

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구

국제사무국

(43) 국제공개일

2023년 3월 23일 (23.03.2023)



(10) 국제공개번호

WO 2023/043123 A1

(51) 국제특허분류:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2022/013476

(22) 국제출원일:

2022년 9월 7일 (07.09.2022)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2021-0124554 2021년 9월 17일 (17.09.2021) 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). 조미경 (JO, Migyeong); 02717 서울특별시 성북구 보국문로 32-3, 401호, Seoul (KR). 김수연 (KIM, Suyeon); 03428 서울특별시 은평구 갈현로11길 46, 109동 401호, Seoul (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, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

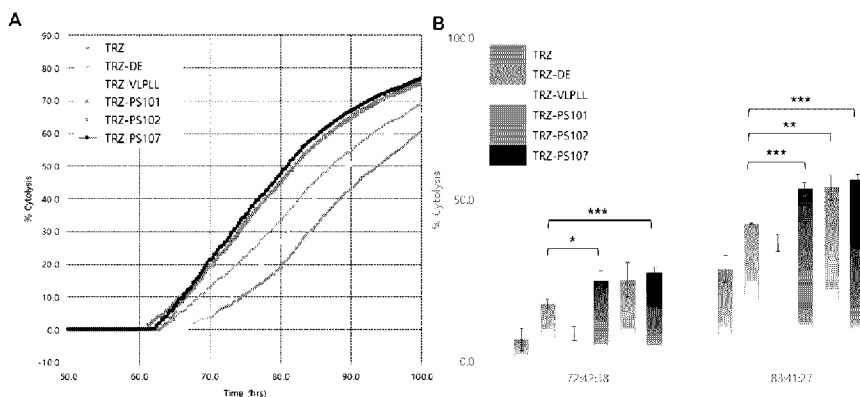
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: GLYCOSYLATED FC VARIANTS WITH IMPROVED SELECTIVE BINDING AFFINITY TO FCγRIIIA

(54) 발명의 명칭: FCγRIIIA 선택적 결합력 향상 당화 FC 변이체들



(57) Abstract: The present invention relates to a glycosylated Fc variant with improved selective binding affinity to FcγRIIIa. Novel human antibody Fc domain variants of the present invention have reduced binding affinity to FcγRIIIb, which is an immuno-inhibitory receptor, compared to antibodies approved as conventional antibody therapeutic agents, and have improved binding affinity to FcγRIIIa (an increase in the A/I ratio), which is an immuno-activating receptor, thus having a significantly 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 as antibody drugs.

(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.



WO 2023/043123 A1

명세서

발명의 명칭: FC γ RIIIa 선택적 결합력 향상 당화 Fc 변이체들 기술분야

- [1] 본 발명은 Fc γ RIIIa에 대한 선택적 결합력이 향상된 당화 Fc 변이체에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 전 세계적으로 유전자 재조합, 세포 배양 등 생명공학기술의 발달에 따라 단백질의 구조와 기능에 대한 연구가 활발히 진행되어왔으며, 이는 생명현상에 대한 이해를 높일 뿐만 아니라, 각종 질병들의 발병 기작을 규명하는데 결정적 역할을 함으로써 효과적인 질병 진단과 치료의 길을 마련해 삶의 질 향상에 크게 기여 하고 있다. 특히, 1975년에 B 세포(B Cell)와 골수암 세포(Myeloma cell)를 융합하여 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 기술(Hybridoma technology)이 개발(Kohler and Milstein, Nature , 256:495-497, 1975)되면서 암, 자가면역질환, 염증, 심혈관 질환, 감염 등의 임상 분야에서 치료용 항체를 이용한 면역 치료(Immunotherapy)에 대한 연구 개발이 활발히 이루어지고 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 결합한다. 항체 Fc 영역 상의 Fc 수용체 결합 부위가 세포 상의 Fc 수용체 (FcR)에 결합함으로써 Fc 영역을 통해 세포에 결합하며, 항체가 세포 표면 상의 Fc 수용체에 결합하면 항체-코팅 입자의 포식 및 파괴, 면역 복합체의 제거, 살세포에 의한 항체-코팅 표적 세포의 용해 (항체-의존적 세포-매개 세포독성, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity 또는 ADCC), 염증 매개체의 방출, 태반 이동 및 면역글로불린 생성의 제어를 포함하여 중요하고도 다양한 여러 생물학적 반응을 촉발한다 (Deo, Y.M. et al., Immunol. Today 18(3):127-135 (1997)). 이와 같이, Fc 도메인은 면역세포의 모집과 ADCC 및 ADCP(antibody dependent cellular 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. 따라서, 특정한 세포를 모집할 수 있도록 항체를 변형하는 시도는 치료 분야에 있어서 매우 중요하다고 할 수 있다.
- [4] 치료용 항체는 기존의 저분자 약물에 비해 타겟에 매우 높은 특이성을 보이며, 생체 독성이 낮고 부작용이 적을 뿐만 아니라, 약 3주의 우수한 혈중 반감기를 가지기 때문에 가장 효과적인 암 치료방법 중의 하나로 여겨지고 있다. 실제로 전 세계의 거대 제약회사들과 연구소들에서 암 발병 원인인자를 비롯한 암세포에

특이적으로 결합하여 효과적으로 제거하는 치료용 항체의 연구 개발에 박차를 가하고 있다. 치료용 항체 의약품 개발 기업으로는 로슈, 암젠, 존슨앤존슨, 애보트, 비엠에스 등의 제약 기업이 주를 이루고 있으며, 특히 로슈는 항암 치료 목적의 허셉틴(Herceptin), 아바스틴(Avastin), 리투산(Rituxan) 등이 대표적 상품으로 이 세 가지 치료용 항체로 2012년 세계시장에서 약 195억 달러의 매출을 달성하는 등 큰 이윤을 창출하고 있을 뿐 아니라, 세계의 항체 의약품 시장을 이끌고 있다. 레미케이드(Remicade)를 개발한 존슨앤존슨 역시 매출의 증가로 세계 항체 시장에서 빠르게 성장해나가고 있으며, 애보트와 비엠에스 등의 제약 기업 역시 개발 막바지 단계의 치료용 항체를 다수 보유하고 있는 것으로 알려져 있다. 이에 따른 결과로 저분자 의약품이 주도권을 가지고 있던 세계 제약 시장에서 질병 타겟에 특이적이고 부작용이 낮은 치료용 항체를 포함한 바이오 의약품이 빠르게 그 자리를 대체해 나가고 있다.

- [5] 현재 의약품으로서 항체의 작용은 항원과 결합하여 항원의 작용을 저해하는 직접적인 방식과, 항원과 결합한 항체의 Fc 감마 부위와 Fc 감마 수용체(Fc gamma receptor, FCGR)를 가지는 효과세포(자연살해세포, 대식세포 등)에 의한 간접적인 항원제거 방식이 있다. 최근 개발 중인 항체 치료제의 경우, 항원과의 결합으로 인한 항원의 작용을 막음과 동시에 항체의 Fc 감마 부위를 효과세포가 인식하여 공격 및 제거하는 ADCC 기전으로 약제의 효과를 높이고 있다. 최근 ADCC와 관련된 연구로, Fc 감마 부위 수용체의 유전자형에 따라 Fc 감마와 Fc 감마 수용체의 결합력에 영향을 주는 것으로 밝혀졌으며, 항체 기반 치료제의 효율이 환자의 Fc 감마 수용체인 FCGR2A 단백질(FcγRIIIa)의 131번째 아미노산과 FCGR3A 단백질의 158번째 아미노산의 아미노산 서열의 다양성에 따라 달라진다는 다수의 연구가 발표되었다. 일 예로 유방암 치료제인 허셉틴(trastuzumab)의 경우 전 임상 연구에서 FCGR2A 131 H/H 혹은 FCGR3A 158 V/V 유전자형에서 항체 의존성 세포독성이 유의적인 차이를 보이며 증가하였다는 연구가 2008년에 Musolino 등에 의하여 보고되었다. 그러나, 포유동물의 항체의 Fc 부위 변형에 의해 특정 Fc 수용체에 대한 결합력이 증가되지만, 다른 Fc 수용체에 대한 결합력도 유지하기 때문에 바람직하지 않은 면역반응을 여전히 유지하는 문제가 있다. 인간의 5 종류의 주요 FcγR 중 4가지는 면역 활성화 또는 염증 반응을 유도하고, FcγRIIb는 면역 저해 또는 항염증 반응을 유도하는데, 대부분의 자연적으로 생산된 항체 또는 재조합된 당화 항체는 활성화 및 저해 Fc 수용체에 모두 결합을 한다. ADCC를 통해 치료용 IgG 항체의 암세포 사멸 효능을 가장 강력하게 유도하는 면역세포는 자연살해세포(NK 세포)로 NK 세포는 다른 면역세포들(예를 들어, monocytes, macrophages, dendritic cells 등)과는 달리 표면에 FcγRIIIa를 발현하고, FcγRI과 FcγRIIa, FcγRIIb 및 FcγRIIIb는 발현하지 않기 때문에 암세포 사멸 작용기작을 극대화하기 위해서는 IgG 항체의 Fc 부위의 최적화를 통해 NK 세포 표면에 발현되는 FcγRIIIa와의 친화도를 향상시키는 것이 필수적이다. 또한, NK 세포 뿐만 아니라 혈액에 존재하는 다양한 면역 세포들의 복합적인 면역 반응을 고

려하면 항체의 Fc 도메인이 활성화 FcγR에 결합하는 능력 (A)과 저해 FcγRIIb에 결합하는 능력 (I)의 비율(A/I ratio)이 높을수록 우수한 ADCC 유도능을 보이기 때문에 저해 수용체인 FcγRIIb 결합력 대비 활성화 수용체 결합력을 선택적으로 높이는 것이 매우 절실한 실정이다 (Boruchov et al, J Clin Invest, 115(10):2914-23, 2005). 하지만, FcγRIIb는 활성화 FcγR와 96%의 상동성을 갖는 문제로 인하여, 당화항체에 유전적 돌연변이를 도입하여 A/I ratio를 증가시키기 위한 노력은 큰 결실을 거두지 못하고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 목적은 신규한 인간 항체 Fc 도메인 변이체들을 제공하는 것이다.
- [7] 또한, 본 발명의 목적은 특정 Fc 감마 수용체에 특이적인 당화 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 제공하는 것이다.
- [8] 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.
- [9] 또한, 본 발명의 목적은 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [10] 또한, 본 발명의 목적은 인간 항체 Fc 도메인 변이체의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [11] 또한, 본 발명의 목적은 FcγRIIIa에 대한 선택적 결합력이 향상된 당화 항체의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [12] 또한, 본 발명의 목적은 항체 치료제의 제조에 사용하기 위한 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 용도를 제공하는 것이다.
- [13] 또한, 본 발명의 목적은 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 암의 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.
- [14] 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

- [15] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 특정 Fc 감마 수용체와의 선택적 결합력이 증대된 신규한 인간 항체 Fc 도메인 변이체들을 제공
- [16] 또한, 본 발명은 상기 신규한 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 포함하는 당화 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 제공
- [17] 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.

- [18] 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.
- [19] 또한, 본 발명은 인간 항체 Fc 도메인 변이체의 제조방법을 제공한다.
- [20] 또한, 본 발명은 FcγRIIIa에 대한 선택적 결합력이 향상된 당화 항체의 제조방법을 제공한다.
- [21] 또한, 본 발명은 항체 치료제의 제조에 사용하기 위한 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 용도를 제공한다.
- [22] 또한, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 암의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [23] 아울러, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 약학적으로 유효한 양으로 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [24] 본 발명의 신규한 인간 항체 Fc 도메인 변이체들은 종래의 항체 치료제로서 승인받은 항체들보다 면역 저해 수용체인 FcγRIIb와의 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.

도면의 간단한 설명

- [25] 도 1은 공지된 돌연변이들의 단순조합으로 구성된 4종의 트라스트주맵 Fc 변이체들 (XMa, XMt, MM 및 XMM) (A) 및 FcγRIIb-GST 단백질 (B)을 고순도 정제한 후 SDS-PAGE 젤로 확인한 도이다.
- [26] 도 2는 정제된 트라스트주맵 Fc 변이체들 (트라스트주맵-XMa, XMt, MM 및 XMM)의 FcγRIIb 결합력을 분석한 ELISA 결과를 나타낸 도이다.
- [27] 도 3은 당화 Fc의 포유류 세포 디스플레이 기술에 대한 개략도를 나타낸 도이다.
- [28] 도 4는 고순도로 정제된 사합체 FcγRIIIa-158V-스트렙타비딘, 사합체 FcγRIIIa-158F-스트렙타비딘, 사합체 FcγRIIb-스트렙타비딘, FcγRIIIa-158V-GST 및 FcγRIIIa-158F-GST을 SDS-PAGE 젤로 확인한 도이다.
- [29] 도 5는 형광 표지된 사합체 FcγRIIIa-Alexa488, 사합체 FcγRIIIa-Alexa647 및 Protein A-FITC와 CHO 세포 발현 야생형 Fc 또는 Fc-T299L의 결합 활성을 분석한 도이다.
- [30] 도 6은 당화 Fc 엔지니어링을 위한 셔플(shuffle) 라이브러리의 개략도를 나타낸 도이다.

- [31] 도 7은 CHO 세포 디스플레이를 이용한 당화 Fc 엔지니어링 모식도 및 스크리닝 결과 확보한 당화 Fc 변이체의 돌연변이들의 유전자 로고(gene logo)를 나타낸 도이다.
- [32] 도 8은 모델 항체인 트라스트주맙 중쇄 유전자에 당화 Fc 변이체들을 클로닝하여 발현 벡터를 트랜스펙션하여 배양한 Expi293F 세포 배양액을 이용하여 FcγRIIIa 결합력을 분석한 ELISA 결과 및 발굴한 Fc 변이체들의 돌연변이 서열을 나타낸 도이다.
- [33] 도 9는 높은 FcγRIIIa 결합력을 보이는 당화 Fc 변이체가 포함된 트라스트주맙 Fc 변이체들 (PS101, PS102, PS105, PS106, PS107, PS205, PS207, PS301, PS303 및 PS305)을 정제한 후 SDS-PAGE 젤로 확인한 도이다.
- [34] 도 10 및 11은 선별한 당화 트라스트주맙 Fc 변이체들 (PS101, PS102, PS105, PS106, PS107, PS205, PS207, PS301, PS303 및 PS305)의 FcγRIIIa-158V, FcγRIIIa-158F 및 FcγRIIb와의 결합력을 ELISA로 분석한 도이다.
- [35] 도 12는 본 발명의 트라스트주맙 Fc 변이체들 (PS101, PS102, PS105, PS106, PS107, PS205, PS207, PS301, PS303 및 PS305), 및 기존에 B-세포 림프종 및 유방암 치료제로 US FDA 승인을 받은 당화 항체인 tafasitamab 및 margetuximab의 Fc가 각각 도입된 트라스트주맙 Fc 변이체 DE 및 VLPLL의 FcγRIIIa-158V, FcγRIIb, FcγRIIIa-158F 또는 FcγRIIb에 대한 결합 경향성을 비교 분석한 도이다.
- [36] 도 13은 야생형 트라스트주맙(TRZ), 양성 대조군 트라스트주맙 Fc 변이체들 (TRZ-DE 및 TRZ-VLPLL) 및 트라스트주맙 Fc 변이체들 (TRZ-PS101, TRZ-PS102 및 TRZ-PS107)의 HER2 결합을 분석한 결과를 나타낸 도이다:
- [37] TRZ: trastuzumab.
- [38] 도 14는 야생형 트라스트주맙(TRZ), 양성 대조군 트라스트주맙 Fc 변이체들 (TRZ-DE 및 TRZ-VLPLL) 및 트라스트주맙 Fc 변이체들 (TRZ-PS101, TRZ-PS102 및 TRZ-PS107)의 CHO 세포 표면에 발현되어 있는(membrane anchored) FcγRIIIa (CHO-FcγRIIIa-158V 및 CHO-FcγRIIIa-158F)에 대한 결합력을 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [39] 도 15는 E:T(Effector cell:target cell)의 비율이 2:1일 때, 야생형 트라스트주맙 (TRZ), 양성 대조군 트라스트주맙 Fc 변이체들 (TRZ-DE 및 TRZ-VLPLL) 및 트라스트주맙 Fc 변이체들 (TRZ-PS101, TRZ-PS102 및 TRZ-PS107)의 ADCC 분석 결과를 나타낸 도이다:
- [40] A: 실시간 % of cytotoxicity 분석 그래프; 및
- [41] B: 실시간 분석 그래프 바탕의 endpoint % of cytotoxicity 분석 그래프.
- [42] 도 16은 E:T의 비율이 5:1일 때, 야생형 트라스트주맙(TRZ), 양성 대조군 트라스트주맙 Fc 변이체들 (TRZ-DE 및 TRZ-VLPLL) 및 트라스트주맙 Fc 변이체들 (TRZ-PS101, TRZ-PS102 및 TRZ-PS107)의 ADCC 분석 결과를 나타낸 도이다:
- [43] A: 실시간 % of cytotoxicity 분석 그래프; 및
- [44] B: 실시간 분석 그래프 바탕의 endpoint % of cytotoxicity 분석 그래프.

- [45] 도 17은 야생형 Fc와 본 발명의 Fc 변이체들(PS101, PS102 및 PS107)의 IEDB 기반 *in silico* 면역원성 분석 결과를 히트맵으로 나타낸 도이다.
- [46] 도 18은 마우스 Fc γ RIV-GST 및 사이노몰거스 원숭이 Fc γ RIII-GST를 제작한 후 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [47] 도 19는 야생형 트라스트주맵(TRZ), 양성 대조군 트라스트주맵 Fc 변이체들 (TRZ-DE 및 TRZ-VLPLL) 및 트라스트주맵 Fc 변이체들 (TRZ-PS101, TRZ-PS102 및 TRZ-PS107)의 마우스 Fc γ RIV 및 사이노몰거스 원숭이 Fc γ RIII에 대한 결합력을 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [48] 도 20은 야생형 세톡시맵(CTX-WT), 양성 대조군 세톡시맵 Fc 변이체들 (CTX-DE 및 CTX-VLPLL) 및 세톡시맵 Fc 변이체들 (CTX-PS101, CTX-PS102 및 CTX-PS107); 및 야생형 리톡시맵(RTX-WT), 양성 대조군 리톡시맵 Fc 변이체들 (RTX-DE 및 RTX-VLPLL) 및 리톡시맵 Fc 변이체들 (RTX-PS101, RTX-PS102 및 RTX-PS107)을 발현 및 정제한 후 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [49] 도 21은 야생형 세톡시맵(CTX), 양성 대조군 세톡시맵 Fc 변이체들 (CTX-DE 및 CTX-VLPLL) 및 세톡시맵 Fc 변이체들 (CTX-PS101, CTX-PS102 및 CTX-PS107)의 인간 Fc γ RIIIa-158V, 인간 Fc γ RIIIa-158F 및 인간 Fc γ RIIb에 대한 결합력을 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [50] 도 22는 야생형 세톡시맵(CTX), 양성 대조군 세톡시맵 Fc 변이체들 (CTX-DE 및 CTX-VLPLL) 및 세톡시맵 Fc 변이체들 (CTX-PS101, CTX-PS102 및 CTX-PS107)의 마우스 Fc γ RIV 및 사이노몰거스 원숭이 Fc γ RIII에 대한 결합력을 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [51] 도 23은 야생형 리톡시맵(RTX), 양성 대조군 리톡시맵 Fc 변이체들 (RTX-DE 및 RTX-VLPLL) 및 리톡시맵 Fc 변이체들 (RTX-PS101, RTX-PS102 및 RTX-PS107)의 인간 Fc γ RIIIa-158V, 인간 Fc γ RIIIa-158F 및 인간 Fc γ RIIb에 대한 결합력을 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [52] 도 24는 야생형 리톡시맵(RTX), 양성 대조군 리톡시맵 Fc 변이체들 (RTX-DE 및 RTX-VLPLL) 및 리톡시맵 Fc 변이체들 (RTX-PS101, RTX-PS102 및 RTX-PS107)의 마우스 Fc γ RIV 및 사이노몰거스 원숭이 Fc γ RIII에 대한 결합력을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

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

- [54] 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.
- [55] 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.
- [56] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1 문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib(α -아미노이소부티르산), Sar(N-methylglycine) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 발명에서 약어로 언급된 아미노산은 하기와 같이 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다:
- [57] 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.
- [58] 일 측면에서, 본 발명은 야생형(Wild type) 인간 항체 Fc 도메인에서, 카밧 넘버링 시스템(Kabat numbering system)에 따라 넘버링된 222, 224, 239, 243, 247, 252, 292, 300, 303, 305, 330, 332, 339, 356, 361, 387, 396, 405 및 415 위치의 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 위치의 아미노산이 야생형의 아미노산과 다른 서열로 치환된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체에 관한 것이다.
- [59] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 224, 243, 247, 292, 300, 303, 305, 330, 332, 339, 356 및 387 위치의 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 위치의 아미노산이 야생형의 아미노산과 다른 서열로 치환될 수 있다.
- [60] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 K222N, H224R, S239D, F243L, P247I, M252V, R292P, Y300L, V303I, V305I, A330L, I332E, A339Q, D356G, N361D, P387Q, P396L, F405L 및 S415G로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [61] 일 구현예에서, 상기 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 H224R, F243L, P247I, R292P, Y300L, V303I, V305I, A330L, I332E, A339Q, D356G 및 P387Q로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

- [62] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체는 서열번호 22 내지 35의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [63] 일 구현예에서, 상기 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 F243L, P247I, R292P, Y300L, V305I, A330L, I332E, A339Q 및 P387Q의 아미노산 치환을 포함하는 PS101일 수 있다.
- [64] 일 구현예에서, 상기 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 H224R, F243L, P247I, R292P, Y300L, V303I, V305I, A330L, I332E, A339Q 및 P387Q의 아미노산 치환을 포함하는 PS102일 수 있다.
- [65] 일 구현예에서, 상기 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 F243L, P247I, R292P, Y300L, V305I, A330L, I332E, A339Q, D356G 및 P387Q의 아미노산 치환을 포함하는 PS107일 수 있다.
- [66] 일 구현예에서, 상기 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 F243L, P247I, M252V, R292P, Y300L, V305I, A330L, I332E, A339Q, D356G 및 P387Q의 아미노산 치환을 포함하는 PS106일 수 있다.
- [67] 일 구현예에서, 상기 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 F243L, P247I, R292P, Y300L, A330L, I332E 및 P396L의 아미노산 치환을 포함하는 PS205일 수 있다.
- [68] 일 구현예에서, 상기 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 K222N, F243L, P247I, R292P, Y300L, V305I, A330L 및 I332E의 아미노산 치환을 포함하는 PS301일 수 있다.
- [69] 일 구현예에서, 상기 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 S239D, P247I, Y300L, V305I, A330L, I332E, A339Q, N361D 및 P387Q의 아미노산 치환을 포함하는 PS303일 수 있다.
- [70] 일 구현예에서, 상기 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 S239D, R292P, Y300L, A330L, A339Q, P387Q 및 F405L의 아미노산 치환을 포함하는 PS305일 수 있다.
- [71] 일 구현예에서, 상기 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 R292P, Y300L, V305I, A330L, I332E, A339Q 및 P387Q의 아미노산 치환을 포함하는 PS105일 수 있다.
- [72] 일 구현예에서, 상기 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 F243L, P247I, R292P, A330L, I332E, A339Q, P396L, S415G의 아미노산 치환을 포함하는 PS207일 수 있다.
- [73] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체는 야생형 Fc 도메인과 비교하여 FcγRIIIa와의 결합력이 향상되고, FcγRIIb와의 결합력이 감소될 수 있다.
- [74] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체는 인간 Fcγ 수용체, 마우스 Fcγ 수용체 또는 원숭이 Fcγ 수용체에 특이적으로 결합할 수 있으며, 인간 Fcγ 수용체는 FcγRIIIa-158V 또는 FcγRIIIa-158F일 수 있고, 마우스 Fcγ 수용체는 FcγIV일 수 있으며, 원숭이 Fcγ 수용체는 사이노몰거스 원숭이 FcγRIII일 수 있다.
- [75] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체는 향상된 ADCC(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) 유도능을 가질 수 있다.

- [76] 일 구현예에서, 인간 항체 (면역글로불린)가 IgA, IgM, IgE, IgD 또는 IgG, 또는 이들의 변형일 수 있으며, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4일 수 있고, 항-HER2(human epidermal growth factor receptor 2) 항체, 항-EGFR(epidermal growth factor receptor) 항체 또는 항-CD20 항체인 것이 바람직하고, 트라스트주맙, 세툽시맙 또는 리툽시맙인 것이 더욱 바람직하다. 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).
- [77] 일 구현예에서, 트라스트주맙은 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄, 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함할 수 있으며, 본 발명의 Fc 변이체를 포함하는 트라스트주맙 TRZ-PS101, TRZ-PS102 또는 TRZ-PS107은 서열번호 53, 54 또는 55의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함할 수 있다.
- [78] 일 구현예에서, 세툽시맙은 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄, 서열번호 57의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함할 수 있으며, 본 발명의 Fc 변이체를 포함하는 세툽시맙 CTX-PS101, CTX-PS102 또는 CTX-PS107은 서열번호 58, 59 또는 60의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함할 수 있다.
- [79] 일 구현예에서, 리툽시맙은 서열번호 61의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄, 서열번호 62의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함할 수 있으며, 본 발명의 Fc 변이체를 포함하는 리툽시맙 RTX-PS101, RTX-PS102 또는 RTX-PS107은 서열번호 63, 64 또는 65의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함할 수 있다.
- [80] 일 구현예에서, 야생형 인간 항체 Fc 도메인은 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 서열번호 36의 핵산분자로 코딩될 수 있다.
- [81] 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).
- [82] 본 발명에서 사용된, 용어 "Fc 도메인 변이체"는 "Fc 변이체"와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [83] 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.

- [84] 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.
- [85] 본 명세서에 사용된 용어 "Fc 변이체"는 야생형 항체 Fc 도메인과 비교하여 하나 이상의 아미노산 잔기의 변형을 포함하는 것을 의미한다.
- [86] 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.
- [87] 본 발명의 Fc 변이체는 당해 기술분야에 공지된 임의의 방법으로 제조될 수 있다. 일 실시예에서, 본 발명에 따른 인간 항체의 Fc 변이체는 특정 아미노산 변형을 포함하는 폴리펩타이드 서열을 코딩한 후, 원하는 경우, 숙주세포 내로 클로닝되고, 발현 및 검정되는 핵산 형성에 이용된다. 이를 위한 다양한 방법이 문헌 (Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 3rd Ed., Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001; Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons)에 기재되어 있다.
- [88] 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.
- [89] 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.

- [90] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편에 관한 것이다.
- [91] 일 구현예에서, 상기 항체는 당화 항체일 수 있다.
- [92] 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 서열번호 1 내지 13의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 2(C_H2) 및 서열번호 14 내지 20의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 3(C_H3)를 포함할 수 있으며, 서열번호 6 또는 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 2(C_H2) 및 서열번호 18 또는 19의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 3(C_H3)를 포함하는 것이 더욱 바람직하다.
- [93] 일 구현예에서, 면역학적 활성을 가진 단편은 Fab, Fd, Fab', dAb, F(ab'), F(ab')₂, scFv(single chain fragment variable), Fv, 단일쇄 항체, Fv 이량체, 상보성 결정 영역 단편, 인간화 항체, 키메라 항체 및 디아바디(diabody)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [94] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 효과가 작용을 증가시킬 수 있으며, 야생형 Fc 도메인과 비교하여 FcγRIIIa와의 결합력이 향상되고 FcγRIIb와의 결합력이 감소됨으로써 높은 FcγRIIIa 결합 선택성을 가져 A/I 비율이 높은 특성을 가지므로, 항체-매개성 세포독성작용(antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC)이 증가될 수 있다.
- [95] 본 발명에서, A/I 비율은 항체의 Fc 도메인이 활성화 FcγR에 결합하는 능력(A)과 저해 FcγRIIb에 결합하는 능력(I)의 비율(A/I ratio)로서, A/I 비율이 높을수록 우수한 ADCC 유도능을 보이기 때문에 저해 수용체인 FcγRIIb 결합력 대비 활성화 수용체 결합력을 선택적으로 높이는 것이 중요하다.
- [96] 일반적으로, 포유동물이 발현하여 당화(glycosylated)되어 있는 당화 항체는 Fc 부위에 수식된 당 사슬에 의해 단백질의 구조가 안정화되어 항체가 Fc 수용체에 결합할 수 있지만, 모든 FcγR에 대한 결합력을 가지기 때문에 면역 반응 활성화와 동시에 저해가 나타나는 문제가 있어왔으며, 이와 반대로, 박테리아에서 생산되는 무당화(aglycosylated) 항체는 Fc 부위에 결합된 탄화수소 사슬이 없기 때문에 Fc 수용체에 결합을 하지 못하여 ADCC 기능을 나타낼 수 없는 문제가 있으나, 본 발명의 항체는 '무당화' 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편이기 때문에 선택적으로 FcγR에 대한 결합력을 향상시켜 면역 반응을 조절할 수 있는 효과가 있다.
- [97] 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.

- [98] 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 불변 영역(CH1)으로 이루어진 Fab 단편; (ii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iii) 단일 항체의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (iv) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편(Ward ES et al., Nature 341:544-546 (1989)); (v) 분리된 CDR 영역; (vi) 2개의 연결된 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (vii) VH 도메인 및 VL 도메인이 항원 결합 부위를 형성하도록 결합시키는 펩타이드 링커에 의해 결합된 단일쇄 Fv 분자(scFv); (viii) 이특이적인 단일쇄 Fv 이량체(PCT/US92/09965) 및 (ix) 유전자 융합에 의해 제작된 다가 또는 다특이적인 단편인 디아바디(diabody) WO94/13804) 등을 포함한다.
- [99] 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.
- [100] 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.
- [101] 본 발명에서 "항체"라 함은, 면역계 내에서 항원의 자극에 의하여 만들어지는 물질을 의미하는 것으로서, 그 종류는 특별히 제한되지 않으며, 자연적 또는 비자연적(예컨대, 합성적 또는 재조합적)으로 얻어질 수 있다. 항체는 생체 외뿐 아니라 생체 내에서도 매우 안정하고 반감기가 길기 때문에 대량 발현 및 생산에 유리하다. 또한, 항체는 본질적으로 다이머(dimer) 구조를 가지므로 접착능(avidity)이 매우 높다. 완전한 항체는 2개의 전장(full length) 경쇄 및 2개의 전장 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합으로 연결되어 있다. 항체의 불변 영역은 중쇄 불변 영역과 경쇄 불변 영역으로 나뉘어지며, 중쇄 불변 영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고, 서브클래스로 감마1(γ 1), 감마2(γ 2), 감마3(γ 3), 감마4(γ 4), 알파1(α 1) 및 알파2(α 2)를 가진다. 경쇄의 불변 영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.
- [102] 본 발명에서 용어, "중쇄(heavy chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위해 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 V_H 및 3개의 불변 영역 도메인 C_H1, C_H2 및 C_H3과 힌지(hinge)를 포함하는 전장 중쇄 및 이

의 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.

- [103] 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.
- [104] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 도메인 변이체, 또는 이를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산분자에 관한 것이다.
- [105] 일 구현예에서, 본 발명에 따른 Fc 변이체를 코딩하는 핵산분자는 37 내지 50의 염기서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [106] 일 측면에서, 본 발명은 상기 핵산분자를 포함하는 벡터, 상기 벡터를 포함하는 숙주세포에 관한 것이다.
- [107] 본 발명의 핵산분자는 단리된 것이거나 재조합된 것일 수 있으며, 단일쇄 및 이중쇄 형태의 DNA 및 RNA뿐만 아니라 대응하는 상보성 서열이 포함된다. 단리된 핵산은 천연 생성 원천에서 단리된 핵산의 경우, 핵산이 단리된 개체의 게놈에 존재하는 주변 유전 서열로부터 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 구축물의 성분으로서의 핵산 분자를 나타낸다. 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 작동가능하게 연결된다. 예를 들면, 전서열 또는 분비 리더(leader)의 DNA는 폴리펩타이드가 분비되기 전의 형태인 전단백질(preprotein)로서 발현되는 경우 폴리펩타이드의 DNA에 작동가능하게 연결되고, 프로모터 또는 인핸서는 폴리펩타이드 서열의 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.
- [108] 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.

[109] 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.

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

- [111] 본 발명에서 용어, "벡터"는 핵산 서열을 복제할 수 있는 세포로의 도입을 위해 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).
- [112] 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.
- [113] 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.
- [114] 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.
- [115] 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.
- [116] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 치료제에 관한 것이다.
- [117] 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.
- [118] 일 구현예에서, 본 발명에 따른 Fc 도메인 변이체 또는 이를 포함하는 단백질 결합체에 항체 약물이 결합될 수 있으며, 암 치료용 항체 약물은 트라스투주맙(Trastuzumab), 세톡시맙(cetuximab), 베바시주맙(bevacizumab), 리툭시맙(rituximab), 바실릭시맙(basiliximab), 인플릭시맙(infliximab), 이필리무맙

(Ipilimumab), 펌브롤리주맵(Pembrolizumab), 니볼루맵(Nivolumab), 아테졸리주맵(Atezolizumab) 또는 아벨루맵(Avelumab)일 수 있다.

- [119] 항체 치료제에서 타겟 항원으로 면역세포들을 모집하여 전달하는 기작은 가장 중요한 기작 중 하나이며, 항체의 Fc 도메인이 면역세포의 모집과 ADCC(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)에 결정적인 역할을 하므로, 본 발명의 Fc 감마 수용체에 선택적 결합력이 증가된 Fc 변이체는 치료용 항체로 이용되기에 유리하다. 특히, 항체의 ADCC 기능은 많은 세포의 표면에 존재하는 Fc감마 수용체(FcγR)와의 상호작용에 의존하며, 사람의 5가지 Fc 수용체 중 항체가 어떠한 Fc 수용체에 결합되는지에 따라 모집되는 면역세포의 종류가 결정되기 때문에 특정한 세포를 모집할 수 있도록 항체를 변형하는 시도는 치료 분야에 있어서 매우 중요하다.
- [120] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 도메인 변이체, 또는 이를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [121] 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.
- [122] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 높은 FcγRIIIa 결합 선택성을 가져 높은 A/I 비율을 가지므로, 자연살해세포(NK 세포)를 통해 효과기 작용을 증가시켜 항체-매개성 세포독성작용(antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC)을 증가시킬 수 있다. 가장 강력한 암세포 사멸 효능을 가지고 있는 자연살해세포(NK 세포)는 다른 면역세포들(예: monocytes, macrophages, dendritic cells)과는 달리 표면에 FcγRIIIa를 발현하고, FcγRI와 FcγRIIa, FcγRIIb 및 FcγRIIIb는 발현하지 않으므로, 본 발명의 FcγRIIIa 결합 선택성을 가지는 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편이 NK 세포를 통해 암세포 사멸 작용 기작을 극대화할 수 있다.
- [123] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 면역원성 세포사멸 유도제를 추가로 포함할 수 있으며, 면역원성 세포사멸 유도제는 안트라사이클린계열 항암제, 타산 계열 항암제, 항-EGFR 항체, BK 채널 작용제, 보르테조밐(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.

- [124] 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.
- [125] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 암의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [126] 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.
- [127] 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.
- [128] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수

해/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.

[129] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정 셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 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.

[130] 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, 덱스트로스 용액, 말토 덱스트린 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.

[131] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 주사 제형으로 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명에 따른 조성물의 일일 투여량은 0.0001 ~ 10 mg/ml이며, 바람직하게는 0.0001 ~ 5 mg/ml이며, 하루 일 회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.

[132] 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 과립

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.

[133] 본 발명은 상기 Fc 도메인 변이체를 비펩타이드성 중합체를 통해 생리활성 폴리펩타이드에 공유결합으로 연결하여 지속성 약물 제제를 제조하는 방법을 포함한다.

[134] 본 발명에 따른 제조방법은 말단에 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체를 통해 생리활성 폴리펩타이드 및 Fc 도메인 변이체를 공유결합으로 연결하는 단계; 및 생리활성 폴리펩타이드, 비펩타이드성 중합체 및 Fc 도메인 변이체가 공유결합으로 연결된 결합체를 분리하는 단계를 포함할 수 있다.

[135] 일 측면에서, 본 발명은 a) 본 발명의 Fc 도메인 변이체를 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및 b) 숙주세포에 의해 발현된 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는, FcγRIIIa에 대한 선택적 결합력이 향상된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체의 제조방법에 관한 것이다.

[136] 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 FcγRIIIa에 대한 선택적 결합력이 향상된 당화 항체의 제조방법에 관한 것이다.

[137] 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.

[138] 일 측면에서, 본 발명은 항체 치료제의 제조에 사용하기 위한 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 용도에 관한 것이다.

[139] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 암의 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다.

[140] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 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

[141] 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.

[142] 실시예 1. Fc 돌연변이들의 단순 조합으로 구성된 트라스트주맙 Fc 변이체들 제작 및 분석

[143] 1-1. 단순 조합 트라스트주맙 Fc 변이체들 제작

- [144] 기존에 공지된 트라스트주맵(trastuzumab) Fc 변이체들의 단순 조합에 의한 효과를 확인하기 위해 DEL 변이체 (S239D/I332E/A330L: 야생형 Fc에 비해 A/I ratio 9배 향상), LPLIL 변이체 (F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L: FcγRIIIa-158V에 대한 결합력 10배 향상) 및 IQ 변이체 (P247I/A339Q: ADCC 유도능 6배 향상)들의 단순 조합으로 구성된 Fc 변이체들을 제작하였다 (XMa: S239D/F243L/R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E/P396L, XMt: S239D/P247I/A330L/I332E/A339Q, MM: F243L/P247I/R292P/Y300L/V305I/A339Q/P396L 및 XMM: S239D/F243L/P247I/R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E/A339Q/P396L) (표 1). 상기 Fc 변이체들을 모델 항체인 트라스트주맵의 중쇄 유전자에 클로닝하고, 경쇄 유전자와 함께 Expi293F 세포에 PEI(polyethylenimine) (Polyscience, 23966)로 co-트랜스펙션(transfection)함으로써 임시 발현을 유도하였다. co-트랜스펙션한 Expi293F 세포를 37°C, 125 rpm 및 8% CO₂ 조건에서 7일간의 배양 후, 배양액을 회수하여 PBS로 평형을 맞춘 다음 Protein A 친화도 크로마토그래피를 통해 트라스트주맵 Fc 변이체들을 정제하였다 (도 1A).
- [145] 1-2. FcγRIIb-GST 생산
- [146] 면역 반응을 하향 조절(down-regulation)하여 ADCC 활성을 약화시키는 역할을 하는 Fc 수용체인 FcγRIIb에 대한 단순 조합 트라스트주맵 Fc 변이체들의 결합력을 확인하기 위해 FcγRIIb-GST를 생산하였다. 구체적으로, GST가 FcγRIIb의 C-말단에 융합된 유전자가 동물세포 발현용 벡터에 클로닝되어 있는 플라스미드를 PEI를 이용해 Expi293F 세포에 트랜스펙션한 뒤 37°C, 125 rpm 및 8% CO₂ 조건에서 7일간 임시발현을 진행하였다. 그런 다음, 세포 배양액을 회수한 뒤, PBS로 평형을 맞추고, anti-GST 친화도 크로마토그래피를 통해 고순도의 FcγRIIb-GST를 확보하였다 (도 1B).
- [147] 1-3. 단순 조합 트라스트주맵 Fc 변이체들의 FcγRIIb 결합력 분석
- [148] 상기 실시예 1-1에서 정제하여 준비한 트라스트주맵 Fc 변이체들 (XMa, XMt, MM 및 XMM)의 FcγRIIb에 대한 결합력을 확인하기 위해 ELISA 분석을 진행하였다. 구체적으로, 0.05 M Na₂CO₃ pH 9.6에 4 μg/ml로 희석한 FcγRIIb-GST를 50 μl씩 flat bottom polystyrene high bind 96웰 마이크로플레이트 (Costar, 3590)에 4°C에서 16시간 동안 고정화한 후 100 μl의 4% 스킴밀크 (GenomicBase, SKI400)로 상온에서 2시간 동안 블로킹(blocking)하였다. 그 후, 0.05% PBST 180 μl로 4회씩 세척하고 1% 스킴밀크로 희석하여 준비한 상기 실시예 1-1의 당화 트라스트주맵 Fc 변이체들을 50 μl씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이를 세척한 후 HRP-Protein L (GenScript, M00098) 50 μl씩 첨가하여 상온에서 1시간 동안 항체 반응을 진행하고 세척하였다. 그 후, 1-Step Ultra TMB-ELISA substrate solution (Thermo Fisher Scientific, 34028)을 50 μl씩 첨가하여 발색한 뒤 2 M H₂SO₄을 50 μl씩 처리하여 반응을 종료시키고 Epoch microplate spectrophotometer (BioTek)을 이용해 흡광도를 분석하였다. 그 결과, 공지된 돌연

변이들의 단순 조합으로 구성된 트라스트주맵 Fc 변이체들이 각각 B-세포 림프종 및 Her2 양성 유방암 치료제로 US FDA 승인을 받은 ADCC 향상 당화 Fc 변이체들(B 세포 림프종 치료제(Monjuvi, Tafasitamab)로 2020년 7월 31일 US FDA 승인받은 DE (S239E/I332E) 및 Her2 양성 유방암 치료제(Margenza, Margetuximab)로 2020년 12월 16일 US FDA 승인받은 VLPLL (L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L))보다 현저히 높은 FcγRIIb 결합력을 가지는 것으로 나타나 (도 2), ADCC 활성 유도에 부정적 영향을 끼칠 수 있음을 확인하였다.

[149] 실시예 2. 당화 Fc 변이체 스크리닝을 위한 포유류 세포 디스플레이 시스템 구축

[150] ADCC 유도능을 극대화할 수 있는 Fc 돌연변이들의 최적의 조합을 찾고 새로운 당화 Fc 변이체를 발굴하기 위해 Fc 라이브러리를 제작하였다. 구체적으로, 당화 Fc를 포유류 세포 표면에 디스플레이하고 안정적으로 스크리닝하기 위해 스테이블 세포주(stable cell line) 제작에 활용되는 FLP-FRT 유전자 재조합(gene recombination) 시스템을 활용하였으며, 세포막에 디스플레이하기 위해 Fc의 C-말단에 PDGFR(Platelet-derived growth factor receptor) 트랜스멤브레인(transmembrane) 도메인을 융합하였다. Fc-PDGFR 유전자는 FRT 사이트(site)가 삽입되어 있는 pcDNA5/FRT 플라스미드(Invitrogen, V601020)에 클로닝하여 준비하였다. 해당 플라스미드를 유전자 재조합을 일으키는 효소인 FLP를 발현하는 pOG44플라스미드(Invitrogen, V600520)와 함께 FRT 사이트가 삽입된 CHO 세포(Invitrogen, R75807)에 co-트랜스펙션하여 유전자 재조합을 유도함으로써 CHO 세포의 염색체 DNA(chromosomal DNA)에 Fc-PDGFR DNA가 통합(Integration)되어 당화 Fc 안정적 발현 CHO 세포주가 제작되었다(도 3). 이 때 트랜스펙션 후 유전자 통합이 일어난 CHO 세포들만 선별하기 위해 하이그로마이신(hygromycin)-B 저항성 유전자를 함께 통합되도록 하였으며, 500 μg/ml의 하이그로마이신-B(Invitrogen, 10687010)를 처리함으로써 당화 Fc 안정적 발현 CHO 세포주를 선별하여 당화 Fc 변이체 스크리닝을 위한 포유류 세포 디스플레이 시스템을 구축하였다.

[151] 실시예 3. 결합력 분석을 위한 FcγRs 제작

[152] 3-1. 발현 및 정제

[153] 확립된 당화 Fc의 CHO 세포 디스플레이 시스템 및 Fc 라이브러리 안정적 발현 세포주를 FACS 스크리닝하고, 발굴할 Fc 변이체들의 FcγRs 결합력을 분석하기 위해 FcγRIIIa 및 FcγRIIb를 제작 및 생산하였다. FcγRs 중 FcγRIIIa 및 FcγRIIb는 Fc와의 결합력이 낮은 저친화성 수용체(low affinity receptor)로 알려져 있기 때문에 각 수용체의 C-말단에 스트렙타비딘(streptavidin)을 융합하여, Fc와의 가시적 결합 친화도를 향상시켜 효율적인 FACS 스크리닝이 가능한 사합체(tetrameric) FcγRIIIa-158V-스트렙타비딘-His, 사합체 FcγRIIIa-158F-스트렙타비딘-His 및 사합체 FcγRIIb-스트렙타비딘-His를 제조하였다. 또한, 발굴할 당화 Fc 변이체들의 FcγRs 결합력을 ELISA로 분석하기 위해, FcγRIIIa-158V-GST 및

FcγRIIIa-158F-GST를 제작하였다. 각각의 단백질들은 동물세포 발현용 벡터에 클로닝하여 준비한 다음, PEI를 이용해 Expi293F 세포에 트랜스펙션한 뒤, 37°C, 125 rpm 및 8% CO₂ 조건에서 7일간 배양하여 얻었다. 배양 후, 상등액을 회수하여 PBS로 평형을 맞추고 Ni-NTA(Anti-His) 또는 anti-GST 친화도 크로마토그래피로 정제하였다. 그 결과, 고순도의 사합체 FcγRIIIa-158V-스트렙타비딘, 사합체 FcγRIIIa-158F-스트렙타비딘, 사합체 FcγRIIb-스트렙타비딘, FcγRIIIa-158V-GST 및 FcγRIIIa-158F-GST가 정제되었다 (도 4).

[154] 3-2. 기능 검증

[155] 상기 실시예 3-1에서 제작 및 생산한 단백질들 중 FACS 스크리닝을 위해 준비한 사합체 FcγRIIIa-스트렙타비딘은 Alexa488(Invitrogen, A10235) 및 Alexa647(Invitrogen, A20173)의 형광 염료(dye)를 표지하여 무형광 사합체 FcγRIIb-스트렙타비딘과의 경쟁적 결합을 통한 Fc 변이체들의 선별(sorting)이 가능하도록 준비하였으며, 디스플레이된 Fc 변이체들의 발현 여부 및 레벨을 확인하기 위해 FcγRs와 결합부위가 겹치지 않는 Protein A (Amicogen, 1070020)에 FITC (Invitrogen, F6434)를 컨쥬게이션(conjugation)하여 준비하였다. 형광 염료들 (alexa488, Alexa647 및 FITC)의 컨쥬게이션은 각각의 제조사에서 제공한 메뉴얼에 따라 수행하였다. 형광 표지된 사합체 FcγRIIIa-스트렙타비딘-Alexa488, 사합체 FcγRIIIa-스트렙타비딘-Alexa647 및 Protein A-FITC를 각각 CHO 세포에 디스플레이 된 야생형 Fc 및 FcγRs 결합력이 제거된 Fc 변이체 (Fc-T299L)에 결합 유도한 뒤 활성을 확인하였다.

[156] 그 결과, Protein A-FITC 결합에 의한 형광 신호를 통해 Protein A-FITC가 정상적인 활성을 가지며, CHO 세포에 디스플레이된 야생형(wild-type) Fc 및 Fc-T299L이 안정적으로 발현되어 서로 유사한 발현 수준을 나타내는 것을 확인하였다 (도 5). 또한, 사합체 FcγRIIIa-스트렙타비딘-Alexa488 및 사합체 FcγRIIIa-스트렙타비딘-Alexa647 역시 야생형 Fc에는 정상적으로 결합하고, FcγRs 결합력이 제거된 Fc 변이체인 Fc-T299L에는 결합하지 않는 것으로 나타나 (도 5), Alexa488/647 형광 표지 FcγRIIIa 역시 우수한 활성을 가지며, CHO 세포에 디스플레이 된 Fc들이 정상적으로 발현되고 각각의 기능을 수행하는 것을 성공적으로 검증하였다.

[157] 실시예 4. 포유류 세포 디스플레이를 이용한 **FcγRIIIa** 선택적 결합력 향상 당화 Fc 변이체 라이브러리 구축

[158] 확립된 CHO 세포 Fc 디스플레이 시스템을 통해 당화 Fc를 엔지니어링하고, FcγRIIIa 결합력이 향상된 당화 Fc 변이체를 선별하기 위해 라이브러리를 제작하였다. 라이브러리를 이용하여 DEL 변이체, LPLIL 변이체 및 IQ 변이체의 돌연변이들을 셔플링(shuffling)하여 FcγRIIIa 결합을 극대화할 수 있는 최적의 돌연변이 조합을 탐색하였다 (도 6). 라이브러리 유전자는 상기 실시예 2에서 확립한 Fc 안정적 발현 포유류 세포주 제조 방법과 동일한 방법으로 FLP 발현 플라스미드와 co-트랜스펙션한 후 하이그로마이신-B 배지를 이용한 선별 과정을 거쳐 당화 Fc 변이체 라이브러리 안정적 발현 CHO 세포주를 제작하였다.

- [159] 실시예 5. 포유류 세포 디스플레이를 이용한 **FcγRIIIa** 선택적 결합력 향상 Fc 변이체 선별
- [160] 상기 실시예 2에서 확립한 CHO 세포 Fc 디스플레이 시스템 및 상기 실시예 4에서 확립한 Fc 라이브러리 안정적 발현 CHO 세포주를 이용하여, FcγRIIIa 결합력이 향상된 당화 Fc를 선별하기 위해, 라이브러리 안정적 발현 CHO 세포주에서 FcγRIIIa-Alexa647, Protein A-FITC 또는 FcγRIIIa-Alexa647과 무형광 FcγRIIb, Protein A-FITC의 결합을 유도한 뒤, Protein A-FITC에 의한 발현 수준과 FcγRIIIa 결합을 동시에 모니터링하여 1R의 FACS 선별을 수행하였다. 이로써 우수한 FcγRIIIa 결합력 및 선택성을 보일 것으로 예상되는 세포 집단(population)을 선별하였고, 선별된 당화 Fc 변이체 발현 CHO 세포들을 유전체 DNA(genomic DNA) 프랩(preparation)을 통해 회수한 뒤, 염기서열을 확인하여 최종적으로 조작된(engineered) 당화 Fc 변이체들을 선별하였다 (도 7).
- [161] 실시예 6. 트라스트주맵 Fc 변이체들의 **FcγRIIIa** 결합력 분석
- [162] 당화 Fc 변이체들을 발현 및 정제하기 위해, 모델 항체인 트라스트주맵 중쇄 유전자에 클로닝하여 발현 벡터를 제조하였다. 구체적으로, Freestyle293 발현 배양액 (Gibco, 12338-018) 3 ml에 변이체들의 중쇄유전자와 경쇄유전자를 1:1의 비율로 먼저 섞고, PEI(polyethylenimine) (Polyscience, 23966) 및 변이체 유전자를 4:1의 비율로 섞어 상온에서 20분간 인큐베이션한 뒤, 2×10^6 cells/ml의 밀도로 30 ml 계대배양한 Expi293F 세포에 섞어 shaking CO₂ 인큐베이터에서 37°C, 125 rpm 및 8% CO₂의 조건으로 7일간 배양한 후 원심분리하여 상등액만 취하였다. 상등액은 25×PBS로 평형을 맞춘 후 0.2 μm 시린지 필터로 여과하였다. Her2 단백질의 세포외 도메인(extracellular domain)을 4°C에서 하룻밤 동안 코팅해 둔 high binding 96웰 플레이트 (Costar, 3590)에 상기 여과한 트라스트주맵 Fc 변이체 발현 배양액을 50 μl씩 넣어 1시간 동안 고정화하였다. 그 후, 100 μl의 4% 스킵밀크 (GenomicBase, SKI400)로 상온에서 2시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST 180 μl로 4 회씩 세척한 뒤 1% 스킵밀크에 20 μg/ml 및 0.02 μg/ml의 FcγRIIIa-GST를 각각 50 μl씩 각 웰에 넣어 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 후 고트 항-GST-HRP (GE Healthcare, RPN1236V) 50 μl을 각각 처리하여 상온에서 1시간 동안 항체 반응을 진행하고 세척하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA substrate solution (Thermo Fisher Scientific, 34028)을 50 μl씩 첨가해 발색한 뒤 2 M H₂SO₄을 50 μl씩 넣어주어 반응을 종료시킨 다음, Epoch microplate spectrophotometer (BioTek)을 이용해 흡광도를 분석하였다. 그 결과, 본 발명에서 개발한 신규한 Fc 변이체들 중 PS301, PS303, PS305, PS205, PS207, PS101, PS102, PS105, PS106 및 PS107 (표 1)이 Her2 양성 유방암 치료제로 승인 받은 기준에 공지된 마르게툽시맵 (margetuximab)인 VLPLL 변이체와 유사하거나 현저히 높은 FcγRIIIa 결합력을 가지는 것을 확인하였다 (도 8).

[163] [표1]

#	돌연변이	서열 번호
PS301	K222N/F243L/P247I/R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E	22 및 37
PS303	S239D/P247I/Y300L/V305I/A330L/I332E/A339Q/N361D/ P387Q	23 및 38
PS305	S239D/R292P/Y300L/A330L/A339Q/P387Q/F405L	24 및 39
PS205	F243L/P247I/R292P/Y300L/A330L/I332E/P396L	25 및 40
PS207	F243L/P247I/R292P/A330L/I332E/A339Q/P396L/S415G	26 및 41
PS101	F243L/P247I/R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E/A339Q/ P387Q	27 및 42
PS102	H224R/F243L/P247I/R292P/Y300L/V303I/V305I/A330L/ I332E/A339Q/P387Q	28 및 43
PS105	R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E/A339Q/P387Q	29 및 44
PS106	F243L/P247I/M252V/R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E/ A339Q/D356G/P387Q	30 및 45
PS107	F243L/P247I/R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E/A339Q/ D356G/P387Q	31 및 46
XMd	S239D/F243L/R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E/P396L	32 및 47
XMt	S239D/P247I/A330L/I332E/A339Q	33 및 48
MM	F243L/P247I/R292P/Y300L/V305I/A339Q/P396L	34 및 49
XMM	S239D/F243L/P247I/R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E/ A339Q/P396L	35 및 50

[164] 실시예 7. FcγRIIIa 결합력 향상 당화 트라스트주맵 Fc 변이체의 정제

[165] 상기 실시예 6에서 배양액 ELISA를 통해 높은 FcγRIIIa 결합력을 가지는 것으로 확인된 트라스트주맵 Fc 변이체들을 정제하기 위해, 변이체들에 Protein A 레진(resin)을 첨가하여 4°C에서 16시간 동안 교반한 후 스핀다운(spin down)하여 레진을 회수한 후 2 ml PBS로 세척하고 300 μl의 100 mM 글라이신 pH 2.7 버퍼로 용출(elution)한 뒤, 100 μl의 1 M Tris-HCl pH 8.0을 이용하여 중화하였다. 버퍼를 바꾸기 위하여 Amicon Ultra-4 centrifugal filter units 30K (Merck Millipore, UFC503096)을 사용하였다. 그 결과, 높은 순도의 당화 항체 트라스트주맵 Fc 변이체들이 정제되었음을 확인하였다 (도 9).

[166] 실시예 8. 당화 트라스트주맵 Fc 변이체들의 FcγRIIIa 및 FcγRIIb 결합력 ELISA 분석

- [167] 상기 실시예 7에서 발현 및 정제한 당화 트라스트주맵 Fc 변이체들의 FcγRIIIa 및 FcγRIIb에 대한 결합력을 확인하기 위해 ELISA 분석을 진행하였다. 구체적으로, 0.05 M Na₂CO₃ (pH 9.6)에 4 μg/ml로 희석한 FcγRs-GST (FcγRIIIa-158V-GST, FcγRIIIa-158F-GST 및 FcγRIIb-GST)를 각각 50 μl씩 flat bottom polystyrene high bind 96웰 플레이트 (Costar, 3590)에 분주하고 4°C에서 16시간 동안 고정화한 후, 100 μl의 4% 스킴밀크 (GenomicBase, SKI400)로 상온에서 2시간 동안 블로킹하였다. 그 후, 0.05% PBST 180 μl로 4 회씩 세척한 뒤 1% 스킴밀크로 연속 희석된 각각의 당화 트라스트주맵 Fc 변이체들을 50 μl 각 웰에 분주하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이를 세척한 후 HRP-Protein L (GenScript, M00098) 50 μl씩을 처리하여 상온에서 1시간 동안 항체 반응을 진행하고 세척하였다. 그 뒤, 1-Step Ultra TMB-ELISA substrate solution (Thermo Fisher Scientific, 34028) 50 μl씩 첨가해 발색한 뒤 2 M H₂SO₄을 50 μl씩 첨가하여 반응을 종료시킨 다음 Epoch microplate spectrophotometer (BioTek)을 이용해 흡광도를 분석하였다.
- [168] 그 결과, 본 발명의 당화 트라스트주맵 Fc 변이체들이 각각 B-세포 림프종 및 Her2 양성 유방암 치료제로 US FDA 승인을 받은 당화 Fc 변이체들 (DE 및 VLPLL) 및 기존에 공지된 돌연변이들의 단순 조합으로 구성된 Fc 변이체들 (XMa, XMt, MM 및 XMM)보다 현저히 높은 FcγRIIIa/FcγRIIb 선택적 결합력을 가지는 것으로 나타났다 (도 10 및 11). 특히, 공지된 기능 향상 Fc 변이체 돌연변이들의 단순 조합이 아닌 당화 항체 Fc 변이체 거대 라이브러리 탐색으로 선별적으로 일부 돌연변이들이 추가되고 삭제되어 최적화된 돌연변이들이 포함된 Fc 변이체들이 FcγRIIIa/FcγRIIb 선택적 결합력 유도에 매우 효과적인 것으로 나타났으며 (도 12), 이들의 결합 특성에 따라 하기 표 2와 같이 3 그룹으로 구분하였다.
- [169] [표2]

Fc 변이체들 (PS)	DE와 비교	VLPLL과 비교
101, 102, 107	FcγRIIIa 결합력 향상	FcγRIIIa 결합력 향상
	FcγRIIb 결합력 감소	FcγRIIb 결합력 감소
106, 205, 301, 303, 305	FcγRIIIa 결합력 향상	FcγRIIIa 결합력 향상
	FcγRIIb 결합력 감소	FcγRIIb 결합력 유사
105, 207	FcγRIIIa 결합력 유사	FcγRIIIa 결합력 향상
	FcγRIIb 결합력 감소	FcγRIIb 결합력 감소

[170]

[171] 실시예 9. 당화 트라스트주맙 Fc 변이체들의 FcγRIIIa 및 FcγRIIb 결합 상수 측정

[172] 상기 실시예 7에서 발현 및 정제한 당화 트라스트주맙 Fc 변이체들 중 PS101, PS102 및 PS107 변이체의 정량적 결합 상수를 Octet R8(Sartorius) 장비를 이용하여 측정하였다. 구체적으로, 10 분간 수화(hydration)한 Ni-NTA 바이오센서(biosensor)에 60초 동안 PBS로 기준선(baseline)을 잡은 후 5 μg/ml의 FcγRIIIa-158V-스트렙타비딘-His, FcγRIIIa-158F-streapavidin-His 및 FcγRIIb-streapavidin-His를 각각 고정화(immobilization)하였다. 고정화 후, 다시 한 번 PBS로 기준선을 잡았으며, 뒤이어 PBS로 연속 희석한 트라스트주맙 Fc 변이체들을 90 간 결합(association)시켰다. 그 뒤 PBS로 150초 간 해리(dissociation)하여 전체 동역학 센서그램(full kinetics sensorgram)을 얻고, Octet BLI Discovery 12.2 software를 이용해 정량적 결합 상수를 포함한 동역학적 계수(kinetics parameters)를 얻었다.

[173] [표3]

	FcγRIIIa-158V				FcγRIIIa-158F				FcγRIIb				A/I ratio	
	K _D (nM)	K _{on} (10 ⁶ /Ms)	K _{off} (10 ⁻³ /s)	Fold	K _D (nM)	K _{on} (10 ⁶ /Ms)	K _{off} (10 ⁻³ /s)	Fold	K _D (nM)	K _{on} (10 ⁶ /Ms)	K _{off} (10 ⁻³ /s)	Fold	158V	158F
Trastuzumab	425±132	1.34±0.102	5.56±1.34	1.00	489±10.2	0.900±0.319	4.40±0.0640	1.00	657±105	2.38±0.0255	1.56±0.0750	1.00	1.55	1.34
Trastuzumab-VL PLL	87.4±15.0	1.97±0.0260	1.73±0.317	4.86	77.8±3.47	1.85±0.0235	1.44±0.0825	6.29	943±27.3	1.61±0.01000	1.52±0.0345	0.70	10.8	12.1
Trastuzumab-DE	59.4±0.02	3.20±0.161	1.90±0.0945	7.15	78.8±7.83	1.88±0.0690	1.47±0.0925	6.21	74.8±0.405	1.43±0.00500	1.07±0.0550	8.78	1.26	0.95
Trastuzumab-PS101	47.5±8.95	3.57±0.579	1.64±0.0445	8.95	42.8±0.770	2.88±0.0405	1.23±0.00500	11.4	859±9.90	1.64±0.00150	1.41±0.0175	0.77	18.1	20.1
Trastuzumab-PS102	34.3±10.3	6.16±0.645	2.05±0.415	12.4	54.2±5.3	3.56±0.129	1.92±0.155	9.03	1140±56.0	1.38±0.0355	1.57±0.0370	0.57	33.3	21.1
Trastuzumab-PS107	18.4±2.26	3.74±1.60	0.654±0.210	23.1	37.6±2.98	3.04±0.139	0.987±0.0455	15.0	867±3.95	1.78±0.000500	1.54±0.0650	0.76	47.1	26.6

[174] 그 결과, 야생형 트라스트주맙에 비해 발굴한 3종의 트라스트주맙 Fc 변이체들(trastuzumab-PS101, trastuzumab-PS102 및 trastuzumab-PS107)이 FcγRIIIa-158V에 대해 최대 23배 및 FcγRIIIa-158F에 대해 최대 15배 향상된 결합력을 나타냈으며, FcγRIIb에 대해서는 1.8배 낮아진 결합력을 나타내는 것을 확인하였다 (trastuzumab-PS101은 FcγRIIIa-158V: 8.95배, FcγRIIIa-158F: 11.4배 및 FcγRIIb: 0.77배; trastuzumab-PS102은 FcγRIIIa-158V: 12.4배, FcγRIIIa-158F: 9.03배 및 FcγRIIb: 0.57배; 및 trastuzumab-PS107은 FcγRIIIa-158V: 23.1배, FcγRIIIa-158F: 15.0배 및 FcγRIIb: 0.76배) (표 3).

[175] 실시예 10. 당화 트라스트주맙 Fc 변이체들의 HER2 발현 표적세포 결합 분석

[176] 본 발명의 Fc 변이체들을 모델항체 (트라스트주맙)에 도입한 후 트라스트주맙의 항원인 HER2 발현 암세포주인 SKBR-3를 이용하여 항원 결합력 유지 여부를 분석하였다. 구체적으로, 4×10⁶의 SKBR-3에 10 nM의 본 발명의 트라스트주맙 Fc 변이체들 (TRZ-PS101, TRZ-PS102 및 TRZ-PS107)과 Protein A-FITC를 함께 넣고 아이스(ice)에서 30분 동안 인큐베이션한 후 PBS로 2회 세척하여 각 Fc 변이체에

따른 시료들을 준비하였다. 준비된 시료들을 BD FACSLyric 유세포 분석기로 분석하여 FITC 형광 세기에 따른 결합 정도 및 여부를 확인하였다.

- [177] 그 결과, Fc 변이를 도입하지 않은 야생형 트라스트주맵과 본 발명의 Fc 변이체들을 도입한 트라스트주맵 Fc 변이체들의 항원 결합력이 모두 동일한 것을 확인하였다 (도 13). 이를 통해, 본 발명의 Fc 변이체를 도입하여도 항원 결합에는 영향이 없는 것을 알 수 있다.

- [178] 실시예 11. 당화 트라스트주맵 Fc 변이체들의 세포막 발현 FcγRIIIa 결합력 분석

- [179] NK 세포 표면에 발현되어 있는 FcγRIIIa와 당화 트라스트주맵 Fc 변이체들의 결합을 모사(mimic)하기 위해 CHO 세포 표면에 naive FcγRIIIa를 발현시키고 본 발명의 트라스트주맵 Fc 변이체들과의 결합력을 분석하였다. 구체적으로, FLP-FRT 유전자 재조합(gene recombination) 시스템을 이용하여 인간 FcγRIIIa-158V 및 인간 FcγRIIIa-158F의 유전자를 FRT 부위(site)가 삽입되어 있는 pcDNA5/FRT 플라스미드 (Invitrogen, V601020)에 각각 클로닝하여 준비하였다. 해당 플라스미드를 유전자 재조합을 일으키는 효소인 FLP를 발현하는 pOG44플라스미드 (Invitrogen, V600520)와 함께 FRT 부위가 삽입된 CHO 세포 (Invitrogen, R75807)에 공동-트랜스펙션(co-transfection)하여 유전자 재조합을 유도함으로써, CHO 세포의 염색체(chromosomal) DNA에 인간 FcγRIIIa DNA가 통합(integration)되어 인간 FcγRIIIa-158V 및 인간 FcγRIIIa-158F를 안정적으로 발현하는 CHO 세포주를 각각 제작하였다. 이 때 트랜스펙션 후 유전자 통합(gene integration)이 일어난 CHO 세포들만 선별하기 위해 하이그로마이신-B 저항성 유전자가 함께 통합되도록 하였으며, 500 μg/ml의 하이그로마이신-B (Invitrogen, 10687010)를 처리함으로써 인간 FcγRIIIa를 안정적으로 발현하는 CHO 세포주를 선별하였다 (CHO-FcγRIIIa-158V 및 CHO-FcγRIIIa-158F). 제작된 CHO-FcγRIIIa-158V 및 CHO-FcγRIIIa-158F에 2.5 nM의 당화 트라스트주맵 Fc 변이체들 (TRZ-PS101, TRZ-PS102 및 TRZ-PS107)과 HER2-Alexa488 형광 프로브를 각각 함께 넣어주어 결합을 유도한 다음 BD FACSLyric 유세포 분석기로 형광을 분석하였다.

- [180] 그 결과, soluble FcγRIIIa와의 결합력 분석 결과와 유사하게, 본 발명의 당화 트라스트주맵 Fc 변이체들 (TRZ-PS101, TRZ-PS102 및 TRZ-PS107)이 양성 대조군인 트라스트주맵-DE, 트라스트주맵-VLPLL보다 현저히 높은 결합력을 가지는 것으로 나타났다 (도 14).

- [181] 실시예 12. 당화 트라스트주맵 Fc 변이체들의 실시간 ADCC 효능 분석

- [182] 본 발명의 당화 트라스트주맵 Fc 변이체들의 ADCC 효능을 실시간으로 확인하기 위해, xCELLigence-RTCA-SP(Agilent) 장비를 이용하여 세포독성(cell cytotoxicity)을 실시간으로 모니터링하였다. 구체적으로, 1×10^4 cell/well로 SKBR-3를 E-플레이트 96에 코팅한 후 24 시간 동안 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 24시간 후 20 pM의 당화 트라스트주맵 Fc 변이체들 (TRZ-PS101, TRZ-PS102 및 TRZ-PS107)과 인간 PBMC를 각각 넣어주고 인큐베이션하여 표적세포

사멸을 유도하였다. 이 때 E:T(Effector cell:target cell)의 비율은 2:1 및 5:1로하여 분석을 수행하였고, full lysis는 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl 및 1 mM EDTA 버퍼를 처리하여 %세포용해(cytolysis)를 계산하였다.

- [183] 각 트라스트주맵 Fc 변이체에 따른 실시간 세포 사멸 그래프를 확인한 결과, E:T 비율 2:1 (도 15) 및 5:1 (도 16) 모두에서 대조군인 야생형 트라스트주맵, 및 양성 대조군인 트라스트주맵-DE 및 트라스트주맵-VLPLL 보다 본 발명의 트라스트주맵 Fc 변이체인 트라스트주맵-PS101, 트라스트주맵-PS102 및 트라스트주맵-PS107 (TRZ-PS101, TRZ-PS102 및 TRZ-PS107)의 표적 세포 사멸 효과가 현저히 높은 것으로 나타났다. 실시간 그래프 (도 15A 및 16A)를 바탕으로 한 endpoint 분석에서도 본 발명의 트라스트주맵-PS101, 트라스트주맵-PS102 및 트라스트주맵-PS107가 현저히 우수한 % of cytotoxicity를 가지는 것을 확인하였다 (도 15B 및 16B).

- [184] 실시예 13. 당화 트라스트주맵 Fc 변이체들의 면역원성 예측 분석

- [185] 본 발명의 당화 트라스트주맵 Fc 변이체들의 MHC class II 결합에 의한 면역원성을 분석하기 위해, IEDB를 기반으로 본 발명의 Fc 변이체들의 염기 서열에 따른 면역원성 가능성을 확인하였다. 구체적으로, 인간에서 가장 많이 발견되는 27개 타입 HLA (HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB1*03:01, HLA-DRB1*04:01, HLA-DRB1*04:05, HLA-DRB1*07:01, HLA-DRB1*08:02, HLA-DRB1*09:01, HLA-DRB1*11:01, HLA-DRB1*12:01, HLA-DRB1*13:02, HLA-DRB1*15:01, HLA-DRB3*01:01, HLA-DRB3*02:02, HLA-DRB4*01:01, HLA-DRB5*01:01, HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01, HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01, HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02, HLA-DQA1*04:01/DQB1*04:02, HLA-DQA1*01:01/DQB1*05:01, HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02, HLA-DPA1*02:01/DPB1*01:01, HLA-DPA1*01:03/DPB1*02:01, HLA-DPA1*01:03/DPB1*04:01, HLA-DPA1*03:01/DPB1*04:02, HLA-DPA1*02:01/DPB1*05:01 및 HLA-DPA1*02:01/DPB1*14:01)에 대한 Fc 펩타이드들 (PS101, PS102 및 PS107)의 결합력을 백분위수 순위(percentil rank)로 분석하였으며, 이 때 Fc는 15-mer 씩 펩타이드 형태로 나누어 분석하였다. 데이터베이스 기반의 예측 순위(rank)를 토대로 고친화성(high affinity)은 빨간색(red), 중간 친화성(intermediated affinity)은 오렌지색(orange) 및 저친화성(low affinity)은 노란색(yellow)로 표시하여 히트맵으로 나타내었다.

- [186] *in silico* 분석 결과, 인간 IgG1 Fc와 본 발명의 Fc 변이체들의 면역원성 예측 결과가 큰 차이가 없는 것으로 나타났다 (도 17).

- [187] 실시예 14. 당화 트라스트주맵 Fc 변이체들의 동물 Fc 수용체들과의 결합력 분석

- [188] 14-1. 마우스 FcγRIV 및 원숭이 FcγRIII 생산

- [189] 마우스 및 원숭이 동물 모델에서의 효능 검증을 위해 인간의 FcγRIIIa에 대응되는 동물의 Fc 수용체들을 GST 융합 형태로 클로닝하여 발현 벡터를 제조하였다 (마우스 FcγRIV-GST 및 사이노몰거스 원숭이 FcγRIII-GST). 구체적으로,

Freestyle293 발현 배양액 (Gibco, 12338-018) 30 ml에 변이체들의 중쇄유전자와 경쇄유전자를 1:1의 비율로 먼저 섞고, PEI(polyethylenimine) (Polyscience, 23966) 및 변이체 유전자를 4:1의 비율로 섞어 상온에서 20분간 인큐베이션한 뒤, 2×10^6 cells/ml의 밀도로 30 ml 계대배양한 Expi293F 세포에 섞어 shaking CO₂ 인큐베이터에서 37°C, 125 rpm 및 8% CO₂의 조건으로 7일간 배양한 후 원심분리하여 상등액만 취하였다. 상등액은 25×PBS로 평형을 맞춘 후 0.2 µm 시린지 필터로 여과하고, 글루타치온 레진(glutathione resin) (GenScript, L00206)을 넣어 4°C에서 16시간 동안 교반하였다. 교반이 끝난 시료를 디스포저블(disposable) 5 ml 폴리프로필렌 컬럼(polypropylene column) (Thermo Fisher Scientific, 29922)에 내려 레진을 회수 한 후 10 CV PBS로 세척하였다. 4 ml의 50 mM Tris-HCl 및 10 mM 환원된 글루타치온(reduced glutathione) pH 8.0 버퍼로 용출(elution)한 후 버퍼를 바꾸기 위하여 Amicon Ultra-4 centrifugal filter units 3K (Merck Millipore, UFC800324)을 사용하였다.

- [190] 그 결과 높은 순도의 마우스 FcγRIV-GST 및 사이노물거스 원숭이 FcγRIII-GST를 확보하였다 (도 18).
- [191] 14-2. 당화 트라스트주맵 Fc 변이체들과 마우스 FcγRIV 및 원숭이 FcγRIII의 결합력 분석
- [192] 인간 FcγRIIIa에 대응되는 동물 Fc 수용체들 (마우스 FcγRIV 및 원숭이 FcγRIII)과 본 발명의 트라스트주맵 Fc 변이체들 (TRZ-PS101, TRZ-PS102 및 TRZ-PS107)의 결합력을 확인하기 위해 ELISA 분석을 진행하였다. 구체적으로, 상기 실시예 14-1에서 제작한 마우스 FcγRIV-GST와 사이노물거스 원숭이 FcγRIII-GST를 0.05 M Na₂CO₃ pH 9.6에 4 µg/ml로 희석하고, 이를 각각 50 µl씩 flat bottom polystyrene high bind 96웰 마이크로플레이트 (Costar, 3590)에 4°C에서 16시간 동안 고정화한 후, 100 µl의 4% 스킵 밀크 (GenomicBase, SKI400)로 상온에서 2시간 동안 블로킹하였다. 그 후, 0.05% PBST 180 µl로 4 회씩 세척한 뒤 1% 스킵 밀크로 연속 희석된 본 발명의 당화 트라스트주맵 Fc 변이체들을 50 µl씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 후 HRP-Protein L (GenScript, M00098) 50 µl씩을 이용해 상온에서 1시간 동안 항체 반응을 진행하고 세척하였다. 그 후, 1-Step Ultra TMB-ELISA substrate solution (Thermo Fisher Scientific, 34028)을 50 µl씩 첨가해 발색하고 2 M H₂SO₄을 50 µl씩 넣어 반응을 종료시킨 뒤 Epoch microplate spectrophotometer (BioTek)을 이용해 흡광도를 분석하였다.
- [193] 그 결과, 본 발명의 트라스트주맵 Fc 변이체들 (TRZ-PS101, TRZ-PS102 및 TRZ-PS107)이 마우스 및 사이노물거스 원숭이의 Fc 수용체에도 인간 수용체에서와 유사하게 양성 대조군 당화 Fc 변이체들 (DE 및 VLPLL)보다 현저히 높은 결합력을 가지는 것으로 나타났다 (도 19).
- [194] 실시예 15. 세톡시맵 또는 리톡시맵 Fc 변이체 제작

- [195] 본 발명의 당화 Fc 변이체들 (PS101, PS102 및 PS107)을 또 다른 모델항체인 세툽시맙(cetuximab) 및 리툽시맙(rituximab)의 중쇄 유전자에 각각 클로닝하여 발현 벡터를 제조하였다. 구체적으로, Freestyle293 발현 배양액 (Gibco, 12338-018) 10 ml에 변이체들의 중쇄유전자와 경쇄유전자를 1:1의 비율로 먼저 섞고, PEI(polyethylenimine) (Polyscience, 23966) 및 변이체 유전자를 4:1의 비율로 섞어 상온에서 20분간 인큐베이션한 뒤, 2×10^6 cells/ml의 밀도로 100 ml 계대 배양한 Expi293F 세포에 섞어 shaking CO₂ 인큐베이터에서 37°C, 125 rpm 및 8% CO₂의 조건으로 7일간 배양한 후 원심분리하여 상등액만 취하였다. 상등액은 25×PBS로 평형을 맞춘 후 0.2 µm 시린지 필터로 여과하고, Protein A 레진을 넣어 4°C에서 16시간 동안 교반하였다. 교반이 끝난 시료를 디스포저블 5 ml 폴리프로필렌 컬럼 (Thermo Fisher Scientific, 29922)에 내려 레진을 회수 한 후 5 ml PBS로 세척하였다. 3 ml의 100 mM 글라이신 pH 2.7 버퍼로 용출(elution)한 후 1 ml의 1 M Tris-HCl pH 8.0을 이용하여 중화하였다. 버퍼를 바꾸기 위하여 Amicon Ultra-4 centrifugal filter units 30K(Merck Millipore, UFC503096)을 사용하였다.
- [196] 그 결과 높은 순도의 당화 항체 세툽시맙 Fc 변이체들 및 리툽시맙 Fc 변이체들이 정제되었음을 확인하였다 (도 20).
- [197] 실시예 16. 당화 세툽시맙 Fc 변이체들의 Fcγ 수용체에 대한 결합력 분석
- [198] 16-1. 인간 FcγRIIIa 및 FcγRIIb에 대한 결합력 분석
- [199] 상기 실시예 15에서 제작한 당화 세툽시맙 Fc 변이체들 (CTX-PS101, CTX-PS102 및 CTX-PS107)의 FcγRIIIa 및 FcγRIIb에 대한 결합력을 확인하기 위해 ELISA 분석을 진행하였다. 구체적으로, 0.05 M Na₂CO₃ pH 9.6에 4 µg/ml로 희석한 FcγRs-GST들 (FcγRIIIa-158V-GST, FcγRIIIa-158F-GST 및 FcγRIIb-GST)를 각각 50 µl씩 flat bottom polystyrene high bind 96웰 마이크로플레이트 (Costar, 3590)에 4°C에서 16시간 동안 고정화한 후, 100 µl의 4% 스킵 밀크 (GenomicBase, SKI400)로 상온에서 2시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST 180 µl로 4 회씩 세척한 뒤 1% 스킵 밀크로 연속 희석한 당화 세툽시맙 Fc 변이체들 (CTX-PS101, CTX-PS102 및 CTX-PS107)을 50 µl씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 후 HRP-Protein L (GenScript, M00098) 50 µl씩을 이용해 상온에서 1시간 동안 항체 반응을 진행하고 세척하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA substrate solution (Thermo Fisher Scientific, 34028)을 50 µl씩 첨가해 발색한 뒤 2 M H₂SO₄을 50 µl씩 넣어 반응을 종료시킨 다음, Epoch microplate spectrophotometer (BioTek)을 이용해 흡광도를 분석하였다.
- [200] 그 결과, 본 발명에서 제작한 당화 세툽시맙 Fc 변이체들이 양성 대조군 당화 Fc 변이체들 (DE 및 VLPLL)보다 현저히 높은 FcγRIIIa/FcγRIIb 선택적 결합력을 가지는 것으로 나타났다 (도 21). 특히, 서로 다른 모델 치료용 항체에 Fc 변이체를 도입했을 때 현저히 우수한 FcγRIIIa/FcγRIIb 선택적 결합 특성을 유지할 수 있음을 확인하였다.

- [201] 16-2. 마우스 FcγRIV 및 원숭이 FcγRIII에 대한 결합력 분석
- [202] 인간 FcγRIIIa에 대응되는 동물 Fc 수용체와 세톡시맵 Fc 변이체들의 결합력을 확인하기 위해 ELISA 분석을 진행하였다. 구체적으로, 0.05 M Na₂CO₃ pH 9.6에 4 µg/ml로 희석한 마우스 FcγRIV-GST 및 사이노몰거스 원숭이 FcγRIII-GST를 각각 50 µl씩 flat bottom polystyrene high bind 96웰 마이크로플레이트 (Costar, 3590)에 4°C에서 16시간 동안 고정화한 후 100 µl의 4% 스킵 밀크 (GenomicBase, SKI400)로 상온에서 2시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST 180 µl로 4 회씩 세척한 뒤 1% 스킵 밀크로 연속 희석한 세톡시맵 Fc 변이체들 (CTX-PS101, CTX-PS102 및 CTX-PS107)을 50 µl씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 후 HRP-Protein L (GenScript, M00098) 50 µl씩을 이용해 상온에서 1시간 동안 항체 반응을 진행하고 세척하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA substrate solution (Thermo Fisher Scientific, 34028)을 50 µl씩 첨가해 발색한 뒤 2 M H₂SO₄을 50 µl씩 넣어 반응을 종료시킨 다음, Epoch microplate spectrophotometer (BioTek)을 이용해 흡광도를 분석하였다.
- [203] 그 결과, 본 발명에서 제작한 당화 세톡시맵 Fc 변이체들이 인간 수용체와 마찬가지로 마우스 및 사이노몰거스 원숭이의 Fc 수용체에도 양성 대조군 당화 Fc 변이체들 (DE 및 VLPLL)보다 현저히 높은 결합력을 가지는 것으로 나타났다 (도 22).
- [204] 실시예 17. 당화 리톡시맵 Fc 변이체들의 Fcγ 수용체에 대한 결합력 분석
- [205] 17-1. 인간 FcγRIIIa 및 FcγRIIb에 대한 결합력 분석
- [206] 상기 실시예 15에서 제작한 당화 리톡시맵 Fc 변이체들 (RTX-PS101, RTX-PS102 및 RTX-PS107)의 FcγRIIIa 및 FcγRIIb에 대한 결합력을 확인하기 위해 ELISA 분석을 진행하였다. 구체적으로, 0.05 M Na₂CO₃ pH 9.6에 4 µg/ml로 희석한 FcγRs-GST들 (FcγRIIIa-158V-GST, FcγRIIIa-158F-GST 및 FcγRIIb-GST)를 각각 50 µl씩 flat bottom polystyrene high bind 96웰 마이크로플레이트 (Costar, 3590)에 4°C에서 16시간 동안 고정화한 후, 100 µl의 4% 스킵 밀크 (GenomicBase, SKI400)로 상온에서 2시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST 180 µl로 4 회씩 세척한 뒤 1% 스킵 밀크로 연속 희석한 당화 리톡시맵 Fc 변이체들 (RTX-PS101, RTX-PS102 및 RTX-PS107)을 50 µl씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 후 HRP-Protein L (GenScript, M00098) 50 µl씩을 이용해 상온에서 1시간 동안 항체 반응을 진행하고 세척하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA substrate solution (Thermo Fisher Scientific, 34028)을 50 µl씩 첨가해 발색한 뒤 2 M H₂SO₄을 50 µl씩 넣어 반응을 종료시킨 다음, Epoch microplate spectrophotometer (BioTek)을 이용해 흡광도를 분석하였다.
- [207] 그 결과, 본 발명에서 제작한 당화 리톡시맵 Fc 변이체들이 양성 대조군 당화 Fc 변이체들 (DE 및 VLPLL)보다 현저히 높은 FcγRIIIa/FcγRIIb 선택적 결합력을 가지는 것으로 나타났다 (도 23). 특히, 서로 다른 모델 치료용 항체에 Fc 변이체를

도입했을 때 월등히 우수한 FcγRIIIa/FcγRIIb 선택적 결합 특성을 유지할 수 있음을 확인하였다.

[208] 17-2. 마우스 FcγRIV 및 원숭이 FcγRIII에 대한 결합력 분석

[209] 인간 FcγRIIIa에 대응되는 동물 Fc 수용체와 리톡시맵 Fc 변이체들의 결합력을 확인하기 위해 ELISA 분석을 진행하였다. 구체적으로, 0.05 M Na₂CO₃ pH 9.6에 4 μg/ml로 희석한 마우스 FcγRIV-GST 및 사이노몰거스 원숭이 FcγRIII-GST를 각각 50 μl씩 flat bottom polystyrene high bind 96웰 마이크로플레이트 (Costar, 3590)에 4°C에서 16시간 동안 고정화한 후 100 μl의 4% 스킴 밀크 (GenomicBase, SKI400)로 상온에서 2시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST 180 μl로 4 회씩 세척한 뒤 1% 스킴 밀크로 연속 희석한 당화 리톡시맵 Fc 변이체들 (RTX-PS101, RTX-PS102 및 RTX-PS107)을 50 μl씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 후 HRP-Protein L (GenScript, M00098) 50 μl씩을 이용해 상온에서 1시간 동안 항체 반응을 진행하고 세척하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA substrate solution (Thermo Fisher Scientific, 34028)을 50 μl씩 첨가해 발색한 뒤 2 M H₂SO₄을 50 μl씩 넣어 반응을 종료시킨 다음, Epoch microplate spectrophotometer (BioTek)을 이용해 흡광도를 분석하였다.

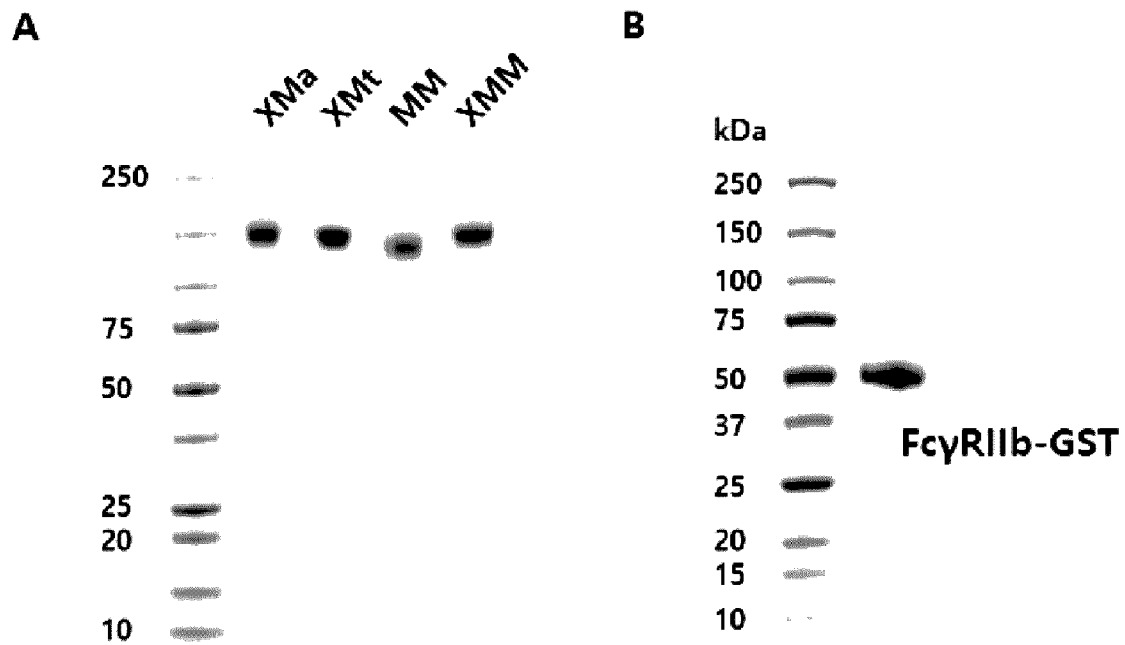
[210] 그 결과, 발굴한 당화 리톡시맵 Fc 변이체들이 인간 수용체와 마찬가지로 마우스 및 사이노몰거스 원숭이의 Fc 수용체에도 양성 대조군 당화 Fc 변이체들 (DE 및 VLPLL)보다 현저히 높은 결합력을 가지는 것으로 나타났다 (도 24).

청구범위

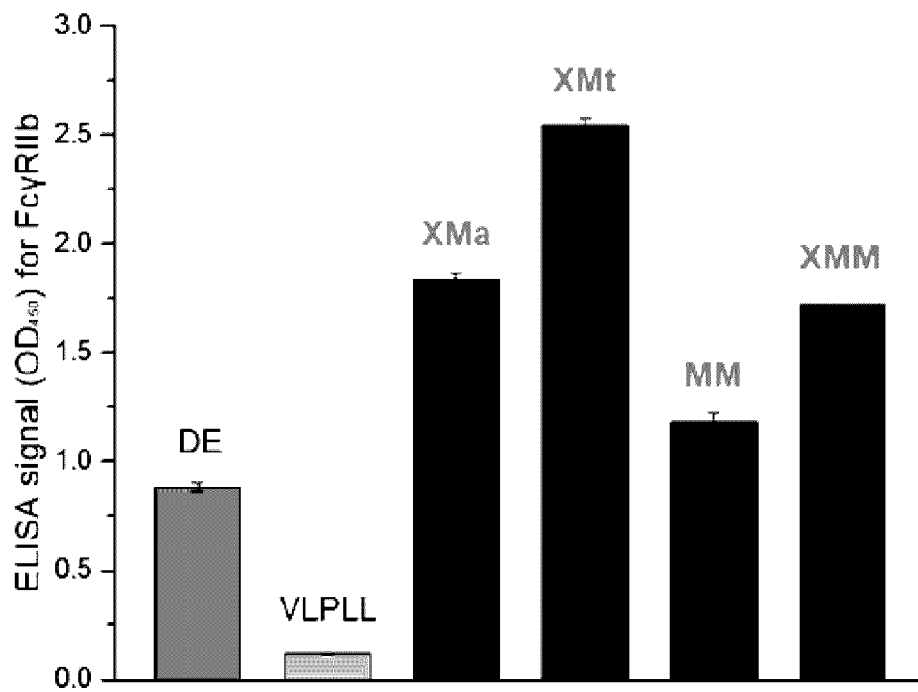
- [청구항1] 야생형(Wild type) 인간 항체 Fc 도메인에서, 카바트 넘버링 시스템(Kabat numbering system)에 따라 넘버링된 224, 243, 247, 292, 300, 303, 305, 330, 332, 339, 356 및 387 위치의 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 위치의 아미노산이 야생형의 아미노산과 다른 서열로 치환된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항2] 제 1항에 있어서, H224R, F243L, P247I, R292P, Y300L, V303I, V305I, A330L, I332E, A339Q, D356G 및 P387Q로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항3] 제 1항에 있어서, F243L, P247I, R292P, Y300L, V305I, A330L, I332E, A339Q 및 P387Q의 아미노산 치환을 포함하는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항4] 제 1항에 있어서, H224R, F243L, P247I, R292P, Y300L, V303I, V305I, A330L, I332E, A339Q 및 P387Q의 아미노산 치환을 포함하는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항5] 제 1항에 있어서, F243L, P247I, R292P, Y300L, V305I, A330L, I332E, A339Q, D356G 및 P387Q의 아미노산 치환을 포함하는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항6] 제 1항에 있어서, 야생형 Fc 도메인과 비교하여 FcγRIIIa와의 결합력이 향상된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항7] 제 1항에 있어서, 야생형 Fc 도메인과 비교하여 FcγRIIb와의 결합력이 감소된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항8] 제 1항에 있어서, 향상된 ADCC(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) 유도능을 가지는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항9] 제 1항의 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.
- [청구항10] 제 9항에 있어서, 상기 항체는 당화 항체인, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.
- [청구항11] 제 9항에 있어서, 서열번호 6 또는 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 2(C_H2) 및 서열번호 18 또는 19의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 3(C_H3)를 포함하는, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.
- [청구항12] 제 1항의 Fc 도메인 변이체, 또는 제 9항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산분자.
- [청구항13] 제 12항의 핵산분자를 포함하는 벡터.
- [청구항14] 제 13항의 벡터를 포함하는 숙주세포.

- [청구항15] 제 1항의 Fc 도메인 변이체, 또는 제 9항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항16] 제 15항에 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, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장 또는 수노관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항17] a) 제 1항의 Fc 도메인 변이체를 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및
b) 숙주세포에 의해 발현된 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는, FcγRIIIa에 대한 선택적 결합력이 향상된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체의 제조방법.
- [청구항18] a) 제 9항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및
b) 숙주세포로부터 발현된 항체를 정제하는 단계를 포함하는 FcγRIIIa에 대한 선택적 결합력이 향상된 당화 항체의 제조방법.
- [청구항19] 항체 치료제의 제조에 사용하기 위한, 제 1항의 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 용도.
- [청구항20] 제 1항의 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 암의 예방 또는 치료 용도.
- [청구항21] 제 1항의 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 약학적으로 유효한 양으로 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법.

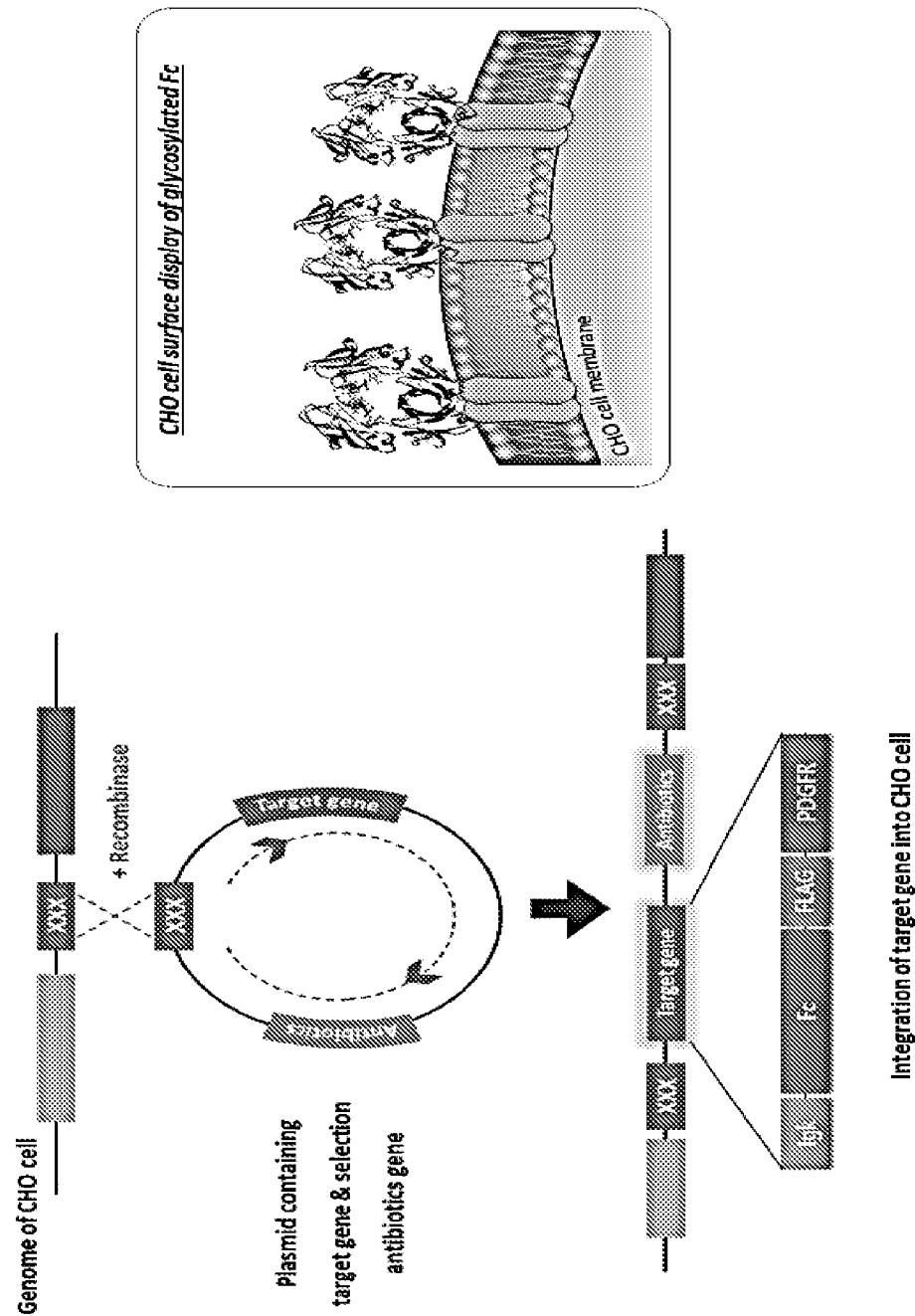
[도1]



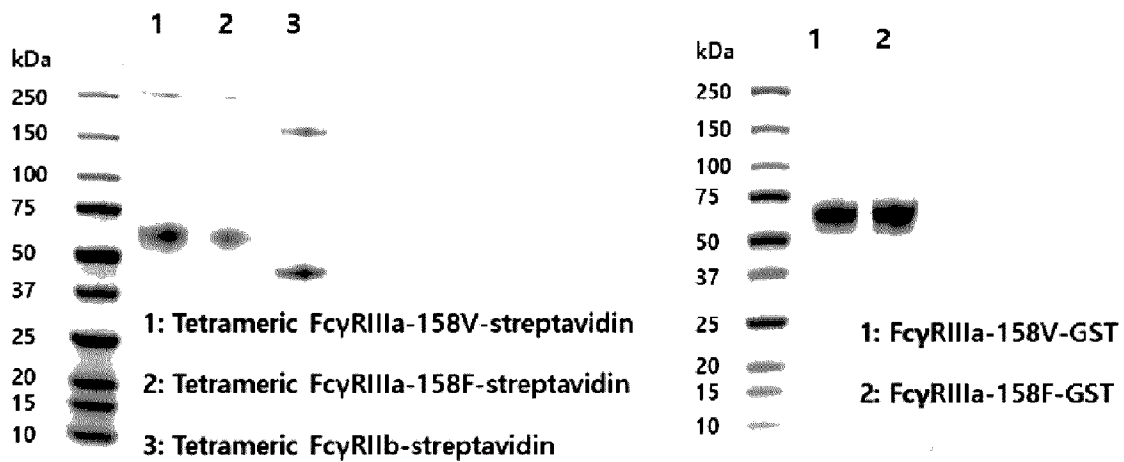
[도2]



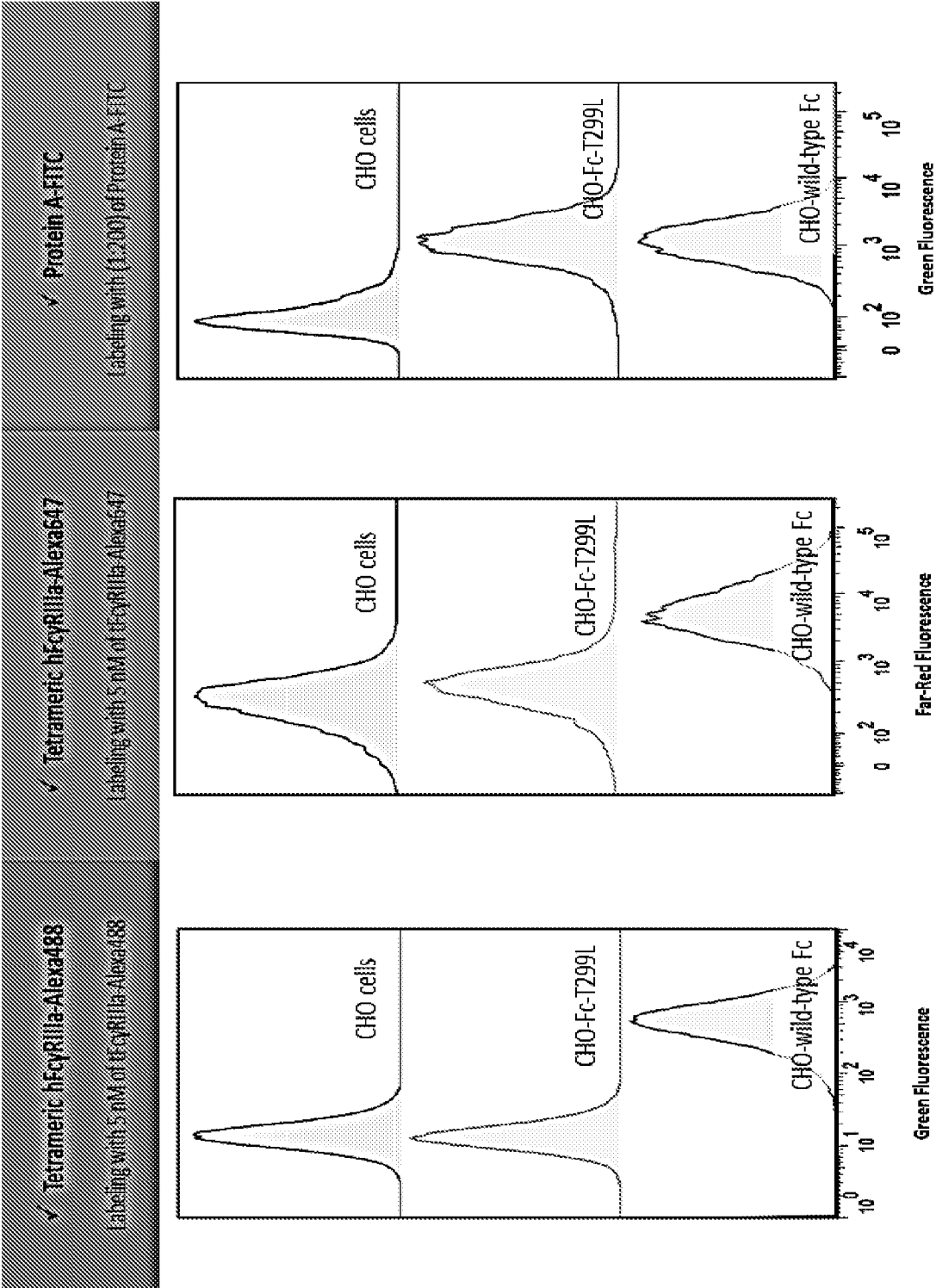
[도3]



[도4]



[도5]



[도6]

	• DEL	: S239D/I332E/A330L
Pre-existing mutations:	• LPLIL	: F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L
	• IQ	: P247I/A339Q

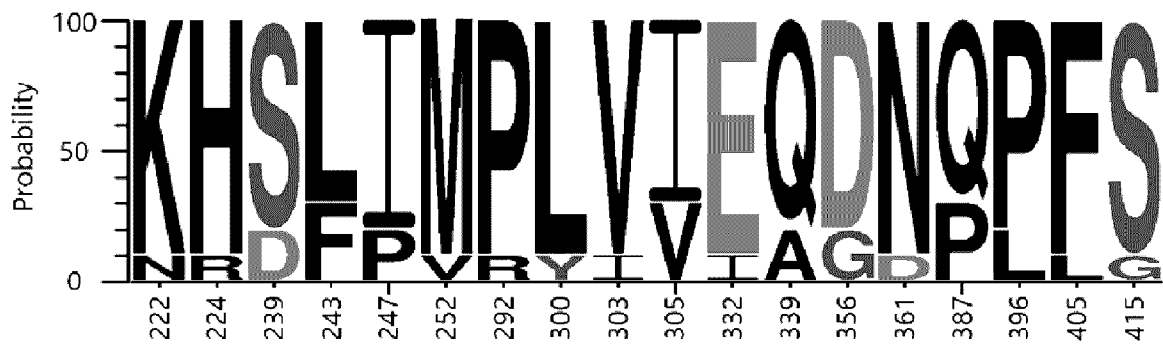
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
D L I

YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
P L I L E

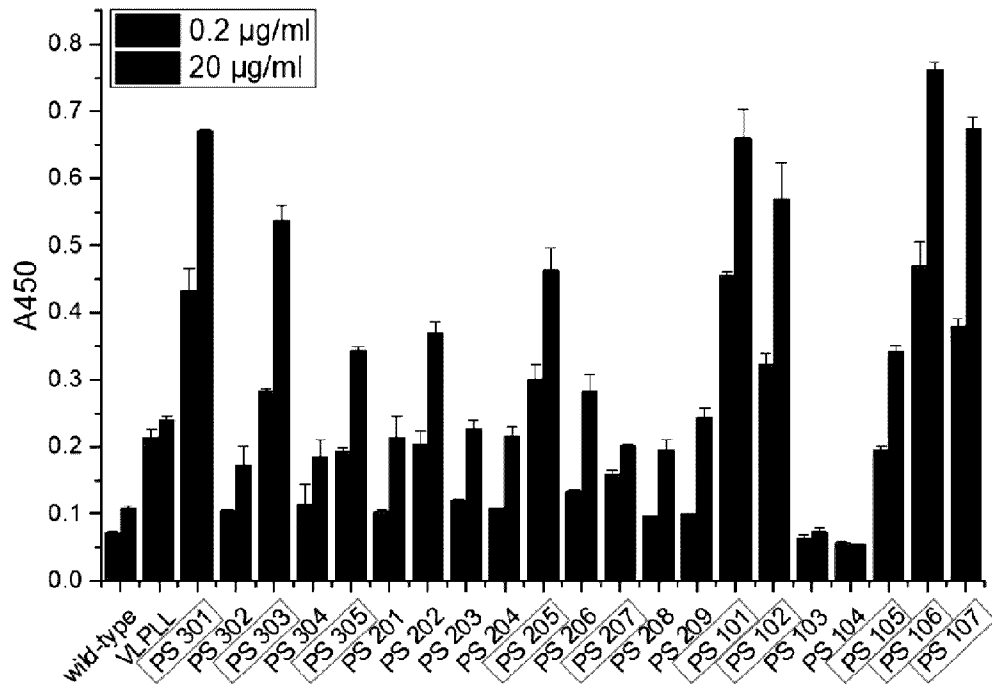
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
Q

KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
L

[도7]

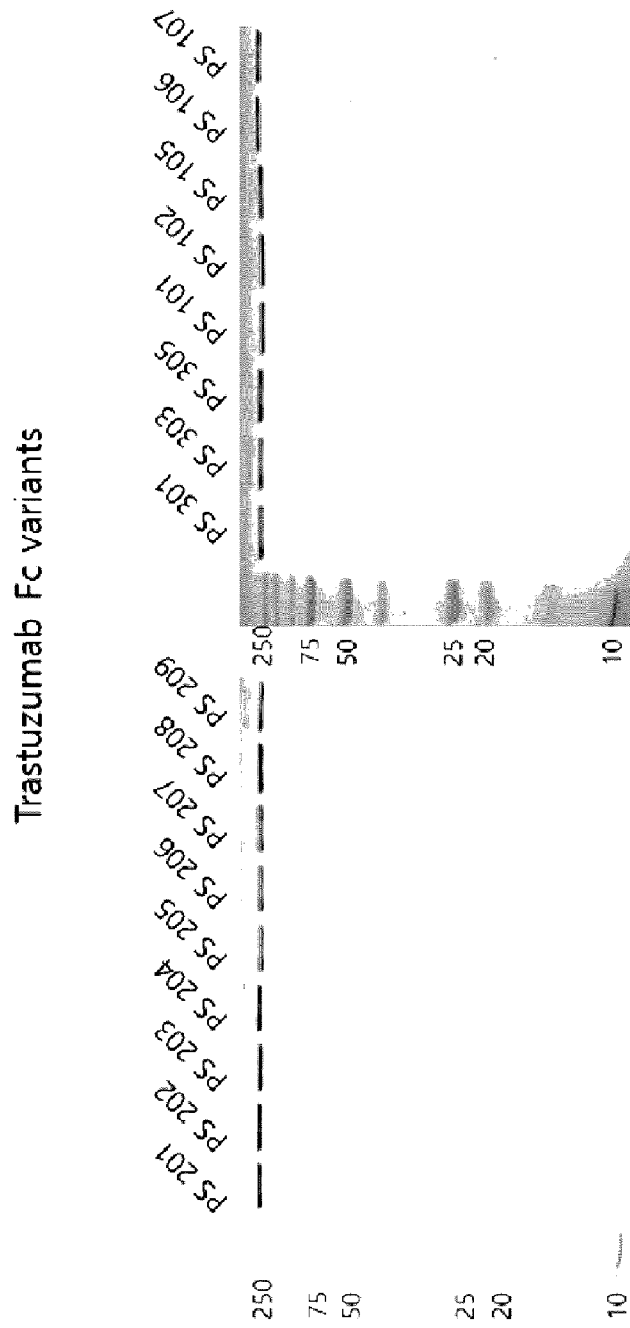


[도8]

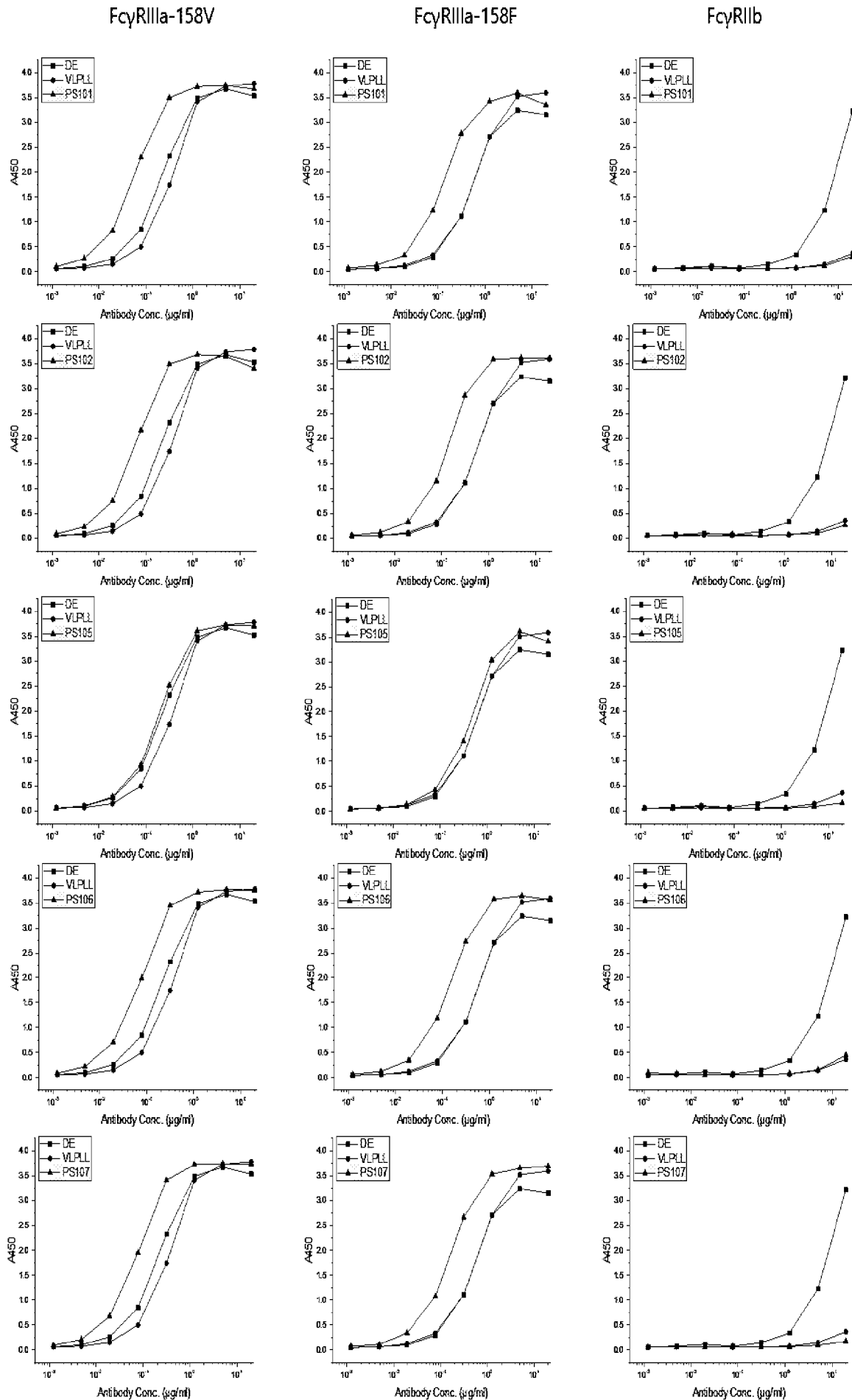


Fc variants	Mutations
Wild-type Fc	-
DE	S239D/I332E
VLPLL	L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L
XMa	S239D/F243L/R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E/P396L
XMt	S239D/P247I/A330L/I332E/A339Q
MM	F243L/P247I/R292P/Y300L/V305I/A339Q/P396L
XMM	S239D/F243L/P247I/R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E/A339Q/P396L
PS301	K222N/F243L/P247I/R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E
PS303	S239D/P247I/Y300L/V305I/A330L/I332E/A339Q/N361D/P387Q
PS305	S239D/R292P/Y300L/A330L/A339Q/P387Q/F405L
PS205	F243L/P247I/R292P/Y300L/A330L/I332E/P396L
PS207	F243L/P247I/R292P/A330L/I332E/A339Q/P396L/S415G
PS101	F243L/P247I/R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E/A339Q/P387Q
PS102	H224R/F243L/P247I/R292P/Y300L/V303I/V305I/A330L/I332E/A339Q/P387Q
PS105	R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E/A339Q/P387Q
PS106	F243L/P247I/M252V/R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E/A339Q/D356G/P387Q
PS107	F243L/P247I/R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E/A339Q/D356G/P387Q

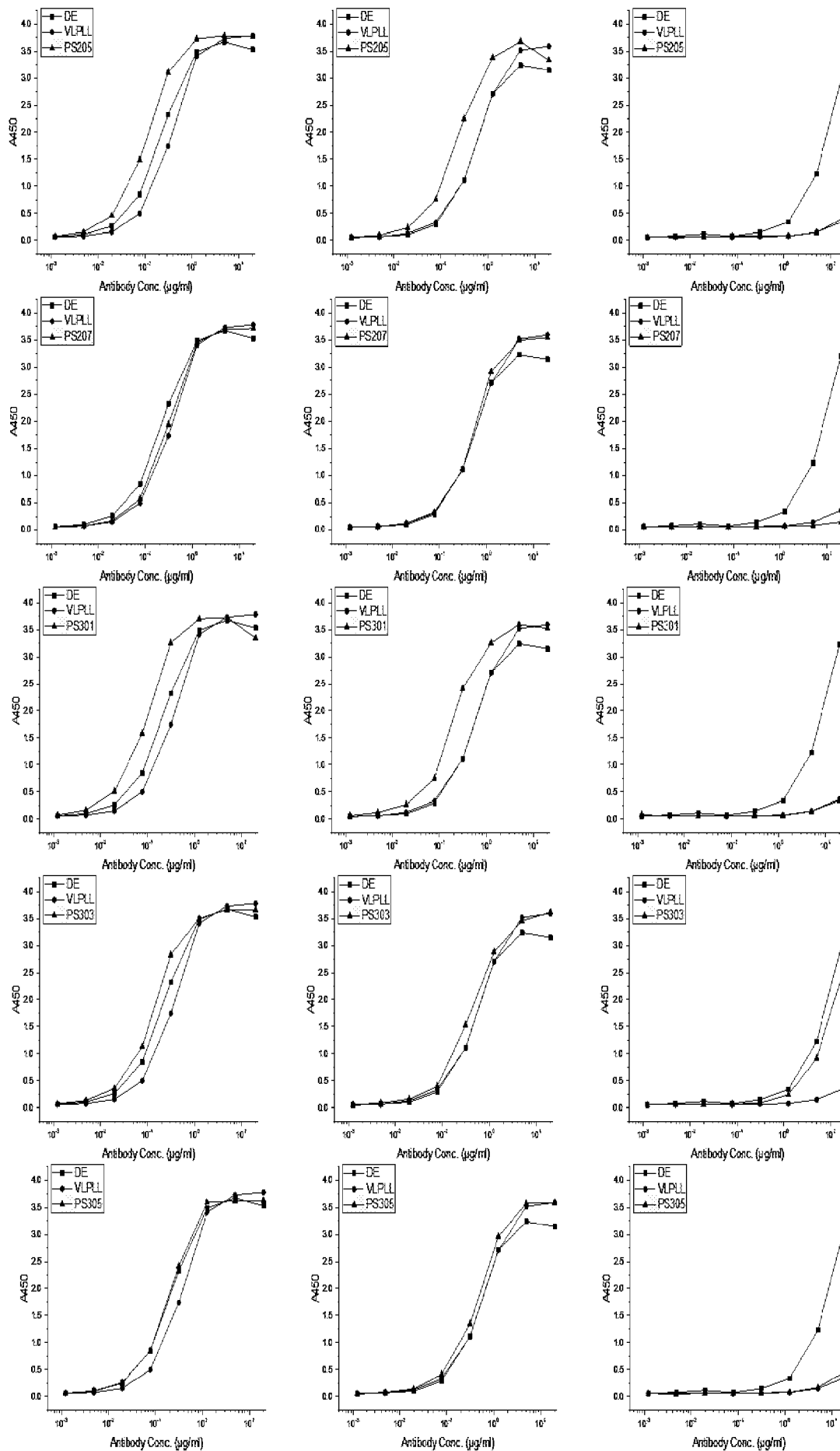
[도9]



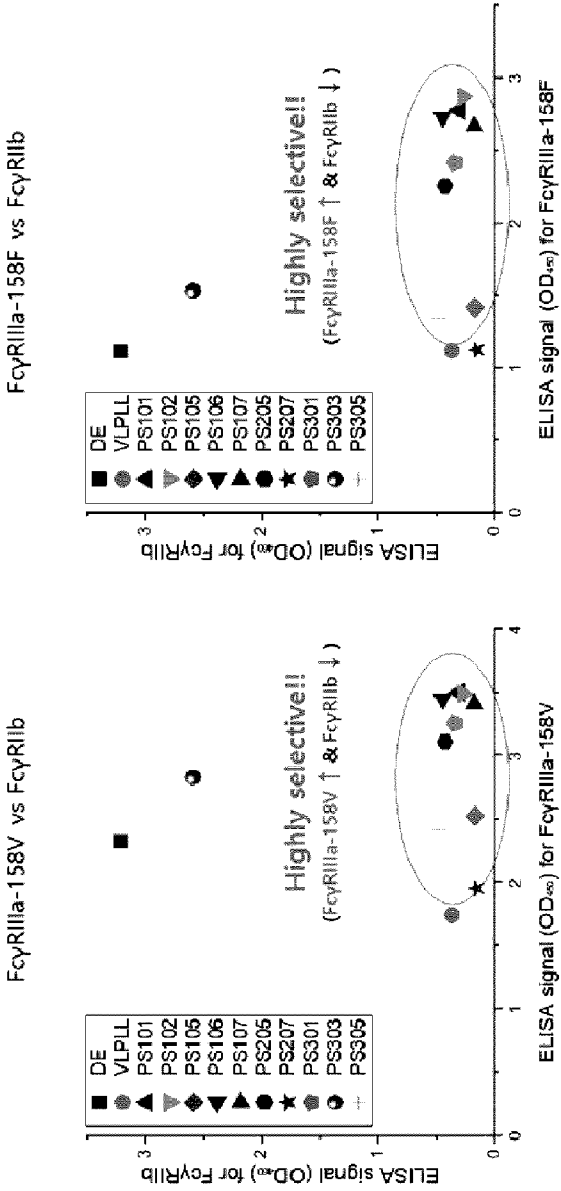
[도 10]



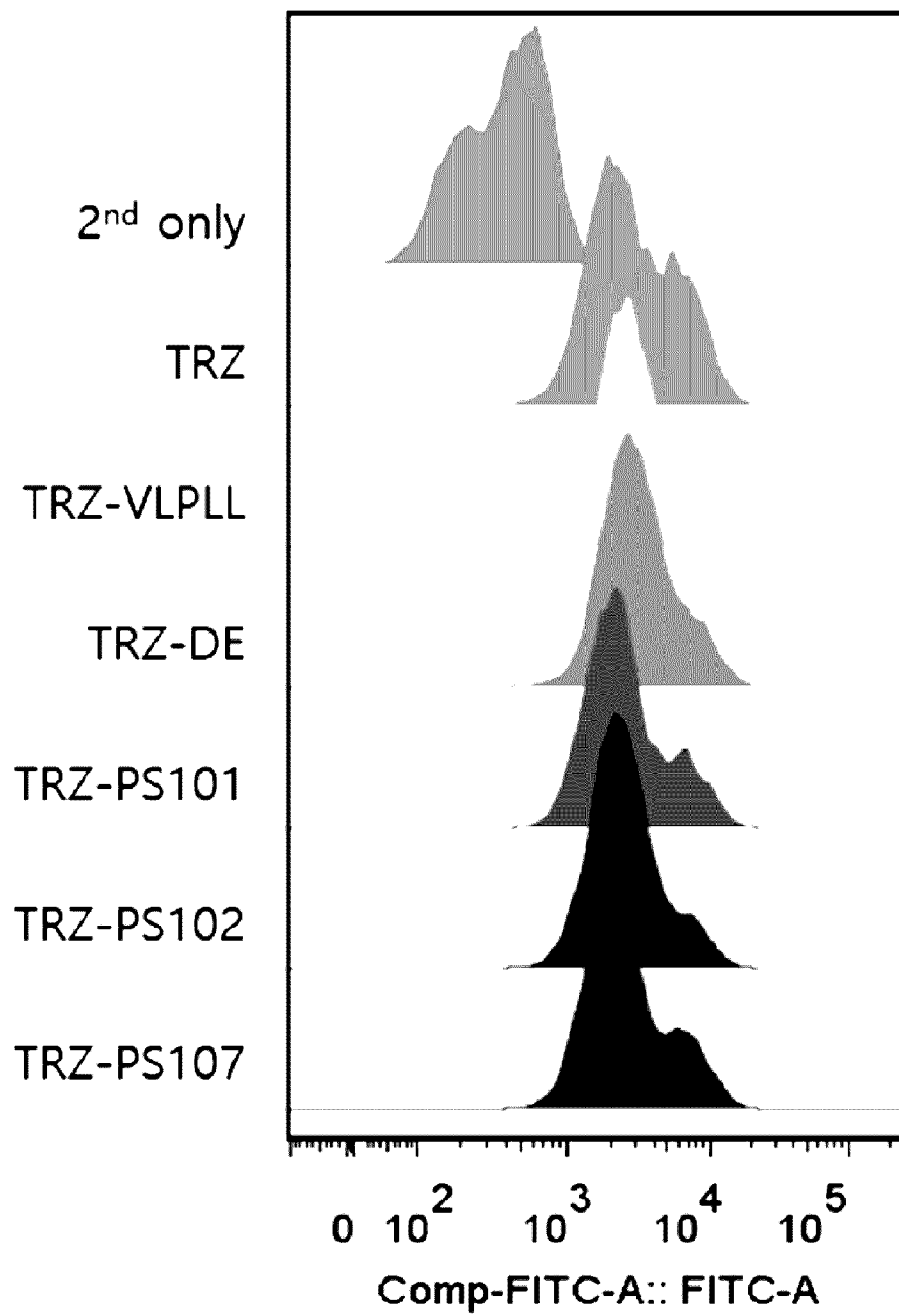
[도11]



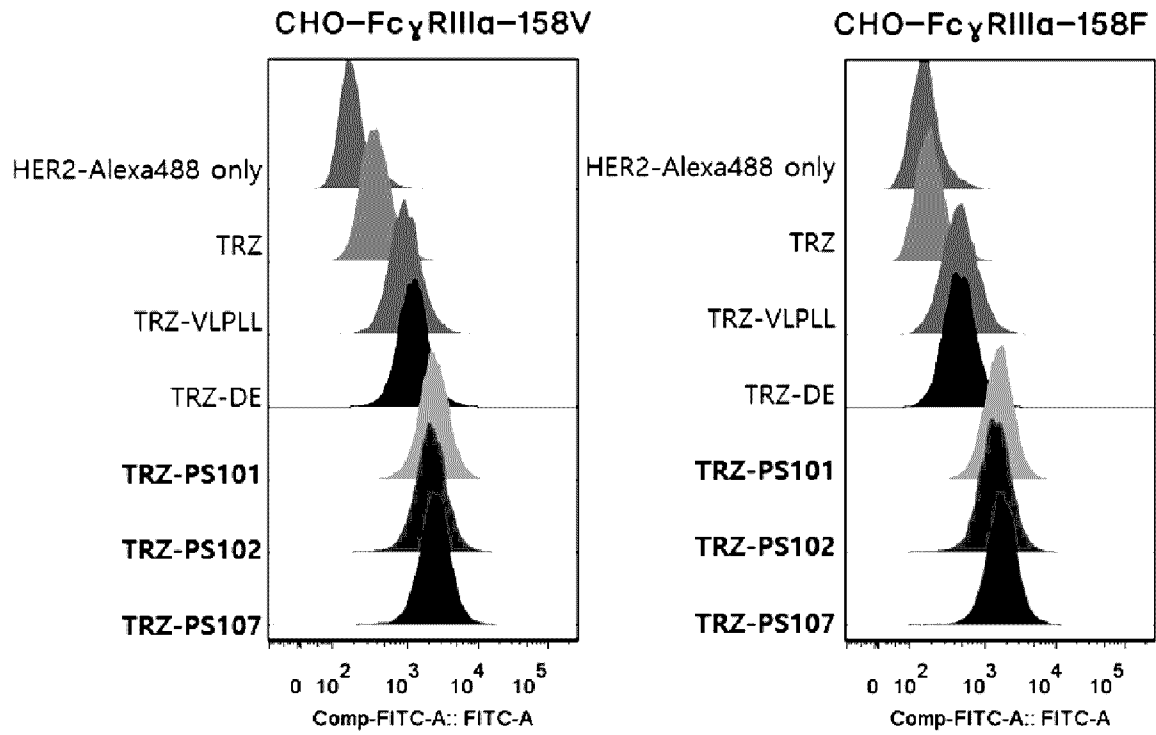
[도12]



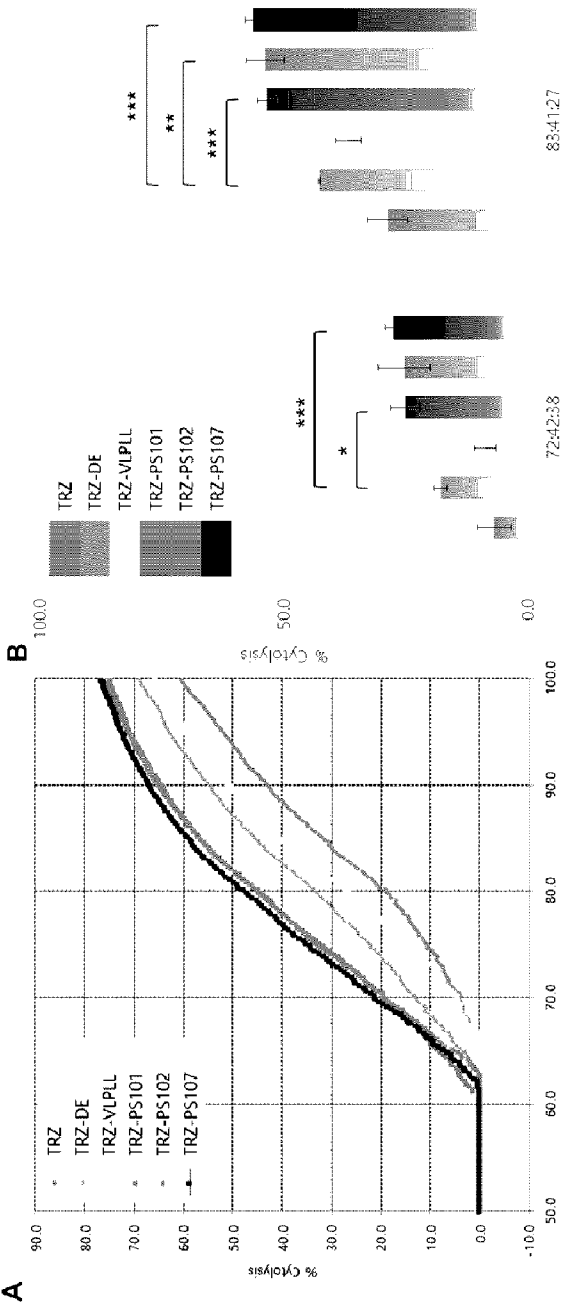
[도13]



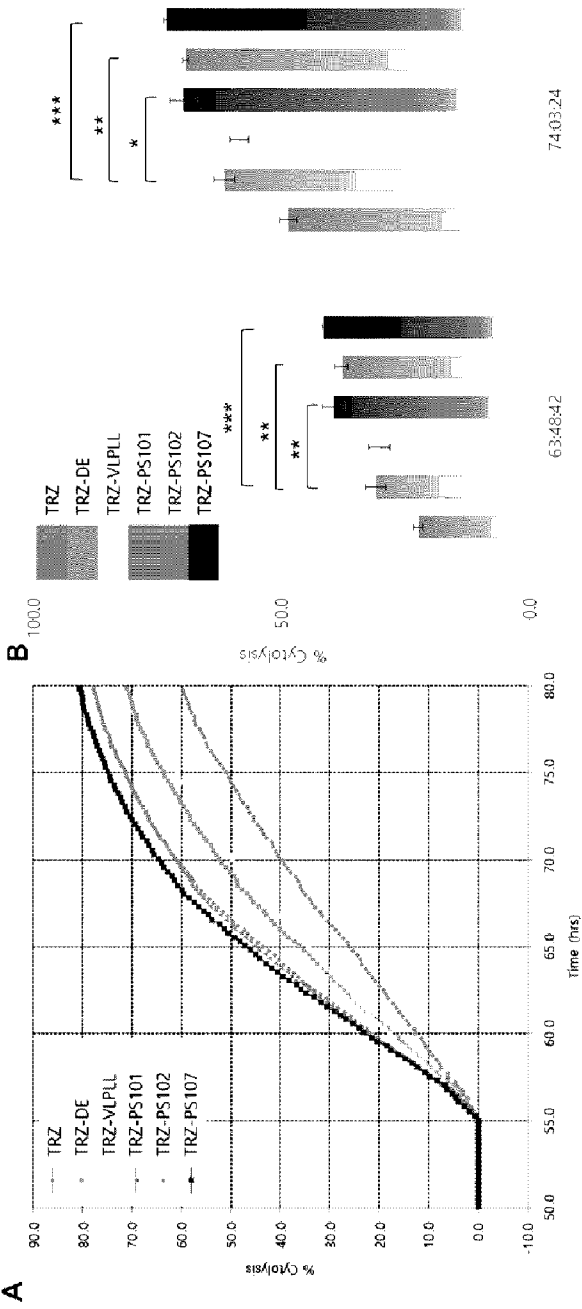
[도14]



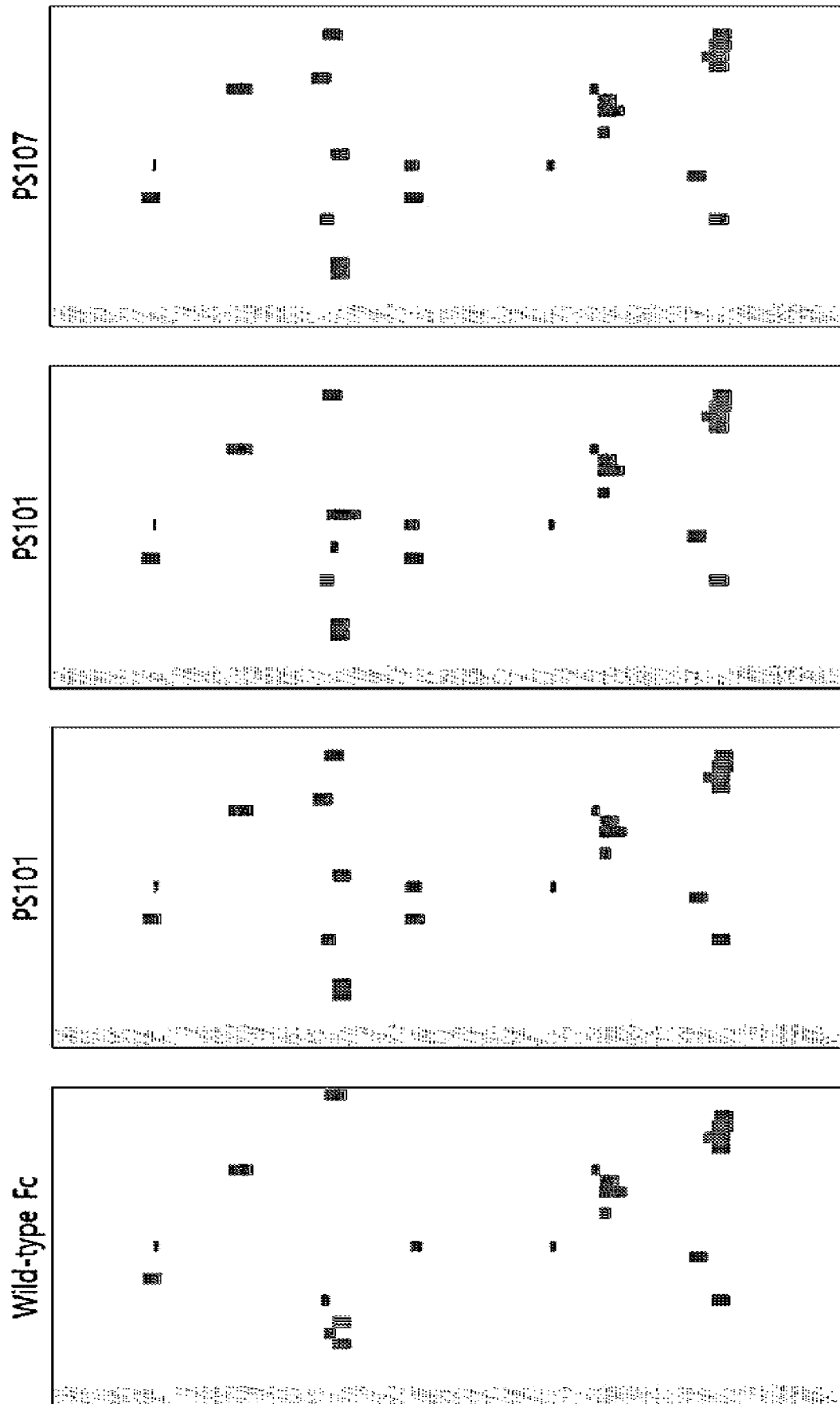
[도15]



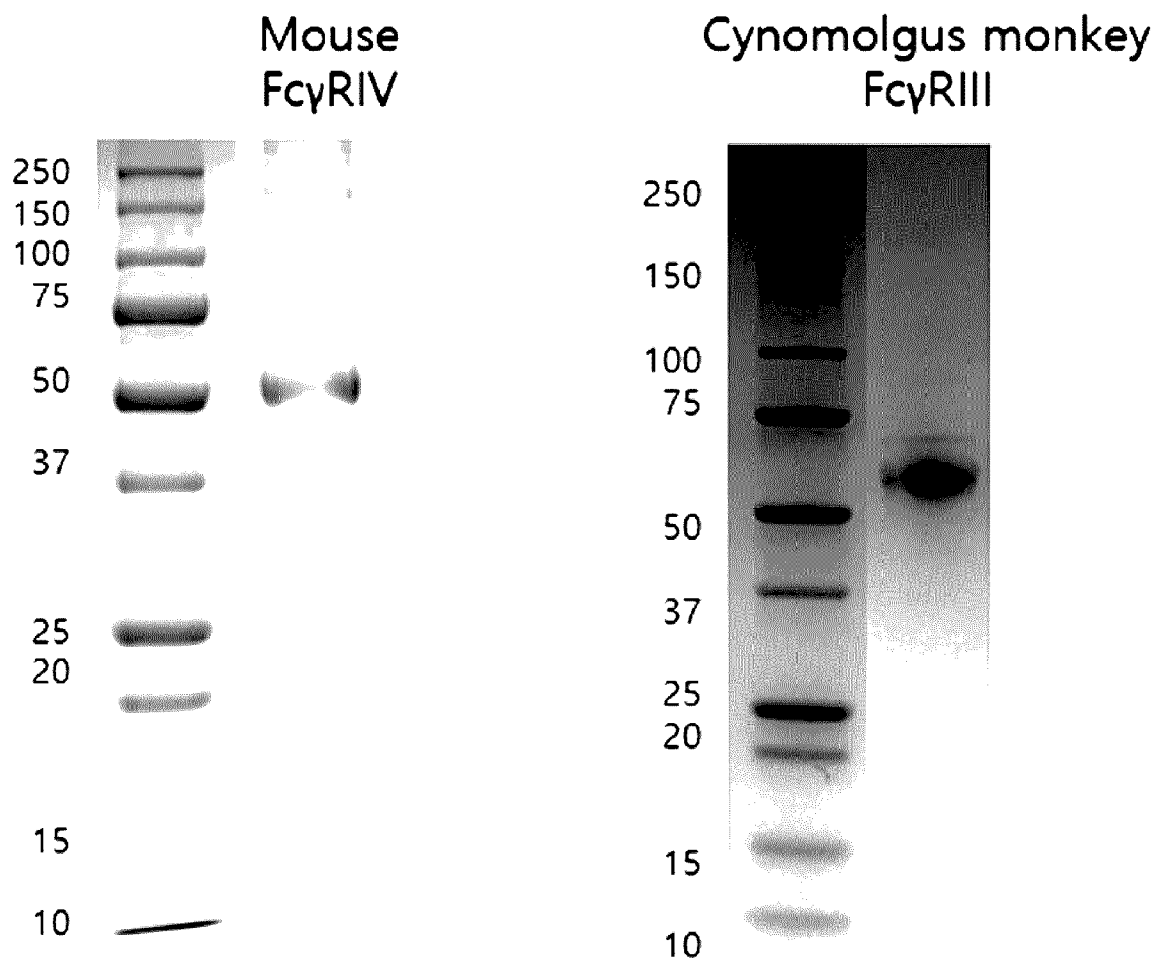
[도16]



[도17]

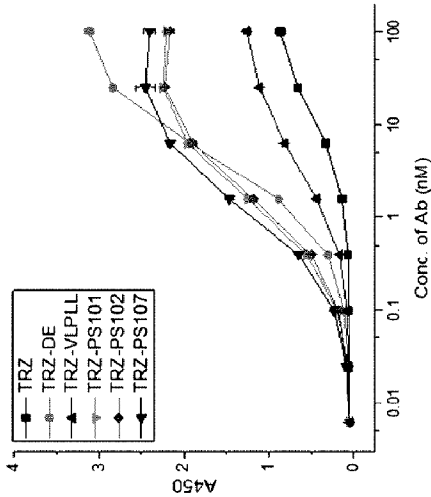


[도18]

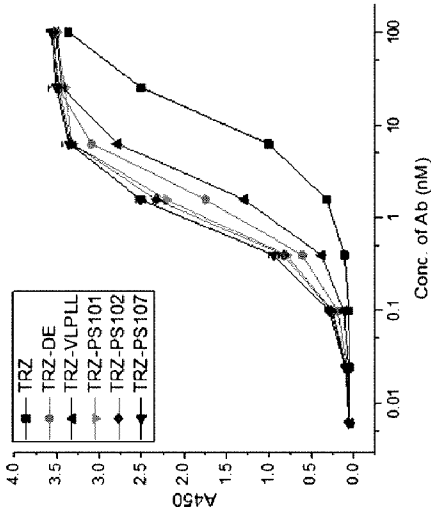


[도19]

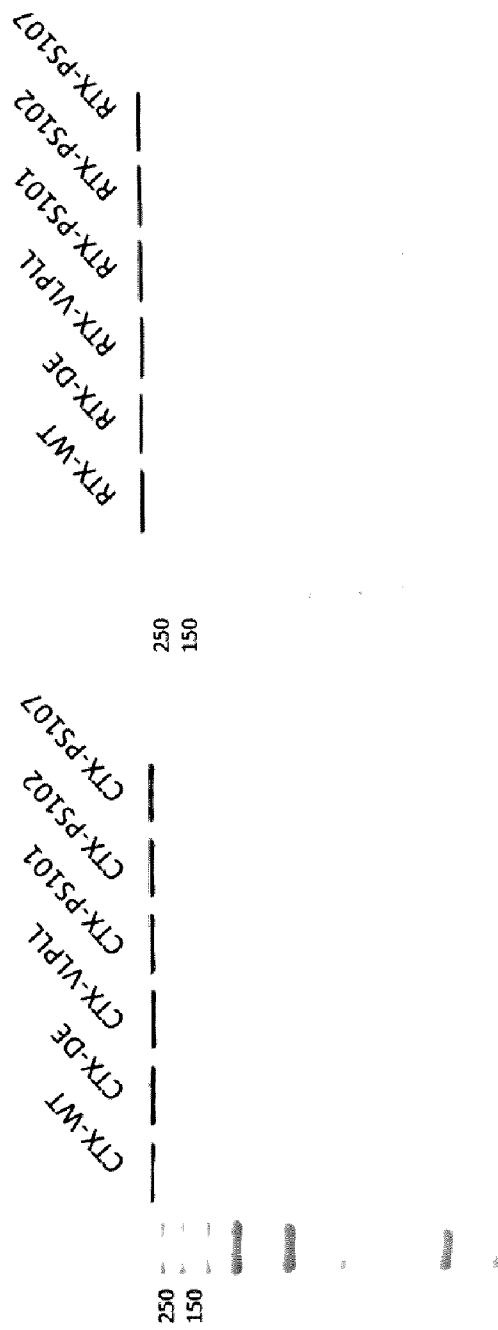
Cynomolgus monkey FcγRIII



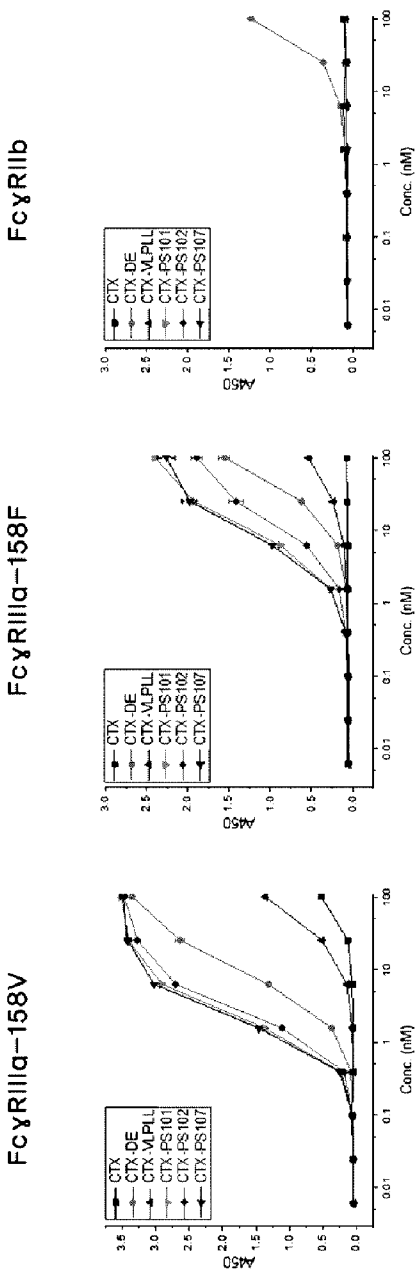
Mouse FcγRIV



[도20]

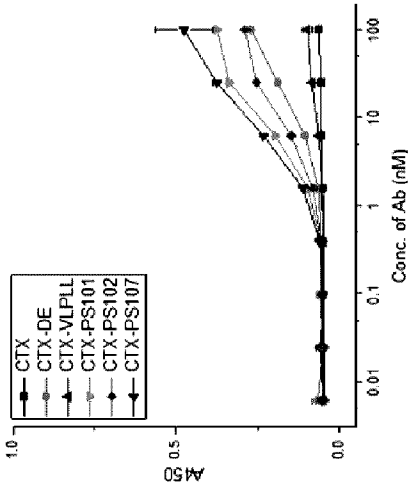


[표 21]

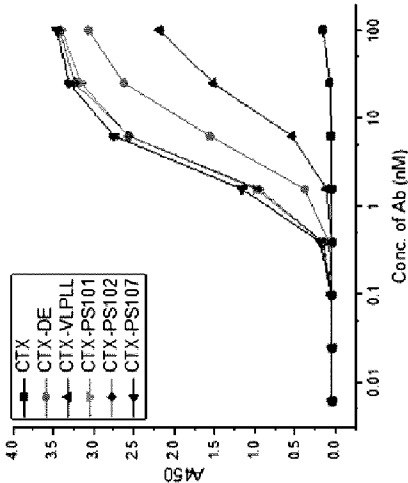


[도22]

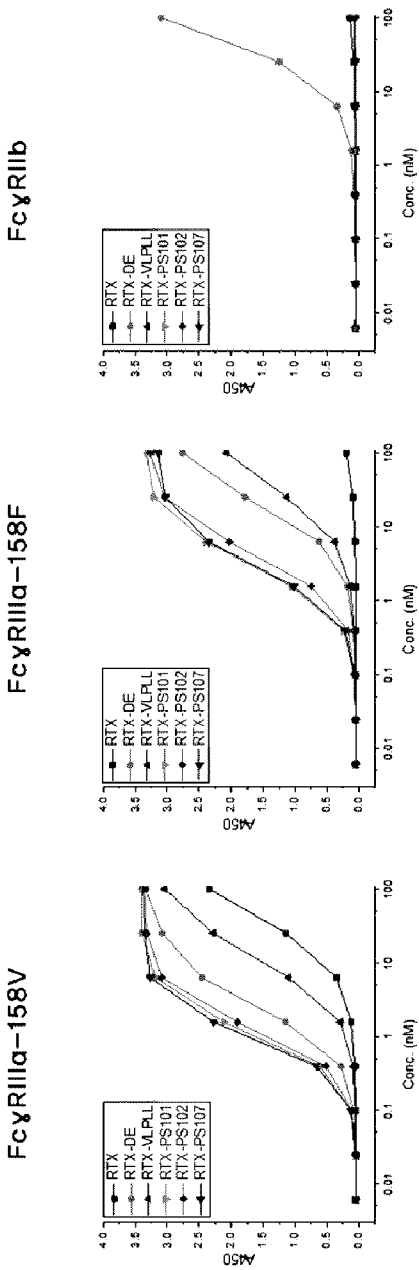
Cynomolgus monkey FcγRIII



Mouse FcγRIV

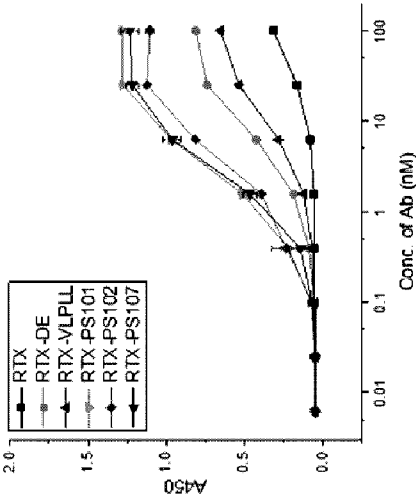


[도23]

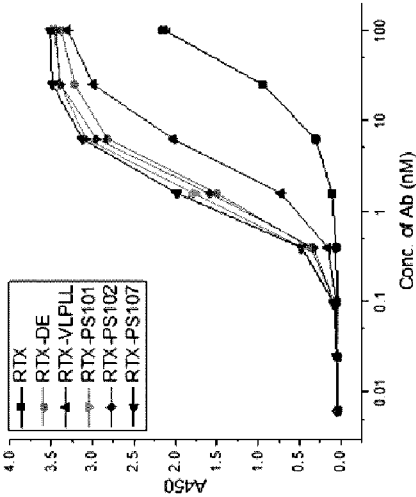


[도24]

Cynomolgus monkey FcγRIII



Mouse FcγRIV



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/013476

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/28(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 16/28(2006.01); A61K 39/395(2006.01); A61P 35/04(2006.01); C07K 16/00(2006.01); C07K 16/32(2006.01); C12P 21/08(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: 인간 항체 Fc 도메인(human antibody Fc domain), 카바트 넘버링 시스템(kabat numbering system), 아미노산 서열(amino acid), 치환(substitution), 변이체(variant), FcγRIIIa, FcγRIIb, 결합력(affinity), ADCC, H224R, F243L, P247L, R292P, Y300L, V303I, V305I, A330L, I332E, A339Q, D356G, P387Q		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021-041715 A2 (UNIVERSITY OF KANSAS et al.) 04 March 2021 (2021-03-04) See abstract, claims 1-2, 25, 33-35 and 45-46, and paragraphs [0015], [0018]-[0020], [0052], [0119], [0138]-[0139] and [0208].	1-2,9-10,12-16,19-20
Y		17-18
A		3-5,11
X	KR 10-2001-0102976 A (GENENTECH, INC.) 17 November 2001 (2001-11-17) See abstract, claims 1, 5-7, 11, 14, 31, 36 and 38-43, and pages 2, 5-6, 11, 14-15 and 41.	1,6-10,12-16,20
Y		17-18
A	US 7317091 B2 (LAZAR, G. A. et al.) 08 January 2008 (2008-01-08) See entire document.	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 27 December 2022		Date of mailing of the international search report 27 December 2022
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/013476**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010-0322924 A1 (JOHNSON, L. S. et al.) 23 December 2010 (2010-12-23) See entire document.	1-20
A	KR 10-2018-0113717 A (KOOKMIN UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION et al.) 17 October 2018 (2018-10-17) See entire document.	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/013476

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/KR2022/013476

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

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

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

Claim 21 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method (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/KR2022/013476

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2021-041715	A2	04 March 2021	US	2022-0306735	A1	29 September 2022
				WO	2021-041715	A3	15 April 2021
KR	10-2001-0102976	A	17 November 2001	CN	1343221	A	03 April 2002
				CN	1763097	A	26 April 2006
				CN	1763097	B	13 April 2011
				EP	1141024	A2	10 October 2001
				EP	1141024	B1	08 August 2018
				EP	2364997	A2	14 September 2011
				EP	2364997	A3	04 July 2012
				EP	2366713	A2	21 September 2011
				EP	2366713	A3	27 June 2012
				EP	2386574	A2	16 November 2011
				EP	2386574	A3	27 June 2012
				JP	2003-512019	A	02 April 2003
				JP	2010-227116	A	14 October 2010
				JP	2013-166770	A	29 August 2013
				JP	2016-136951	A	04 August 2016
				JP	5335735	B2	06 November 2013
				JP	6230257	B2	15 November 2017
				JP	6312092	B2	18 April 2018
				KR	10-0887482	B1	10 March 2009
				KR	10-0940380	B1	02 February 2010
				KR	10-1077001	B1	26 October 2011
				KR	10-1155191	B1	13 June 2012
				KR	10-2006-0067983	A	20 June 2006
				KR	10-2008-0090572	A	08 October 2008
				KR	10-2009-0078369	A	17 July 2009
				KR	10-2010-0045527	A	03 May 2010
				US	2004-0191244	A1	30 September 2004
				US	2004-0228856	A1	18 November 2004
				US	2005-0118174	A1	02 June 2005
				US	2005-0233382	A1	20 October 2005
				US	2006-0194290	A1	31 August 2006
				US	2006-0194291	A1	31 August 2006
				US	2006-0194957	A1	31 August 2006
				US	2007-0009523	A1	11 January 2007
				US	2008-0274105	A1	06 November 2008
				US	2008-0274108	A1	06 November 2008
				US	2008-0274506	A1	06 November 2008
				US	2010-0166749	A1	01 July 2010
				US	2011-0293632	A1	01 December 2011
				US	2012-0201813	A1	09 August 2012
				US	2012-0202224	A1	09 August 2012
				US	2014-0147436	A1	29 May 2014
				US	2014-0342404	A1	20 November 2014
				US	2016-0060330	A1	03 March 2016
				US	6737056	B1	18 May 2004
				US	7122637	B2	17 October 2006
				US	7183387	B1	27 February 2007
				US	7332581	B2	19 February 2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/013476

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				US	7335742	B2	26 February 2008
				US	7371826	B2	13 May 2008
				US	7416727	B2	26 August 2008
				US	7785791	B2	31 August 2010
				US	7790858	B2	07 September 2010
				US	8163882	B2	24 April 2012
				US	8674083	B2	18 March 2014
				WO	00-42072	A2	20 July 2000
				WO	00-42072	A3	30 November 2000
US	7317091	B2	08 January 2008	CN	101014619	A	08 August 2007
				CN	101014619	B	03 November 2010
				CN	101987870	A	23 March 2011
				CN	101987870	B	03 July 2013
				CN	101987871	A	23 March 2011
				CN	102292353	A	21 December 2011
				CN	102292353	B	29 April 2015
				CN	102633880	A	15 August 2012
				CN	102633880	B	25 February 2015
				CN	103172731	A	26 June 2013
				CN	103351434	A	16 October 2013
				CN	103351434	B	30 September 2015
				CN	104788565	A	22 July 2015
				CN	104961830	A	07 October 2015
				CN	104961830	B	07 September 2018
				CN	1705491	A	07 December 2005
				CN	1705491	B	29 May 2013
				CN	1755850	A	05 April 2006
				CN	1867583	A	22 November 2006
				CN	1867583	B	23 May 2012
				EP	1550167	A1	06 July 2005
				EP	1550167	B1	28 November 2007
				EP	1553975	A2	20 July 2005
				EP	1553975	B1	18 January 2012
				EP	1620467	A2	01 February 2006
				EP	1645902	A2	12 April 2006
				EP	1645902	A3	20 October 2010
				EP	1697520	A2	06 September 2006
				EP	1697741	A2	06 September 2006
				EP	1737890	A2	03 January 2007
				EP	1871808	A2	02 January 2008
				EP	1919950	A1	14 May 2008
				EP	1931709	A2	18 June 2008
				EP	1931709	B1	07 December 2016
				EP	1951757	A2	06 August 2008
				EP	1951757	B1	14 May 2014
				EP	2004695	A2	24 December 2008
				EP	2042517	A1	01 April 2009
				EP	2042517	B1	14 November 2012
				EP	2053062	A1	29 April 2009
				EP	2059536	A2	20 May 2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/013476

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		EP 2059536 B1	08 January 2014
		EP 2064240 A2	03 June 2009
		EP 2125893 A2	02 December 2009
		EP 2176298 A1	21 April 2010
		EP 2176298 B1	15 November 2017
		EP 2221315 A1	25 August 2010
		EP 2298805 A2	23 March 2011
		EP 2298805 A3	13 April 2011
		EP 2331578 A1	15 June 2011
		EP 2331578 B1	04 June 2014
		EP 2345671 A1	20 July 2011
		EP 2345671 B1	11 November 2015
		EP 2364996 A1	14 September 2011
		EP 2364996 B1	09 November 2016
		EP 2368911 A1	28 September 2011
		EP 2368911 B1	10 May 2017
		EP 2383297 A1	02 November 2011
		EP 2383297 B1	16 January 2013
		EP 2471813 A1	04 July 2012
		EP 2471813 B1	31 December 2014
		EP 2703415 A1	05 March 2014
		EP 2703415 B1	06 March 2019
		EP 2708557 A1	19 March 2014
		EP 2796469 A2	29 October 2014
		EP 2796469 A3	05 November 2014
		EP 2796469 B1	08 May 2019
		EP 2853545 A1	01 April 2015
		EP 2853545 B1	25 May 2016
		EP 2940043 A1	04 November 2015
		EP 2945969 A1	25 November 2015
		EP 3101030 A1	07 December 2016
		EP 3101030 B1	23 December 2020
		EP 3150630 A1	05 April 2017
		EP 3190128 A1	12 July 2017
		EP 3190128 B1	14 November 2018
		EP 3321282 A1	16 May 2018
		EP 3342782 A1	04 July 2018
		EP 3342782 B1	17 August 2022
		EP 3392273 A1	24 October 2018
		EP 3502133 A1	26 June 2019
		EP 3581588 A1	18 December 2019
		EP 3581588 B1	15 June 2022
		EP 3838920 A1	23 June 2021
		JP 2006-100821 A	13 April 2006
		JP 2006-504253 A	02 February 2006
		JP 2006-512407 A	13 April 2006
		JP 2007-512846 A	24 May 2007
		JP 2007-525443 A	06 September 2007
		JP 2008-147707 A	26 June 2008
		JP 2008-505174 A	21 February 2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/013476

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		JP 2008-537941 A	02 October 2008
		JP 2009-203237 A	10 September 2009
		JP 2009-209150 A	17 September 2009
		JP 2009-511495 A	19 March 2009
		JP 2010-500882 A	14 January 2010
		JP 2010-503732 A	04 February 2010
		JP 2010-514460 A	06 May 2010
		JP 2011-182798 A	22 September 2011
		JP 2011-188869 A	29 September 2011
		JP 2012-503007 A	02 February 2012
		JP 2013-177443 A	09 September 2013
		JP 2015-187185 A	29 October 2015
		JP 2015-221839 A	10 December 2015
		JP 4578467 B2	10 November 2010
		JP 4580340 B2	10 November 2010
		JP 4860703 B2	25 January 2012
		JP 5226613 B2	03 July 2013
		JP 5242502 B2	24 July 2013
		JP 5301611 B2	25 September 2013
		JP 5357778 B2	04 December 2013
		JP 5562031 B2	30 July 2014
		JP 5645747 B2	24 December 2014
		JP 5785493 B2	30 September 2015
		JP 5825756 B2	02 December 2015
		JP 6178819 B2	09 August 2017
		US 2004-0110226 A1	10 June 2004
		US 2004-0132101 A1	08 July 2004
		US 2005-0054832 A1	10 March 2005
		US 2006-0160996 A9	20 July 2006
		US 2007-0003546 A1	04 January 2007
		US 2007-0053901 A1	08 March 2007
		US 2007-0160597 A1	12 July 2007
		US 2007-0202098 A1	30 August 2007
		US 2007-0219133 A1	20 September 2007
		US 2007-0224189 A1	27 September 2007
		US 2007-0224192 A1	27 September 2007
		US 2008-0181890 A1	31 July 2008
		US 2008-0292621 A1	27 November 2008
		US 2009-0068175 A1	12 March 2009
		US 2009-0142340 A1	04 June 2009
		US 2009-0214526 A1	27 August 2009
		US 2013-0058919 A1	07 March 2013
		US 7662925 B2	16 February 2010
		US 8093357 B2	10 January 2012
		US 8124731 B2	28 February 2012
		US 8734791 B2	27 May 2014
US 2010-0322924 A1	23 December 2010	CA 2660592 A1	04 September 2008
		CA 2660592 C	12 July 2016
		EP 2021029 A2	11 February 2009
		EP 2021029 B1	11 June 2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/013476

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				US	2008-0044417	A1	21 February 2008
				US	2012-0269811	A1	25 October 2012
				US	7786270	B2	31 August 2010
				US	8216579	B2	10 July 2012
				WO	2008-105886	A2	04 September 2008
				WO	2008-105886	A3	05 March 2009
KR	10-2018-0113717	A	17 October 2018	CN	110691796	A	14 January 2020
				EP	3608339	A1	12 February 2020
				JP	2020-516310	A	11 June 2020
				JP	2021-065242	A	30 April 2021
				JP	2022-159401	A	17 October 2022
				KR	10-1792191	B1	31 October 2017
				KR	10-1792205	B1	31 October 2017
				KR	10-1913743	B1	01 November 2018
				KR	10-1924485	B1	04 December 2018
				KR	10-1957431	B1	12 March 2019
				US	2020-0223938	A1	16 July 2020
				WO	2018-186717	A1	11 October 2018

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 16/28(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 16/28(2006.01); A61K 39/395(2006.01); A61P 35/04(2006.01); C07K 16/00(2006.01); C07K 16/32(2006.01); C12P 21/08(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: 인간 항체 Fc 도메인(human antibody Fc domain), 카뎀 넘버링 시스템(kabat numbering system), 아미노산 서열(amino acid), 치환(substitution), 변이체(variant), FcγRIIIa, FcγRIIIb, 결합력(affinity), ADCC, H224R, F243L, P247I, R292P, Y300L, V303I, V305I, A330L, I332E, A339Q, D356G, P387Q		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2021-041715 A2 (UNIVERSITY OF KANSAS 등) 2021.03.04 요약, 청구항 1-2, 25, 33-35, 45-46, 단락 [0015], [0018]-[0020], [0052], [0119], [0138]-[0139], [0208]	1-2,9-10,12-16,19-20
Y		17-18
A		3-5,11
X	KR 10-2001-0102976 A (제넨테크, 인크.) 2001.11.17 요약, 청구항 1, 5-7, 11, 14, 31, 36, 38-43, 페이지 2, 5-6, 11, 14-15, 41	1,6-10,12-16,20
Y		17-18
A	US 7317091 B2 (LAZAR, G. A. 등) 2008.01.08 전체 문헌	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 2022년12월27일(27.12.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년12월27일(27.12.2022)
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

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2010-0322924 A1 (JOHNSON, L. S. 등) 2010.12.23 전체 문헌	1-20
A	KR 10-2018-0113717 A (국민대학교 산학협력단 등) 2018.10.17 전체 문헌	1-20

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: **21**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 21은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 관한 것입니다(PCT 17조(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 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2021-041715 A2	2021/03/04	US 2022-0306735 A1	2022/09/29
		WO 2021-041715 A3	2021/04/15
KR 10-2001-0102976 A	2001/11/17	CN 1343221 A	2002/04/03
		CN 1763097 A	2006/04/26
		CN 1763097 B	2011/04/13
		EP 1141024 A2	2001/10/10
		EP 1141024 B1	2018/08/08
		EP 2364997 A2	2011/09/14
		EP 2364997 A3	2012/07/04
		EP 2366713 A2	2011/09/21
		EP 2366713 A3	2012/06/27
		EP 2386574 A2	2011/11/16
		EP 2386574 A3	2012/06/27
		JP 2003-512019 A	2003/04/02
		JP 2010-227116 A	2010/10/14
		JP 2013-166770 A	2013/08/29
		JP 2016-136951 A	2016/08/04
		JP 5335735 B2	2013/11/06
		JP 6230257 B2	2017/11/15
		JP 6312092 B2	2018/04/18
		KR 10-0887482 B1	2009/03/10
		KR 10-0940380 B1	2010/02/02
		KR 10-1077001 B1	2011/10/26
		KR 10-1155191 B1	2012/06/13
		KR 10-2006-0067983 A	2006/06/20
		KR 10-2008-0090572 A	2008/10/08
		KR 10-2009-0078369 A	2009/07/17
		KR 10-2010-0045527 A	2010/05/03
		US 2004-0191244 A1	2004/09/30
		US 2004-0228856 A1	2004/11/18
		US 2005-0118174 A1	2005/06/02
		US 2005-0233382 A1	2005/10/20
		US 2006-0194290 A1	2006/08/31
		US 2006-0194291 A1	2006/08/31
		US 2006-0194957 A1	2006/08/31
		US 2007-0009523 A1	2007/01/11
		US 2008-0274105 A1	2008/11/06
		US 2008-0274108 A1	2008/11/06
		US 2008-0274506 A1	2008/11/06
		US 2010-0166749 A1	2010/07/01
		US 2011-0293632 A1	2011/12/01
		US 2012-0201813 A1	2012/08/09
		US 2012-0202224 A1	2012/08/09
		US 2014-0147436 A1	2014/05/29
		US 2014-0342404 A1	2014/11/20
		US 2016-0060330 A1	2016/03/03
		US 6737056 B1	2004/05/18
		US 7122637 B2	2006/10/17
		US 7183387 B1	2007/02/27
		US 7332581 B2	2008/02/19

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 7335742 B2	2008/02/26
		US 7371826 B2	2008/05/13
		US 7416727 B2	2008/08/26
		US 7785791 B2	2010/08/31
		US 7790858 B2	2010/09/07
		US 8163882 B2	2012/04/24
		US 8674083 B2	2014/03/18
		WO 00-42072 A2	2000/07/20
		WO 00-42072 A3	2000/11/30
US 7317091 B2	2008/01/08	CN 101014619 A	2007/08/08
		CN 101014619 B	2010/11/03
		CN 101987870 A	2011/03/23
		CN 101987870 B	2013/07/03
		CN 101987871 A	2011/03/23
		CN 102292353 A	2011/12/21
		CN 102292353 B	2015/04/29
		CN 102633880 A	2012/08/15
		CN 102633880 B	2015/02/25
		CN 103172731 A	2013/06/26
		CN 103351434 A	2013/10/16
		CN 103351434 B	2015/09/30
		CN 104788565 A	2015/07/22
		CN 104961830 A	2015/10/07
		CN 104961830 B	2018/09/07
		CN 1705491 A	2005/12/07
		CN 1705491 B	2013/05/29
		CN 1755850 A	2006/04/05
		CN 1867583 A	2006/11/22
		CN 1867583 B	2012/05/23
		EP 1550167 A1	2005/07/06
		EP 1550167 B1	2007/11/28
		EP 1553975 A2	2005/07/20
		EP 1553975 B1	2012/01/18
		EP 1620467 A2	2006/02/01
		EP 1645902 A2	2006/04/12
		EP 1645902 A3	2010/10/20
		EP 1697520 A2	2006/09/06
		EP 1697741 A2	2006/09/06
		EP 1737890 A2	2007/01/03
		EP 1871808 A2	2008/01/02
		EP 1919950 A1	2008/05/14
		EP 1931709 A2	2008/06/18
		EP 1931709 B1	2016/12/07
		EP 1951757 A2	2008/08/06
		EP 1951757 B1	2014/05/14
		EP 2004695 A2	2008/12/24
		EP 2042517 A1	2009/04/01
		EP 2042517 B1	2012/11/14
		EP 2053062 A1	2009/04/29
		EP 2059536 A2	2009/05/20

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		EP 2059536 B1	2014/01/08
		EP 2064240 A2	2009/06/03
		EP 2125893 A2	2009/12/02
		EP 2176298 A1	2010/04/21
		EP 2176298 B1	2017/11/15
		EP 2221315 A1	2010/08/25
		EP 2298805 A2	2011/03/23
		EP 2298805 A3	2011/04/13
		EP 2331578 A1	2011/06/15
		EP 2331578 B1	2014/06/04
		EP 2345671 A1	2011/07/20
		EP 2345671 B1	2015/11/11
		EP 2364996 A1	2011/09/14
		EP 2364996 B1	2016/11/09
		EP 2368911 A1	2011/09/28
		EP 2368911 B1	2017/05/10
		EP 2383297 A1	2011/11/02
		EP 2383297 B1	2013/01/16
		EP 2471813 A1	2012/07/04
		EP 2471813 B1	2014/12/31
		EP 2703415 A1	2014/03/05
		EP 2703415 B1	2019/03/06
		EP 2708557 A1	2014/03/19
		EP 2796469 A2	2014/10/29
		EP 2796469 A3	2014/11/05
		EP 2796469 B1	2019/05/08
		EP 2853545 A1	2015/04/01
		EP 2853545 B1	2016/05/25
		EP 2940043 A1	2015/11/04
		EP 2945969 A1	2015/11/25
		EP 3101030 A1	2016/12/07
		EP 3101030 B1	2020/12/23
		EP 3150630 A1	2017/04/05
		EP 3190128 A1	2017/07/12
		EP 3190128 B1	2018/11/14
		EP 3321282 A1	2018/05/16
		EP 3342782 A1	2018/07/04
		EP 3342782 B1	2022/08/17
		EP 3392273 A1	2018/10/24
		EP 3502133 A1	2019/06/26
		EP 3581588 A1	2019/12/18
		EP 3581588 B1	2022/06/15
		EP 3838920 A1	2021/06/23
		JP 2006-100821 A	2006/04/13
		JP 2006-504253 A	2006/02/02
		JP 2006-512407 A	2006/04/13
		JP 2007-512846 A	2007/05/24
		JP 2007-525443 A	2007/09/06
		JP 2008-147707 A	2008/06/26
		JP 2008-505174 A	2008/02/21

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		JP 2008-537941 A	2008/10/02
		JP 2009-203237 A	2009/09/10
		JP 2009-209150 A	2009/09/17
		JP 2009-511495 A	2009/03/19
		JP 2010-500882 A	2010/01/14
		JP 2010-503732 A	2010/02/04
		JP 2010-514460 A	2010/05/06
		JP 2011-182798 A	2011/09/22
		JP 2011-188869 A	2011/09/29
		JP 2012-503007 A	2012/02/02
		JP 2013-177443 A	2013/09/09
		JP 2015-187185 A	2015/10/29
		JP 2015-221839 A	2015/12/10
		JP 4578467 B2	2010/11/10
		JP 4580340 B2	2010/11/10
		JP 4860703 B2	2012/01/25
		JP 5226613 B2	2013/07/03
		JP 5242502 B2	2013/07/24
		JP 5301611 B2	2013/09/25
		JP 5357778 B2	2013/12/04
		JP 5562031 B2	2014/07/30
		JP 5645747 B2	2014/12/24
		JP 5785493 B2	2015/09/30
		JP 5825756 B2	2015/12/02
		JP 6178819 B2	2017/08/09
		US 2004-0110226 A1	2004/06/10
		US 2004-0132101 A1	2004/07/08
		US 2005-0054832 A1	2005/03/10
		US 2006-0160996 A9	2006/07/20
		US 2007-0003546 A1	2007/01/04
		US 2007-0053901 A1	2007/03/08
		US 2007-0160597 A1	2007/07/12
		US 2007-0202098 A1	2007/08/30
		US 2007-0219133 A1	2007/09/20
		US 2007-0224189 A1	2007/09/27
		US 2007-0224192 A1	2007/09/27
		US 2008-0181890 A1	2008/07/31
		US 2008-0292621 A1	2008/11/27
		US 2009-0068175 A1	2009/03/12
		US 2009-0142340 A1	2009/06/04
		US 2009-0214526 A1	2009/08/27
		US 2013-0058919 A1	2013/03/07
		US 7662925 B2	2010/02/16
		US 8093357 B2	2012/01/10
		US 8124731 B2	2012/02/28
		US 8734791 B2	2014/05/27
US 2010-0322924 A1	2010/12/23	CA 2660592 A1	2008/09/04
		CA 2660592 C	2016/07/12
		EP 2021029 A2	2009/02/11
		EP 2021029 B1	2014/06/11

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 2008-0044417 A1	2008/02/21
		US 2012-0269811 A1	2012/10/25
		US 7786270 B2	2010/08/31
		US 8216579 B2	2012/07/10
		WO 2008-105886 A2	2008/09/04
		WO 2008-105886 A3	2009/03/05
KR 10-2018-0113717 A	2018/10/17	CN 110691796 A	2020/01/14
		EP 3608339 A1	2020/02/12
		JP 2020-516310 A	2020/06/11
		JP 2021-065242 A	2021/04/30
		JP 2022-159401 A	2022/10/17
		KR 10-1792191 B1	2017/10/31
		KR 10-1792205 B1	2017/10/31
		KR 10-1913743 B1	2018/11/01
		KR 10-1924485 B1	2018/12/04
		KR 10-1957431 B1	2019/03/12
		US 2020-0223938 A1	2020/07/16
		WO 2018-186717 A1	2018/10/11