템(Kabat numbering system)에 따라 넘버링된 249, 252, 268, 276, 326, 384, 392, 422, 435 및 436 위치의 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 위치의 아미노산이 야생형의 아미노산과 다른 서열로 치환된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체에 관한 것이다.
- [84] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 249N, 252I, 276N, 268Y, 276K, 326N, 384N, 384S, 392K, 392N, 422V, 422I, 435H, 435R, 436Y 및 436F로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [85] 일 구현예에서, 상기 항체는 면역글로불린(IgG)일 수 있으며, IgA, IgM, IgE, IgD 또는 IgG, 또는 이들의 변형일 수 있고, IgG1 또는 IgG3 동종형인 것이 더욱 바람직하며, 항-HER2(human epidermal growth factor receptor 2) 항체, 항-EGFR(epidermal growth factor receptor) 항체 또는 항-CD20 항체일 수 있으며, 트라스투주맙, 세톡시맙 또는 리톡시맙일 수 있다. 항체의 파파인 분해는 2개의

Fab 도메인과 1개의 Fc 도메인을 형성하며, 인간 IgG 분자에서, Fc 영역은 Cys 226의 N-말단을 파파인 분해함으로써 생성된다 (Deisenhofer, Biochemistry 20: 2361-2370, 1981).

- [86] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 IgG1 Fc 도메인에서 N276K, N384S, K392N 및 V422I로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있으며, 야생형 인간 IgG1 Fc 도메인은 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [87] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 IgG3 Fc 도메인에서 D249N, M252I, H268Y, K276N, K326N, S384N, N392K, I422V, R435H 및 F436Y로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있으며, 야생형 인간 IgG3 Fc 도메인은 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [88] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 C1q와의 결합력이 증가될 수 있다.
- [89] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 작용기 기능(effector function)을 증가시킬 수 있으며, 상기 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 하향조정, ADC 흡수, 아포토시스의 유도, 세포 사멸, 세포 주기 정지, 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 Fc-매개된 작용기 기능일 수 있다.
- [90] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 보체 의존적 세포독성(Complement-dependent cytotoxicity, CDC)이 증가시킬 수 있다. 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 CDC 활성이 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 증가될 수 있다.
- [91] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 IgG3 변이체일 수 있으며, 야생형 IgG1과 유사하거나 그 보다 높은 FcγRIIIa 및 FcγRIIa에 대한 결합력을 가질 수 있다.
- [92] 일 구현예에서, 야생형 인간 항체 Fc 도메인은 서열번호 17 또는 18의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

- [93] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 서열번호 1 내지 8의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 2(C<sub>H</sub>2) 및 서열번호 9 내지 16의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 3(C<sub>H</sub>3)를 포함할 수 있다.
- [94] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 서열번호 19 내지 26의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [95] 일 구현예에서, 상기 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 276K 및 384S의 아미노산 치환을 포함할 수 있고, 야생형 인간 IgG1 Fc 도메인에서 N276K 및 N384S의 아미노산 치환을 포함하는 Sv1-5일 수 있으며, 이는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 2, 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 3 또는 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 도메인을 포함할 수 있다.
- [96] 일 구현예에서, 상기 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 384N의 아미노산 치환을 포함할 수 있고, 야생형 인간 IgG3 Fc 도메인에서 S384N의 아미노산 치환을 포함하는 Sv3-2일 수 있으며, 이는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 2, 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 3 또는 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 도메인을 포함할 수 있다.
- [97] 야생형 인간 IgG3 Fc 도메인에서 S384N의 아미노산 치환을 포함하는 Sv3-2일 수 있으며,
- [98] 일 구현예에서, 상기 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 384N 및 392K의 아미노산 치환을 포함할 수 있고, 야생형 인간 IgG3 Fc 도메인에서 S384N 및 N392K의 아미노산 치환을 포함하는 Sv3-8일 수 있으며, 이는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 2, 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 3 또는 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 도메인을 포함할 수 있다.
- [99] 일 구현예에서, 상기 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 392K 및 422V의 아미노산 치환을 포함할 수 있고, 야생형 인간 IgG3 Fc 도메인에서 N392K 및 I422V의 아미노산 치환을 포함하는 Sv3-10일 수 있으며, 이는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 2, 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 3 또는 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 도메인을 포함할 수 있다.
- [100] 일 구현예에서, 상기 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 276N, 384N 및 392K의 아미노산 치환을 포함할 수 있고, 야생형 인간 IgG3 Fc 도메인에서 K276N, S384N 및 N392K의 아미노산 치환을 포함하는 Sv3-11일 수 있으며, 이는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 2, 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 3 또는 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 도메인을 포함할 수 있다.

- [101] 일 구현예에서, 상기 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 276N, 384N 및 422V의 아미노산 치환을 포함할 수 있고, 야생형 인간 IgG3 Fc 도메인에서 K276N, S384N 및 I422V의 아미노산 치환을 포함하는 Sv3-12일 수 있으며, 이는 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 2, 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 3 또는 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 도메인을 포함할 수 있다.
- [102] 일 구현예에서, 상기 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 268Y, 326N, 435H 및 436Y의 아미노산 치환을 포함할 수 있고, 야생형 인간 IgG3 Fc 도메인에서 H268Y, K326N, R435H 및 F436Y의 아미노산 치환을 포함하는 EFS11일 수 있으며, 이는 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 2, 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 3 또는 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 도메인을 포함할 수 있다.
- [103] 일 구현예에서, 상기 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 249N, 252I, 268Y, 326N, 435H 및 436Y의 아미노산 치환을 포함할 수 있고, 야생형 인간 IgG3 Fc 도메인에서 D249N, M252I, H268Y, K326N, R435H 및 F436Y의 아미노산 치환을 포함하는 EFS16일 수 있으며, 이는 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 2, 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 3 또는 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 도메인을 포함할 수 있다.
- [104] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 항체 Fc 도메인과 유사한 정도로 pH 7.0 내지 7.8에서 FcRn에 낮은 결합 친화력을 나타내며, pH 5.6 내지 6.5에서 FcRn에 높은 결합 친화력을 나타내는 pH 감응성일 수 있다.
- [105] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 변이체는 pH 5.6 내지 6.5에서 FcRn에 높은 결합 친화력을 나타낼 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 동일하거나 실질적으로 변화되지 않을 수 있다.
- [106] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 변이체는 pH 7.0 내지 7.8에서 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.
- [107] 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).

- [108] 본 발명에서 사용된, 용어 "야생형 (wild-type) 폴리펩타이드"는 후에 변형되어 유도체를 생산하는 비변형 폴리 펩타이드를 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.
- [109] 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, T299A 치환을 포함하는 Fc 변이체는 야생형 항체의 Fc 도메인의 아미노산 서열에서 299번째 아미노산 잔기인 트레오닌이 알라닌으로 대체된 것을 의미한다.
- [110] 본 명세서에 사용된 용어 "Fc 변이체"는 야생형 항체 Fc 도메인과 비교하여 하나 이상의 아미노산 잔기의 변형을 포함하는 것을 의미한다.
- [111] 본 발명에서 사용된, 용어 "Fc 도메인 변이체"는 "Fc 변이체"와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [112] 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.
- [113] 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 항체 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.
- [114] 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 문

현 (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.

- [115] 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.
- [116] 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. 또한, 상기 Fc 변이체를 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 항체는 당해 기술분야에서 공지된 다양한 방법으로 분리 및 정제되어 제조될 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 융합 파트너에 의한 정제가 가능할 수 있다.
- [117] 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 ( $\beta$ -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.
- [118] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편에 관한 것이다.
- [119] 일 구현예에서, 상기 항체는 당화 항체일 수 있다.
- [120] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 야생형 인간 항체에 비해 C1q와의 결합력이 증가될 수 있다.

- [121] 일 구현예에서, 상기 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 미니바디(minibody), 도메인 항체, 이중특이적 항체, 항체 모방체, 키메라 항체, 항체 접합체(conjugate), 인간항체 또는 인간화 항체일 수 있으며, 면역학적 활성을 가진 단편은 상기 항체의 Fab, Fd, Fab', dAb, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub>, scFv(single chain fragment variable), Fv, 단일쇄 항체, Fv 이량체, 상보성 결정 영역 단편 또는 디아바디(diabody)일 수 있다.
- [122] 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 항-HER2(human epidermal growth factor receptor 2) 항체, 항-EGFR(epidermal growth factor receptor) 항체 또는 항-CD20 항체일 수 있으며, 트라스트주맙, 세툽시맙 또는 리툽시맙일 수 있다.
- [123] 일 구현예에서, 상기 트라스트주맙은 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함할 수 있으며, 상기 세툽시맙은 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함할 수 있고, 리툽시맙은 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함할 수 있다.
- [124] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 변이체를 포함하는 항체는 리툽시맙-Fc 변이체 SV1-5은 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함할 수 있다.
- [125] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 변이체를 포함하는 항체는 리툽시맙-Fc 변이체 SV3-2은 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함할 수 있다.
- [126] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 변이체를 포함하는 항체는 리툽시맙-Fc 변이체 SV3-8은 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함할 수 있다.
- [127] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 변이체를 포함하는 항체는 리툽시맙-Fc 변이체 SV3-10은 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함할 수 있다.
- [128] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 변이체를 포함하는 항체는 리툽시맙-Fc 변이체 SV3-11은 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함할 수 있다.
- [129] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 변이체를 포함하는 항체는 리툽시맙-Fc 변이체 SV3-12은 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함할 수 있다.
- [130] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 변이체를 포함하는 항체는 리툽시맙-Fc 변이체 EFS11은 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함할 수 있다.
- [131] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 변이체를 포함하는 항체는 리툽시맙-Fc 변이체 EFS16은 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함할 수 있다.
- [132] 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 서열번호 21 내지 23의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 중쇄; 및 서열번호 30 내지 37의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 중쇄를 포함할 수 있다.
- [133] 본 발명에서 사용된, 용어 "당화(glycosylation)"는 글리코실기를 단백질에 전위시키는 가공방법을 의미한다. 상기 당화는 글리코실 전달효소에 의해 글리코실기가 표적 단백질의 세린, 트레오닌, 아스파라긴 또는 히드록실리신 잔기에 결합되어 수행되는데, 상기 당화된 단백질은 생체조직의 구성물질로서 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 세포표면에 서 세포인식에도 중요한 역할을 수행한다.

- [134] 본 발명에서 사용된, 용어 "트라스트주맵-Fc 변이체", "세톡시맵-Fc 변이체" 또는 "리톡시맵-Fc 변이체"는 야생형 트라스트주맵, 세톡시맵 또는 리톡시맵 중쇄의 Fc 영역을 대신하여, 본원 발명의 Fc 변이체가 도입된 것이다. 따라서, 상기 "트라스트주맵-Fc 변이체", "세톡시맵-Fc 변이체" 또는 "리톡시맵-Fc 변이체"의 제작은 야생형 트라스트주맵, 세톡시맵 또는 리톡시맵 중쇄의 Fc 영역을 대신하여 본 발명의 Fc 변이체 또는 Fc 변이체를 포함하는 폴리펩타이드가 도입된 발현 벡터를 제작하고, 야생형 트라스트주맵, 세톡시맵 또는 리톡시맵의 경쇄가 도입된 발현 벡터를 제작하여 이를 동물세포에 트랜스펙션하여 발현시킬 수 있다.
- [135] 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 융합 파트너에 의한 정제가 가능할 수 있다.
- [136] 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 첫번째 불변영역(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 ES et al., Nature 341:544-546 (1989)); (v) 분리된 CDR 영역; (vi) 2개의 연결된 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')<sub>2</sub> 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) WO94/13804) 등을 포함한다.
- [137] 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.
- [138] 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.
- [139] 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( $\gamma$ ), 뮤( $\mu$ ), 알파( $\alpha$ ), 델타( $\delta$ ) 및 엡실론( $\epsilon$ ) 타입을 가지고, 서브클래스로 감마1( $\gamma$ 1), 감마2( $\gamma$ 2), 감마3( $\gamma$ 3), 감마4( $\gamma$ 4), 알파1( $\alpha$ 1) 및 알파2( $\alpha$ 2)를 가진다. 경쇄의 불변 영역은 카파( $\kappa$ ) 및 람다( $\lambda$ ) 타입을 가진다.

- [140] 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  $C_H3$ 과 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  $C_L$ 을 포함하는 전장 경쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다.
- [141] 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.
- [142] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 도메인 변이체, 또는 이를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산분자에 관한 것이다.
- [143] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 도메인 변이체, 또는 이를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산분자에 관한 것이다.
- [144] 일 측면에서, 본 발명은 상기 핵산분자를 포함하는 벡터, 상기 벡터를 포함하는 숙주세포에 관한 것이다.
- [145] 본 발명의 핵산분자는 단리된 것이거나 재조합된 것일 수 있으며, 단일쇄 및 이 중쇄 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 분리된 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 구조물의 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 폴

리캡타이드 서열의 전사에 영향을 주는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되며, 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 촉진하도록 배치될 때 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로 작동가능하게 연결된 연결될 DNA 서열들이 인접하여 위치함을 의미하며, 분비 리더의 경우 인접하여 동일한 리딩 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.

- [146] 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.
- [147] 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.
- [148] 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 에셰리키아속(*Escherichia* sp.) 균인 경우에는 PhoA 시그널 서열, OmpA 시그널 서열 등이, 숙주가 바실러스속(*Bacillus* sp.) 균인 경우에는  $\alpha$ -아밀라아제 시그널 서열, 서브틸리신 시그널 서열 등이, 숙주가 효모(yeast)인 경우에는 MF $\alpha$  시그널 서열, SUC2 시그널 서열 등이, 숙주가 동물세포인 경우에는 인슐린 시그널 서열,  $\alpha$ -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.

- [149] 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, 코스미드 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).
- [150] 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.
- [151] 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.
- [152] 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.
- [153] 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.
- [154] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 단편을 포함하는 항체 치료제 또는 약학 조성물에 관한 것이다.

- [155] 일 구현예에서, 본 발명에 따른 Fc 도메인 변이체 또는 이를 포함하는 단백질 결합체에 인간의 질병을 치료 또는 예방할 목적으로 사용되는 싸이토카인, 인터루킨, 인터루킨 결합 단백질, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 혈액인자, 백신, 구조단백질, 리간드 단백질 또는 수용체, 세포표면항원, 수용체 길항물질과 같은 다양한 생리활성 폴리펩타이드, 이들의 유도체 및 유사체가 결합되어 사용될 수 있다.
- [156] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편이 하나 이상의 치료제에 접합된 항체 치료제에 관한 것이다.
- [157] 일 구현예에서, 상기 치료제는 키메라 항원 수용체(CAR) 세포 치료제, 종양 세포붕괴성 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- $\alpha$  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, 로미테핀, 벡사로텐, 메토틱렉세이트, 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 조합일 수 있다.
- [158] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체, 또는 이를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [159] 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 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [160] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 면역원성 세포사멸 유도제를 추가로 포함할 수 있으며, 면역원성 세포사멸 유도제는 안트라사이클린계열 항암제, 탁

산 계열 항암제, 항-EGFR 항체, BK 채널 작용제, 보르테조미브(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, 타산계열 항암제는 파클리탁셀(paclitaxel) 또는 도세탁셀(docetaxel)일 수 있다.

- [161] 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), 부숴판(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.
- [162] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 암의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [163] 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, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.
- [164] 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 기술되어 있다.

- [165] 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.
- [166] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드실리콘디옥사이드, 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.
- [167] 본 발명의 조성물은 또한 생물학적 제제에 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 적정한 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.
- [168] 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 투여

량은 0.0001 ~ 10 mg/ml이며, 바람직하게는 0.0001 ~ 5 mg/ml이며, 하루 일 회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.

- [169] 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 과라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다.
- [170] 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.
- [171] 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 CDC 활성이 증가된 항체의 제조방법에 관한 것이다.
- [172] 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.
- [173] 일 측면에서, 본 발명은 항체 치료제의 제조에 사용하기 위한 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 용도에 관한 것이다.
- [174] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 암의 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다.
- [175] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 약학적으로 유효한 양으로 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법에 관한 것이다.

### 발명의 실시를 위한 형태

- [176] 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.
- [177]
- [178] 실시예 1. 표적 물질 발현 및 정제
- [179] C1q 결합력 향상 Fc 변이체 발굴 및 Fc 변이체의 FcRn 결합력 분석을 위해, 표적 물질을 발현 및 정제하였다. 구체적으로, pMAZ-hFcγRIIIa-158F-GST 발현 벡터를 제작하고, Freestyle 293 expression 배양액 (Gibco, 12338-018) 30 ml에

PEI(polyethylenimine, Polyscience, 23966) 및 상기 발현 벡터 유전자를 4:1의 비율로 섞어 상온에서 20 분간 인큐베이션한 뒤, 전날  $2 \times 10^6$  cells/ml의 밀도로 배양한 Expi293F 동물 세포에 트랜스펙션하고 37°C, 125 rpm 및 8% CO<sub>2</sub>의 조건으로 7일간 배양하였다. 배양 후 6000×g로 15분간 원심분리하여 상등액을 취하고, 12.5 ml의 25×PBS를 상기 배양 상등액 30 ml과 혼합한 후 0.2 µm 바틀탑 필터(bottle top filter) (Corning, 430513)로 여과하였다. 여과된 pMAZ-hFcRn-GST를 트랜스펙션한 배양액에 GST 레진 (Incospin, 1101-3) 500 µl을 넣고 4°C에서 16 시간 교반한 후 디스포저블 폴리프로필렌 컬럼(disposable polypropylene column)에 패킹(packing)하여 레진을 회수하였다. 이 후, 100 ml 1×PBS (pH 7.4)로 세척하고 4 ml의 1×PBS에 희석된 50 mM Tris-HCl 및 10 mM GSH 버퍼 (pH 8.0)로 용출하였다. Amicon Ultra-4 centrifugal filter units 3K (Merck Millipore, UFC800324)을 사용하여 1×PBS (pH 7.4)로 버퍼를 교환하였고, 그 결과, 높은 순도의 hFcRn-GST이 성공적으로 정제되었음을 SDS-PAGE 젤로 확인하였다 (도 1).

[180]

[181] 실시예 2. C1q에 대한 결합력이 향상된 Fc 변이체 설계 및 발굴

[182] IgG3가 IgG1에 비해 FcRn 결합력이 매우 낮아 혈중 반감기가 짧으며, 길고 유연한 힌지(hinge) 때문에 생산이 비효율적이므로, FcRn과 직접적으로 결합하는 부위 및 힌지를 IgG1과 동일한 서열을 갖도록 변형한 리툽시맙-3HY (IgG3의 R435H 및 F436Y 변이체)와 야생형 리툽시맙 (IgG1)을 두 가지의 뼈대로서 제작하였다 (도 2). IgG1과 IgG3 간에 서로 상이한 아미노산 서열들을 확인하여 C1q 결합에 중요할 것으로 예상되는 아미노산 서열 (IgG1: N276, N384, K392 및 V422; 및 IgG3: K276, S384, N392 및 I422)을 선별하여 상기에서 제작한 각각의 뼈대에 돌연변이들이 무작위로 조합되어 도입되도록 하는 셔플링(shuffling)을 수행함으로써, IgG1의 아미노산을 IgG3의 아미노산 종류 (K276, S384, N392 또는 I422)로 치환된 리툽시맙 Fc 변이체 15종 (Sv1-1 내지 15)과 IgG3의 아미노산을 IgG1의 아미노산 종류 (N276, N394, K392 또는 V422)로 치환된 리툽시맙 Fc 변이체 15종 (Sv3-1 내지 15)을 포함하는 리툽시맙 Fc 변이체 30종을 제작하였다 (도 2, 및 도 3a 및 b).

[183]

[184] 실시예 3. C1q에 대한 결합력이 향상된 리툽시맙(rituximab)-Fc 변이체의 발현 및 정제

[185] 상기 실시예 2에서 제작한 리툽시맙 Fc 변이체 30종을 각각 발현 및 정제하기 위해, 리툽시맙 Fc 변이체 30종의 발현 벡터인 pMAZ-Rituximab-HC를 제작하였다. Freestyle 293 expression 배양액 (Gibco, 12338-018) 3 ml에 각 변이체들의 중쇄유전자와 경쇄유전자를 1:1의 비율로 먼저 섞고 PEI:변이체유전자=4:1의 비율로 섞어 상온에서 20 분간 두었다가 전날  $2 \times 10^6$  cells/ml의 밀도로 계대배양해 놓은 Expi293F 세포에 트랜스펙션하였다. 그 후 CO<sub>2</sub> 진탕배양기에서 37 °C, 125 rpm

및 8 % CO<sub>2</sub>의 조건으로 7일간 배양하고 6000 ×g로 15분간 원심분리하여 상등액만 취하였다. 이 후, 취한 배양 상등액 30 ml과 1.25 ml의 25×PBS를 혼합한 후 0.2 µm 바틀탑 필터 (Corning, 430513)로 여과하였다. 여과된 배양액에 Protein A resin 100 µl을 넣어 주고 4°C에서 16 시간 교반한 뒤 디스포저블 폴리프로필렌 컬럼에 패킹하여 레진을 회수하였다. 5 ml 1×PBS (pH 7.4)로 세척하고 3 ml 100 mM 글라이신 (pH 2.7) 버퍼로 용출한 후 1 M Tris-HCl (pH 8.0)을 이용하여 중화하였다. Amicon Ultra-4 centrifugal filter units 3K (Merck Millipore, UFC800324)을 사용하여 1×PBS (pH 7.4)로 버퍼를 교환하였으며, SDS-PAGE 겔로 항체 리톡시맵-Fc 변이체들이 높은 순도로 성공적으로 정제되었음을 확인하였다 (도 4).

[186]

[187] 실시예 4. 리톡시맵-Fc 변이체들의 C1q 결합력 분석

[188] 상기 실시예 3에서 발현 및 정제한 리톡시맵-Fc 변이체들의 C1q 결합력을 ELISA를 이용하여 분석하였다. 구체적으로, 0.05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9.6)에 4 µg/ml로 희석한 리톡시맵-Fc 변이체들을 각각 50 µl씩 flat bottom polystyrene High Bind 96 well microplate (Costar, 3590)에 4°C로 16 시간 동안 인큐베이션하여 고정화한 후 100 µl의 4% 스킴 밀크(skim milk) (GenomicBase, SKI400)로 상온에서 2시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST 180 µl로 4 회 세척한 뒤, 1% 스킴 밀크로 연속 희석한 C1q (Quidel, A400) 50 µl를 각 웰에 분주하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 웰을 세척한 후, C1q 항체-HRP(Invitrogen, PA1-84324) 50 µl와 상온에서 1시간 동안 반응시키고 세척하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA substrate solution (Thermo Fisher Scientific, 34028)을 50 µl씩 첨가하여 발색한 뒤 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 50 µl씩 넣어 주어 반응을 종료시키고, Epoch microplate spectrophotometer (BioTek)을 이용해 흡광도를 분석하였다.

[189] 그 결과, 본 발명에서 발굴한 당화 리톡시맵 Fc 변이체들 중 다수가 야생형 리톡시맵 또는 종래의 113F 변이체가 도입된 리톡시맵보다 현저히 향상된 C1q 결합력을 가지는 것을 확인하였으며 (도 5 내지 8), 특히, 리톡시맵 Fc 변이체 3 종 (SV3-8, SV3-10 및 SV3-11)이 가장 높은 C1q 결합력을 나타냈다.

[190]

[191] 실시예 5. 리톡시맵-변이체들의 FcRn에 대한 결합력 분석

[192] 발굴된 Fc 변이체 SV3-8, SV3-10 및 SV3-11가 포함된 리톡시맵-Fc 변이체들의 pH-의존적 인간 FcRn에 대한 결합력을 확인하기 위해 ELISA 분석을 수행하였다. 구체적으로, 0.05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9.6)에 4 µg/ml로 희석한 hFcRn-GST를 각각 50 µl씩 flat bottom polystyrene High Bind 96 well microplate (Costar, 3590)에 4°C로 16 시간 동안 인큐베이션하여 고정화한 후 100 µl의 1×PBS (pH 7.4)에 희석된 4% 스킴 밀크 (GenomicBase, SKI400)로 상온에서 2 시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST (pH 7.4) 150 µl로 4 회 세척한 뒤, 1×PBS (pH 7.4)에 희석된 1% 스킴 밀크에 20 µg/ml로 희석된 야생형 리톡시맵 (RTX-1), 리톡시맵-3HY (RTX-3), 리톡시맵-

Fc 변이체들 SV3-8, SV3-10 및 SV3-11 을 50  $\mu$ l씩 각 well에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 0.05% PBST (pH 6.0/pH 7.4) 100  $\mu$ l로 4 회씩 세척한 뒤, 1xPBS에 희석된 1% 스킵 밀크 (pH 6.0/pH 7.4)에 희석된 HRP-Protein L(GenScript, M00098) 50  $\mu$ l을 이용해 상온에서 각각 1 시간 동안 항체 반응을 진행하고 0.05% PBST (pH 6.0/pH 7.4) 100  $\mu$ l로 4 회 세척하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA substrate solution (Thermo Fisher Scientific, 34028)를 50  $\mu$ l씩 첨가하여 발색한 뒤 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 50  $\mu$ l씩 넣어주어 반응을 종료시키고, Epoch microplate spectrophotometer (BioTek)를 이용해 흡광도를 분석하였다.

[193] 그 결과, 리톡시맵-Fc 변이체들이 야생형 리톡시맵과 유사하게 pH-의존적 FcRn 결합이 유지되는 것을 확인하였다 (도 9).

[194]

[195] 실시예 6. 리톡시맵-변이체들의 CDC 활성 분석

[196] 발굴된 Fc 변이체 SV3-8, SV3-10 및 SV3-11가 포함된 리톡시맵-Fc 변이체들의 보체 의존적 세포독성(Complement-dependent cytotoxicity, CDC) 활성을 확인하기 위해, CDC 분석을 수행하였다. 구체적으로, RPMI-1640(Gibco, 11875119) 및 complement sera human (Sigma-Aldrich, S1764-5X1ML)를 4:1의 비율로 섞어 20% human serum complement를 제작하고, 제작한 20% human serum complement에 표적 암세포주 (Ramos 또는 Daudi)를 분주하고 V bottom 96 well cell culture plate (Corning, 3894)에 웰당 100  $\mu$ l로  $5 \times 10^5$  개의 세포를 분주하였다. 이 후, 20% human serum complement에 준비한 야생형 리톡시맵 (RTX-WT), 리톡시맵-Fc 변이체인 RTX-1(IgG1의 T299L 변이체인 리톡시맵), SV3-8, SV3-10 및 SV3-11를 각각 20  $\mu$ l씩 각 웰에 분주하여 최종 리톡시맵-Fc 변이체의 농도가 각각 1.25  $\mu$ g/ml 혹은 5  $\mu$ g/ml가 되게 하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 2시간 동안 인큐베이션한 뒤, 파쇄된 암세포들에 Annexin V binding buffer (Biolegend, 422201)에 0.5 $\mu$ g/ml로 희석한 FITC Annexin V 및 7-AAD (BioLegend, 640922)를 각 웰에 120  $\mu$ l씩 분주한 뒤, 상온에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 이 후, 400xg로 5분 동안 원심분리하여 상등액을 버리고, Annexin V binding buffer 100  $\mu$ l를 각 웰에 처리하여 세포를 풀고, Annexin V binding buffer에 6% formaldehyde (Sigma-Aldrich, 252549)를 희석하여 준비한 고정액을 100  $\mu$ l씩 각 웰에 추가하여 파이프팅을 통해 잘 섞어준 뒤, 15분 동안 상온에서 인큐베이션하였다. 400xg로 5분 동안 원심분리하여 상등액을 버리고, 500  $\mu$ l의 annexin V binding buffer로 세포를 쏜 뒤, FACS lyric으로 FITC 및 7-AAD 형광 신호를 분석하여 세포독성(cytotoxicity)을 계산하였다.

[197] 그 결과, 본 발명의 리톡시맵-Fc 변이체들 모두 야생형 리톡시맵에 비해 현저히 향상된 CDC 활성을 나타내는 것을 확인하였다 (도 10 및 11).

[198]

[199] 실시예 7. C1q 결합력 향상 Fc 변이체 라이브러리 구축

- [200] CHO 세포 Fc 디스플레이 시스템을 통해 당화 Fc를 엔지니어링하고, 상기 실시예 1 내지 6에서 발굴한 리톡시맵-Fc 변이체들보다 C1q 결합력이 더욱 향상된 당화 Fc 변이체를 선별하기 위해 SV3-8 변이체 (IgG3 Fc 도메인 기준 S384N 및 N392K의 변이) 및 SV3-10 변이체 (IgG3 Fc 도메인 기준 N392K 및 I422V 변이)를 바탕으로 무작위 돌연변이를 도입하여 라이브러리를 제작하였다. 구체적으로, 돌연변이 도입 부위에 따라 두 종류의 라이브러리를 분류하였다: 1) E-Library: SV3-8 또는 SV3-10 변이체의 Fc 전체 영역에 대해 error-prone PCR을 통해 무작위 돌연변이를 도입하여 구축; 및 2) F-Library: SV3-8 및 SV3-10 변이체의 Fc 영역 중 직접적으로 C1q 결합에 관여하는 부위에만 집중적으로 무작위 돌연변이를 각각 도입하여 구축된 F8-Library 및 F10-Library에 대해 각각 1R sorting을 진행한 뒤 합쳐서 구축 (도 12). 라이브러리 유전자는 Fc 안정적 발현 CHO 세포주 제조 방법과 동일한 방법으로 FLP 발현 플라스미드와 공동-트랜스펙션(co-transfection)한 후 하이그로마이신(hygromycin)-B 배지를 이용한 선별 과정을 거쳐 당화 Fc 변이체 라이브러리를 안정적으로 발현하는 CHO 세포주를 각각 제작하였다 (도 13).
- [201]
- [202] 실시예 8. C1q 결합력이 더욱 향상된 Fc 변이체의 최종 선별
- [203] 상기 실시예 7에서 CHO 세포 Fc 디스플레이 시스템을 이용하여 제작한 CHO 세포주를 이용하여 C1q 결합력이 향상된 Fc를 선별하기 위해, 당화 Fc 변이체 라이브러리를 안정적으로 발현하는 CHO 세포주에 C1q-Alexa647의 결합을 유도한 뒤, C1q 결합을 모니터링하여 두 라이브러리 (E 및 F)를 각각 4R의 FACS sorting을 수행하였다. 이를 통해, 우수한 C1q 결합력을 보일 것으로 예상되는 세포 집단(population)을 선별하였고, 선별된 당화 Fc 변이체 발현 CHO 세포들을 genomic DNA prep.을 통해 회수한 뒤, 염기서열을 확인하여 engineered Fc 변이체들을 선별하였다 (도 14). 선별된 Fc 변이체들에 포함된 돌연변이들이 Fc-C1q 결합에 끼치는 영향을 분석한 뒤, 가장 최적의 돌연변이 조합을 통해 C1q 결합력이 더욱 향상된 Fc 변이체로서 최종적으로 Fc 변이체 EFS11 (IgG3 Fc 도메인 기준 H268Y, K326N, R435H 및 F436Y) 및 EFS16 (IgG3 Fc 도메인 기준 D249N, M252I, H268Y, K326N, R435H 및 F436Y)를 선별하였다 (도 15).
- [204]
- [205] 실시예 9. 최종 선별된 Fc 변이체가 포함된 리톡시맵-Fc 변이체들의 C1q 결합력 분석
- [206] EFS11 변이체가 포함된 리톡시맵-Fc 변이체 (RTX-EFS11) 및 EFS16 변이체가 포함된 리톡시맵-Fc 변이체 (RTX-EFS16)의 생리화학적 조건 하의 C1q 결합능을 평가하기 위해, 1xPBS에 CD20<sup>+</sup> 표적 암세포주(Daudi)를 현탁하고, 1 µg/ml의 C1q와 최종 농도 1.25 µg/ml의 RTX-EFS11 및 RTX-EFS16를 각각 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후 세포들을 원심분리하여 1% BSA-PBS로 한 번 세척한 뒤, FITC anti-C1q (Invitrogen, PA1-29720)과 50:1 비율로 혼합하여 30분 동안 얼음 위

에서 염색하고, 세척한 후에 FACS Lyric (BioTek)을 사용하여 분석하였다. 이 때, 비교를 위해, Amgen에서 개발된 KWES 변이체 (IgG1 기준 K326W 및 E333S) 및 Xencor에서 개발된 EFTAE 변이체 (IgG1 기준 S267E, H268F, S324T, G236A 및 I332E)를 이용하였다 (도 15).

[207] 그 결과, 본 발명에서 최종 선별한 Fc 변이체 EFS11를 포함하는 리톡시맙 및 EFS16를 포함하는 리톡시맙이 종래의 KWES 변이체를 포함하는 리톡시맙 및 EFTAE 변이체를 포함하는 리톡시맙에 비해 향상된 C1q 결합력을 가지는 것을 확인하였다 (도 16).

[208]

[209] 실시예 10. 최종 선별된 Fc 변이체가 포함된 리톡시맙-Fc 변이체들의 CDC 활성 분석

[210] 최종 선별한 EFS11 변이체가 포함된 리톡시맙-Fc 변이체 (RTX-EFS11) 및 EFS16 변이체가 포함된 리톡시맙-Fc 변이체 (RTX-EFS16)의 보체 의존적 세포 독성(Complement-dependent cytotoxicity, CDC) 활성을 확인하기 위해, CDC 분석을 상기 실시예 6에 기재된 방법으로 수행하였으며, 활성 비교를 위해, Amgen에서 개발된 KWES 변이체 (IgG1 기준 K326W 및 E333S) 및 Xencor에서 개발된 EFTAE 변이체 (IgG1 기준 S267E, H268F, S324T, G236A 및 I332E)를 이용하였다.

[211] 그 결과, 본 발명에서 최종 선별한 Fc 변이체 EFS11를 포함하는 리톡시맙 및 EFS16를 포함하는 리톡시맙이 종래의 KWES 변이체를 포함하는 리톡시맙 및 EFTAE 변이체를 포함하는 리톡시맙에 비해 향상된 CDC 활성을 가지는 것으로 나타났다 (도 17).

[212]

[213] 실시예 11. 최종 선별된 Fc 변이체가 포함된 리톡시맙-Fc 변이체들의 FcγRIIIa 및 FcγRIIa 결합력 분석

[214] 최종 선별한 EFS11 변이체가 포함된 리톡시맙-Fc 변이체 (RTX-EFS11) 및 EFS16 변이체가 포함된 리톡시맙-Fc 변이체 (RTX-EFS16)의 FcγRIIIa 및 FcγRIIa에 대한 결합력을 확인하기 위해 ELISA 분석을 진행하였다. 구체적으로, 구체적으로, 0.05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9.6)에 4 μg/ml로 희석한 FcγRs-GST (FcγRIIIa-158V-GST 및 FcγRIIa-GST)를 각각 50 μl씩 flat bottom polystyrene High Bind 96 well microplate (Costar, 3590)에 4°C로 16 시간 동안 인큐베이션하여 고정화한 후 100 μl의 4% 스킴 밀크 (GenomicBase, SKI400)로 상온에서 2 시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST 180 μl로 4 회 세척한 뒤, 1% 스킴 밀크로 연속 희석한 당화 리톡시맙-Fc 변이체들 (RTX-EFS11 및 RTX-EFS16)을 각 웰에 50 μl씩 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 세척 후, HRP-Protein L(GenScript, M00098) 50 μl을 이용해 상온에서 각각 1 시간 동안 항체 반응을 진행하고 세척 과정을 수행하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA substrate solution (Thermo Fisher Scientific, 34028)를 50 μl씩 첨가하여 발색한 뒤 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 50 μl씩 넣어주어 반응을 종료시키고, Epoch microplate spectrophotometer (BioTek)를 이용해 흡광도를 분석하였다. 이

때, 비교를 위해 야생형 IgG1 (RTX-IgG1), 리톡시맙-KWES 변이체 및 리톡시맙-EFTAE 변이체를 이용하였다.

- [215] 그 결과, 본 발명에서 최종 선별한 Fc 변이체 EFS11를 포함하는 리톡시맙 및 EFS16를 포함하는 리톡시맙이 야생형 IgG1에 비해 현저하게 높은 FcγRIIIa 결합력과 유사한 정도의 FcγRIIIa 결합력을 가지며, 종래의 변이체에 비해 우수한 FcγRIIIa 및 FcγRIIa에 대한 결합력을 가지는 것으로 나타났다 (도 18 및 19).

## 청구범위

- [청구항 1] 야생형(Wild type) 인간 항체 Fc 도메인에서, 카바트 넘버링 시스템(Kabat numbering system)에 따라 넘버링된 249, 252, 268, 276, 326, 384, 392, 422, 435 및 436 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, 249N, 252I, 276N, 268Y, 276K, 326N, 384N, 384S, 392K, 392N, 422V, 422I, 435H, 435R, 436Y 및 436F로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 항체는 면역글로불린(IgG)인, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 항체는 IgG1 또는 IgG3 동종형인, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 야생형 인간 IgG1 Fc 도메인에서 N276K, N384S, K392N 및 V422I로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서, 야생형 인간 IgG3 Fc 도메인에서 D249N, M252I, H268Y, K276N, K326N, S384N, N392K, I422V, R435H 및 F436Y로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 7] 제 1항에 있어서, 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 C1q와의 결합력이 증가된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 8] 제 1항에 있어서, 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 작용기 기능(effector function)을 증가시키는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 9] 제 8항에 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 10] 제 1항에 있어서, 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 보체 의존적 세포독성(Complement-dependent cytotoxicity, CDC)이 증가된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 11] 제 1항에 있어서, 서열번호 1 내지 8의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 2(C<sub>H</sub>2) 및 서열번호 9 내지 16의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 3(C<sub>H</sub>3)를 포함하는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 12] 제 1항의 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 포함하는, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.
- [청구항 13] 제 12항에 있어서, 야생형 인간 항체에 비해 C1q와의 결합력이 증가된, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.
- [청구항 14] 제 12항에 있어서, 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 미니바디(minibody), 도메인 항체, 이중특이적 항체, 항체 모방체, 키메라 항체, 항체 접합체(conjugation), 인간 항체 또는 인간화 항체인, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.
- [청구항 15] 제 12항에 있어서, 항체는 항-HER2(human epidermal growth factor receptor 2) 항체, 항-EGFR(epidermal growth factor receptor) 항체 또는 항-CD20 항체인, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.
- [청구항 16] 제 12항에 있어서, 항체는 트라스트주맙, 세툽시맙 또는 리툽시맙인, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.
- [청구항 17] 제 1항의 인간 항체 Fc 도메인 변이체, 제 12항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산분자.
- [청구항 18] 제 17항의 핵산분자를 포함하는 벡터.
- [청구항 19] 제 18항의 벡터를 포함하는 숙주세포.
- [청구항 20] 제 1항의 인간 항체 Fc 도메인 변이체, 또는 제 12항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 21] 제 20항에 있어서, 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, 연조직육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

- [청구항 22] a) 제 1항의 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 제조방법.
- [청구항 23] 항체 치료제의 제조에 사용하기 위한, 제 1항의 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 용도.
- [청구항 24] 제 1항의 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 암의 예방 또는 치료 용도.
- [청구항 25] 제 1항의 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 약학적으로 유효한 양으로 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법.

[도 1]

# hFcRn-GST

kDa

250

150

100

75

50

37

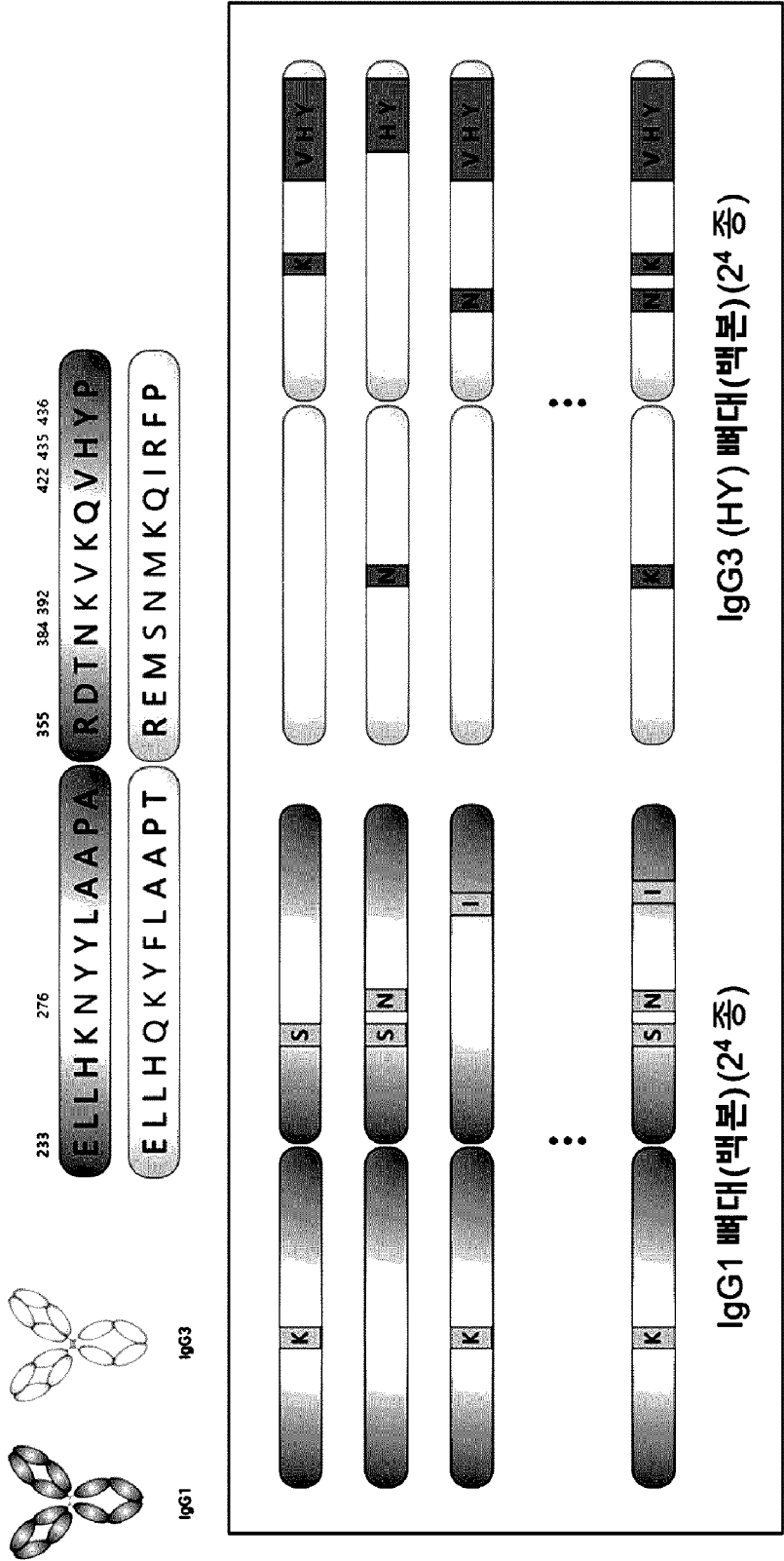
25

20

15



[도2]



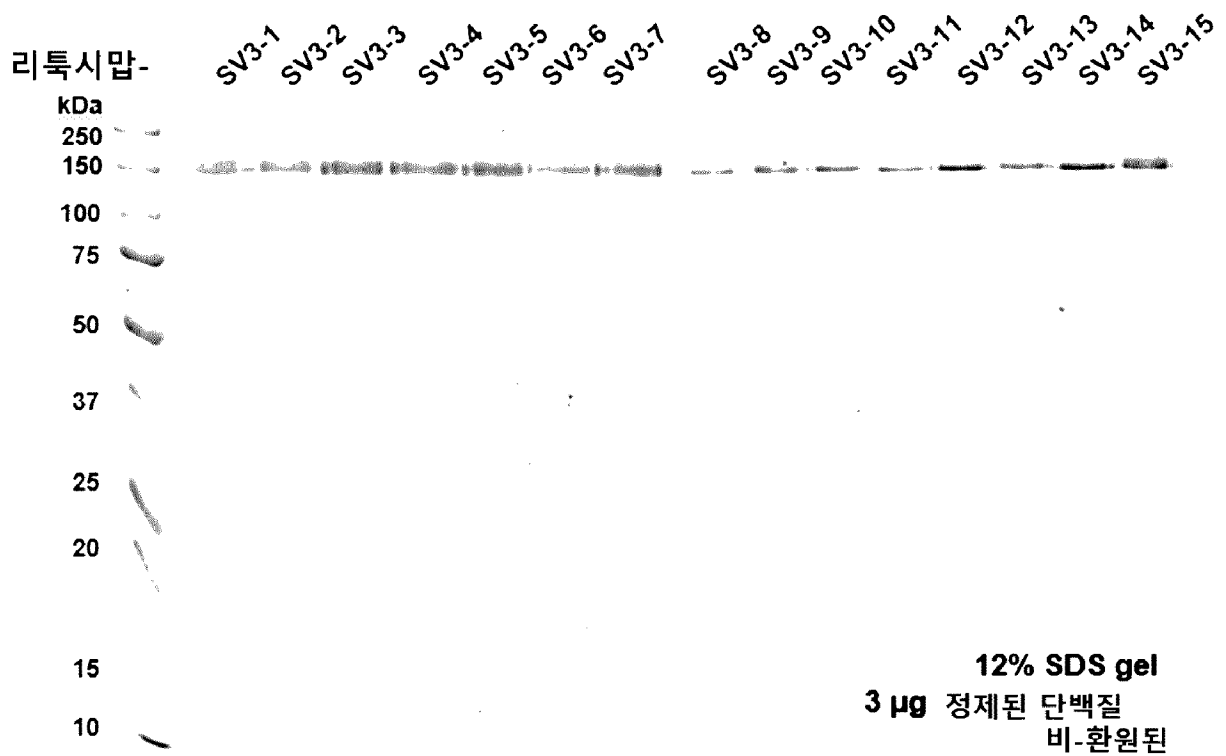
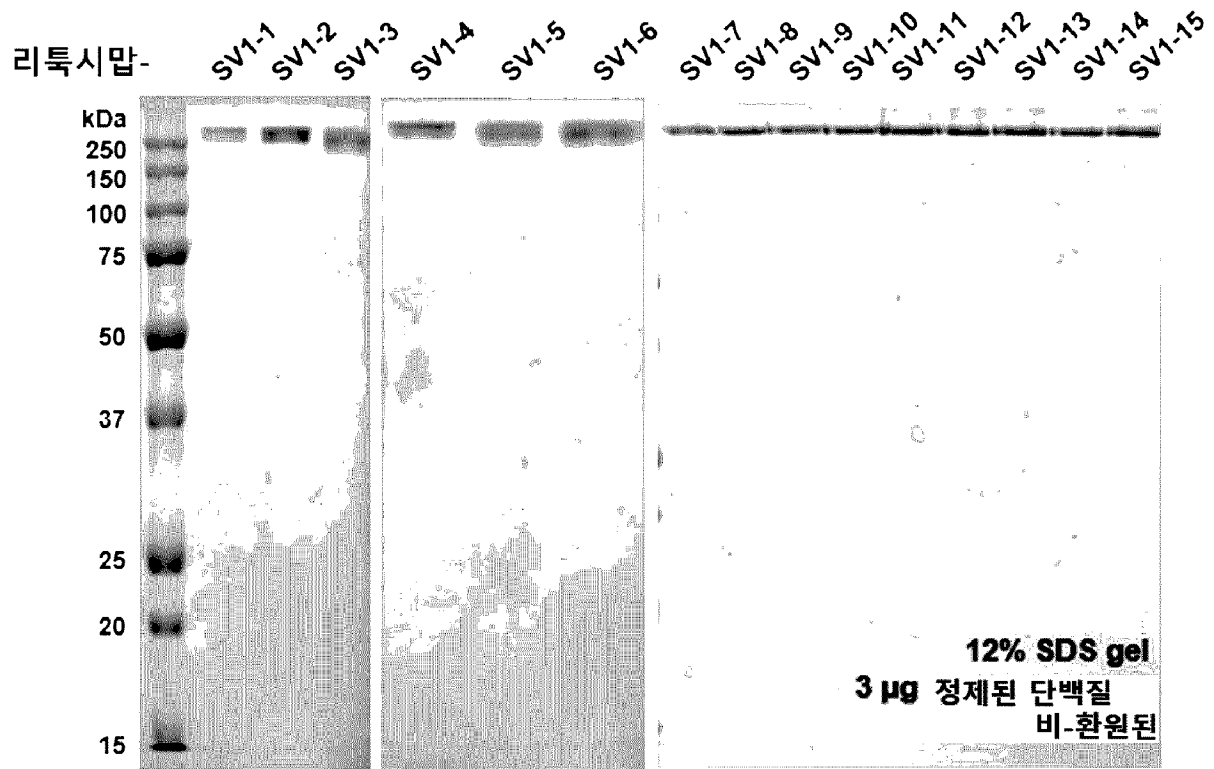
CH2

|            | 230                                                                                                           | 240 | 250 | 260 | 270   | 280 | 290 | 300 | 310 | 320 | 330 | 340 |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| IGG1 Fc    | PAPELGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |     |     |     |       |     |     |     |     |     |     |     |
| IGG3 Fc    | ---                                                                                                           |     |     |     | -Q-K- |     |     | F-  |     |     |     | T-  |
| 113F Fc    | ---                                                                                                           |     |     |     | -Q-K- |     |     | F-  |     |     |     | T-  |
| IGG3-HY Fc | ---                                                                                                           |     |     |     | -Q-K- |     |     | F-  |     |     |     | T-  |
| SV1-1 Fc   | ---                                                                                                           |     |     |     | -K-   |     |     |     |     |     |     |     |
| SV1-2 Fc   | ---                                                                                                           |     |     |     |       |     |     |     |     |     |     |     |
| SV1-3 Fc   | ---                                                                                                           |     |     |     |       |     |     |     |     |     |     |     |
| SV1-4 Fc   | ---                                                                                                           |     |     |     | -K-   |     |     |     |     |     |     |     |
| SV1-5 Fc   | ---                                                                                                           |     |     |     | -K-   |     |     |     |     |     |     |     |
| SV1-6 Fc   | ---                                                                                                           |     |     |     |       |     |     |     |     |     |     |     |
| SV1-7 Fc   | ---                                                                                                           |     |     |     | -K-   |     |     |     |     |     |     |     |
| SV1-8 Fc   | ---                                                                                                           |     |     |     |       |     |     |     |     |     |     |     |
| SV1-9 Fc   | ---                                                                                                           |     |     |     | -K-   |     |     |     |     |     |     |     |
| SV1-10 Fc  | ---                                                                                                           |     |     |     |       |     |     |     |     |     |     |     |
| SV1-11 Fc  | ---                                                                                                           |     |     |     |       |     |     |     |     |     |     |     |
| SV1-12 Fc  | ---                                                                                                           |     |     |     | -K-   |     |     |     |     |     |     |     |
| SV1-13 Fc  | ---                                                                                                           |     |     |     | -K-   |     |     |     |     |     |     |     |
| SV1-14 Fc  | ---                                                                                                           |     |     |     |       |     |     |     |     |     |     |     |
| SV1-15 Fc  | ---                                                                                                           |     |     |     | -K-   |     |     |     |     |     |     |     |
| SV3-1 Fc   | ---                                                                                                           |     |     |     | -Q-   |     |     | F-  |     |     |     | T-  |
| SV3-2 Fc   | ---                                                                                                           |     |     |     | -Q-K- |     |     | F-  |     |     |     | T-  |
| SV3-3 Fc   | ---                                                                                                           |     |     |     | -Q-K- |     |     | F-  |     |     |     | T-  |
| SV3-4 Fc   | ---                                                                                                           |     |     |     | -Q-   |     |     | F-  |     |     |     | T-  |
| SV3-5 Fc   | ---                                                                                                           |     |     |     | -Q-   |     |     | F-  |     |     |     | T-  |
| SV3-6 Fc   | ---                                                                                                           |     |     |     | -Q-K- |     |     | F-  |     |     |     | T-  |
| SV3-7 Fc   | ---                                                                                                           |     |     |     | -Q-   |     |     | F-  |     |     |     | T-  |
| SV3-8 Fc   | ---                                                                                                           |     |     |     | -Q-K- |     |     | F-  |     |     |     | T-  |
| SV3-9 Fc   | ---                                                                                                           |     |     |     | -Q-   |     |     | F-  |     |     |     | T-  |
| SV3-10 Fc  | ---                                                                                                           |     |     |     | -Q-K- |     |     | F-  |     |     |     | T-  |
| SV3-11 Fc  | ---                                                                                                           |     |     |     | -Q-K- |     |     | F-  |     |     |     | T-  |
| SV3-12 Fc  | ---                                                                                                           |     |     |     | -Q-   |     |     | F-  |     |     |     | T-  |
| SV3-13 Fc  | ---                                                                                                           |     |     |     | -Q-   |     |     | F-  |     |     |     | T-  |
| SV3-14 Fc  | ---                                                                                                           |     |     |     | -Q-K- |     |     | F-  |     |     |     | T-  |
| SV3-15 Fc  | ---                                                                                                           |     |     |     | -Q-   |     |     | F-  |     |     |     | T-  |

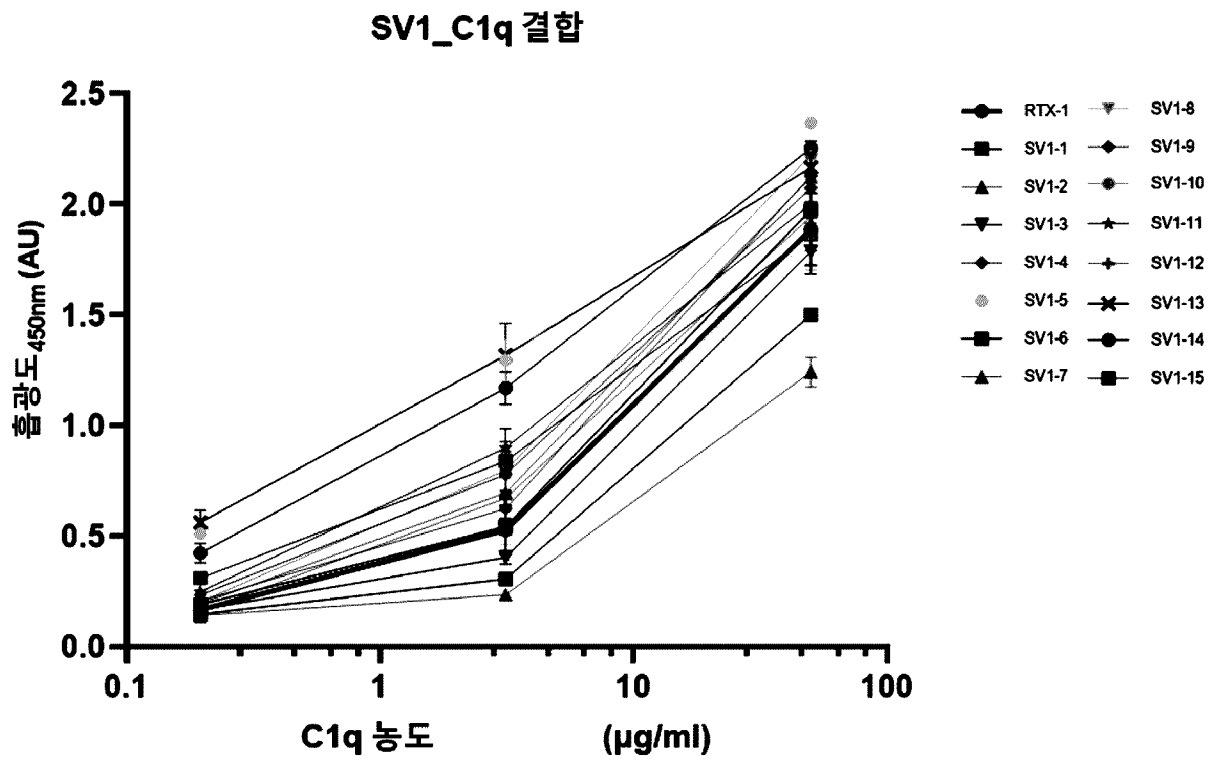
CH3

|            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| IgG1 Fc    | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 | 430 | 440 |
| IgG3 Fc    | --- | E-M | --- | S   | N-M | --- | --- | I   | --- | --- |
| 113F Fc    | --- | E-M | --- | S   | N-M | --- | --- | I   | --- | RF  |
| IgG3-HY Fc | --- | E-M | --- | S   | N-M | --- | --- | I   | --- | --- |
| SV1-1 Fc   | --- | --- | --- | S   | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| SV1-2 Fc   | --- | --- | --- | --- | N   | --- | --- | --- | --- | --- |
| SV1-3 Fc   | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| SV1-4 Fc   | --- | --- | --- | S   | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| SV1-5 Fc   | --- | --- | --- | --- | N   | --- | --- | --- | --- | --- |
| SV1-6 Fc   | --- | --- | --- | S   | N   | --- | --- | --- | --- | --- |
| SV1-7 Fc   | --- | --- | --- | S   | N   | --- | --- | --- | --- | --- |
| SV1-8 Fc   | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | I   | --- | --- |
| SV1-9 Fc   | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | I   | --- | --- |
| SV1-10 Fc  | --- | --- | --- | S   | --- | --- | --- | I   | --- | --- |
| SV1-11 Fc  | --- | --- | --- | --- | N   | --- | --- | I   | --- | --- |
| SV1-12 Fc  | --- | --- | --- | S   | --- | --- | --- | I   | --- | --- |
| SV1-13 Fc  | --- | --- | --- | --- | N   | --- | --- | I   | --- | --- |
| SV1-14 Fc  | --- | --- | --- | S   | N   | --- | --- | --- | --- | --- |
| SV1-15 Fc  | --- | --- | --- | S   | N   | --- | --- | --- | --- | --- |
| SV3-1 Fc   | --- | E-M | --- | S   | N-M | --- | --- | I   | --- | --- |
| SV3-2 Fc   | --- | E-M | --- | --- | N   | --- | --- | I   | --- | --- |
| SV3-3 Fc   | --- | E-M | --- | S   | --- | --- | --- | I   | --- | --- |
| SV3-4 Fc   | --- | E-M | --- | --- | N   | --- | --- | I   | --- | --- |
| SV3-5 Fc   | --- | E-M | --- | S   | --- | --- | --- | I   | --- | --- |
| SV3-6 Fc   | --- | E-M | --- | --- | --- | --- | --- | I   | --- | --- |
| SV3-7 Fc   | --- | E-M | --- | --- | --- | --- | --- | I   | --- | --- |
| SV3-8 Fc   | --- | E-M | --- | S   | N   | --- | --- | --- | --- | --- |
| SV3-9 Fc   | --- | E-M | --- | S   | N   | --- | --- | --- | --- | --- |
| SV3-10 Fc  | --- | E-M | --- | --- | N   | --- | --- | --- | --- | --- |
| SV3-11 Fc  | --- | E-M | --- | S   | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| SV3-12 Fc  | --- | E-M | --- | --- | N   | --- | --- | --- | --- | --- |
| SV3-13 Fc  | --- | E-M | --- | S   | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| SV3-14 Fc  | --- | E-M | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| SV3-15 Fc  | --- | E-M | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |

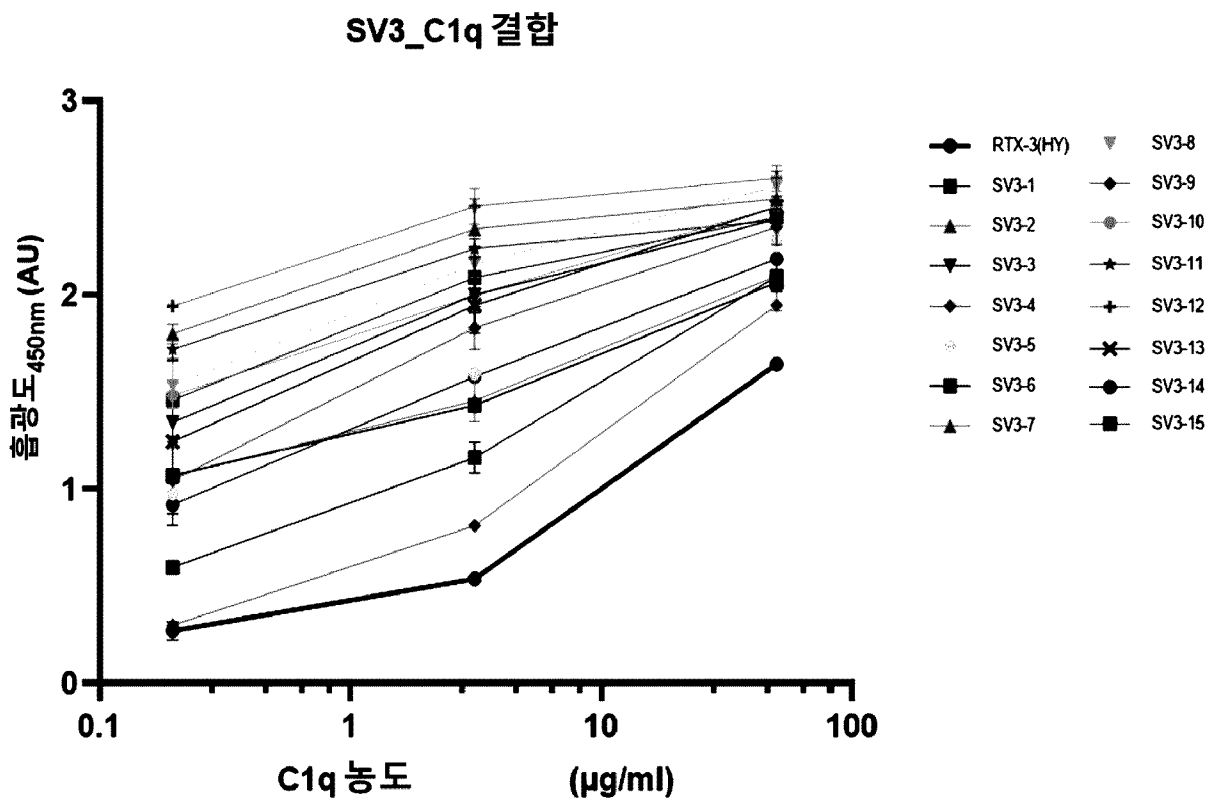
[도4]



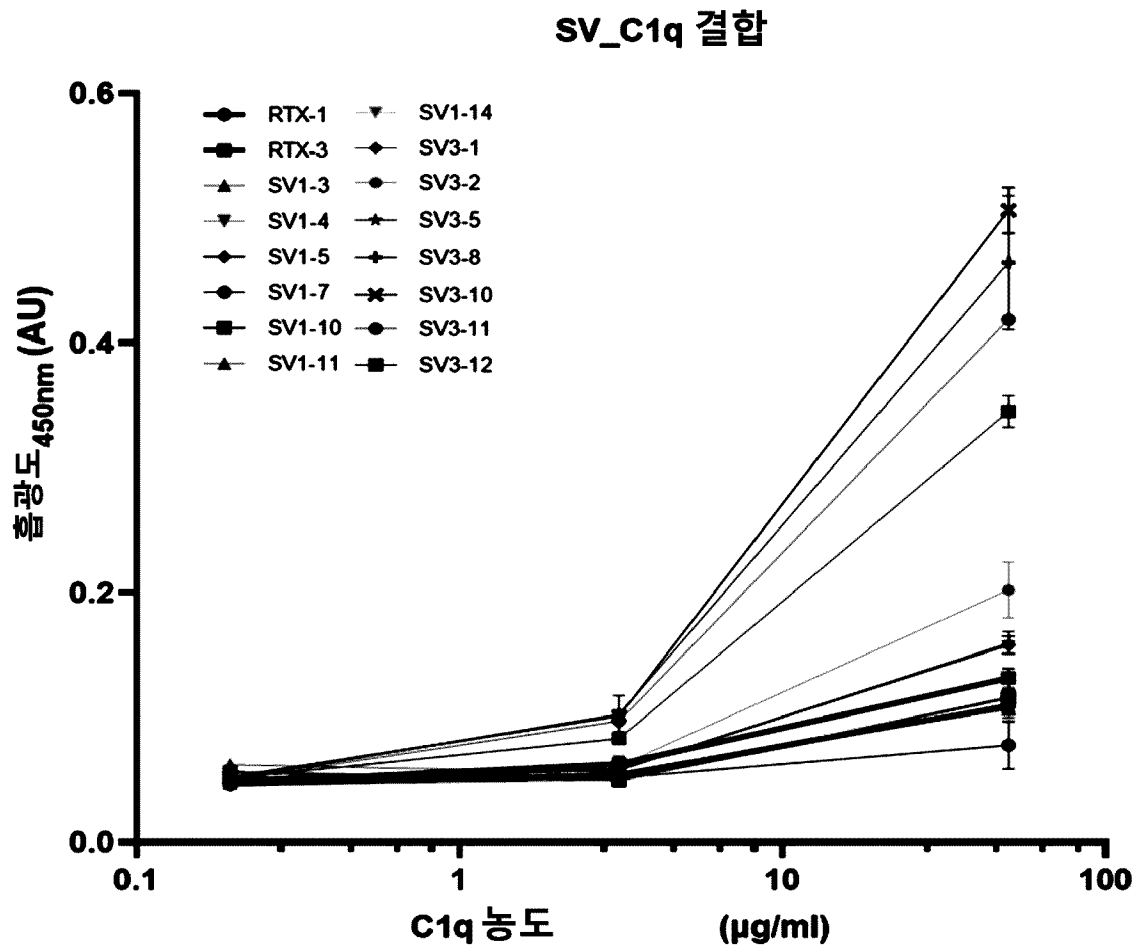
[도5]



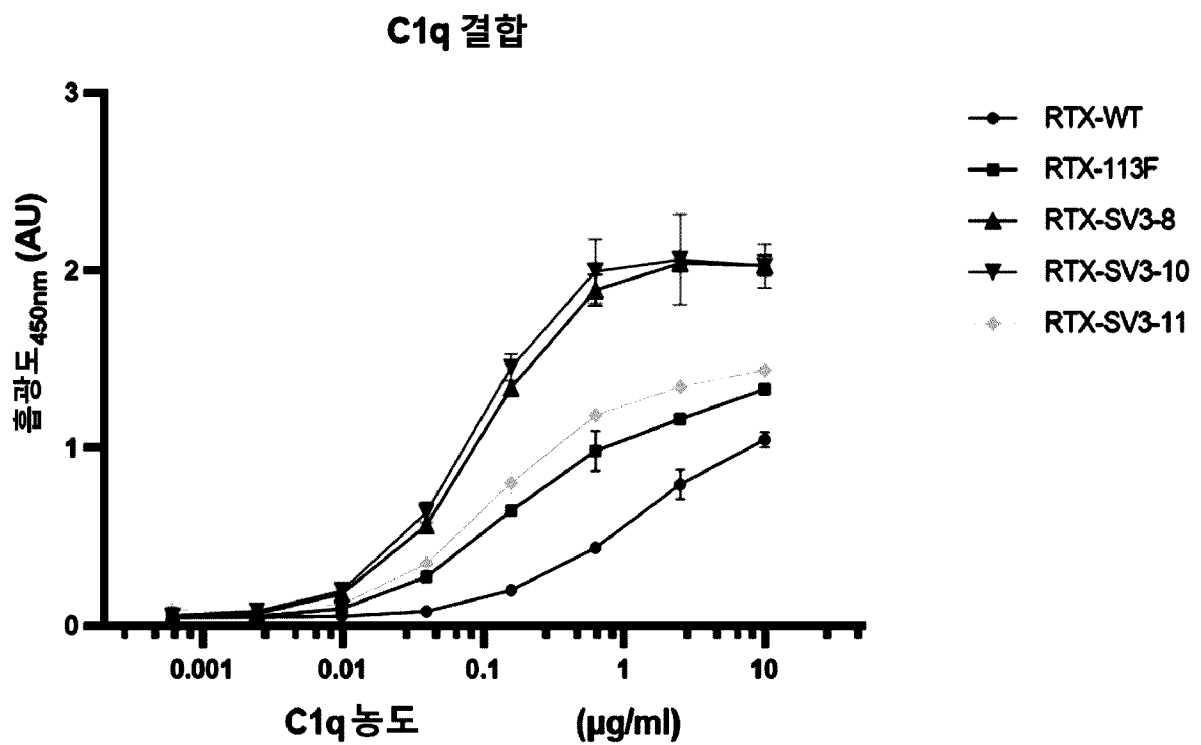
[도6]



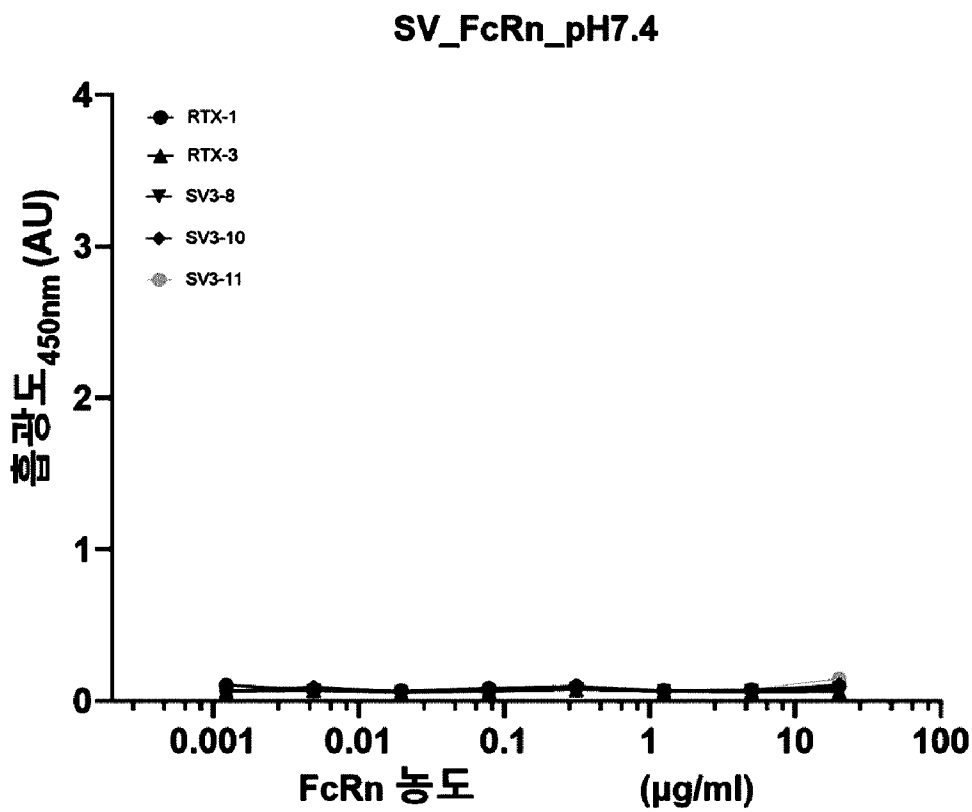
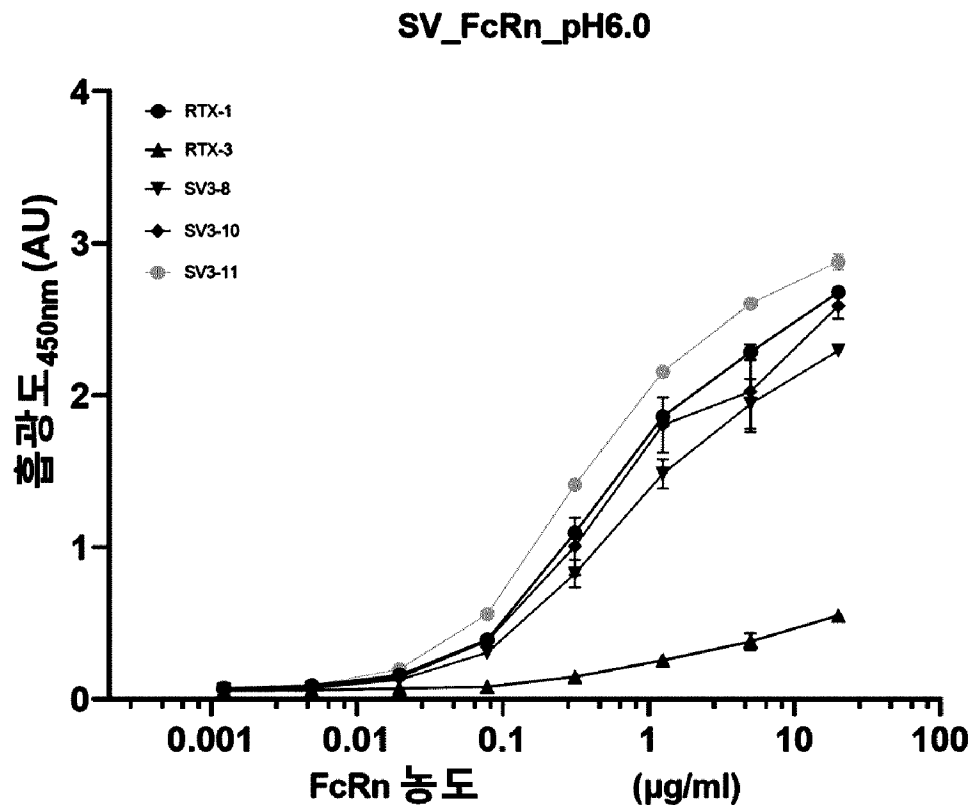
[도7]



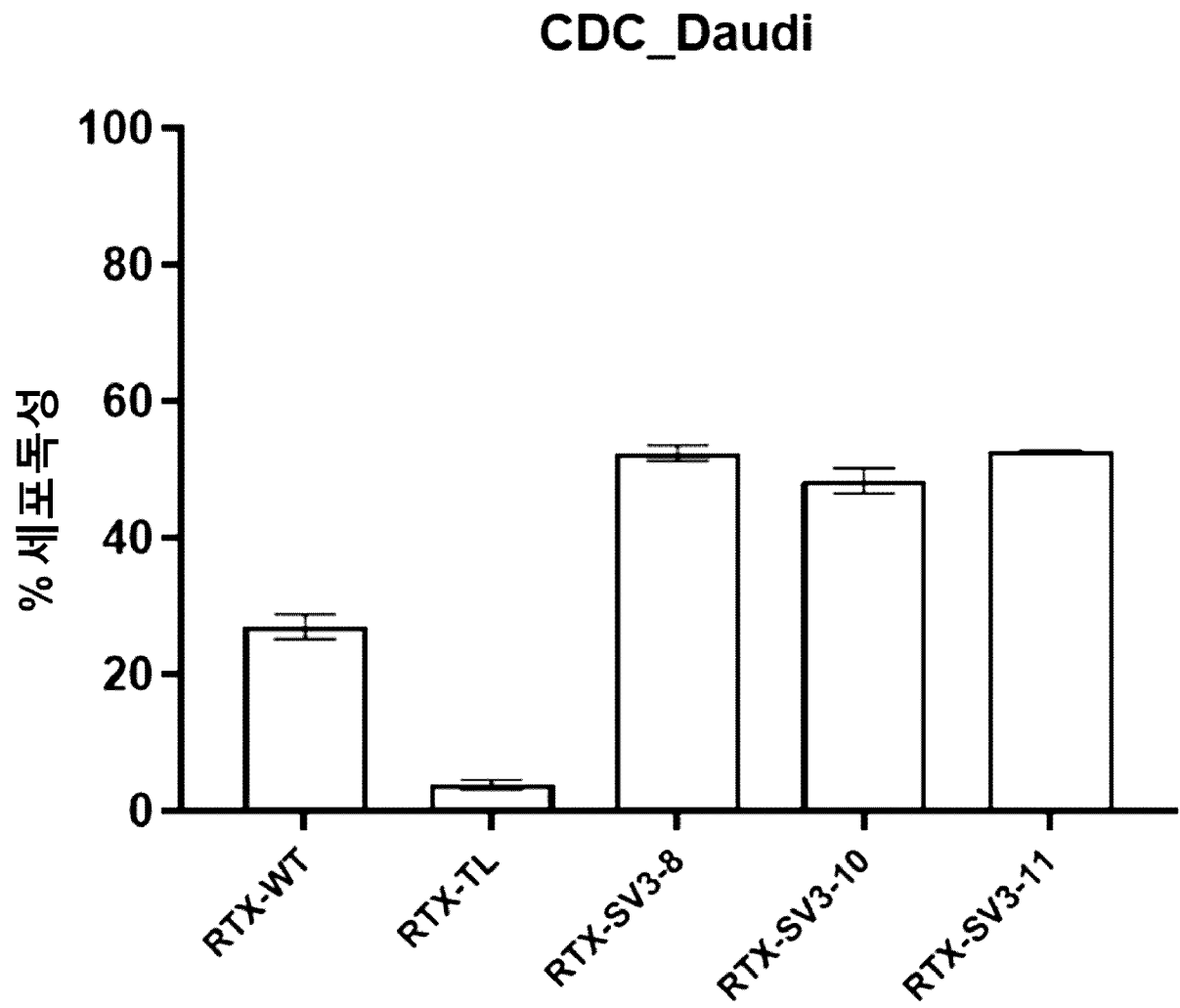
[도8]



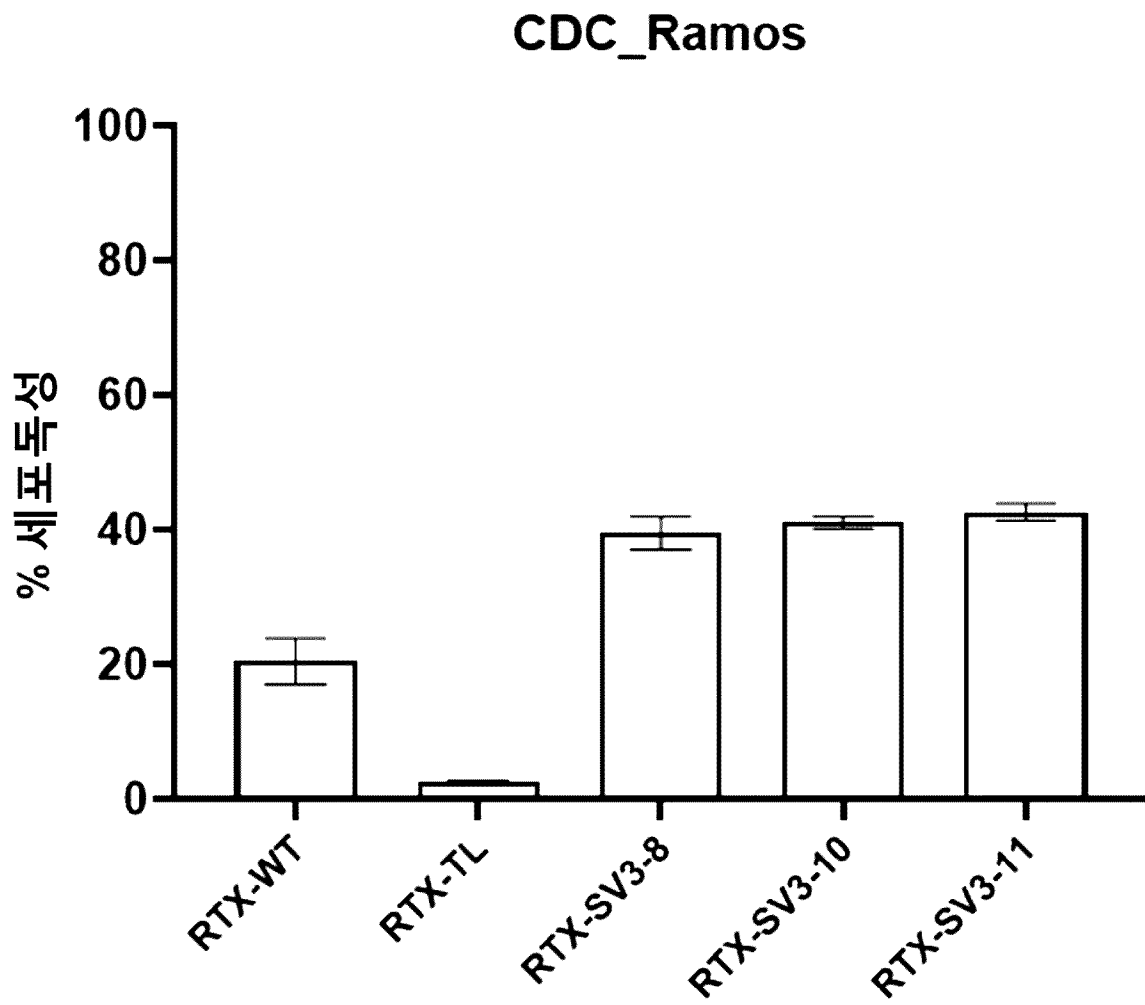
[도9]



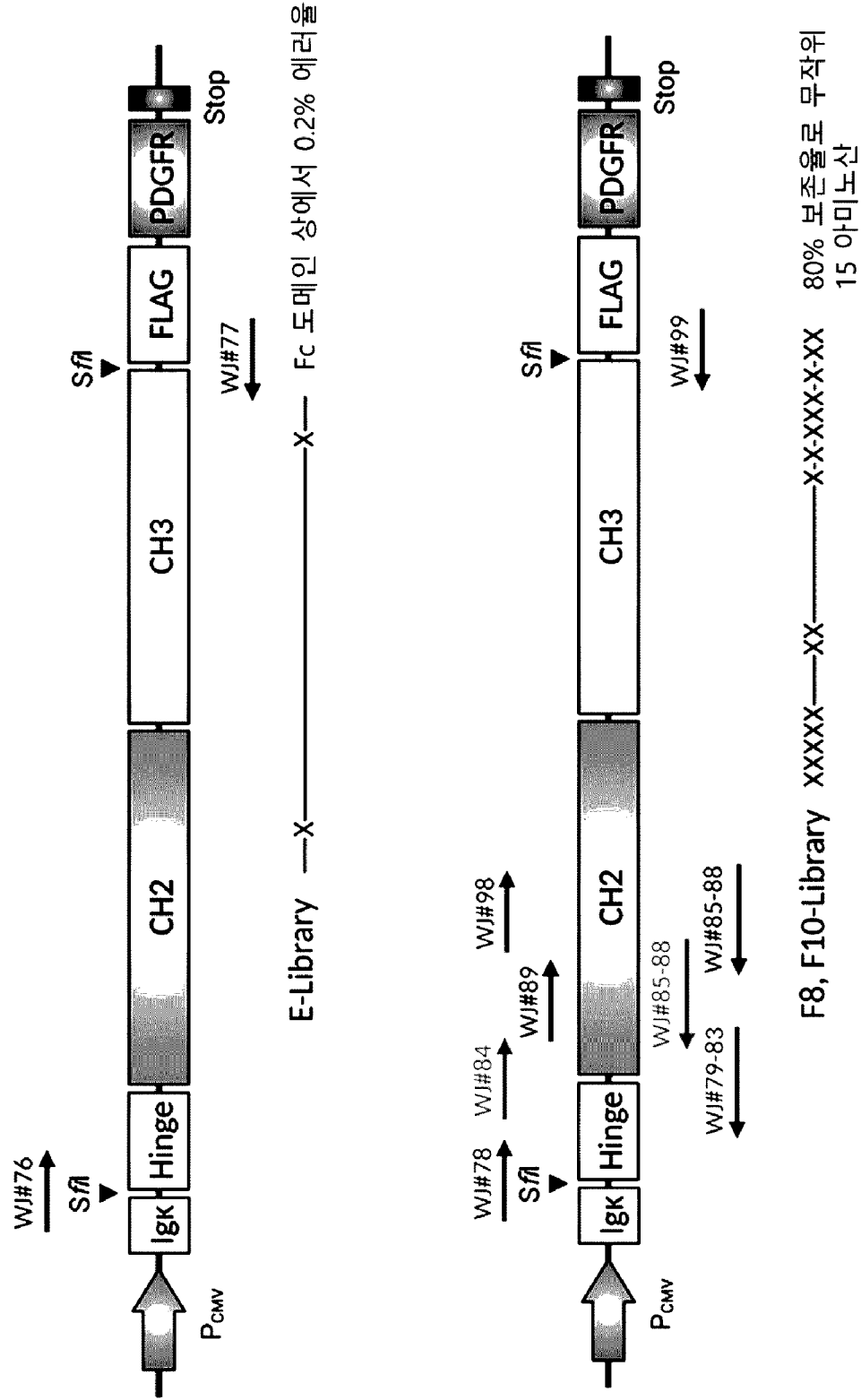
[도10]



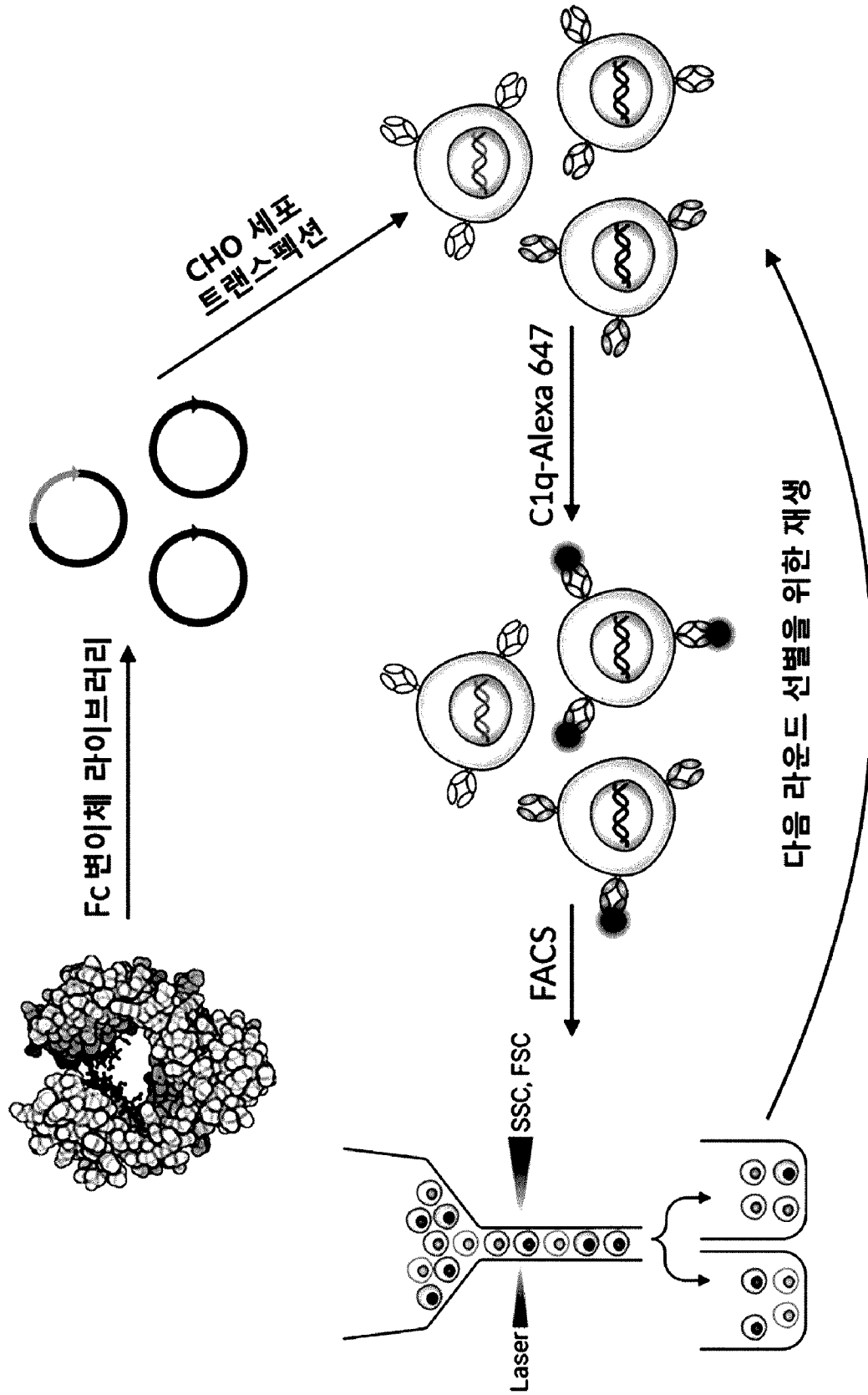
[도11]



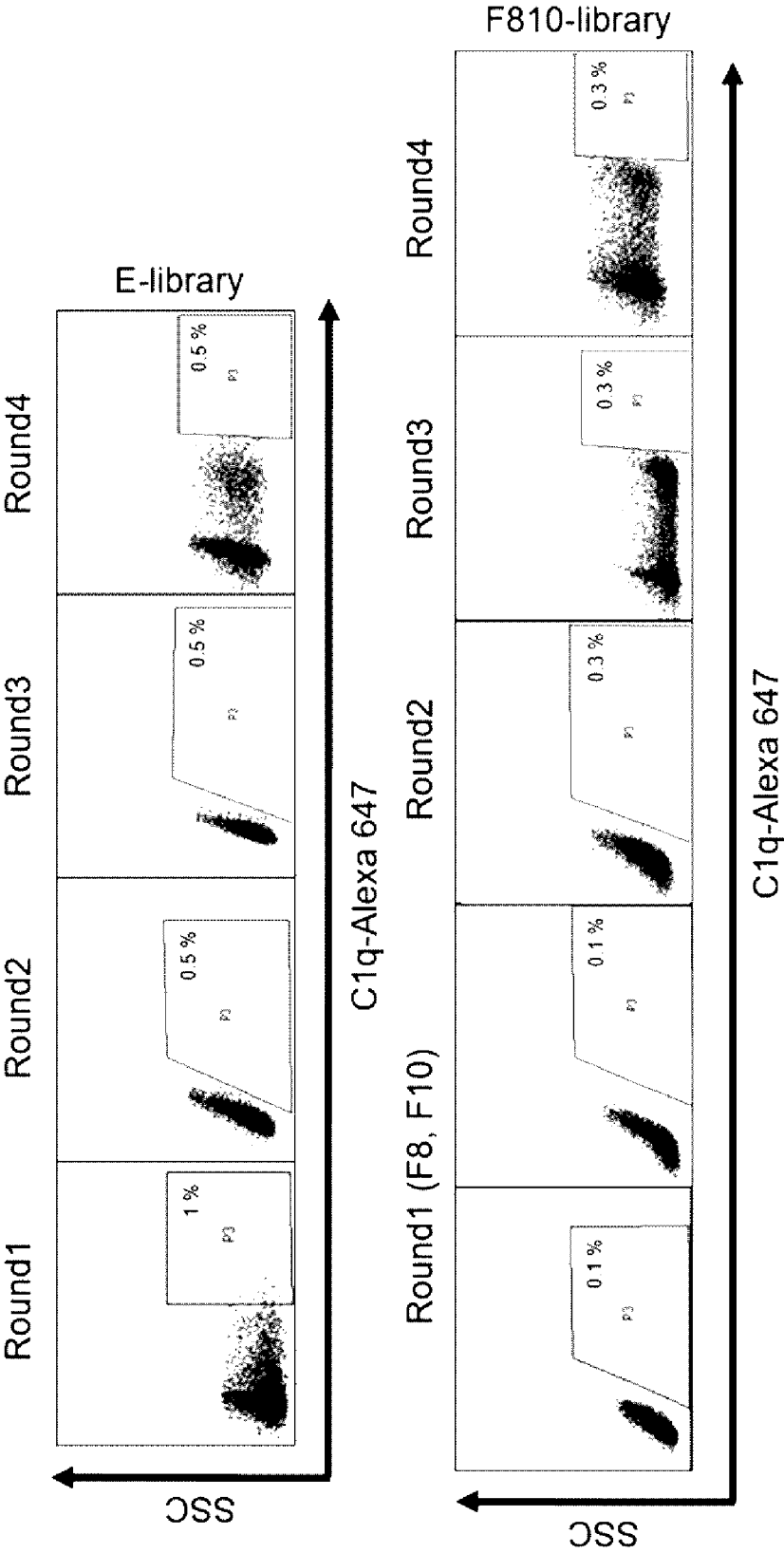
[도12]



[도13]



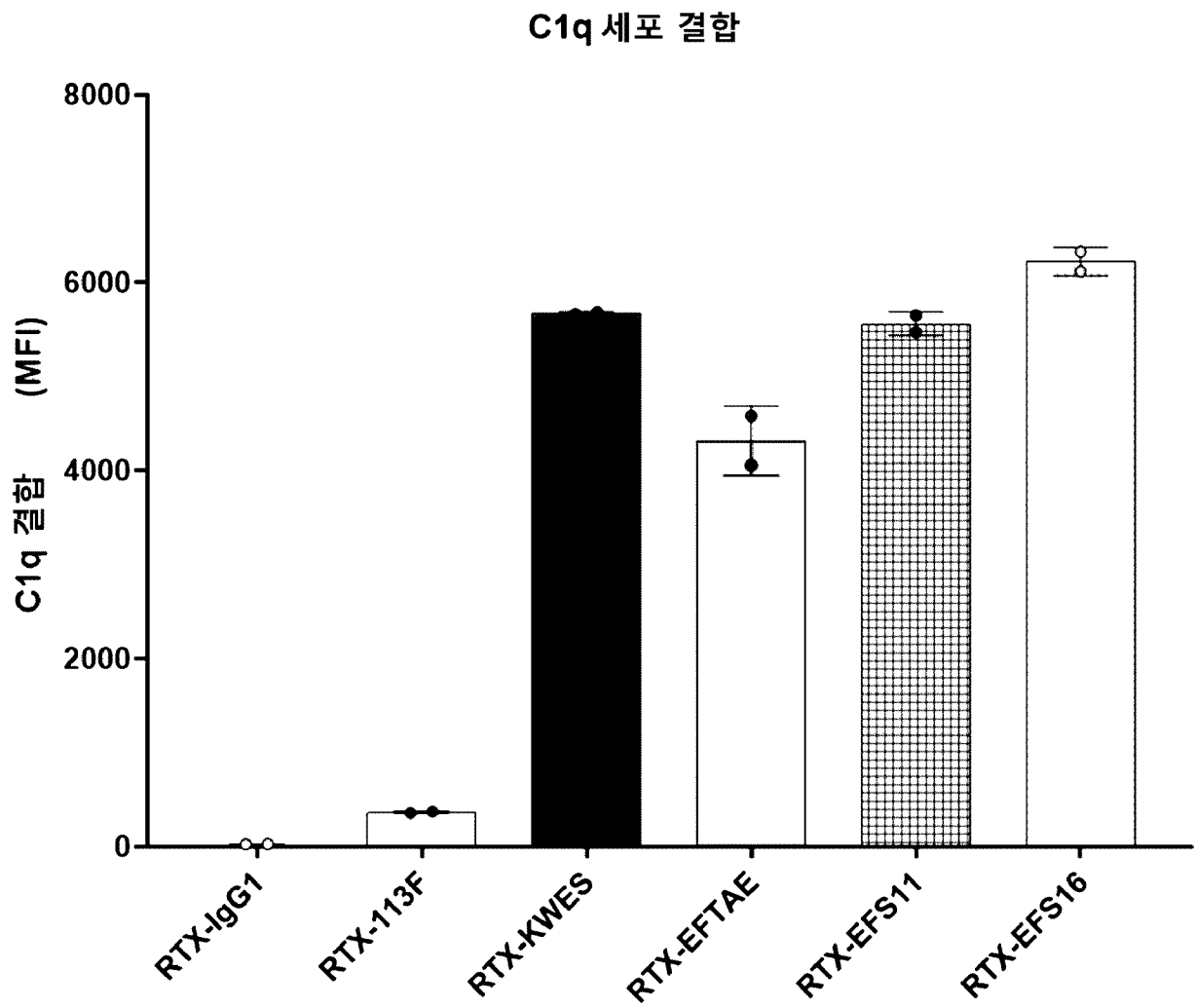
[도14]



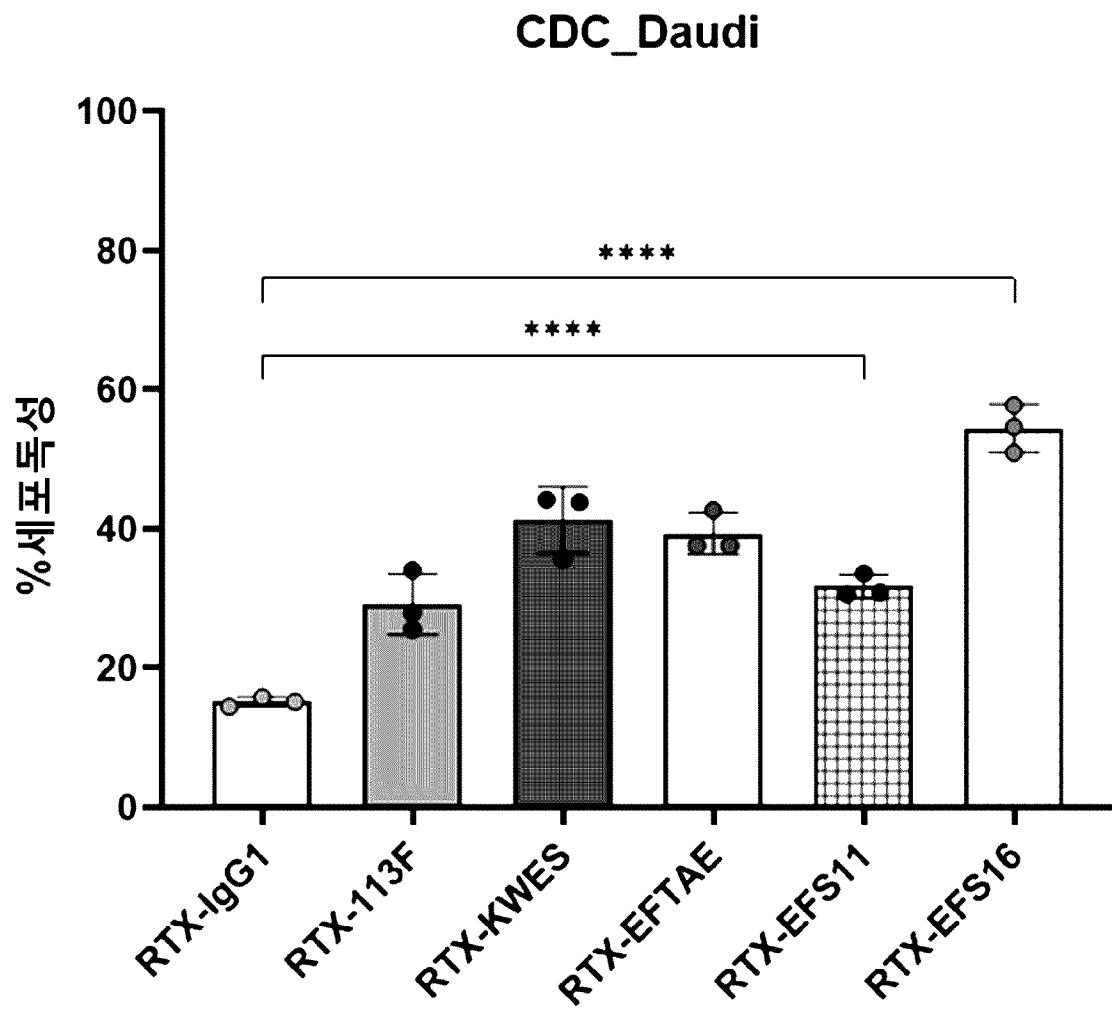
[도15]

| Fc 변이체       | 돌연변이                                |
|--------------|-------------------------------------|
| 야생형 IgG1 Fc  | -                                   |
| KWES         | K326W/E333S                         |
| EFTAE        | S267E/H268F/S324T/G236A/I332E       |
| 야생형 IgG3 Fc  | -                                   |
| IgG3 (HY) Fc | R435H/F436Y                         |
| EFS11        | H268Y/K326N/R435H/F436Y             |
| EFS16        | D249N/M252I/H268Y/K326N/R435H/F436Y |

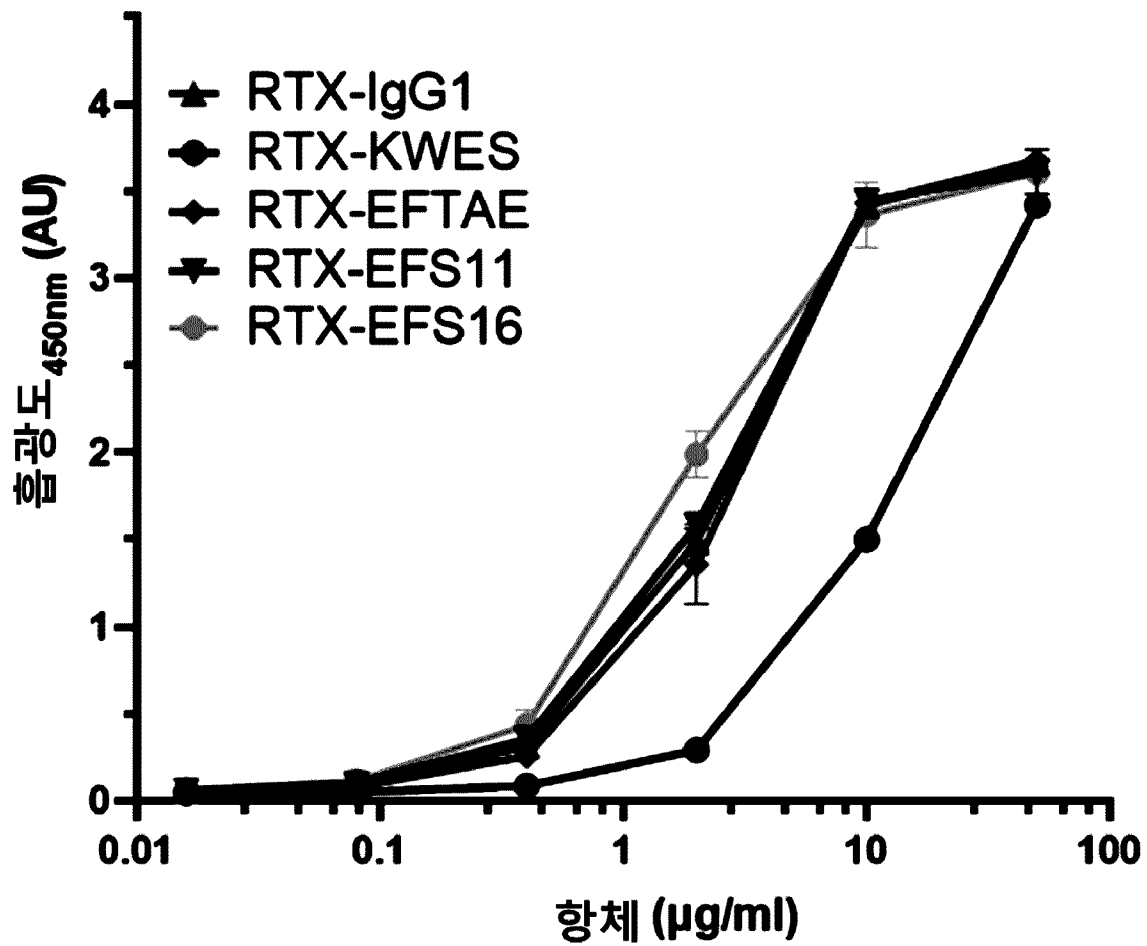
[도16]



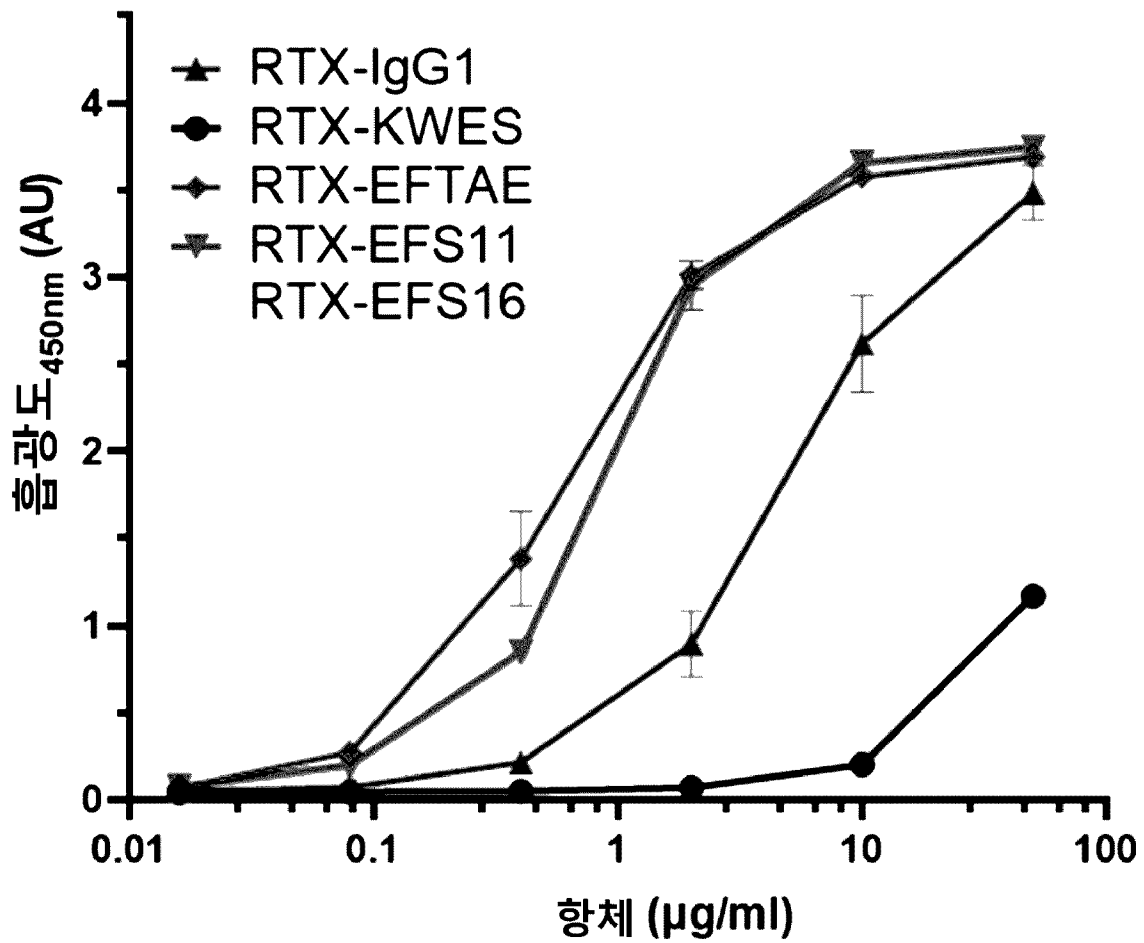
[도17]



[도18]

**FcγRIIIa 결합**

[도 19]

**FcγRIIa 결합**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/003485

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C07K 16/18(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/18(2006.01); C07K 16/00(2006.01); C07K 16/12(2006.01); C07K 16/28(2006.01); C07K 16/32(2006.01);  
C07K 16/46(2006.01); C12P 21/00(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: Fc 변이체(Fc variant), C1q, CDC(complement dependent cytotoxicity), 항체  
(antibody), 암(cancer)**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                           | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | US 2017-0362323 A1 (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.) 21 December 2017 (2017-12-21)<br>See paragraphs [0003], [0052], [0054], [0063], [0117], [0142], [0153], [0160], [0185],<br>[0209], [0211] and [0341]; and figure 22B.                                                       | 1-5,7-24              |
| A         |                                                                                                                                                                                                                                                                              | 6                     |
| X         | SAITO, Seiji et al. A stable engineered human IgG3 antibody with decreased aggregation during antibody<br>expression and low pH stress. Protein Science. 22 March 2019 (online publication date), vol. 28, pp. 900-<br>909.<br>See pages 901-902, 904 and 907; and figure 8. | 1-4,6-10,12-24        |
| X         | US 2017-0226195 A1 (LYDON, Nicholas B.) 10 August 2017 (2017-08-10)<br>See paragraphs [0123], [0201] and [0208]; and claims 31-35 and 40-41.                                                                                                                                 | 1-10,12-14,17-24      |
| X         | US 2010-0184959 A1 (GULER-GANE, Gulin et al.) 22 July 2010 (2010-07-22)<br>See paragraphs [0040]-[0042], [0115]-[0119], [0123] and [0141]; and claims 35, 37, 39-40<br>and 47.                                                                                               | 1-5,7-10,12-24        |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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

26 June 2024

Date of mailing of the international search report

01 July 2024

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro,  
Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2024/003485**

### C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                              | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | US 2017-0166655 A1 (XENCOR, INC.) 15 June 2017 (2017-06-15)<br>See paragraphs [0010], [0042] and [0084]-[0086]. | 1-4,6,12,14-24        |
| <hr/>     |                                                                                                                 |                       |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2024/003485**

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

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

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2024/003485**

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

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

1. ☒ Claims Nos.: **25**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Claim 25 pertains to a method for treatment of the human body by therapy (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/KR2024/003485**

| Patent document<br>cited in search report |              |    | Publication date<br>(day/month/year) | Patent family member(s) |                   | Publication date<br>(day/month/year) |
|-------------------------------------------|--------------|----|--------------------------------------|-------------------------|-------------------|--------------------------------------|
| US                                        | 2017-0362323 | A1 | 21 December 2017                     | EP                      | 2905290 A1        | 12 August 2015                       |
|                                           |              |    |                                      | EP                      | 2905290 B1        | 04 December 2019                     |
|                                           |              |    |                                      | JP                      | 6273205 B2        | 31 January 2018                      |
|                                           |              |    |                                      | US                      | 10494437 B2       | 03 December 2019                     |
|                                           |              |    |                                      | US                      | 2014-0120581 A1   | 01 May 2014                          |
|                                           |              |    |                                      | US                      | 9714291 B2        | 25 July 2017                         |
|                                           |              |    |                                      | WO                      | 2014-054804 A1    | 10 April 2014                        |
| US                                        | 2017-0226195 | A1 | 10 August 2017                       | EP                      | 2793944 A1        | 29 October 2014                      |
|                                           |              |    |                                      | US                      | 10457723 B2       | 29 October 2019                      |
|                                           |              |    |                                      | US                      | 10913791 B2       | 09 February 2021                     |
|                                           |              |    |                                      | US                      | 10941193 B2       | 09 March 2021                        |
|                                           |              |    |                                      | US                      | 2015-0166640 A1   | 18 June 2015                         |
|                                           |              |    |                                      | US                      | 2016-0068589 A1   | 10 March 2016                        |
|                                           |              |    |                                      | US                      | 2016-0115222 A1   | 28 April 2016                        |
|                                           |              |    |                                      | US                      | 2017-0166629 A1   | 15 June 2017                         |
|                                           |              |    |                                      | US                      | 2020-0291099 A1   | 17 September 2020                    |
|                                           |              |    |                                      | US                      | 2022-0002392 A1   | 06 January 2022                      |
|                                           |              |    |                                      | US                      | 9416171 B2        | 16 August 2016                       |
|                                           |              |    |                                      | US                      | 9988439 B2        | 05 June 2018                         |
|                                           |              |    |                                      | WO                      | 2013-096948 A1    | 27 June 2013                         |
| US                                        | 2010-0184959 | A1 | 22 July 2010                         | EP                      | 2087111 A2        | 12 August 2009                       |
|                                           |              |    |                                      | WO                      | 2008-114011 A2    | 25 September 2008                    |
| US                                        | 2017-0166655 | A1 | 15 June 2017                         | CN                      | 101987870 A       | 23 March 2011                        |
|                                           |              |    |                                      | CN                      | 101987870 B       | 03 July 2013                         |
|                                           |              |    |                                      | EP                      | 1553975 A2        | 20 July 2005                         |
|                                           |              |    |                                      | EP                      | 2064240 A2        | 03 June 2009                         |
|                                           |              |    |                                      | EP                      | 3150630 A1        | 05 April 2017                        |
|                                           |              |    |                                      | JP                      | 2011-188869 A     | 29 September 2011                    |
|                                           |              |    |                                      | JP                      | 2015-187185 A     | 29 October 2015                      |
|                                           |              |    |                                      | JP                      | 5645747 B2        | 24 December 2014                     |
|                                           |              |    |                                      | KR                      | 10-0863776 B1     | 16 October 2008                      |
|                                           |              |    |                                      | KR                      | 10-0890586 B1     | 25 March 2009                        |
|                                           |              |    |                                      | KR                      | 10-0956110 B1     | 10 May 2010                          |
|                                           |              |    |                                      | KR                      | 10-0960560 B1     | 03 June 2010                         |
|                                           |              |    |                                      | KR                      | 10-0973564 B1     | 03 August 2010                       |
|                                           |              |    |                                      | KR                      | 10-0980065 B1     | 03 September 2010                    |
|                                           |              |    |                                      | KR                      | 10-1783272 B1     | 29 September 2017                    |
|                                           |              |    |                                      | KR                      | 10-2005-0071523 A | 07 July 2005                         |
|                                           |              |    |                                      | KR                      | 10-2005-0116400 A | 12 December 2005                     |
|                                           |              |    |                                      | KR                      | 10-2007-0029190 A | 13 March 2007                        |
|                                           |              |    |                                      | KR                      | 10-2007-0116176 A | 06 December 2007                     |
|                                           |              |    |                                      | KR                      | 10-2008-0106371 A | 04 December 2008                     |
|                                           |              |    |                                      | KR                      | 10-2009-0059170 A | 10 June 2009                         |
|                                           |              |    |                                      | KR                      | 10-2011-0061616 A | 09 June 2011                         |
|                                           |              |    |                                      | US                      | 10113001 B2       | 30 October 2018                      |
|                                           |              |    |                                      | US                      | 11566080 B2       | 31 January 2023                      |
|                                           |              |    |                                      | US                      | 2006-0121032 A1   | 08 June 2006                         |
|                                           |              |    |                                      | US                      | 2006-0134105 A1   | 22 June 2006                         |
|                                           |              |    |                                      | US                      | 2007-0237767 A1   | 11 October 2007                      |
|                                           |              |    |                                      | US                      | 2008-0051563 A1   | 28 February 2008                     |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/KR2024/003485**

| Patent document<br>cited in search report | Publication date<br>(day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date<br>(day/month/year) |
|-------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
|                                           |                                      | US 2009-0010920 A1      | 08 January 2009                      |
|                                           |                                      | US 2010-0093979 A1      | 15 April 2010                        |
|                                           |                                      | US 2011-0021755 A1      | 27 January 2011                      |
|                                           |                                      | US 2012-0014943 A1      | 19 January 2012                      |
|                                           |                                      | US 2013-0156758 A1      | 20 June 2013                         |
|                                           |                                      | US 2014-0073768 A1      | 13 March 2014                        |
|                                           |                                      | US 2015-0010543 A1      | 08 January 2015                      |
|                                           |                                      | US 2016-0347825 A1      | 01 December 2016                     |
|                                           |                                      | US 2017-0335013 A1      | 23 November 2017                     |
|                                           |                                      | US 2018-0360981 A1      | 20 December 2018                     |
|                                           |                                      | US 2019-0071512 A1      | 07 March 2019                        |
|                                           |                                      | US 2020-0332024 A1      | 22 October 2020                      |
|                                           |                                      | US 2021-0395363 A1      | 23 December 2021                     |
|                                           |                                      | US 2023-0227560 A1      | 20 July 2023                         |
|                                           |                                      | US 8084582 B2           | 27 December 2011                     |
|                                           |                                      | US 9040041 B2           | 26 May 2015                          |
|                                           |                                      | WO 2005-092925 A2       | 06 October 2005                      |
|                                           |                                      | WO 2006-019447 A1       | 23 February 2006                     |
|                                           |                                      | WO 2007-044616 A2       | 19 April 2007                        |
|                                           |                                      | WO 2008-121160 A2       | 09 October 2008                      |
|                                           |                                      | WO 2010-033736 A1       | 25 March 2010                        |
|                                           |                                      | WO 2014-113510 A1       | 24 July 2014                         |
| -----                                     |                                      |                         |                                      |

## A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 16/18(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i

## B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 16/18(2006.01); C07K 16/00(2006.01); C07K 16/12(2006.01); C07K 16/28(2006.01); C07K 16/32(2006.01);  
C07K 16/46(2006.01); C12P 21/00(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: Fc 변이체(Fc variant), C1q, CDC(complement dependent cytotoxicity), 항체  
(antibody), 암(cancer)

## C. 관련 문헌

| 카테고리*  | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                                                                                                      | 관련 청구항            |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| X<br>A | US 2017-0362323 A1 (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.) 2017.12.21<br>단락 [0003], [0052], [0054], [0063], [0117], [0142], [0153], [0160], [0185], [0209],<br>[0211], [0341]; 도면 22B 참조.                                                 | 1-5,7-24<br><br>6 |
| X      | SAITO, SEIJI 등, 'A stable engineered human IgG3 antibody with decreased aggregation during antibody<br>expression and low pH stress', Protein Science, 2019.03.22(온라인 공개일), 28권, 페이지 900-909<br>페이지 901-902, 904, 907; 도면 8 참조. | 1-4,6-10,12-24    |
| X      | US 2017-0226195 A1 (LYDON, NICHOLAS B.) 2017.08.10<br>단락 [0123], [0201], [0208]; 청구항 31-35, 40-41 참조.                                                                                                                           | 1-10,12-14,17-24  |
| X      | US 2010-0184959 A1 (GULER-GANE, GULIN 등) 2010.07.22<br>단락 [0040]-[0042], [0115]-[0119], [0123], [0141]; 청구항 35, 37, 39-40, 47 참조.                                                                                               | 1-5,7-10,12-24    |
| X      | US 2017-0166655 A1 (XENCOR, INC.) 2017.06.15<br>단락 [0010], [0042], [0084]-[0086] 참조.                                                                                                                                            | 1-4,6,12,14-24    |

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 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.

“&amp;” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2024년06월26일(26.06.2024)

국제조사보고서 발송일

2024년07월01일(01.07.2024)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청  
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동,  
정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-5373

제1기제란      핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
  - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
  - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))
 

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

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

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

1. ☒ 청구항: **25**  
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,  
청구항 25는 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
  
2. ☐ 청구항:  
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
  
3. ☐ 청구항:  
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

| 국제조사보고서에서<br>인용된 특허문헌 | 공개일        | 대응특허문헌               | 공개일        |
|-----------------------|------------|----------------------|------------|
| US 2017-0362323 A1    | 2017/12/21 | EP 2905290 A1        | 2015/08/12 |
|                       |            | EP 2905290 B1        | 2019/12/04 |
|                       |            | JP 6273205 B2        | 2018/01/31 |
|                       |            | US 10494437 B2       | 2019/12/03 |
|                       |            | US 2014-0120581 A1   | 2014/05/01 |
|                       |            | US 9714291 B2        | 2017/07/25 |
|                       |            | WO 2014-054804 A1    | 2014/04/10 |
| US 2017-0226195 A1    | 2017/08/10 | EP 2793944 A1        | 2014/10/29 |
|                       |            | US 10457723 B2       | 2019/10/29 |
|                       |            | US 10913791 B2       | 2021/02/09 |
|                       |            | US 10941193 B2       | 2021/03/09 |
|                       |            | US 2015-0166640 A1   | 2015/06/18 |
|                       |            | US 2016-0068589 A1   | 2016/03/10 |
|                       |            | US 2016-0115222 A1   | 2016/04/28 |
|                       |            | US 2017-0166629 A1   | 2017/06/15 |
|                       |            | US 2020-0291099 A1   | 2020/09/17 |
|                       |            | US 2022-0002392 A1   | 2022/01/06 |
|                       |            | US 9416171 B2        | 2016/08/16 |
|                       |            | US 9988439 B2        | 2018/06/05 |
|                       |            | WO 2013-096948 A1    | 2013/06/27 |
| US 2010-0184959 A1    | 2010/07/22 | EP 2087111 A2        | 2009/08/12 |
|                       |            | WO 2008-114011 A2    | 2008/09/25 |
| US 2017-0166655 A1    | 2017/06/15 | CN 101987870 A       | 2011/03/23 |
|                       |            | CN 101987870 B       | 2013/07/03 |
|                       |            | EP 1553975 A2        | 2005/07/20 |
|                       |            | EP 2064240 A2        | 2009/06/03 |
|                       |            | EP 3150630 A1        | 2017/04/05 |
|                       |            | JP 2011-188869 A     | 2011/09/29 |
|                       |            | JP 2015-187185 A     | 2015/10/29 |
|                       |            | JP 5645747 B2        | 2014/12/24 |
|                       |            | KR 10-0863776 B1     | 2008/10/16 |
|                       |            | KR 10-0890586 B1     | 2009/03/25 |
|                       |            | KR 10-0956110 B1     | 2010/05/10 |
|                       |            | KR 10-0960560 B1     | 2010/06/03 |
|                       |            | KR 10-0973564 B1     | 2010/08/03 |
|                       |            | KR 10-0980065 B1     | 2010/09/03 |
|                       |            | KR 10-1783272 B1     | 2017/09/29 |
|                       |            | KR 10-2005-0071523 A | 2005/07/07 |
|                       |            | KR 10-2005-0116400 A | 2005/12/12 |
|                       |            | KR 10-2007-0029190 A | 2007/03/13 |
|                       |            | KR 10-2007-0116176 A | 2007/12/06 |
|                       |            | KR 10-2008-0106371 A | 2008/12/04 |
|                       |            | KR 10-2009-0059170 A | 2009/06/10 |
|                       |            | KR 10-2011-0061616 A | 2011/06/09 |
|                       |            | US 10113001 B2       | 2018/10/30 |
|                       |            | US 11566080 B2       | 2023/01/31 |
|                       |            | US 2006-0121032 A1   | 2006/06/08 |
|                       |            | US 2006-0134105 A1   | 2006/06/22 |
|                       |            | US 2007-0237767 A1   | 2007/10/11 |
|                       |            | US 2008-0051563 A1   | 2008/02/28 |

**PCT/KR2024/003485**

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2022년 7월)