

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024년 1월 4일 (04.01.2024)



(10) 국제공개번호

WO 2024/005422 A1

(51) 국제특허분류:

C07K 14/705 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/008393

(22) 국제출원일:

2023년 6월 16일 (16.06.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0079826 2022년 6월 29일 (29.06.2022) 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). 김보미 (KIM, Bo-Mi); 02477 서울특별시 동대문구 안암로 84-14, 201호, Seoul (KR). 하지연 (HA, Ji Yeon); 05401 서울특별시 강동구 성내로 80, 103동 1304호, 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, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

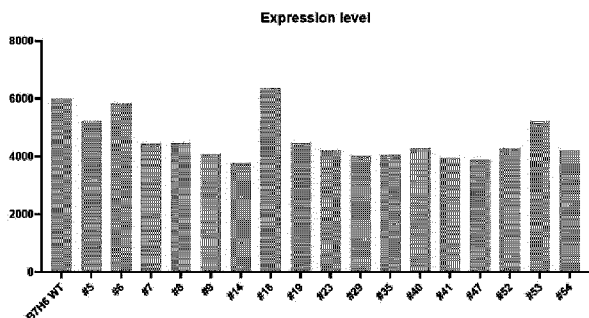
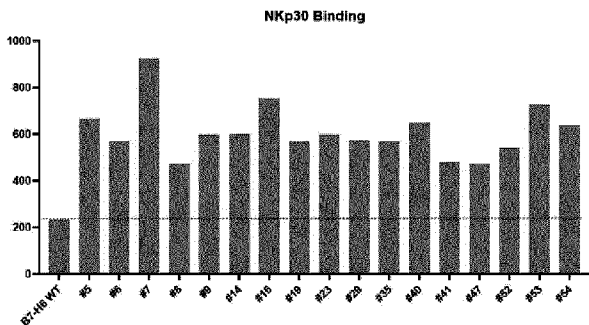
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: B7-H6 VARIANTS WITH IMPROVED BINDING AFFINITY FOR NKP30

(54) 발명의 명칭: NKP30 결합력이 향상된 B7-H6 변이체



(57) Abstract: The present invention relates to B7-H6 variants with improved binding affinity for NKP30. The B7-H6 variants of the present invention can increase the activation of natural killer (NK) cells due to significantly increased binding affinity for NKP30, which is an activating receptor of NK cells, compared to wild type, are easy to penetrate the tumor microenvironment due to having a much smaller size than antibodies, and are easily produced, and thus can be effectively used alone or in combination with various immunotherapeutic agents to treat cancer or infectious diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 NKP30에 대한 결합력이 향상된 B7-H6 변이체들에 관한 것으로, 본 발명의 B7-H6 변이체는 자연살해세포(NK cell)의 활성화 수용체인 NKP30에 대한 결합력이 야생형에 비해 현저히 증가하여 자연살해세포 활성화를 증가시킬 수 있고, 크기가 항체에 비해 현저히 작아 종양 미세환경으로의 침투가 용이하고, 생산이 쉬우므로, 단독 또는 다양한 면역 치료제와 융합하여 암 치료 또는 감염성 질환의 치료에 유용하게 사용할 수 있다.



WO 2024/005422 A1

명세서

발명의 명칭: NKP30 결합력이 향상된 B7-H6 변이체

기술분야

- [1] 본 발명은 NKp30에 대한 결합력이 향상된 B7-H6 변이체들에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 암 치료를 위한 의약품은 크게 저분자 의약품과 고분자 의약품으로 나뉘며 특이성이 없어 부작용이 상대적으로 큰 저분자 의약품에 비해 특이성이 있는 고분자 의약품이 치료제로서 각광을 받고 있다. 암세포들은 면역세포들에 의한 살상 작용기작을 회피하기 위해 정상세포들이 면역세포 활성화를 억제할 때 이용되는 면역관문(immune checkpoint) 단백질을 세포 표면에 발현하고 있어, 최근 암을 치료하기 위한 방법으로써 면역관문 억제 단백질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 면역관문억제제에 대한 반응을 보이는 환자는 치료과정에서의 부작용도 적고, 다양한 암종들에 대해 기존 항암제에 비해 우수한 치료 효과들이 보고되면서 이용이 폭발적으로 증가하고 있지만, 여전히 절반 이상의 환자들은 임상 허가된 면역관문억제제들에 반응을 보이지 않으며, 일부 초기 반응자들도 치료 후 다시 암이 진행되는 내성이 관측되고 있다. 면역관문억제제에 대한 내성 원인은 환자별 종양면역학적 특성에 따라 다르기 때문에 효과적인 치료와 의료비용 절감을 위해 치료적합 환자 선별이 가능한 새로운 바이오마커가 필요하며, 많은 전임상 및 임상 연구사례들에서 면역자극 약물을 이용한 병용 치료법이 환자의 반응률을 향상시킨다는 것이 보고되고 있어 효과적인 면역자극 치료제 또한 절실히 필요하다. 그러나, 항체는 분자량 150,000의 거대 분자 단백질이기 때문에 암 조직 내부로 침투가 어려운 단점이 존재한다. 이에, 보다 효과적인 치료를 위해서 항체보다 크기가 훨씬 작으면서 암 조직 내부로 침투가 용이하고 낮은 반응률을 극복하기 위해 새로운 면역관문 (immune checkpoint) 단백질을 표적으로 하는 단백질 치료제의 필요성이 대두되고 있다.

- [3] 면역세포에는 자신을 억제와 활성화하는데 이용되는 면역관문 (immune checkpoint) 단백질을 세포 표면에 발현하고 있다. 다양한 면역관문(immune checkpoint) 수용체들 중에서 B7-H6가 NK 세포 (Natural killer cell) 표면에 발현된 활성화 수용체인 NKp30에 결합을 하여 NK 세포가 활성화되는 것이 확인되었다. NK 세포는 선천면역세포로 특정한 항원 없이도 암세포 및 바이러스 감염 세포를 감지하고 제거하고, 다른 면역세포의 활성을 유도하여 면역반응과 염증반응을 조절하며, 암 세포의 증식과 재발, 전이를 억제하나, 이를 활성화 시키는 야생형 B7-H6은 NKp30에 매우 낮은 친화도 (평형해리상수 = $\sim 1.0 \mu\text{M}$)로 결합하기 때문에 이의 활용이 어려운 문제점이 있어 왔다. 따라서, 기존의 면역관문 억제 치료제가 가지고 있는 낮은 반응률을 극복하고 특정한 항원이 없이도 암세포 및 바이러스 감염 세포를 인지하고 제거하는 NK 세포의 효과적인 면역관문 활성화를 유

도하기 위해 활성화 수용체인 NKp30와의 결합력을 증가시킨 B7-H6 변이체의 발굴이 매우 필요한 실정이다.

- [4] 한편, 세포치료제는 손상되었거나 질병이 있는 세포/조직을 회복시키기 위해 살아있는 세포를 사용해 재생을 유도하는 의약품으로서, 자가, 동종, 이종 세포를 체외에서 배양·증식하거나 선별하는 등 물리적, 화학적, 생물학적 방법으로 조작하여 제조하는 의약품을 말한다. 그 중에서, 면역조절 세포치료제란 수지상 세포(dendritic cell), 자연 살해 세포(natural killer cell), T 세포 등 면역세포를 이용하여 체내의 면역반응을 활성화시켜 질병을 치료할 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다. 현재, 면역조절 세포치료제는 주로 암 치료를 적응증으로 개발되고 있으며, 환자에게 직접 면역세포를 투여하여 면역 기능을 활성화하여, 치료 효과를 얻기 때문에 기존의 암 치료에 이용되는 수술 요법, 항암제나 방사선 치료와는 차별화되는 치료 기전 및 효능으로, 향후 바이오 신약의 주요한 부분을 차지할 것으로 예상되는 분야이다. 면역조절 세포치료제의 종류에 따라서 세포에 도입하는 항원의 물리·화학적 특징이 서로 다르고, 면역 세포에 외래 유전자가 바이러스 벡터 등으로 도입되는 경우 세포치료제이자 유전자치료제라는 두 가지 모두의 특징을 가지게 된다. 면역조절 세포치료제는 채집(apheresis)를 통해 환자로부터 분리한 PBMC(peripheral blood mononuclear cell), T 세포, 자연살해 세포(NK 세포) 등 다양한 면역세포를 다양한 항체 및 사이토카인으로 활성화시킨 뒤, 이를 체외에서 증식시켜 다시 환자에게 주입하거나, TCR (T-Cell Receptor) 이나 CAR (Chimeric Antigen Receptor) 등의 유전자를 도입한 면역세포를 환자에게 다시 주입하는 방식으로 이루어지며, 특히, 대량 생산 및 동결이 가능한 자연살해세포를 이용한 면역치료법이 연구되고 있다. 자연살해세포는 말초혈 림프구(peripheral blood lymphocyte)의 약 15% 정도를 차지하는 림프구계 세포로서, 선천성 면역반응에 중요한 역할을 한다. 자연살해세포는 수지상세포를 활성화시키고 세포독성 T 임파구(cytotoxic T lymphocyte, CTL)를 종양에 특이적으로 반응하도록 유도하여 종양세포를 제거한다. 자연살해세포는 육종(sarcoma), 골수종(myeloma), 암종(carcinoma), 림프종(lymphomas) 및 백혈병(leukemia)과 같은 악성 종양을 직접적으로 사멸시킨다. 하지만, 정상인의 체내에 존재하는 대부분의 자연살해세포는 비활성화 상태로 존재하며, 종양을 제거하기 위해서는 활성화된 자연살해세포가 필요하다. 또한, 암환자의 체내에 존재하는 자연살해세포의 경우 암세포의 면역회피 기전에 의해 자연살해세포의 기능적 결함이 존재한다. 따라서, 자연살해세포를 치료제로서 이용하기 위해서는 자연살해세포를 활성화시키는 것이 매우 중요하다. 또한, 체내에 존재하는 자연살해세포의 세포수는 한정되어 있으므로, 정상인의 혈액 또는 환자의 혈액의 자연살해 세포를 대량으로 증식시키고 동결하는 기술의 개발이 필수적이다. 자연살해세포를 대량으로 증식시키기 위한 방법으로는 체외 확장 방법을 이용하고 있으며, 말초혈 림프구(peripheral blood lymphocyte, PBMC), 제대혈(cord blood, CB) 또는 사람유도 만능줄기세포(human-induced pluripotent stem cell)를 원료로 이용한 자연

살해세포의 대량 배양방법에 대해 연구되고 있다. 자연살해세포의 체외 확장 배양에는 PBMC, CD3⁺ 세포, CD3-CD56⁺ 세포, CD56⁺ 세포 등이 원료세포로 사용되며, 자연살해세포 증식 인자로 IL-2, IL-12, IL-15, IL-21 등의 사이토카인들과 LPS (Goodier et al., J. Immunol. 165(1):139-147, 2000), CD3을 자극하는 OKT-3 항체 (Condiotti et al., Experimental Hematol. 29(1):104-113, 2001)를 이용하고 있으나, 자연살해세포를 치료제로 상업화시키기 어려운 정도의 증식율을 가진다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명의 목적은 자연살해세포와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체를 제공하는 것이다.
- [6] 또한, 본 발명의 목적은 자연 살해 세포 활성화제를 제공하는 것이다.
- [7] 또한, 본 발명의 목적은 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 제공하는 것이다.
- [8] 또한, 본 발명의 목적은 암의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [9] 또한, 본 발명의 목적은 활성화된 자연살해세포의 생체외 증식 방법을 제공하는 것이다.
- [10] 또한, 본 발명의 목적은 B7-H6 변이체 또는 이를 포함하는 이중특이적 또는 다중특이적 항체의 암의 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.
- [11] 아울러, 본 발명의 목적은 암의 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [12] 상기 목적의 달성을 위해, 본 발명은 NKp30(Natural cytotoxicity triggering receptor 3)와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체를 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 상기 B7-H6 변이체를 포함하는 자연 살해 세포 활성화제를 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 상기 B7-H6 변이체 및 표적 항원에 결합하는 부분을 포함하는 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 상기 B7-H6 변이체, 또는 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 포함하는 암의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 활성화된 자연살해세포의 생체외 증식 방법을 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 상기 B7-H6 변이체, 또는 이중특이적 또는 다중특이적 항체의 암의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [18] 아울러, 본 발명은 상기 B7-H6 변이체, 또는 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 약학적으로 유효한 양으로 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [19] 본 발명의 B7-H6 변이체는 자연살해세포(NK cell)의 활성화 수용체인 NKp30에 대한 결합력이 야생형에 비해 현저히 증가하여 자연살해세포 활성화를 증가시

킬 수 있고, 크기가 항체에 비해 현저히 작아 종양 미세환경으로의 침투가 용이하고, 생산이 쉬우므로, 단독 또는 다양한 면역 치료제와 융합하여 암 치료 또는 감염성 질환의 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [20] 도 1은 NKp30-스트랩타비딘 단백질의 발현벡터 및 정제된 단백질의 SDS-PAGE 젤 사진을 나타낸 도이다.
- [21] 도 2는 B7-H6 디스플레이 방법 선택을 위한 유세포 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [22] 도 3은 구축된 이니셜 라이브러리의 아미노산 서열 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [23] 도 4는 유세포 분석기를 통한 스크리닝 진행 과정에 따른 NKp30 결합력이 향상된 클론들의 농축 검증 결과를 나타낸 도이다.
- [24] 도 5는 유세포 분석기를 통한 확보한 B7-H6 변이체들의 NKp30와의 결합력 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [25] 도 6은 정제된 B7-H6 변이체-Fc 융합 단백질들의 SDS-PAGE 젤 사진을 나타낸 도이다.
- [26] 도 7은 B7-H6 변이체-Fc 융합 단백질들의 NKp30 결합력을 ELISA로 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [27] 도 8은 구축된 B7-H6 focused 라이브러리의 아미노산 서열 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [28] 도 9는 스크리닝 진행에 따른 NKp30 친화도가 높은 B7-H6 변이체 클론들의 증폭을 유세포 분석기로 검증한 결과를 나타낸 도이다.
- [29] 도 10은 유세포 분석기를 이용한 B7-H6 변이체들의 NKp30와의 결합력 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [30] 도 11은 정제된 B7-H6 변이체-Fc 융합 단백질들의 SDS-PAGE 젤 사진을 나타낸 도이다.
- [31] 도 12는 본 발명의 B7-H6 변이체-Fc 융합 단백질들의 NKp30 결합력을 ELISA로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [32] 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.
- [33] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에

대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

- [34] 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.
- [35] 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:
- [36] 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.
- [37] 일 측면에서, 본 발명은 야생형(Wild type) B7-H6(B7 homolog 6, NCR3LG1)의 아미노산 서열 중 31번째, 32번째, 37번째, 40번째, 51번째, 53번째, 57번째, 60번째, 67번째, 86번째, 101번째, 102번째, 108번째, 114번째, 129번째, 136번째, 142번째 및 143번째 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산이 야생형의 아미노산과 다른 서열로 치환된, NKp30(Natural cytotoxicity triggering receptor 3)와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체 또는 이의 단편에 관한 것이다.
- [38] 일 구현예에서, 야생형 B7-H6의 아미노산은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 상기 아미노산 위치는 서열번호 1의 아미노산 서열을 기준으로 할 수 있다.
- [39] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 M31I, A32T, I37T, I37F, L40Q, F51I, F51S, F51L, F51Y, F51T, F51H, F51Q, F51K, F51R, S53G, N57D, S60I, S60Y, S60T, S60H, S60L, W67R, Q86L, K101E, S102C, S102R, R108M, L114M, L129M, Q136R, S142N 및 P143S로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [40] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 야생형 B7-H6의 전체 아미노산의 세포 외부에 노출된 영역인 세포외제성 도메인(ectodomain) 부위 (서열번호 2)의 아미노산 변이를 포함하는 변이체일 수 있다.
- [41] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 F51S 및 S60I를 포함하는 B5일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외제성 도메인 부위

(서열번호 3)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 4의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.

- [42] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 N57D를 포함하는 B6일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인 부위 (서열번호 5)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 6의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [43] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 K101E 및 S102R를 포함하는 B7일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인 부위 (서열번호 7)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 8의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [44] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 A32T 및 S60I를 포함하는 B8일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인 부위 (서열번호 9)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 10의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [45] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 A32T, L40Q 및 S60I를 포함하는 B9일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인 부위 (서열번호 11)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 12의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [46] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 F51L 및 S60I를 포함하는 B14일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인 부위 (서열번호 13)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 14의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [47] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 K101E를 포함하는 B16일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인 부위 (서열번호 15)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 16의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [48] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 A32T, W67R, Q86L, K101E 및 L129M를 포함하는 B19일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인 부위 (서열번호 17)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 18의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [49] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 S60I, L114M 및 S142N를 포함하는 B23일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인 부위 (서열번호 19)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 20의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [50] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 M31I, A32T, F51I, S60I, S102C 및 R108M를 포함하는 B29일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인 부위 (서열번호 21)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 22의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.

- [51] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 A32T, S60I, K101E 및 P143S를 포함하는 B35일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외 재성 도메인 부위 (서열번호 23)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 24의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [52] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 I37T, Q86L 및 K101E를 포함하는 B40일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인 부위 (서열번호 25)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 26의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [53] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 A32T, S53G, S60I 및 Q136R를 포함하는 B41일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인 부위 (서열번호 27)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 28의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [54] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 F51Y 및 S60I를 포함하는 B47일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인 부위 (서열번호 29)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 30의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [55] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 S60I 및 K101E를 포함하는 B52일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인 부위 (서열번호 31)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 32의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [56] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 A32T 및 K101E를 포함하는 B53일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인 부위 (서열번호 33)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 34의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [57] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 A32T, S60I 및 K101E를 포함하는 B54일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인 부위 (서열번호 35)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 36의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [58] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 F51H 및 S60I를 포함하는 BF2일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인 부위 (서열번호 37)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 38의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [59] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 F51I 및 S60Y를 포함하는 BF3일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인 부위 (서열번호 39)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 40의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [60] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 I37F, F51L 및 S60T를 포함하는 BF5일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인

부위 (서열번호 41)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 42의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.

- [61] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 F51T 및 S60T를 포함하는 BF8일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인 부위 (서열번호 43)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 44의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [62] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 F51L 및 S60H를 포함하는 BF11일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인 부위 (서열번호 45)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 46의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [63] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 F51T 및 S60Y를 포함하는 BF19일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인 부위 (서열번호 47)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 48의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [64] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 F51Q 및 S60H를 포함하는 BF25일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인 부위 (서열번호 49)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 50의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [65] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 F51K 및 S60L를 포함하는 BF39일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인 부위 (서열번호 51)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 52의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [66] 일 구현예에서, 본 발명의 B7-H6 변이체는 아미노산 치환 F51R 및 S60T를 포함하는 BF46일 수 있으며, 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인 부위 (서열번호 53)를 포함할 수 있고, 이는 서열번호 54의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [67] 본 발명에서 아미노산 치환 위치는 야생형 B7-H6의 전체 아미노산 (서열번호 1)을 기준으로 기재되었으나, 실제 변이 위치는 세포외재성 도메인 부위 (서열번호 2)에 존재하므로, 야생형 B7-H6의 전체 아미노산 기준으로 기재된 상기 위치가 상기 아미노산 치환을 포함하는 세포외재성 도메인 부위에서의 위치와 상이할 수 있다. 예를 들어, B5 변이체의 F51S 아미노산 치환은 서열번호 3의 아미노산을 기준으로 F27I이다.
- [68] 본 발명의 B7-H6 변이체는 야생형 B7-H6 단백질 (또는 펩타이드)에서 일부 아미노산 서열이 치환된 것을 말하며, 본 발명에서 사용된, 용어 "변이체"는 기준 물질과 비교하였을 때 최소한 한개의 아미노산 차이(치환, 삽입 또는 결손)를 포함하는 대응하는 아미노산 서열을 말한다. 특정 구체예들에 있어서 "변이체"는 기준 서열과 비교하였을 때 높은 아미노산 서열 상동성(homology) 및/또는 보존적 아미노산 치환, 결손 및/또는 삽입을 가진다. 또한, 본 발명에서 사용된, 용어

"B7-H6 변이체"는 이의 NKp30와의 결합 활성을 조절하기 위하여 하나 또는 그 이상의 아미노산에서 돌연변이된 B7-H6 변이체 단백질을 말한다.

- [69] 구체적으로, 본 발명의 B7-H6 변이체는 표준 합성 방법, 재조합 발현 시스템, 또는 임의의 다른 당해 분야의 방법에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 펩타이드들은, 예를 들어 하기를 포함하는 방법을 포함하는 다수의 방법으로 합성될 수 있다:
- [70] (a) 펩타이드를 고체상 또는 액체상 방법의 수단으로 단계적으로 또는 단편 조립에 의해 합성하고, 최종 펩타이드 생성물을 분리 및 정제하는 방법; 또는
- [71] (b) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물을 숙주세포 내에서 발현시키고, 발현 생성물을 숙주 세포 배양물로부터 회수하는 방법; 또는
- [72] (c) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물의 무세포 시험관 내 발현을 수행하고, 발현 생성물을 회수하는 방법; 또는
- [73] (a), (b) 및 (c)의 임의의 조합으로 펩타이드의 단편을 수득하고, 이어서 단편을 연결시켜 펩타이드를 수득하고, 당해 펩타이드를 회수하는 방법.
- [74] 보다 구체적인 예로, 유전자 조작을 통하여, 본 발명의 B7-H6 변이체를 코딩하는 유전자를 제조하고 이를 숙주 세포에 형질전환시킨 후, 발현하여 본 발명의 B7-H6 변이체를 생산할 수 있다.
- [75] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 B7-H6 변이체를 코딩하는 핵산분자, 이를 포함하는 벡터 및 상기 벡터를 포함하는 숙주세포에 관한 것이다.
- [76] 본 발명에서 사용되는 용어 "핵산분자"는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이며, 다르게 특별하게 언급되어 있지 않은 한 자연의 핵산 유사체를 포함한다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990)).
- [77] 본 발명에서 사용되는 용어 "벡터"는 숙주 세포에 삽입되어 숙주 세포 계통과 재조합되고 이에 삽입되거나, 또는 에피솜으로서 자발적으로 복제하는 컴피턴트 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 임의의 핵산을 의미한다. 이러한 벡터로는 선형 핵산, 플라스미드, 파지미드, 코스미드, RNA 벡터, 바이러스 벡터 등이 있다.
- [78] 본 발명에서 사용되는 용어 "숙주 세포"는 하나 이상의 DNA 또는 벡터가 도입되는 진핵 또는 원핵 세포를 가리키며, 특정 대상 세포만이 아니라 그 자손 혹은 잠재적 자손까지도 가리키는 것으로 이해되어야 한다. 어떤 변형이 돌연변이 혹은 환경적 영향 때문에 후속 세대에 일어날 수 있기 때문에 사실 상기 자손은 부모 세포와 동일하지는 않지만, 본 발명에서 사용된 바와 같이 상기 용어의 범주 내에서 여전히 포함된다.
- [79] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 B7-H6 변이체 또는 이의 단편을 포함하는 자연 살해 세포(natural killer cell, NK cell) 활성화제에 관한 것이다.
- [80] 일 구현예에서, 단편은 본 발명의 B7-H6 변이체의 세포외제성 도메인(ectodomain) 부위일 수 있다.

- [81] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 B7-H6 변이체를 포함하는, 자연 살해 세포 세포 검출용 조성물에 관한 것이다.
- [82] 일 구현예에서, 상기 조성물은 자연 살해 세포의 표면에 발현되는 NKp30 단백질을 검출 및 정량할 수 있다.
- [83] 일 구현예에서, B7-H6 변이체는 발색효소, 방사성 동위원소, 크로모포어(chromophore), 발광물질 및 형광물질로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나로 표지될 수 있으며, 형광물질은 Cy(cyanine) 계열, 로다민(Rhodamine) 계열, 알렉사(Alexa) 계열, BODIPY 계열 또는 ROX 계열의 형광물질일 수 있으며, 나일 레드(Nile Red), 보디피(BODIPY, 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene), 시아닌(cyanine), 플루오레세인(fluorescein), 로다민(rhodamine), 쿠마린(coumarine) 또는 알렉사(Alexa)일 수 있다.
- [84] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 B7-H6 변이체 및 표적 항원에 결합하는 부분을 포함하는 이중특이적 또는 다중특이적 항체에 관한 것이다.
- [85] 일 구현예에서, 이중특이적 항체는 이중특이적 NK 세포 개입유발자(engager)일 수 있다.
- [86] 일 구현예에서, 표적 항원에 결합하는 부분이 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 포함할 수 있으며, 면역학적 활성을 가진 단편은 Fab, Fd, Fab', dAb, F(ab'), F(ab')₂, scFv, Fv, 단일쇄 항체, Fv 이량체, 상보성 결정 영역 단편, 인간화 항체, 키메라 항체 및 디아바디(diabody)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있고, scFv 또는 Fab인 것이 더욱 바람직하다.
- [87] 일 구현예에서, 표적 항원은 17-1A 항원, GD3 갱글리오시드 R24, EGFRvIII, PSMA, PSCA, HLA-DR, EpCAM, MUC1 코어 단백질, 이상 글리코실화 MUC1, ED-B 도메인을 함유하는 피브로넥틴 이형, HER2/neu, 암종배아성 항원(CEA), 가스트린-방출 펩티드(GRP) 수용체 항원, 뮤신(mucine) 항원, 표피 성장 인자 수용체(EGF-R), HER3, HER4, MAGE 항원, SART 항원, MUC1 항원, c-erb-2 항원, TAG 72, 탄산 무수화효소 IX(carbonic anhydrase IX), 알파-태아단백질(alpha-fetoprotein), A3, A33 항체에 특이적인 항원, Ba 733, BrE3-항원, CA125, CD1, CD1a, CD3, CD5, CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD33, CD38, CD40, CD45, CD52, CD74, CD79a, CD80, CD138, 결장-특이적 항원-p(CSAp), CSAp, EGP-1, EGP-2, Ep-CAM, Flt-1, Flt-3, 폴산염 수용체(folate receptor), HLA-DR, 인간 융모성 성선자극호르몬(HCG) 및 그 소단위체들, 저산소증 유도 인자(HIF-1), Ia, IL-2, IL-6, IL-8, 인슐린 성장 인자-1(IGF-1), KC4-항원, KS-1-항원, KSI-4, Le-Y, 대식세포 억제 인자(MIF), MAGE, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, NCA66, NCA95, NCA90, PAM-4 항체에 특이적인 항원, 태반 성장 인자, p53, 전립선 산성 포스파타제(prostatic acid phosphatase), PSA, RS5, SLOO, TAC, 테나신(tenascin), TRAIL 수용체들, Tn 항원, 톰슨-프리덴라이히(Thomson-Friedenreich) 항원들, 종양 괴사 항원들, VEGF, ED-B 피브로넥틴(fibronectin), 혈관형성 표지(angiogenesis marker), 종양유전자 표지(oncogene marker) 또는 종양

유전자 생성물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 종양유전자는 아폽토시스(Apoptosis) 관련 유전자, 전사인자(Transcription Factor) 유전자, 전이(Metastasis) 관련 유전자, 혈관신생(Angiogenesis) 관련 유전자 또는 티로신-카이네이즈(Tyrosine-Kinase) 유전자일 수 있다.

- [88] 일 구현예에서, 상기 아폽토시스 관련 유전자는 ABL1, AKT1, AKT2, BARD1, BAX, BCL11B, BCL2, BCL2A1, BCL2L1, BCL2L12, BCL3, BCL6, BIRC2, BIRC3, BIRC5, BRAF, CARD11, CAV1, CBL, CDC25A, CDKN1A, CFLAR, CNR2, CTNNB1, CUL4A, DAXX, DDIT3, E2F1, E2F3, E2F5, ESPL1, FOXO1, HDAC1, HSPA5, IGF1R, IGF2, JUN, JUNB, JUND, MALT1, MAP3K7, MCL1, MDM2, MDM4, MYB, MYC, NFKB2, NPM1, NTRK1, PAK1, PAX3, PML, PRKCA, PRKCE, PTK2B, RAF1, RHOA, TGFB1, TNFRSF1B, TP73, TRAF6, YWHAG, YWHAQ 또는 YWHAZ일 수 있으며; 상기 전사인자 유전자는 AR, ARID3A, ASCL1, ATF1, ATF3, BCL11A, BCL11B, BCL3, BCL6, CDC5L, CDX2, CREB1, CUX1, DDIT3, DLX5, E2F1, E2F3, E2F5, ELF4, ELK1, ELK3, EN2, ERG, ETS1, ETS2, ETV1, ETV3, ETV4, ETV6, FEV, FEZF1, FLI1, FOS, FOSL1, FOXA1, FOXG1, FOXM1, FOXO1, FOXP1, FOXQ1, GATA1, GATA6, GFI1, GFI1B, GLI1, GLI2, GLI3, HES6, HHEX, HLF, HMGA1, HMGA2, HOXA1, HOXA9, HOXD13, HOXD9, ID1, ID2, IKZF1, IRF2, IRF4, JUN, JUNB, JUND, KAT6A, KDM2A, KDM5B, KLF2, KLF4, KLF5, KLF6, KLF8, KMT2A, LEF1, LHX1, LMX1B, MAF, MAFA, MAFB, MBD1, MECOM, MEF2C, MEIS1, MITF, MYB, MYC, MYCL, MYCN, NANOG, NCOA3, NFIB, NFKB2, NKX2-1, OTX2, PATZ1, PAX2, PAX3, PAX4, PAX8, PBX1, PBX2, PITX2, PLAG1, PLAGL2, PPARG, PPP1R13L, PRDM10, PRDM13, PRDM14, PRDM15, PRDM16, PRDM6, PRDM8, PRDM9, RARA, REL, RERE, RUNX1, RUNX3, SALL4, SATB1, SFPQ, SIX1, SNAI1, SOX2, SOX4, SPI1, SREBF1, STAT3, TAF1, TAL1, TAL2, TBX2, TBX3, TCF3, TFCP2, TFE3, THRA, TLX1, TP63, TP73, TWIST1, WT1, YBX1, YY1, ZBTB16, ZBTB7A, ZIC2, ZNF217 또는 ZNF268일 수 있고; 상기 전이 관련 유전자는 AKT1, AKT2, AR, CBL, CDH1, CRK, CSF1, CTNNB1, CTTN, CXCR4, EGFR, FGFR1, FLT3, FYN, GLI1, ILK, ITGA3, JAK2, MET, PDGFRB, PLXNB1, PRKCI, PTCH1, PTPN11, RAC1, RHOA, RHOC, ROCK1, SMO, SNAI1, SRC, TCF3 또는 WT1일 수 있으며; 상기 혈관신생 관련 유전자는 BRAF, CAV1, CTGF, EGFR, ERBB2, ETS1, FGF4, FGF6, FGFR1, FGFR3, FGFR4, ID1, NRAS, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB 또는 SPARC일 수 있고; 상기 티로신-카이네이즈 유전자는 ABL1, ABL2, ALK, AXL, BLK, EGFR, EPHA2, ERBB2, ERBB3, ERBB4, FES, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FGR, FLT3, FYN, ITK, JAK1, JAK2, KIT, LCK, MERTK, MET, MST1R, NTRK1, NTRK3, PDGFRA, PDGFRB, PTK2B, PTK7, RET, ROS1, SRC, SYK, TEC 또는 YES1일 수 있다.

[89] 일 구현예에서, 종양유전자는 SEPTIN9, ACOD1, ACTN4, ADAM28, ADAM9, ADGRF1, ADRBK2, AFF1, AFF3, AGAP2, AGFG1, AGRN, AHCYL1, AHI1, AIMP2, AKAP13, AKAP9, AKIRIN2, AKTIP, ALDH1A1, ALL1, ANIB1, ANP32C, ANP32D, AQP1, ARAF, ARHGEF1, ARHGEF2, ARHGEF5, ASPSCR1, AURKA, BAALC, BAIAP2L1, BANP, BCAR4, BCKDHB, BCL9, BCL9L, BCR, BMI1, BMP7, BOC, BRD4, BRF2, CABIN1, CAMK1D, CAPG, CBFEB, CBLB, CBLL1, CBX7, CBX8, CCDC28A, CCDC6, CCNB1, CCNB2, CCND1, CCNE1, CCNL1, CD24, CDC25C, CDC6, CDH17, CDK1, CDK14, CDK4, CDK5R2, CDK6, CDK8, CDKN1B, CDKN3, CDON, CEACAM6, CENPW, CHD1L, CHIC1, CHL1, CKS1B, CMC4, CNTN2, COPS3, COPS5, CRKL, CRLF2, CROT, CRTIC1, CRYAB, CSF1R, CSF3, CSF3R, CSNK2A1, CSNK2A2, CT45A1, CTBP2, CTNND2, CTSZ, CUL7, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CYGB, CYP24A1, DCD, DCUN1D1DDB2, DDHD2, DDX6, DEK, DIS3, DNPH1, DPPA2, DPPA4, DSG3, DUSP12, DUSP26, ECHS1, ECT2, EEF1A1, EEF1A2, EEF1D, EIF3E, EIF3I, EIF4E, EIF5A2, ELAVL1, ELL, EML4, EMSY, ENTPD5, EPCAM, EPS8, ERAS, ERGIC1, ERVW-1, EVI2A, EVI5, EWSR1, EZH2, FAM189B, FAM72A, FAM83D, FASN, FDPS, FGF10, FGF3, FGF5, FGF8, FR1OP, FHL2, FIP1L1, FNDC3B, FRAT1, FUBP1, FUS, FZD2, GAB2, GAEC1, GALNT10, GALR2, GLO1, GMNN, GNA12, GNA13, GNAI2, GNAQ, GNAS, GOLPH3, GOPC, GPAT4, GPM6A, GPM6B, GPR132, GREM1, GRM1, GSK3A, GSM1, H19, HAS1, HAX1, HDGFRP2, HMGN5, HNRNPA1, HOTAIR, HOTTIP, HOXA-AS2, HRAS, HSPA1A, HSPA4, HSPB1, HULC, IDH1, IFNG, IGF2BP1, IKBKE, IL7R, INPPL1, INTS1, INTS2, INTS3, INTS4, INTS5, INTS7, INTS8, IRS2, IST1, JUP, KDM4C, KIAA0101, KIAA1524, KIF14, KRAS, KSR2, LAMTOR5, LAPTM4B, LCN2, LDHB, LETMD1, LIN28A, LIN28B, LMO1, LMO2, LMO3, LMO4, LSM1, LUADT1, MACC1, MACROD1, MAGEA11, MALAT1, MAML2, MAP3K8, MAPRE1, MAS1, MCC, MCF2, MCF2L, MCTS1, MEFV, MFHAS1, MFNG, MIEN1, MINA, MKL2, MLANA, MLLT1, MLLT11, MLLT3, MLLT4, MMP12, MMS22L, MN1, MNAT1, MOS, MPL, MPST, MRAS, MRE11A, MSI1, MTCP1, MTDH, MTOR, MUC1, MUC4, MUM1, MYD88, NAAA, NANOCP8, NBPFI2, NCOA4, NEAT1, NECTIN4, NEDD4, NEDD9, NET1, NINL, NME1, NOTCH1, NOTCH4, NOV, NSD1, NUAKE2, NUP214, NUP98, NUTM1, OLR1, PA2G4, PADI2, PAK7, PARK7, PARM1, PBK, PCAT1, PCAT5, PDGFA, PDZK1IP1, PELP1, PFN1P3, PIGU, PIK3CA, PIK3R1, PIM1, PIM2, PIM3, PIR, PIWIL1, PLAC8, PLK1, PPM1D, PPP1R10, PPP1R14A, PPP2R1A, PRAME, PRDM12, PRMT5, PSIP1, PSMD10, PTCH2, PTMA, PTP4A1, PTP4A2, PTP4A3, PTTG1, PTTG1IP, PTTG2, PVT1, RAB11A, RAB18, RAB22A, RAB23, RAB8A, RALGDS, RAP1A, RASSF1, RBM14, RBM15, RBM3, RBMY1A1, RFC3, RGL4, RGR, RHO, RING1, RINT1, RIT1, RNF43, RPL23, RRAS, RRAS2,

RSF1, RUNX1T1, S100A4, S100A7, S100A8, SAG, SART3, SBSN, SEA, SEC62, SERTAD1, SERTAD2, SERTAD3, SET, SETBP1, SETDB1, SGK1, SIRT1, SIRT6, SKI, SKIL, SKP2, SLC12A5, SLC3A2, SMR3B, SMURF1, SNCG, SNORA59A, SNORA80E, SPAG9, SPATA4, SPRY2, SQSTM1, SRSF1, SRSF2, SRSF3, SRSF6, SS18, SSX1, SSX2, SSX2B, STIL, STMN1, STRA6, STYK1, SUZ12, SWAP70, SYT1, TAC1, TACSTD2, TAF15, TALDO1, TAZ, TBC1D1, TBC1D15, TBC1D3, TBC1D3C, TBC1D7, TCL1A, TCL1B, TCL6, TCP1, TFG, TGM3, TINCR, TKTL1, TLE1, TMEM140, TMPOP2, TMPRSS2, TNS4, TPD52, TPR, TRE17, TREH, TRIB1, TRIB2, TRIM28, TRIM32, TRIM8, TRIO, TRIP6, TSPAN1, TSPY1, TXN, TYMS, TYRP1, UBE2C, UBE3C, UCA1, UCHL1, UHRF1, URI1, USP22, USP4, USP6, VAV1, VAV2, VAV3, VIM, WAPL, WHSC1, WHSC1L1, WISP1, WNT1, WNT10A, WNT10B, WNT2, WNT3, WNT5A, WWTR1, XCL1, XIAP, YAP1, YEATS4, YY1AP1, ZEB1-AS1, ZFAND4, ZFAS1, ZMYM2, ZNF703 또는 ZNHIT6 일 수 있다.

- [90] 일 구현예에서, 표적 항원은 세포 표면 항원 또는 자가항원일 수 있으며, 세포 표면 항원은 CEA, ED-B 피브로넥틴, CD20, CD22, CD19, EGFR, IGFIR, VEGFR1/Flt-1, VEGFR2/KDR, VEGFR3/Flt-4, HER2/neu, CD30, CD33, CD3, CD16, CD64, CD89, CD2, 아데노바이러스 섬유 농, P1MSP-1, HN/NDV, EpCAM/17-1A, hTR, IL-2R/Tac, CA19-9, MUC1, HLA 클래스 II, GD2, G250, TAG-72, PSMA, CEACAM6, HMWMAA, CD40, M13 외피 단백질 및 GPIIb/IIIa로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [91] 일 구현예에서, 본 발명의 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.
- [92] 상기 항체는 전체(whole) 항체 형태일 뿐 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 전체 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄(light chain) 및 2개의 전체 길이의 중쇄(heavy chain)를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합(disulfide bond)으로 연결되어 있다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, 항체 단편의 예는 (i) 경쇄의 가변영역(VL) 및 중쇄의 가변영역(VH)과 경쇄의 불변영역(CL) 및 중쇄의 첫번째 불변영역(CH1)으로 이루어진 Fab 단편; (ii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iii) 단일 항체의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (iv) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편(Ward ES et al., Nature 341:544-546 (1989)); (v) 분리된 CDR 영역; (vi) 2개의 연결된 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')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.

- [93] 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.
- [94] 원하는 항원을 피면역 동물에게 면역시켜 생산하는 동물 유래 항체는 일반적으로 치료 목적으로 인간에 투여시 면역거부반응이 일어날 수 있으며, 이러한 면역거부반응을 억제하고자 키메라 항체(chimeric antibody)가 개발되었다. 키메라 항체는 유전공학적 방법을 이용하여 항-아이소타입(anti-isotype) 반응의 원인이 되는 동물 유래 항체의 불변 영역을 인간 항체의 불변 영역으로 치환한 것이다. 키메라 항체는 동물 유래 항체에 비하여 항-아이소타입 반응에 있어서 상당 부분 개선되었으나, 여전히 동물 유래 아미노산들이 가변 영역에 존재하고 있어 잠재적인 항-이디오타입(anti-idiotypic) 반응에 대한 부작용을 내포하고 있다. 이러한 부작용을 개선하고자 개발된 것이 인간화 항체(humanized antibody)이다. 이는 키메라 항체의 가변 영역 중 항원의 결합에 중요한 역할을 하는 CDR(complementarity determining regions) 부위를 인간 항체 골격(framework)에 이식하여 제작된다.
- [95] 인간화 항체를 제작하기 위한 CDR 이식(grafting) 기술에 있어서 가장 중요한 것은 동물 유래 항체의 CDR 부위를 가장 잘 받아들일 수 있는 최적화된 인간 항체를 선정하는 것이며, 이를 위하여 항체 데이터베이스의 활용, 결정구조(crystal structure)의 분석, 분자모델링 기술 등이 활용된다. 그러나, 최적화된 인간 항체 골격에 동물 유래 항체의 CDR 부위를 이식할지라도 동물 유래 항체의 골격에 위치하면서 항원 결합에 영향을 미치는 아미노산이 존재하는 경우가 있기 때문에, 항원 결합력이 보존되지 못하는 경우가 상당수 존재하므로, 항원 결합력을 복원하기 위한 추가적인 항체 공학 기술의 적용은 필수적이라고 할 수 있다.
- [96] 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.
- [97] 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, 서브클래

스로 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.

- [98] 본 발명에서 용어, "중쇄(heavy chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위해 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 V_H 및 3개의 불변 영역 도메인 C_{H1} , C_{H2} 및 C_{H3} 과 힌지(hinge)를 포함하는 전장 중쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다. 또한, 용어 "경쇄(light chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 V_L 및 불변 영역 도메인 C_L 을 포함하는 전장 경쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다.
- [99] 본 발명에서 용어, "가변 영역(variable region) 또는 가변 부위 (variable domain)"는 항원과 특이적으로 결합하는 기능을 수행하면서 서열상의 많은 변이를 보이는 항체 분자의 부분을 의미하고, 가변 영역에는 상보성 결정 영역인 CDR1, CDR2 및 CDR3가 존재한다. 상기 CDR 사이에는 프레임 워크 영역 (framework region, FR) 부분이 존재하여 CDR 고리를 지지해주는 역할을 한다. 상기 "상보성 결정 영역"은 항원의 인식에 관여하는 고리모양의 부위로서 이 부위의 서열이 변함에 따라 항체의 항원에 대한 특이성이 결정된다.
- [100] 본 발명에서 사용되는 용어 "scFv(single chain fragment variable)"는 유전자 재조합을 통해 항체의 가변영역만을 발현시켜 만든 단쇄항체를 말하며, 항체의 VH 영역과 VL 영역을 짧은 펩티드 사슬로 연결한 단일쇄 형태의 항체를 말한다. 상기 용어 "scFv"는 달리 명시되지 않거나, 문맥상 달리 이해되는 것이 아니라면, 항원 결합 단편을 비롯한 scFv 단편을 포함하고자 한다. 이는 통상의 기술자에게 자명한 것이다.
- [101] 본 발명에서 용어, "상보성결정영역(complementarity determining region, CDR)"은 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 고가변 영역 (hypervariable region)의 아미노산 서열을 의미한다. 중쇄 및 경쇄는 각각 3개의 CDR을 포함할 수 있다 (CDRH1, CDRH2, CDRH3 및 CDRL1, CDRL2, CDRL3). 상기 CDR은 항체가 항원 또는 항원결정부위에 결합하는 데 있어서 주요한 접촉 잔기를 제공할 수 있다.
- [102] 본 발명에서, 용어, "특이적으로 결합" 또는 "특이적으로 인식"은 당업자에게 통상적으로 공지되어 있는 의미와 동일한 것으로서, 항원 및 항체가 특이적으로 상호작용하여 면역학적 반응을 하는 것을 의미한다.
- [103] 본 발명에서 용어, "항원결합단편"은 면역글로불린 전체 구조에 대한 그의 단편으로, 항원이 결합할 수 있는 부분을 포함하는 폴리펩타이드의 일부를 의미한다. 예를 들어, scFv, (scFv) 2, scFv-Fc, Fab, Fab' 또는 F(ab') 2 일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 항원결합단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(C_{H1})을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 C_{H1} 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab') 2

항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 당업계에 널리 공지되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변 부위와 경쇄 가변 부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 단쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다имер와 같은 구조를 이룰 수 있다. 상기 링커는 1 내지 100개 또는 2 내지 50개의 임의의 아미노산으로 이루어진 펩타이드 링커일 수 있으며, 당업계에 적절한 서열이 알려져 있다. 상기 항원결합단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.

- [104] 본 발명에서 용어 "힌지 영역(hinge region)"은 항체의 중쇄에 포함되어 있는 영역으로서, C_{H1} 및 C_{H2} 영역 사이에 존재하며, 항체 내 항원 결합 부위의 유연성(flexibility)를 제공하는 기능을 하는 영역을 의미한다. 예컨대, 상기 힌지는 인간 항체로부터 유래한 것일 수 있으며, 구체적으로, IgA, IgE, 또는 IgG, 예컨대, IgG1, IgG2, IgG 3, 또는 IgG4로부터 유래한 것일 수 있다.
- [105] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 B7-H6 변이체 또는 이의 단편, 또는 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 코딩하는 단리된 핵산 분자, 이를 포함하는 벡터, 및 이로 형질전환된 숙주 세포에 관한 것이다.
- [106] 본 발명의 핵산 분자는 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 연결된 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 존재하

지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커를 통상적인 방법에 따라 사용한다.

[107] 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 본 발명의 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 코딩하는 단리된 핵산 분자는 코돈의 축퇴성 (degeneracy)으로 인하여 또는 상기 항체를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 코딩영역으로부터 발현되는 항체의 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.

[108] 본 발명에 따른 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 본 발명의 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 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 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 본 발명의 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 코딩하는 단리된 핵산 분자 함유 발현벡터를 배양하여 단백질 발현을 유도하는 방법에 의해 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 본 발명의 이중특이적 또는 다중특이적 항체가 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.

[109] 본 발명의 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 상기 시그널 서열에는 숙주가 에셰리키아속 (*Escherichia* sp.) 균인 경우에는 PhoA 시그널 서열, OmpA 시그널 서열 등이, 숙주가 바실러스속 (*Bacillus* sp.) 균인 경우에는 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.

- [110] 본 발명에서 용어, "벡터"는 핵산 서열을 복제할 수 있는 세포로의 도입을 위해서 핵산 서열을 삽입할 수 있는 전달체를 의미한다. 핵산 서열은 외생 (exogenous) 또는 이종 (heterologous)일 수 있다. 벡터로서는 플라스미드, 코스미드 및 바이러스(예를 들면 박테리오파지)를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 당업자는 표준적인 재조합 기술에 의해 벡터를 구축할 수 있다(Maniatis, et al., Molecular Cloning , A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; 및 Ausubel et al., In: Current Protocols in Molecular Biology , John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994 등).
- [111] 일 구현예에서, 상기 벡터의 제작 시, 상기 항체를 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.
- [112] 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.
- [113] 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.
- [114] 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.
- [115] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 B7-H6 변이체 또는 이의 단편, 또는 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 포함하는, 암의 치료 또는 예방용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [116] 일 구현예에서, 상기 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, 신장세포암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신

경고종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

- [117] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 질병 또는 질환의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [118] 본 발명에서 사용된 용어 "치료"란 본 발명에 따른 조성물의 투여로 질병 또는 질환 및 이로 인한 합병증의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학 협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.
- [119] 본 발명에서 유효성분과 결합하여 사용된 "치료학적으로 유효한 양"이란 용어는 질병 또는 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 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 PublishingCo.에 기술되어 있다.
- [120] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 질병 또는 질환의 종류, 질병 또는 질환의 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.
- [121] 본 발명의 약학적 조성물은 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 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 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

- [122] 일 구현예에서, 상기 약학적 조성물은 경구형 제형, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 및 분무제를 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있으며, 경구형 또는 주사 제형이 더욱 바람직하다.
- [123] 본 발명에서 사용되는 용어, "투여"란, 임의의 적절한 방법으로 개체 또는 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 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 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다. 본 발명의 약학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제(예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있다.
- [124] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란, 상기 질병 또는 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 박쥐, 낙타, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함한 모든 동물을 의미하고, "검체"란 이로부터 분리한 비말, 가래, 전혈, 혈장, 혈청, 뇨 또는 타액일 수 있다.
- [125] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정 셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시

프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산 알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산 칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [126] 일 측면에서, 본 발명은 자연 살해 세포를 분리하는 단계; 및 본 발명의 B7-H6 변이체 또는 이의 단편의 존재 하에 상기 분리된 자연 살해 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 활성화된 자연살해세포의 생체외 증식 방법에 관한 것이다.
- [127] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 B7-H6 변이체 또는 이를 포함하는 이중특이적 또는 다중특이적 항체의 암의 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다.
- [128] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 B7-H6 변이체 또는 이를 포함하는 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 약학적으로 유효한 양으로 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법에 관한 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [129] 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.
- [130] 실시예 1. B7-H6 변이체 탐색을 위한 사합체 인간 NKp30 클로닝
- [131] NKp30에 결합력이 향상된 B7-H6 변이체 탐색에 사용하기 위해 NKp30 단백질의 사합체화(tetramerization)를 통한 결합 활성(Avidity) 효과를 유도하였다. 구체적으로, 사합체화를 유도하기 위해 NKp30의 C-말단 부분에 스트렙타비딘을 발현시켰으며, NKp30과 스트렙타비딘 사이에는 글라이신 및 세린 링커를 삽입하여 각각의 단백질 유동성을 확보하였다. NKp30 및 스트렙타비딘 유전자를 프라이머들과 Vent polymerase (New England Biolab)를 사용하여 각각 증폭한 후, Vent polymerase를 사용한 assembly PCR을 진행하였다. 만들어진 유전자에 *Bss* HII 및 *Xba*I (New England Biolab)을 사용해 제한효소 처리하였다. 제한효소 처리된 NKp30-Streptavidin 유전자는 동일한 제한효소 처리된 동물세포용 벡터인 pMAZ 벡터에 라이게이션하였다. 라이게이션된 플라스미드를 대장균 *J*ude1에 트랜스포메이션(transformation)한 후, 단일 클론을 확보하고 염기서열 분석하여 NKp30-스트렙타비딘이 pMAZ 벡터에 성공적으로 삽입된 것을 확인하였다 (도 1).
- [132] 실시예 2. 사합체 인간 NKp30의 발현, 정제 및 표지화
- [133] Expi293F 세포를 2×10^6 cells/ml의 밀도로 300 ml 계대배양하고 하루 뒤, Freestyle 293 expression 배양액 (Gibco. 12338-018) 30 ml에 PEI(Polyethylenimine, Polyscience, 23966)와 상기 실시예 1에서 제작한 NKp30-스트렙타비딘-His tag 발현벡터를 1:4의 비율로 섞어 상온에서 20분간 두었다가 상기 Expi293F 동물세포에 트랜스펙션하였다. 세포를 CO₂ 진탕배양기에서 37 °C, 125 rpm, 8% CO₂의 조

건으로 7일간 배양한 후 원심 분리하여 상등액만 취하였다. 그 후 25x PBS를 이용하여 평형을 맞추고 바틀 탑 필터를 이용해 0.2 μm 필터 (Merck Millipore)로 여과하였다. 여과된 배양액에 Ni-NTA 레진 1 ml을 넣어 주고 4 °C에서 16 시간 교반한 후 컬럼에 통과시켜 레진을 회수하여 10 ml PBS로 세척하였다. 세척한 레진을 10 mM 이미다졸 버퍼 및 20 mM 이미다졸 버퍼 각각 10 ml로 순차적으로 세척한 뒤, 250 mM 이미다졸 버퍼 4 ml로 용출하였다. centrifugal filter units 3K (Merck Millipore)을 사용하여 PBS 버퍼로 교환한 뒤 정제된 NKp30-스트렙타비딘 사합체(tetramer) 단백질을 Alexa-488 labeling kit를 사용해 형광표지하였다.

[134] 실시예 3. 스크리닝 방법 선택

[135] 3-1. Yeast surface display 방법을 위한 B7-H6 클로닝

[136] 효율적인 스크리닝을 위해 yeast surface anchoring motif를 결정하기로 하였고, B7-H6의 N-말단을 Aga2에 anchoring 시키는 시스템 (pCTCON-Aga2-B7-H6-FLAG) 및 C-말단을 Aga2에 anchoring 시키는 시스템 (pCTCON-B7-H6-Aga2-FLAG)을 비교하고자 B7-H6을 클로닝하였다. 구체적으로, 야생형 B7-H6 유전자를 합성하여 디자인한 프라이머 및 Vent Polymerase (New England Biolab)를 사용해 유전자를 증폭하였다. 증폭된 야생형 B7-H6 유전자는 *Sfi*I (New England Biolab)을 사용해 제한효소 처리하였으며, 제한효소 처리된 유전자를 동일한 제한효소 처리된 pCTCON 벡터에 라이게이션하였다. 라이게이션된 플라스미드를 Jude1 대장균에 트랜스포메이션시킨 후, 단일 클론을 확보하여 염기서열 분석함으로써 pCTCON-Aga2-B7-H6_WT-FLAG 및 pCTCON-B7-H6_WT-Aga2-FLAG 2종의 플라스미드가 성공적으로 클로닝됨을 확인하였다.

[137] 3-2. 결합력 검증을 통한 디스플레이 방법 선택

[138] 효모 표면에 발현된 B7-H6과 프로브인 NKp30-스트렙타비딘의 결합력을 유세포 분석기를 이용하여 검증하여 디스플레이 방법을 선택하였다. 구체적으로, 상기 실시예 3-1에서 제작한 2종의 플라스미드를 각각 AWY101 (Trp-) 균주에 트랜스포메이션하고, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 카나마이신(Kanamycin) 및 40 $\mu\text{g/ml}$ 의 클로람페니콜(Chloramphenicol)이 첨가된 SDCAA (20 g/L Glucose, 6.7 g/L Yeast nitrogen base without amino acids, 5 g/L casamino acids, 5.4 g/L Na_2HPO_4 및 8.56 g/L NaH_2PO_4) 배지 5 ml에서 30°C 및 225 rpm의 조건으로 16시간 동안 배양하였다. 배양된 세포 5×10^7 개를 원심분리 (2,500g, 5분, 4°C)하여 수득한 뒤, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 카나마이신 및 40 $\mu\text{g/ml}$ 의 클로람페니콜이 첨가된 SGCAA (20 g/L Galactose, 6.7 g/L Yeast nitrogen base without amino acids, 5 g/L casamino acids, 5.4 g/L Na_2HPO_4 및 8.56 g/L NaH_2PO_4) 배지 5 ml에서 20°C 및 225 rpm의 조건으로 24시간 동안 인덕션하였다. 인덕션이 끝난 후, 2×10^7 개의 세포를 원심분리 (14,000g, 30초, 4°C) 하여 e-튜브에 회수하였다. 세포를 회수한 각 e-튜브에 PBSB (0.1% BSA in PBS) 1 ml을 넣어 재현탁하고 원심분리 (14,000g, 30초, 4°C)를 통해 세포를 다시 모은 후, PBSB 0.5 ml을 넣고 재현탁하여 4×10^7 cell/ml을 만들었다. 25 μl 의 세포를 새로운 e-튜브에

웁긴 후, 25 μ l의 PBSB, NKp30-스트렙타비딘-Alexa488 (200 nM) 및 Anti-FLAG-iFluor647 (1000:1) 프로브를 각각 넣고 상온에서 30분 동안 인큐베이션하여 세포에 형광 프로브를 표지하였다. 그 후, 원심분리 (14,000g, 30초, 4°C)하여 상등액을 버리고 200 μ l의 PBSB로 재현탁하여 세척하고, 다시 원심분리 (14,000g, 1분, 4°C)하여 200 μ l의 PBSB로 재현탁한 시료를 준비하였다. FACSLyric (BD Biosciences) 장비로 준비된 시료들의 형광 신호값을 측정함으로써 야생형 B7-H6 및 NKp30의 결합력을 간접적으로 분석하였다.

- [139] 분석 결과, 야생형 B7-H6의 시그널을 통해 사합체 NKp30을 사용했을 때 형광 표지된 사합체 NKp30이 활성이 있다는 것을 확인하였다. 또한, 모두 발현은 잘 되었으나, N-말단 부분이 Aga2에 anchoring되어 효모에 디스플레이된 야생형 B7-H6에 비해 C-말단 부분이 Aga2에 anchoring되어 효모에 디스플레이된 B7-H6가 NKp30에 대한 결합력이 현저히 증가한 것을 확인하여, C-말단을 anchoring한 형태로 스크리닝을 진행하기로 결정하였다 (도 2).
- [140] 실시예 4. 초고속 스크리닝 기법을 사용하기 위한 거대 **B7-H6 error-prone** 라이브러리 제작
- [141] NKp30과 결합력이 증가된 B7-H6 변이체들을 고속으로 탐색하기 위해, pCTCON-B7-H6-WT-Aga2-FLAG을 기반으로 B7-H6의 모든 부위에 무작위 돌연변이가 들어갈 수 있도록 양쪽의 *SfiI* site를 포함하는 프라이머를 디자인하였다. 디자인한 프라이머와 *Taq* Polymerase (TAKARA), dNTPs (Invitrogen), $MgCl_2$ 및 $MnCl_2$ (SIGMA)를 사용하여 Error-Prone PCR 기법으로 DNA를 1차 증폭시켰다. Vent polymerase를 이용하여 증폭된 유전자를 2차 증폭시켜 준비하였으며 (24 μ g), 해당 벡터는 *SfiI* 제한 효소 처리하여 준비하였다 (8 μ g). 준비된 두 유전자를 AWY101 균주에 트랜스포메이션하여 상동 재조합(homologous recombination)을 통한 라이브러리를 구축하였다. 구축된 라이브러리는 5.1×10^7 크기였으며, 서열 분석을 통해 DNA 기준 0.92% (평균 2.3개 돌연변이/총 360 bp) 및 아미노산 기준 1.92% (평균 3.3개 돌연변이/총 120 아미노산)의 error-rate을 가지는 것을 확인하였다 (도 3).
- [142] 실시예 5. **B7-H6** 변이체 스크리닝
- [143] 상기 실시예 4에서 AWY101에 트랜스포메이션하여 제작한 초기 라이브러리를 50 μ g/ml의 카나마이신 및 40 μ g/ml의 클로람페니콜이 첨가된 SDCAA (20 g/L Glucose, 6.7 g/L Yeast nitrogen base without amino acids, 5 g/L casamino acids, 5.4 g/L Na_2HPO_4 및 8.56 g/L NaH_2PO_4) 배지 500 ml에서 30°C, 225 rpm으로 16시간 동안 배양하고, 죽은 세포를 제거하기 위해 SDCAA 배지 100 ml에 $OD_{450}=0.7$ 로 접종한 후 30°C, 225 rpm으로 16시간 동안 추가로 배양하였다. 그 후, 배양된 세포를 SGCAA 배지 100 ml에 $OD_{450}=0.7$ 로 접종하여 20°C, 225 rpm으로 2일 동안 배양하여 인덕션한 후, 1×10^8 개의 세포를 원심분리 (14,000g, 30초, 4°C)하여 e-튜브에 회수하였다. 세포를 회수한 e-튜브에 PBSB (0.1% BSA in PBS)를 1 ml 넣어 재

현탁하고 원심분리 (14,000g, 30초, 4°C)를 통해 세포를 다시 모은 후, Anti-FLAG-iFluor647 (1000:1) 및 NKp30-스트렙타비딘-Alexa488 (200 nM) 프로브를 넣은 1 ml의 PBSB로 재현탁하여 상온에서 1시간 동안 인큐베이션함으로써 표지하였다. 그 후, 원심분리 (14,000g, 30초, 4°C)를 하여 상등액을 버리고 1 ml의 PBSB로 재현탁하여 세척하고, 또 다시 원심분리 (14,000g, 1분, 4°C)하여 1 ml의 PBSB로 재현탁하여 시료를 준비하였다. S3 sorter (Bio-Rad) 장비를 이용하여 준비된 라이브러리 시료의 형광 신호값을 측정하여 NKp30에 높은 결합력을 가지는 효모들을 회수하였으며, 회수한 효모들을 SDCAA 20 ml에서 30°C 및 225 rpm으로 배양하였다. 배양된 세포들을 다음날 회수하고 SGCAA 100 ml에서 20°C 및 225 rpm으로 2-3일 동안 배양하여 인덕션한 후, 다음 라운드를 진행하였다. 상기와 같은 스크리닝 과정을 프로브의 농도를 줄여가며 총 4회 진행하였다.

[144] 실시예 6. **NKp30** 와의 결합력이 증가된 **B7-H6** 변이체들의 증폭 확인

[145] 50 µg/ml의 카나마이신 및 40 µg/ml의 클로람페니콜이 첨가된 SDCAA (20 g/L Glucose, 6.7 g/L Yeast nitrogen base without amino acids, 5 g/L casamino acids, 5.4 g/L Na₂HPO₄, 8.56 g/L NaH₂PO₄) 배지 100 ml에 상기 실시예 5의 이니셜, 1라운드, 2라운드, 3라운드 및 4라운드의 라이브러리를 각각 따로 접종하여 30°C 및 225 rpm으로 16시간 동안 배양하였다. 죽은 세포를 제거하기 위해 상기 배양한 세포를 SDCAA 배지 100 ml에 각각 OD₄₅₀=0.7로 접종한 후 30°C 및 225 rpm으로 16시간 동안 배양하였으며, 다시 SGCAA 배지 100 ml에 OD₄₅₀=0.7로 접종하여 20°C 및 225 rpm으로 2일 동안 배양하였다. 인덕션이 끝난 후, 라이브러리들을 2x10⁷ 개의 세포에 해당하는 양으로 각각 원심분리 (14,000g, 30초, 4°C) 하여 e-튜브에 회수하고 각 e-튜브에 PBSB (0.1% BSA in PBS) 1 ml을 넣어 재현탁하고 원심분리 (14,000g, 30초, 4°C)를 통해 세포를 다시 모은 후, PBSB 0.5 ml을 넣고 재현탁하여 4x10⁷ cell/ml을 만들었다. 25 µl의 세포를 새로운 e-튜브에 옮긴 후, 25 µl의 PBSB, NKp30-스트렙타비딘-Alexa488 (100 nM) 및 Anti-FLAG-iFluor647 (1000:1) 프로브를 각각 넣고 상온에서 30분 동안 인큐베이션하여 세포에 형광 프로브를 표지하였다. 그 후, 원심분리 (14,000g, 30초, 4°C)하여 상등액을 버리고 200 µl의 PBSB로 재현탁하여 세척하고, 또 다시 원심분리 (14,000g, 1분, 4°C)하고 200 µl의 PBSB로 재현탁하여 시료를 준비하였다. FACSLytic (BD Biosciences) 장비로 준비된 시료들의 형광 신호값을 측정하여 각 라이브러리들의 NKp30와의 결합력을 간접적으로 분석하였다. 그 결과, 스크리닝 라운드가 증가됨에 따라 NKp30와의 결합력이 향상된 변이체들이 증폭되고 있음을 확인하였다 (도 4).

[146] 실시예 7. **B7-H6** 변이체들의 아미노산 서열 분석 및 **NKp30**와 결합력이 증가된 **B7-H6** 변이체들 확보

[147] Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep kits (Zymo Research)를 이용하여 4라운드 라이브러리의 DNA를 확보한 후, Jude1 대장균에 트랜스포메이션하여 얻은 콜로니 50개의 염기서열 분석을 진행하였다. 그 결과, 26종의 변이체들을 선별할 수

있었으며, 이들의 NKp30와의 결합력을 분석하기 위해 26종 변이체의 플라스미드를 각각 AWY101(Trp-) 균주에 트랜스포메이션하였다. 유세포 분석기를 이용해 변이체들의 NKp30와의 결합력을 확인하기 위해 야생형 B7-H6 및 26종의 변이체들을 각각 50 µg/ml의 카나마이신 및 40 µg/ml의 클로람페니콜이 첨가된 SDCAA (20 g/L Glucose, 6.7 g/L Yeast nitrogen base without amino acids, 5 g/L casamino acids, 5.4 g/L Na₂HPO₄, 8.56 g/L NaH₂PO₄) 배지 5 ml에서 30°C 및 225 rpm으로 16시간 동안 배양하고 배양된 세포 5x10⁷ 개를 원심분리 (2,500g, 5분, 4°C)하여 수득한 뒤, 50 µg/ml의 카나마이신 및 40 µg/ml의 클로람페니콜이 첨가된 SGCAA (20 g/L Galactose, 6.7 g/L Yeast nitrogen base without amino acids, 5 g/L casamino acids, 5.4 g/L Na₂HPO₄, 8.56 g/L NaH₂PO₄) 배지 5 ml에서 20°C 및 225 rpm으로 24시간 동안 인덕션하였다. 인덕션이 끝난 후, 2x10⁷ 개의 세포를 원심분리 (14,000g, 30초, 4°C)하여 e-튜브에 회수하였다. 세포를 회수한 각 e-튜브에 PBSB (0.1% BSA in PBS) 1 ml을 넣어 재현탁하고 원심분리 (14,000g, 30초, 4°C)를 통해 세포를 다시 모은 후, PBSB 0.5 ml을 넣고 재현탁하여 4x10⁷ cell/ml을 만들어주었다. 25 µl의 세포를 새로운 e-튜브에 옮긴 후, 25 µl의 PBSB, NKp30-스트렙타비딘-Alexa488 (100 nM) 및 Anti-FLAG-iFluor647 (1000:1) 프로브를 각각 넣고 상온에서 30분 동안 인큐베이션하여 세포에 형광 프로브를 표지하였다. 그 후, 원심분리 (14,000g, 30초, 4°C)하여 상등액을 버리고 200 µl의 PBSB로 재현탁하여 세척하고, 또 다시 원심분리 (14,000g, 1분, 4°C)하고 200 µl의 PBSB로 재현탁한 시료를 준비하였다. FACSLytic (BD Biosciences) 장비로 준비된 시료들의 형광 신호값을 측정하여 각 변이체들의 발현양 및 NKp30와의 결합력을 간접적으로 분석하고, NKp30와의 결합력이 향상된 총 17종의 변이체 (B5, B6, B7, B8, B9, B14, B16, B19, B23, B29, B35, B40, B41, B47, B52, B53 및 B54)를 선발하였다 (도 5 및 표 1).

[148] [표1]

B7-H6 변이체	B7-H6 변이 위치 및 치환된 아미노산
B5	F51S/S60I
B6	N57D
B7	K101E/S102R
B8	A32T/S60I
B9	A32T/L40Q/S60I
B14	F51L/S60I
B16	K101E
B19	A32T/W67R/Q86L/K101E/L129M
B23	S60I/L114M/S142N

B29	M31I/A32T/F51I/S60I/S102C/R108M
B35	A32T/S60I/K101E/P143S
B40	I37T/Q86L/K101E
B41	A32T/S53G/S60I/Q136R
B47	F51Y/S60I
B52	S60I/K101E
B53	A32T/K101E
B54	A32T/S60I/K101E

[149] 실시예 8. NKp30와 결합력이 증가된 B7-H6 변이체들의 발현 및 정제

[150] NKp30와 결합력이 증가된 B7-H6 변이체들의 동물세포 발현벡터를 제작하기 위해, 대조군으로 야생형 B7-H6 및 B7-H6 변이체를 IgG 항체의 Fc 도메인을 발현시켜 이합체(dimer) 형성을 유도하였으며, 이 때, Fc와 B7-H6 변이체 사이에는 글리신(glycine) 및 세린(serine)으로 구성된 GS 링커를 넣어 각각의 단백질의 유동성을 확보하였다. 구체적으로, 야생형 B7-H6, 상기 실시예 7에서 선발한 17종의 B7-H6 변이체들 중에서 선별한 3종의 변이체 (B5, B7 및 B14)의 유전자, Fc 도메인을 디자인된 프라이머 및 Vent Polymerase (New England Biolab)를 사용하여 증폭한 뒤, 증폭된 유전자를 Assembly PCR 진행한 후, *Bss*HII 및 *Xba*I 제한효소 (New England Biolab) 처리하였다. 제한효소 처리된 B7-H6 변이체들의 유전자를 동일한 제한효소 처리된 동물세포용 벡터인 pMAZ 벡터에 라이게이션하였다. 라이게이션 된 플라스미드를 *E. coli* Jude1에 트랜스포메이션(transformation)한 후, 단일 클론을 확보해 염기서열 분석을 진행한 결과, 변이체들의 유전자가 벡터에 성공적으로 삽입되었음을 확인하였다. 제작한 B7-H6 변이체-Fc 융합 단백질 발현용 벡터를 Expi293F 동물세포에 트랜스펙션하고, CO₂ 진탕배양기에서 37 °C, 125 rpm 및 8% CO₂ 조건으로 7일간 배양한 후 원심분리하여 상등액만 분리하였다. 그 후 25x PBS를 이용해 평형을 맞추었으며, 0.2 µm 시린지 필터 (Sartorius, S6634)를 이용해 여과하였다. 여과된 배양액에 Protein A 레진 0.15 ml을 넣고 상온에서 1 시간 동안 교반하여 레진을 회수한 뒤 PBS로 세척하였다. 이후, 100 mM 글라이신 버퍼 (pH 2.7)로 용출하고 1 M Tris-HCl (pH 8.0)을 이용하여 중화한 뒤, centrifugal filter units 10K (Merck Millipore)을 사용하여 1x PBS (pH 7.4)로 버퍼를 교환하였다. 이렇게 발현 및 정제한 야생형 B7-H6-Fc 융합 단백질과 본 발명에서 발굴한 변이체 3종 (B5, B7 및 B14)을 각각 포함하는 B7-H6 변이체-Fc 융합 단백질의 발현을 SDS-PAGE로 확인하였다 (도 6).

[151] 실시예 9. B7-H6 변이체들의 NKp30 결합력 검증

[152] 상기 실시예 8에서 정제한 B7-H6 변이체-Fc 융합 단백질들의 NKp30 결합력을 분석하기 위해 ELISA를 진행하였다. 구체적으로, 0.05 M Na₂CO₃ pH 9.6에 4 µg/ml로 희석한 B7-H6 변이체-Fc 융합 단백질들을 Flat Bottom Polystyrene High

Bind 96웰 마이크로플레이트 (costar)에 50 μ l씩 분주하여 4 °C에서 16 시간 동안 고정화한 후 100 μ l의 4% 스킵 밀크 (Biopure) (in PBS, pH 7.4)로 상온에서 1 시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST (pH 7.4) 180 μ l로 4 회씩 세척한 뒤 1% 스킵 밀크 (Biopure) (in PBS, pH 7.4)로 연속 희석된 NKp30-GST를 50 μ l 각 웰에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 4 회 세척 후 anti-GST-HRP 컨쥬게이트 50 μ l을 넣어 상온에서 1 시간 동안 반응시키고 4 회 세척하였다. 그 후, 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific)을 50 μ l씩 첨가해 발색한 뒤 2 M H₂SO₄을 50 μ l씩 첨가하여 반응을 종료시킨 다음 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek)을 이용해 분석하였다.

[153] 그 결과, 선별한 3종의 변이체들 (B5, B7 및 B14)이 야생형 B7-H6 보다 현저히 높은 결합력을 나타냈다 (도 7).

[154] 실시예 10. B7-H6 변이체 추가 스크리닝

[155] 10-1. 초고속 스크리닝 기법을 사용하기 위한 거대 B7-H6 focused 라이브러리 제작

[156] 야생형 B7-H6와 일치하는 돌연변이를 제외하고 3종의 변이체 (B5, B7, B14)의 2곳의 아미노산 위치에 돌연변이를 도입하여 NKp30의 결합이 향상된 신규 B7-H6 변이체를 추가로 발굴하기 위한 라이브러리를 제작하였다. 라이브러리 유전자는 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 효모 표면 디스플레이(yeast surface display) 라이브러리를 구축하였다. 구축된 라이브러리는 1.5×10^7 크기였으며, 시퀀스 분석을 통해 2곳에 돌연변이가 들어간 것을 확인하였다 (도 8).

[157] 10-2. B7-H6 변이체 스크리닝

[158] 상기 실시예 5와 동일한 방법으로 라이브러리 샘플의 형광 신호 값 측정을 통해 NKp30에 높은 결합력을 가지는 효모들을 회수하였으며, 스크리닝 과정은 1회 진행하였다.

[159] 10-3. NKp30와의 결합력이 증가된 B7-H6 변이체들의 enrichment 확인

[160] 상기 실시예 6과 동일한 방법으로 라이브러리의 NKp30와의 결합력을 간접적으로 분석하였다. 그 결과, 한 번의 스크리닝 후 NKp30와의 결합력이 향상된 변이체들이 증폭된 것을 확인하였다 (도 9).

[161] 실시예 11. 추가 B7-H6 변이체들의 아미노산 서열 분석 및 선별

[162] 상기 실시예 7과 동일한 방법으로 형광 신호값 측정을 통해 변이체들의 발현 양 및 NKp30와의 결합력을 간접적으로 분석하였다. 이를 통해 NKp30와의 결합력이 향상된 총 9종의 변이체 (BF2, BF3, BF5, BF8, BF11, BF19, BF25, BF39 및 BF46)를 선별하였다 (표 2 및 도 10).

[163] [표2]

B7-H6 변이체	B7-H6 변이 위치 및 치환된 아미노산
B5	F51S/S60I
B6	N57D

B7	K101E/S102R
B8	A32T/S60I
B9	A32T/L40Q/S60I
B14	F51L/S60I
B16	K101E
B19	A32T/W67R/Q86L/K101E/L129M
B23	S60I/L114M/S142N
B29	M31I/A32T/F51I/S60I/S102C/R108M
B35	A32T/S60I/K101E/P143S
B40	I37T/Q86L/K101E
B41	A32T/S53G/S60I/Q136R
B47	F51Y/S60I
B52	S60I/K101E
B53	A32T/K101E
B54	A32T/S60I/K101E
BF2	F51H/S60I
BF3	F51I/S60Y
BF5	I37F/F51L/S60T
BF8	F51T/S60T
BF11	F51L/S60H
BF19	F51T/S60Y
BF25	F51Q/S60H
BF39	F51K/S60L
BF46	F51R/S60T

[164] 실시예 12. 추가 확보한 **B7-H6** 변이체들의 동물세포 발현백터 제조 및 발현, 정제

[165] 상기 실시예 11에서 선별한 9종의 변이체(BF2, BF3, BF5, BF8, BF11, BF19, BF25, BF39 및 BF46)를 이용하여 상기 실시예 8과 동일한 방법으로 동물세포 발현백터 제조, 발현 및 정제하고, SDS-PAGE로 야생형 **B7-H6**, 추가 발굴한 변이체 9종 모두 잘 발현되었음을 확인하였다 (도 11).

[166] 실시예 13. 본 발명의 **B7-H6** 변이체들의 **NKp30** 결합력 검증

- [167] 초기 발굴한 3종의 변이체들 (B5, B7 및 B14), 및 추가 발굴한 변이체들 중 NKp30 결합력이 가장 높은 3종 (BF2, BF8 및 BF19)에 대해서 ELISA를 상기 실시예 9와 동일한 방법으로 진행한 결과, 본 발명에서 발굴한 모든 변이체들이 야생형 B7-H6 보다 현저히 높은 결합력을 나타냈다 (도 12).

청구범위

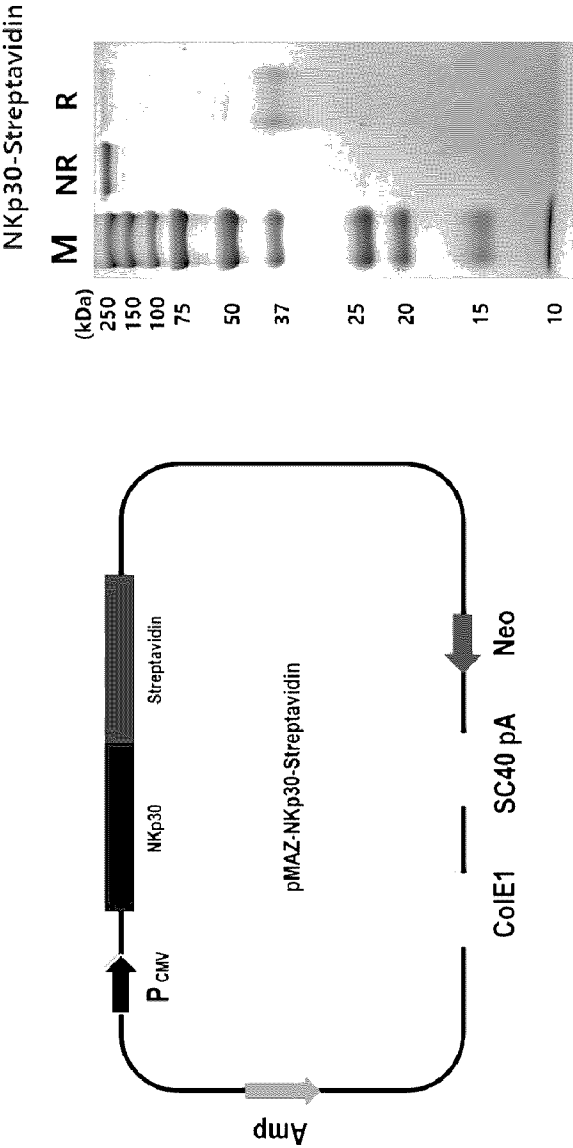
- [청구항 1] 야생형(Wild type) B7-H6(B7 homolog 6, NCR3LG1)의 아미노산 서열 중 31번째, 32번째, 37번째, 40번째, 51번째, 53번째, 57번째, 60번째, 67번째, 86번째, 101번째, 102번째, 108번째, 114번째, 129번째, 136번째, 142번째 및 143번째 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산이 야생형의 아미노산과 다른 서열로 치환된, NKp30(Natural cytotoxicity triggering receptor 3)와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 야생형 B7-H6의 아미노산은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, M31I, A32T, I37T, I37F, L40Q, F51I, F51S, F51L, F51Y, F51T, F51H, F51Q, F51K, F51R, S53G, N57D, S60I, S60Y, S60T, S60H, S60L, W67R, Q86L, K101E, S102C, S102R, R108M, L114M, L129M, Q136R, S142N 및 P143S로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 아미노산 치환 F51S 및 S60I를 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 아미노산 치환 K101E 및 S102R를 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서, 아미노산 치환 A32T 및 S60I를 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 7] 제 1항에 있어서, 아미노산 치환 A32T, L40Q 및 S60I를 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 8] 제 1항에 있어서, 아미노산 치환 F51L 및 S60I를 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 9] 제 1항에 있어서, 아미노산 치환 A32T, W67R, Q86L, K101E 및 L129M를 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 10] 제 1항에 있어서, 아미노산 치환 S60I, L114M 및 S142N를 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 11] 제 1항에 있어서, 아미노산 치환 M31I, A32T, F51I, S60I, S102C 및 R108M를 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 12] 제 1항에 있어서, 아미노산 치환 A32T, S60I, K101E 및 P143S를 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 13] 제 1항에 있어서, 아미노산 치환 I37T, Q86L 및 K101E를 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 14] 제 1항에 있어서, 아미노산 치환 A32T, S53G, S60I 및 Q136R를 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.

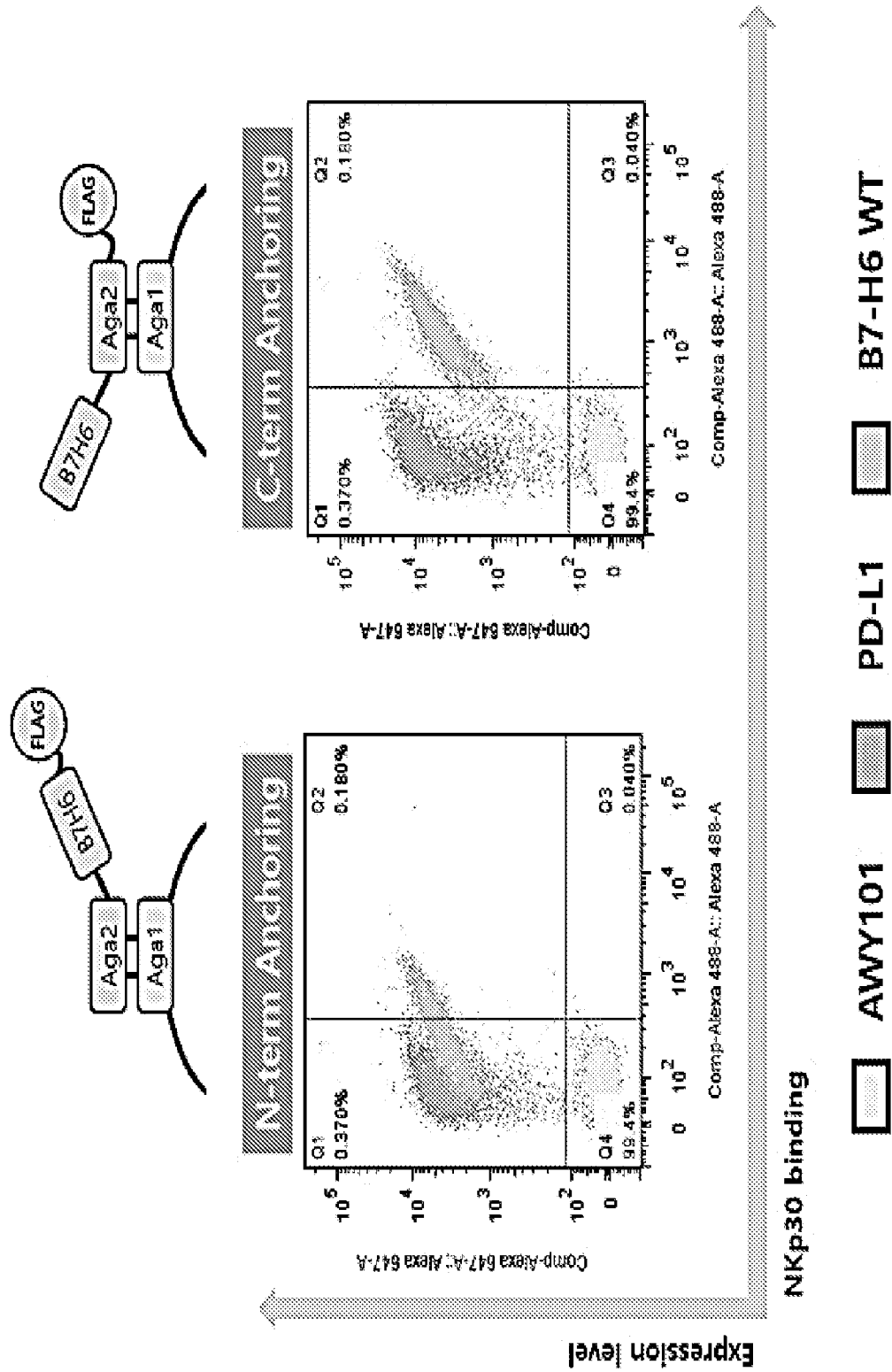
- [청구항 15] 제 1항에 있어서, 아미노산 치환 F51Y 및 S60I를 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 16] 제 1항에 있어서, 아미노산 치환 S60I 및 K101E를 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 17] 제 1항에 있어서, 아미노산 치환 A32T 및 K101E를 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 18] 제 1항에 있어서, 아미노산 치환 A32T, S60I 및 K101E를 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 19] 제 1항에 있어서, 아미노산 치환 F51H 및 S60I를 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 20] 제 1항에 있어서, 아미노산 치환 F51I 및 S60Y를 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 21] 제 1항에 있어서, 아미노산 치환 I37F, F51L 및 S60T를 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 22] 제 1항에 있어서, 아미노산 치환 F51T 및 S60T를 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 23] 제 1항에 있어서, 아미노산 치환 F51L 및 S60H를 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 24] 제 1항에 있어서, 아미노산 치환 F51T 및 S60Y를 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 25] 제 1항에 있어서, 아미노산 치환 F51Q 및 S60H를 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 26] 제 1항에 있어서, 아미노산 치환 F51K 및 S60L를 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 27] 제 1항에 있어서, 아미노산 치환 F51R 및 S60T를 포함하는, NKp30와의 결합력이 증대된 B7-H6 변이체.
- [청구항 28] 제 1항의 B7-H6 변이체를 포함하는 자연 살해 세포(natural killer cell, NK cell) 활성화제.
- [청구항 29] 제 1항의 B7-H6 변이체 및 표적 항원에 결합하는 부분을 포함하는 이중특이적 또는 다중특이적 항체.
- [청구항 30] 제 29항에 있어서, 표적 항원은 17-1A 항원, GD3 갱글리오시드 R24, EGFRvIII, PSMA, PSCA, HLA-DR, EpCAM, MUC1 코어 단백질, 이상 글리코실화 MUC1, ED-B 도메인을 함유하는 피브로넥틴 이형, HER2/neu, 암종배아성 항원(CEA), 가스트린-방출 펩티드(GRP) 수용체 항원, 뮤신(mucine) 항원, 표피 성장 인자 수용체(EGF-R), HER3, HER4, MAGE 항원, SART 항원, MUC1 항원, c-erb-2 항원, TAG 72, 탄산 무수화효소 IX(carbonic anhydrase IX), 알파-태아단백질(alpha-fetoprotein), A3, A33 항체에 특이적인 항원, Ba 733, BrE3-항원, CA125, CD1, CD1a, CD3, CD5,

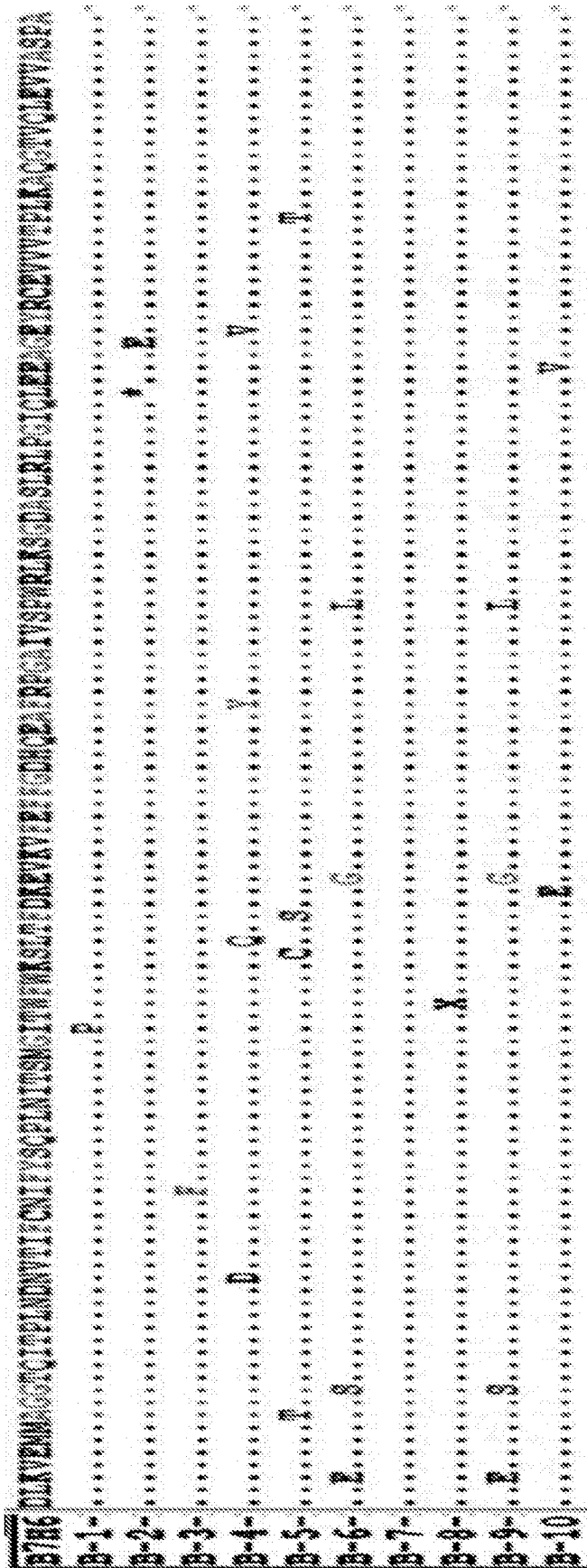
CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD33, CD38, CD40, CD45, CD52, CD74, CD79a, CD80, CD138, 결장-특이적 항원-p(CSAp), CSAp, EGP-1, EGP-2, Ep-CAM, Flt-1, Flt-3, 폴산염 수용체(folate receptor), HLA-DR, 인간 융모성 성선자극호르몬(HCG) 및 그 소단위체들, 저산소증 유도 인자(HIF-1), Ia, IL-2, IL-6, IL-8, 인슐린 성장 인자-1(IGF-1), KC4-항원, KS-1-항원, KSI-4, Le-Y, 대식세포 억제 인자(MIF), MAGE, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, NCA66, NCA95, NCA90, PAM-4 항체에 특이적인 항원, 태반 성장 인자, p53, 전립선 산성 포스파타제(prostatic acid phosphatase), PSA, RS5, SIOO, TAC, 테나신(tenascin), TRAIL 수용체들, Tn 항원, 톰슨-프리덴라이히(Thomson-Friedenreich) 항원들, 종양 괴사 항원들, VEGF, ED-B 피브로넥틴(fibronectin), 혈관형성 표지(angiogenesis marker), 종양유전자 표지(oncogene marker) 또는 종양유전자 생성물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 이중특이적 또는 다중특이적 항체.

- [청구항 31] 제 1항의 B7-H6 변이체 또는 제 29항의 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 포함하는, 암의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.
- [청구항 32] i) 자연 살해 세포를 분리하는 단계; 및
#) 제 1항의 B7-H6 변이체 또는 이의 단편의 존재 하에 상기 분리된 자연 살해 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 활성화된 자연살해세포의 생체 외 증식 방법.
- [청구항 33] 제 1항의 B7-H6 변이체 또는 제 29항의 이중특이적 또는 다중특이적 항체의 암의 예방 또는 치료 용도.
- [청구항 34] 제 1항의 B7-H6 변이체 또는 제 29항의 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 약학적으로 유효한 양으로 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법.

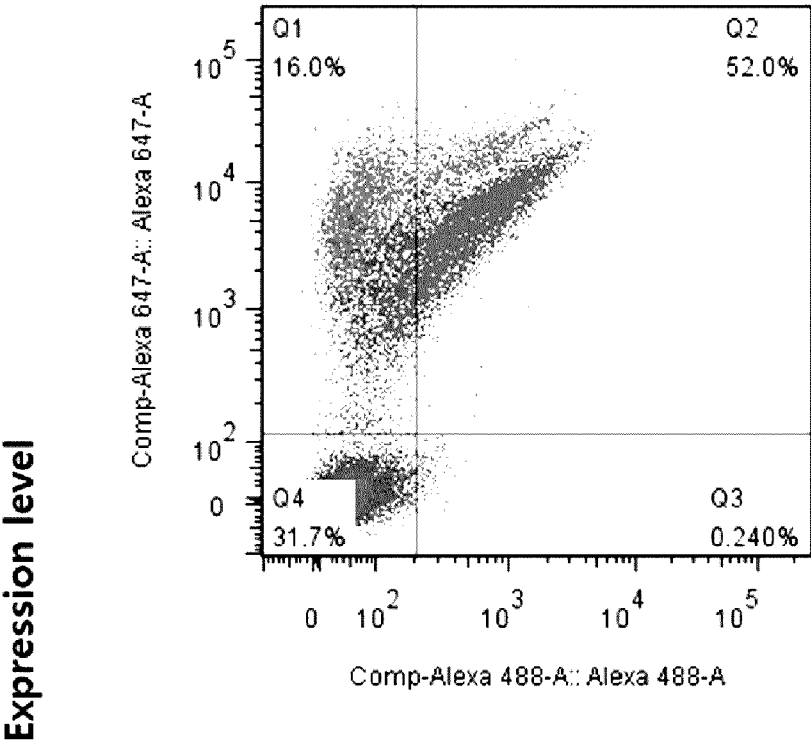
[Figure 1]







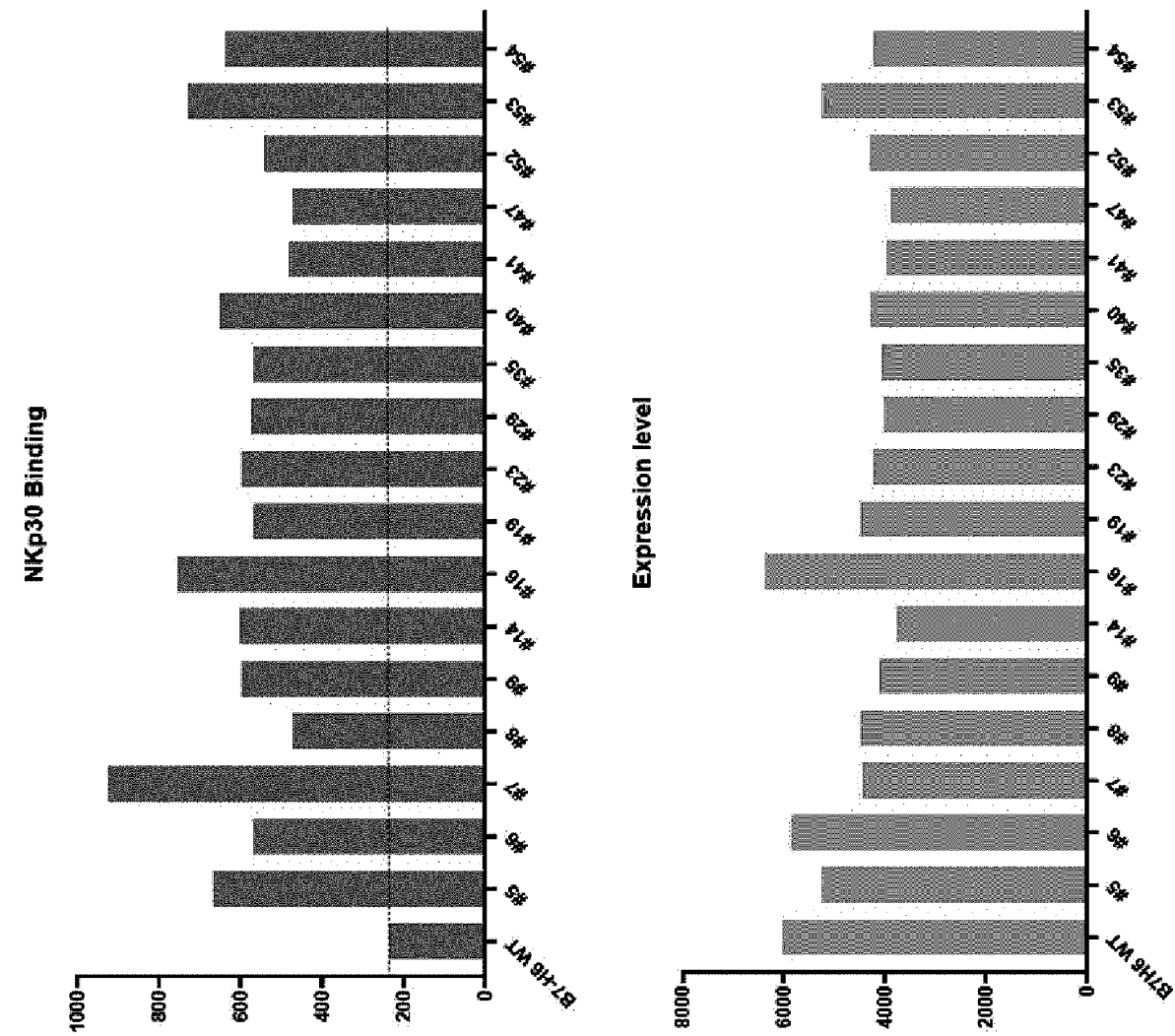
[도4]



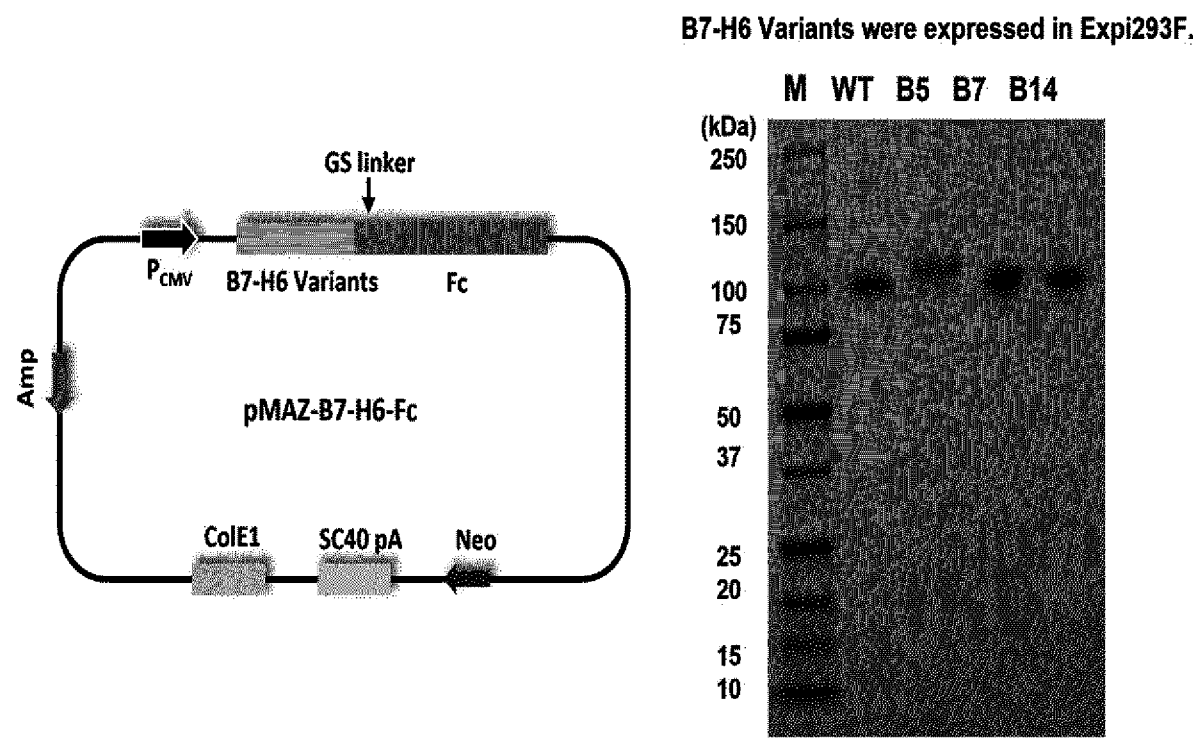
NKp30 binding

 **Initial**  **4 Round**

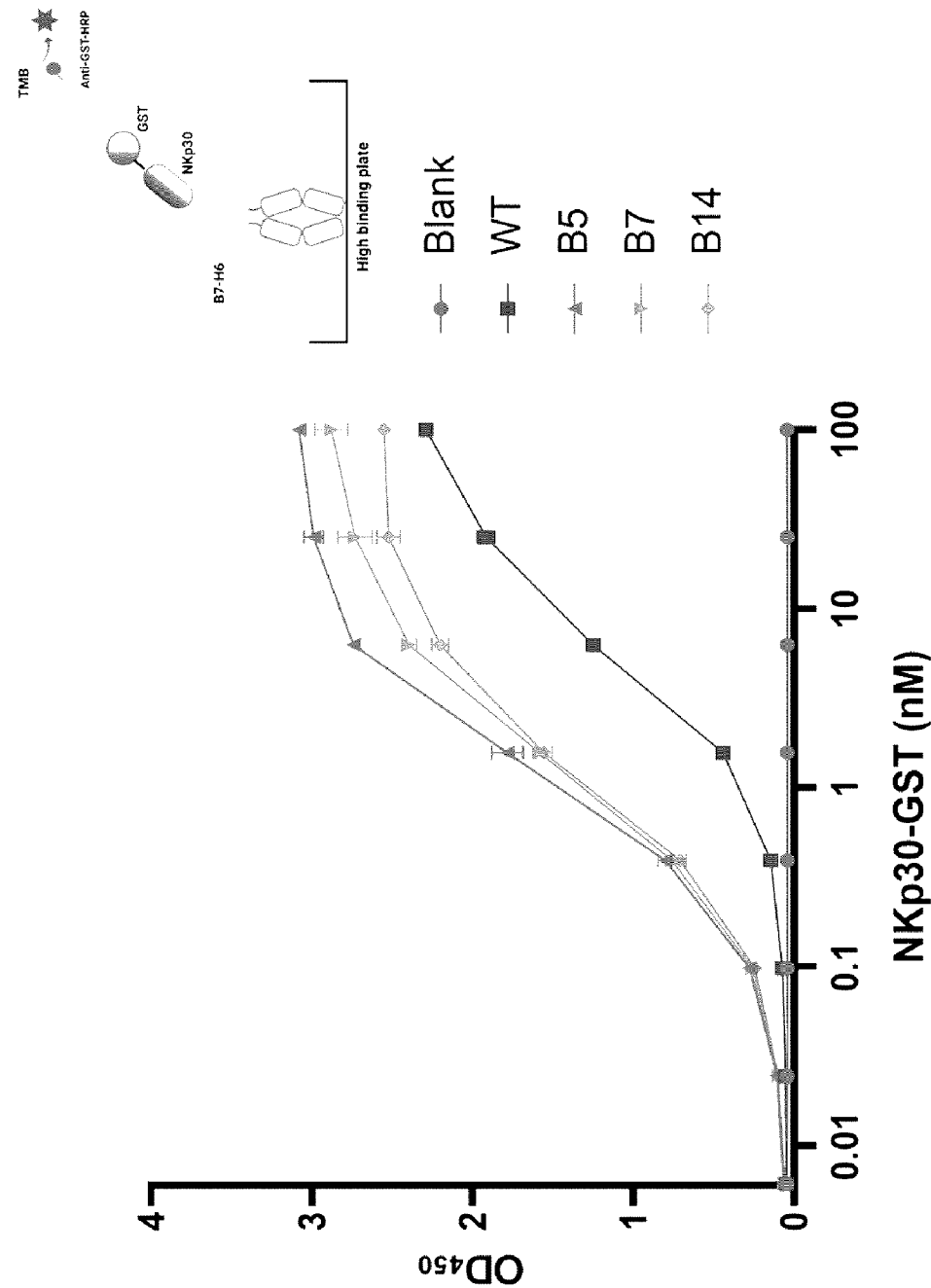
[도5]



[도6]



[도7]



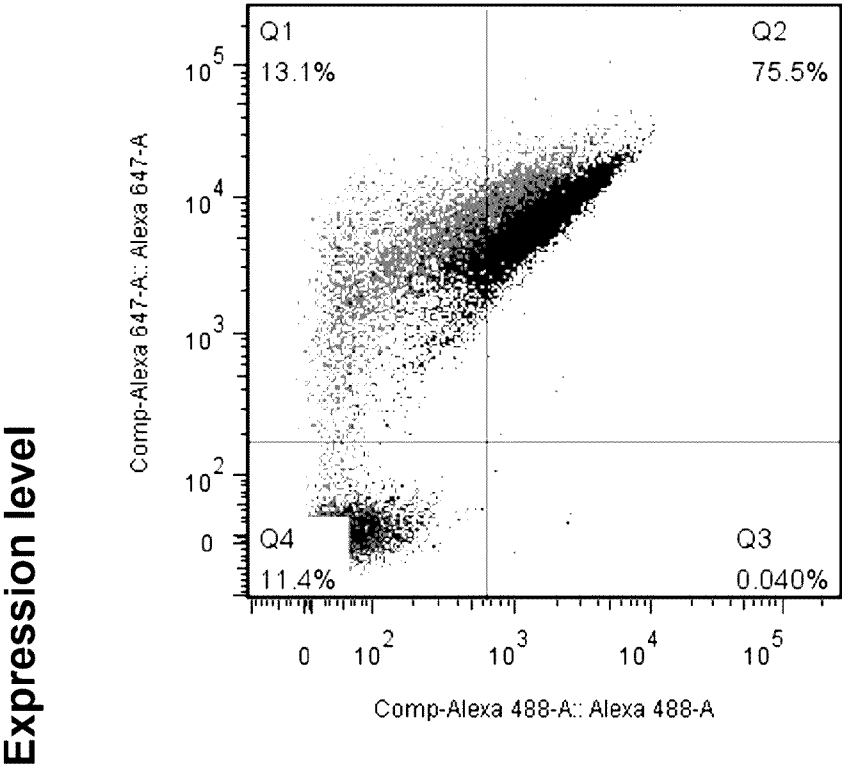
✓ ER

B7-H6 WT	DLKVENMAGGCTCITPINDNVITTCNIFYSQPINITSMGITWFKSLTFEDAEVKVVEEFSDHCEAFRPGAIUSPWRKLSGDSIRLPGICIEEAESEYRCVWVVTFLKQCTVQIEVWASPA
7-FW	ER
SNA664311-	N
SNA664311-	NE
SNA664311-	N
SNA664311-	LI
SNA664311-	EC
SNA664311-	CK
SNA664311-	HE
SNA664311-	EC
SNA664311-	*D
SNA664311-	HL
SNA664311-	NE

✓ SI/LI

B7-H6 WT	DLKVENMAGGCTCITPINDNVITTCNIFYSQPINITSMGITWFKSLTFEDAEVKVVEEFSDHCEAFRPGAIUSPWRKLSGDSIRLPGICIEEAESEYRCVWVVTFLKQCTVQIEVWASPA
5-FW	S
14-FW	L
SNA664317-N	P
SNA664317-	T
SNA664317-	R
SNA664317-	E
SNA664317-	P
SNA664317-	R
SNA664317-	C
SNA664317-	M
SNA664317-	W
SNA664317-	K

[도9]



NKp30 binding

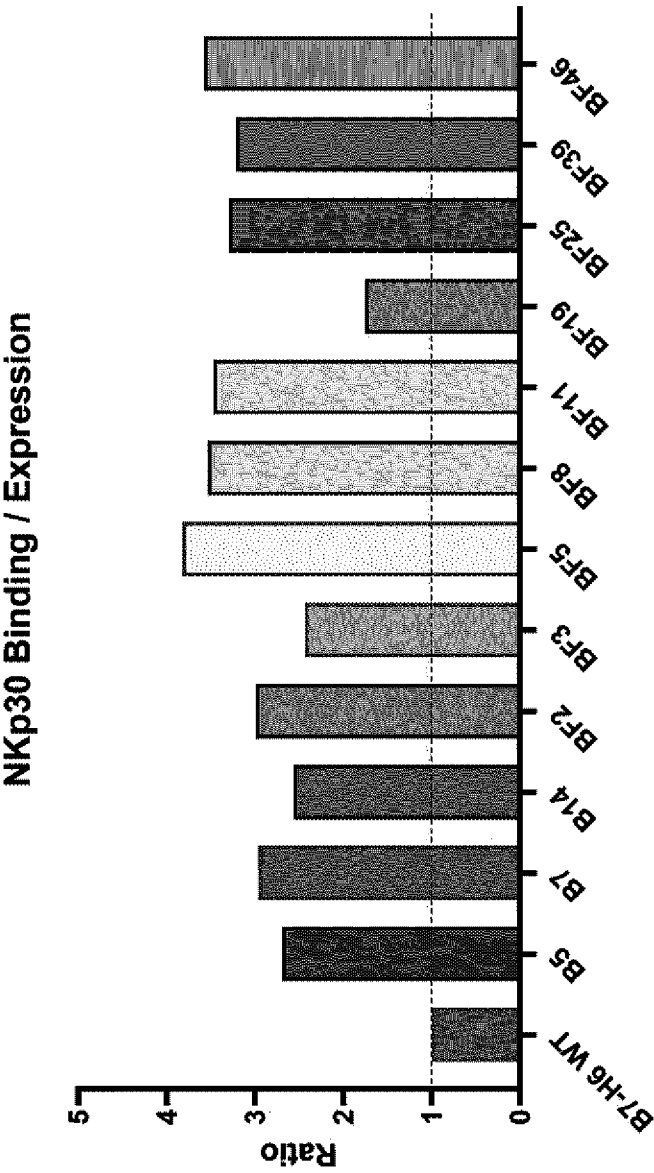


Initial



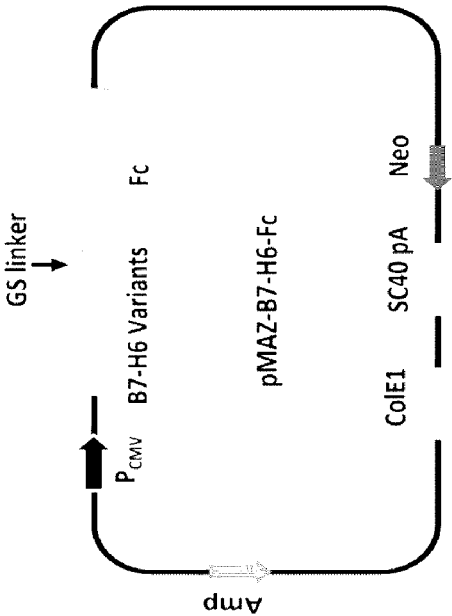
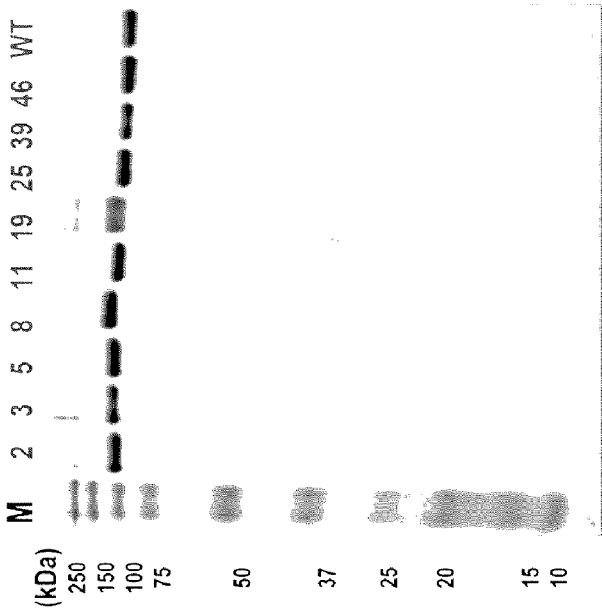
1 Round

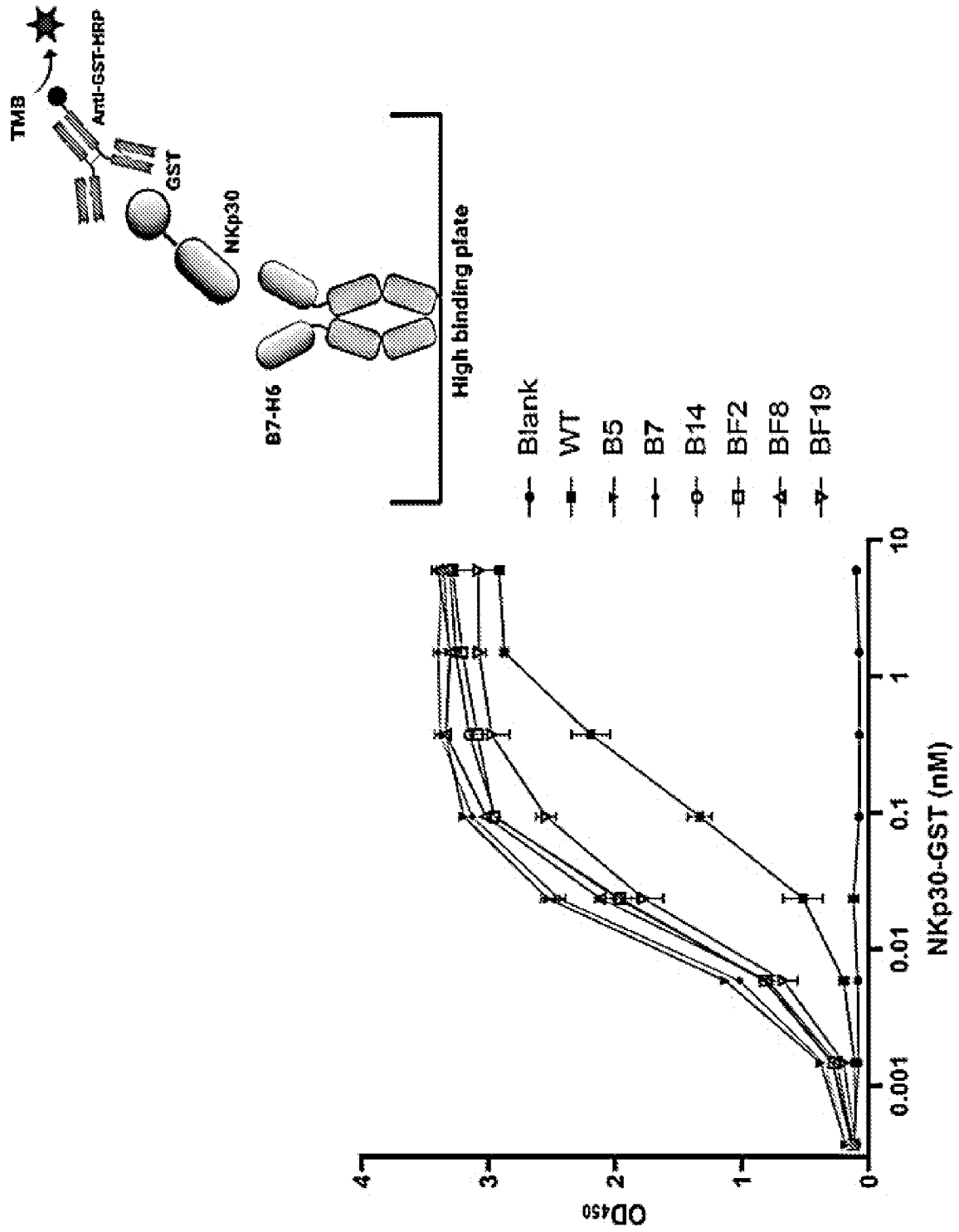
[도10]



[E11]

B7-H6 Variants were expressed in Expi293F.





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/008393

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/705(2006.01)i; 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 14/705(2006.01); A61K 39/395(2006.01); C07K 16/28(2006.01); C07K 16/30(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: B7-H6(B7 homolog 6, NCR3LG1), 치환(substitution), 변이(mutant), 결합력(binding activity), NKp30(Natural cytotoxicity triggering receptor 3), 자연 살해 세포(natural killer cell), 활성화제(activator), 배양(culture), 표적항원(target antigen), 암(cancer), 치료(treatment), 예방(prevention), 제약(drug)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2010-0091950 A (ZYMOGENETICS, INC.) 19 August 2010 (2010-08-19) See abstract, claim 1, paragraphs [0013], [0032], [0036], [0098]-[0101], [0118]-[0123], [0128]-[0132], [0164]-[0165] and [0373]-[0375], table 2, and SEQ ID NO: 2.	1-33
A	WO 2011-070443 A1 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 16 June 2011 (2011-06-16) See entire document.	1-33
A	US 11291721 B2 (MARENGO THERAPEUTICS, INC.) 05 April 2022 (2022-04-05) See entire document.	1-33
A	JOYCY, M. G. et al. Crystal structure of human natural cytotoxicity receptor NKp30 and identification of its ligand binding site. PNAS. 2011, vol. 108, no. 15, pp. 6223-6228. See entire document.	1-33

☒ 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

25 September 2023

Date of mailing of the international search report

25 September 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/KR2023/008393**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SKOREPA, O. et al. Natural killer cell activation receptor NKp30 oligomerization depends on its N-glycosylation. Cancer. 2020, vol. 12, no. 1998, pp. 1-24. See entire document.	1-33
A	NCBI. Genbank accession no. AIC53717.1 (19 March 2015). See entire document.	1-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/008393

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/KR2023/008393

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.: **34**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 34 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/KR2023/008393

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2010-0091950	A	19 August 2010	CN	102099055	A	15 June 2011
				EP	2197489	A2	23 June 2010
				EP	2197489	B1	10 May 2017
				EP	2197489	B2	01 April 2020
				EP	3241846	A1	08 November 2017
				EP	3241846	B1	23 February 2022
				JP	2011-512786	A	28 April 2011
				JP	2014-003983	A	16 January 2014
				JP	2014-005290	A	16 January 2014
				JP	2014-005291	A	16 January 2014
				JP	5496897	B2	21 May 2014
				JP	5841575	B2	13 January 2016
				JP	5887320	B2	16 March 2016
				US	10005837	B2	26 June 2018
				US	2009-0220502	A1	03 September 2009
				US	2011-0081346	A1	07 April 2011
				US	2015-0175702	A1	25 June 2015
				US	2018-0258172	A1	13 September 2018
				US	7858759	B2	28 December 2010
				US	8969518	B2	03 March 2015
				WO	2009-046407	A2	09 April 2009
				WO	2009-046407	A3	19 May 2011
WO	2011-070443	A1	16 June 2011	CN	102741290	A	17 October 2012
				CN	102741290	B	22 April 2015
				CN	104926942	A	23 September 2015
				CN	104926942	B	14 September 2018
				EP	2510011	A1	17 October 2012
				EP	2510011	B1	17 September 2014
				JP	2013-513380	A	22 April 2013
				JP	2017-031147	A	09 February 2017
				JP	6212181	B2	11 October 2017
				US	2013-0004432	A1	03 January 2013
				US	2015-0056214	A1	26 February 2015
				US	8822652	B2	02 September 2014
				US	9663577	B2	30 May 2017
US	11291721	B2	05 April 2022	CN	109153728	A	04 January 2019
				EP	3433281	A1	30 January 2019
				JP	2019-512272	A	16 May 2019
				JP	2022-088627	A	14 June 2022
				JP	7082604	B2	08 June 2022
				US	2017-0368169	A1	28 December 2017
				US	2022-0288200	A1	15 September 2022
				WO	2017-165464	A1	28 September 2017

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 14/705(2006.01)i; 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 14/705(2006.01); A61K 39/395(2006.01); C07K 16/28(2006.01); C07K 16/30(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: B7-H6(B7 homolog 6, NCR3LG1), 치환(substitution), 변이(mutant), 결합력(binding activity), NKp30(Natural cytotoxicity triggering receptor 3), 자연 살해 세포(natural killer cell), 활성화제(activator), 배양(culture), 표적항원(target antigen), 암(cancer), 치료(treatment), 예방(prevention), 제약(drug)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2010-0091950 A (지모제텍스, 인코포레이티드) 2010.08.19 요약, 청구항 1, 단락 [0013], [0032], [0036], [0098]-[0101], [0118]-[0123], [0128]-[0132], [0164]-[0165], [0373]-[0375], 표 2, 서열번호 2	1-33
A	WO 2011-070443 A1 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 2011.06.16 전체 문헌	1-33
A	US 11291721 B2 (MARENGO THERAPEUTICS, INC.) 2022.04.05 전체 문헌	1-33
A	JOYCY, M. G. 등, "Crystal structure of human natural cytotoxicity receptor NKp30 and identification of its ligand binding site", PNAS, 2011, 제108권, 제15호, 페이지 6223-6228 전체 문헌	1-33
A	SKOREPA, O. 등, "Natural killer cell activation receptor NKp30 oligomerization depends on its N-glycosylation", Cancer, 2020, 제12권, 제1998호, 페이지 1-24 전체 문헌	1-33
☒ 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 2023년09월25일(25.09.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년09월25일(25.09.2023)
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

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	NCBI, Genbank accession no. AIC53717.1 (2015.03.19) 전체 문헌	1-33

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: **34**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 34는 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
KR 10-2010-0091950 A	2010/08/19	CN 102099055 A	2011/06/15
		EP 2197489 A2	2010/06/23
		EP 2197489 B1	2017/05/10
		EP 2197489 B2	2020/04/01
		EP 3241846 A1	2017/11/08
		EP 3241846 B1	2022/02/23
		JP 2011-512786 A	2011/04/28
		JP 2014-003983 A	2014/01/16
		JP 2014-005290 A	2014/01/16
		JP 2014-005291 A	2014/01/16
		JP 5496897 B2	2014/05/21
		JP 5841575 B2	2016/01/13
		JP 5887320 B2	2016/03/16
		US 10005837 B2	2018/06/26
		US 2009-0220502 A1	2009/09/03
		US 2011-0081346 A1	2011/04/07
		US 2015-0175702 A1	2015/06/25
		US 2018-0258172 A1	2018/09/13
		US 7858759 B2	2010/12/28
		US 8969518 B2	2015/03/03
		WO 2009-046407 A2	2009/04/09
		WO 2009-046407 A3	2011/05/19
WO 2011-070443 A1	2011/06/16	CN 102741290 A	2012/10/17
		CN 102741290 B	2015/04/22
		CN 104926942 A	2015/09/23
		CN 104926942 B	2018/09/14
		EP 2510011 A1	2012/10/17
		EP 2510011 B1	2014/09/17
		JP 2013-513380 A	2013/04/22
		JP 2017-031147 A	2017/02/09
		JP 6212181 B2	2017/10/11
		US 2013-0004432 A1	2013/01/03
		US 2015-0056214 A1	2015/02/26
		US 8822652 B2	2014/09/02
		US 9663577 B2	2017/05/30
US 11291721 B2	2022/04/05	CN 109153728 A	2019/01/04
		EP 3433281 A1	2019/01/30
		JP 2019-512272 A	2019/05/16
		JP 2022-088627 A	2022/06/14
		JP 7082604 B2	2022/06/08
		US 2017-0368169 A1	2017/12/28
		US 2022-0288200 A1	2022/09/15
		WO 2017-165464 A1	2017/09/28