

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구

국제사무국

(43) 국제공개일

2023년 5월 19일 (19.05.2023)



(10) 국제공개번호

WO 2023/085779 A1

(51) 국제특허분류:

C07K 16/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2022/017565

(22) 국제출원일:

2022년 11월 9일 (09.11.2022)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2021-0153428 2021년 11월 9일 (09.11.2021) KR

(71) 출원인: 한양대학교 산학협력단 (IUCF-HYU (IN-

DUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY)) [KR/KR]; 04763

서울특별시 성동구 왕십리로 222 한양대학교내, Seoul (KR). 주식회사 지뉴브 (GENUV INC.) [KR/KR]; 04520

서울특별시 중구 청계천로 14, Seoul (KR).

(72) 발명자: 류성연 (RYU, Seong Eon); 07225 서울특별시

영등포구 버드나루로 130, 304동 1804호, Seoul (KR).

박정원 (PARK, Jungwon); 41477 대구광역시 북구 서

변로9길 9-8, Daegu (KR). 김명빈 (KIM, Myeongbin); 04808 서울특별시 성동구 천호대로 416, 1101호, Seoul (KR). 박홍록 (PARK, Heungrok); 07967 서울특별시 양

천구 목동중앙로 11, 202동 305호, Seoul (KR). 윤소라

(YOON, Sorah); 05855 서울특별시 송파구 법원로4길 5, 812호, Seoul (KR). 이광현 (LEE, Kwanghyun); 02829 서울특별시 성북구 동소문로27길 1, 5층 36호, Seoul (KR). 박수봉 (PARK, Soobong); 04520 서울특별시 중구 청계천로 14, Seoul (KR). 배동구 (BAE, Donggoo); 04520 서울특별시 중구 청계천로 14, Seoul (KR).

(74) 대리인: 해움특허법인 (HAEUM PATENT & LAW FIRM); 06536 서울특별시 서초구 강남대로 525, 8층, Seoul (KR).

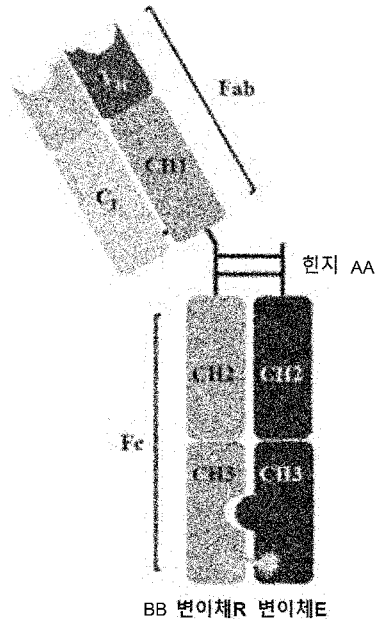
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW,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

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,

(54) Title: HETERODIMER COMPRISING FC MUTANT AND METHOD FOR PREPARING SAME

(54) 발명의 명칭: Fc 변이체를 포함하는 이중이합체 및 이의 제조방법

[도1]



AA ... Hinge
BB ... Mutant R/E

(57) Abstract: The present invention relates to a heterodimer comprising Fc mutants and a method for preparing same. According to the Fc mutants of the present invention, bonding hardly occurs formed between chains having the same sequence whereas bonding strength is improved between chains having different sequences, thereby significantly improving the production yield of heterodimers. In addition, since the structural modification caused by the mutation is minimized in the mutants of the present invention, the mutants have excellent structural similarity with the wild-type Fc region. Accordingly, various types of antibodies having the function of the Fc region maintained therein can be produced in high yield, using the heterodimer formation technology of the present invention.

(57) 요약서: 본 발명은 Fc 변이체를 포함하는 이중이합체 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 Fc 변이체에 따르면, 동일한 서열을 갖는 사슬 간에는 결합이 거의 형성되지 않고 상이한 서열을 갖는 사슬 간에는 결합력이 향상되어 이중이합체의 제조 수율을 현저하게 향상시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 변이체는 변이에 의한 구조 변형을 최소화할 수 있으므로 야생형 Fc 영역과 구조적 유사성이 매우 우수하다. 이에 따라, 본 발명의 이중이합체 형성 기술을 이용하면 Fc 영역의 기능이 유지된 다양한 형태의 항체를 고수율로 제조할 수 있다.

ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM),
유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME,
MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

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

명세서

발명의 명칭: Fc 변이체를 포함하는 이종이합체 및 이의 제조방법 기술분야

- [1] 본 발명은 Fc 변이체를 포함하는 이종이합체 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 야생형의 Fc 영역과 구조적 유사성이 우수하고 이종이합체의 수율이 높은 Fc 변이체를 포함하는 이종이합체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 항체 치료제는 질병의 원인이 되는 항원 에피토프에 결합하는 항체를 이용하여 질병의 진행을 막는 작용 기전을 가지고 있다. 항체 치료제들은 표적 항원에 대한 높은 결합 특이성 및 인체 내 안정성으로 인하여 치료 효능이 우수하고 상대적으로 부작용이 작은 것으로 알려져 있으며, Adalimumab (상품명: Humira)를 비롯한 다수의 항체 치료제들이 큰 성공을 거둔 바 있다.
- [3] 종래의 항체 치료제는 항원에 강하게 결합하여 치료 효능을 향상시키는 전략을 가지고 있는데, 항체 치료제의 적용 범위 및 효능을 더욱 증대시키기 위하여 하나의 항체가 두 개의 상이한 항원에 결합하도록 설계된 항체가 개발되었다. 이와 같이 두 종류의 항원에 결합할 수 있는 항체를 이중특이적 항체(bispecific antibody)라 한다.
- [4] 이중특이적 항체를 이용하면 단일특이적 항체에 비해 특이적 항원 결합 부위를 추가로 가지고 있어 질병과 관련된 조직 또는 세포를 더욱 특이적으로 표적화할 수 있으며 내성에서 보다 자유롭고 치료 효과를 높일 수 있다. 또한, 이중특이적 항체는 표적 세포 및 면역 세포에 동시에 결합하도록 조작될 수 있어 표적 세포에 면역 세포를 근접하게 위치시킬 수 있으며 이에 따라 면역 세포의 활성화를 유도하여 효과적으로 표적 세포를 사멸시킬 수 있다. 이중특이적 항체 치료제의 대표적인 예로는 유럽 등록특허공보 제1315520호에 기재된 이중특이적 항체로서 EpCAM 항원과 T 세포의 CD3에 결합 가능한 Catumaxomab 항체가 있다. 이외에, HER2/neu 항원과 T 세포의 CD3에 결합 가능한 Ertumaxomab 항체 등 다양한 이중특이적 항체가 임상 시험 단계에 있다.
- [5] 그런데 자연에 존재하는 항체는 동일한 아미노산 서열을 가진 두 개의 중쇄와 동일한 서열을 가진 두 개의 경쇄가 조합된 형태로 존재하여 하나의 항원에 결합하는 구조를 가지며, 이중특이적 항체를 제조하기 위해서는 화학공학 또는 생명공학적인 기술을 이용하여 접합체를 형성하여야 한다.
- [6] 이러한 이중특이적 항체의 제조에 있어서, 원하는 항체를 고수율로 수득하기 위해서는 동일한 항원결합부를 갖는 사슬 간에는 결합이 형성되지 않고 상이한 항원결합부를 갖는 사슬 간에만 결합이 형성되도록 설계하는 것이 중요하다. 이에 따라 동일한 사슬 간의 반발력 및 상이한 사슬 간의 결합력을 향상시킬 수 있도록, Fc 영역의 CH3 도메인에 변이체를 도입한 Fc 이종이합체 형성 기술이

개발되었다.

- [7] Fc 영역에 이중이합체를 형성하기 위한 대표적인 기술로는 knob-인투-홀(knob-into-hole, KiH) 기술이 있다. 상기 KiH 방식에서는 CH3 도메인의 소수성 상호작용 영역에서 한쪽 사슬에서는 곁가지의 크기가 큰 아미노산을 곁가지의 크기가 작은 아미노산으로 치환하고, 다른 쪽 사슬에서는 작은 아미노산을 큰 아미노산으로 치환하는 변이를 이용한다. 예를 들어, 미국 등록특허공보 제8,216,805호에서는 T366을 Y, W의 큰 잔기로 치환하고, 반대 사슬의 Y407, T394, T366 등을 T, A 등의 작은 잔기로 치환한 형태의 헤테로머 폴리펩티드를 기재하고 있다. 그런데, KiH 방식의 경우 Fc 이중이합체의 수율이 약 60% 정도로 개선이 필요하였다.
- [8] 제조 수율의 향상을 위한 새로운 변이체 기술로서, Fc 영역에 전하 및 소수성 아미노산 변이를 도입한 EW-RVT 변이체가 제안된 바 있다. 상기 변이체는 KiH에 비해 수율 개선에 효과를 보였으나, 삼차구조를 분석한 결과 돌연변이된 잔기의 구조적 충돌로 인하여 Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인의 삼차구조에 변형이 나타나는 것으로 확인되었다.
- [9] 항체의 Fc 영역은 면역 세포와 결합하여 면역 반응을 유도하는 특성을 나타내며 항체의 반감기를 증가시켜 혈장 내 항체의 안정성을 조절하는 역할을 하는데, 상기와 같이 Fc 영역에 구조 변형이 일어나는 경우 야생형과의 구조적 유사성이 떨어지게 되어, Fc 영역의 기능이 저하되는 문제가 발생할 수 있다. 이러한 Fc 영역의 기능 저하 문제를 방지하기 위해서는 야생형 Fc 영역과 구조적 유사성이 우수한 변이체를 설계하는 것이 중요하다.
- [10] 따라서, 높은 수율로 이중이합체를 수득할 수 있으면서 야생형과 비교하여 구조적 변형을 최소화할 수 있는 이중이합체 형성 기술의 개발이 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명의 목적은 야생형 Fc 영역과 구조적 유사성이 높고 이중이합체 제조 수율이 우수한 Fc 변이체를 포함하는 이중이합체를 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 이중이합체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 야생형 면역글로불린의 Fc 영역의 변이체, 구체적으로 CH3 도메인의 변이체를 포함하는 이중이합체를 제공한다.
- [14] 본 발명의 일 측면에서, 본 발명의 이중이합체는 항체의 제1 CH3 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 및 제2 CH3 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하고, 상기 제1 CH3 도메인은 T366에서의 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 CH3 도메인은 T366, L368 및 Y407 중 하나 이상에서의 아미노산 치환을 포함하며, 상기 제1 CH3 도메인 및 제2 CH3 도메인 중 어느 한 도메인은

K360에서의 아미노산 치환을 더 포함하고, 다른 한 도메인은 Q347에서의 아미노산 치환을 더 포함한다.

- [15] 본 발명에 있어서, CH3 도메인의 아미노산 번호는 KABAT 문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Ed., NIH Publication, 1991]의 EU 넘버링을 기준으로 한다.
- [16] 본 발명의 일 측면에서, 상기 제1 CH3 도메인 및 제2 CH3 도메인 중 K360에서의 아미노산 치환을 포함하는 도메인은 Q347에서의 아미노산 치환을 더 포함할 수 있다. 본 발명의 일 측면에서, 상기 제1 CH3 도메인 및 제2 CH3 도메인 중 Q347에서의 아미노산 치환을 포함하는 도메인은 K360에서의 아미노산 치환을 더 포함할 수 있다. 본 발명의 일 측면에서, 상기 제1 CH3 도메인 및 제2 CH3 도메인 중 K360에서의 아미노산 치환을 포함하는 도메인이 Q347에서의 아미노산 치환을 더 포함하고, Q347에서의 아미노산 치환을 포함하는 도메인이 K360에서의 아미노산 치환을 더 포함할 수 있다.
- [17] 본 발명의 일 측면에서, 상기 제1 CH3 도메인 및/또는 제2 CH3 도메인의 K360 및/또는 Q347에서의 아미노산 치환은 생리학적 pH에서 양전하 또는 음전하를 띠는 아미노산으로의 치환을 포함한다.
- [18] 본 발명의 일 측면에서, 본 발명의 이중이합체는 항체의 제1 CH3 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 및 제2 CH3 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하고, 상기 제1 CH3 도메인은 T366에서의 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 CH3 도메인은 T366, L368 및 Y407 중 하나 이상에서의 아미노산 치환을 포함하며, 상기 제1 CH3 도메인 및 제2 CH3 도메인은 각각 K360 및 Q347 중 하나 이상에서의 아미노산 치환을 더 포함하되,
- [19] 상기 제1 CH3 도메인과 제2 CH3 도메인 중 어느 한 도메인의 Q347이 생리학적 pH에서 양전하를 띠는 아미노산으로 치환되어 있는 경우, 다른 한 도메인의 K360은 생리학적 pH에서 음전하를 띠는 아미노산으로 치환되어 있고, 이 때 상기 Q347이 생리학적 pH에서 양전하를 띠는 아미노산으로 치환되어 있는 도메인은 K360에서 생리학적 pH에서 양전하를 띠는 아미노산으로의 치환을 더 포함할 수 있고, 상기 K360이 생리학적 pH에서 음전하를 띠는 아미노산으로 치환되어 있는 다른 한 도메인은 Q347에서 생리학적 pH에서 음전하를 띠는 아미노산으로의 치환을 더 포함할 수 있거나, 또는
- [20] 상기 제1 CH3 도메인과 제2 CH3 도메인 중 어느 한 도메인의 Q347이 생리학적 pH에서 음전하를 띠는 아미노산으로 치환되어 있는 경우, 다른 한 도메인의 K360은 생리학적 pH에서 양전하를 띠는 아미노산으로 치환되어 있고, 이 때 상기 Q347이 생리학적 pH에서 음전하를 띠는 아미노산으로 치환되어 있는 도메인은 K360에서 생리학적 pH에서 음전하를 띠는 아미노산으로의 치환을 더 포함한다.
- [21] 예를 들어, 본 발명의 이중이합체에서 제1 CH3 도메인과 제2 CH3 도메인은 Q347과 K360에서 각각 다음과 같은 아미노산 치환을 포함할 수 있다:

- [22] (a) 제1 CH3 도메인과 제2 CH3 도메인 중 어느 한 도메인의 Q347이 생리학적 pH에서 양전하를 띠는 아미노산으로 치환되어 있고, 다른 한 도메인의 K360이 생리학적 pH에서 음전하를 띠는 아미노산으로 치환되어 있거나,
- [23] (b) 제1 CH3 도메인과 제2 CH3 도메인 중 어느 한 도메인의 Q347이 생리학적 pH에서 양전하를 띠는 아미노산으로 치환되어 있고, 다른 한 도메인의 K360 및 Q347이 생리학적 pH에서 음전하를 띠는 아미노산으로 치환되어 있거나,
- [24] (c) 제1 CH3 도메인과 제2 CH3 도메인 중 어느 한 도메인의 Q347 및 K360이 생리학적 pH에서 양전하를 띠는 아미노산으로 치환되어 있고, 다른 한 도메인의 K360이 생리학적 pH에서 음전하를 띠는 아미노산으로 치환되어 있거나,
- [25] (d) 제1 CH3 도메인과 제2 CH3 도메인 중 어느 한 도메인의 Q347 및 K360이 생리학적 pH에서 양전하를 띠는 아미노산으로 치환되어 있고, 다른 한 도메인의 K360 및 Q347이 생리학적 pH에서 음전하를 띠는 아미노산으로 치환되어 있거나,
- [26] (e) 제1 CH3 도메인과 제2 CH3 도메인 중 어느 한 도메인의 Q347 및 K360이 생리학적 pH에서 음전하를 띠는 아미노산으로 치환되어 있고, 다른 한 도메인의 K360이 생리학적 pH에서 양전하를 띠는 아미노산으로 치환되어 있음.
- [27] 본 발명의 일 측면에서, 본 발명은 항체의 제1 CH3 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 및 제2 CH3 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하고, 상기 제1 CH3 도메인은 T366 및 K360에서의 아미노산 치환을 포함하고, 제2 CH3 도메인은 T366, L368 및 Y407 중 하나 이상에서의 아미노산 치환 및 Q347에서의 아미노산 치환을 포함하는 이중이합체를 제공한다.
- [28] 본 발명의 일 측면에서, 본 발명은 항체의 제1 CH3 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 및 제2 CH3 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하고, 상기 제1 CH3 도메인은 T366 및 Q347에서의 아미노산 치환을 포함하고, 제2 CH3 도메인은 T366, L368 및 Y407 중 하나 이상에서의 아미노산 치환 및 K360에서의 아미노산 치환을 포함하는 이중이합체를 제공한다.
- [29] 본 발명의 일 측면에서, 본 발명은 항체의 제1 CH3 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 및 제2 CH3 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하고, 상기 제1 CH3 도메인은 T366, K360 및 Q347에서의 아미노산 치환을 포함하고, 제2 CH3 도메인은 T366, L368 및 Y407 중 하나 이상에서의 아미노산 치환 및 K360 및 Q347에서의 아미노산 치환을 포함하는 이중이합체를 제공한다.
- [30] 본 발명의 일 측면에서, 상기 제1 CH3 도메인은 T366W의 아미노산 치환을 포함하고, 제2 CH3 도메인은 T366S, L368A 및 Y407V의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [31] 본 발명의 일 측면에서, 상기 제1 CH3 도메인 및 제2 CH3 도메인은 각각 K360E, K360D, K360R, Q347E, Q347D, Q347R 및 Q347K로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 이 때, 상기 제1 CH3 도메인 및 제2 CH3 도메인 중 어느 한 도메인이 Q347E 또는 Q347D의 아미노산

치환을 포함하는 경우, 다른 도메인의 아미노산 위치 360번의 라이신(K)은 치환되지 않을 수 있다. 이 때, Q347E 또는 Q347D의 아미노산 치환을 포함하는 도메인은 K360E 또는 K360D의 아미노산 치환을 추가로 포함하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 제1 CH3 도메인 및 제2 CH3 도메인 중 어느 한 도메인이 K360에서의 아미노산 치환을 포함하지 않으면서 Q347에서의 아미노산 치환을 포함하는 경우, 상기 Q347에서의 아미노산 치환은 양전하를 띠는 아미노산으로의 치환이 바람직하다.

- [32] 본 발명의 일 측면에서, 상기 이종이합체는 상기 CH3 도메인이 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE로 이루어진 군으로부터 선택된 면역글로불린에 포함될 수 있으며, 바람직하게는 IgG, 더욱 바람직하게는 인간 IgG에 포함될 수 있다.
- [33] 본 발명의 일 측면에서, 상기 이종이합체는 상기 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드 중 하나 이상의 폴리펩티드에 연결된 하나 이상의 결합 도메인 단백질을 더 포함할 수 있다. 이 때, 상기 연결은 직접 연결, 또는 1 내지 50개의 아미노산으로 구성된 펩티드에 의한 연결일 수 있다.
- [34] 본 발명의 일 측면에서, 상기 결합 도메인 단백질은 항체의 항원 결합 영역, 수용체 유래 단백질, 사이토카인 및 호르몬으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [35] 본 발명의 일 측면에서, 상기 항원 결합 영역은 Fab, scFab, sdAb, scFv, di-scFv 또는 (dsFv)₂ 형태일 수 있다.
- [36] 본 발명의 일 측면에서, 상기 이종이합체는 2개 이상의 표적 단백질에 결합 가능한 이중특이적 또는 다중특이적 항체, 또는 이중특이적 또는 다중특이적 융합 단백질일 수 있다.
- [37] 본 발명의 일 측면에서, 상기 이종이합체에 하나 이상의 약물이 접합될 수 있다.
- [38] 본 발명의 또다른 측면은 또한, 상기 이종이합체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [39] 본 발명은 또한, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [40] 본 발명은 또한, 상기 폴리뉴클레오티드 또는 이를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [41] 본 발명은 또한, 상기 이종이합체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [42] 본 발명의 일 측면에서, 상기 이종이합체 제조방법은 상기 이종이합체를 코딩하는 1종 이상의 발현 벡터를 준비하는 단계; 및 상기 발현 벡터를 숙주 세포에서 발현시키고 단백질을 수득하여 이종이합체를 형성하는 단계를 포함할 수 있다.
- [43] 본 발명의 제조방법에서, 상기 발현 벡터는 제1 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 제2 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.
- [44] 본 발명의 예시적인 실시태양에서, 상기 발현 벡터는 제1 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 발현 벡터, 및 제2

폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 발현 벡터를 포함할 수 있다.

- [45] 본 발명의 예시적인 실시태양에서, 상기 제1 발현 벡터 및 제2 발현 벡터를 숙주 세포에서 각각 발현시켜 2종의 단백질을 수득하고 혼합 반응시켜 이종이합체를 형성할 수 있다.
- [46] 본 발명의 예시적인 실시태양에서, 제1 발현 벡터 및 제2 발현 벡터를 숙주 세포에서 동시 발현시켜 이종이합체를 수득할 수 있다.
- [47] 본 발명은 또한, 상기 이종이합체 또는 이를 포함하는 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 질병의 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [48] 본 발명의 Fc 변이체에 따르면, 동일한 서열을 갖는 사슬 간에는 결합이 거의 형성되지 않고 상이한 서열을 갖는 사슬 간에는 결합력이 향상되어, 이종이합체의 제조 수율을 현저하게 향상시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 Fc 변이체는 변이에 의한 구조 변형을 최소화할 수 있으므로 야생형 Fc 영역과 구조적 유사성이 매우 우수하다. 따라서 본 발명의 이종이합체 형성 기술을 이용하면 Fc 영역의 기능이 유지된 다양한 형태의 항체를 고수율로 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [49] 도 1은 본 발명의 일 실시태양에 따른 이종이합체로서, Fc 영역에 항원 결합 영역이 연결된 이종이합체의 구조를 개략적으로 나타낸 것이다.
- [50] 도 2a 및 2b는 각각 본 발명의 일 실시태양에 따른 이종이합체의 제1 Fc 사슬(a) 및 제2 Fc 사슬(b)의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.
- [51] 도 3a 및 3b는 각각 본 발명의 일 실시태양에 따른 이종이합체에서, Fc 사슬 간 소수성 상호작용 부위(a) 및 전하쌍 상호작용 부위(b)의 구조 모델을 나타낸 것이다.
- [52] 도 4는 본 발명의 일 실시태양에 따른 Fc 이종이합체, 종래 기술의 Fc 이종이합체 및 야생형 Fc 영역의 구조를 나타낸 것이다.
- [53] 도 5a 및 5b는 각각 도 4의 구조에서 B-chain 영역만을 대상으로 하여, 본 발명의 일 실시태양에 따른 이종이합체와 야생형의 구조 비교(a) 및 종래 기술의 이종이합체와 야생형의 구조 비교(b)를 나타낸 것이다.
- [54] 도 6은 본 발명의 일 실시태양에 따른 이종이합체 및 종래 기술의 이종이합체의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 것이다.
- [55] 도 7은 본 발명의 일 실시태양에 따른 이종이합체 및 종래 기술의 이종이합체의 구조를 개략적으로 나타낸 것이다.
- [56] 도 8은 본 발명의 일 실시태양에 따라 Fc 영역의 한 사슬에 항원 결합 영역이 연결된 비대칭 구조의 이종이합체 형태를 제조하는 경우 발생 가능한 단백질 형태를 도시한 것이다.

- [57] 도 9는 본 발명의 일 실시태양에 따른 CH3 변이체 또는 종래 기술의 CH3 변이체가 도입된 발현 벡터로부터 발현 및 정제된 재조합 단백질의 크기 배제 크로마토그래피(SEC)-HPLC 그래프 분석 프로파일이다.
- [58] 도 10은 도 9의 SEC-HPLC 그래프 분석 프로파일로부터 얻어진 동종이합체, 이종이합체 및 단량체의 생성 비율을 나타낸 그래프이다.
- [59] 도 11a, 11b 및 11c는 각각 야생형 IgG1 동종이합체(WT Fc)(a) 및 본 발명의 일 실시태양에 따른 이종이합체 2종(각각 WRE(b) 및 WRREE(c))에 대하여, FcRn에 대한 결합 및 해리 분석을 통해 얻어진 센소그램을 바탕으로 평형상태(steacy-state) RU를 통해 친화도 분석을 진행한 그래프이다.
- [60] 도 12a, 12b 및 12c는 각각 야생형 IgG1 동종이합체(WT Fc)(a) 및 본 발명의 일 실시태양에 따른 이종이합체 2종(각각 WRE(b) 및 WRREE(c))의 시차주사 열용량 분석 결과 프로파일이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [61] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [62]
- [63] 본 발명은 야생형 항체의 Fc 영역의 변이체, 구체적으로 CH3 도메인의 변이체를 포함하는 이종이합체에 관한 것이다.
- [64] 이종이합체(heterodimer)는 서로 다른 두 개의 단량체(monomer)에 의해 형성되는 이합체(dimer)를 의미한다. 본 발명에서, 용어 "이종이합체"는 항체의 Fc 영역 또는 CH3 도메인이 아미노산 서열이 서로 다른 두개의 사슬로 형성되어 상호 결합된 단백질 복합체인 Fc 이종이합체 또는 CH3 이종이합체 뿐만 아니라, 이를 포함하는 항체의 일부 또는 전체, 그리고 상기 이종이합체에 다른 폴리펩티드 및/또는 단백질이 연결된 형태의 융합 단백질, 이중특이적 항체 및 다중특이적 항체와, 이들에 약물이 접합된 항체-약물 접합체 형태를 모두 포괄하는 의미로 해석된다.
- [65] 본 발명의 이종이합체에서, Fc 영역의 각 사슬은 제1 Fc 사슬 및 제2 Fc 사슬로 구분될 수 있다. 또 다르게는, 본 발명의 이종이합체는 제1 CH3 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 및 제2 CH3 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드로 구분될 수 있다. 상기 제1 Fc 사슬(또는 제1 폴리펩티드) 및 제2 Fc 사슬(또는 제2 폴리펩티드)은 3차 구조를 형성할 수 있으며, 이들은 이황화 결합과 같은 공유 결합이나, 수소 결합, 이온 결합, 반데르발스 결합, 소수성 상호작용과 같은 비공유 상호작용에 의해 서로 상호작용할 수 있다.
- [66] 본 발명에서, 용어 "항체"란 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린(immunoglobulin, Ig) 분자를 포함하며, 다클론항체 및

단일클론항체를 모두 포함한다. 또한, 상기 용어는 인간 이외의 포유동물 항체(예를 들면, 뮤린(murine) 항체), 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체 및 이종결합항체(예를 들면, 이종특이적 항체)와 같은 유전공학에 의해 생산된 형태를 포함한다. 상기 면역글로불린은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4와 같은 IgG, IgA, IgE, IgD 또는 IgM일 수 있다.

- [67] 본 발명에서, 용어 "Fc 영역"은 항체의 중쇄불변영역 중 CH2 및 CH3 도메인(또는, CH2, CH3 및 CH4 도메인)을 포함하는 C-말단 영역을 의미하며, 야생형(wild-type, WT) Fc 영역 및 그의 변이체를 포괄하는 의미로 사용된다. 본 발명에서, 상기 Fc 영역은 인간 IgG1 중쇄의 221번 잔기로부터 C-말단에 이르는 영역, 또는 상기 영역에 힌지를 더 포함하는 영역을 의미할 수 있다. Fc 영역에서 아미노산 잔기의 번호는 Kabat 문헌에서 인간 면역글로불린 중쇄 내의 잔기 번호를 정의하는 EU 넘버링에 따른다.
- [68] 본 발명에서, 용어 "야생형 Fc 영역"은 자연에서 발견되는 면역글로불린의 Fc 영역의 아미노산 서열과 일치하는 아미노산 서열을 포함한다.
- [69] 본 발명에서, 용어 "Fc 영역의 변이체"는 야생형 Fc 영역과 상이한 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 것으로서, "Fc 변이체"로 약칭할 수 있다. 본 발명에서, 상기 Fc 변이체는 모체가 되는 야생형 Fc 영역 서열과 약 80% 이상, 바람직하게는 약 90% 이상의 상동성을 가질 수 있다. 본 발명의 이종이합체에서, Fc 변이체는 각 사슬의 CH3 도메인에 서로 다른 변이체를 도입하여 형성된 것이다. 본 발명에서, 상기 "Fc 변이체"는 경우에 따라 CH2 도메인의 아미노산 변이를 추가로 포함할 수 있다.
- [70] 본 발명에서, 용어 "CH3 도메인의 변이체"는 항체 중쇄의 야생형 CH3 도메인과 상이한 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 것으로서, "CH3 변이체"로 약칭할 수 있다. 본 발명에서, 상기 CH3 변이체는 야생형 CH3 도메인의 서열과 대략 95% 이상, 바람직하게는 96% 이상, 더욱 바람직하게는 97% 이상의 상동성을 가질 수 있다.
- [71] 본 발명에서, 용어 "변이"는 아미노산 잔기의 치환, 삽입 및/또는 결실을 포함하는 의미로, 바람직하게, 본 발명의 변이체는 아미노산 잔기의 치환을 포함한다. 아미노산 잔기의 치환은 모체가 되는 야생형 항체의 Fc 영역에 존재하는 아미노산 잔기, 아미노산 잔기의 번호 및 치환된 아미노산 잔기의 순서로 나타낸다.
- [72]
- [73] 본 발명의 이종이합체에서, Fc 영역을 이루는 각 사슬은 제1 Fc 사슬 및 제2 Fc 사슬로 구분할 수 있으며, 각 사슬은 야생형 Fc를 모체로 하여 하나 이상의 변이를 포함한다. 이 때 두 사슬의 상호작용 부위에 서로 상보적인 변이를 도입하여, 동일한 사슬 간에는 결합이 형성되지 않도록 조절하여 이종이합체를 형성한다.
- [74] 본 발명에서는 야생형 Fc와 구조적 유사성이 높고 수율이 우수한 Fc

이종이합체를 개발하기 위하여, 단백질 삼차구조 모델링을 통하여 야생형 Fc 이합체 상호작용 부위의 잔기들을 다양한 세트(set)로 돌연변이하고, 각 돌연변이 세트에 대해 삼차구조의 에너지 최소화 및 구조변형 분석을 통하여 구조변형 및 상호작용 에너지가 최적화된 세트를 탐색하는 방식으로 돌연변이를 설계하였다.

- [75] 본 발명의 일 실시태양에서, 본 발명의 이종이합체는 항체의 제1 CH3 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 및 제2 CH3 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하고, 상기 제1 CH3 도메인은 T366에서의 아미노산 치환을 포함하며, 상기 제2 CH3 도메인은 T366, L368 및 Y407 중 하나 이상에서의 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제1 CH3 도메인 및 제2 CH3 도메인은 각각 K360 및 Q347 중 하나 이상에서의 아미노산 치환을 더 포함한다.
- [76] 본 발명의 일 실시태양에서, 상기 제1 폴리펩티드의 T366에서의 아미노산 치환은 트립토판(W), 티로신(Y), 아르기닌(R) 또는 페닐알라닌(F)으로의 치환일 수 있다. 바람직하게, 상기 T366에서의 아미노산 치환은 T366W일 수 있다.
- [77] 본 발명의 일 실시태양에서, 상기 제2 폴리펩티드는 제1 폴리펩티드의 아미노산 위치 366번 잔기와 상호작용하기 위하여, T366, L368 및 Y407 중 하나 이상에서의 아미노산 치환을 포함한다. 상기 제2 폴리펩티드에서, T366, L368 또는 Y407에서의 아미노산 치환은 각각 세린(S), 알라닌(A) 또는 발린(V)으로의 치환일 수 있다. 바람직하게, 상기 제2 폴리펩티드의 T366에서의 아미노산 치환은 T366S일 수 있으며, L368에서의 아미노산 치환은 L368A일 수 있고, Y407에서의 아미노산 치환은 Y407V일 수 있다.
- [78] 본 발명의 일 실시태양에서, 상기 K360 또는 Q347에서의 아미노산 치환은 생리학적 pH(대략 pH 7.4)에서 양전하 또는 음전하를 띠는 아미노산으로의 치환을 포함한다. 본 발명에서, 생리학적 pH에서 양전하를 띠는 아미노산은 아르기닌(R), 라이신(K) 또는 히스티딘(H)을 포함한다. 생리학적 pH에서 음전하를 띠는 아미노산은 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)을 포함한다.
- [79] 본 발명의 일 실시태양에서, 상기 K360 또는 Q347에서의 아미노산 치환은 제1 CH3 도메인 및 제2 CH3 도메인 사이에서 서로 반대의 전하를 띠는 아미노산으로 각각 치환되어 양 도메인 사이에 정전기적 인력이 형성되도록 상호작용할 수 있다. 이러한 의미에서, 아미노산 위치 360번의 라이신(K)은 그 자체로 생리학적 pH에서 양전하를 띠므로 반대편 도메인의 Q347번에서의 아미노산 치환이 음전하를 띠는 아미노산으로의 변경인 경우 치환되지 않을 수 있다.
- [80] 본 발명의 일 실시태양에서, 상기 K360에서의 아미노산 치환은 글루탐산(E), 아스파르트산(D), 히스티딘(H) 또는 아르기닌(R)으로의 치환일 수 있으며, 바람직하게는 K360E 또는 K360R일 수 있다.
- [81] 본 발명의 일 실시태양에서, 상기 K360에서의 아미노산 치환을 포함하는 폴리펩티드 사슬의 아미노산 위치 360번 잔기와 상호작용하기 위하여, 다른

폴리펩티드 사슬은 Q347에서의 아미노산 치환을 포함한다. 상기 Q347에서의 아미노산 치환은 아르기닌(R), 라이신(K), 히스티딘(H), 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로의 치환일 수 있으며, 바람직하게는 Q347R 또는 Q347E일 수 있다.

- [82] 본 발명의 일 실시태양에서, 본 발명의 이종이합체는 상기 제1 CH3 도메인 및 제2 CH3 도메인 중 어느 한 도메인이 Q347에서의 아미노산 치환을 포함하지 않는 경우, 다른 한 도메인은 K360에서의 아미노산 치환을 포함하지 않는 것이 바람직하다.
- [83] 본 발명의 일 실시태양에서, 본 발명의 이종이합체는 상기 제1 CH3 도메인 및/또는 제2 CH3 도메인에서 Y349, D356, F405 및 K409 중 하나 이상에서의 아미노산 치환을 포함하지 않을 수 있다.
- [84] 본 발명에서는, Fc 영역에서 소수성 계면이 충돌하지 않도록 소수성 잔기들을 조정하고 전하를 도입하여, 최적화된 소수성 계면으로 인해 구조 변형을 방지할 수 있으면서 Fc 이합체 형성의 수율을 높일 수 있는 변이체를 설계하였다.
- [85] 따라서, 본 발명에 따르면 종래 Fc 이종이합체 형성 기술에 비해 높은 수율로 이종이합체를 수득할 수 있다. 또한, Fc 영역의 CH2 도메인은 Fc 수용체 등이 결합하여 면역활성화의 이펙터 기능을 일으키는 곳으로 CH2 도메인의 구조가 변하면 면역 이펙터 기능이 저하될 수 있는데, 본 발명에 따른 상기 변이체의 CH2 및 CH3 도메인은 야생형의 Fc와 구조적 유사성이 매우 우수하여 Fc 영역의 면역 이펙터 기능(effector function)을 유지할 수 있다. 아울러, Fc 영역에 의한 FcRn(neonatal Fc receptor) 결합 특성을 그대로 유지할 수 있어 혈장에서의 안정성 효과 또한 보존할 수 있다.
- [86] 본 발명의 바람직한 일 실시태양에서, K360에서의 아미노산 치환은 제1 Fc 사슬에 형성될 수 있고, Q347에서의 아미노산 치환은 제2 Fc 사슬에 형성될 수 있다. 이에 따라, 제1 Fc 사슬은 T366 및 K360에서의 아미노산 치환을 포함하고, 제2 Fc 사슬은 T366, L368 및 Y407 중 하나 이상에서의 아미노산 치환 및 Q347에서의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 더 바람직하게, 제1 Fc 사슬은 T366 및 K360에서의 아미노산 치환을 포함하고, 제2 Fc 사슬은 T366, L368, Y407 및 Q347에서의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [87] 본 발명의 바람직한 일 실시태양에서, 상기 제1 Fc 사슬이 T366W 및 K360E의 치환을 포함하고, 제2 Fc 사슬이 T366S, L368A, Y407V 및 Q347R의 치환을 포함할 수 있다. 본 발명에서, 상기 변이체를 "WER 변이체"로 명명한다.
- [88] 상기 WER 변이체는 아래 인간 IgG1의 (Kabat 문헌의 EU 넘버링에 따름) 221 내지 447번 아미노산 서열을 모체로 하여 형성될 수 있다.
- [89] [서열번호 3] IgG1 221-447 (야생형 Fc)
- [90] DKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA

VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

[91] WER 변이체 사슬의 아미노산 서열은 아래 서열번호 1 및 2로 나타낼 수 있다.

[92] [서열번호 1] **IgG1 221-447 T366W/K360E (WER Fc mutant chain 1)**

[93] DKHTTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTE~~N~~QVSLWCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

[94] [서열번호 2] **IgG1 221-447 T366S/L368A/Y407V/Q347R (WER Fc mutant chain 2)**

[95] DKHTTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY~~V~~SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

[96] 본 발명의 바람직한 일 실시태양에서, Q347에서의 아미노산 치환은 제1 Fc 사슬에 형성될 수 있고, K360에서의 아미노산 치환은 제2 Fc 사슬에 형성될 수 있다. 이에 따라, 제1 Fc 사슬은 T366 및 Q347에서의 아미노산 치환을 포함하고, 제2 Fc 사슬은 T366, L368 및 Y407 중 하나 이상에서의 아미노산 치환 및 K360에서의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 더 바람직하게, 제1 Fc 사슬은 T366 및 Q347에서의 아미노산 치환을 포함하고, 제2 Fc 사슬은 T366, L368, Y407 및 K360에서의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[97] 본 발명의 바람직한 일 실시태양에서, 상기 제1 Fc 사슬이 T366W 및 Q347R의 치환을 포함하고, 제2 Fc 사슬이 T366S, L368A, Y407V 및 K360E의 치환을 포함할 수 있다. 본 발명에서, 상기 변이체를 "WRE 변이체"로 명명한다(서열번호 6 및 7 참조).

[98] 본 발명의 바람직한 일 실시태양에서, 제1 Fc 사슬 및 제2 Fc 사슬은 K360 및 Q347에서의 아미노산 치환을 모두 가질 수 있다. 이에 따라, 제1 Fc 사슬은 T366, K360 및 Q347에서의 아미노산 치환을 포함하고, 제2 Fc 사슬은 T366, L368 및 Y407 중 하나 이상에서의 아미노산 치환 및 K360 및 Q347에서의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 더 바람직하게, 제1 Fc 사슬은 T366, K360 및 Q347에서의 아미노산 치환을 포함하고, 제2 Fc 사슬은 T366, L368, Y407, K360 및 Q347에서의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[99] 본 발명의 바람직한 일 실시태양에서, 상기 제1 Fc 사슬이 T366W, K360R 및 Q347R의 치환을 포함하고, 제2 Fc 사슬이 T366S, L368A, Y407V, K360E 및 Q347E의 치환을 포함할 수 있다. 본 발명에서, 상기 변이체를 "WRREE 변이체"로 명명한다(서열번호 8 및 9 참조).

- [100] 본 발명의 또다른 바람직한 실시태양에서, 상기 제1 Fc 사슬이 T366W, K360E 및 Q347E의 치환을 포함하고, 제2 Fc 사슬이 T366S, L368A, Y407V, K360R 및 Q347R의 치환을 포함할 수 있다. 본 발명에서, 상기 변이체를 "WEERR 변이체"로 지칭한다.
- [101] 상기 본 발명의 바람직한 실시태양에 따른 변이체들에 의하면, Fc 영역에서 소수성 계면이 충돌하지 않도록 소수성 잔기들을 조정하고 전하를 도입하여, 최적화된 소수성 계면으로 인해 구조 변형을 최소화하고 Fc 이합체 형성의 수율을 현저히 향상시킬 수 있다.
- [102] 따라서 이들 변이체를 이용하면 종래 Fc 이중이합체 형성 기술보다 높은 수율로 이중특이성 항체를 제조할 수 있다. 또한, 본 발명의 변이체는 야생형의 Fc와 구조적 유사성이 매우 우수하여 Fc 영역의 면역 이펙터 기능(effector function)을 유지할 수 있고, 혈장에서의 안정성 효과 또한 보존할 수 있다는 특징점을 갖는다.
- [103] 본 발명의 일 실시태양에 따른 이중이합체는 상기 CH3 돌연변이를 포함하는 Fc 영역 및 이에 연결된 하나 이상의 결합 도메인 단백질을 포함할 수 있다.
- [104] 구체적으로, 상기 결합 도메인 단백질은 제1 CH3 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 및 제2 CH3 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드 중 하나 이상의 폴리펩티드에 연결될 수 있다. 이와 같은 구조를 통해, 본 발명의 이중이합체 형성 기술을 융합 단백질, 이중특이적 항체, 다중특이적 항체 등 다양한 형태의 이중이합체 단백질 및 항체에 적용할 수 있다. 이 때, 상기 연결은 직접 연결, 또는 1 내지 50개의 아미노산으로 구성된 펩티드에 의한 연결일 수 있다. 또한, 상기 결합 도메인 단백질은 상기 제1 및/또는 제2 폴리펩티드의 N-말단 및/또는 C-말단에 연결될 수 있다.
- [105] 본 발명의 일 실시태양에서, 상기 결합 도메인 단백질은 항체의 항원 결합 영역, 사이토카인, 성장 인자, 호르몬, 수용체 유래 단백질로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [106] 본 발명의 일 실시태양에서, 상기 항원 결합 영역은 항원의 일부 또는 전부에 특이적으로 결합하고 항원의 일부 또는 전부에 상보적인 영역을 포함하는 항체의 일부를 의미할 수 있다. Fc 영역에 연결되는 항원 결합 영역의 형태는 특별히 제한되지 않으며, Fab 형태 뿐만 아니라 scFab, sdAb, scFv, di-scFv, dsFv, (dsFv)₂ 등의 재조합 도메인 형태일 수 있다.
- [107] Fab 형태는 중쇄의 가변영역(VH) 도메인 및 불변영역 중 CH1 도메인, 및 경쇄의 가변영역(VL) 도메인 및 불변영역인 CL 도메인을 포함하고, 상기 CH1 도메인 및 CL 도메인 사이에 이황화결합이 형성된 형태이다. scFab 형태는 VH-CH1 중쇄절편과 VL-CL 경쇄가 펩티드 링커(linker)로 이어진 형태의 단쇄 항체 단편을 의미한다. 또한, sdAb 형태는 단일 도메인 가변 단편(single-domain variable fragment)을 의미하며, 하나의 가변영역 도메인을 의미한다.
- [108] 한편, scFv 형태는 가변영역이 이어진 형태의 단쇄 가변 단편(single-chain

variable fragment)을 의미하는 것으로, VH 및 VL 영역을 펩티드 링커로 연결한 재조합 도메인을 의미한다. 또한, di-scFv 형태는 두개의 scFv가 링커로 연결된 재조합 도메인을 의미한다. 상기 링커는 당해 기술 분야에 알려진 링커를 적절하게 사용할 수 있으며, 5 내지 20개의 아미노산으로 이루어진 펩티드일 수 있다. 바람직하게, 상기 링커는 G, A, S, P, E, T, D 및 K로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 아미노산으로 구성될 수 있다. 예를 들어, 링커는 $(GGGGX)_n$ 일 수 있으며, X는 A 또는 S인 것이 바람직하고, n은 1 내지 4의 자연수인 것이 바람직하다.

- [109] 또한, dsFv 형태는 이황화-결합 가변 단편(disulfide-linked variable fragment)으로서 가변영역이 이어진 형태라는 점에서 scFv와 유사하나, VH 및 VL 영역을 링커가 아닌 이황화결합으로 연결한 재조합 도메인을 의미한다. $(dsFv)_2$ 형태는 두 개의 dsFv가 링커로 연결된 재조합 도메인을 의미한다.
- [110] 상기 항원 결합 영역은 Fc 영역의 각 사슬의 C-말단 및 N-말단 중 하나 이상에 연결될 수 있으며, 바람직하게는 각 사슬의 N-말단 중 하나 이상에 연결될 수 있다. 각 연결은 힌지 또는 링커에 의해 형성될 수 있다.
- [111] 본 발명에서, 상기 결합 도메인 단백질은 IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, SLF, TNF α , TNF β , IFN α , IFN β , IFN γ , TGF β , LIF, Eta-1, Oncostatin M 등의 사이토카인; 신경 성장 인자(NGF), 혈소판 유래 성장 인자(PDFG) 등의 성장 인자; 성장 호르몬(GH), 갑상선 자극 호르몬(TSH) 등의 호르몬과 같은 생체 단백질을 포함할 수 있다.
- [112] 본 발명에서, 상기 결합 도메인 단백질은 수용체 유래 단백질을 포함할 수 있다. 상기 수용체는 하나 이상의 리간드에 결합할 수 있는 폴리펩티드로, 다양한 세포 표면 수용체, 사이토카인 수용체, 면역세포 수용체 등을 포함하는 의미로 해석되며, 예를 들어 가용성 T 세포 수용체일 수 있다. 상기 수용체 유래 단백질은 수용체 단백질의 전부, 일부 또는 이의 변이체를 의미할 수 있으며, 바람직하게, 수용체의 세포외도메인(ectodomain) 유래 단백질을 포함할 수 있다. 다만, 상기 결합 도메인 단백질은 상술한 예에 제한되는 것은 아니며, 표적 분자에 결합할 수 있는 단백질을 목적에 따라 선택하여 사용할 수 있다.
- [113] 이에 따라, 본 발명의 이중이합체는 2개 이상의 표적 단백질에 결합 가능한 이중특이적 또는 다중특이적 항체로 사용될 수 있다.
- [114] 본 발명의 예시적인 실시태양에서, 상기 이중특이적 항체는, 상기 Fc 영역 중 하나의 사슬에 표적 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 연결하고, 다른 사슬에 면역세포 활성화 수용체에 결합하는 도메인을 연결한 형태일 수 있다. 이러한 이중특이적 항체는 표적 항원 및 면역세포 활성화 수용체에 동시에 결합함으로써, 항체의존성 세포독성(antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC)에 의해 표적 항원의 사멸을 유도할 수 있다. 또는, 서로 상이한 표적 항원에 결합하는 것도 가능하다.

- [115] 예를 들어, 본 발명의 이중특이적 항체는 IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-1R, IL-4, IL-5, IL-6R, IL-9, IL-12, IL-13, IL-18, IL-18R, IL-25, TARC, MDC, MEF, TGF- β , LHR agonist, TWEAK, CL25, SPRR2a, SPRR2b, ADAM8, PED2, TNF alpha, TGF beta, VEGF, MIF, ICAM-1, PGE4, PEG2, RANK 리간드, Te38, BAFF, CTLA-4, GP130, HER1, HER2, HER3, HER4, VEGF-A, PDGF, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, DR5, MET, EGFR, MAPG, CSPGs, CTLA-4, IGF1, IGF2, Erb2B, MAG, RGM A, NogoA, NgR, OMGP, PDL-I, NRP1, NRP2, CD3, CD8, CD16, CD19, CD20, CD22, CD28, CD40 및 CD64 중 2종의 표적 분자에 결합할 수 있다. 또는, 이들 중 1종 이상의 추가의 표적 분자에 결합하여 다중특이적 항체 형태로 이용하는 것도 가능하다.
- [116] 본 발명의 일 실시태양에서, 상기 이중이합체에 하나 이상의 약물을 접합하여 항체-약물 접합체(antibody-drug conjugate, ADC)를 형성할 수 있다.
- [117] 본 발명에서, 상기 약물은 각 사슬의 C-말단 및/또는 N-말단 뿐 아니라 사슬 내의 아미노산 중 하나 이상의 잔기에 연결될 수 있다. 상기 약물은 적절한 링커(linker)를 이용하여 접합될 수 있다. 상기 약물로는 당해 기술 분야에 공지된 약물 화합물, 성장 억제제, 독소, 방사성 동위원소, miRNA, siRNA, shRNA 등을 이용할 수 있다.
- [118] 이와 같은 항체-약물 접합체를 이용하면, 표적 항원에 약물을 인도하여 약효를 향상시킬 수 있다. 또는, 특정 수용체에 결합하는 항체에 약물을 부착하는 경우, 수용체를 통한 항체의 트랜스사이토시스(transcytosis)를 이용하여 약물이 조직 내로 전달되도록 유도할 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fc 영역에 트랜스페린 수용체에 대한 항체의 항원 결합 영역 유래의 단백질을 연결하고 치료용 단백질 또는 약물을 추가 접합하면, 항체가 트랜스사이토시스를 통해 뇌혈관장벽을 통과할 수 있다. 이를 통해, 뇌혈관장벽을 통과하기 어려운 치료용 단백질 또는 약물의 전달 효율을 향상시킬 수 있다.
- [119] 본 발명의 이중이합체는, 해당 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 숙주 세포에서 발현시켜 제조할 수 있다.
- [120] 본 발명에서, 상기 이중이합체의 제조방법은, 상기 이중이합체를 코딩하는 1종 이상의 발현 벡터를 준비하는 단계; 및 상기 발현 벡터를 숙주 세포에서 발현시켜 단백질을 수득하는 단계를 포함할 수 있다.
- [121] 본 발명에서, 폴리뉴클레오티드는 단일가닥 또는 이중가닥 형태의 디옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드의 중합체를 포함하는 의미로 해석된다. 본 발명에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 야생형 Fc 사슬을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 본 발명의 Fc 변이체 서열에 따라 변경하여 생성될 수 있으며, 각 사슬의 신호 펩티드, 힌지, 링커, 히스티딘 태그 등을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 더 포함할 수 있다.
- [122] 또한, 이중이합체가 Fc 사슬에 연결된 다른 단백질(예를 들어, 항원 결합 영역, 치료용 단백질 등의 결합 도메인 단백질)을 포함하는 경우, 이를 포함하는 전체 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 이용하여 제조할 수 있다.

- [123] 발현 벡터는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 것으로, 역할 및 숙주 세포에 따라 다양한 성분을 함유할 수 있다. 예를 들어, 벡터는 숙주 세포에 의해 인식 및 프로세싱되는 신호 서열, 복제 기점, 마커 유전자, 전사조절인자들이 결합하는 프로모터, DNA의 전사를 증가시키기 위한 인핸서, 리보솜 결합 부위, 전사 종결 서열 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [124] 구체적으로, 본 발명의 이종이합체 생산을 위하여 이종이합체의 각 사슬을 코딩하는 핵산, 즉 폴리뉴클레오티드를 얻은 후 이를 이용하여 발현 벡터를 구축할 수 있다.
- [125] 본 발명에서, 상기 발현 벡터는 제1 Fc 사슬의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 제2 Fc 사슬의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 이 때, 각 폴리뉴클레오티드 서열은 동일한 벡터 또는 별개의 벡터에 포함될 수 있다.
- [126] 본 발명에서, 상기 발현 벡터는 각 Fc 사슬을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 외에도, Fc 이종이합체에 연결될 수 있는 다른 폴리펩티드 및/또는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 더 포함할 수 있다. 따라서, 이종이합체의 구조에 따라 1개 또는 2개의 발현 벡터, 또는 그 이상의 발현 벡터를 사용할 수 있다.
- [127] 본 발명의 예시적인 실시태양에서, 상기 발현 벡터는 제1 Fc 사슬의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 발현 벡터, 및 제2 Fc 사슬의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 발현 벡터를 포함할 수 있다.
- [128] 발현 벡터가 제작되면, 숙주 세포에서 이를 발현시켜 목적하는 단백질을 얻을 수 있다. 구체적으로, 숙주 세포에 발현 벡터를 트랜스펙션(transfection, 형질주입)한 후 배양시켜, 단백질을 발현할 수 있다.
- [129] 상기 숙주 세포는 당해 기술 분야에 공지되어 있는 상용 기법을 이용하여, 본 발명에 사용하기에 적합한 것을 실험적으로 결정하여 선택할 수 있다. 예를 들어, 상기 숙주 세포로는 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포, 베이비 햄스터 신장 세포(BHK), 원숭이 신장 세포(COS), 대장균 세포 등을 이용할 수 있다.
- [130] 본 발명의 예시적인 실시태양에서, 상기 발현 벡터가 제1 발현 벡터와 제2 발현 벡터를 포함하는 경우, 각 발현 벡터를 개별적인 숙주 세포에 주입하여 발현시킬 수 있다. 또는, 각 발현 벡터를 동일한 숙주 세포에 함께 주입하여 동시발현(co-expression)시키는 것도 가능하다.
- [131] 배양이 완료되면, 세포로부터 단백질을 단리(isolation)할 수 있다. 구체적으로, 배양된 세포를 원심분리하여, 목적 단백질을 함유하는 세포 배양액을 얻을 수 있다. 이후, 배양액에서 단백질을 분리하고 정제하는 과정을 수행할 수 있다. 상기 분리에는 친화도 크로마토그래피, 겔 전기영동 등을 이용할 수 있으며, 정제를 위하여 추가의 크로마토그래피, SDS-PAGE 등을 이용할 수 있다.

- [132] 본 발명에서, 제1 발현 벡터와 제2 발현 벡터를 각각 발현시키는 경우, 단리된 단백질을 혼합하여 이종이합체를 형성할 수 있다.
- [133] 본 발명의 이종이합체(즉, 본 발명의 Fc 이종이합체 및 이를 이용한 융합 단백질, 이중특이적 항체, 다중특이적 항체 및 항체-약물 접합체)는 약학 조성물에 이용될 수 있다. 이에 따라, 본 발명은 상기 이종이합체를 포함하는 질병의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공할 수 있다.
- [134] 본 발명의 약학 조성물의 예방 또는 치료의 대상이 되는 질환은 이종이합체에서 Fc 영역에 연결되는 결합 도메인 단백질 및/또는 약물의 종류에 따라 결정될 수 있다.
- [135] 본 발명의 약학 조성물은 이종이합체 외에 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다.
- [136] 상기 약학적으로 허용가능한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [137] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [138] 본 발명의 약학 조성물은, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 상기 약학 조성물은 통상의 방법에 따라 멸균 주사용액, 동결건조(lyophilized) 제형, 사전 충전식 주사(pre-filled syringe) 용액제, 경구형 제형, 외용제 또는 좌제 등의 형태로 제형화될 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 펩티드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화될 수 있다.
- [139] 본 발명의 약학 조성물은 추가로 적어도 하나의 다른 치료제 또는 진단제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 이종이합체와 함께 인터페론, 항-S 단백질 단일클론 항체, 항-S 단백질 폴리클로날 항체, 뉴클레오시드 유사체, DNA 폴리머라제 저해제, siRNA 제제 또는 치료백신을 추가로 포함할 수 있다.
- [140] 본 발명의 약학 조성물을 인간을 포함하는 포유동물에게 투여함으로써 질병을 예방 또는 치료할 수 있다. 이때, 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의

약학 조성물의 1일 투여량은 0.001 내지 100mg/kg일 수 있다.

- [141] 본 발명은 또한, 본 발명의 이중이합체(즉, 본 발명의 Fc 이중이합체 및 이를 이용한 융합 단백질, 이중특이적 항체, 다중특이적 항체 및 항체-약물 접합체)를 투여하는 단계를 포함하는, 질병의 예방 또는 치료 방법을 제공할 수 있다.
- [142] 본 발명의 예시적인 실시태양에서, 예방 또는 치료 대상이 되는 질병은 유방암, 결장직장암, 폐암, 신세포 암종, 신경교종 또는 난소암과 같은 암; 알레르기성 또는 염증성 질환; 자가면역 질환 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예방 또는 치료 대상이 되는 질병의 종류는 Fc 영역에 연결된 결합 도메인 단백질 및/또는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 예를 들어, 본 발명의 이중이합체의 Fc 영역에 HER2에 결합하는 결합 도메인 단백질이 연결된 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 이용하면, 유방암, 결장직장암, 폐암, 신세포암종, 신경교종, 또는 난소암의 치료를 위해 사용될 수 있다.
- [143] 본 발명의 이중이합체 또는 약학 조성물은 이를 필요로 하는 개체(subject), 즉 해당 질병을 갖고 있거나, 해당 질병이 발생할 위험이 있는 개체에 투여될 수 있다. 상기 개체는 동물일 수 있고, 통상적으로 포유동물, 예를 들어 인간일 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [144] 실시예
- [145] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위하여 일부 실험방법과 조성을 나타낸 것으로, 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [146]
- [147] 실험 준비: 수율 및 구조가 최적화된 Fc 이중이합체의 설계
- [148] 야생형의 Fc 이합체의 구조를 이용하여, 이합체 상호작용 부위의 잔기들을 돌연변이 함으로써 수율 및 구조가 최적화된 이중이합체가 형성되도록 설계하였다.
- [149] 잔기의 돌연변이를 위하여 구조모델링 프로그램인 Coot를 사용하였고, 동일 프로그램을 사용하여 돌연변이된 잔기들을 포함하는 Fc 이합체 전체의 구조를 에너지 최소화(energy minimization) 한 후, 소수성 잔기들의 충돌, 도메인 위치변형의 정도 등 구조적 변형을 분석하였다.
- [150] 이러한 구조 분석에서, 가장 구조 변형이 좋으면서 상호작용 에너지가 최적화된 돌연변이 세트(set)를 선정하였다.
- [151]
- [152] 제조예 1: 폴리뉴클레오타이드 서열 설계 및 발현 벡터 제작
- [153] 발현 벡터는 pcDNA 3.1 / Myc His-A (Invitrogen)을 바탕으로 단백질의 C-말단에 폴리히스티딘 태그를 갖도록 제작되었다.
- [154] IgG1의 221 내지 447(Kabat 문헌의 EU 넘버링에 따름)을 코딩하는

폴리뉴클레오티드 서열을 기준으로, 변이체의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 설계하고, PCR 기법으로 증폭한 뒤 제한효소와 연결효소를 통해 클로닝하였다. 이를 통해 인간 면역글로불린 G1 (IgG1) 중쇄의 신호 펩티드를 포함하는 Fc 영역의 단백질을 발현하는 발현 벡터를 제작하였다.

- [155] 이 때, 제1 Fc 사슬(Fc chain 1) 발현 벡터는 T366W/K360E 돌연변이를 유발하도록 뉴클레오티드 서열을 변경하여 제작하였으며, 제2 Fc 사슬(Fc chain 2) 발현 벡터는 T366S/L368A/Y407V/Q347R 돌연변이를 유발하는 뉴클레오티드 서열을 도입하여 제작하였다.
- [156] 각 발현 벡터가 코딩하는 아미노산 서열을 도 2에 나타내었다. 도 2a 및 도 2b는 각각 chain 1 발현 벡터가 코딩하는 아미노산 서열(a)(서열번호 4) 및 chain 2 발현 벡터가 코딩하는 아미노산 서열(b)(서열번호 5)을 나타낸다. IgG1 221~447에 해당하는 영역을 밑줄로 표시하였으며, 변이가 형성된 잔기를 별표로 표시하였다. 그 외 신호 펩티드, 제한효소 인식부위 및 히스티딘 태그 영역은 표시하지 않았다.

[157]

[158] **제조예 2: 단백질 발현 및 이중이합체 단백질 제조**

[159] **2-1. 단백질 발현**

[160] ExpiCHO™ 세포에 제조예 1의 발현 벡터를 트랜스펙션(transfection)하여 일시적으로 각 단백질을 발현하였다.

[161] 상기 트랜스펙션은 초기 세포 밀도 6×10^6 세포/mL 및 발현 벡터 농도 0.8 μ gDNA/mL 조건에서 진행되었으며, 이 과정에서 ExpiCHO™ Expression Medium, OptiPRO™ SFM 및 ExpiFectamine™ 트랜스펙션 키트(Gibco)를 제조사 지침에 따라 사용하였다.

[162] 트랜스펙션 과정을 거친 세포들을 이산화탄소 인큐베이터에서 8일간 배양한 후, 원심분리를 통해 각 단백질을 함유하는 세포 배양액과 세포로 분리하였다.

[163]

[164] **2-2. 정제**

[165] 각각의 재조합 단백질을 포함하는 배양액에서 목표 단백질들을 분리하기 위해 Ni-NTA (Qiagen) 컬럼을 이용한 친화도 크로마토그래피(affinity chromatography)를 실시하였다.

[166] 구체적으로, Ni-NTA 컬럼에 50mM Tris-HCl pH 7.5 및 200mM NaCl을 포함하는 완충용액을 채운 후, 원심분리를 통해 획득된 배양액을 0.45 μ m 여과지로 여과하여 투입하였다. 배양액과 반응을 마친 뒤, 컬럼을 50mM Tris-HCl pH 7.5 및 500mM NaCl을 포함하는 완충용액과 50mM Tris-HCl pH 7.5, 200mM NaCl 및 30mM imidazole을 포함하는 완충용액으로 순차적으로 세척하였다.

[167] 최종적으로 50mM Tris-HCl pH 7.5, 200mM NaCl 및 500mM imidazole을 포함하는 완충용액을 사용하여, 컬럼에 결합한 단백질을 용출하였다. 용출 후, Hitrap™ Desalting (GE healthcare) 컬럼을 이용하여 상기 단백질을 포함하는

완충용액의 조성을 인산염완충식염수(PBS)로 교체하였다.

[168]

[169] **2-3. 이종이합체 단백질 조합**

[170] 정제된 Fc chain 1 단백질과 Fc chain 2 단백질을 정량한 후, 동일 분자 비율로 혼합하였다. 혼합한 단백질 용액에 최종농도 0.1M arginine, 5mM L-glutathione (reduced)이 되도록 시약을 추가하여, 37°C에서 2시간 동안 이종이합체 단백질이 형성되도록 반응시켰다. 반응이 끝난 단백질은 SDS-PAGE 기법을 통하여 이종이합체가 형성되었음을 확인하였다. 이하, 생성된 이종이합체를 "WER Fc"(본 발명의 실시예 1의 CH3 변이체)로 지칭한다.

[171]

[172] **2-4. WER Fc의 결정화 및 결정구조 확인**

[173] 상기 제조예에서 수득한 WER Fc에 대해, 초기 결정화 스크리닝(initial crystallization screen) 및 결정 시드화(crystal seeding)를 거쳐 결정화를 수행하였다. 결정화에는 저농도의 Tri-Cl 과 salt 조건을 사용하였다.

[174] 결정의 X-선 회절 데이터를 포항가속기 빔라인 11C에서 측정하였다. WER Fc 결정은 3.39Å 해상도로 회절하였고, 측정 결과를 표 1에 나타내었다.

[175]

[176] [표1]

데이터 수집 항목		결과
공간군(space group)		P2 ₁
해상도 범위 (Å)		45.5 - 3.4 (3.5 - 3.4)
셀 파라미터	a, b, c (Å)	64.72, 147.06, 66.41
	α , β , γ (°)	90.00, 119.15, 90.00
완성도(completeness, %)		92.4 (74.7)
R-merge (%)		9.8 (24.9)
I/ σ		8.1 (3.2)
중복도(redundancy)		2.8 (2.1)

[177]

[178] 표 1의 회절 데이터를 사용하여 분자치환법으로 결정의 3차 구조를 규명하고, 정밀화(refinement) 결과를 표 2에 나타내었다.

[179]

[180] [표2]

정밀화 결과 항목		결과
반사수		14318 (1166)
수소를 제외한 원자의 개수	단백질	6642
	비(非)단백질	348
R-work (%)		22.6
R-free (%)		25.5
RMS	길이 (Å)	0.006
	각도 (°)	1.14
라마찬드란 플롯 (Ramachandran plot)	Favored (%)	95.1
	Allowed (%)	4.9
	Outliers (%)	0

[181]

[182] 또한 상기 WER Fc에서, 사슬 간 소수성 상호작용 부위(a) 및 전하쌍 상호작용 부위(b)의 구조 모델을 도 3a 및 3b에 각각 나타내었다.

[183]

[184] 실험예

[185] 이하, 실험예를 통해 본 발명의 일 실시태양에 따른 Fc 변이체를 야생형 IgG1 Fc 영역(WT Fc) 및 종래 기술의 Fc 이중이합체인 EW-RVT Fc 및 KiH Fc와 비교하였다.

[186] 상기 EW-RVT Fc는 WT Fc의 한 사슬에 K409W/K360E 변이가 형성되고, 다른 사슬에 F405T/D399V/Q347R 변이가 형성된 이중이합체이다. 상기 KiH Fc는 WT Fc의 한 사슬에 T366W 변이가 형성되고, 다른 사슬에 T366S/L368A/Y407V 변이가 형성된 이중이합체이다.

[187]

[188] 실험예 1: Fc 영역의 구조 비교

[189] 1-1. WER Fc와 WT Fc의 Fc 영역 구조 비교

[190] WER 이중이합체로 이루어진 Fc 영역(WER Fc), 야생형 Fc 영역(WT Fc) 및 EW-RVT 이중이합체의 Fc 영역(EW-RVT Fc)의 구조를 도 4에 나타내었다. 도 4에서, 자홍색으로 표시한 구조는 WER Fc이고, 녹색으로 표시한 구조는 WT Fc이며, 청록색(cyan)으로 표시한 구조는 EW-RVT Fc이다.

[191] 구체적으로, 각각의 Fc 구조를 A-chain (제2 Fc 사슬에 해당)을 이용하여 중첩하였고 이때 B-chain (제1 Fc 사슬에 해당)의 구조가 비틀어지는 정도를 비교하였다.

[192] 그 결과, EW-RVT Fc에서는 구조가 많이 비틀어지는 반면, 본 발명의 WER

Fc는 그다지 변화가 크지 않고, WT의 Fc 영역과 구조적으로 매우 유사한 것을 확인할 수 있다. 이에 따라, 본 발명의 아미노산 변이는 Fc 영역의 구조 변형을 거의 일으키지 않는 것을 알 수 있었다.

[193]

[194] **1-2. WER Fc와 WT 및 EW-RVT Fc의 CH2 도메인 구조 비교**

[195] WT Fc와 WER Fc 및 EW-RVT Fc의 CH2 도메인 구조를 비교하여 구조적 유사성을 확인하였다.

[196] 도 4의 구조 중 B-chain 영역만을 대상으로 하여, WER Fc와 WT Fc의 구조 비교(a) 및 EW-RVT Fc와 WT Fc의 구조 비교(b)를 도 5a 및 5b에 각각 나타내었다. 도 5a에서 확인 가능한 바와 같이 WER은 WT와 CH2 도메인 구조에 차이가 거의 없는 반면, 도 5b에 따르면 EW-RVT는 구조 변형(displacement)에 의해 WT와의 구조적 유사성이 현저히 떨어지는 것을 확인할 수 있었다.

[197] 도 5a 및 5b의 비교 결과, 종래 기술의 이중이합체의 경우 면역 반응에 중요한 CH2 도메인이 야생형 구조와 비교하여 16.3Å이나 비틀어진 것으로 나타났다. 이에 반해, 본 발명의 구조는 그다지 변화가 크지 않은 것을 알 수 있었다.

[198]

[199] **실험 예 2: WER Fc와 EW-RVT Fc의 RMS deviation 비교**

[200] 이중이합체의 Fc 영역과 WT Fc 영역의 구조적 유사성을 확인하기 위하여, 평균 제곱 거리(RMS deviation)를 측정하였다.

[201] C-alpha alignment를 사용하여 WER Fc와 WT Fc에 대해 한쪽 chain (chain A, 제2 Fc 사슬에 해당)의 3차 구조의 중첩(superposition)을 수행한 후, 겹쳐진 원자들 사이에 RMS deviation을 측정하였다.

[202] 이때 3차 구조 중첩에 사용하지 않은 다른 쪽 chain (chain B, 제1 Fc 사슬에 해당)의 구조가 비틀어지는 것을 비교하기 위하여 chain B의 RMS deviation을 계산하였다.

[203] 비교를 위하여, EW-RVT Fc에 대해서도 상기 방법으로 WT Fc와의 RMS deviation을 측정하였다.

[204] 상기 RMS deviation 측정 결과를 아래 표 3에 나타내었다.

[205]

[206] [표3]

RMS deviation	WER	EW-RVT
A-chain (중첩)	1.50Å	1.74Å
B-chain	4.14Å	7.95Å

[207]

[208] 표 3의 결과로부터, 구조 중첩에 사용한 A-chain의 경우 WER 및 EW-RVT 모두 WT Fc와 약 2Å 내외의 deviation을 보이는 반면, 구조 중첩에 사용하지 않은

B-chain의 경우, EW-RVT의 deviation은 약 8Å 정도로 매우 큰 것에 비해 WER의 deviation은 상당히 작은 것을 확인하였다.

[209] 이를 통해, 본 발명의 WER Fc는 EW-RVT Fc에 비해 WT Fc와의 구조적 유사성이 매우 높은 것을 확인할 수 있었다.

[210]

[211] **실험예 3: WER Fc와 EW-RVT 및 KiH Fc의 수율 비교**

[212] 본 발명의 일 실시태양에 따른 Fc 변이체의 이중이합체 생성 수율을 평가하기 위해서, Fc 이중이합체를 포함하는 융합단백질을 제조하고, SDS-PAGE 분석을 수행하여 수율을 측정하였다.

[213] 실험을 위해, 인간 항체의 중쇄(HC)와 경쇄(LC)에 토끼 항체의 가변 영역을 갖는 단백질을 코딩하는 발현 벡터를 설계하고, 인간 항체 Fc (hFc)를 코딩하는 벡터와 동시 발현(co-expression)시켜 융합단백질을 제조하였다.

[214] 인간 항체 카파 경쇄 및 중쇄 IgG1 유전자는 한국인간유전자뱅크(Korea human gene bank, clone ID: hMU013040, hMU014012)에서 구입하였다. 토끼 항체 가변 영역을 코딩하는 cDNA는 CHO expression system용 발현 조절 벡터(Thermo Fisher Scientific)에서 확보하였다. 인간/토끼 키메라 항체를 코딩하는 뉴클레오티드와 인간 항체 Fc (hFc)를 코딩하는 뉴클레오티드는 EcoRV 및 AgeI 제한효소를 포함하는 프라이머로 PCR 증폭하여 확보하였다.

[215] 상기 PCR 산물 및 pcDNA 3.1-Myc His A 벡터(Thermo Fisher Scientific)를 EcoRV 및 AgeI 제한효소로 37°C에서 1시간 자른 후 1% 아가로스 겔로 정제하고, T4 연결효소(Enzymomics Co., Ltd.)와 상온에서 1시간 동안 혼합하였다. 이후 연결효소 반응 산물로 TOP competent cell(Thermo Fisher Scientific)을 형질전환시켰다. 클로닝 후, 이중이합체 생성을 위한 Fc 돌연변이로서 WER, EW-RVT 또는 KiH 돌연변이가 항체의 CH3 도메인에 도입되도록 하였다.

[216] Fc 돌연변이가 도입된 인간 항체의 중쇄와 경쇄에 토끼 항체의 가변 영역을 갖는 단백질을 코딩하는 발현 벡터와 Fc 돌연변이가 도입된 인간 항체 Fc만을 코딩하는 발현 벡터를 제조예 2-1과 동일한 방법으로 CHO 세포에 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션에 사용한 전체 벡터 양은 동일하게 유지하되, 발현량이 적은 경쇄 단백질을 코딩하는 벡터를 과량 첨가하여 비율을 조절하였다.

[217] 수득한 이중이합체 융합단백질에 대해 SDS-PAGE 분석을 수행하고, 그 결과를 도 6에 나타내었다. 도면에서, 1열은 KiH, 2열은 EW-RVT, 3열은 WER의 결과를 나타낸다.

[218] 도 6에서 확인 가능한 바와 같이, KiH 돌연변이를 이용한 경우 수율이 약 57%로 나타났으며, EW-RVT의 경우 수율이 약 70%로 나타났다. 반면, 본 발명의 WER의 경우 수율이 약 98%로, 종래의 Fc 변이체들에 비하여 이중이합체의 수득 효율이 월등하게 우수한 것을 확인하였다.

[219]

- [220] 실험예 4: 추가 조합의 CH3 변이체를 도입한 이중이합체 단백질의 제조
- [221] 이중이합체 생성 수율 및 구조 변형 최소화를 고려하여 다른 조합의 Fc CH3 도메인 돌연변이 세트 2종(CH3 변이체 A 및 B)을 추가로 설계하고 이를 도입하여 이중이합체 단백질을 제조하였다.
- [222]
- [223] **4-1. 발현 벡터 설계 및 제작**
- [224] CH3 변이체 A 및 B가 도입된 이중이합체 단백질의 제조를 위해, 제1 Fc 사슬의 CH3 도메인 돌연변이가 도입된 인간 IgG1 Fc 영역을 코딩하는 발현 벡터와 제2 Fc 사슬의 CH3 도메인 돌연변이가 도입된 항체의 중쇄(HC) 및 경쇄(LC)를 코딩하는 발현 벡터를 각각 설계하였다.
- [225] 먼저, CH3 변이체 A 및 B 각각에 대해 인간 IgG1 Fc 영역만을 코딩하는 발현 벡터(각 변이체의 제1 Fc 사슬 발현 벡터)를 pcDNA 3.1을 바탕으로 제작하였다. IgG1의 221 내지 446(Kabat 문헌의 EU 넘버링에 따름)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 기준으로, CH3 변이체 A의 제1 Fc 사슬 발현 벡터는 T366W/Q347R 돌연변이를 포함하는 Fc 사슬의 아미노산 서열(서열번호 6)을 코딩하도록 뉴클레오티드 서열을 변경하였고, CH3 변이체 B의 제1 Fc 사슬 발현 벡터는 T366W/Q347R/K360R 돌연변이를 포함하는 Fc 사슬의 아미노산 서열(서열번호 8)을 코딩하도록 뉴클레오티드 서열을 변경하였다. 이들을 PCR 기법으로 증폭한 뒤 NEBuilder HiFi DNA assembly kit (NEB)를 이용하여 중첩(overlapping)을 통해 제작하였다. 이를 통해 인간 세럼 알부민의 신호 펩티드를 포함하는 각 CH3 변이체의 제1 Fc 사슬 단백질을 발현하는 발현 벡터를 제조하였다.
- [226] 다음으로, CH3 변이체 A 및 B 각각의 제2 Fc 사슬을 포함하는 항체의 중쇄(HC) 및 경쇄(LC)를 코딩하는 발현 벡터(각 변이체의 제2 Fc 사슬 발현 벡터)를 pTRIOZ (Invivogen)를 바탕으로 제작하였다. 상기 항체의 중쇄 및 경쇄 서열은 본 출원인의 국제공개공보 WO 2022/169274(본원에 참고로 인용됨)에 기재된 항-PD-1 항체의 가변 영역 서열을 포함하도록 설계하였다.
- [227] 각 변이체의 제2 Fc 사슬을 포함하는 중쇄 서열의 IgG1 Fc 영역은, IgG1의 221 내지 446(Kabat 문헌의 EU 넘버링에 따름)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 기준으로, CH3 변이체 A의 제2 Fc 사슬 발현 벡터의 경우 K360E/T366S/L368A/Y407V 돌연변이를 포함하는 아미노산 서열(서열번호 7)을 포함하는 항체를 코딩하도록 뉴클레오티드 서열을 변경하였고, CH3 변이체 B의 제2 Fc 사슬 발현 벡터의 경우 Q347E/K360E/T366S/L368A/Y407V 돌연변이를 포함하는 아미노산 서열(서열번호 9)을 포함하는 항체를 코딩하도록 뉴클레오티드 서열을 변경하여 제작하였다. 이들을 PCR 기법으로 증폭한 뒤 NEBuilder HiFi DNA assembly kit (NEB)를 이용하여 중첩(overlapping)을 통해 제작하였다. 이를 통해 인간 세럼 알부민의 신호 펩티드 및 각 CH3 변이체의 제2 Fc 사슬 단백질을 포함하는 각각의 항체(중쇄 변이체 및 경쇄)를 발현하는 발현

백터를 제작하였다. 여기서, 경쇄 아미노산 서열은 서열번호 10을 참조한다. CH3 변이체 A 또는 B의 제2 Fc 사슬 돌연변이가 도입된 전체 중쇄 아미노산 서열은 각각 서열번호 11 및 12를 참조한다.

[228]

[229] **4-2. 단백질 발현 및 정제**

[230] 상기 실험예 4-1에서 제작한 CH3 변이체 A 및 B 각각에 대한 제1 Fc 사슬 발현 백터와 제2 Fc 사슬 발현 백터(즉, 항체 발현 백터)를 ExpiCHO 세포에 co-transfection하여 단백질을 발현하였다.

[231] 상기 트랜스펙션은 초기 세포 밀도 6×10^6 cells/mL 및 발현 백터 농도가 총 0.8 μ g DNA/mL인 조건에서 진행되었으며, 이 과정에서 ExpiCHO™ Expression Medium, OptiPRO™ SFM 및 ExpiFectamine™ 트랜스펙션 키트(Gibco)를 제조사 지침에 따라 사용하였다. 트랜스펙션에 사용한 전체 발현 백터 양은 동일하게 유지하되, 발현량이 적은 항체 단백질을 코딩하는 발현 백터를 과량 첨가하여 비율을 조절하였다(대략 1:4).

[232] 트랜스펙션 과정을 거친 세포들을 37°C, 8% CO₂ 조건에서 18시간 배양한 뒤 트랜스펙션 키트(Gibco) 제조사 지침에 따라 ExpiCHO™ Feed와 ExpiCHO™ Enhancer를 처리한 뒤 32°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 트랜스펙션으로부터 6일 뒤 원심분리를 통해 각 단백질을 함유하는 세포 배양액과 세포를 분리하였으며, 이 때 세포 생존율은 75% 이상이었다.

[233] 각각의 재조합 단백질을 포함하는 배양액에서 목표 단백질들을 분리하기 위해 Pierce® Protein A Agarose 레진 (Thermo Scientific™)을 이용한 친화도 크로마토그래피를 실시하였다.

[234] 구체적으로 10CV(컬럼 부피)의 Protein A IgG Binding Buffer (Thermo Scientific™)로 평형시킨 레진에 13000 xg 원심분리를 통해 aggregate 및 세포 유래 불순물을 제거한 배양액을 투입하였다. 이 후 레진을 10CV의 Protein A IgG Binding Buffer (Thermo Scientific™) 및 1CV의 IgG Elution buffer (Thermo Scientific™)로 순차적으로 세척한 뒤 3CV의 IgG Elution buffer (Thermo Scientific™)를 이용하여 단백질을 용출하였다. 용출된 단백질의 pH를 7.4까지 중화시키기 위해 용출에 사용한 IgG Elution buffer의 1/10 부피에 해당하는 1M Tris pH8.5를 용출된 단백질에 첨가했다.

[235] 용출된 단백질 중 일부 분획은 이중이합체 단백질 생성 수율을 확인하기 위해 Amicon tube (Merck, MWCO: 3K)를 이용하여 1 mg/mL까지 농축하였다.

[236] 용출된 단백질 중 또다른 분획을 FcRn binding 및 Tm 측정을 위해 크기 배제 크로마토그래피 컬럼을 이용하여 이중이합체 단백질을 분리 정제하였다. 구체적으로 AKTA avant 25 FPLC를 이용하여 정제하였으며, HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (Cytiva) 컬럼을 사용하였다. 1.5CV의 PBS (10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl pH 7.4)로 평형시킨 컬럼에 친화도 크로마토그래피 용출 단백질 500 μ L를 주입한 뒤 1 mL/min의 속도로 PBS

buffer를 흘려주었다. 크기에 따라 분리된 단백질은 1.3 mL씩 분액하여 모았으며 4-12% 비환원성 SDS-PAGE를 통해 이중이합체 단백질의 형성을 확인하였다.

[237] 이하, CH3 변이체 A의 돌연변이가 도입된 CH3 도메인, Fc 영역 또는 이중이합체를 "WRE 변이체"(본 발명의 실시예 2의 CH3 변이체)로 지칭하고, CH3 변이체 B의 돌연변이가 도입된 CH3 도메인, Fc 영역 또는 이중이합체를 "WRREE 변이체"(본 발명의 실시예 3의 CH3 변이체)로 지칭한다. 또한, 대조군으로서, IgG1 야생형 Fc, KiH Fc 및 EW-RVT Fc를 사용하는 것을 제외하고는 본 실험에 4와 동일한 방식으로 발현 벡터를 제작하고 이로부터 단백질을 생산하였다.

[238] 도 7은 KiH, WER, WRE 및 WRREE 각각에 대하여, 본 실험에 4에서 제작된 제1 Fc 사슬 발현 벡터 및 제2 사슬 발현 벡터를 co-transfection 하였을 때 생산되는 이중이합체를 도식화한 것이다. 돌연변이가 도입되지 않은 IgG1 야생형 Fc(Fc WT)는 동중이합체를 형성한다.

[239]

[240] 실험예 5: WRE Fc 및 WRREE Fc를 도입한 이중이합체 단백질의 분석

[241] 5-1. 이중이합체 형성 수율 분석

[242] 상기 실험예 4에서 제작한 제1 Fc 사슬 발현 벡터 및 제2 Fc 사슬 발현 벡터를 co-transfection하여 단백질을 생산하였을 때 발생 가능한 단백질 형태는 도 8에 도시한 바와 같다. 이 중에서, 본 발명의 실시예 2 및 3의 CH3 변이체(각각 WRE 변이체 및 WRREE 변이체)를 도입함에 따라 이중이합체의 형성이 선호되는지 여부를 확인하기 위해 이중이합체 단백질의 형성 수율을 분석하였다.

[243] 상기 실험예 4에서 생산된 KiH Fc, EW-RVT Fc, WRE Fc 또는 WRREE Fc를 포함하는 이중이합체 단백질을 Protein A로 정제한 후 크기 배제 크로마토그래피 (Thermo Scientific™, MAbPac™ SEC-1)를 이용하여 HPLC (Thermo Scientific™, Vanquish VC-P20-A) 분석을 수행하였다. 용출 완충액으로 PBS를 사용하였으며 유속 0.7 mL/min에서 진행되었다. 동중이합체 및 단량체 크기 확인을 위해 KiH의 제1 사슬 발현 벡터(Knob) 및 제2 사슬 발현 벡터(Hole)를 각각 단독 transfection 및 발현하여 정제한 단백질을 함께 분석함으로써, 동중이합체, 이중이합체 및 단량체의 피크를 특정하였다.

[244] 그 결과를 도 9에 나타내었다. 도 9의 SEC-HPLC 그래프 분석 프로파일로부터 분석된 각각의 동중이합체, 이중이합체 및 단량체의 생성 비율을 표 4에 정리하고, 이들 생성 비율을 막대 그래프로 도식화하여 도 10에 나타내었다.

[245]

[246] [표4]

	(%)	KiH	EW-RVT	WRE (본 발명의 실시예 2)	WRREE (본 발명의 실시예 3)
Molar ratio of constructs (SEC-HPLC)	Hole Dimer	0.00	0.77	0.00	0.00
	Heterodimer	64.15	70.41	89.65	93.69
	Hole Monomer	0.00	0.00	0.00	0.00
	Knob Dimer	24.17	28.82	8.57	4.99
	Knob monomer	11.68	0.00	1.78	1.32

[247]

[248] 위에서 보는 바와 같이, 종래 기술의 대조군 변이체를 도입한 경우의 이종이합체 생성 수율은 대략 64~70%을 보이는 것에 비하여, 본 발명의 실시예 2 및 3의 CH3 변이체를 도입한 경우의 이종이합체 생성 수율은 대략 90~94%로 현저히 향상된 이종이합체 생성 수율을 나타내는 것이 확인되었다.

[249]

[250] 5-2. 이종이합체 FcRn 결합능 분석

[251] 상기 실험예 4에 따라 제조된 본 발명의 일 실시태양에 따른 이종이합체 단백질이 야생형 동종이합체와 비교하여 FcRn에 대한 결합능을 유지하고 있는지 확인하기 위해, 크기 배제 크로마토그래피 컬럼을 이용하여 FPLC에서 분리한 이종이합체 단백질에 대해 SRP (Surface Plasmon Resonance) 장비인 Biacore 8K (Cytiva)를 이용하여 분석하였다. 구체적으로 CM5 센서칩 (Cytiva)에 10 mM Sodium acetate pH 5.0에 희석한 FcRn 단백질을 약 600 RU (response units)이 되도록 고정하였다. 야생형 동종이합체, WRE 이종이합체 및 WRREE 이종이합체를 1500-2.5 nM의 농도로 2.5배씩 0.005% Tween20이 함유된 PBS (pH6.0)에 희석하여 120초 동안 30 μ L/min의 속도로 흘려 결합 분석을 진행하였으며, 단백질을 포함하지 않은 동일한 완충 용액을 600초 동안 30 μ L/min의 속도로 흘려 해리 분석을 진행하였다. CM5 센서칩의 재생은 HBS-EP (pH8.0) 완충용액을 60초 동안 30 μ L/min의 속도로 흘려 진행하였다.

[252] 도 11a 내지 11c는 각 재조합 단백질의 FcRn에 대한 결합 및 해리 분석 후 얻어진 센소그램을 바탕으로 평형상태 (steady-state)의 RU를 통해 친화도 분석을 진행한 그래프를 나타낸 것이다. 상기 센소그램을 바탕으로 계산된 FcRn 친화도를 아래 표 5에 표기하였다.

[253]

[254] [표5]

	IgG1 (Fc WT)	WRE	WRREE
Steady-state K_D (nM)	490	411	458

[255]

[256] 이로부터 본 발명의 WRE 및 WRREE 이중이합체는 돌연변이 도입에도 불구하고 야생형 동종이합체 (IgG1 (Fc WT))와 동일한 FcRn 결합능을 그대로 유지하고 있는 것을 확인하였다.

[257]

[258] **5-3. 이중이합체 열역학적 안정성 분석**

[259] 상기 실험에 4에 따라 제조된 본 발명의 일 실시태양에 따른 이중이합체 단백질의 열역학적 안정성을 평가하기 위하여, 크기 배제 크로마토그래피 컬럼을 이용하여 FPLC에서 분리한 이중이합체 단백질에 대해 시차주사 열용량 분석기 (Differential Scanning Calorimetry, DSC)인 MicroCal PEAQ-DSC Automated (Malvern Panalytical)를 사용하여 열전이 중간점(thermal transition midpoint, T_m)을 측정하였다. 열역학적 변성은 10°C에서 110°C까지 1°C/min의 속도로 측정하였으며, 단백질을 제외한 동일 조성 완충액을 통해 측정값을 보정하였다.

[260] 도 12a 내지 12c는 각 제조합 단백질의 시차주사 열용량 분석 결과 프로파일을 나타낸 것이다. 상기 프로파일을 바탕으로 계산된 각 제조합 단백질의 CH2 도메인 및 Fab/(CH3) 도메인의 열 전이 중간점(T_m)을 아래 표 6에 정리하였다.

[261]

[262] [표6]

T_m	IgG1 (Fc WT)	WRE	WRREE
CH2	72.78	71.75	71.32
Fab/(CH3)	77.96/83.96	77.53	77.57

[263]

[264] 표 6에서 보는 바와 같이, 본 발명의 WRE 및 WRREE 이중이합체는 돌연변이 도입에도 불구하고 야생형 IgG1 동종이합체 (IgG1 Fc WT)와 동일한 열역학적 안정성을 유지하고 있는 것으로 확인되었다(WRE 및 WRREE 이중이합체의 CH3 도메인의 열전이 중간점은 Fab의 피크와 겹쳐져 특정되지 않았으나, IgG1 Fc WT의 Fab 열전이 중간점에 비해 변화가 크지 않고 유사하게 나타난 점으로부터 WRE 및 WRREE 이중이합체의 CH3 도메인의 열역학적 안정성이 WT과 유사함을 알 수 있다).

[265]

[266] **5-4. 컴퓨터 가상 분석을 통한 이중이합체의 면역원성 분석 (*in silico* CD4 T cell immunogenicity prediction)**

- [267] 이종이합체 형성을 위해 도입한 돌연변이에 의해 면역원성 증가 가능성을 분석하기 위해 면역원성 컴퓨터 가상 분석을 진행하였다. 분석에는 IEDB Analysis Resource에서 제공하는 분석 시스템인 CD4 T cell immunogenicity prediction (<http://tools.iedb.org/CD4episcore/>)을 사용하였다. 분석 방법은 7-allele method와 immunogenicity method를 함께 예측하는 IEDB recommended (combined)을 선택하였으며, maximum percentile rank threshold는 50을 선택하여 분석 진행하였다. 분석에는 인간 IgG1의 야생형 Fc 아미노산 서열과 본 발명의 일 실시태양에 따른 WRE 및 WRREE 이종이합체의 Fc 아미노산 서열을 사용하였다. 분석 결과표에서 펩티드는 항원결정기(epitope)로 작용할 것으로 예측되는 부위를 나타낸다. 각 점수는 면역원성을 유발할 수 있는 정도를 예측한 값으로 그 값이 낮을수록 면역원성을 유발할 가능성이 높음을 의미한다.
- [268] 본 발명의 WRE Fc 및 WRREE Fc의 면역원성 예측 분석 결과를 아래 표 7에 나타내었다. WRE Fc 및 WRREE Fc의 서열에서 항원결정기 가능성이 있는 펩티드 범위가 대조군으로 사용된 인간 IgG1의 야생형 Fc의 분석 결과와 동일하게 예측되었다. WRE Fc 및 WRREE Fc 각각의 제2 사슬(Hole 사슬)의 항원결정기 펩티드(3번째 펩티드)에 이종이합체 형성을 위해 도입한 돌연변이가 존재하여 점수의 변화가 나타났지만, 계산된 점수가 야생형 대비 높으므로 면역원성이 낮을 것으로 예측된다. 종합하면, WRE Fc 및 WRREE Fc에 도입된 돌연변이가 IgG1 야생형에 의해 발생 가능한 면역원성 외에 추가적인 혹은 더 높은 면역원성을 일으킬 가능성은 매우 낮을 것으로 예측되었다.
- [269]

[270] [표 7]

		Peptide	Combined Score	Immunogenicity Score	Median percentile Rank (7-Allele)
IgG1 Fc WT		KPKDTLMISRTPE VT	47.92904	89.8226	20.0
		YNSTYRVVSVLT VLH	48.60732	94.5183	18.0
		DGSFFLYSKLTVD KS	48.28376	83.2094	25.0
WRE Fc	Knob	KPKDTLMISRTPE VT	47.92904	89.8226	20.0
		YNSTYRVVSVLT VLH	48.60732	94.5183	18.0
		DGSFFLYSKLTVD KS	48.28376	48.28376	83.2094
	Hole	KPKDTLMISRTPE VT	47.92904	89.8226	20.0
		YNSTYRVVSVLT VLH	48.60732	94.5183	18.0
		DGSFFLVSKLTV DKS	49.45232	90.6308	22.0

WRR EE Fc	Knob	KPKDTLMISRTPE VT	47.92904	89.8226	20.0
		YNSTYRVVSVLT VLH	48.60732	94.5183	18.0
		DGSFFLYSKLTV KS	48.28376	48.28376	83.2094
	Hole	KPKDTLMISRTPE VT	47.92904	89.8226	20.0
		YNSTYRVVSVLT VLH	48.60732	94.5183	18.0
		DGSFFLVSKLTV DKS	49.45232	90.6308	22.0

[271]

[272] 이상으로 본 발명의 내용의 특정부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[273]

[274] 서열 리스트

[275] [표 8]

SEQ ID No.	Description	Sequences
1	WER Fc mutant chain 1	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTE N QVSL W CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
2	WER Fc mutant chain 2	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP R VYTLPPSRDELTKNQVSL S C A VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY V SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
3	Wild Type IgG1 221-447 (EU numbering)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
4	WER Fc mutant chain 1 - vector coding sequences	MDWTWRVFCLLAVAPGAHSDIDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTE N QVSL W CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGHHHHHH
5	WER Fc mutant chain 2 - vector coding sequences	MDWTWRVFCLLAVAPGAHSDIDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA

		KGQPREP <u>R</u> VYTLPPSRDELTKNQVSL <u>SCA</u> VKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY <u>Y</u> SKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GKTGHHHHHH
6	WRE Fc mutant chain 1 (CH3 mutant A chain 1)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREP <u>R</u> VYTLPPSRDELTKNQ VSL <u>W</u> CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
7	WRE Fc mutant chain 2 (CH3 mutant A chain 2)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL <u>T</u> ENQ VSL <u>SCA</u> VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLY <u>Y</u> SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG
8	WRREE Fc mutant chain 1 (CH3 mutant B chain 1)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREP <u>R</u> VYTLPPSRDEL <u>T</u> RNQ VSL <u>W</u> CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
9	WRREE Fc mutant chain 2 (CH3 mutant B chain 2)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREP <u>E</u> VYTLPPSRDEL <u>T</u> ENQ VSL <u>SCA</u> VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLY <u>Y</u> SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG
10	Light chain amino acids	DIVLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIVHSNGDTY LEWYLQKPGQSPKLLIYKVKRFSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPWTFGGGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY

		PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
11	WRE heavy chain amino acids	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTGYWMHWVKQRPGQGLEWIGMIHPNSDTTTYNEKFKNRATLTVDKSSGTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTGTDQAAWFAFWGQGTLLTVSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTE <u>N</u> QVSL <u>S</u> CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
12	WRREE heavy chain amino acids	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTGYWMHWVKQRPGQGLEWIGMIHPNSDTTTYNEKFKNRATLTVDKSSGTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTGTDQAAWFAFWGQGTLLTVSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPEVYTLPPSRDELTE <u>N</u> QVSL <u>S</u> CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

청구범위

- [청구항 1] 항체의 제1 CH3 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 및 제2 CH3 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 이종이합체로서,
상기 제1 CH3 도메인은 T366에서의 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 CH3 도메인은 T366, L368 및 Y407 중 하나 이상에서의 아미노산 치환을 포함하며,
상기 제1 CH3 도메인 및 제2 CH3 도메인 중 어느 한 도메인은 K360에서의 아미노산 치환을 더 포함하고, 다른 한 도메인은 Q347에서의 아미노산 치환을 더 포함하며, 여기서 상기 아미노산 번호는 KABAT 문헌의 EU 넘버링을 기준으로 하는 것인, 이종이합체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 제1 CH3 도메인 및 제2 CH3 도메인 중 K360에서의 아미노산 치환을 포함하는 도메인이 Q347에서의 아미노산 치환을 더 포함하거나,
상기 제1 CH3 도메인 및 제2 CH3 도메인 중 Q347에서의 아미노산 치환을 포함하는 도메인이 K360에서의 아미노산 치환을 더 포함하거나, 또는
상기 제1 CH3 도메인 및 제2 CH3 도메인 중 K360에서의 아미노산 치환을 포함하는 도메인이 Q347에서의 아미노산 치환을 더 포함하고,
Q347에서의 아미노산 치환을 포함하는 도메인이 K360에서의 아미노산 치환을 더 포함하는 것인, 이종이합체.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항에 있어서, K360 또는 Q347에서의 아미노산 치환이 생리학적 pH에서 양전하 또는 음전하를 띠는 아미노산으로의 치환을 포함하는 것인, 이종이합체.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, (a) 상기 제1 CH3 도메인과 제2 CH3 도메인 중 어느 한 도메인의 Q347이 생리학적 pH에서 양전하를 띠는 아미노산으로 치환되어 있는 경우, 다른 한 도메인의 K360은 생리학적 pH에서 음전하를 띠는 아미노산으로 치환되어 있고,
이 때 상기 Q347이 생리학적 pH에서 양전하를 띠는 아미노산으로 치환되어 있는 도메인은 K360에서 생리학적 pH에서 양전하를 띠는 아미노산으로의 치환을 더 포함할 수 있고,
상기 K360이 생리학적 pH에서 음전하를 띠는 아미노산으로 치환되어 있는 다른 한 도메인은 Q347에서 생리학적 pH에서 음전하를 띠는 아미노산으로의 치환을 더 포함할 수 있거나, 또는
(b) 상기 제1 CH3 도메인과 제2 CH3 도메인 중 어느 한 도메인의 Q347이 생리학적 pH에서 음전하를 띠는 아미노산으로 치환되어 있는 경우, 다른 한 도메인의 K360은 생리학적 pH에서 양전하를 띠는 아미노산으로 치환되어 있고, 이 때 상기 Q347이 생리학적 pH에서 음전하를 띠는 아미노산으로 치환되어 있는 도메인은 K360에서 생리학적 pH에서

- 음전하를 띠는 아미노산으로의 치환을 더 포함하는 것인, 이종이합체.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 양전하를 띠는 아미노산이 라이신(K) 또는 아르기닌(R)이고, 음전하를 띠는 아미노산이 아스파르트산(D) 또는 글루탐산(E)인, 이종이합체.
- [청구항 6] 제1항 또는 제2항에 있어서,
 (A1) 상기 제1 CH3 도메인이 T366W 및 K360E의 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 CH3 도메인이 T366S, L368A, Y407V 및 Q347R의 아미노산 치환을 포함하거나,
 (A2) 상기 제1 CH3 도메인이 T366W 및 Q347R의 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 CH3 도메인이 T366S, L368A, Y407V 및 K360E의 아미노산 치환을 포함하거나,
 (A3) 상기 제1 CH3 도메인이 T366W, K360R 및 Q347R의 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 CH3 도메인이 T366S, L368A, Y407V, K360E 및 Q347E의 아미노산 치환을 포함하거나, 또는
 (A4) 상기 제1 CH3 도메인이 T366W, K360E 및 Q347E의 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 CH3 도메인이 T366S, L368A, Y407V, K360R 및 Q347R의 아미노산 치환을 포함하는 것인, 이종이합체.
- [청구항 7] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 CH3 도메인이 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE로 이루어진 군으로부터 선택된 면역글로불린에 포함되는 것인, 이종이합체.
- [청구항 8] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드 중 하나 이상의 폴리펩티드에 연결된 하나 이상의 결합 도메인 단백질 또는 약물을 더 포함하는, 이종이합체.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 연결이 직접 연결, 또는 1 내지 50개의 아미노산으로 구성된 펩티드에 의한 연결인, 이종이합체.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 결합 도메인 단백질이 항체의 항원 결합 영역, 수용체 유래 단백질, 사이토카인 및 호르몬으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상인, 이종이합체.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 항원 결합 영역이 Fab, scFab, sdAb, scFv, di-scFv 또는 (dsFv)₂ 형태인, 이종이합체.
- [청구항 12] 제8항에 있어서, 상기 이종이합체가 2개 이상의 표적 단백질에 결합 가능한 이중특이적 또는 다중특이적 항체 또는 이중특이적 또는 다중특이적 융합 단백질인, 이종이합체.
- [청구항 13] 제1항 또는 제2항의 이종이합체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 14] 제13항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.
- [청구항 15] 제13항의 폴리뉴클레오티드 또는 이를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.
- [청구항 16] 제1항 또는 제2항의 이종이합체를 코딩하는 1종 이상의 발현 벡터를

준비하는 단계; 및

상기 발현 벡터를 숙주 세포에서 발현시키고 단백질을 수득하여

이종이합체를 형성하는 단계

를 포함하는, 이종이합체 제조방법.

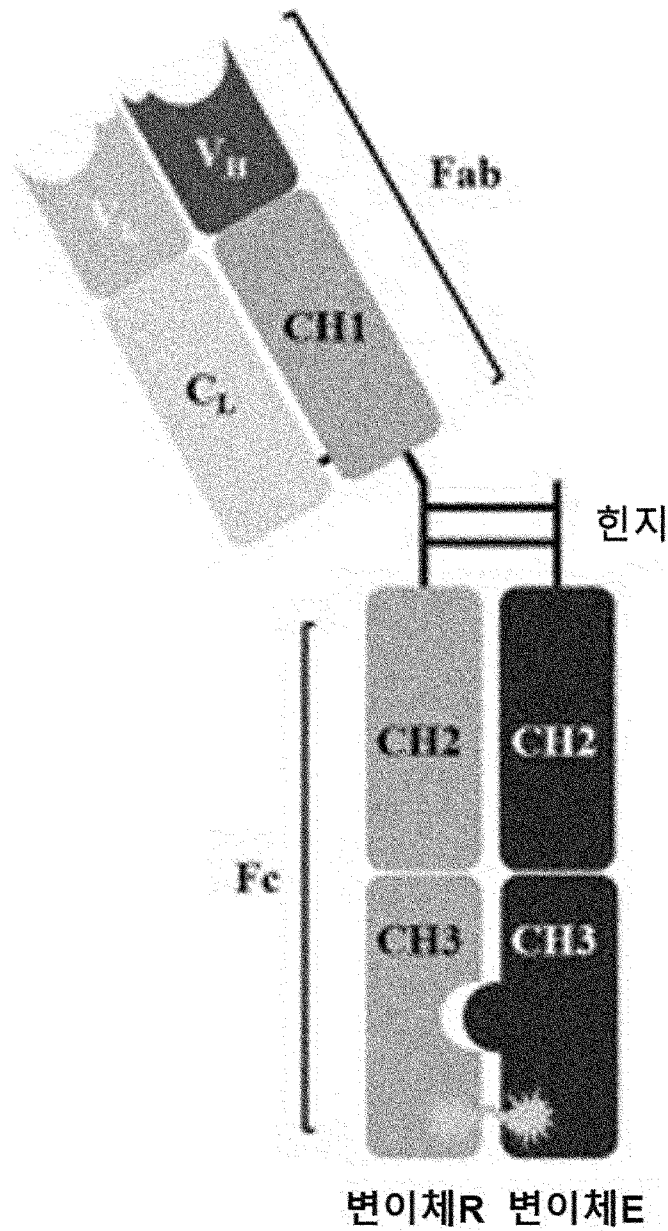
[청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 발현 벡터가, 제1 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 제2 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 이종이합체 제조방법.

[청구항 18] 제16항에 있어서, 상기 발현 벡터가, 제1 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 발현 벡터, 및 제2 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 발현 벡터를 포함하는 것인, 이종이합체 제조방법.

[청구항 19] 제18항에 있어서, 이종이합체 형성 단계에서, 상기 제1 발현 벡터 및 제2 발현 벡터를 숙주 세포에서 각각 발현시켜 2종의 단백질을 수득하고 혼합 반응시켜 이종이합체를 형성하는 것인, 이종이합체 제조방법.

[청구항 20] 제18항에 있어서, 이종이합체 형성 단계에서, 상기 제1 발현 벡터 및 제2 발현 벡터를 숙주 세포에서 동시 발현시켜 이종이합체를 수득하는 것인, 이종이합체 제조방법.

[도1]



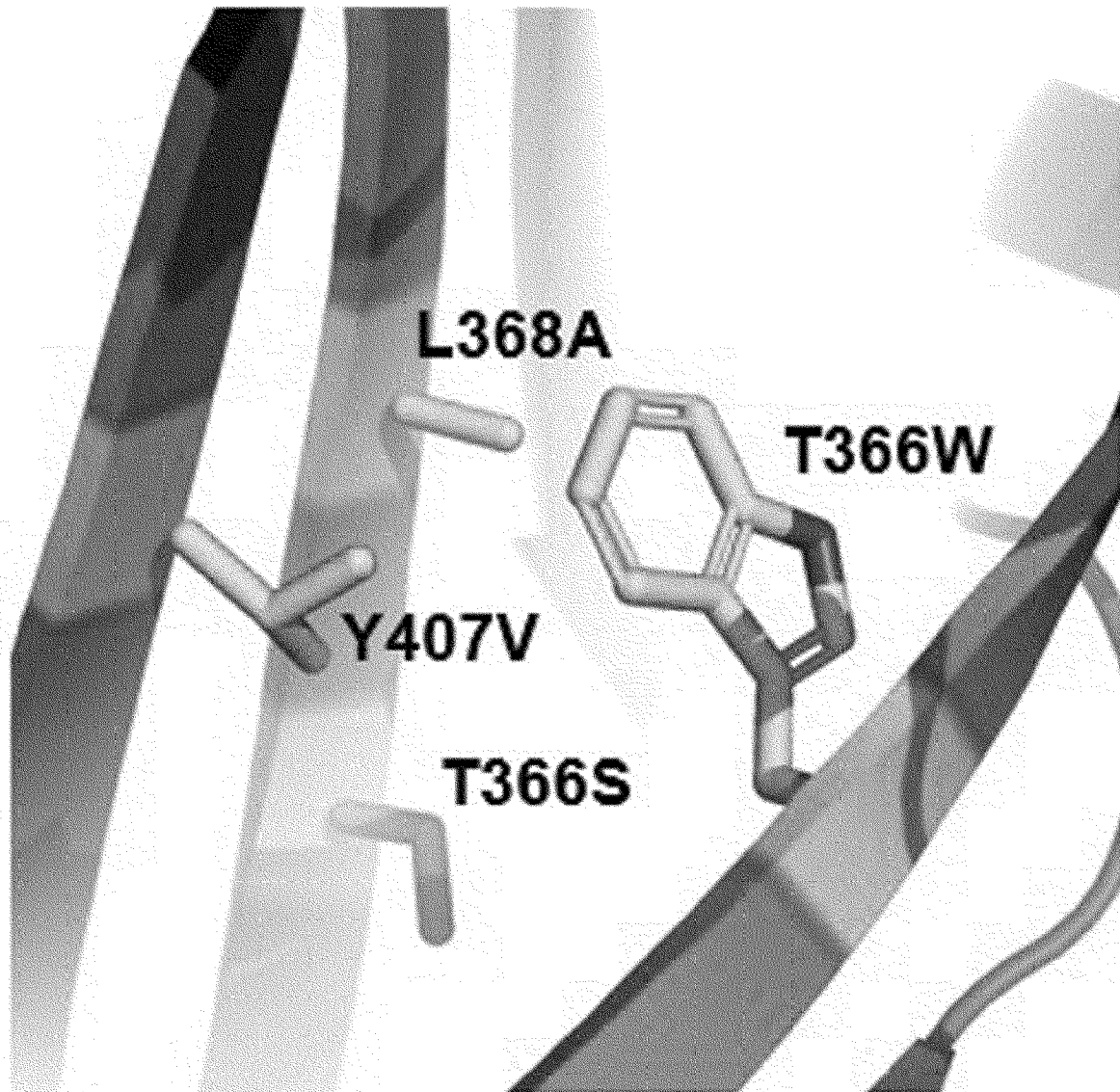
[도2a]

MDWTWRUFCL	LAVAPGAHSD	IDKTHTCPPC	PAPELLGGPS	VFLFPPKPKD	TLNISRTPEV	60
TCUUUDUSHE	DPEUKFNWYU	DGUEVHNAKT	KPREEQYNST	YRVUSULTUL	HQDWLNGKEY	120
KCKUSNKALP	APIEKTISKA	KGQPREPQVY	TLPPSRDELT	*ENQUSL*CLU	KGFYPSDIAV	180
EWESNGQPEN	NYKTTTPULD	SDGSFFLYSK	LTUDKSRWQQ	GNVFSCSUMH	EALHNHYTQK	240
SLSLSPGKTG	HHHHHH					

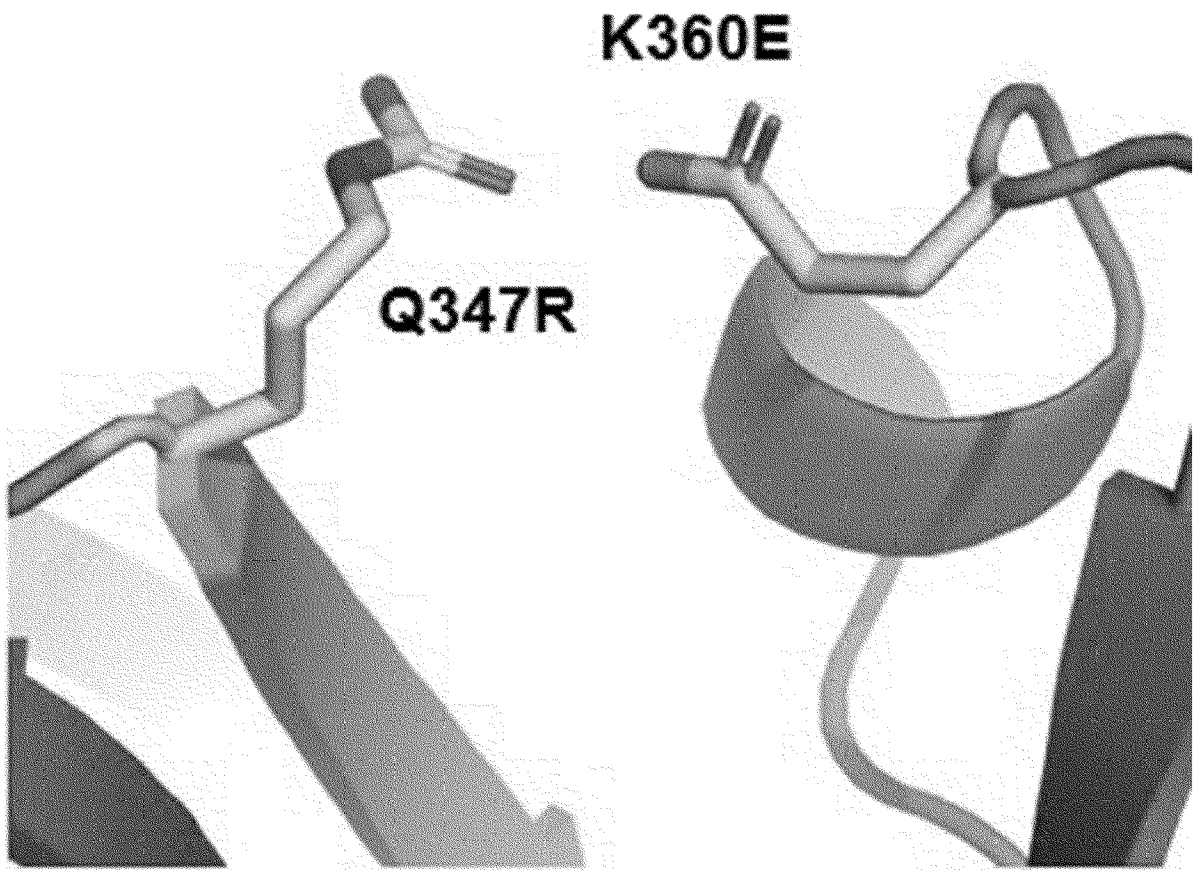
[도2b]

MDWTWRUFCL	LAVAPGAHSD	IDKTHTCPPC	PAPELLGGPS	VFLFPPKPKD	TLNISRTPEV	60
TCUUUDUSHE	DPEUKFNWYU	DGUEVHNAKT	KPREEQYNST	YRVUSULTUL	HQDWLNGKEY	120
KCKUSNKALP	APIEKTISKA	KGQPREPRUY	TLPPSRDELT	KNQUSL*CAV	KGFYPSDIAV	180
EWESNGQPEN	NYKTTTPULD	SDGSFFLUSK	LTUDKSRWQQ	GNVFSCSUMH	EALHNHYTQK	240
SLSLSPGKTG	HHHHHH					

[도3a]



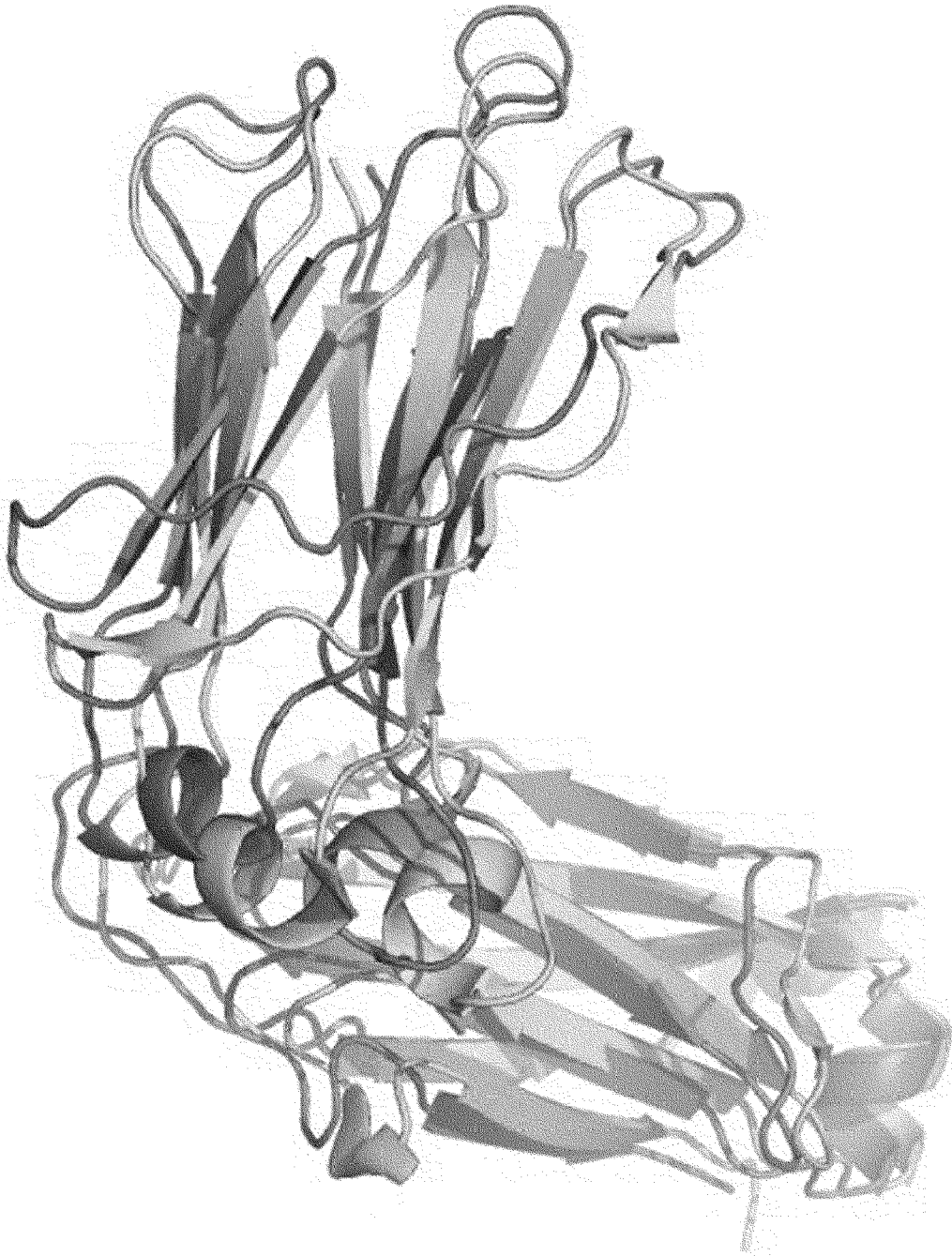
[도3b]



[도4]

A-chain**B-chain**

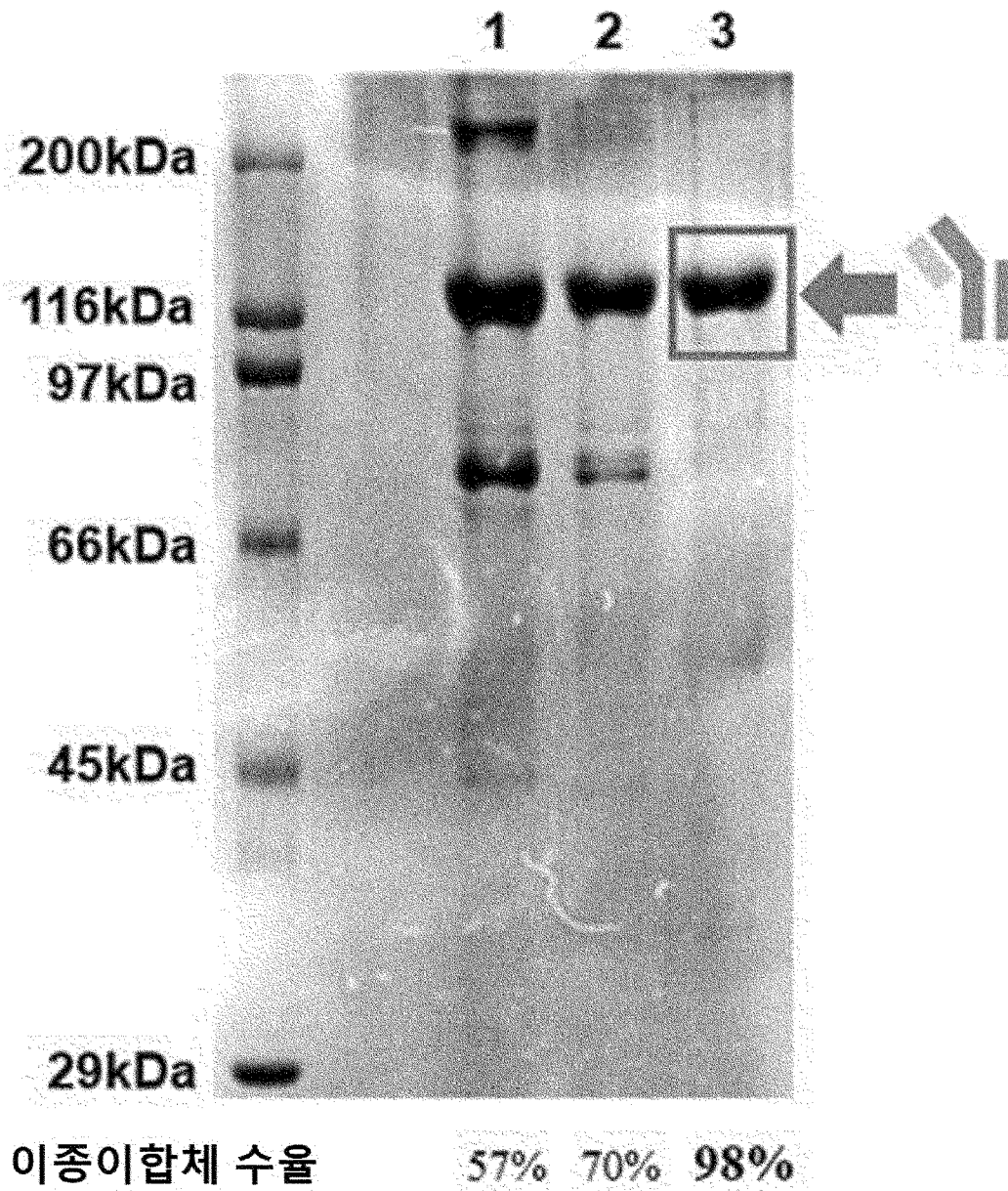
[도5a]



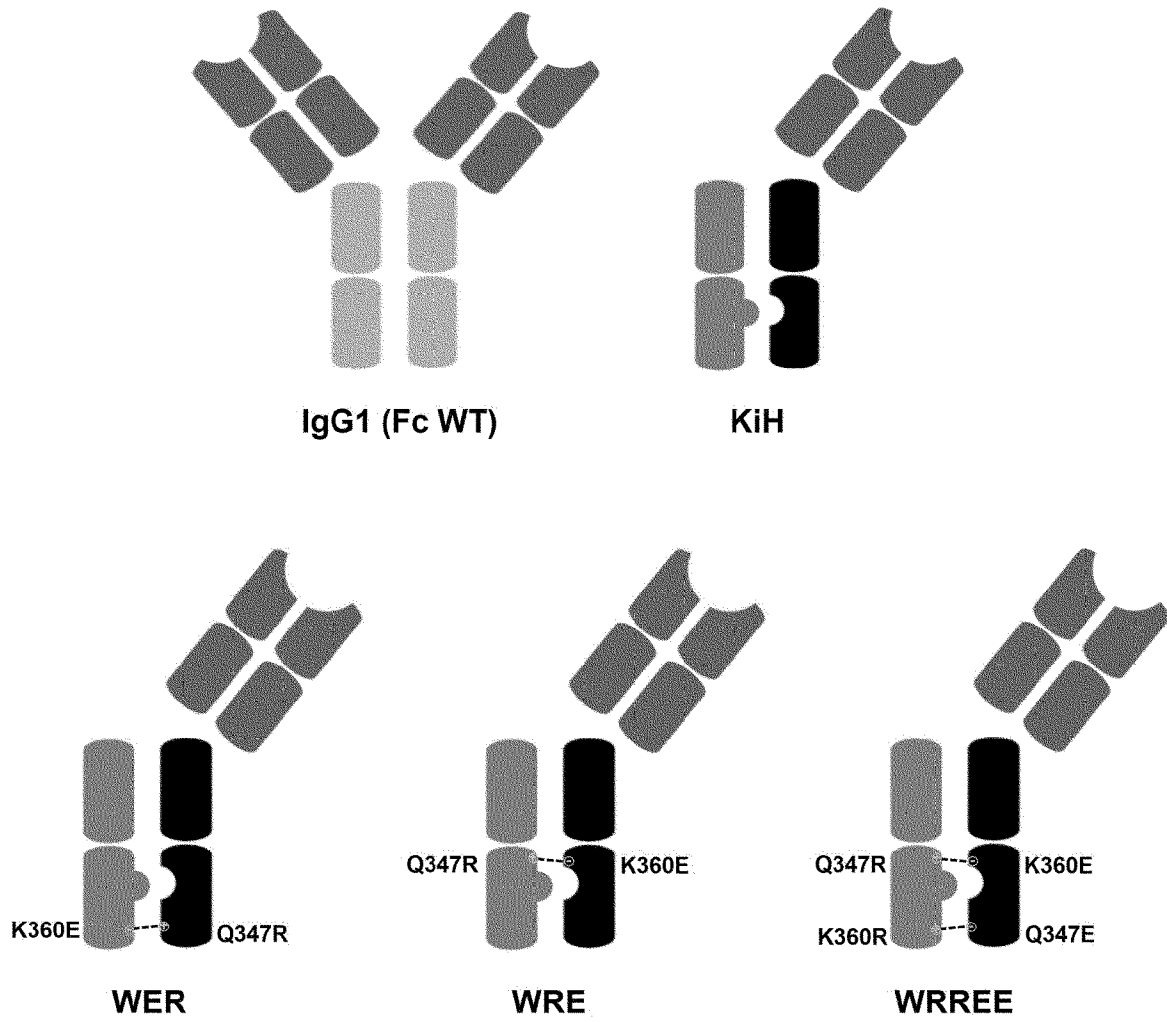
[도5b]



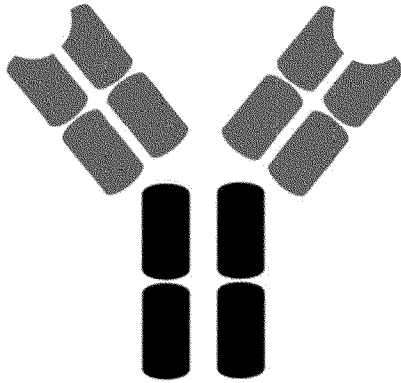
[도6]



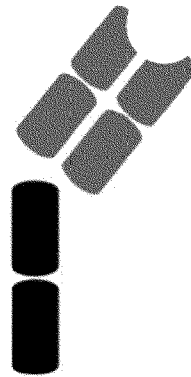
[도7]



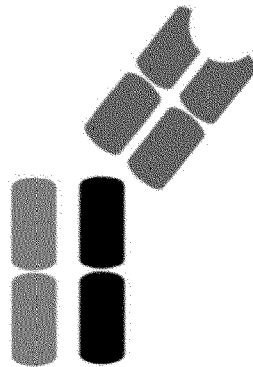
[도8]



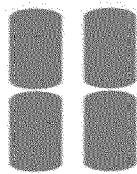
제 2 사슬 동종이합체
(Chain 2 homodimer)



제 2 사슬 단량체
(Chain 2 monomer)



이종이합체
(Heterodimer)

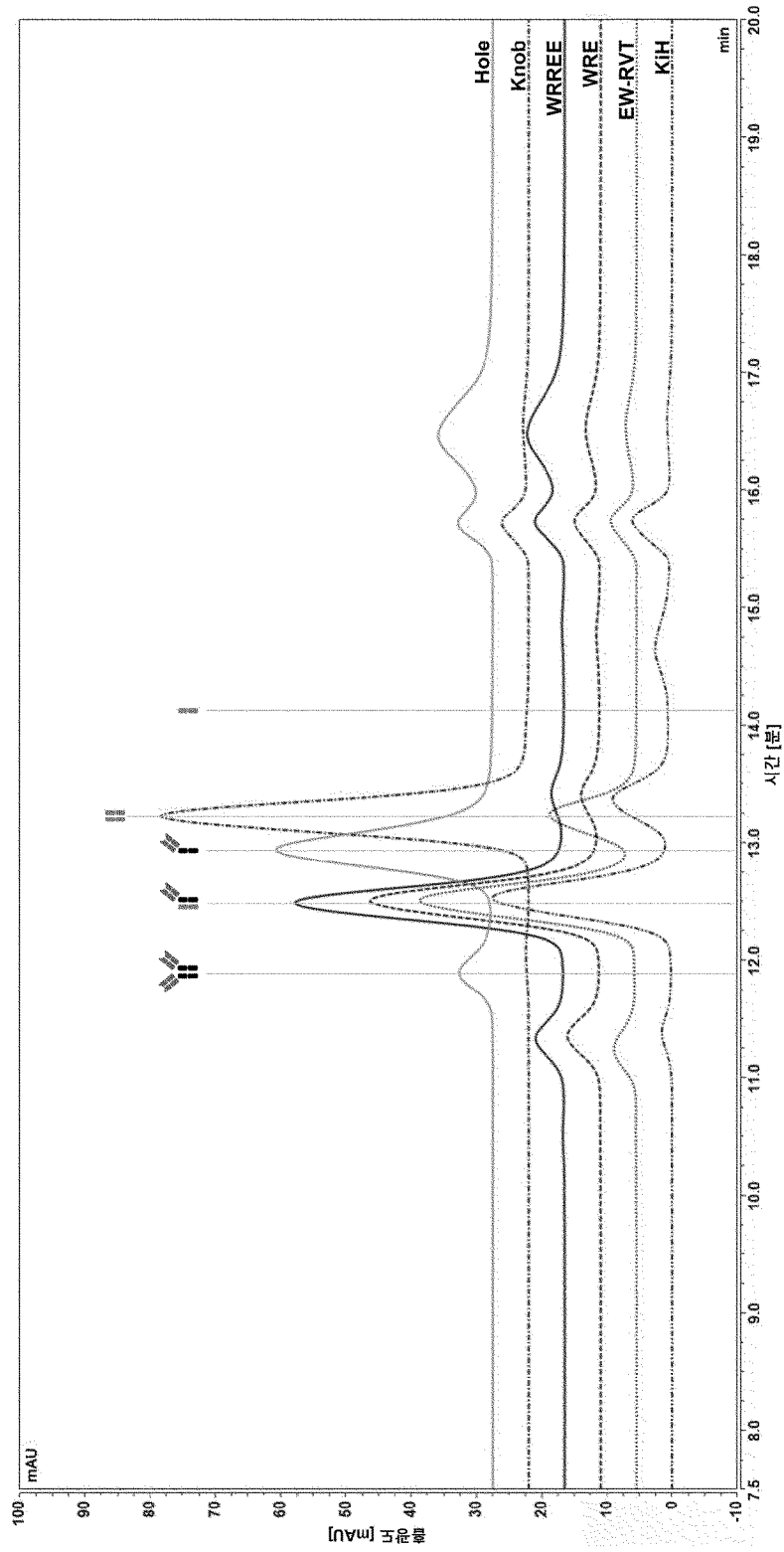


제 1 사슬 동종이합체
(Chain 1 homodimer)

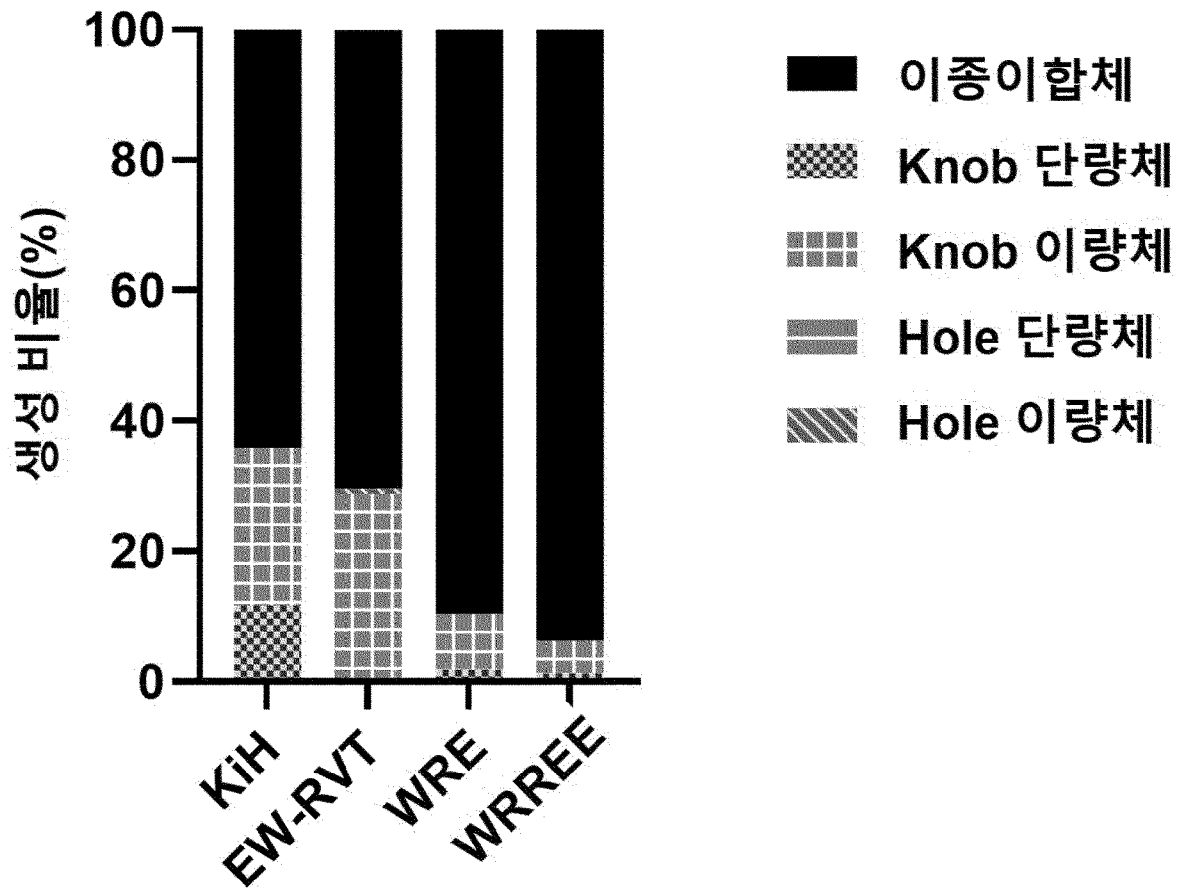


제 1 사슬 단량체
(Chain 1 monomer)

[도9]

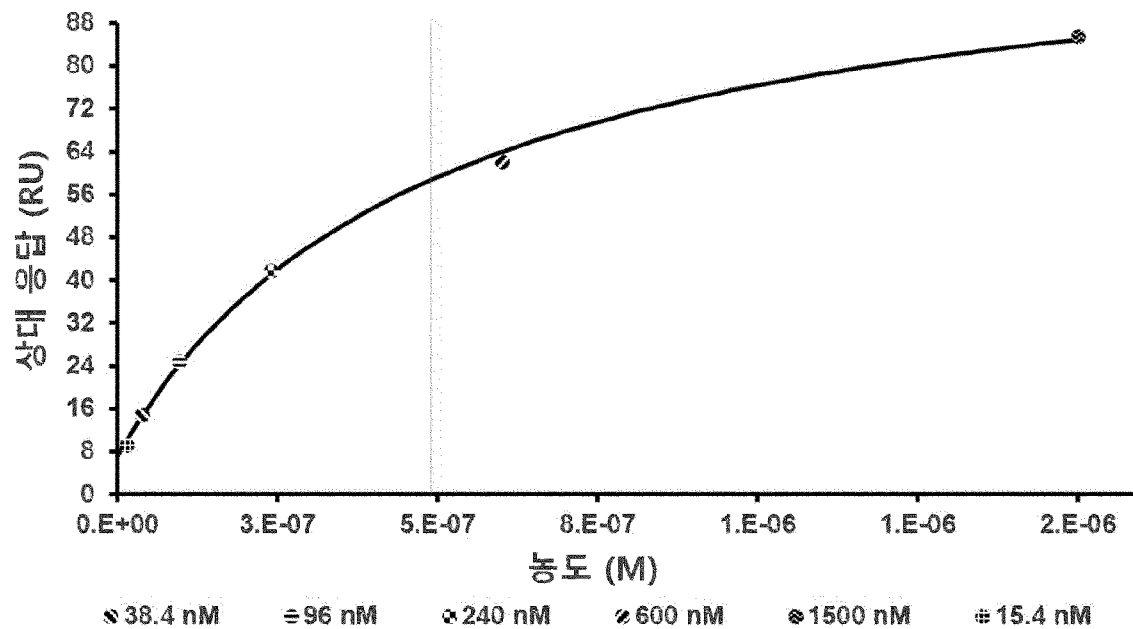


[도10]



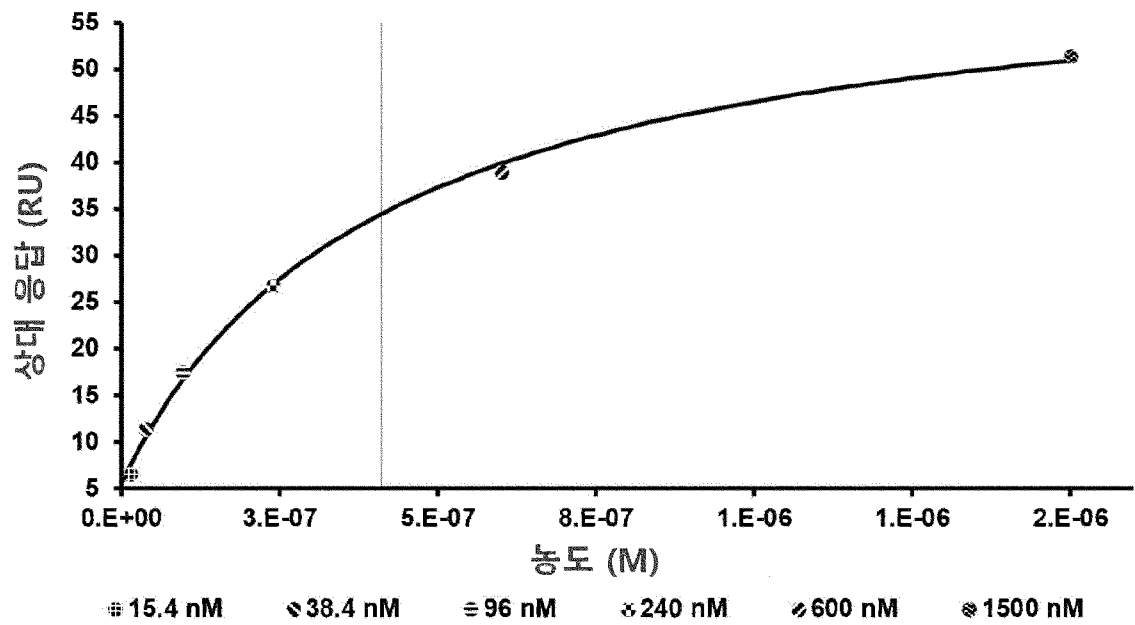
[도11a]

IgG1 (Fc WT); FcRn; 평형상태 친화도



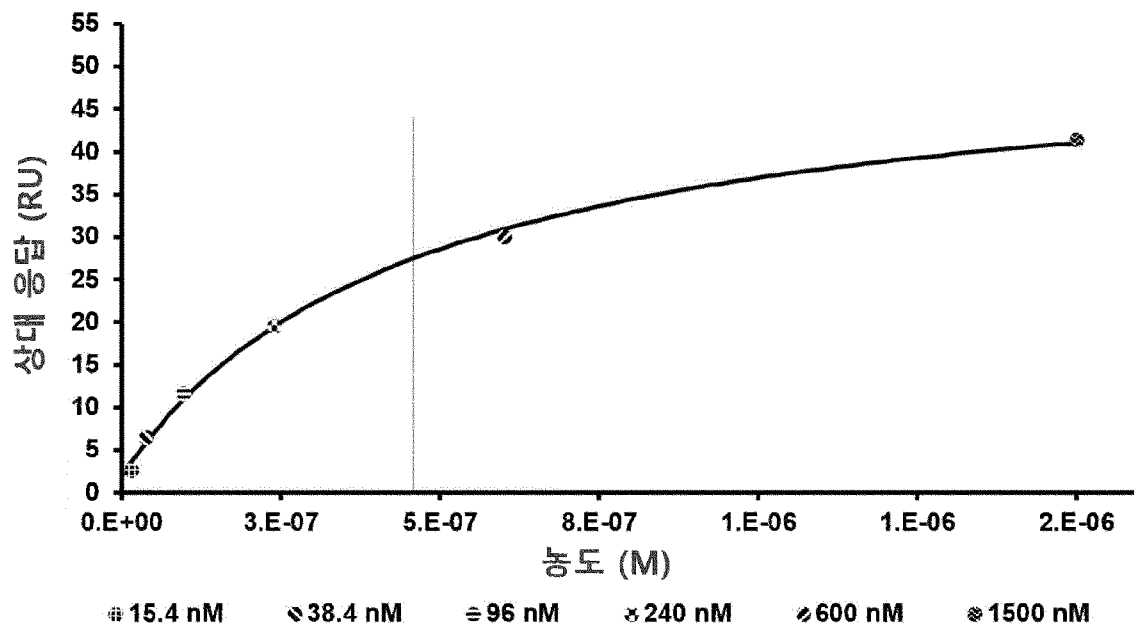
[도11b]

WRE; FcRn; 평형상태 친화도

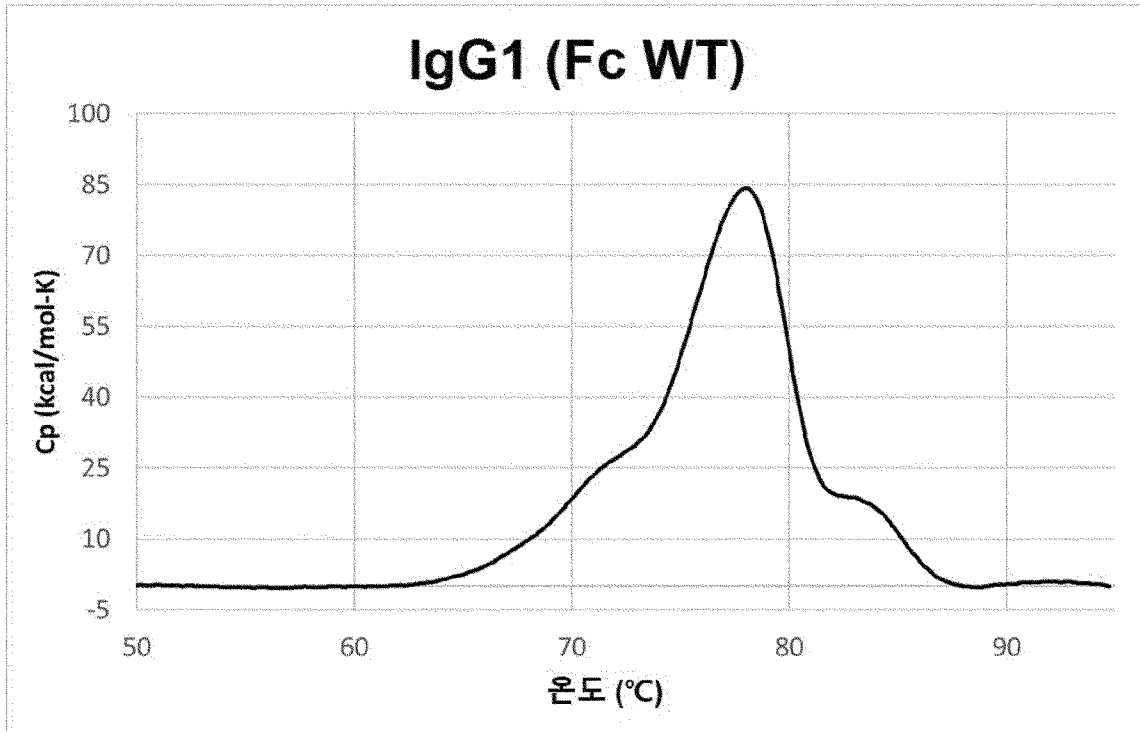


[도11c]

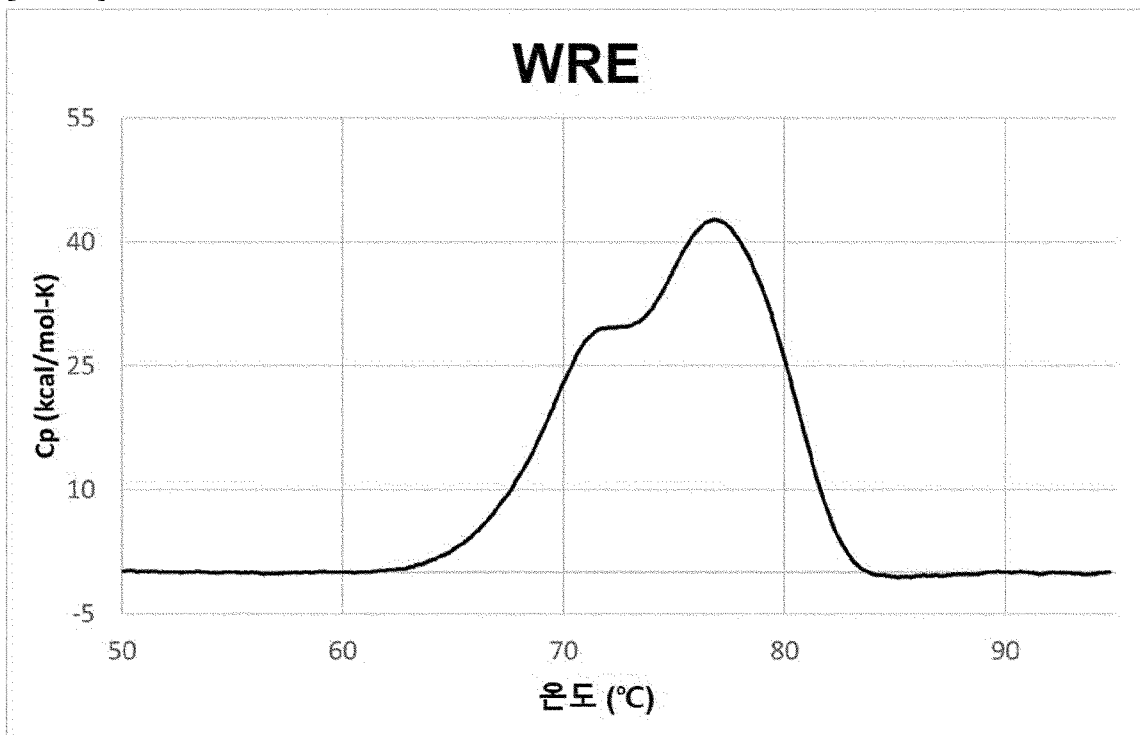
WRREE; FcRn; 평형상태 친화도



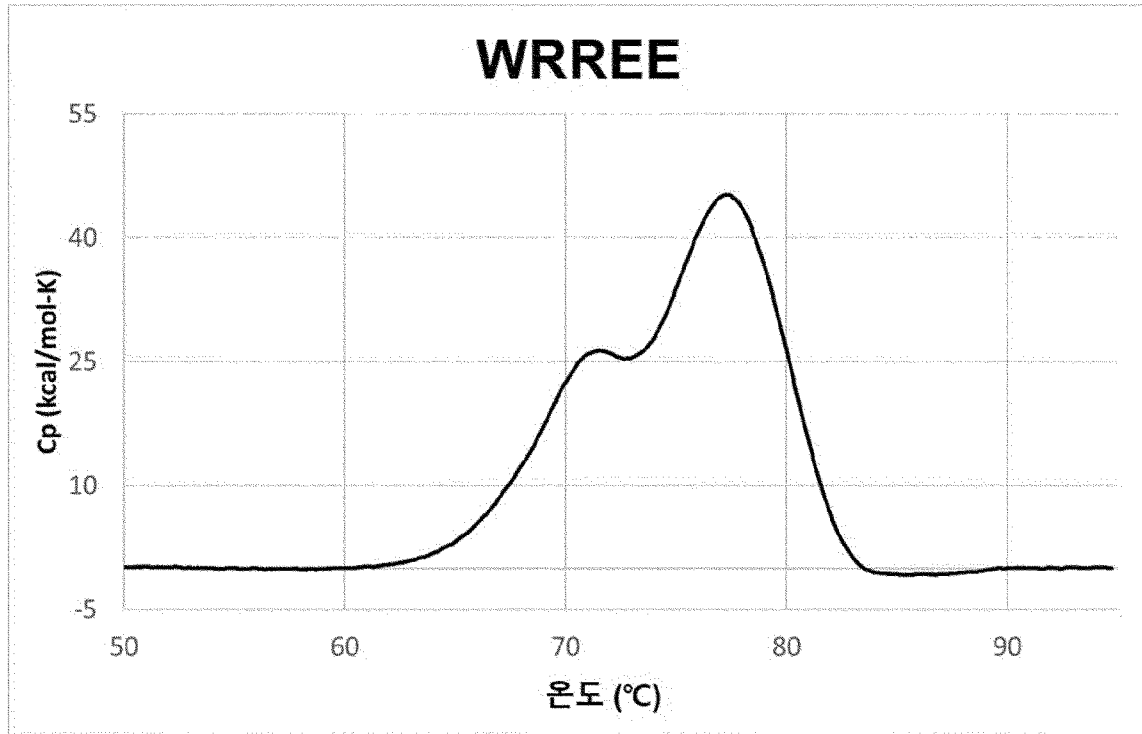
[도 12a]



[도 12b]



[도 12c]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/017565

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/00(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 16/00(2006.01); A61K 38/20(2006.01); A61K 39/00(2006.01); A61K 39/395(2006.01); C07K 14/54(2006.01); C07K 16/18(2006.01); C07K 16/28(2006.01); C07K 16/46(2006.01); C12N 15/62(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 단편 결정화 영역(fragment crystallizable region, Fc), 이종이 합체(heterodimer), CH3 도메인(CH3 domain), 변이(mutation), 아미노산 치환(amino acid substitution), T366, K360, Q347		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2018-0362668 A1 (JIANGSU ALPHAMAB BIOPHARMACEUTICALS CO., LTD. et al.) 20 December 2018 (2018-12-20) See claim 1; and paragraphs [0004]-[0045] and [0069]-[0119].	1-20
A	KR 10-2014-0067944 A (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 05 June 2014 (2014-06-05) See claims 1 and 2; and paragraphs [0014], [0058] and [0100]-[0179].	1-20
A	KR 10-1247908 B1 (GENENTECH, INC.) 26 March 2013 (2013-03-26) See paragraph [0363].	1-20
A	KR 10-2021-0064199 A (DENALI THERAPEUTICS INC.) 02 June 2021 (2021-06-02) See paragraphs [0037] and [0403].	1-20
A	KR 10-2018-0026279 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION et al.) 12 March 2018 (2018-03-12) See claim 1; and paragraphs [0048] and [0050].	1-20
☐ 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 13 February 2023		Date of mailing of the international search report 14 February 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/017565

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
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/017565

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
US	2018-0362668	A1	20 December 2018	CA	3007427	A1	22 June 2017
				CN	106883297	A	23 June 2017
				CN	106883297	B	13 December 2019
				CN	108473592	A	31 August 2018
				CN	108473592	B	03 May 2022
				EP	3392276	A1	24 October 2018
				HK	1253248	A1	14 June 2019
				JP	2019-502701	A	31 January 2019
				JP	2022-130568	A	06 September 2022
				JP	7103603	B2	20 July 2022
				US	11168149	B2	09 November 2021
				US	2022-0017643	A1	20 January 2022
				WO	2017-101828	A1	22 June 2017
KR	10-2014-0067944	A	05 June 2014	AU	2013-352812	A1	05 June 2014
				BR	112015012310	A2	06 February 2018
				CA	2892623	A1	05 June 2014
				CA	2892623	C	11 August 2020
				CN	104955953	A	30 September 2015
				CN	104955953	B	26 April 2019
				DK	2927321	T3	15 March 2021
				EA	032681	B1	31 July 2019
				EA	201591038	A1	30 November 2015
				EP	2927321	A1	07 October 2015
				EP	2927321	B1	17 February 2021
				EP	3878964	A1	15 September 2021
				ES	2861446	T3	06 October 2021
				IL	239041	A	30 June 2019
				IL	239041	B	30 June 2019
				IL	239041	D0	30 July 2015
				JP	2016-506377	A	03 March 2016
				JP	6385357	B2	05 September 2018
				KR	10-1522954	B1	27 May 2015
				US	2015-0307628	A1	29 October 2015
				US	2018-0237541	A1	23 August 2018
				US	2022-0162342	A1	26 May 2022
				US	9951145	B2	24 April 2018
				WO	2014-084607	A1	05 June 2014
				KR	10-1247908	B1	26 March 2013
AU	2005-282720	B2	04 August 2011				
BR	PI0515589	A	29 July 2008				
CA	2577405	A1	16 March 2006				
CN	101052653	A	10 October 2007				
EP	1786836	A2	23 May 2007				
IL	181186	A	31 January 2012				
IL	181186	B	31 January 2012				
IL	181186	D0	04 July 2007				
JP	2008-515780	T	15 May 2008				
JP	2011-256213	A	22 December 2011				
JP	2014-058566	A	03 April 2014				
KR	10-2007-0057852	A	07 June 2007				

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/017565

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				NO	20071717	A	31 May 2007
				NO	20071717	L	31 May 2007
				NZ	553118	A	24 December 2009
				RU	2007111941	A	10 October 2008
				RU	2404991	C2	27 November 2010
				US	2006-0073142	A1	06 April 2006
				US	2007-0253948	A1	01 November 2007
				US	2009-0087428	A1	02 April 2009
				WO	2006-028956	A2	16 March 2006
				WO	2006-028956	A3	31 August 2006
				ZA	200701783	A	28 October 2009
				ZA	200701783	B	28 October 2009
KR	10-2021-0064199	A	02 June 2021	AU	2019-320803	A1	11 March 2021
				AU	2019-320803	A1	20 February 2020
				BR	112021002730	A2	10 August 2021
				CA	3109763	A1	20 February 2020
				CN	112839955	A	25 May 2021
				EA	202190542	A1	07 September 2021
				EP	3850007	A2	21 July 2021
				IL	280882	A	29 April 2021
				IL	280882	D0	29 April 2021
				JP	2021-533779	A	09 December 2021
				MA	53616	A	04 May 2022
				SG	11202101273	A	30 March 2021
				US	2022-017634	A1	20 January 2022
				WO	2020-037150	A2	20 February 2020
				WO	2020-037150	A3	15 October 2020
KR	10-2018-0026279	A	12 March 2018	CN	110088124	A	02 August 2019
				EP	3508495	A1	10 July 2019
				EP	3508495	B1	24 November 2021
				JP	2019-530657	A	24 October 2019
				JP	6911105	B2	28 July 2021
				KR	10-1928981	B1	13 December 2018
				US	10800825	B2	13 October 2020
				US	11459367	B2	04 October 2022
				US	2019-0218267	A1	18 July 2019
				US	2020-0399336	A1	24 December 2020
				WO	2018-044105	A1	08 March 2018

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 16/00(2006.01)j		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 16/00(2006.01); A61K 38/20(2006.01); A61K 39/00(2006.01); A61K 39/395(2006.01); C07K 14/54(2006.01); C07K 16/18(2006.01); C07K 16/28(2006.01); C07K 16/46(2006.01); C12N 15/62(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 단편 결정화 영역(fragment crystallizable region, Fc), 이종이합체(heterodimer), CH3 도메인(CH3 domain), 변이(mutation), 아미노산 치환(amino acid substitution), T366, K360, Q347		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2018-0362668 A1 (JIANGSU ALPHAMAB BIOPHARMACEUTICALS CO., LTD. 등) 2018.12.20 청구항 1; 및 단락 [0004]-[0045], [0069]-[0119]	1-20
A	KR 10-2014-0067944 A (아주대학교산학협력단) 2014.06.05 청구항 1, 2; 및 단락 [0014], [0058], [0100]-[0179]	1-20
A	KR 10-1247908 B1 (제넨테크, 인크.) 2013.03.26 단락 [0363]	1-20
A	KR 10-2021-0064199 A (테날리 테라퓨틱스 인크.) 2021.06.02 단락 [0037], [0403]	1-20
A	KR 10-2018-0026279 A (고려대학교 산학협력단 등) 2018.03.12 청구항 1; 및 단락 [0048], [0050]	1-20
☐ 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. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년02월13일(13.02.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년02월14일(14.02.2023)
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:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2018-0362668 A1	2018/12/20	CA 3007427 A1	2017/06/22
		CN 106883297 A	2017/06/23
		CN 106883297 B	2019/12/13
		CN 108473592 A	2018/08/31
		CN 108473592 B	2022/05/03
		EP 3392276 A1	2018/10/24
		HK 1253248 A1	2019/06/14
		JP 2019-502701 A	2019/01/31
		JP 2022-130568 A	2022/09/06
		JP 7103603 B2	2022/07/20
		US 11168149 B2	2021/11/09
		US 2022-0017643 A1	2022/01/20
		WO 2017-101828 A1	2017/06/22
KR 10-2014-0067944 A	2014/06/05	AU 2013-352812 A1	2014/06/05
		BR 112015012310 A2	2018/02/06
		CA 2892623 A1	2014/06/05
		CA 2892623 C	2020/08/11
		CN 104955953 A	2015/09/30
		CN 104955953 B	2019/04/26
		DK 2927321 T3	2021/03/15
		EA 032681 B1	2019/07/31
		EA 201591038 A1	2015/11/30
		EP 2927321 A1	2015/10/07
		EP 2927321 B1	2021/02/17
		EP 3878964 A1	2021/09/15
		ES 2861446 T3	2021/10/06
		IL 239041 A	2019/06/30
		IL 239041 B	2019/06/30
		IL 239041 D0	2015/07/30
		JP 2016-506377 A	2016/03/03
		JP 6385357 B2	2018/09/05
		KR 10-1522954 B1	2015/05/27
		US 2015-0307628 A1	2015/10/29
		US 2018-0237541 A1	2018/08/23
		US 2022-0162342 A1	2022/05/26
		US 9951145 B2	2018/04/24
		WO 2014-084607 A1	2014/06/05
KR 10-1247908 B1	2013/03/26	AU 2005-282720 A1	2006/03/16
		AU 2005-282720 B2	2011/08/04
		BR PI0515589 A	2008/07/29
		CA 2577405 A1	2006/03/16
		CN 101052653 A	2007/10/10
		EP 1786836 A2	2007/05/23
		IL 181186 A	2012/01/31
		IL 181186 B	2012/01/31
		IL 181186 D0	2007/07/04
		JP 2008-515780 T	2008/05/15
		JP 2011-256213 A	2011/12/22
		JP 2014-058566 A	2014/04/03
		KR 10-2007-0057852 A	2007/06/07

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		NO 20071717 A	2007/05/31
		NO 20071717 L	2007/05/31
		NZ 553118 A	2009/12/24
		RU 2007111941 A	2008/10/10
		RU 2404991 C2	2010/11/27
		US 2006-0073142 A1	2006/04/06
		US 2007-0253948 A1	2007/11/01
		US 2009-0087428 A1	2009/04/02
		WO 2006-028956 A2	2006/03/16
		WO 2006-028956 A3	2006/08/31
		ZA 200701783 A	2009/10/28
		ZA 200701783 B	2009/10/28
KR 10-2021-0064199 A	2021/06/02	AU 2019-320803 A1	2021/03/11
		AU 2019-320803 A1	2020/02/20
		BR 112021002730 A2	2021/08/10
		CA 3109763 A1	2020/02/20
		CN 112839955 A	2021/05/25
		EA 202190542 A1	2021/09/07
		EP 3850007 A2	2021/07/21
		IL 280882 A	2021/04/29
		IL 280882 D0	2021/04/29
		JP 2021-533779 A	2021/12/09
		MA 53616 A	2022/05/04
		SG 11202101273 A	2021/03/30
		US 2022-017634 A1	2022/01/20
		WO 2020-037150 A2	2020/02/20
		WO 2020-037150 A3	2020/10/15
KR 10-2018-0026279 A	2018/03/12	CN 110088124 A	2019/08/02
		EP 3508495 A1	2019/07/10
		EP 3508495 B1	2021/11/24
		JP 2019-530657 A	2019/10/24
		JP 6911105 B2	2021/07/28
		KR 10-1928981 B1	2018/12/13
		US 10800825 B2	2020/10/13
		US 11459367 B2	2022/10/04
		US 2019-0218267 A1	2019/07/18
		US 2020-0399336 A1	2020/12/24
		WO 2018-044105 A1	2018/03/08