

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024년 1월 4일 (04.01.2024)



(10) 국제공개번호
WO 2024/005424 A1

- (51) 국제특허분류:
C07K 16/00 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2023/008402
- (22) 국제출원일: 2023년 6월 16일 (16.06.2023)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2022-0079827 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). 고우형 (KO, Woo Hyung); 08018 서울특별시 양천구 목동동로 130, 1432동 106호, Seoul (KR). 고상환 (KO, Sanghwan);

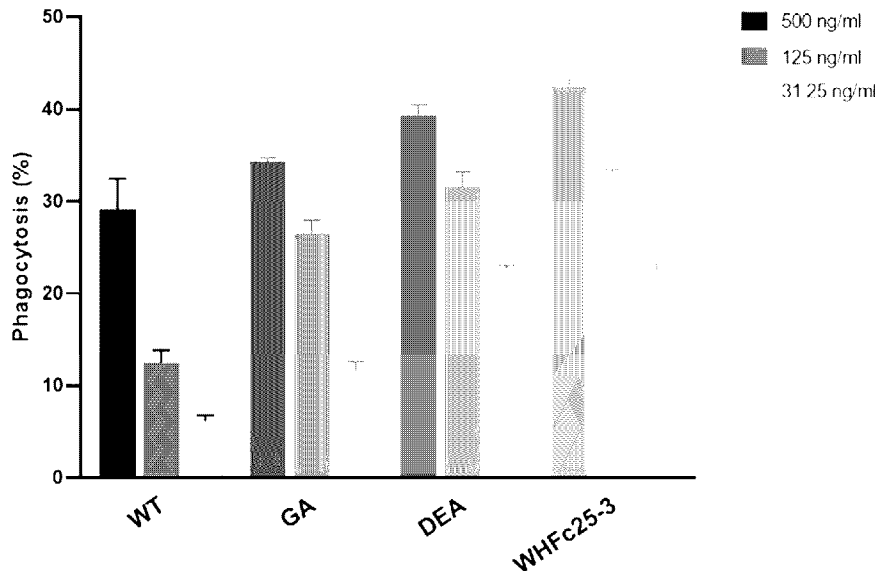
02709 서울특별시 성북구 솔샘로16길 11, 302호, Seoul (KR). 조미경 (JO, Migyeong); 02717 서울특별시 성북구 보국문로 32-3, 401호, Seoul (KR). 경문수 (KYUNG, Munsu); 10109 경기도 김포시 봉화로 9-13, 103동 502호, Gyeonggi-do (KR). 김수연 (KIM, Suyeon); 07211 서울특별시 영등포구 선유로 201, 601동 2104호, Seoul (KR).

(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,

(54) Title: HUMAN FC VARIANTS HAVING IMPROVED FCγRIIA BINDING SELECTIVITY

(54) 발명의 명칭: FCγRIIA 결합 선택성이 향상된 인간 FC 변이체



(57) Abstract: The present invention relates to an Fc variant which has improved half-life by binding to and unbinding from FcRn in a pH-dependent manner, and which has improved selective binding to Fcγ receptors. Compared to a wild-type human antibody Fc domain and conventional antibodies approved as antibody therapeutic agents, novel human antibody Fc domain variants of the present invention have a lower capacity to bind to immune-inhibiting receptors FcγRIIb and FcγRIIIb and have a higher capacity to bind to immune-activating receptor FcγRIIa (increased A/I ratio), thereby having a remarkably improved effector function and having maximized half-life in blood in which excellent pH-selective FcRn binding and unbinding capacity is exhibited, and thus bind to numerous peptide drug therapeutics having a short half-life and retention time in the body so that long-term drug efficacy through increased blood half-life can be exhibited, and can maximize the immune mechanism of therapeutic protein drugs so as to be effectively used as an improved antibody drug.

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

공개:

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

(57) 요약서: 본 발명은 pH 의존적으로 FcRn에 결합 및 해리함으로써 반감기가 향상되고, Fc 감마 수용체에 대한 선택적 결합력이 향상된 Fc 변이체에 관한 것으로, 본 발명의 신규한 인간 항체 Fc 도메인 변이체들은 야생형 인간 항체 Fc 도메인 및 종래의 항체 치료제로서 승인받은 항체들보다도 면역 저해 수용체인 FcγRIIb 및 FcγRIIIb와의 결합력이 감소되고, 면역 활성화 수용체인 FcγRIIIa와의 결합력이 향상되어 (A/I 비율 증가), 현저히 향상된 작용기 기능을 가지며, 뛰어난 pH-선택적 FcRn 결합 및 해리 능력을 보이는 혈중 반감기가 극대화된 변이체이므로, 체내에서 낮은 반감기와 유지시간을 가진 수 많은 펩타이드 의약품 치료제에 결합하여 증가된 혈중 반감기로 장시간 약효 발휘가 가능하며, 치료용 단백질 의약품의 면역 작용 기작을 극대화할 수 있으므로 개선된 항체 의약품으로 유용하게 이용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: FC γ RIIA 결합 선택성이 향상된 인간 FC 변이체 기술분야

- [1] 본 발명은 IgG 항체의 표적 세포 및 분자에 대한 식세포작용(phagocytosis)을 유도하는 인간 Fc γ RIIA 결합력이 향상된 Fc 변이체에 관한 것으로 치료용 항체의 표적에 대한 작용기 기능을 향상시키는 기술에 대한 것이다.

배경기술

- [2] 단백질 치료제들은 질병 타겟들에 아주 높은 특이성과 낮은 부작용과 독성을 보이기 때문에 비특이적인 저분자 화합물 치료제들을 아주 빠른 속도로 대체하여 임상에서 널리 이용되고 있으며, 현재 임상에 이용되고 있는 단백질 치료제들 중 항체 치료제들과 항체 Fc 영역을 융합된 Fc-융합 단백질 치료제들이 주종을 이루고 있다. 치료용 항체는 기존의 저분자 약물에 비해 타겟에 매우 높은 특이성을 보이며, 생체 독성이 낮고 부작용이 적을 뿐만 아니라, 약 3주의 우수한 혈중 반감기를 가지기 때문에 가장 효과적인 암 치료방법 중의 하나로 여겨지고 있다. 실제로 전 세계의 거대 제약회사들과 연구소들에서 암 발병 원인인자를 비롯한 암세포에 특이적으로 결합하여 효과적으로 제거하는 치료용 항체의 연구 개발에 박차를 가하고 있다. 치료용 항체 의약품 개발 기업으로는 로슈, 암젠, 존슨앤존슨, 애보트, 비엠에스 등의 제약 기업이 주를 이루고 있으며, 특히 로슈는 항암 치료 목적의 허셉틴 (Herceptin), 아바스틴 (Avastin), 리툭산 (Rituxan) 등이 대표적 상품으로 이 세 가지 치료용 항체로 2012년 세계시장에서 약 195억 달러의 매출을 달성하는 등 큰 이윤을 창출하고 있을 뿐 아니라, 세계의 항체 의약품 시장을 이끌고 있다. 레미케이드(Remicade)를 개발한 존슨앤존슨 역시 매출의 증가로 세계 항체 시장에서 빠르게 성장해나가고 있으며, 애보트와 비엠에스 등의 제약 기업 역시 개발 막바지 단계의 치료용 항체를 다수 보유하고 있는 것으로 알려져 있다. 이에 따른 결과로 저분자 의약품이 주도권을 가지고 있던 세계 제약 시장에서 질병 타겟에 특이적이고 부작용이 낮은 치료용 항체를 포함한 바이오 의약품이 빠르게 그 자리를 대체해 나가고 있다. 항체는 체액성 및 세포성 면역계 사이의 연결고리를 제공하며, 항체의 Fab 영역이 항원을 인식하는 반면, Fc 도메인 부분은 모든 면역 적격 세포에 의해 차별적으로 발현되는 세포상의 항체(면역글로불린)에 대한 수용체 (Fc 수용체 또는 FcR)에 결합하며, 결합하는 면역세포 표면에 발현된 Fc γ R의 종류에 따라 다른 기작을 가진다. 항체 Fc 영역 상의 Fc 수용체 결합 부위가 세포 상의 Fc 수용체 (FcR)에 결합함으로써 Fc 영역을 통해 항체가 세포 표면 상의 Fc 수용체에 결합하면 항체-코팅 입자의 포식 및 파괴, 면역 복합체의 제거, 살세포에 의한 항체-코팅 표적 세포의 용해 (항체-의존적 세포-매개 세포독성, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity 또는 ADCC), 염증 매개체의 방출, 태반 이동 및 면역글로불린 생성의 제어를 포함하

여 중요하고도 다양한 여러 생물학적 반응을 촉발한다 (Deo, Y.M. et al., Immunol. Today 18(3):127-135 (1997)). 이와 같이, Fc 도메인은 면역세포의 모집과 ADCC 및 ADCP(antibody dependent cell-mediated phagocytosis)에 결정적인 역할을 하며, 특히, 항체의 작용기 기능(effector function)인 ADCC 및 ADCP 기능은 많은 세포의 표면에 존재하는 Fc 수용체와의 상호작용에 의존한다. 따라서, 특정한 세포를 모집할 수 있도록 항체를 변형하는 시도는 치료 분야에 있어서 매우 중요하다고 할 수 있다. 사람의 Fc 수용체는 5가지로 분류되며, 인간의 5 종류의 주요 Fc γ R 중 4가지는 면역 활성화 또는 염증 반응을 유도하고, Fc γ RIIb는 면역 저해 또는 항염증 반응을 유도하는데, 항체가 어떠한 Fc 수용체 (예, 면역 활성화 수용체: Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIIa / 면역 저해 수용체: Fc γ RIIb)에 결합되는지에 따라 모집되는 면역세포의 종류가 결정되기 때문에 특정한 세포를 모집할 수 있도록 항체를 변형하는 시도는 치료 분야에 있어서 매우 중요하다. 현재 의약품으로서 항체의 작용은 항원과 결합하여 항원의 작용을 저해하는 직접적인 방식과, 항원과 결합한 항체의 Fc 감마 부위와 Fc 감마 수용체(Fc gamma receptor, FCGR)를 가지는 효과세포(자연살해세포, 대식세포 등)에 의한 간접적인 항원제거 방식이 있다. 최근 개발 중인 항체 치료제의 경우, 항원과의 결합으로 인한 항원의 작용을 막음과 동시에 항체의 Fc 감마 부위를 효과세포가 인식하여 공격 및 제거하는 ADCC 기전으로 약제의 효과를 높이고 있다. 특히 바이러스 감염병 치료에 있어서 항체의 ADCP를 통한 바이러스 입자와 감염 세포 섭취 및 항원 제시 기작이 매우 중요하며 이를 유도하는 대식세포(macrophage)는 다른 면역세포들 (예: T-세포, B-세포, NK 세포)과는 달리 표면에 Fc γ RIIa를 포함하여 Fc γ RI, Fc γ RIIIa를 모두 발현하기 때문에 바이러스 및 감염 세포의 효과적 제거를 위해서는 대식세포 표면에 발현되는 Fc γ RIIa와의 친화도를 향상하는 동시에 다른 활성화 Fc γ R들에 대한 결합력을 유지하는 것이 필수적이다. 또한 항체의 Fc 도메인이 활성화 Fc γ R에 결합하는 능력 (A)과 저해 Fc γ RIIb에 결합하는 능력 (I)의 비율(A/I ratio)이 높을수록 우수한 ADCC 및 ADCP 유도능을 보이기 때문에 저해 수용체인 Fc γ RIIb 결합력 대비 활성화 수용체 결합력을 선택적으로 높이는 것이 매우 절실한 실정이나 (Boruchov et al, J Clin Invest, 115(10):2914-23, 2005), Fc γ R들이 서로 높은 구조적 상동성을 갖는 문제로 인하여 항체에 유전적 돌연변이를 도입하여 A/I ratio를 증가시키기 위한 노력은 큰 결실을 거두지 못하고 있다.

- [3] 한편, 최근 암의 치료 및 경과에 있어 환자의 면역 세포 중 하나인 호중구(neutrophil)의 역할이 중요하다는 것이 밝혀지고 있고, 이러한 호중구를 이용한 치료에도 많은 연구가 이루어지고 있다. 항체 의약품에 의한 호중구의 암세포 사멸은 호중구 표면에 발현된 Fc γ RIIa와의 결합을 통해 이루어지는데 이때 호중구에 발현된 다른 수용체인 Fc γ RIIb는 세포 신호전달 도메인이 없어 이와 결합했을 때에는 암세포 살상이 유도되지 않는다. 따라서 호중구에 의한 효과적인 항암 작용을 위해서는 항체 Fc 영역의 Fc γ RIIb에 대한 결합력은 증가하지 않으면서 Fc γ RIIa에 대한 결합력은 증가하도록 하는 변이체 개발이 필요하다.

- [4] 면역글로불린 (항체)의 혈중/생체내 반감기 및 지속성이 IgG 결합 리간드 중의 하나인 FcRn(neonatal Fc receptor)에 대한 Fc의 결합에 크게 의존한다는 것이 보고되었으며, FcRn가 주로 내피(endothelial) 세포들과 상피(epithelial) 세포들에서 발현되고, 항체 Fc 영역의 CH2-CH3 경계 영역에 결합하여 체내에서 항체 농도의 항상성을 유지하고 세포 내부로 이동했다가 혈장으로 방출되는 재순환 과정을 통해 혈중 항체의 반감기를 증가시킨다고 보고되었다. 구체적으로, 면역글로불린의 Fc 단편은 비특이적 세포 흡수작용을 통해 내피세포에 의해 섭취(uptake)되고, 이어서 산성 엔도솜 내에 도입된다. FcRn은 엔도솜 내 산성 pH (< 6.5) 하에서 면역글로불린과 결합하고, 혈류 내에서 염기성 pH (> 7.4) 하에서 면역글로불린을 방출한다. 따라서, FcRn은 리소솜 퇴화 경로로부터 면역글로불린을 회수한다. 혈청 면역글로불린 수치가 감소하는 경우에는, 보다 많은 FcRn 분자를 면역글로불린 결합에 이용하여 면역글로불린의 양을 증가시킬 수 있다. 반대로, 혈청 면역글로불린 수치가 상승하는 경우에는, FcRn이 포화되어 퇴화되는 세포 흡수된 면역글로불린의 비율을 증가시킬 수 있다 (Ghetie 및 Ward, Annu. Rev. Immunol. 18: 739-766, 2000). 즉, 항체의 혈중 반감기와 지속성은 항체의 Fc 부위와 IgG 결합 리간드 중의 하나인 FcRn (neonatal Fc receptor) 결합에 크게 의존한다. 면역 백혈구 또는 혈청 보체 분자를 소집하여, 암세포 또는 감염된 세포와 같은 손상된 세포들이 제거될 수 있도록 역할을 하는 항체의 Fc 부위는 C γ 2 및 C γ 3 도메인 사이의 부위이고, 신생(neonatal) 수용체 FcRn과의 상호 작용을 매개하며, 그의 결합은 엔도솜(endosome)으로부터 혈류(bloodstream)로 세포내 이입된 항체를 재순환시킨다 (Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12: 181-220; Ghetie et al., 2000, Annu Rev Immunol 18: 739-766). 이 과정은, 전체 길이 분자의 거대한 크기에 기인하여, 신장 여과(kidney filtration)의 저지와 연관되어, 1주 내지 3주 범위의 유리한 항체 혈청 반감기(antibody serum half-life)를 갖는다. 또한, FcRn에 대한 Fc의 결합은 항체 운반에 있어서도 중요한 역할을 담당한다. 따라서, Fc 부위는 세포 내 수송(intracellular trafficking) 및 리사이클 기작을 통하여 항체가 순환되어 연장된 혈청 지속성(prolonged serum persistence)을 유지하는데 필수적인 역할을 하므로, 항체의 혈중 반감기를 개선하기 위해서는 FcRn 과의 pH-의존적 결합력을 향상시켜야 한다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명의 목적은 신규한 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 제공하는 것이다.
- [6] 또한, 본 발명의 목적은 Fc 감마 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 제공하는 것이다.
- [7] 또한, 본 발명의 목적은 신규한 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 코딩하는 핵산분자, 이를 포함하는 벡터, 및 이를 포함하는 숙주세포를 제공하는 것이다.

- [8] 또한, 본 발명의 목적은 증가된 생체 내 반감기를 갖는 생리활성 폴리펩타이드 결합체를 제공하는 것이다.
- [9] 또한, 본 발명의 목적은 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [10] 또한, 본 발명의 목적은 인간 항체 Fc 도메인 변이체의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [11] 또한, 본 발명의 목적은 Fc 감마 수용체에 특이적인 항체의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [12] 또한, 본 발명의 목적은 항체 치료제의 제조에 사용하기 위한 용도를 제공하는 것이다.
- [13] 또한, 본 발명의 목적은 암의 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.
- [14] 아울러, 본 발명의 목적은 암 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [15] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 증가된 생체 내 반감기를 가지며 특정 Fc 감마 수용체와의 선택적 결합력이 증대된 신규한 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 상기 신규한 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 상기 신규한 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 포함하는 생리활성 폴리펩타이드 결합체를 제공한다.
- [18] 또한, 본 발명은 상기 Fc 도메인 변이체, 또는 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산분자, 이를 포함하는 벡터, 및 이를 포함하는 숙주세포를 제공한다.
- [19] 또한, 본 발명은 상기 Fc 도메인 변이체, 상기 생리활성 폴리펩타이드 결합체, 또는 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [20] 또한, 본 발명은 인간 항체 Fc 도메인 변이체의 제조방법을 제공한다.
- [21] 또한, 본 발명은 Fc 감마 수용체에 특이적인 항체의 제조방법을 제공한다.
- [22] 또한, 본 발명은 상기 Fc 도메인 변이체, 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 상기 생리활성 폴리펩타이드 결합체의 항체 치료제의 제조에 사용하기 위한 용도를 제공한다.
- [23] 또한, 본 발명은 상기 Fc 도메인 변이체, 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 상기 생리활성 폴리펩타이드 결합체의 암의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [24] 아울러, 본 발명은 상기 Fc 도메인 변이체, 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 상기 생리활성 폴리펩타이드 결합체를 약학적으로 유효한 양으로 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [25] 본 발명의 신규한 인간 항체 Fc 도메인 변이체들은 야생형 인간 항체 Fc 도메인 및 종래의 항체 치료제로서 승인받은 항체들보다도 면역 저해 수용체인 FcγRIIb와의 결합력이 감소되고, 면역 활성화 수용체인 FcγRIIa 및 FcγRIIb와의 결합력이 향상되어 (A/I 비율 증가), 현저히 향상된 작용기 기능을 가지며, 뛰어난 pH-선택적 FcRn 결합 및 해리 능력을 보이는 혈중 반감기가 극대화된 변이체이므로, 체내에서 낮은 반감기와 유지시간을 가진 수 많은 펩타이드 의약품 치료제에 결합하여 증가된 혈중 반감기로 장시간 약효 발휘가 가능하며, 치료용 단백질 의약품의 면역 작용 기작을 극대화할 수 있으므로 개선된 항체 의약품으로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [26] 도 1은 FcγRIIa-131H-스트렙타비딘-His, hFcγRIIa-131R-스트렙타비딘-His, hFcγRIIb-스트렙타비딘-His, hFcFcγRIIa-131H-GST, hFcFcγRIIa-131R-GST, hFcFcγRIIb-GST 및 hFcRn-GST의 발현 및 정제 후 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [27] 도 2는 FACS를 이용한 효모 디스플레이 라이브러리에 대한 각 라운드의 선별 (sorting)에 대한 Alexa647 컨쥬게이트된 사합체(conjugated tetrameric) FcγRIIa, 무형광 사합체 FcγRIIb, Alexa488 컨쥬게이트된 Protein A의 농도와 게이팅(gating) 전략을 나타낸 도이다.
- [28] 도 3은 사카로마이세스 세레비지에 세포벽 디스플레이를 통해 스크리닝한 각 라운드의 Fc sub-라이브러리에서 FcγRIIa-Alexa647 결합에 의한 형광세기 (A), 무형광 FcγRIIb에 의해 마스킹된 상태에서의 FcγRIIa-Alexa647 결합 형광세기 (즉, FcγRIIa 선택적 결합 세기) (B)를 FACS로 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [29] 도 4는 WHFc5의 아미노산 회귀 Fc 변이체들이 포함된 트라스트주맵-Fc 변이체의 발현 및 정제 후 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [30] 도 5는 WHFc5의 아미노산 회귀 Fc 변이체들이 포함된 트라스트주맵-Fc 변이체들의 FcγRs에 대한 결합력을 ELISA로 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [31] 도 6은 개별 아미노산 치환 조합의 트라스트주맵-Fc 변이체들 (WHFc25-1, WHFc25-2 및 WHFc25-3)의 발현 및 정제 후 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [32] 도 7은 개별 아미노산 치환 조합의 트라스트주맵-Fc 변이체들 (WHFc25-1, WHFc25-2 및 WHFc25-3)의 pH 6.0 및 7.4 에서의 FcRn 결합력을 ELISA로 분석한 결과를 나타낸 도이다:
- [33] WT: 트라스트주맵 야생형; 및
- [34] DEA: 종래의 Fc 변이체.

- [35] 도 8은 개별 아미노산 치환 조합의 트라스트주맵-Fc 변이체들 (WHFc25-1, WHFc25-2 및 WHFc25-3)의 Fc γ RIIa에 대한 결합력을 ELISA로 분석한 결과를 나타낸 도이다;
- [36] WT: 트라스트주맵 야생형; 및
- [37] DEA: 종래의 Fc 변이체.
- [38] 도 9는 개별 아미노산 치환 조합의 트라스트주맵-Fc 변이체들 (WHFc25-1, WHFc25-2 및 WHFc25-3)의 Fc γ RIIIb에 대한 결합력을 ELISA로 분석한 결과를 나타낸 도이다;
- [39] WT: 트라스트주맵 야생형; 및
- [40] DEA: 종래의 Fc 변이체.
- [41] 도 10은 개별 아미노산 치환 조합의 트라스트주맵-Fc 변이체들 (WHFc25-1, WHFc25-2 및 WHFc25-3)의 호중구에 대한 ADCC 효과를 분석한 결과를 나타낸 도이다;
- [42] WT: 트라스트주맵 야생형; 및
- [43] DEA: 종래의 Fc 변이체.
- [44] 도 11은 개별 아미노산 치환 조합의 트라스트주맵-Fc 변이체 WHFc25-3의 대식세포 ADCP 효율을 분석한 결과를 나타낸 도이다;
- [45] WT: 트라스트주맵 야생형;
- [46] GA: 종래의 Fc 변이체 (G236A); 및
- [47] DEA: 종래의 Fc 변이체.
- [48] 도 12는 개별 아미노산 치환 조합의 트라스트주맵-Fc 변이체들 (WHFc25-2 및 WHFc25-3)의 혈중 반감기를 확인한 도이다;
- [49] WT: 트라스트주맵 야생형;
- [50] DEA: 종래의 Fc 변이체; 및
- [51] PFc29: 본 발명자들이 선행 Fc 변이체 (양성 대조군).
- [52] 도 13은 개별 아미노산 치환 조합의 트라스트주맵-Fc 변이체들 (WHFc25-1, WHFc25-2 및 WHFc25-3)의 열안정성을 분석한 도이다;
- [53] WT: 트라스트주맵 야생형;
- [54] DEA: 종래의 Fc 변이체; 및
- [55] PFc29: 본 발명자들이 선행 Fc 변이체 (양성 대조군).

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [56] 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.

- [57] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [58] 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.
- [59] 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:
- [60] 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.
- [61] 일 측면에서, 본 발명은 야생형(Wild type) 인간 항체 Fc 도메인에서, 카밧 넘버링 시스템(Kabat numbering system)에 따라 넘버링된 231 또는 355 위치의 아미노산이 야생형의 아미노산과 다른 서열로 치환된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체에 관한 것이다.
- [62] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 231, 236, 311, 355, 396 및 428 위치의 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 위치의 아미노산이 야생형의 아미노산과 다른 서열로 치환될 수 있다.
- [63] 일 구현예에서, 야생형 인간 항체 Fc 도메인은 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어질 수 있으며, 이는 서열번호 8의 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [64] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 A231V, G236A, Q311R, R355L, P396L 및 M428L로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [65] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 A231V, G236A, Q311R, P396L 및 M428L의 아미노산 치환을 포함하는 인간 항체 Fc 도메인 변이체 WHFc25-1일 수 있으며, 인간 항체 Fc 도메인 변이체 WHFc25-1은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 이는 서열번호 2의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.

- [66] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 G236A, Q311R, R355L, P396L 및 M428L의 아미노산 치환을 포함하는 인간 항체 Fc 도메인 변이체 WHFc25-2일 수 있으며, 인간 항체 Fc 도메인 변이체 WHFc25-2는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 이는 서열번호 4의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [67] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 A231V, G236A, Q311R, R355L, P396L 및 M428L의 아미노산 치환을 포함하는 인간 항체 Fc 도메인 변이체 WHFc25-3일 수 있으며, 인간 항체 Fc 도메인 변이체 WHFc25-3은 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 이는 서열번호 6의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [68] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 FcγRIIa와의 결합력이 향상될 수 있다.
- [69] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 Fc 도메인에 비해 인간 FcγRIIb에 대비 인간 FcγRIIa에 대한 선택적 결합력이 향상될 수 있다.
- [70] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 FcγRIIb 대비 FcγRIIa에 대한 선택적 결합력이 향상될 수 있다.
- [71] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 Fc 도메인과 비교하여 활성화 수용체인 FcγRIIa와의 결합력이 현저히 향상되고, A/I 비율이 야생형보다 향상되어, 인간 FcγRIIb에 비해 인간 FcγRIIa에 대한 결합성을 선택적으로 향상시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 ADCP(antibody-dependent cell-mediated phagocytosis) 유도능을 향상시킬 수 있다.
- [72] FcγRIIb는 일반적으로 호중구에서만 발현되는 수용체이며, FcγRIIb에 세포 신호 전달 도메인이 없기 때문에 여기에 결합한 항체에 의해서는 면역세포가 활성화되지 못하므로, FcγRIIa에 선택적으로 결합해야만 호중구에 의한 ADCC가 향상된다. 따라서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체는 FcγRIIb에 비해 인간 FcγRIIa에 대한 결합성이 선택적으로 향상됨으로써 호중구에 의한 ADCC가 향상되는 효과가 있다.
- [73] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 Fc 도메인과 비교하여 FcγRIIb (CD16b)와의 결합력이 감소하거나 유지되는 반면, FcγRIIa에 대한 결합력은 월등히 향상되어, FcγRIIb에 비해 인간 FcγRIIa에 대한 결합성을 선택적으로 향상시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 ADCC가 향상될 수 있다.
- [74] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 작용기 기능(effector function)을 향상시킬 수 있으며, 상기 작용기 기능은 항체-의존적 세포-매개된 세포독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC), 항체-의존적 세포성 포식작용(antibody-dependent cell-mediated phagocytosis, ADCP), C1q-결합, 보체 활성화, 보체 의존적 세포독성

- (complement dependent cytotoxicity, CDC), Fc-감마 수용체 결합을 포함하는 Fc-수용체 결합, 단백질 A-결합, 단백질 G-결합, 보체-의존적 세포성 세포독성 (complement dependent cell-mediated cytotoxicity, CDCC), 보체-증강 세포독성, 옉소닌화, Fc-함유 폴리펩티드 내재화, 표적 하향조정, ADC 흡수, 아포토시스의 유도, 세포 사멸, 세포 주기 정지, 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택될 수 있다.
- [75] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 ADCP(antibody-dependent cell-mediated phagocytosis) 유도능을 향상시킬 수 있다.
- [76] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 ADCC(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) 유도능을 향상시킬 수 있으며, 호중구에 의한 ADCC인 것이 더욱 바람직하다.
- [77] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 pH 7.0 내지 7.8에서 FcRn에 낮은 결합 친화력을 나타낼 수 있으며, 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 pH 5.6 내지 6.5에서 FcRn에 높은 결합 친화력을 나타내는 pH 감응성일 수 있다.
- [78] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 변이체는 pH 5.6 내지 6.5에서 야생형 면역글로블린 Fc 영역에 비해 FcRn에 높은 결합 친화력을 나타낼 수 있으며, 엔도솜 내 약산성 조건일 수 있고, pH 5.8 내지 6.0일 수 있다. 본 발명의 pH 감응성 Fc 변이체는 상기 pH 범위에서 FcRn에 대한 결합 친화도가 야생형 Fc 도메인과 비교하여 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 100% 이상 증가되거나, 야생형 Fc 도메인 보다 2배 이상, 3배 이상, 4배 이상, 5배 이상, 6배 이상, 7배 이상, 8배 이상, 9배 이상, 10배 이상, 20배 이상, 30배 이상, 40배 이상, 50배 이상, 60배 이상, 70배 이상, 80배 이상, 90배 이상 또는 100배 이상 증가될 수 있다.
- [79] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 변이체는 pH 7.0 내지 7.8에서 야생형 면역글로블린 Fc 영역에 비해 FcRn에 낮은 결합 친화력을 나타낼 수 있으며, 혈액의 정상 pH 범위일 수 있고, pH 7.2 내지 7.6일 수 있다. 본 발명의 Fc 변이체는 상기 pH 범위에서 FcRn에서 해리(dissociation)되는 정도가 야생형 Fc 도메인과 비교하여 동일하거나 실질적으로 변화되지 않을 수 있다.
- [80] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 생체 내 반감기(Half-life)가 증가될 수 있다.
- [81] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 체내 혈중 반감기가 증가될 수 있다.
- [82] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체의 반감기는 야생형 인간 항체 Fc 도메인과 비교하여 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 100% 이상 증가되거나, 야생형 Fc 도메인 보다 2배 이상, 3배 이상, 4배 이상, 5배 이상, 6배 이상, 7배 이상, 8배 이상, 9배 이상 또는 10배 이상 증가될 수 있다.

- [83] 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 항체 인 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).
- [84] 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).
- [85] 본 발명에서 사용된, 용어 "Fc 도메인 변이체"는 "Fc 변이체"와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [86] 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"가 사용될 수 있다.
- [87] 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, Q311R 치환을 포함하는 Fc 변이체는 야생형 항체의 Fc 도메인의 아미노산 서열에서 311번째 아미노산 잔기인 글루타민이 아르기닌으로 대체된 것을 의미한다.
- [88] 본 명세서에 사용된 용어 "Fc 변이체"는 야생형 항체 Fc 도메인과 비교하여 하나 이상의 아미노산 잔기의 변형을 포함하는 것을 의미한다.
- [89] 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.

- [90] 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.
- [91] 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.
- [92] 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.
- [93] 본 발명에서 사용된, 용어 "FcRn" 또는 "신생아 Fc 수용체"는 IgG 항체 Fc 영역에 결합하는 단백질을 의미하며, 이는 적어도 부분적으로는 FcRn 유전자에 의해 코딩된다. 상기 FcRn은, 이로 제한하는 것은 아니나, 인간, 마우스, 래트, 토끼 및 원숭이를 포함하는 임의의 유기체 유래일 수 있다. 당해 기술분야에 공지된 바와 같이, 기능적 FcRn 단백질은 종종 경쇄 및 중쇄로 불리는 2개의 폴리펩타이드를 포함한다. 경쇄는 베타-2-마이크로글로불린(β -2-microglobulin)이며, 중쇄는 FcRn 유전자에 의해 코딩된다. 본 명세서에서 달리 언급되지 않는 한, FcRn 또는 하나의 FcRn 단백질은 FcRn 중쇄와 베타-2-마이크로글로불린의 복합체를 언급하는 것이다.
- [94] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 도메인 변이체를 포함하는 Fc 감마 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편에 관한 것이다.
- [95] 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 Fc 감마 수용체에 대한 결합력이 향상될 수 있다.

- [96] 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 야생형 인간 항체에 비해 증가된 생체 내 반감기를 가질 수 있다.
- [97] 일 구현예에서, 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 미니바디(minibody), 도메인 항체, 이중특이적 항체, 항체 모방체, 키메라 항체, 항체 접합체(conjugate), 인간항체 또는 인간화 항체일 수 있으며, 면역학적 활성을 가진 단편은 상기 항체의 Fab, Fd, Fab', dAb, F(ab'), F(ab')₂, scFv(single chain fragment variable), Fv, 단일쇄 항체, Fv 이량체, 상보성 결정 영역 단편 또는 디아바디(diabody)일 수 있다.
- [98] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 효과기 작용을 증가시킬 수 있으며, 야생형 Fc 도메인과 비교하여 FcγRIIb와의 결합력 대비 FcγRIIa와의 결합력이 향상되어, 높은 FcγRIIa 결합 선택성을 가져 A/I 비율이 높은 특성을 가지므로, 항체-의존성 식세포작용(antibody-dependent cell-mediated phagocytosis, ADCC)이 증가될 수 있다.
- [99] 본 발명에서, A/I 비율은 항체의 Fc 도메인이 활성화 FcγR에 결합하는 능력(A)과 저해 FcγRIIb에 결합하는 능력(I)의 비율(A/I ratio)로서, A/I 비율이 높을수록 우수한 ADCC 및 ADCC 유도능을 보이기 때문에 저해 수용체인 FcγRIIb 결합력 대비 활성화 수용체 결합력을 선택적으로 높이는 것이 중요하다.
- [100] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 효과기 작용을 증가시킬 수 있으며, 야생형 Fc 도메인과 비교하여 FcγRIIb와의 결합력 대비 FcγRIIa와의 결합력이 향상되어, 높은 FcγRIIa 결합 선택성을 가지므로, 호중구에 의한 ADCC이 증가될 수 있다.
- [101] 본 발명에서, 일반적으로 호중구에서만 발현되는 수용체인 FcγRIIb에는 세포 신호전달 도메인이 없기 때문에, 이에 결합한 항체에 의해서는 면역세포가 활성화되지 못하므로, FcγRIIa에 선택적으로 결합해야만 호중구에 의한 ADCC가 향상된다. 따라서, FcγRIIb 결합력 대비 FcγRIIa 결합력의 비율을 선택적으로 높이는 것이 중요하다.
- [102] 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.
- [103] 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

역(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.

- [104] 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.
- [105] 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.
- [106] 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.
- [107] 본 발명에서 용어, "중쇄(heavy chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위해 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 V_H 및 3개의 불변 영역 도메인 C_H1, C_H2 및 C_H3과 힌지(hinge)를 포함하는 전장 중쇄 및 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_L을 포함하는 전장 경쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다.
- [108] 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 이루어지

고, Fc 도메인/단편은 중쇄의 두 번째 불변 영역(C_H2) 및 세 번째 불변 영역(C_H3)로 이루어진다.

- [109] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 도메인 변이체, 또는 이를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산분자에 관한 것이다.
- [110] 일 구현예에서, 본 발명에 따른 Fc 변이체를 코딩하는 핵산분자는 서열번호 2, 4 또는 6의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [111] 일 측면에서, 본 발명은 상기 핵산분자를 포함하는 벡터, 상기 벡터를 포함하는 숙주세포에 관한 것이다.
- [112] 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 인핸서는 인접하여 위치할 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커를 통상적인 방법에 따라 사용한다.
- [113] 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 분자

의 서열은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자 또는 RNA(mRNA) 분자일 수 있다.

- [114] 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.
- [115] 본 발명의 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 상기 시그널 서열에는 숙주가 에شري키아속(*Escherichia* sp.) 균인 경우에는 PhoA 시그널 서열, OmpA 시그널 서열 등이, 숙주가 바실러스속(*Bacillus* sp.) 균인 경우에는 α -아밀라아제 시그널 서열, 서브틸리신 시그널 서열 등이, 숙주가 효모(yeast)인 경우에는 MF α 시그널 서열, SUC2 시그널 서열 등이, 숙주가 동물세포인 경우에는 인슐린 시그널 서열, α -인터페론 시그널 서열, 항체 분자 시그널 서열 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함할 수 있고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.
- [116] 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).

- [117] 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.
- [118] 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.
- [119] 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.
- [120] 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.
- [121] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체 및 생리활성 폴리펩타이드가 결합되어 증가된 생체 내 반감기를 갖는 생리활성 폴리펩타이드 결합체에 관한 것이다.
- [122] 일 구현예에서, 생리활성 폴리펩타이드가 인간 성장 호르몬, 성장 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬 방출 펩타이드, 인터페론, 콜로니 자극 인자, 인터루킨, 인터루킨 수용성 수용체, TNF 수용성 수용체, 글루코세레브로시다제, 마크로파지 활성화 인자, 마크로파지 펩타이드, B세포 인자, T세포 인자, 단백질 A, 알러지 억제 인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 괴사 인자, 종양 억제 인자, 전이성장 인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, 아포리포단백질-E, 에리트로포이에틴, 고 당쇄화 에리트로포이에틴, 혈액인자 VII, 혈액인자 VIII, 혈액인자 IX, 플라즈미노젠 활성화 인자, 유로키나제, 스트렙토키나제, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스무타제, 렙틴, 혈소판 유래 성장 인자, 표피 성장 인자, 골형성 성장 인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 인슐린, 인슐린 유도체, 글루카곤, 글루카곤 유사체 펩타이드-1 (Glucagon Like Peptide-1) 아트리오펩틴, 연골 유도 인자, 결합 조직 활성화인자, 난포 자극호르몬, 황체 형성 호르몬, 난포 자극 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장 인자, 부갑상선 호르몬, 릴렉신, 씨크레틴, 소마토메딘, 인슐린-유사 성장 인자, 부신 피질 호르몬, 콜레스티로키닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드, 코티코트로핀 방출 인자, 갑상선 자극 호르몬, 수용체류, 수용체 길항물질, 세포표면항원, 단일클론 항체, 폴리클론항체, 항체 단편류 및 바이러스 유래 백신 항원으로 이루어진 군

으로부터 선택될 수 있으며, 혈중 반감기를 증가시킬 필요가 있는 것이면 어느 것이나 특별한 제한이 없이 사용할 수 있다.

- [123] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 단백질 약물과 같은 생리활성 폴리펩타이드의 생체 내 반감기를 증가시키기 위한 캐리어 (carrier)로서 유용하게 사용될 수 있으며, 이를 포함하는 생리활성 폴리펩타이드 결합체는 생체 내 반감기가 현저히 증가한 지속성 약물 제제로 사용될 수 있다.
- [124] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체 및 생리활성 폴리펩타이드는 비펩타이드성 중합체로 연결될 수 있으며, 본 발명에 사용가능한 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐 에틸에테르, PLA (폴리락트산, polylactic acid) 및 PLGA (폴리락틱-글리콜산, polylactic-glycolic acid)와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히아루론산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜이다. 당해 기술분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 기술분야의 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.
- [125] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 포함하는 생리활성 폴리펩타이드 결합체에 항체 약물이 결합될 수 있으며, 암 치료용 항체 약물은 트라스투주맙(Trastuzumab), 세톡시맙(cetuximab), 베바시주맙(bevacizumab), 리톡시맙(rituximab), 바실릭시맙(basiliximab), 인플릭시맙(infliximab), 이필리무맙(Ipilimumab), 펌브롤리주맙(Pembrolizumab), 니볼루맙(Nivolumab), 아테졸리주맙(Atezolizumab) 또는 아벨루맙(Avelumab)일 수 있다.
- [126] 항체 치료제에서 타겟 항원으로 면역세포들을 모집하여 전달하는 기작은 가장 중요한 기작 중 하나이며, 항체의 Fc 도메인이 면역세포의 모집과 ADCP(antibody-dependent cell-mediated phagocytosis)에 결정적인 역할을 하므로, 본 발명의 Fc 감마 수용체에 선택적 결합력이 증가된 Fc 변이체는 치료용 항체로 이용되기에 유리하다. 특히, 항체의 ADCP 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.
- [127] 본 발명은 상기 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 비펩타이드성 중합체를 통해 생리활성 폴리펩타이드에 공유결합으로 연결하여 지속성 약물 제제를 제조하는 방법을 포함한다.
- [128] 본 발명에 따른 제조방법은 말단에 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체를 통해 생리활성 폴리펩타이드 및 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 공유결합으로 연결하는 단계; 및 생리활성 폴리펩타이드, 비펩타이드성 중합체 및 인간 항체 Fc 도메인 변이체가 공유결합으로 연결된 결합체를 분리하는 단계를 포함할 수 있다.

- [129] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체, 이를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 이를 포함하는 생리활성 폴리펩타이드 결합체를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [130] 일 구현예에서, 암은 뇌종양, 흑색종, 골수종, 비소세포성폐암, 구강암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [131] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 높은 FcγRIIIa 결합 선택성을 가져 높은 A/I 비율을 가지므로, 효과기 작용을 증가시켜 식세포작용을 증가시킬 수 있으므로, 본 발명의 FcγRIIIa 결합 선택성을 가지는 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편이 이를 통해 암세포 사멸 작용 기작을 극대화할 수 있다.
- [132] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 면역원성 세포사멸 유도제를 추가로 포함할 수 있으며, 면역원성 세포사멸 유도제는 안트라사이클린계열 항암제, 타산 계열 항암제, 항-EGFR 항체, BK 채널 작용제, 보르테조미브(Bortezomib), 강심성 배당체(cardiac glycoside), 사이클로포스마이드 계열 항암제, GADD34/PP1 저해제, LV-tSMAC, Measles 바이러스, 블레오마이신(bleomycin), 미토잔트론(mitoxantrone) 또는 옥살리플라틴(oxaliplatin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 안트라사이클린 계열 항암제는 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 이다루비신(idarubicin), 픽산트론(pixantrone), 사바루비신(sabarubicin) 또는 발루비신(valrubicin)일 수 있고, 타산계열 항암제는 파클리탁셀(paclitaxel) 또는 도세탁셀(docetaxel)일 수 있다.
- [133] 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.

- [134] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 암의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [135] 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.
- [136] 본 발명에서 유효성분과 결합하여 사용된 "치료학적으로 유효한 양"이란 용어는 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 조성물의 약학적으로 허용 가능한 염의 양을 의미하며, 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack Publishing Co.에 기술되어 있다.
- [137] 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.
- [138] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루

미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [139] 본 발명의 조성물은 또한 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 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.
- [140] 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.
- [141] 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.
- [142] 일 측면에서, 본 발명은 a) 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및 b) 숙주세포에 의해 발현된 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체의 제조방법에 관한 것이다.
- [143] 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 항체의 제조방법에 관한 것이다.
- [144] 일 구현예에서, 항체의 정제는 여과, HPLC, 음이온 교환 또는 양이온 교환, 고속 액체 크로마토그래피(HPLC), 친화도 크로마토그래피, 또는 이들의 조합을 하

는 것이 포함될 수 있으며, 바람직하게는 Protein A를 사용하는 친화 크로마토그래피를 이용할 수 있다.

- [145] 일 측면에서, 본 발명은 항체 치료제의 제조에 사용하기 위한, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체, 이를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 이를 포함하는 생리활성 폴리펩타이드 결합체의 용도에 관한 것이다.
- [146] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체, 이를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 이를 포함하는 생리활성 폴리펩타이드 결합체의 암의 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다.
- [147] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체, 이를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 이를 포함하는 생리활성 폴리펩타이드 결합체를 약학적으로 유효한 양으로 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법에 관한 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [148] 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.

[149] 실시예 1. 표적 물질 발현 및 정제

- [150] FcγRIIa에 대한 결합력이 향상된 Fc 변이체 발굴, Fc 변이체의 FcγRs 및 FcRn 결합력 분석을 위해, 표적물질을 발현 및 정제하였다. 구체적으로, pMAZ-hFcγRIIa-131H-스트렙타비딘-His, pMAZ-hFcγRIIa-131R-스트렙타비딘-His, pMAZ-hFcγRIIb-스트렙타비딘-His, pMAZ-hFcγRIIa-131H-GST, pMAZ-hFcγRIIa-131R-GST, pMAZ-hFcγRIIb-GST 및 pMAZ-hFcRn-GST의 7종의 발현 벡터를 제작하고, Freestyle 293 expression 배양액 (Gibco, 12338-018) 30 ml에 PEI(polyethylenimine, Polyscience, 23966) 및 상기 발현 벡터 유전자를 4:1의 비율로 섞어 상온에서 20 분간 인큐베이션한 뒤 2×10^6 cells/ml의 밀도로 배양한 Expi293F 동물 세포에 트랜스펙션하고 37°C, 125 rpm 및 8% CO₂의 조건으로 7 일간 배양하였다. 배양 후 6000×g로 15분간 원심분리하여 상등액을 취하고, 12.5 ml의 25×PBS를 상기 배양 상등액 30 ml과 혼합한 후 0.2 μm 바틀탑 필터(bottle top filter) (Corning, 430513)로 여과하였다. 여과된 각각의 pMAZ-hFcγRIIa-131H-스트렙타비딘-His, pMAZ-hFcγRIIa-131R-스트렙타비딘-His 및 pMAZ-hFcγRIIb-스트렙타비딘-His를 트랜스펙션한 배양액에 Ni-NTA 레진 (QIAGEN, 40724) 500 μl을 넣고 4°C에서 16 시간 교반한 후 디스포저블 폴리프로필렌 컬럼(disposable polypropylene column)에 패킹(packing)하여 레진을 회수하였다. 100 ml PBS (pH 7.4), PBS에 희석된 10 mM 이미다졸(imidazole) 버퍼 25 ml 및 PBS에 희석된 20 mM 이미다졸 버퍼 25 ml을 이용하여 순서대로 세척하고 4 ml의 PBS에 희석된 250 mM 이미다졸 버퍼로 용출(elution)하였다. 또한, 여과된 각각의 pMAZ-hFcγRIIa-131H-GST, pMAZ-hFcγRIIa-131R-GST, pMAZ-hFcγRIIb-GST 및 pMAZ-

hFcRn-GST를 트랜스펙션한 배양액에 GST 레진 (Incospharm, 1101-3) 500 μ l 을 넣어 주고 4°C에서 16 시간 교반한 후 디스포저블 폴리프로필렌 컬럼에 패킹하여 레진을 회수하였다. 100 ml 1×PBS (pH 7.4)로 세척하고 4 ml의 1×PBS 에 희석된 50 mM Tris-HCl 및 10 mM GSH 버퍼 (pH 8.0)로 용출하였다. 이 후, Amicon Ultra-4 centrifugal filter units 3K (Merck Millipore, UFC800324)을 사용하여 1×PBS (pH 7.4)로 버퍼를 교환하였고, 그 결과, 높은 순도의 hFcγRIIa-131H-스트렙타비딘-His, hFcγRIIa-131R-스트렙타비딘-His, hFcγRIIb-스트렙타비딘-His, hFcγRIIa-131H-GST, hFcγRIIa-131R-GST, hFcγRIIb-GST 및 hFcRn-GST이 성공적으로 정제되었음을 SDS-PAGE 젤로 확인하였다 (도 1). 이 중, 정제된 hFcγRIIa-131H-스트렙타비딘-His 및 hFcγRIIa-131R-스트렙타비딘-His는 1:1의 비율로 섞어 Alexa Fluor™ 647 Protein Labeling Kit (Invitrogen, A20173)를 이용하여 Alexa647가 컨쥬게이트된(conjugated) 사합체(사량체, tetrameric)의 FcγRIIa를 제작하였다.

- [151] 실시예 2. **FcγRIIa** 결합력이 향상된 Fc 변이체 선별을 위한 효모 디스플레이 라이브러리 제작
- [152] FcγRIIa에 대한 결합력이 향상된 Fc 변이체를 효율적으로 선별하기 위해, cRn에 대한 pH-의존적 결합을 향상시키는 Q311R/M428L이 도입된 항체 Fc 서열에 error-prone PCR을 통해 Fc 전체 서열 중 1.468%의 확률로 돌연변이가 도입된 DNA 라이브러리를 제작하였다. 제작된 DNA 라이브러리 총 12 μ g은 효모 디스플레이를 위한 효모 세포벽 고정 단백질인 Aga2 단백질과 형질전환 선발표지 유전자 (*Trp1*)가 암호화된 pCTCON 벡터 4 μ g과 함께 MicroPulser Electroporator (Bio-Rad, #1652100)를 이용한 전기천공법을 통해 효모종 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 컴피턴트(Competent) 세포 400 μ l에 전달한 뒤, 트립토판(tryptophan)이 결핍된 SD 배지 [Difco Yeast nitrogen base(BD, 291940) 6.7 g/l, Bacto casamino acid(BD, 223050) 5.0 g/l, Na₂HPO₄(JUNSEI, 7558-79-4) 5.4 g/l, NaH₂PO₄·H₂O(SAMCHUN, 10049-21-5) 8.56 g/l, Glucose(DUKSAN, 50-99-7) 20 g/l] 500 ml에서 배양함으로써 형질전환된 효모종만 선택적으로 생존하게하여 총 3.25×10^7 개의 항체 Fc의 다양성이 확보된 효모 디스플레이 라이브러리를 제작하였다.
- [153] 실시예 3. **FcγRIIa** 결합력이 향상된 Fc 변이체 발굴
- [154] 제작된 효모 라이브러리의 5.5×10^8 개 세포를 트립토판이 결핍된 SD 배지 100 ml에서 30°C 조건으로 16시간 배양한 후, 7×10^8 개 세포를 트립토판이 결핍된 SG 배지 [Difco Yeast nitrogen base (BD, 291940) 6.7 g/l, Bacto casamino acid (BD, 223050) 5.0 g/l, Na₂HPO₄(JUNSEI,7558-79-4)5.4g/l,NaH₂PO₄·H₂O (SAMCHUN,10049-21-5)8.56g/l 및 Galactose (Sigma-Aldrich, 59-23-4) 20 g/l] 100 ml에서 20°C 조건으로 48 시간 배양하여 디스플레이된 Fc 라이브러리의 발현량을 향상시켰다. 배양한 세포 중 1×10^8 개 세포를 4°C에서 14,000 ×g로 30초간

원심분리 후 상층액을 제거한 뒤 1 ml PBSB (1×PBS, 0.1% bovine serum albumin (gibco, 30063-572)) (pH 7.4)로 세척한 뒤 40 nM Alexa488 conjugated Protein A, 20 nM Alexa647 컨쥬게이트된 사합체 FcγRIIa 및 40 nM 무형광 사합체 FcγRIIb가 희석된 PBSB (pH 7.4) 1 ml에 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후 1 ml PBSB (pH 7.4)로 세척한 뒤 1 ml PBSB (pH 7.4)로 재부유하여 Alexa488 컨쥬게이트된 Protein A 결합, Alexa647 컨쥬게이트된 사합체 FcγRIIa 및 무형광 FcγRIIb의 경쟁적 결합을 유도하여 높은 형광 신호를 보이는 세포들을 유세포 분리기 (Bio-Rad S3 sorter, Bio-Rad, #1451029)를 통해 회수하였다. 회수된 서브 라이브러리는 같은 방법으로 Alexa647 컨쥬게이트된 사합체 FcγRIIa의 농도를 줄이거나 무형광 사합체 FcγRIIb의 농도를 높이며 (도 2), 총 4 라운드의 선별(sorting) 과정을 거쳐 FcγRIIa에 대한 결합력이 우수한 Fc 변이체들을 디스플레이하고 있는 세포들을 농축(enrichment)시켰고 (도 3), 농축된 마지막 서브 라이브러리에서 무작위 선택을 통해, 최종적으로, FcγRIIa에 대한 결합력 및 pH-의존적 FcRn 결합력이 동시에 향상된 Fc 변이체들 WHFc1 (G236A/Q311R/P396L/M428L) 및 WHFc5 (A231V/G236W/F243L/Q311R/R355L/P396L/M428L)를 확보하였다 (표 1).

[155] [표1]

변이체 이름	도입된 돌연변이
WHFc1	G236A/Q311R/P396L/M428L
WHFc5	A231V/G236W/F243L/Q311R/R355L/P396L/M428L

[156] 실시예 4. 개별 아미노산 치환 트라스트주맵-Fc 변이체의 발현 및 정제

[157] 상기 실시예 3에서 확보한 Fc 변이체 WHFc5의 개별적인 아미노산 치환이 FcγRIIa와의 결합력에 미치는 영향을 평가하기 위해, WHFc5의 아미노산 치환을 야생형으로 되돌린 5종의 변이체들 (WHFc5-1: G236W/F243L/Q311R/R355L/P396L/M428L; WHFc5-2: A231V/F243L/Q311R/R355L/P396L/M428L; WHFc5-3: A231V/G236W/Q311R/R355L/P396L/M428L; WHFc5-4: A231V/G236W/F243L/Q311R/P396L/M428L; 및 WHFc5-5: A231V/G236W/F243L/Q311R/R355L/M428L) 및 WHFc1의 G236A 변이로 치환된 변이체 WHFc5-6 (A231V/G236A/F243L/Q311R/R355L/P396L/M428L) (표 2)을 트라스트주맵 Fc에 치환한 발현 벡터 pMAZ-트라스트주맵-HC-WHFc5-1, pMAZ-트라스트주맵-HC-WHFc5-2, pMAZ-트라스트주맵-HC-WHFc5-3, pMAZ-트라스트주맵-HC-WHFc5-4, pMAZ-트라스트주맵-HC-WHFc5-5 및 pMAZ-트라스트주맵-HC-WHFc5-6를 제작하였다. Freestyle 293 expression 배양액 (Gibco, 12338-018) 3 ml에 각 변이체들의 중쇄유전자와 경쇄유전자를 1:1의 비율로 먼저 섞고 PEI:변이체유전자=4:1의 비율로 섞어 상온에서 20 분간 두었다가 전날 2×10^6 cells/ml의 밀도로 계대배양해 놓은 Expi293F 세포에 트랜스펙션하였다. 그 후 CO₂ 진탕배양기에서 37 °C, 125 rpm 및 8 % CO₂의 조건으로 7일간 배양하고 6000 ×g로 15분간 원심분리하여 상등액만 취하였

다. 이 후, 취한 배양 상등액 30 ml과 1.25 ml의 25×PBS를 혼합한 후 0.2 µm 바틀 탭 필터 (Corning, 430513)로 여과하였다. 여과된 배양액에 Protein A resin 100 µl을 넣어 주고 4°C에서 16 시간 교반 한 뒤 디스포저블 폴리프로필렌 컬럼에 패킹하여 레진을 회수하였다. 5 ml 1×PBS (pH 7.4)로 세척하고 3 ml 100 mM 글라이신 (pH 2.7) 버퍼로 용출한 후 1 M Tris-HCl (pH 8.0)을 이용하여 중화하였다. Amicon Ultra-4 centrifugal filter units 3K (Merck Millipore, UFC800324)을 사용하여 1×PBS (pH 7.4)로 버퍼를 교환하였으며, SDS-PAGE 겔로 분석하여 항체 트라스트주맵-Fc 변이체들이 높은 순도로 성공적으로 정제되었음을 확인하였다 (도 4).

[158] [표2]

변이체 이름	도입된 돌연변이
WHFc5-1	G236W/F243L/Q311R/R355L/P396L/M428L
WHFc5-2	A231V/F243L/Q311R/R355L/P396L/M428L
WHFc5-3	A231V/G236W/Q311R/R355L//P396L/M428L
WHFc5-4	A231V/G236W/F243L/Q311R/P396L/M428L
WHFc5-5	A231V/G236W/F243L/Q311R/R355L/M428L
WHFc5-6	A231V/G236A/F243L/Q311R/R355L/P396L/M428L

[159] 실시예 5. 개별 아미노산 치환이 FcγRIIa 결합에 미치는 영향 평가

[160] 상기 실시예 4에서 제작한 표 2의 Fc 변이체가 포함된 트라스트주맵-Fc 변이체들의 FcγRIIa에 대한 결합력을 확인하기 위하여 ELISA 분석을 수행하였다. 구체적으로, 0.05 M Na₂CO₃ (pH9.6)에 0.4 µg/ml로 희석한 HER2를 각각 50 µl씩 flat bottom polystyrene High Bind 96 well microplate (Costar, 3590)에 4°C, 16 시간 동안 인큐베이션하여 고정화한 후 100 µl의 1×PBS (pH 7.4)에 희석된 4% 스킵 밀크(skim milk) (GenomicBase, SKI400)로 상온에서 2 시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST (1×PBS 및 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich, P1379-1L)) (pH7.4) 150 µl로 4 회 세척한 뒤, 1×PBS (pH 7.4)에 희석된 1% 스킵 밀크에 10 µg/ml로 희석된 트라스트주맵 Fc 변이체들을 50 µl씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 0.05% PBST (pH 6.0/pH 7.4) 100 µl로 4 회 세척한 뒤, 1×PBS에 희석된 1% 스킵 밀크 (pH 6.0/pH 7.4)로 연속 희석된 hFcγRs-GST (hFcγRIIa-131H-GST 및 hFcγRIIa-131R-GST)를 50 µl 각 well에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 0.05% PBST (pH 7.4) 100 µl로 4 회 세척 후, 항-GST-HRP 킨주게이트 (GE Healthcare, RPN1236V) 50 µl을 이용해 상온에서 각각 1 시간 동안 항체 반응을 진행하고 0.05% PBST (pH 7.4) 100 µl로 4 회 세척하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA substrate solution (Thermo Fisher Scientific, 34028)를 50 µl씩 첨가하여 발색한 뒤 2 M H₂SO₄를 50 µl씩 넣어주어 반응을 종료시키고, Epoch microplate spectrophotometer (BioTek)를 이용해 흡광도를 분석하였다. 그 결과, 개별적인

아미노산 치환 중 A231V, R355L 및 P396L이 hFcγRIIa에 대한 결합을 향상시키는 반면, F243L은 hFcγRIIa에 대한 결합을 저하하는 것으로 나타났으며 (도 5), G236A가 G236W에 비해 hFcγRIIa에 대한 결합력을 더 증가시키는 것으로 나타났다.

[161] 실시예 6. 개별 아미노산 치환 조합의 트라스트주맵-Fc 변이체들의 발현 및 정제

[162] 상기 실시예 5에서 hFcγRIIa에 대한 결합력이 향상되는 것으로 확인된 개별 아미노산 치환들을 조합한 Fc 변이체로서, WHFc25-1 (A231V/G236A/Q311R/P396L/M428L), WHFc25-2 (G236A/Q311R/R355L/P396L/M428L) 및 WHFc25-3(A231V/G236A/Q311R/R355L/P396L/M428L) (표 3)을 트라스트주맵 Fc에 치환한 발현 벡터 pMAZ-트라스트주맵-HC-WHFc25-1, pMAZ-트라스트주맵-HC-WHFc25-2 및 pMAZ-트라스트주맵-HC-WHFc25-3을 제작하였다. Freestyle 293 expression 배양액 (Gibco, 12338-018) 3 ml에 각 변이체들의 중쇄유전자와 경쇄유전자를 1:1의 비율로 먼저 섞고 PEI:변이체유전자=4:1의 비율로 섞어 상온에서 20 분간 두었다가 전날 2×10^6 cells/ml의 밀도로 계대배양해 놓은 Expi293F 세포에 트랜스펙션하였다. 그 후 CO₂ 진탕배양기에서 37 °C, 125 rpm 및 8 % CO₂의 조건으로 7일간 배양하고 6000 ×g로 15분간 원심분리하여 상등액만 취하였다. 이 후, 취한 배양 상등액 30 ml과 1.25 ml의 25×PBS를 혼합한 후 0.2 μm 바틀 탭 필터 (Corning, 430513)로 여과하였다. 여과된 배양액에 Protein A resin 100 μl을 넣어 주고 4°C에서 16 시간 교반 한 뒤 디스포저블 폴리프로필렌 컬럼에 패킹하여 레진을 회수하였다. 5 ml 1×PBS (pH 7.4)로 세척하고 3 ml 100 mM 글라이신 (pH 2.7) 버퍼로 용출한 후 1 M Tris-HCl (pH 8.0)을 이용하여 중화하였다. Amicon Ultra-4 centrifugal filter units 3K (Merck Millipore, UFC800324)을 사용하여 1×PBS (pH 7.4)로 버퍼를 교환하였으며, SDS-PAGE 젤로 분석하여 항체 트라스트주맵-Fc 변이체들이 높은 순도로 성공적으로 정제되었음을 확인하였다 (도 6).

[163] [표3]

변이체 이름	도입된 돌연변이
WHFc25-1	A231V/G236A/Q311R/P396L/M428L
WHFc25-2	G236A/Q311R/R355L/P396L/M428L
WHFc25-3	A231V/G236A/Q311R/R355L/P396L/M428L

[164] 실시예 7. 개별 아미노산 치환 조합의 트라스트주맵-Fc 변이체들의 pH-의존적 FcRn 결합력 분석

[165] 상기 실시예 6에서 개별 아미노산 치환 돌연변이를 조합한 Fc 변이체들 (표 3)이 각각 포함된 트라스트주맵 변이체들에 대하여 pH-의존적 인간 FcRn 결합력을 ELISA를 이용하여 분석하였다. 구체적으로, 0.05 M Na₂CO₃ (pH9.6)에 4

μg/ml로 희석한 HER2를 각각 50 μl씩 flat bottom polystyrene High Bind 96 well microplate (Costar, 3590)에 4°C, 16 시간 동안 인큐베이션하여 고정화한 후 100 μl의 1×PBS (pH 7.4)에 희석된 4% 스킴 밀크(skim milk) (GenomicBase, SKI400)로 상온에서 2 시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST (pH 7.4) 150 μl로 4 회 세척한 뒤, 1×PBS (pH 7.4)에 희석된 1% 스킴 밀크에 10 μg/ml로 희석된 트라스트주맵 Fc 변이체들을 50 μl씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 0.05% PBST (pH 6.0/pH 7.4) 100 μl로 4 회 세척한 뒤, 1×PBS에 희석된 1% 스킴 밀크 (pH 6.0/pH 7.4)로 연속 희석된 hFcRn-GST를 50 μl 각 well에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 0.05% PBST (pH 7.4) 100 μl로 4 회 세척 후, 1×PBS에 희석된 1% 스킴 밀크 (pH 6.0/pH 7.4)에 희석된 항-GST-HRP 컨쥬게이트 (GE Healthcare, RPN1236V) 50 μl을 이용해 상온에서 각각 1 시간 동안 항체 반응을 진행하고 0.05% PBST (pH 6.0/pH 7.4) 100 μl로 4 회 세척하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA substrate solution(Thermo Fisher Scientific, 34028)를 50 μl 첨가하여 발색한 뒤 2 M H₂SO₄를 50 μl씩 넣어주어 반응을 종료시키고, Epoch microplate spectrophotometer (BioTek)를 이용해 흡광도를 분석하였다.

[166] 그 결과, 본 발명의 WHFc25-1, WHFc25-2 및 WHFc25-3 변이체가 각각 도입된 트라스트주맵-Fc 변이체들이 종래의 DEA 변이체 (S239D/I332E/G236A)가 도입된 트라스트주맵-Fc 변이체보다 pH 7.4 대비 pH 6.0에서 현저히 향상된 hFcRn에 대한 결합력을 나타내, pH-의존적 결합력이 증가된 것으로 나타났으며, 야생형 트라스트주맵 대비 현저히 향상된 pH-의존적 FcRn 결합력을 나타냈다 (도 7).

[167] 실시예 8. 개별 아미노산 치환 조합의 트라스트주맵-Fc 변이체들의 FcγRs 결합력 분석

[168] 8-1. FcγRIIa에 대한 결합력 분석

[169] 개별 아미노산 치환 돌연변이를 조합한 Fc 변이체가 포함된 트라스트주맵-Fc의 FcγRIIa에 대한 결합력을 확인하기 위하여 ELISA 분석을 수행하였다. 구체적으로, 0.05 M Na₂CO₃ (pH 9.6)에 0.4 μg/ml로 희석한 HER2를 각각 50 μl씩 flat bottom polystyrene High Bind 96 well microplate (Costar, 3590)에 4°C, 16 시간 동안 인큐베이션하여 고정화한 후 100 μl의 1×PBS (pH 7.4)에 희석된 4% 스킴 밀크 (skim milk) (GenomicBase, SKI400)로 상온에서 2 시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST (1×PBS 및 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich, P1379-1L)) (pH 7.4) 150 μl로 4 회 세척한 뒤, 1×PBS (pH 7.4)에 희석된 1% 스킴 밀크에 10 μg/ml로 희석된 트라스트주맵 Fc 변이체들을 50 μl씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 0.05% PBST (pH 6.0/pH 7.4) 100 μl로 4 회 세척한 뒤, 1×PBS에 희석된 1% 스킴 밀크 (pH 6.0/pH 7.4)로 연속 희석된 hFcγRs-GST (hFcγRIIa-131H-GST, hFcγRIIa-131R-GST 및 hFcγRIIb-GST)를 50 μl 각 well에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 0.05% PBST (pH 7.4) 100 μl로 4 회 세척 후, 항-GST-HRP 컨쥬게이트 (GE Healthcare, RPN1236V) 50 μl을 이용해 상온에서 각각 1 시간 동안 항체 반응을 진행하고 0.05% PBST (pH 7.4) 100 μl로 4 회 세척하였다. 1-Step

Ultra TMB-ELISA substrate solution (Thermo Fisher Scientific, 34028)를 50 μ l씩 첨가하여 발색한 뒤 2 M H₂SO₄를 50 μ l씩 넣어주어 반응을 종료시키고, Epoch microplate spectrophotometer (BioTek)를 이용해 흡광도를 분석하였다.

- [170] 그 결과, 확보된 본 발명의 트라스트주맵-Fc 변이체들이 야생형 트라스트주맵-Fc 변이체보다 hFc γ RIIa-131H 및 hFc γ RIIa-131R과의 결합력이 월등히 향상된 것으로 나타났으며, 본 발명의 트라스트주맵-Fc 변이체들이 종래의 DEA (DE: S239D/I332E/G236A) 변이체가 도입된 트라스트주맵-Fc 변이체의 hFc γ RIIa-131H 및 hFc γ RIIa-131R 결합력보다도 결합력이 현저히 증가한 것으로 나타났다 (도 8). 또한, 본 발명의 트라스트주맵-Fc 변이체들이 DEA 변이체가 도입된 트라스트주맵-Fc 변이체에 비해 낮은 hFc γ RIIb 결합력을 보이는 것을 확인하였다 (도 8).

[171] 8-2. Fc γ RIIb에 대한 결합력 분석

- [172] 개별 아미노산 치환 돌연변이를 조합한 Fc 변이체가 포함된 트라스트주맵-Fc의 Fc γ RIIb에 대한 결합력을 확인하기 위하여 ELISA 분석을 수행하였다. 구체적으로, 0.05 M Na₂CO₃ (pH 9.6)에 4 μ g/ml로 희석한 HER2를 각각 50 μ l씩 flat bottom polystyrene High Bind 96 well microplate (Costar, 3590)에 4°C, 16 시간 동안 인큐베이션하여 고정화한 후 100 μ l의 1×PBS (pH 7.4)에 희석된 4% 스킴 밀크(skim milk) (GenomicBase, SKI400)로 상온에서 2 시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST (1×PBS 및 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich, P1379-1L)) (pH 7.4) 150 μ l로 4 회 세척한 뒤, 1×PBS (pH 7.4)에 희석된 1% 스킴 밀크에 10 μ g/ml로 희석된 트라스트주맵 Fc 변이체들을 50 μ l씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 0.05% PBST (pH 6.0/pH 7.4) 100 μ l로 4 회 세척한 뒤, 1×PBS에 희석된 1% 스킴 밀크 (pH 6.0/pH 7.4)로 연속 희석된 hFc γ Rs-GST (hFc γ RIIb-NA1-GST 및 hFc γ RIIb-NA2-GST)를 50 μ l 각 well에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 0.05% PBST (pH 7.4) 100 μ l로 4 회 세척 후, 항-GST-HRP 컨쥬게이트 (GE Healthcare, RPN1236V) 50 μ l을 이용해 상온에서 각각 1 시간 동안 항체 반응을 진행하고 0.05% PBST (pH 7.4) 100 μ l로 4 회 세척하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA substrate solution (Thermo Fisher Scientific, 34028)를 50 μ l씩 첨가하여 발색한 뒤 2 M H₂SO₄를 50 μ l씩 넣어주어 반응을 종료시키고, Epoch microplate spectrophotometer (BioTek)를 이용해 흡광도를 분석하였다.

- [173] 그 결과, 확보된 본 발명의 트라스트주맵-Fc 변이체들이 야생형 트라스트주맵-Fc 변이체와 비교하여 hFc γ RIIb-NA1 및 hFc γ RIIb-NA2와의 결합력이 감소하거나 유사한 정도인 것으로 확인된 반면, 종래의 DEA 변이체가 도입된 트라스트주맵-Fc 변이체의 hFc γ RIIb-NA1 및 hFc γ RIIb-NA2에 대한 결합력은 야생형 트라스트주맵-Fc 변이체에 비해 상당히 증가한 것으로 나타났다 (도 9).

- [174] 실시예 9. 개별 아미노산 치환 조합의 트라스트주맵-Fc 변이체들의 호중구에 대한 ADCC 효과 분석

- [175] 개별 아미노산 치환 조합의 트라스트주맵-Fc 변이체들에 의해 호중구 (neutrophil) (polymorphonuclear cells, PMN)의 암세포에 대한 ADCC(항체-의존적 세포-매개 세포독성, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) 효과를 비교하고자 실험하였다. 먼저 혈액 시료에서 호중구를 분리하기 위해 15 ml 코니칼 튜브에 3 ml의 Histopaque-1119 (Sigma-Aldrich, 1119-100ML), 3 ml의 Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, 1077-100ML) 및 4 ml의 혈액을 순서대로 쌓아 700 ×g로 30분간 원심분리하고 과립구(granulocyte) 층만을 취했다. RBC 파쇄 버퍼 (eBioscience, 00-4333-57)를 이용해 적혈구를 용해하고 회수한 호중구를 50 ng/ml IFN- γ (BioLegend, 570202) 및 10 ng/ml G-CSF (PeproTech, 300-23-2UG)를 포함한 배양액으로 37 °C 및 5% CO₂의 조건으로 16시간 배양하였다. 한편, 전날 96 Well Black/Clear Bottom Plate (Thermo Scientific, 165305)에 1x10⁴ cells/well로 배양한 SK-BR-3 세포를 2 μ M calcein-AM (InvivoGen, C3100MP)으로 30분간 염색하였다. 배양한 상기 호중구를 2x10⁵ cells/well로 염색한 SK-BR-3와 함께 배양하였고, 5 μ g/ml로 희석한 트라스트주맵-Fc 변이체들을 각각 넣고 Lionheart FX (BioTek)로 live-cell 이미징을 수행하였다. 또한, 형광 이미지를 활용하여 SK-BR-3의 세포 사멸을 분석하고 이를 그래프화하였다.
- [176] 그 결과, 확보된 본 발명의 트라스트주맵-Fc 변이체들이 야생형 트라스트주맵-Fc 변이체에 비해 현저히 향상된 호중구 ADCC 효율을 나타냈으며, 종래의 DEA 변이체가 도입된 트라스트주맵-Fc 변이체에 의한 것보다도 향상된 호중구 ADCC 효율을 가지는 것을 확인하였다 (도 10).
- [177] 실시예 10. 개별 아미노산 치환 조합의 트라스트주맵-Fc 변이체들의 대식세포 ADCP 효율 분석
- [178] 개별 아미노산 치환 조합의 트라스트주맵-Fc 변이체에 의한 대식세포의 ADCP 효율을 평가하기 위해, 혈액 시료에서 단핵구(monocyte)를 획득하기 위해 15 ml 코니칼 튜브에 6 ml의 Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, 1077-100ML), 및 PBS와 1:1로 희석한 혈액 8 ml을 순서대로 쌓아 1000 ×g로 10분간 원심분리하고 PBMC만을 취했다. 혈소판을 제거하기 위해 PBMC를 50 ml의 PBS에 풀어 100 ×g로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec, 130-050-201)를 이용해 PBMC에서 단핵구만을 분리한 뒤, 50 ng/ml GM-CSF (PeproTech, 300-03)로 일주일간 대식세포(macrophage)로 분화시켰다. 한편, SK-BR-3를 2 μ M PKH67 (Sigma-Aldrich, MIDI67-1KT)로 세포 표면을 염색하고, 상기에서 분화시킨 대식세포와 1:5의 비율로 섞은 뒤, 본 발명의 트라스트주맵-Fc 변이체 (WHFc25-3)와 각각 37 °C, 5 % CO₂의 조건으로 4시간 배양하였다. 이 후, 항 CD11b-APC 항체 (BioLegend, 301309), 항 CD14-APC 항체 (BioLegend, 301807)로 대식세포를 염색하여 FACS 분석하고, 얻은 데이터는 FlowJo 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.

- [179] 그 결과, 본 발명의 WHFc25-3 변이체가 도입된 트라스트주맵-Fc 변이체는 야생형에 비해 현저히 향상된 ADCP 효율을 나타냈고, 종래의 DEA 변이체가 도입된 트라스트주맵-Fc 변이체와 유사한 정도의 ADCP 효율을 나타내는 것을 확인하였다 (도 11).
- [180] 실시예 11. 개별 아미노산 치환 조합의 트라스트주맵-Fc 변이체들의 혈중 반감기 평가
- [181] 개별 아미노산 치환 조합의 트라스트주맵-Fc 변이체에 의한 체내 혈중 반감기를 평가하기 위해, hFcRn 트랜스제닉 마우스(transgenic mouse)를 이용한 약동학 프로파일(pharmacokinetic profile) 분석을 수행하였다. 구체적으로, 동물세포에서 발현시키고 Protein A 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)로 정제한 트라스트주맵-Fc 변이체들을 NGC Chromatography System (Bio Rad)을 이용한 SEC(size-exclusion chromatography)로 추가 정제하였다. 각각의 트라스트주맵-Fc 변이체를 Tg276 마우스에 5 mg/kg의 양으로 정맥 주사 투여한 후, 30분 및 24시간 차에 약 100 μ l씩 채혈하여 혈청을 취하였다. 이 후, 7일 간격으로 채혈하여 혈청을 얻어 투약한 체내 잔존 트라스트주맵-Fc 변이체의 함량을 정량적(quantitative) ELISA로 분석하기 위해, 0.05 M Na₂CO₃ (pH9.6)에 0.4 μ g/ml로 희석한 HER2를 각각 50 μ l씩 flat bottom polystyrene High Bind 96 well microplate (Costar, 3590)에 4°C 및 16 시간 동안 인큐베이션하여 고정화한 후 100 μ l의 1xPBS (pH 7.4)에 희석된 4% 스킴 밀크(skim milk) (GenomicBase, SKI400)로 상온에서 2 시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST (1xPBS 및 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich, P1379-1L)) (pH7.4) 150 μ l로 4 회 세척한 뒤, 1xPBS (pH 7.4)에 희석된 1% 스킴 밀크에 연속 희석한 혈청을 50 μ l씩 분주하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 때, 정량을 위해 1 μ g/ml의 농도부터 연속 희석한 트라스트주맵-Fc 변이체를 함께 반응시켜 표준 곡선을 구하는 데 이용했다. 0.05% PBST (pH 6.0/pH 7.4) 100 μ l로 4 회 세척한 뒤, Peroxidase AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 109-036-003) 50 μ l로 상온에서 1시간 동안 반응을 진행하고 0.05% PBST (pH 7.4) 100 μ l로 4 회 세척하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA substrate solution (Thermo Fisher Scientific, 34028)를 50 μ l씩 첨가하여 발색한 뒤 2 M H₂SO₄를 50 μ l씩 넣어주어 반응을 종료시키고, Epoch microplate spectrophotometer (BioTek)를 이용해 흡광도를 분석하였다. 얻은 결과를 이용해 각 샘플 내의 잔존 트라스트주맵-Fc 변이체의 농도를 구하고 이를 그래프화하여 혈중 반감기를 측정하였다.

- [182] [표4]

	T _{1/2} (h)
트라스트주맵	57.4±2.9
트라스트주맵-DEA (Xencor)	51.5±0.5
트라스트주맵-PFc29	166.7±11.3

트라스트주맵-WHFc25-2	174.9±19.4
트라스트주맵-WHFc25-3	150.8±4.0

[183] 그 결과, 본 발명의 변이체들이 도입된 트라스트주맵-Fc 변이체의 혈중 반감기가 야생형 트라스트주맵에 비해 현저하게 긴 것으로 나타났으며, 특히, 선행 연구에서 보고된 DEA 변이체가 도입된 트라스트주맵-Fc 변이체에 비해서도 현저히 향상된 혈중 반감기를 갖는 것으로 나타났다(도 12 및 표 4).

[184] 실시예 12. 개별 아미노산 치환 조합의 트라스트주맵-Fc 변이체들의 열안정성 평가

[185] 개별 아미노산 치환 돌연변이를 조합한 Fc 변이체가 포함된 트라스트주맵-Fc의 열 안정성을 평가하기 위해 thermofluor 분석을 수행하였다. 구체적으로, 5 μ M로 PBS에 희석한 단백질 (트라스트주맵-Fc 변이체) 45 μ l 및 200 $\times$ 로 PBS에 희석한 SYPRO Orange (Invitrogen, S6651) 5 μ l를 white PCR 플레이트 (Thermo Scientific, AB0900W)에 넣고 optically clear sealing film (Thermo Scientific, AB1170)으로 봉하였다. PCR 플레이트를 QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, A28567)으로 25 $^{\circ}$ C부터 99.9 $^{\circ}$ C까지 0.03 $^{\circ}$ C/s의 ramp rate로 온도를 올리며 형광 발광을 분석하였다. 형광 신호는 PBS 샘플을 이용해 백그라운드 제거(background subtraction)하였고 온도를 변수로 그래프화하고, OriginPro 소프트웨어를 이용하여 각 단백질의 T_m(melting temperature)인 그래프의 sigmoidal transition curve의 중점을 구하였다. 상기의 분석은 3 반복 수행되었다.

[186] [표5]

	T _m ($^{\circ}$ C)
트라스트주맵	69.5±0.053
트라스트주맵-PFc29	68.5±0.296
트라스트주맵-DEA	50.9±0.099
트라스트주맵-WHFc25-1	68.2±0.009
트라스트주맵-WHFc25-2	69.1±0.081
트라스트주맵-WHFc25-3	68.4±0.149

[187] 그 결과, 본 발명의 트라스트주맵 변이체들은 야생형 트라스트주맵 변이체에 비해 열 안정성이 감소하지 않은 것으로 나타난 반면, 종래의 DEA 변이체가 도입된 트라스트주맵-Fc 변이체는 야생형에 비해 열 안정성이 크게 감소한 것으로 나타났다(도 13 및 표 5).

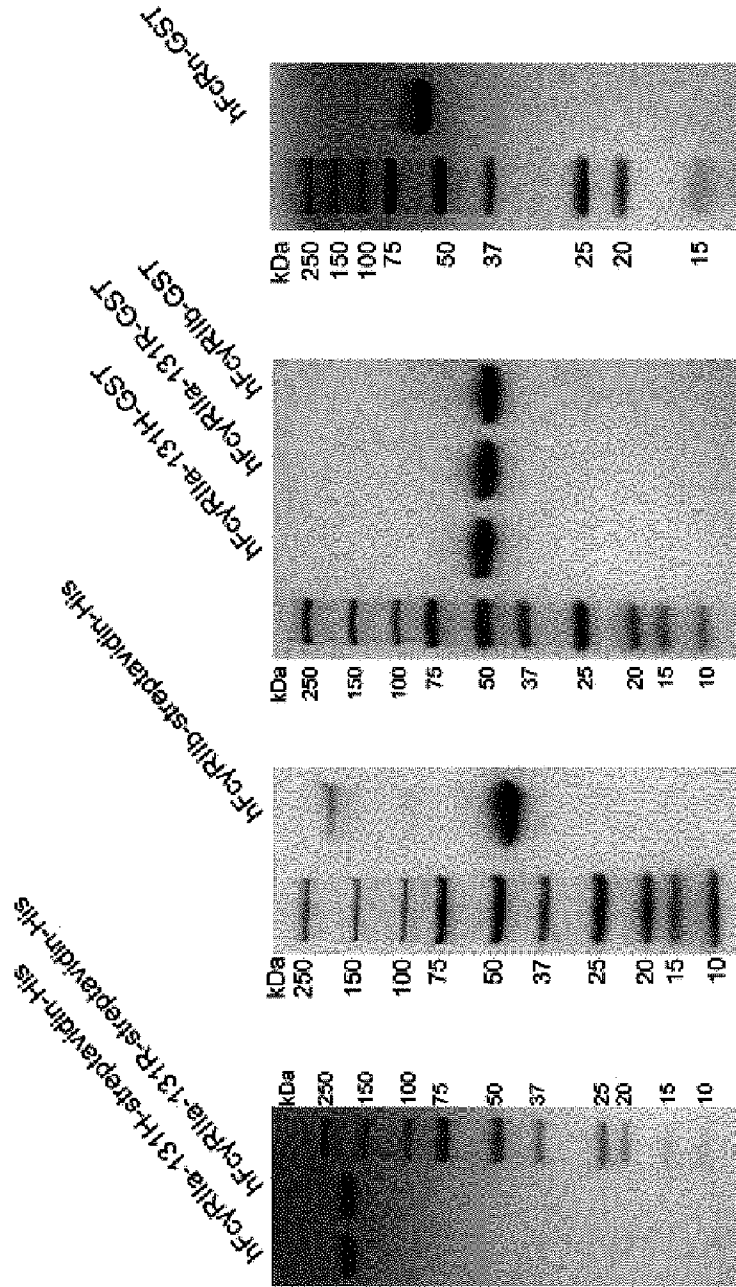
청구범위

- [청구항 1] 야생형(Wild type) 인간 항체 Fc 도메인에서, 카밧 넘버링 시스템(Kabat numbering system)에 따라 넘버링된 231 또는 355 위치의 아미노산이 야생형의 아미노산과 다른 서열로 치환된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 야생형 인간 항체 Fc 도메인에서, 카밧 넘버링 시스템에 따라 넘버링된 231, 236, 311, 355, 396 및 428 위치의 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 위치의 아미노산이 야생형의 아미노산과 다른 서열로 치환된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, A231V, G236A, Q311R, R355L, P396L 및 M428L로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, A231V, G236A, Q311R, P396L 및 M428L의 아미노산 치환을 포함하는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, G236A, Q311R, R355L, P396L 및 M428L의 아미노산 치환을 포함하는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서, A231V, G236A, Q311R, R355L, P396L 및 M428L의 아미노산 치환을 포함하는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 7] 제 1항에 있어서, 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 Fc γ RIIIa와의 결합력이 향상된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 8] 제 1항에 있어서, 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 A/I 비율이 증가된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 9] 제 1항에 있어서, 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 Fc γ RIIIb 대비 Fc γ RIIIa에 대한 선택적 결합력이 향상된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 10] 제 1항에 있어서, 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 작용기 기능(effector function)을 향상시키는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 11] 제 10항에 있어서, 작용기 기능은 항체-의존적 세포-매개된 세포독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC), 항체-의존적 세포성 포식작용(antibody-dependent cell-mediated phagocytosis, ADCP), C1q-결합, 보체 활성화, 보체 의존적 세포독성(complement dependent cytotoxicity, CDC), Fc-감마 수용체 결합을 포함하는 Fc-수용체 결합, 단백질 A-결합, 단백질 G-결합, 보체-의존적 세포성 세포독성(complement dependent cell-mediated cytotoxicity, CDCC), 보체-증강 세포독성, 옵소닌화, Fc-함유 폴리펩티드 내재화, 표적 하향조절, ADC 흡수, 아포토시스의 유도, 세포 사멸, 세포 주기 정지, 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 Fc-매개된 작용기 기능인, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 12] 제 1항에 있어서, 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 pH 7.0 내지 7.8에서 FcRn에 낮은 결합 친화력을 나타내는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.

- [청구항 13] 제 1항에 있어서, 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 pH 5.6 내지 6.5에서 FcRn에 높은 결합 친화력을 나타내는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 14] 제 1항에 있어서, 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 생체 내 반감기 (Half-life)가 증가된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.
- [청구항 15] 제 1항의 Fc 도메인 변이체를 포함하는 Fc 감마 수용체에 대한 결합력이 향상된 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.
- [청구항 16] 제 15항에 있어서, 야생형 인간 항체에 비해 증가된 생체 내 반감기를 갖는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.
- [청구항 17] 제 1항의 인간 항체 Fc 도메인 변이체 및 생리활성 폴리펩타이드가 결합되어 증가된 생체 내 반감기를 갖는 생리활성 폴리펩타이드 결합체.
- [청구항 18] 제 17항에 있어서, 생리활성 폴리펩타이드가 인간 성장 호르몬, 성장 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬 방출 펩타이드, 인터페론, 콜로니 자극 인자, 인터루킨, 인터루킨 수용성 수용체, TNF 수용성 수용체, 글루코세레브로시다제, 마크로파지 활성화 인자, 마크로파지 펩타이드, B세포 인자, T세포 인자, 단백질 A, 알러지 억제 인자, 세포 피사 당단백질, 면역독소, 림프독소, 종양 피사 인자, 종양 억제 인자, 전이성장 인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, 아포리포단백질-E, 에리트로포이에틴, 고 당쇄화 에리트로포이에틴, 혈액인자 VII, 혈액인자 VIII, 혈액인자 IX, 플라즈미노젠 활성화 인자, 유로키나제, 스트렙토키나제, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스무타제, 렙틴, 혈소판 유래 성장 인자, 표피 성장 인자, 골형성 성장 인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 인슐린, 인슐린 유도체, 글루카곤, 글루카곤 유사체 펩타이드-1 (Glucagon Like Peptide-1) 아트리오펩틴, 연골 유도 인자, 결합 조직 활성화인자, 난포 자극호르몬, 황체 형성 호르몬, 난포 자극 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장 인자, 부갑상선 호르몬, 릴렉신, 씨크레틴, 소마토메딘, 인슐린-유사 성장 인자, 부신 피질 호르몬, 콜레시스토키닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드, 코티코트로핀 방출 인자, 갑상선 자극 호르몬, 수용체류, 수용체 길항물질, 세포표면항원, 단일클론 항체, 폴리클론항체, 항체 단편류 및 바이러스 유래 백신 항원으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 생리활성 폴리펩타이드 결합체.
- [청구항 19] 제 1항의 인간 항체 Fc 도메인 변이체, 제 15항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산분자.
- [청구항 20] 제 1항의 인간 항체 Fc 도메인 변이체, 제 15항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 제 17항의 생리활성 폴리펩타이드 결합체를 유효 성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 21] a) 제 1항의 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및

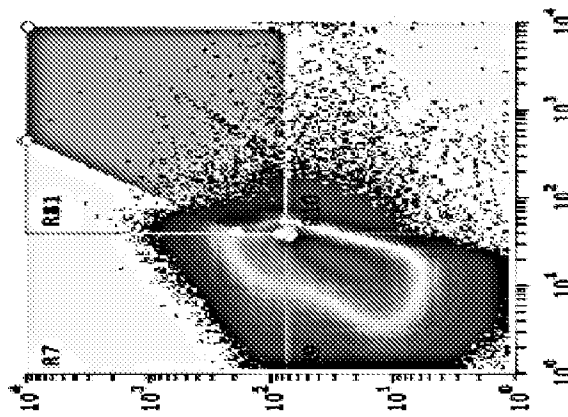
- b) 숙주세포에 의해 발현된 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체의 제조방법.
- [청구항 22] a) 제 15항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및
b) 숙주세포로부터 발현된 항체를 정제하는 단계를 포함하는 Fc 감마 수용체에 특이적인 항체의 제조방법.
- [청구항 23] 항체 치료제의 제조에 사용하기 위한, 제 1항의 인간 항체 Fc 도메인 변이체, 제 15항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 제 17항의 생리활성 폴리펩타이드 결합체의 용도.
- [청구항 24] 제 1항의 인간 항체 Fc 도메인 변이체, 제 15항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 제 17항의 생리활성 폴리펩타이드 결합체의 암의 예방 또는 치료 용도.
- [청구항 25] 제 1항의 인간 항체 Fc 도메인 변이체, 제 15항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 제 17항의 생리활성 폴리펩타이드 결합체를 약학적으로 유효한 양으로 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법.

[도1]



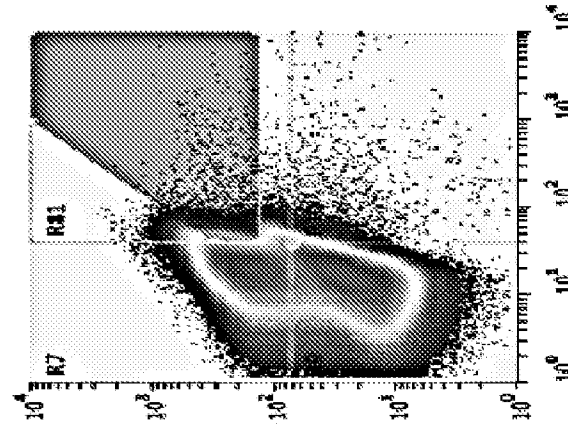
Round 1

Alexa 488 - Protein A 40nM
Alexa 647 - FcγRIIIa 20nM
FcγRIIb 40nM



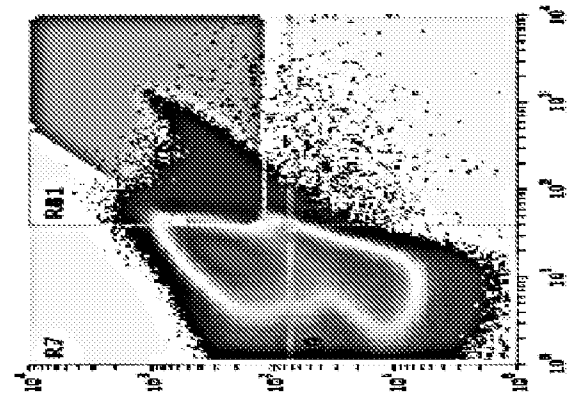
Round 2

Alexa 488 - Protein A 40nM
Alexa 647 - FcγRIIIa 20nM
FcγRIIb 40nM



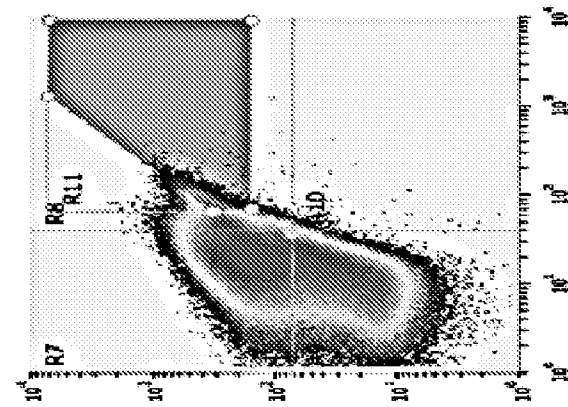
Round 3

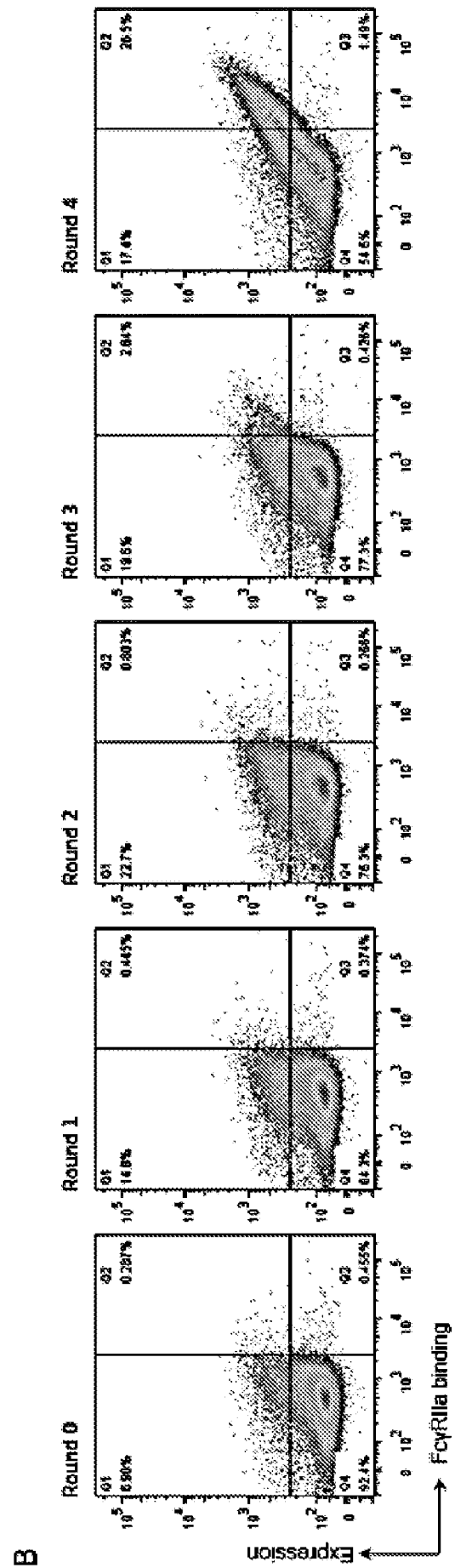
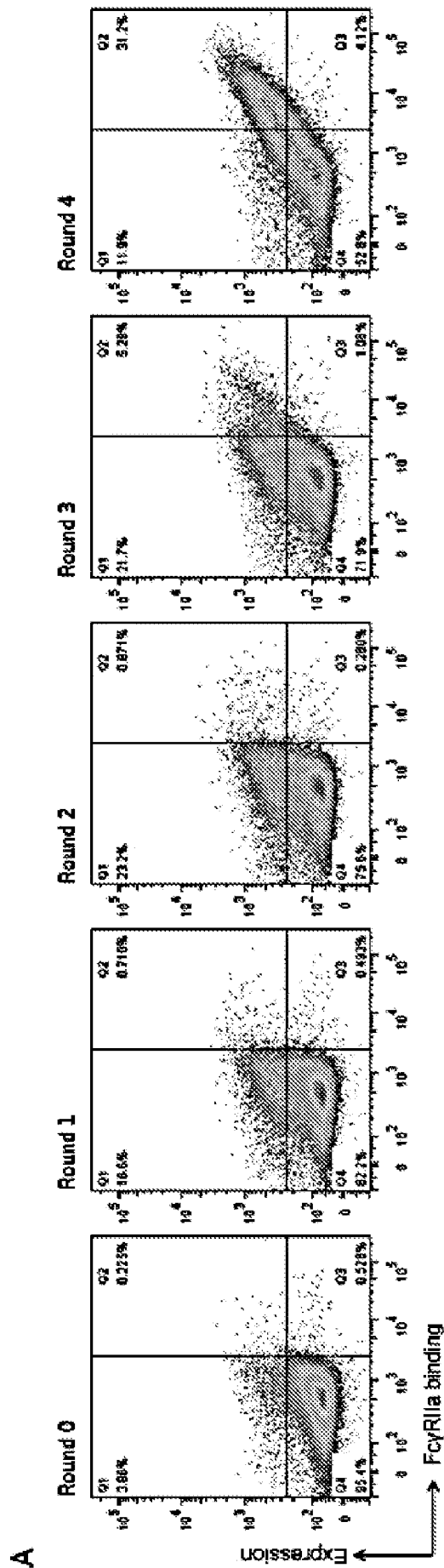
Alexa 488 - Protein A 40nM
Alexa 647 - FcγRIIIa 20nM
FcγRIIb 100nM



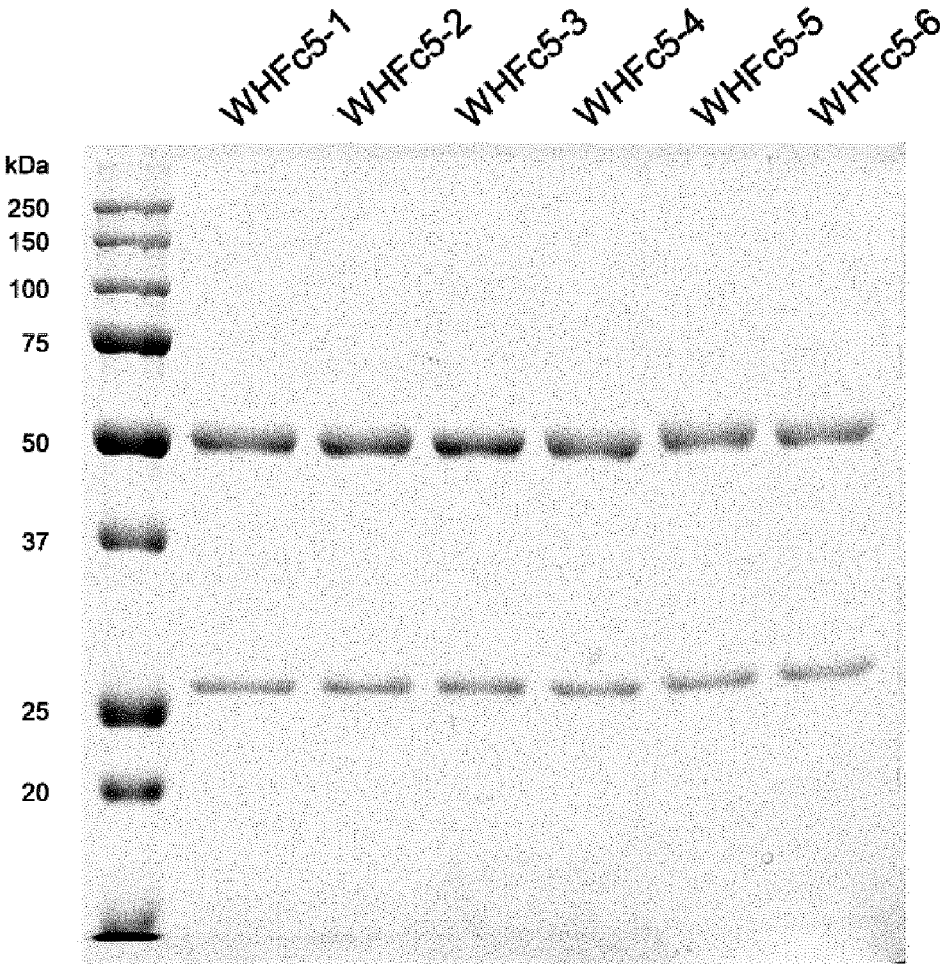
Round 4

Alexa 488 - Protein A 40nM
Alexa 647 - FcγRIIIa 5nM
FcγRIIb 100nM

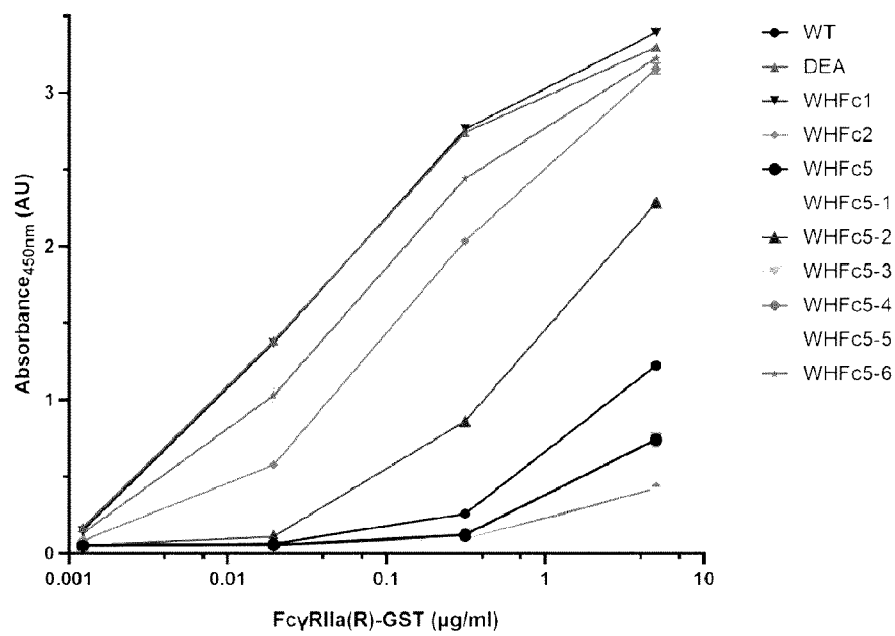
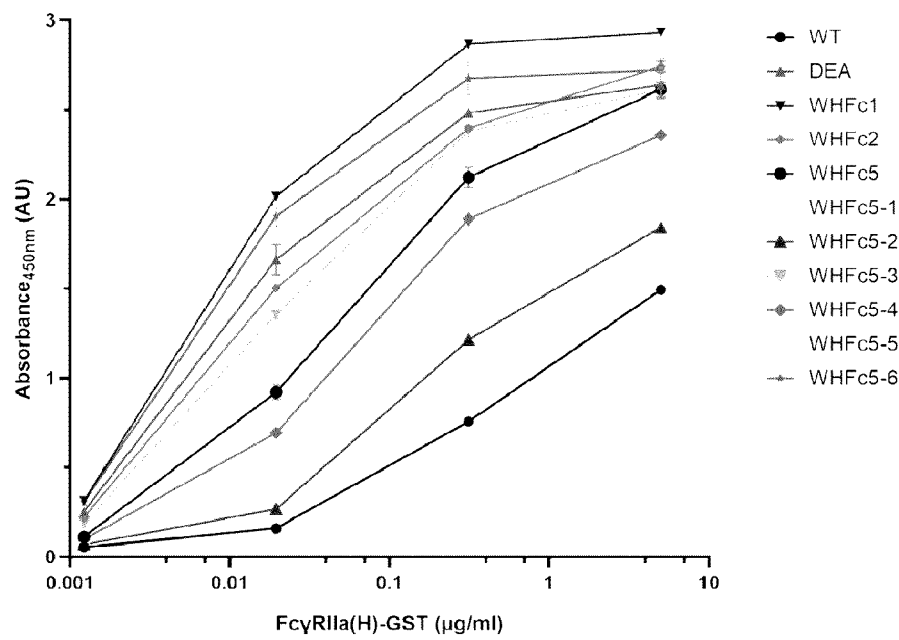




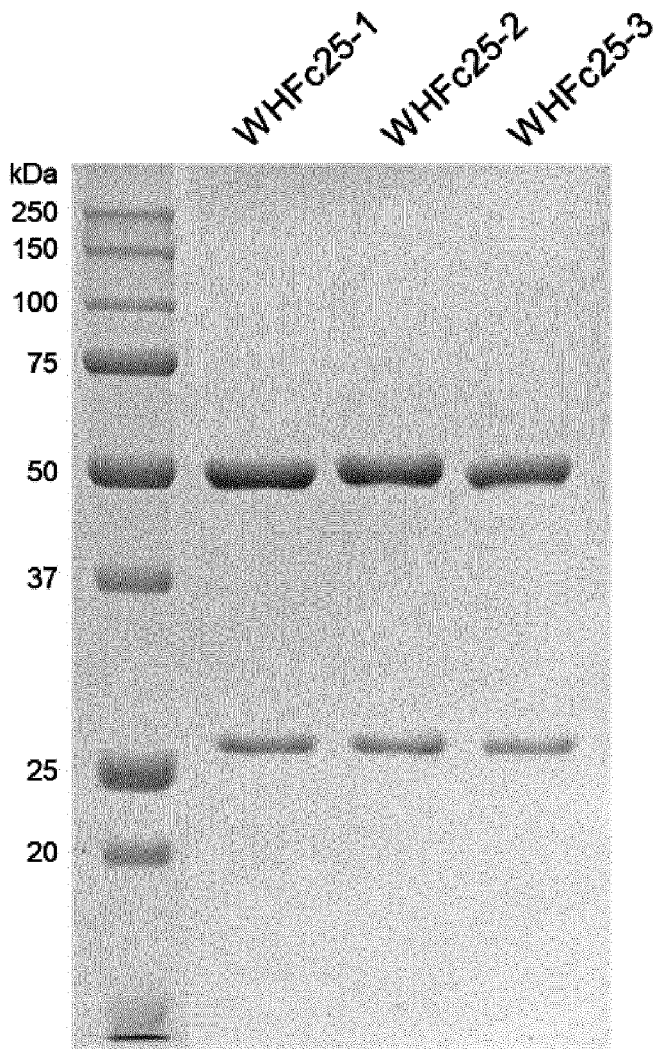
[도4]



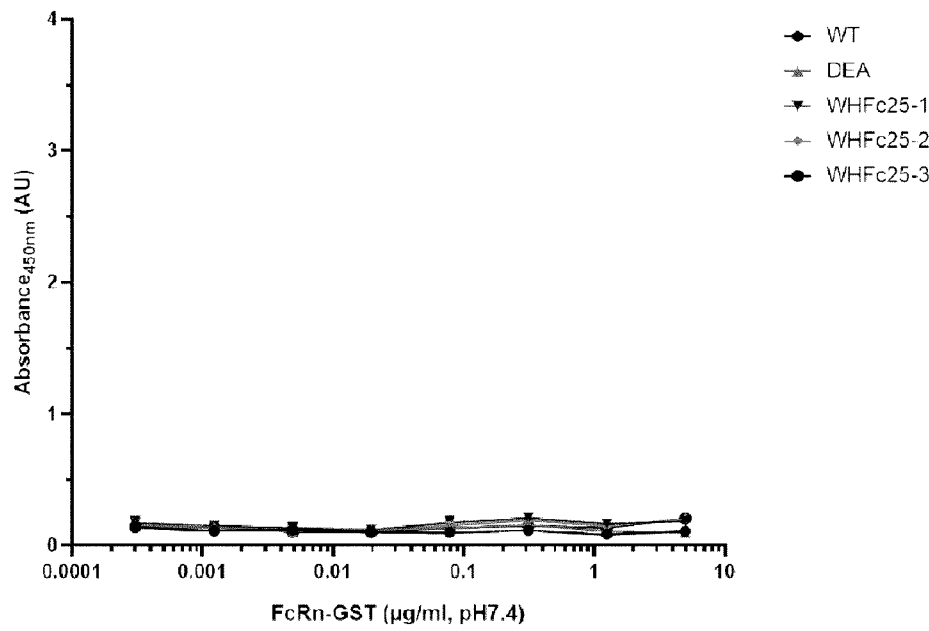
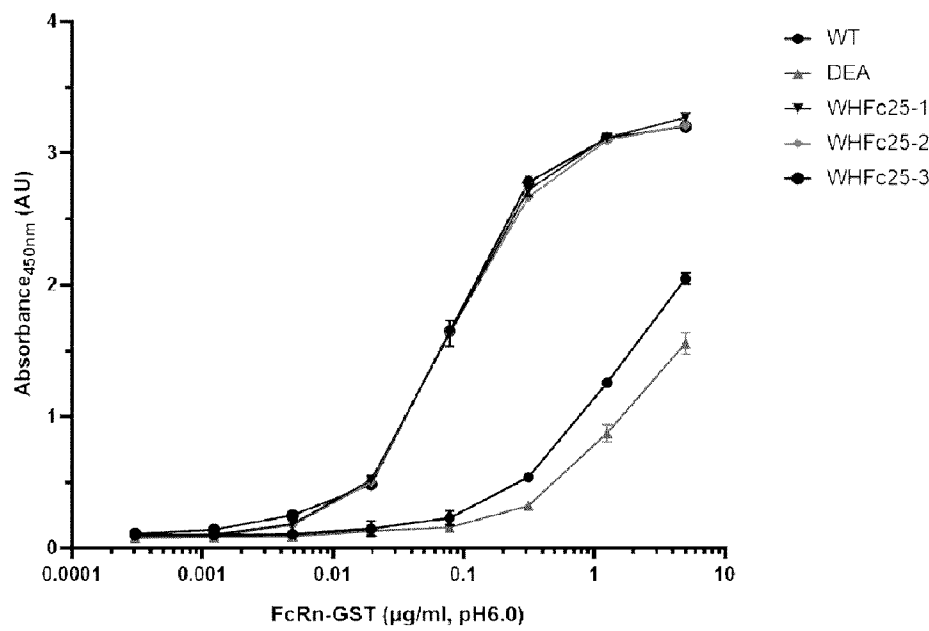
[도5]



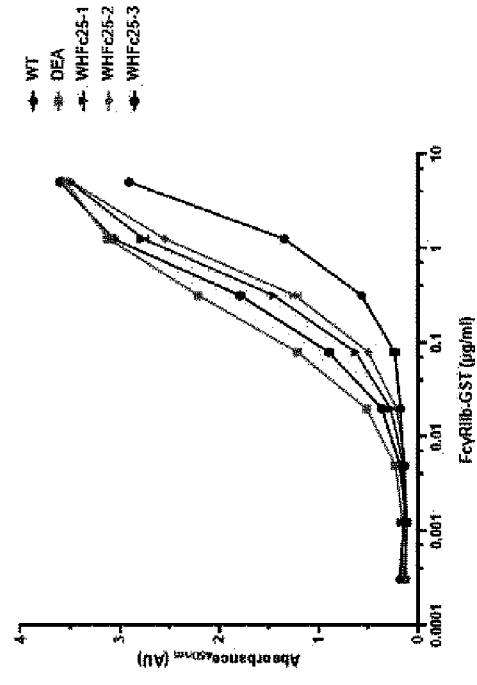
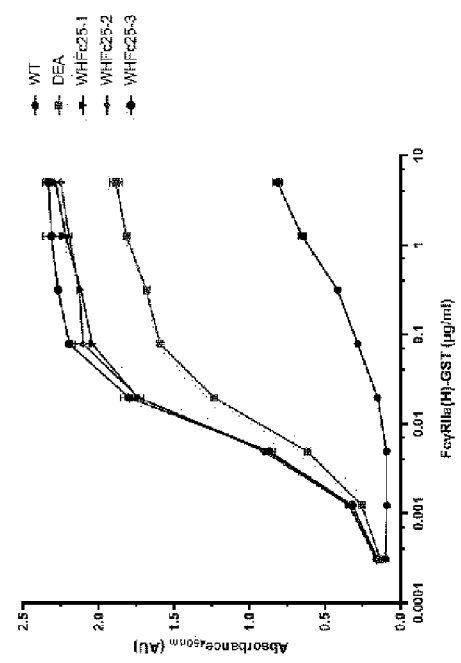
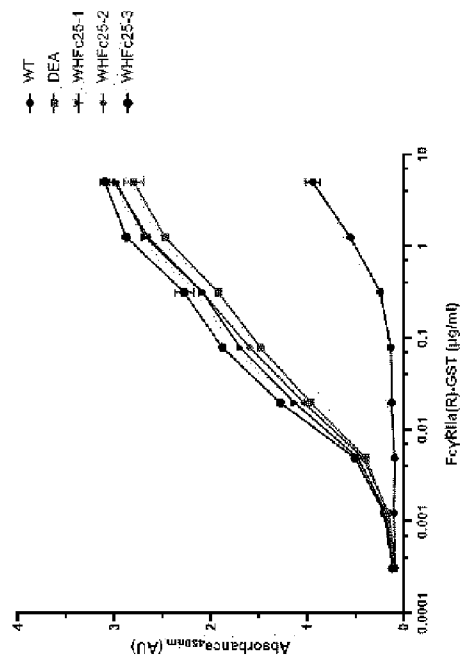
[도6]



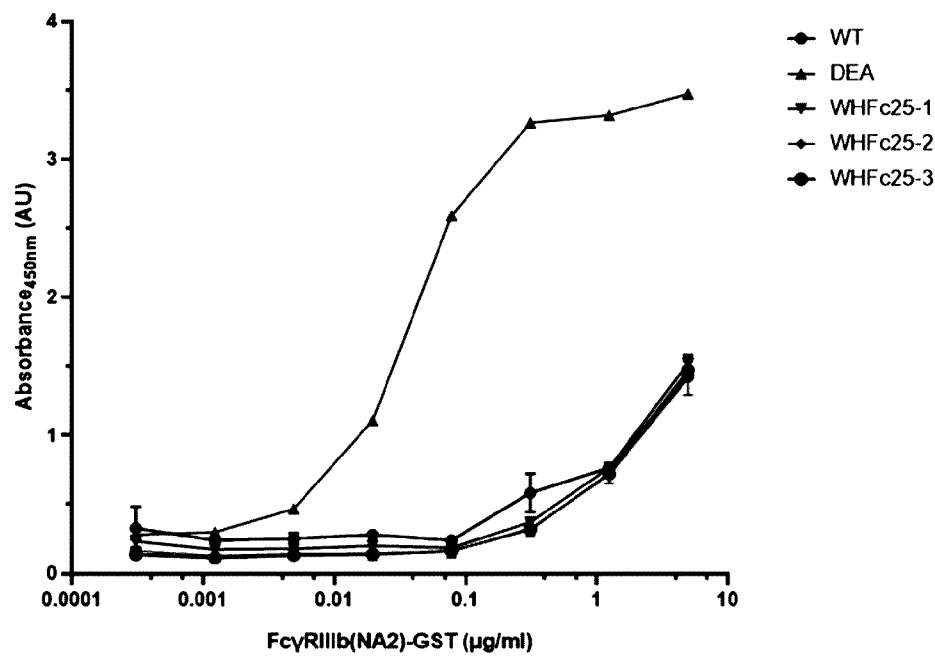
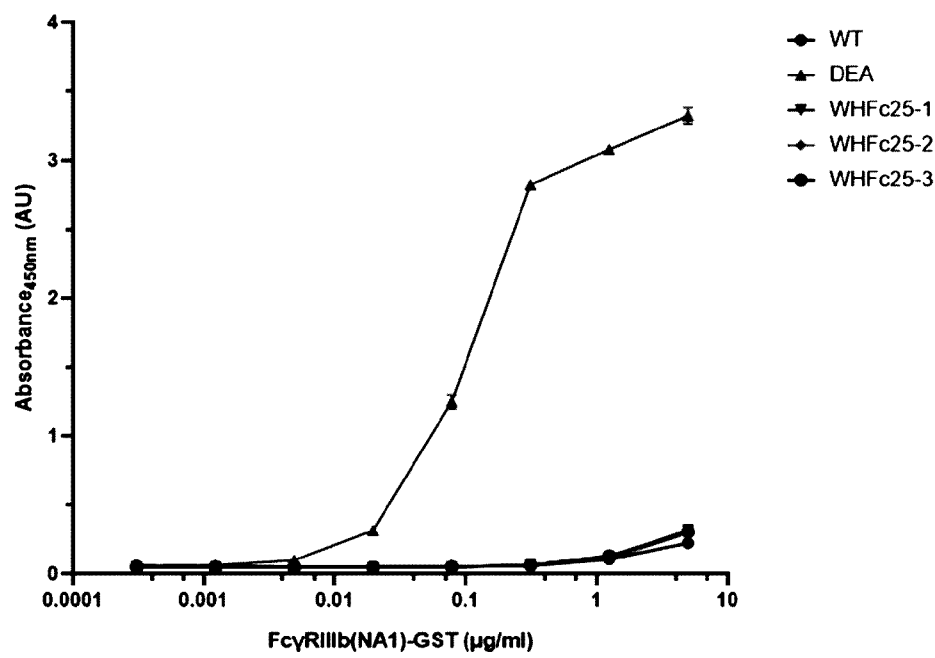
[도7]



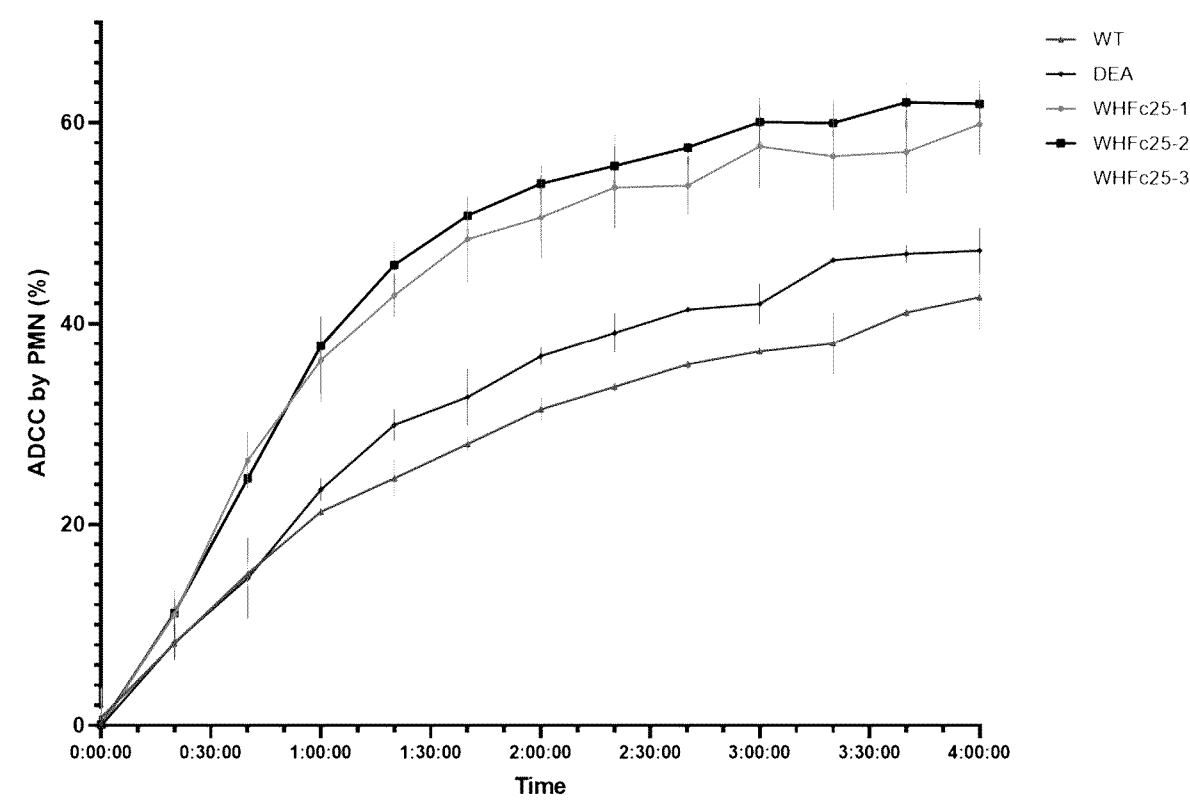
[도8]



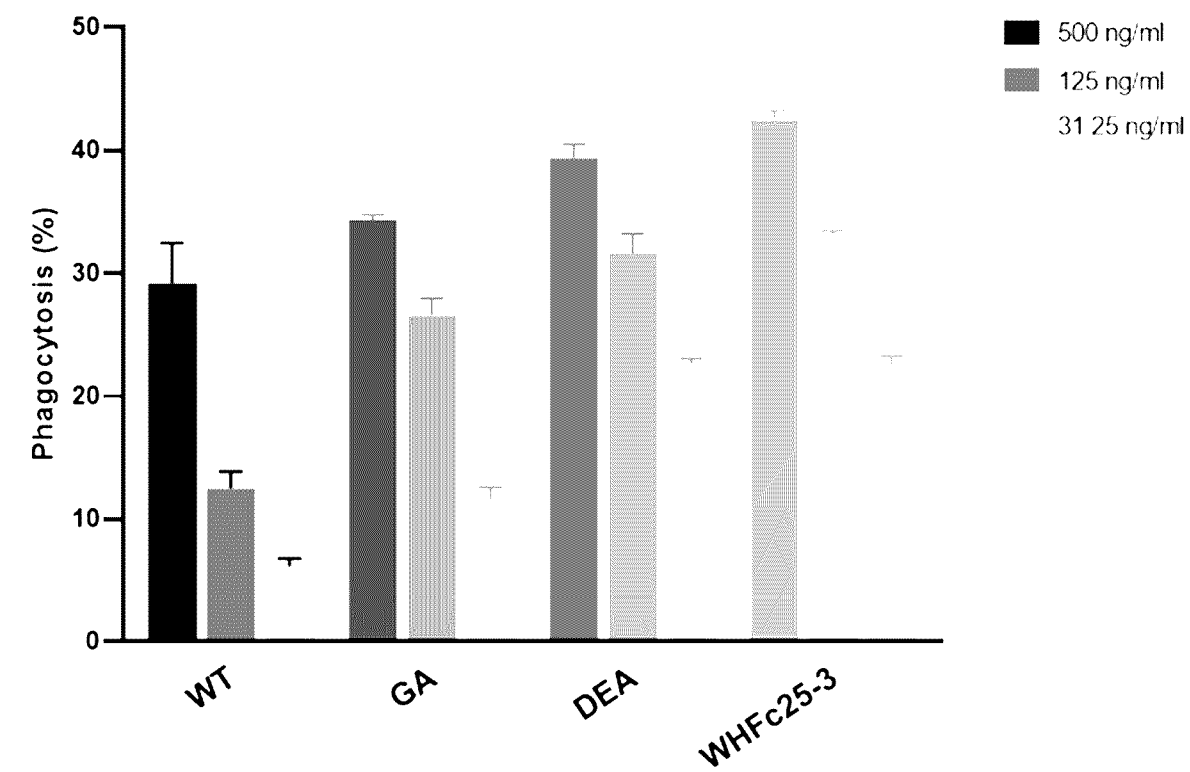
[도9]



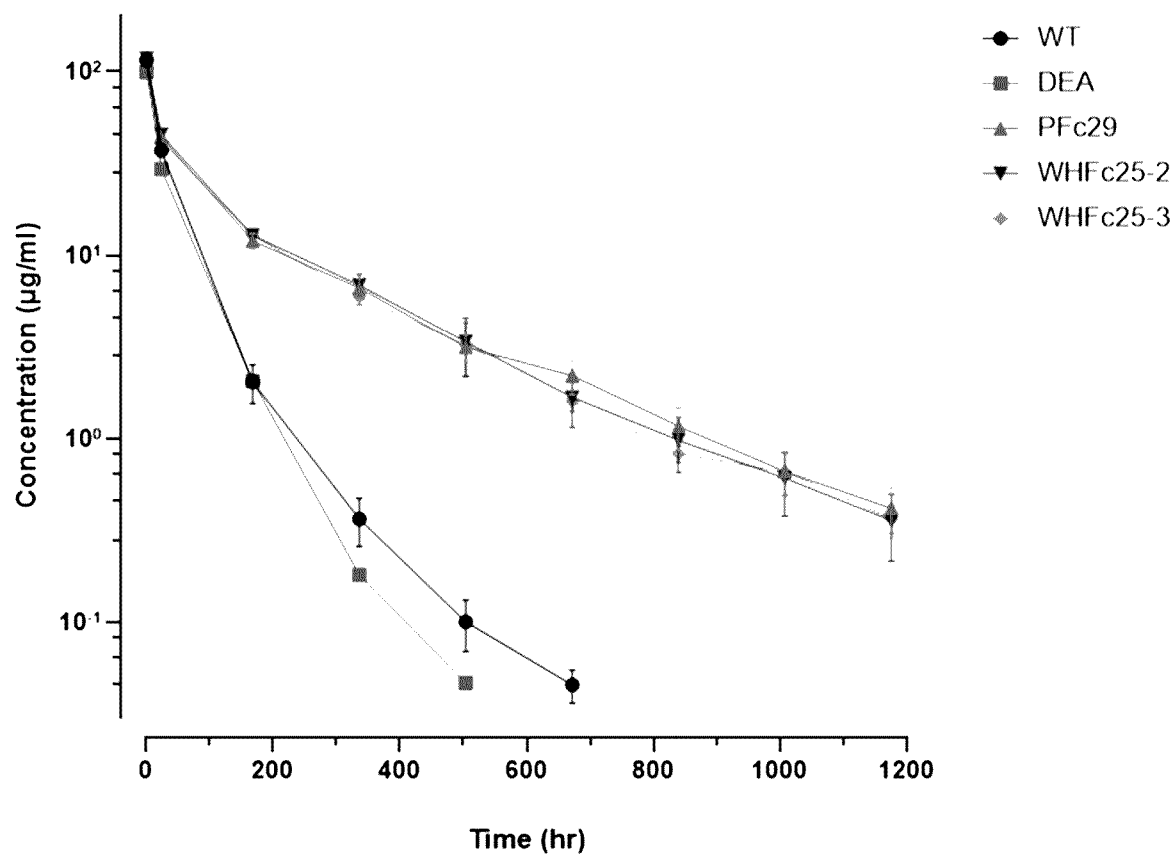
[도10]



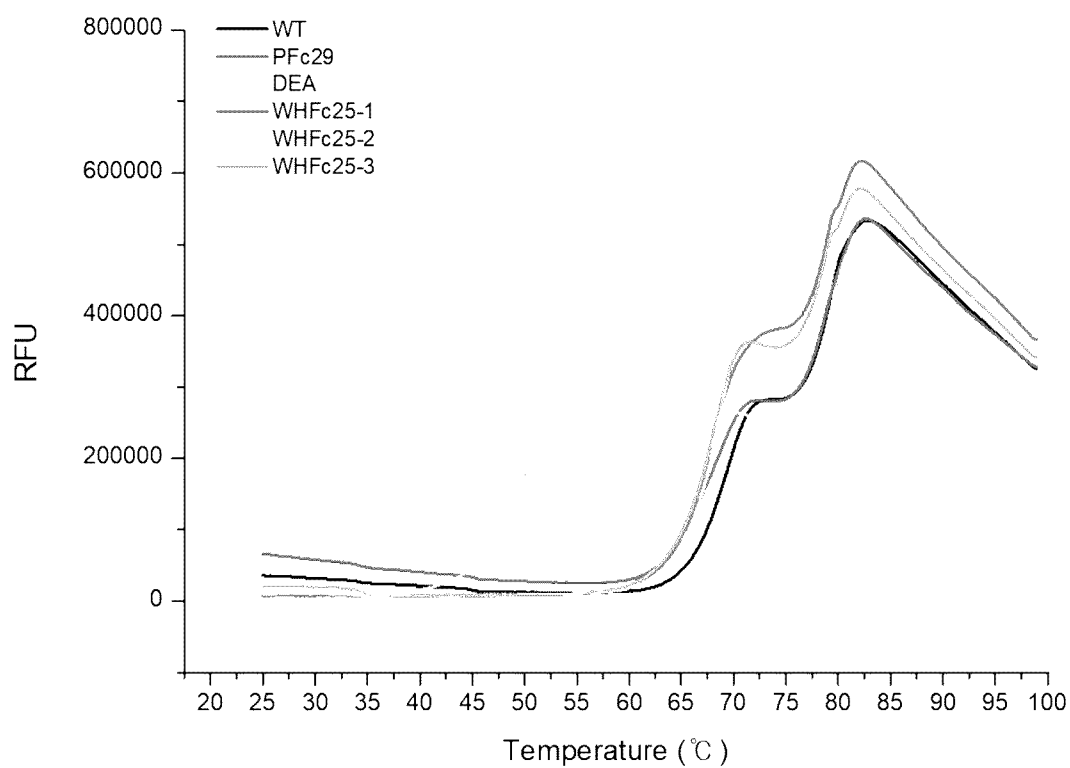
[도11]



[도12]



[도13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/008402

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/00(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 16/00(2006.01); A61K 38/08(2006.01); A61K 47/48(2006.01); A61P 35/00(2006.01); C07K 16/24(2006.01); C07K 16/28(2006.01); C07K 16/32(2006.01); C12N 15/10(2006.01); C40B 50/06(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: 항체 Fc 도메인(antibody Fc domain), 카바트 넘버링 시스템(Kabat numbering system), 변이(mutation), 치환(substitution), pH, 친화력(affinity)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2018-0004125 A (LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES) 10 January 2018 (2018-01-10) See claims 1-4, 9-23 and 30-33; and paragraphs [0004]-[0006], [0009], [0107], [0133] and [0172].	1-3,7-18,20-24
Y		4
A		5-6
Y	KR 10-2018-0113907 A (KOOKMIN UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION et al.) 17 October 2018 (2018-10-17) See claims 1-2.	4
Y	KR 10-2019-0044347 A (KOOKMIN UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION) 30 April 2019 (2019-04-30) See claims 12-13; and paragraphs [0041] and [0127]-[0133].	4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 September 2023

Date of mailing of the international search report

26 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/KR2023/008402**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2005-0116400 A (XENCOR INC.) 12 December 2005 (2005-12-12) See claims 1-22 and 33-36; and paragraphs [0022]-[0025].	1-3,7-18,20-24
X	US 2016-0008485 A1 (PFIZER INC.) 14 January 2016 (2016-01-14) See claims 1-7, 11, 16-18, 20-23, 26-30 and 36; paragraphs [0152], [0210], [0362]-[0364] and [0375]; and table 13.	1-2,7-18,20-24
PX	WO 2023-068718 A1 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 27 April 2023 (2023-04-27) See entire document.	1-18,20-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/008402

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/KR2023/008402

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

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

1. ☒ Claims Nos.: **25**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 25 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, 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.: **19**
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/KR2023/008402

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2018-0004125	A	10 January 2018	AU	2016-259124	A1	31 August 2017
				AU	2016-259124	B2	16 June 2022
				AU	2022-228151	A1	29 September 2022
				BR	112017023453	A2	31 July 2018
				CA	2977010	A1	10 November 2016
				CN	107531794	A	02 January 2018
				CN	107531794	B	12 July 2022
				CN	115073604	A	20 September 2022
				EP	3292145	A1	14 March 2018
				FR	3035879	A1	11 November 2016
				JP	2018-515446	A	14 June 2018
				JP	6830903	B2	17 February 2021
				MX	2017013028	A	08 December 2017
				US	11649271	B2	16 May 2023
				US	2018-0030111	A1	01 February 2018
				US	2023-0265155	A1	24 August 2023
				WO	2016-177984	A1	10 November 2016
KR	10-2018-0113907	A	17 October 2018	KR	10-1924485	B1	04 December 2018
KR	10-2019-0044347	A	30 April 2019	KR	10-2048037	B1	22 November 2019
				WO	2019-078591	A1	25 April 2019
KR	10-2005-0116400	A	12 December 2005	AU	2004-236160	A1	18 November 2004
				AU	2008-261120	A1	15 January 2009
				BR	PI0410031	A	25 April 2006
				CA	2524399	A1	18 November 2004
				CA	2524399	C	26 February 2013
				CA	2916863	A1	18 November 2004
				CA	2916863	C	21 August 2018
				CN	100867583	A	22 November 2006
				CN	100867583	B	23 May 2012
				CN	102633880	A	15 August 2012
				CN	102633880	B	25 February 2015
				CN	104788565	A	22 July 2015
				DK	2368911	T3	11 September 2017
				EP	1620467	A2	01 February 2006
				EP	2368911	A1	28 September 2011
				EP	2368911	B1	10 May 2017
				EP	3101030	A1	07 December 2016
				EP	3101030	B1	23 December 2020
				EP	3838920	A1	23 June 2021
				ES	2638568	T3	23 October 2017
				HU	E034268	T2	28 February 2018
				IL	171723	A	31 March 2014
				JP	2007-525443	A	06 September 2007
				JP	2009-209150	A	17 September 2009
				JP	4578467	B2	10 November 2010
				JP	5226613	B2	03 July 2013
				KR	10-0890586	B1	25 March 2009
				KR	10-0956110	B1	10 May 2010
				KR	10-0973564	B1	03 August 2010
				KR	10-2007-0116176	A	06 December 2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/008402

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		KR 10-2009-0059170 A	10 June 2009
		PL 2368911 T3	29 December 2017
		PL 2368911 T4	29 December 2017
		SI 2368911 T1	30 October 2017
		US 10183999 B2	22 January 2019
		US 10184000 B2	22 January 2019
		US 2004-0132101 A1	08 July 2004
		US 2009-0068177 A1	12 March 2009
		US 2009-0081208 A1	26 March 2009
		US 2009-0092599 A1	09 April 2009
		US 2012-0230980 A1	13 September 2012
		US 2013-0156754 A1	20 June 2013
		US 2013-0156758 A1	20 June 2013
		US 2013-0243762 A1	19 September 2013
		US 2015-0079082 A1	19 March 2015
		US 2016-0318993 A1	03 November 2016
		US 2016-0347825 A1	01 December 2016
		US 2016-0347837 A1	01 December 2016
		US 8039592 B2	18 October 2011
		US 8093359 B2	10 January 2012
		US 8383109 B2	26 February 2013
		US 8809503 B2	19 August 2014
		US 8858937 B2	14 October 2014
		US 9193798 B2	24 November 2015
		US 9353187 B2	31 May 2016
		WO 2004-099249 A2	18 November 2004
		WO 2004-099249 A3	26 January 2006
US 2016-0008485 A1	14 January 2016	CA 2859755 A1	27 June 2013
		CA 2859755 C	20 April 2021
		CA 3111357 A1	27 June 2013
		EP 2794653 A1	29 October 2014
		EP 2794653 B1	13 March 2019
		EP 3539982 A2	18 September 2019
		EP 3539982 A3	15 January 2020
		ES 2721882 T3	06 August 2019
		JP 2015-502397 A	22 January 2015
		JP 2017-206512 A	24 November 2017
		JP 2019-034942 A	07 March 2019
		JP 2021-019632 A	18 February 2021
		JP 7165175 B2	02 November 2022
		US 11147852 B2	19 October 2021
		WO 2013-093809 A1	27 June 2013
WO 2023-068718 A1	27 April 2023	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 16/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 16/00(2006.01); A61K 38/08(2006.01); A61K 47/48(2006.01); A61P 35/00(2006.01); C07K 16/24(2006.01); C07K 16/28(2006.01); C07K 16/32(2006.01); C12N 15/10(2006.01); C40B 50/06(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: 항체 Fc 도메인(antibody Fc domain), 카бат 넘버링 시스템(Kabat numbering system), FcγRIIa, 변이(mutation), 치환(substitution), pH, 친화력(affinity)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2018-0004125 A (라보라토이레 프란카이즈 듀 프락티온네먼트 에트 데스 바이오테크놀로지스) 2018.01.10 청구항 1-4, 9-23, 30-33; 단락 [0004]-[0006], [0009], [0107], [0133], [0172]	1-3,7-18,20-24
Y		4
A		5-6
Y	KR 10-2018-0113907 A (국민대학교산학협력단 등) 2018.10.17 청구항 1-2	4
Y	KR 10-2019-0044347 A (국민대학교산학협력단) 2019.04.30 청구항 12-13; 단락 [0041], [0127]-[0133]	4
X	KR 10-2005-0116400 A (젠코어 인코포레이티드) 2005.12.12 청구항 1-22, 33-36; 단락 [0022]-[0025]	1-3,7-18,20-24
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.		
☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년09월26일(26.09.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년09월26일(26.09.2023)
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
X	US 2016-0008485 A1 (PFIZER INC.) 2016.01.14 청구항 1-7, 11, 16-18, 20-23, 26-30, 36; 단락 [0152], [0210], [0362]-[0364], [0375]; 표 13	1-2,7-18,20-24
PX	WO 2023-068718 A1 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 2023.04.27 전문	1-18,20-24

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

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

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

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

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

1. ☒ 청구항: **25**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 25는 수술 또는 치료에 의한 사람의 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 관
련됩니다. 구체적으로는,
3. ☒ 청구항: **19**
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 10-2018-0004125 A	2018/01/10	AU 2016-259124 A1	2017/08/31
		AU 2016-259124 B2	2022/06/16
		AU 2022-228151 A1	2022/09/29
		BR 112017023453 A2	2018/07/31
		CA 2977010 A1	2016/11/10
		CN 107531794 A	2018/01/02
		CN 107531794 B	2022/07/12
		CN 115073604 A	2022/09/20
		EP 3292145 A1	2018/03/14
		FR 3035879 A1	2016/11/11
		JP 2018-515446 A	2018/06/14
		JP 6830903 B2	2021/02/17
		MX 2017013028 A	2017/12/08
		US 11649271 B2	2023/05/16
		US 2018-0030111 A1	2018/02/01
		US 2023-0265155 A1	2023/08/24
		WO 2016-177984 A1	2016/11/10
KR 10-2018-0113907 A	2018/10/17	KR 10-1924485 B1	2018/12/04
KR 10-2019-0044347 A	2019/04/30	KR 10-2048037 B1	2019/11/22
		WO 2019-078591 A1	2019/04/25
KR 10-2005-0116400 A	2005/12/12	AU 2004-236160 A1	2004/11/18
		AU 2008-261120 A1	2009/01/15
		BR PI0410031 A	2006/04/25
		CA 2524399 A1	2004/11/18
		CA 2524399 C	2013/02/26
		CA 2916863 A1	2004/11/18
		CA 2916863 C	2018/08/21
		CN 100867583 A	2006/11/22
		CN 100867583 B	2012/05/23
		CN 102633880 A	2012/08/15
		CN 102633880 B	2015/02/25
		CN 104788565 A	2015/07/22
		DK 2368911 T3	2017/09/11
		EP 1620467 A2	2006/02/01
		EP 2368911 A1	2011/09/28
		EP 2368911 B1	2017/05/10
		EP 3101030 A1	2016/12/07
		EP 3101030 B1	2020/12/23
		EP 3838920 A1	2021/06/23
		ES 2638568 T3	2017/10/23
		HU E034268 T2	2018/02/28
		IL 171723 A	2014/03/31
		JP 2007-525443 A	2007/09/06
		JP 2009-209150 A	2009/09/17
		JP 4578467 B2	2010/11/10
		JP 5226613 B2	2013/07/03
		KR 10-0890586 B1	2009/03/25
		KR 10-0956110 B1	2010/05/10
		KR 10-0973564 B1	2010/08/03
		KR 10-2007-0116176 A	2007/12/06

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		KR 10-2009-0059170 A	2009/06/10
		PL 2368911 T3	2017/12/29
		PL 2368911 T4	2017/12/29
		SI 2368911 T1	2017/10/30
		US 10183999 B2	2019/01/22
		US 10184000 B2	2019/01/22
		US 2004-0132101 A1	2004/07/08
		US 2009-0068177 A1	2009/03/12
		US 2009-0081208 A1	2009/03/26
		US 2009-0092599 A1	2009/04/09
		US 2012-0230980 A1	2012/09/13
		US 2013-0156754 A1	2013/06/20
		US 2013-0156758 A1	2013/06/20
		US 2013-0243762 A1	2013/09/19
		US 2015-0079082 A1	2015/03/19
		US 2016-0318993 A1	2016/11/03
		US 2016-0347825 A1	2016/12/01
		US 2016-0347837 A1	2016/12/01
		US 8039592 B2	2011/10/18
		US 8093359 B2	2012/01/10
		US 8383109 B2	2013/02/26
		US 8809503 B2	2014/08/19
		US 8858937 B2	2014/10/14
		US 9193798 B2	2015/11/24
		US 9353187 B2	2016/05/31
		WO 2004-099249 A2	2004/11/18
		WO 2004-099249 A3	2006/01/26
US 2016-0008485 A1	2016/01/14	CA 2859755 A1	2013/06/27
		CA 2859755 C	2021/04/20
		CA 3111357 A1	2013/06/27
		EP 2794653 A1	2014/10/29
		EP 2794653 B1	2019/03/13
		EP 3539982 A2	2019/09/18
		EP 3539982 A3	2020/01/15
		ES 2721882 T3	2019/08/06
		JP 2015-502397 A	2015/01/22
		JP 2017-206512 A	2017/11/24
		JP 2019-034942 A	2019/03/07
		JP 2021-019632 A	2021/02/18
		JP 7165175 B2	2022/11/02
		US 11147852 B2	2021/10/19
		WO 2013-093809 A1	2013/06/27
WO 2023-068718 A1	2023/04/27	없음	