

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2023년 3월 23일 (23.03.2023) WIPO | PCT

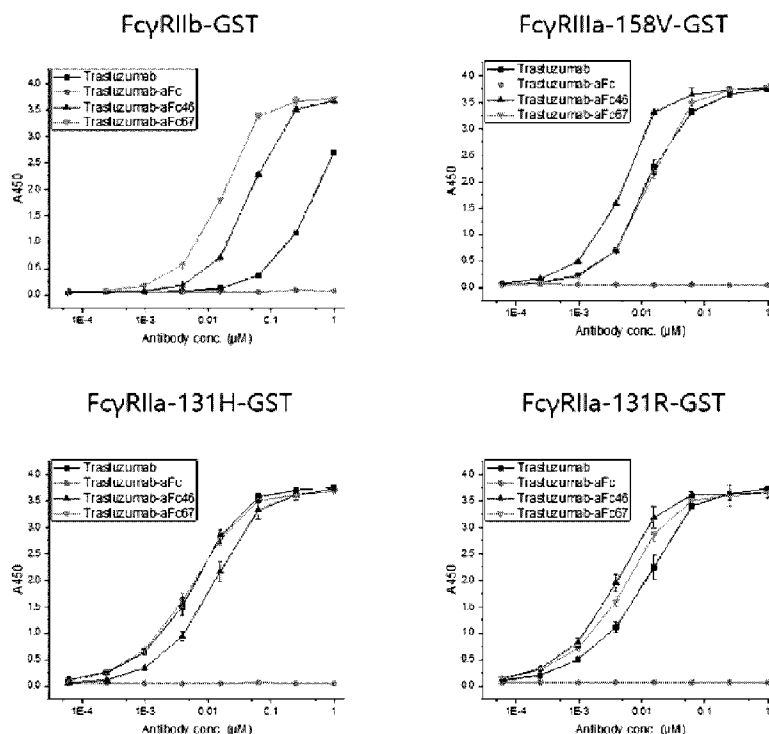


(10) 국제공개번호
WO 2023/043125 A1

- (51) 국제특허분류: C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2022/013489
- (22) 국제출원일: 2022년 9월 7일 (07.09.2022)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2021-0124540 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).
- (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,

(54) Title: FC VARIANT WITH ENHANCED BINDING TO VARIOUS FC GAMMA RECEPTORS

(54) 발명의 명칭: 다양한 FC 감마 수용체들과의 결합력이 증대된 FC 변이체



(57) Abstract: The present invention relates to an aglycosylated Fc variant with improved binding ability to various Fc-gamma variants, i.e., FcγR IIa, FcγR IIIa, and FcγR IIb. Human antibody Fc domain variants of the present invention have improved binding ability not only to FcγRIIa and FcγRIIIa that are activating receptors, but to FcγRIIb that is an inhibitory Fc receptor, among Fc-gamma receptors, and particularly, have significantly increased binding ability to FcγRIIb, and thus can be used as antibody drugs useful for apoptosis of target cells that require a low A/I ratio. As an aglycosylated variant, it has no problem with glycan heterogeneity of a protein therapeutic agent, and mass production of the variant is inexpensive and easy even in bacteria, resulting in the effect of enabling the manufacture of biopharmaceuticals without problems caused by cell lines, culture processes, and purification processes.

[다음 쪽 계속]

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))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 다양한 Fc 감마 수용체, 즉, FcγR IIa, FcγR IIIa 및 FcγR IIb에 대한 결합력이 향상된 무당화 Fc 변이체에 관한 것으로, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체들은 Fc 감마 수용체 중 활성화 수용체인 FcγR IIa와 FcγR IIIa뿐만 아니라 저해 수용체인 FcγRIIb에 대한 결합력이 향상되었으며, 특히, FcγR IIb에 대한 결합력이 현저히 높아졌으므로, 낮은 A/I 비율이 요구되는 표적 세포 사멸에 유용한 항체 의약품으로 이용될 수 있고, 무당화 변이체이므로 단백질 치료제의 당화 비균질성(glycan heterogeneity) 문제점이 없으며, 박테리아에서도 저렴하게 대량 생산이 용이하고, 세포주, 배양공정 및 정제공정에 따른 문제가 없는 생물의약품 제조가 가능한 효과가 있다.

명세서

발명의 명칭: 다양한 FC 감마 수용체들과의 결합력이 증대된 FC 변이체

기술분야

- [1] 본 발명은 다양한 Fc 감마 수용체와의 결합력이 증대된 Fc 변이체에 관한 것으로, FcγRIIa, FcγRIIIa 및 FcγRIIb에 대한 결합력이 향상된 무당화 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 면역글로불린에 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, 또는 ADCC 라 알려짐), 염증 매개체의 방출, 태반 이동 및 면역글로불린 생성의 제어를 포함하여 중요하고도 다양한 여러 생물학적 반응을 촉발한다 (Deo, Y.M. et al., Immunol. Today 18(3):127-135 (1997)). 이와 같이, Fc 도메인은 면역세포의 모집과 ADCC(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) 및 ADCP(antibody dependent cellular phagocytosis)에 결정적인 역할을 하며, 특히, 항체의 effector function인 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 막마지 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.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명의 목적은 다양한 Fc 감마 수용체들(Fc γ Rs)과의 결합력이 증대된 무당화 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 제공하는 것이다.
- [6] 또한, 본 발명의 목적은 다양한 Fc 감마 수용체들과의 결합력이 향상된 무당화 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 제공하는 것이다.
- [7] 또한, 본 발명의 목적은 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [8] 또한, 본 발명의 목적은 다양한 Fc 감마 수용체들과의 결합력이 증대된 무당화 인간 항체 Fc 도메인 변이체의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [9] 또한, 본 발명의 목적은 다양한 Fc 감마 수용체들과의 결합력이 향상된 무당화 항체의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [10] 또한, 본 발명의 목적은 항체 치료제의 제조에 사용하기 위한, Fc 감마 수용체에 특이적인 무당화 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 용도를 제공하는 것이다.
- [11] 또한, 본 발명의 목적은 Fc 감마 수용체에 특이적인 무당화 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 암의 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.
- [12] 아울러, 본 발명의 목적은 Fc 감마 수용체에 특이적인 무당화 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 약학적으로 유효한 양으로 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [13] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 다양한 Fc 감마 수용체들과의 결합력이 증대된 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 제공한다.

- [14] 또한, 본 발명은 Fc 도메인 변이체를 포함하는 다양한 Fc 감마 수용체들과의 결합력이 증대된 무당화 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 Fc 도메인 변이체, 또는 이를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 다양한 Fc 감마 수용체들과의 결합력이 증대된 인간 항체 Fc 도메인 변이체의 제조방법을 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 다양한 Fc 감마 수용체들과의 결합력이 증대된 무당화 항체의 제조방법을 제공한다.
- [18] 또한, 본 발명은 항체 치료제의 제조에 사용하기 위한, Fc 감마 수용체에 특이적인 무당화 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 용도를 제공한다.
- [19] 또한, 본 발명은 Fc 감마 수용체에 특이적인 무당화 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 암의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [20] 아울러, 본 발명은 Fc 감마 수용체에 특이적인 무당화 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 약학적으로 유효한 양으로 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [21] 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체들은 Fc 감마 수용체 중 활성화 수용체인 FcγRIIIa와 FcγRIIIa뿐만 아니라 저해 수용체인 FcγRIIb에 대한 결합력이 향상되었으며, 특히, FcγRIIb에 대한 결합력이 현저히 높아졌으므로, 낮은 A/I 비율이 요구되는 표적 세포 사멸에 유용한 항체 의약품으로 이용될 수 있고, 무당화 변이체이므로 단백질 치료제의 당화 비균질성(glycan heterogeneity) 문제점이 없으며, 박테리아에서도 저렴하게 대량 생산이 용이하고, 세포주, 배양공정 및 정제공정에 따른 문제가 없는 생물의약품 제조가 가능한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [22] 도 1은 *E. coli* 내막에 디스플레이 된 무당화 Fc 변이체들의 FcγRIIIa 결합력을 FACS로 분석한 결과이다.
- [23] 도 2는 돌연변이들의 조합으로 제조된 무당화 Fc 변이체들 aFc-S1 내지 12 및 실시예 1에서 선별된 무당화 Fc 변이체들 aFc34, aFc43, aFc46 및 aFc67의 FcγRIIIa에 대한 결합력 (A) 및 FcγRIIIa에 대한 선택적 결합력 (B)을 FACS로 분석한 결과이다.
- [24] 도 3은 무당화 Fc 변이체가 포함된 트라스트주맙 Fc 변이체를 Expi293F 세포에서 발현 및 정제한 후 SDS-PAGE로 확인한 도이다.
- [25] 도 4는 무당화 Fc 변이체가 포함된 트라스트주맙 Fc 변이체들의 FcγRs에 대한 결합력을 ELISA로 분석한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib(α -아미노이소부티르산), Sar(N-methylglycine) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 발명에서 약어로 언급된 아미노산은 하기와 같이 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다:
- [30] 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.
- [31] 일 측면에서, 본 발명은 야생형(Wild type) 인간 항체 Fc 도메인에서, 카바트 넘버링 시스템(Kabat numbering system)에 따라 넘버링된 239, 262, 264, 292, 299, 300, 350, 358, 382, 390, 392, 396, 399, 401, 414 및 428 위치의 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 위치의 아미노산이 야생형의 아미노산과 다른 서열로 치환된, Fc 감마 수용체(Fc γ R)와의 결합력이 증대된 인간 항체 Fc 도메인 변이체에 관한 것이다.
- [32] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체는 S239D, V262A, V264E, R292P, T299A, Y300L, T350A, L358P, E382V, N390S/N390G, K392E, P396L, D399G, D401N, K414R 및 M428L로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

- [33] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체는 V264E, T299A 및 E382V의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [34] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체는 S239D, V264E, R292P, T299A, Y300L, E382V, D399G, K414R 및 M428L의 아미노산 치환을 포함하는 aFc46일 수 있다.
- [35] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체는 V262A, V264E, T299A, T350A, E382V, N390S 및 P396L의 아미노산 치환을 포함하는 aFc67일 수 있다.
- [36] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체는 V264E, T299A, T350A, L358P, E382V 및 N390G의 아미노산 치환을 포함하는 aFc34; 또는 V264E, R292P, T299A, Y300L, T350A, E382V, K392E, P396L 및 D401N의 아미노산 치환을 포함하는 aFc43일 수 있다.
- [37] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체는 FcγRIIIa, FcγRIIa 및 FcγRIIb에 대한 결합력이 향상된 Fc 도메인 변이체일 수 있다.
- [38] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체는 FcγRIIb에 대한 결합력이 향상되어, 기존의 변이체들보다 FcγRIIb 결합에 의한 작용 효과(agonistic effect)가 추가되어, 특정 항원 (DR5, CD40, GITR, OX-40 또는 4-1BB 등)에 대해 극대화된 치료효과를 보일 수 있다.
- [39] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체는 낮은 A/I 비율 (FcγRIIIa 결합력/FcγRIIb 결합력)을 가질 수 있다.
- [40] 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 항체인 것이 바람직하고, 트라스트주맙인 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).
- [41] 일 구현예에서, 야생형 인간 항체의 Fc 영역은 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 서열번호 17의 핵산분자로 코딩될 수 있다.
- [42] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체는 서열번호 12 내지 16의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [43] 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).
- [44] 본 발명에서 사용된, 용어 "Fc 도메인 변이체"는 "Fc 변이체"와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [45] 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.

- [46] 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.
- [47] 본 명세서에 사용된 용어 "Fc 변이체"는 야생형 항체 Fc 도메인과 비교하여 하나 이상의 아미노산 잔기의 변형을 포함하는 것을 의미한다. 바람직하게는, 본 발명에서 Fc 변이체는 S239D, V262A, V264E, R292P, T299A, Y300L, T350A, L358P, E382V, N390S/N390G, K392E, P396L, D399G, D401N, K414R 및 M428L (상기 넘버링은 카바트에 기재된 EU 인덱스에 따른 것임)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 잔기의 변형을 포함하여 야생형 항체 Fc 도메인 (영역)에 비해 Fc 감마 수용체에 대한 선택적 결합력이 증가된다.
- [48] 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.
- [49] 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.
- [50] 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.

- [51] 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.
- [52] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 변이체를 포함하는 Fc 감마 수용체에 특이적인 무당화 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편에 관한 것이다.
- [53] 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 서열번호 1 내지 5의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 2(CH2) 및 서열번호 6 내지 10의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 3(C_H3)를 포함할 수 있다.
- [54] 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.
- [55] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 효과기 작용을 증가시킬 수 있으며, 활성화 수용체인 FcγRIIa와 FcγRIIIa 뿐만 아니라 저해 수용체인 FcγRIIb에 대한 결합력이 향상되었으며, 특히, FcγRIIb에 대한 결합력이 향상되었으므로, ADCC(antibody dependent cellular cytotoxicity) 및 ADCP(Antibody-dependent cellular phagocytosis)를 비롯한 FcγRIIb 결합 매개의 세포 사멸(apoptosis) 및 T 세포 활성화 유도 등의 작용 효과(agonistic effect)를 유도함으로써 복합적 면역 반응 일으키므로 항체 의약품의 치료 효율을 획기적으로 개선할 수 있다.
- [56] 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.

- [57] 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.
- [58] 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.
- [59] 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.
- [60] 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.
- [61] 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.

- [62] 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.
- [63] 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.
- [64] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 도메인 변이체, 또는 이를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산분자에 관한 것이다.
- [65] 일 측면에서, 본 발명은 상기 핵산분자를 포함하는 벡터, 상기 벡터를 포함하는 숙주세포에 관한 것이다.
- [66] 일 구현예에서, 본 발명에 따른 Fc 변이체를 코딩하는 핵산분자는 18 내지 22의 염기서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [67] 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 연결된 DNA 서열들이 인접하여 위치함을 의미하며, 분비 리더의 경우 인접하여 동일한 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다.

그러나 인헨서는 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.

- [68] 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.

- [69] 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.

- [70] 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 인헨서 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.

- [71] 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).
- [72] 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.
- [73] 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.
- [74] 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.
- [75] 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.
- [76] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 치료제에 관한 것이다.
- [77] 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.

- [78] 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), 리툽시맙(rituximab), 바실릭시맙(basiliximab), 인플릭시맙(infliximab), 이필리무맙(Ipilimumab), 펌브롤리주맙(Pembrolizumab), 니볼루맙(Nivolumab), 아테졸리주맙(Atezolizumab) 또는 아벨루맙(Avelumab)일 수 있다.
- [79] 항체 치료제에서 타깃 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.
- [80] 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.
- [81] 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, 신장세포암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [82] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 면역원성 세포사멸 유도제를 추가로 포함할 수 있으며, 면역원성 세포사멸 유도제는 안트라사이클린계열 항암제, 탁산 계열 항암제, 항-EGFR 항체, BK 채널 작용제, 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, 탁산계열 항암제는

파클리탁셀(paclitaxel) 또는 도세탁셀(docetaxel)일 수 있다.

- [83] 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.
- [84] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 암의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [85] 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.
- [86] 본 발명에서 유효성분과 결합하여 사용된 "치료학적으로 유효한 양"이란 용어는 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 조성물의 약학적으로 허용가능한 염의 양을 의미하며, 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack Publishing Co.에 기술되어있다.
- [87] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 암의 종류, 중증도, 약물의

활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [88] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 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.
- [89] 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 것이라면 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 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.
- [90] 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.
- [91] 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.

- [92] 본 발명은 상기 Fc 도메인 변이체를 비펩타이드성 중합체를 통해 생리활성 폴리펩타이드에 공유결합으로 연결하여 지속성 약물 제제를 제조하는 방법을 포함한다.
- [93] 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.
- [94] 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, Fc 감마 수용체와의 결합력이 증대된 인간 항체 Fc 도메인 변이체의 제조방법에 관한 것이다.
- [95] 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 Fc 감마 수용체에 특이적인 무당화 항체의 제조방법에 관한 것이다.
- [96] 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.
- [97] 일 측면에서, 본 발명은 항체 치료제의 제조에 사용하기 위한, 본 발명의 Fc 감마 수용체에 특이적인 무당화 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 용도에 관한 것이다.
- [98] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 감마 수용체에 특이적인 무당화 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 암의 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다.
- [99] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 감마 수용체에 특이적인 무당화 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

- [100] 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.
- [101] 실시예 1. 활성화 FcγRIIIa에 대한 결합력이 향상된 무당화 Fc 변이체 선별
- [102] 모든 FcγRs의 결합력이 결핍된 무당화 Fc를 방향적 진화에 이용하여 활성화 수용체인 FcγRIIIa에 대한 선택적 결합력이 향상된 무당화 트라스트주맙(trastuzumab) Fc 변이체를 선별하기 위해, 항체 Fc의 canonical N

-당화(glycosylation) 변형(modification)이 일어나는 위치인 299번째 아마노산 Thr을 Leu으로 치환한 후 본 발명자들이 구축한 박테리아 디스플레이된 인간 scFv 항체 라이브러리를 제작하였다. *E. coli*의 세포질 영역(periplasmic region)에 무당화 Fc 라이브러리를 발현시키고 형광이 표지된 사합체(tetrameric) FcγRIIIa와의 결합을 유도한 뒤, 높은 형광값을 나타내는 클론 집단(population)을 반복적으로 증폭시켜나감으로써 엔지니어링을 수행하였다. 이 후, 70 여 종의 개별 무당화 Fc 클론들의 활성화 FcγRIIIa에 대한 결합 세기를 분석하여 야생형 무당화 Fc보다 FcγRIIIa에 대한 결합력이 현저히 향상된 무당화 Fc 변이체들로서 aFc34 (V264E/T299A/T350A/L358P/E382V/N390G), aFc43 (V264E/R292P/T299A/Y300L/T350A/E382V/K392E/P396L/D401N), aFc46 (S239D/V264E/R292P/T299A/Y300L/E382V/D399G/K414R/M428L) 및 aFc67 (V262A/V264E/T299A/T350A/E382V/N390S/P396L)을 선별하였다 (도 1).

[103] 실시예 2. FcγRs 결합 특성 확인 및 낮은 A/I 비율의 무당화 트라스트주맵 Fc 변이체 선별

[104] 활성화 FcγRIIIa와의 결합 세기가 가장 우수한 4종의 무당화 Fc 변이체들 (aFc34, aFc43, aFc46 및 aFc67)의 서열 분석을 통해 7 개의 공통적인 아미노산 변이 V264E/T299A/E382V/T350/Y300L/R292P/P396L를 확인하였고, 상기 돌연변이들을 조합하여 12 종의 무당화 Fc 변이체들인 aFc-S1 내지 S12 (S1: V264E/T299A/E382V, S2: V264E/T299A/E382V/T350A, S3: V264E/T299A/E382V/Y300L, S4: V264E/T299A/E382V/R292P, S5: V264E/T299A/E382V/P396L, S6: V264E/T299A/E382V/T350A/Y300L, S7: V264E/T299A/E382V/T350A/R292P, S8: V264E/T299A/E382V/T350A/P396L, S9: V264E/T299A/E382V/Y300L/R292P, S10: V264E/T299A/E382V/Y300L/P396L, S11: V264E/T299A/E382V/R292P/P396L 및 S12: V264E/T299A/E382V/T350/Y300L/R292P/P396L)을 제작한 뒤, FACS를 통해 FcγRs에 대한 결합 특성을 분석하여 상기 실시예 1에서 선별한 변이체들과 비교하였다. 그 결과, 상기 12 종의 무당화 Fc 변이체들 (aFc-S1 내지 S12)은 상기 실시예 1에서 선별한 무당화 Fc 변이체들에 비해 FcγRIIIa에 대한 결합력이 주로 높게 나타나지 않았으며, 특히, aFc64 및 aFc67의 FcγRIIIa에 대한 결합력이 현저히 높게 나타났다 (도 2A). 또한, aFc46 변이체 및 aFc67 변이체가 FcγRIIb로 마스킹(masking)된 상태에서는 FcγRIIIa 결합력이 현저히 떨어지는 것으로 나타나, 낮은 A/I ratio를 가질 것으로 분석되었다 (도 2B).

[105] 이에, 우수한 FcγRIIIa 결합력을 유지하면서 동시에 낮은 A/I ratio (FcγRIIIa 결합력/FcγRIIb 결합력)을 보일 것으로 분석된 무당화 Fc 변이체들로서 aFc46 변이체 및 aFc67 변이체를 최종적으로 선발하였다 (표 1).

[106] [표1]

#	돌연변이	서열번호
aFc	T299L	12
aFc34	V264E, T299A, T350A, L358P, E382V, N390G	13
aFc43	V264E, R292P, T299A, Y300L, T350A, E382V, K392E, P396L, D401N	14
aFc46	S239D, V264E, R292P, T299A, Y300L, E382V, D399G, K414R, M428L	15
aFc67	V262A, V264E, T299A, T350A, E382V, N390S, P396L	16

[107] 실시예 3.활성화 **FcγRIIIa**에 대한 선택적 결합력이 향상된 무당화 **Fc** 변이체의 발현 및 정제

[108] 상기 실시예에서 선발한 무당화 **Fc** 변이체들을 포함하는 트라스트주맵 **Fc** 변이체를 발현 및 정제하기 위해, **Fc** 변이체 3종 (aFc, aFc46 및 aFc67)의 중쇄(heavy chain) 및 경쇄(light chain) 발현 벡터를 각각 제작한 뒤, Freestyle 293 expression 배양액 (Gibco, 12338-018) 100 30 ml에 각 변이체들의 중쇄유전자와 경쇄유전자를 1:1의 비율로 먼저 섞고 PEI:변이체유전자=4:1의 비율로 섞어 상온에서 20 분간 두었다가 전날 2×10^6 cells/ml의 밀도로 계대배양해 놓은 Expi293F 세포에 트랜스펙션하였다. 그 후 CO₂ 진탕배양기에서 37 °C, 125 rpm 및 8 % CO₂의 조건으로 7일간 배양하고 원심 분리하여 상등액만 취하였다. 상등액을 25x PBS를 이용해 평형을 맞춘 뒤 바틀탑 필터를 이용해 0.2 μm 필터 (Corning, 430513)로 여과하였다. 여과된 배양액에 Protein A 레진 500 μl을 넣고 4 °C에서 16 시간 교반한 뒤 컬럼을 통해 레진을 회수한 후 5 ml PBS로 세척하고 pH 2.7의 100 mM 글리신(glycine) 버퍼 3 ml로 용출하고 1M Tris-HCl pH 8.0을 이용하여 중화하였다. Amicon Ultra-4 centrifugal filter units 3K(Merck Millipore, UFC800324)을 사용하여 버퍼를 교체한 후 높은 순도로 정제된 무당화 항체 트라스트주맵 **Fc** 변이체들 (aFc, aFc46 및 aFc67)의 크기를 SDS-PAGE를 통해 분석하였다 (도 3).

[109] 실시예 4. 무당화 트라스트주맵 **Fc** 변이체들의 **FcγRs** 결합력 분석

[110] 상기 실시예 3에서 발현 및 정제한 무당화 트라스트주맵 **Fc** 변이체들 (aFc, aFc46 및 aFc67)의 **Fc** 감마 수용체(**FcγRs**)에 대한 결합력을 확인하기 위해 ELISA 분석을 진행하였다. 구체적으로, 0.05 M Na₂CO₃ pH 9.6에 4 μg/ml로 희석한 **FcγRs**-GST (**FcγRIIa**-131H-GST, **FcγRIIa**-131R-GST, **FcγRIIb**-GST 및 **FcγRIIIa**-158V-GST)를 각각 50 μl씩 flat bottom polystyrene high bind 96 웰 마이크로플레이트 (Costar, 3590)에 4°C에서 16 시간 동안 고정화한 후 100 μl의 4% 스킵밀크 (GenomicBase, SKI400) (in PBS)로 상온에서 2 시간 동안

블로킹하였다. 0.05% PBST 180 μ l로 4 회씩 세척한 뒤 1% 스킴밀크 (in PBS)로 연속 희석한 무당화 트라스트주맙 Fc 변이체들 (aFc, aFc46 및 aFc67)을 각각 50 μ l씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 세척 과정 후 50 μ l의 HRP-Protein L (GenScript, M00098)과 상온에서 1 시간 동안 각각 항체 반응을 진행하고 세척하였다. 그 후 1-Step Ultra TMB-ELISA substrate solution (Thermo Fisher Scientific, 34028)를 50 μ l씩 첨가해 발색한 뒤 50 μ l의 2 M H₂SO₄를 첨가하여 반응을 종료시킨 다음 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek)을 이용해 흡광도를 분석하였다.

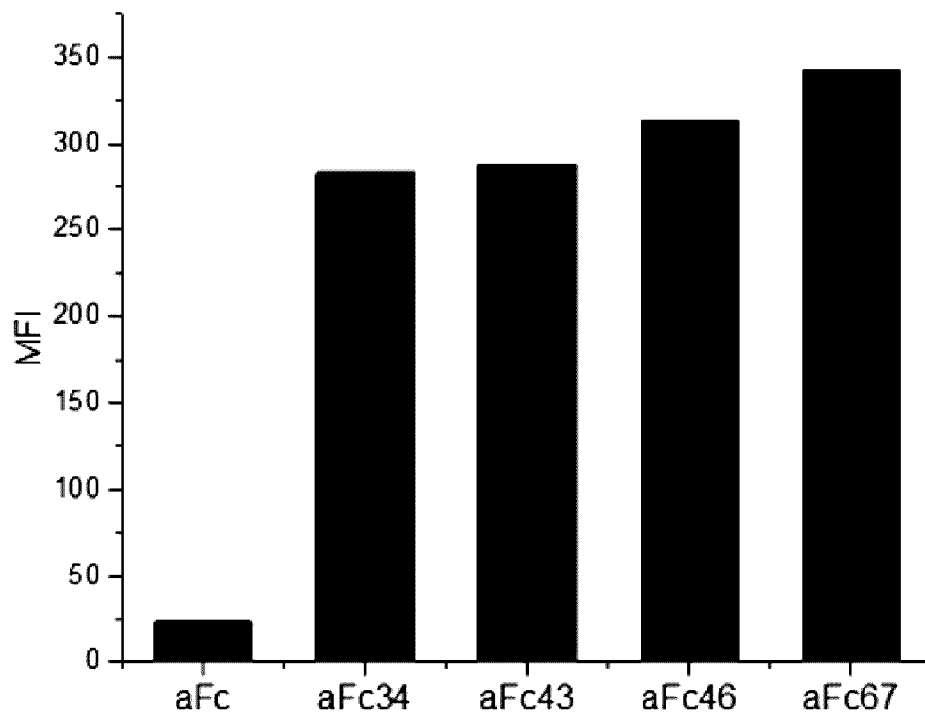
- [111] 그 결과, 무당화 Fc 변이체들 (aFc46 및 aFc67)이 포함된 트라스트주맙 변이체들의 Fc γ RIIa-131H, Fc γ RIIa-131R, Fc γ RIIb 및 Fc γ RIIIa에 대한 결합력이 야생형 당화 트라스트주맙과 유사하거나 이보다 더 증가되었으며, 특히, aFc46 무당화 Fc 변이체가 도입된 트라스트주맙은 야생형 당화 트라스트주맙에 비해 현저히 증가된 Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa-158V 및 Fc γ RIIa-131R에 대한 결합력을 가지는 것을 확인할 수 있었다 (도 4). 또한, aFc67 무당화 Fc 변이체가 도입된 트라스트주맙의 경우 야생형 당화 트라스트주맙 및 aFc46 무당화 Fc 변이체가 도입된 트라스트주맙 (trastuzumab-aFc46) 보다도 Fc γ RIIb에 대한 결합력이 현저히 높은 것으로 확인되었으며, Fc γ RIIa-131R에도 야생형 당화 트라스트주맙 보다 증가된 결합력을 보였다 (도 4).

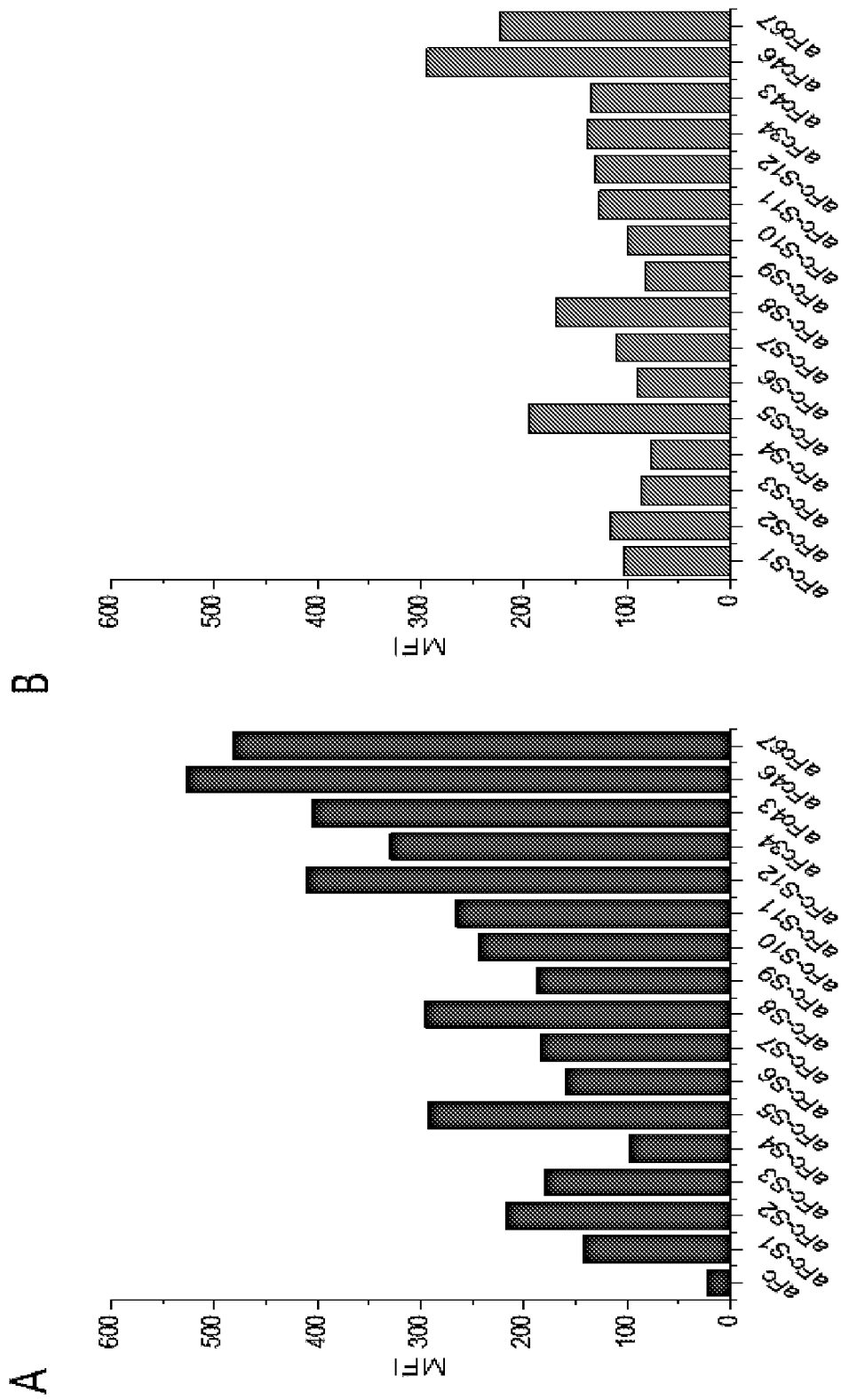
청구범위

- [청구항 1] 야생형(Wild type) 인간 항체 Fc 도메인에서, 카바트 넘버링 시스템(Kabat numbering system)에 따라 넘버링된 239, 262, 264, 292, 299, 300, 350, 358, 382, 390, 392, 396, 399, 401, 414 및 428 위치의 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 위치의 아미노산이 야생형의 아미노산과 다른 서열로 치환된, Fc 감마 수용체(FcγR)와의 결합력이 증대된 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, S239D, V262A, V264E, R292P, T299A, Y300L, T350A, L358P, E382V, N390S/N390G, K392E, P396L, D399G, D401N, K414R 및 M428L로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, Fc 감마 수용체와의 결합력이 증대된 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서, V264E, T299A 및 E382V의 아미노산 치환을 포함하는, Fc 감마 수용체와의 결합력이 증대된 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 4] 제 2항에 있어서, S239D, V264E, R292P, T299A, Y300L, E382V, D399G, K414R 및 M428L의 아미노산 치환을 포함하는, Fc 감마 수용체와의 결합력이 증대된 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 5] 제 2항에 있어서, V262A, V264E, T299A, T350A, E382V, N390S 및 P396L의 아미노산 치환을 포함하는, Fc 감마 수용체와의 결합력이 증대된 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서, Fc 감마 수용체는 FcγRIIIa, FcγRIIIa 및 FcγRIIb인, Fc 감마 수용체와의 결합력이 증대된 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 7] 제 1항에 있어서, 낮은 A/I 비율 (FcγRIIIa 결합력/FcγRIIb 결합력)을 가지는, Fc 감마 수용체와의 결합력이 증대된 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 8] 제 1항의 Fc 도메인 변이체를 포함하는 Fc 감마 수용체에 특이적인 무당화 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.
- [청구항 9] 제 8항에 있어서, Fc 도메인은 서열번호 1 내지 5의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 2(CH2) 및 서열번호 6 내지 10의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 3(CH3)를 포함하는, Fc 감마 수용체에 특이적인 무당화 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.
- [청구항 10] 제 8항에 있어서, 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 하나인, Fc 감마 수용체에 특이적인

- 무당화 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.
- [청구항 11] 제 1항의 Fc 도메인 변이체, 또는 제 8항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산분자.
- [청구항 12] 제 11항의 핵산분자를 포함하는 벡터.
- [청구항 13] 제 12항의 벡터를 포함하는 숙주세포.
- [청구항 14] 제 1항의 Fc 도메인 변이체, 또는 제 8항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 15] 제 14항에 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 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 16] a) 제 1항의 Fc 도메인 변이체를 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및
b) 숙주세포에 의해 발현된 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는, Fc 감마 수용체와의 결합력이 증대된 인간 항체 Fc 도메인 변이체의 제조방법.
- [청구항 17] a) 제 8항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및
b) 숙주세포로부터 발현된 항체를 정제하는 단계를 포함하는 Fc 감마 수용체에 특이적인 무당화 항체의 제조방법.
- [청구항 18] 항체 치료제의 제조에 사용하기 위한, Fc 감마 수용체에 특이적인 무당화 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 용도.
- [청구항 19] Fc 감마 수용체에 특이적인 무당화 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 암의 예방 또는 치료 용도.
- [청구항 20] Fc 감마 수용체에 특이적인 무당화 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 약학적으로 유효한 양으로 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법.

[도1]

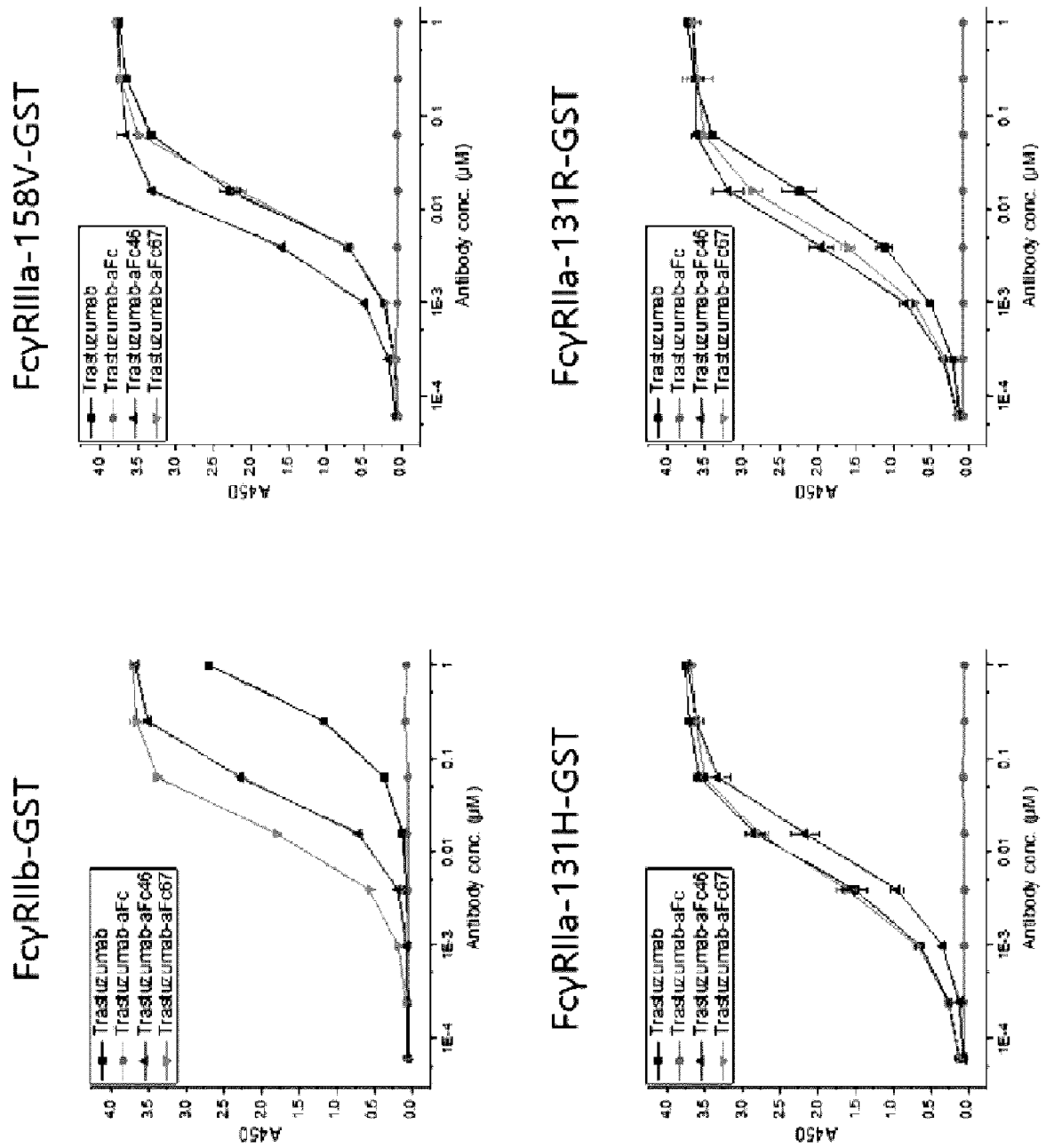




[도3]



[도4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/013489

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 39/00(2006.01); C07K 16/00(2006.01); C07K 16/30(2006.01); C12N 15/10(2006.01); G01N 33/68(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: Fc 변이체(Fc variant), 항체(antibody), 암(cancer), 무당화(aglycosylate)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2018-0051100 A (KOOKMIN UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION) 16 May 2018 (2018-05-16) See abstract; paragraphs [0072]-[0073]; and claims 1-12.	1-3,8,11-19
Y		4-7,9-10
Y	WO 2004-099249 A2 (XENCOR, INC.) 18 November 2004 (2004-11-18) See abstract; paragraph [0079]; and claims 1-5 and 33.	4-7,10
Y	NCBI, GenBank Accession No. PDB: 2DTS_A. Chain A, Ig gamma-1 chain C region. 01 December 2020. See entire document.	9
X	KR 10-2019-0044348 A (KOOKMIN UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION) 30 April 2019 (2019-04-30) See abstract; and claims 1-20.	1-2,8,11-19



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

10 January 2023

Date of mailing of the international search report

10 January 2023

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/013489

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2018-0046179 A (KOOKMIN UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION) 08 May 2018 (2018-05-08) See abstract; and claims 1-12.	1-2,8,11-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/013489

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/KR2022/013489

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.: **20**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 20 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of 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/KR2022/013489

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
KR	10-2018-0051100	A	16 May 2018	AU	2017-348982	A1	23 May 2019
				DE	112017005457	T5	11 July 2019
				GB	2571036	A	14 August 2019
				KR	10-2018-0046179	A	08 May 2018
				US	2022-0348654	A1	03 November 2022
				WO	2018-079997	A1	03 May 2018
WO	2004-099249	A2	18 November 2004	AT	541857	T	15 February 2012
				AU	2003-217912	A1	16 September 2003
				BR	0314814	A	09 August 2005
				CA	2499816	A1	08 April 2004
				CN	101014619	A	08 August 2007
				CY	1113852	T1	27 July 2016
				DK	1553975	T3	07 May 2012
				EP	1550167	A1	06 July 2005
				ES	2402591	T3	07 May 2013
				HK	1131168	A1	15 January 2010
				HR	P20130314	T1	31 May 2013
				HR	P20140331	T1	09 May 2014
				HU	E029341	T2	28 February 2017
				IL	167685	A	17 May 2010
				JP	2006-100821	A	13 April 2006
				KR	10-2005-0116400	A	12 December 2005
				PL	2368911	T3	29 December 2017
				SI	2368911	T1	30 October 2017
				US	2016-0347837	A1	01 December 2016
				WO	2004-099249	A3	26 January 2006
KR	10-2019-0044348	A	30 April 2019	KR	10-1985863	B1	04 June 2019
KR	10-2018-0046179	A	08 May 2018	AU	2017-348982	A1	23 May 2019
				DE	112017005457	T5	11 July 2019
				GB	2571036	A	14 August 2019
				KR	10-2018-0051100	A	16 May 2018
				US	2022-0348654	A1	03 November 2022
				WO	2018-079997	A1	03 May 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 39/00(2006.01); C07K 16/00(2006.01); C07K 16/30(2006.01); C12N 15/10(2006.01); G01N 33/68(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: Fc 변이체(Fc variant), 항체(antibody), 암(cancer), 무당화(aglycosylate)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2018-0051100 A (국민대학교산학협력단) 2018.05.16 요약; 단락 [0072]-[0073]; 청구항 1-12	1-3,8,11-19
Y		4-7,9-10
Y	WO 2004-099249 A2 (XENCOR, INC.) 2004.11.18 요약; 단락 [079]; 청구항 1-5, 33	4-7,10
Y	NCBI, GenBank Accession No. PDB: 2DTS_A, 'Chain A, Ig gamma-1 chain C region', 2020.12.01 전체 문헌	9
X	KR 10-2019-0044348 A (국민대학교산학협력단) 2019.04.30 요약; 청구항 1-20	1-2,8,11-19
X	KR 10-2018-0046179 A (국민대학교산학협력단) 2018.05.08 요약; 청구항 1-12	1-2,8,11-19
☐ 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 2023년01월10일(10.01.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년01월10일(10.01.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 민인규 전화번호 +82-42-481-3326

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: **20**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 20은 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
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 10-2018-0051100 A	2018/05/16	AU 2017-348982 A1	2019/05/23
		DE 112017005457 T5	2019/07/11
		GB 2571036 A	2019/08/14
		KR 10-2018-0046179 A	2018/05/08
		US 2022-0348654 A1	2022/11/03
		WO 2018-079997 A1	2018/05/03
WO 2004-099249 A2	2004/11/18	AT 541857 T	2012/02/15
		AU 2003-217912 A1	2003/09/16
		BR 0314814 A	2005/08/09
		CA 2499816 A1	2004/04/08
		CN 101014619 A	2007/08/08
		CY 1113852 T1	2016/07/27
		DK 1553975 T3	2012/05/07
		EP 1550167 A1	2005/07/06
		ES 2402591 T3	2013/05/07
		HK 1131168 A1	2010/01/15
		HR P20130314 T1	2013/05/31
		HR P20140331 T1	2014/05/09
		HU E029341 T2	2017/02/28
		IL 167685 A	2010/05/17
		JP 2006-100821 A	2006/04/13
		KR 10-2005-0116400 A	2005/12/12
		PL 2368911 T3	2017/12/29
		SI 2368911 T1	2017/10/30
		US 2016-0347837 A1	2016/12/01
		WO 2004-099249 A3	2006/01/26
KR 10-2019-0044348 A	2019/04/30	KR 10-1985863 B1	2019/06/04
KR 10-2018-0046179 A	2018/05/08	AU 2017-348982 A1	2019/05/23
		DE 112017005457 T5	2019/07/11
		GB 2571036 A	2019/08/14
		KR 10-2018-0051100 A	2018/05/16
		US 2022-0348654 A1	2022/11/03
		WO 2018-079997 A1	2018/05/03