



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0055971
(43) 공개일자 2023년04월26일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/00 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/32 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 16/00 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-0133375
(22) 출원일자 2022년10월17일
심사청구일자 2022년10월17일</p> <p>(30) 우선권주장
1020210138530 2021년10월18일 대한민국(KR)
기술이전 희망 : 기술양도</p> | <p>(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)</p> <p>(72) 발명자
정상택
서울특별시 강남구 선릉로69길 20, 112동 702호
경문수
경기도 김포시 봉화로 9-13, 103동 502호
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
위병갑</p> |
|--|--|

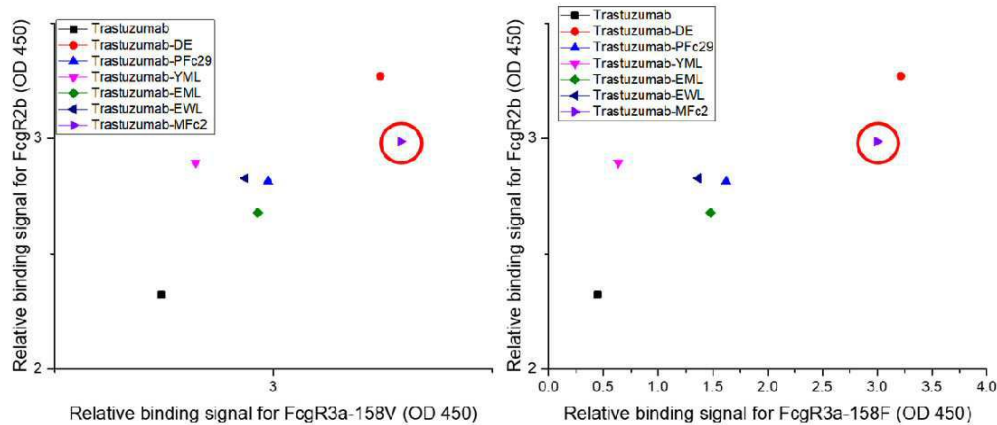
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 pH-의존 FcRn 결합력과 Fc γ RIIIa 결합력이 향상된 Fc 변이체

(57) 요약

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 변이체는 종래의 항체 치료제로서 승인받은 항체들보다도 면역 저해 수용체인 Fc γ RIIb와의 결합력이 감소되고, 면역 활성화 수용체인 Fc γ RIIIa와의 결합력이 향상되어 (A/I 비율 증가), 현저히 향상된 ADCC 유도능을 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 발현이 가능하며, 치료용 단백질 의약품의 면역 작용 기작을 극대화할 수 있으므로 개선된 항체 의약품으로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

C07K 16/32 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/732 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2317/94 (2013.01)

김수연

서울특별시 영등포구 선유로 201, 601동 2104호

고우형

서울특별시 양천구 목동동로 130, 1432동 106호

(72) 발명자

고상환

서울특별시 성북구 솔샘로16길 11, 302호

조미경

서울특별시 성북구 보국문로 32-3, 다운빌 401호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711127806
과제번호	2020M3E5E2037775
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발사업
연구과제명	포유류 세포 디스플레이, 차세대 염기서열분석 및 Fc repertoire 분석을 기반으로
한 치료용 항체의 표적세포	살상 작용 기작 극대화 기반 기술 개발
기 여 율	1/3
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711135894
과제번호	2021R1F1A1046672
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업
연구과제명	효과적 암 진단 및 치료제를 위한 무당화 PD-1 단백질 변이체 개발
기 여 율	1/3
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.06.01 ~ 2022.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711098515
과제번호	2019R1A4A1029000
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초연구지원사업 (기초연구실)
연구과제명	면역관문 억제 항체치료 불응암 통합 제어 연구실
기 여 율	1/3
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2019.09.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

야생형(Wild type) 인간 항체 Fc 도메인에서, 카바트 넘버링 시스템(Kabat numbering system)에 따라 넘버링된 235, 259, 311, 332, 378 및 428 위치의 아미노산이 야생형의 아미노산과 다른 서열로 치환된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.

청구항 2

제 1항에 있어서, L235P, V259I, Q311R, I332E, A378V 및 M428L의 아미노산 치환을 포함하는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.

청구항 3

제 1항에 있어서, 인간 Fc γ RIIb에 비해 인간 Fc γ RIIIa에 대한 결합성을 선택적으로 증강시키는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.

청구항 4

제 1항에 있어서, 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 ADCC(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) 유도능을 증강시키는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.

청구항 5

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 6

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 7

제 1항에 있어서, 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 생체 내 반감기(Half-life)가 증가된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체.

청구항 8

제 1항의 Fc 도메인 변이체를 포함하는 Fc 감마 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 9

제 8항에 있어서, 야생형 인간 항체에 비해 증가된 생체 내 반감기를 갖는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 10

제 1항의 인간 항체 Fc 도메인 변이체 및 생리활성 폴리펩타이드가 결합되어 증가된 생체 내 반감기를 갖는 생리활성 폴리펩타이드 결합체.

청구항 11

제 10항에 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 활성 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, 랩틴, 혈소판 유래 성장 인자, 포피 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, 체장 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 12

제 1항의 인간 항체 Fc 도메인 변이체, 제 8항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산분자.

청구항 13

제 12항의 핵산분자를 포함하는 벡터.

청구항 14

제 13항의 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 15

제 1항의 인간 항체 Fc 도메인 변이체, 제 8항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 제 10항의 생리활성 폴리펩타이드 결합체를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 16

제 15항에 있어서, 암은 뇌종양, 흑색종, 골수종, 비소세포성폐암, 구강암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 17

- 제 1항의 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및
- 숙주세포에 의해 발현된 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는, 인간 항체 Fc 도메인 변이체의 제조방법.

청구항 18

- 제 8항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및
- 숙주세포로부터 발현된 항체를 정제하는 단계를 포함하는 Fc 감마 수용체에 특이적인 항체의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 pH 의존적으로 FcRn에 결합 및 해리함으로써 반감기가 향상되고, Fc 감마 수용체에 대한 선택적 결합력이 향상된 Fc 변이체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 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 임상에서 이용되고 있는 단백질 치료제들 중 항체 치료제들과 항체 Fc영역을 융합된 Fc-융합 단백질 치료제들이 주종을 이루고 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 세포 상의 항체(면역글로불린)에 대한 수용체 (Fc 수용체 또는 FcR)에 결합한다. 항체 Fc 영역 상의 Fc 수용체 결합 부위가 세포 상의 Fc 수용체 (FcR)에 결합함으로써 Fc 영역을 통해 세포에 결합하며, 항체가 세포 표면 상의 Fc 수용체에 결합하면 항체-코팅 입자의 포식 및 파괴, 면역 복합체의 제거, 살세포에 의한 항체-코팅 표적 세포의 용해 (항체-의존적 세포-매개 세포독성, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity 또는 ADCC), 염증 매개체의 방출, 태반 이동 및 면역글로불린 생성의 제어를 포함하여 중요하고도 다양한 여러 생물학적 반응을 촉발한다 (Deo, Y.M. et al., Immunol. Today 18(3):127-135 (1997)). 이와 같이, Fc 도메인은 면역세포의 모집과 ADCC 및 ADCP(antibody dependent cellular phagocytosis)에 결정적인 역할을 하며, 특히, 항체의 작용기 기능(effector function)인 ADCC 및 ADCP 기능은 많은 세포의 표면에 존재하는 Fc 수용체와의 상호작용에 의존한다. 사람의 Fc 수용체는 5가지로 분류되며, 항체가 어떠한 Fc 수용체에 결합되는지에 따라 모집되는 면역세포의 종류가 결정된다. 따라서, 특정한 세포를 모집할 수 있도록 항체를 변형하는 시도는 치료 분야에 있어서 매우 중요하다고 할 수 있다.

[0003] 치료용 항체는 기존의 저분자 약물들에 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(Remcade)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.

[0004] 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 기

작을 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.

[0005] 한편, 현재 의약품으로서 항체의 작용은 항원과 결합하여 항원의 작용을 저해하는 직접적인 방식과, 항원과 결합한 항체의 Fc 감마 부위와 Fc 감마 수용체(Fc gamma receptor, FCGR)를 가지는 효과세포(자연살해세포, 대식세포 등)에 의한 간접적인 항원제거 방식이 있다. 최근 개발 중인 항체 치료제의 경우, 항원과의 결합으로 인한 항원의 작용을 막음과 동시에 항체의 Fc 감마 부위를 효과세포가 인식하여 공격 및 제거하는 ADCC 기전으로 약제의 효과를 높이고 있다. 최근 ADCC와 관련된 연구로, Fc 감마 부위 수용체의 유전자형에 따라 Fc 감마와 Fc 감마 수용체의 결합력에 영향을 주는 것으로 밝혀졌으며, 항체 기반 치료제의 효율이 환자의 Fc 감마 수용체인 FCGR2A 단백질(FcγRIIIa)의 131번째 아미노산과 FCGR3A 단백질의 158번째 아미노산의 아미노산 서열의 다양성에 따라 달라진다는 다수의 연구가 발표되었다. 일 예로 유방암 치료제인 허셉틴(trastuzumab)의 경우 전임상 연구에서 FCGR2A 131 H/H 혹은 FCGR3A 158 V/V 유전자형에서 항체 의존성 세포독성이 유의적인 차이를 보이며 증가하였다는 연구가 2008년에 Musolino등에 의하여 보고되었다. 그러나, 포유동물의 항체의 Fc 부위 변형에 의해 특정 Fc 수용체에 대한 결합력이 증가되지만, 다른 Fc 수용체에 대한 결합력도 유지를 하기 때문에 바람직하지 않은 면역반응을 여전히 유지하는 문제가 있다. 인간의 5 종류의 주요 FcγR 중 4가지는 면역 활성화 또는 염증 반응을 유도하고, FcγRIIb는 면역 저해 또는 항염증 반응을 유도하는데, 대부분의 자연적으로 생산된 항체 또는 재조합된 당화 항체는 활성화 및 저해 Fc 수용체에 모두 결합을 한다. ADCC를 통해 치료용 IgG 항체의 암세포 사멸 효능을 가장 강력하게 유도하는 면역세포는 자연살해세포(NK 세포)로 NK 세포는 다른 면역세포들 (예를 들어, monocytes, macrophages, dendritic cells 등)과는 달리 표면에 FcγRIIIa를 발현하고, FcγRI과 FcγRIIa, FcγRIIb 및 FcγRIIIb는 발현하지 않기 때문에 암세포 사멸 작용기작을 극대화하기 위해서는 IgG 항체의 Fc 부위의 최적화를 통해 NK 세포 표면에 발현되는 FcγRIIIa와의 친화도를 향상시키는 것이 필수적이다. 또한, NK 세포 뿐만 아니라 혈액에 존재하는 다양한 면역 세포들의 복합적인 면역 반응을 고려하면 항체의 Fc 도메인이 활성화 FcγR에 결합하는 능력 (A)과 저해 FcγRIIb에 결합하는 능력 (I)의 비율(A/I ratio)이 높을수록 우수한 ADCC 유도능을 보이기 때문에 저해 수용체인 FcγRIIb 결합력 대비 활성화 수용체 결합력을 선택적으로 높이는 것이 매우 절실한 실정이다 (Boruchov et al, J Clin Invest, 115(10):2914-23, 2005).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은 신규한 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 제공하는 것이다.
- [0007] 또한, 본 발명의 목적은 Fc 감마 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 제공하는 것이다.
- [0008] 또한, 본 발명의 목적은 상기 Fc 도메인 변이체, 또는 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산분자, 이를 포함하는 벡터, 및 이를 포함하는 숙주세포를 제공하는 것이다.
- [0009] 또한, 본 발명의 목적은 증가된 생체 내 반감기를 갖는 생리활성 폴리펩타이드 결합체를 제공하는 것이다.
- [0010] 또한, 본 발명의 목적은 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 또한, 본 발명의 목적은 인간 항체 Fc 도메인 변이체의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 아울러, 본 발명의 목적은 Fc 감마 수용체에 특이적인 항체의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 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.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 신규한 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 신규한 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 포함하는 생리활성 폴리펩타이드 결합체를 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 Fc 도메인 변이체, 또는 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵

산분자, 이를 포함하는 벡터, 및 이를 포함하는 숙주세포를 제공한다.

[0017] 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.

[0018] 또한, 본 발명은 인간 항체 Fc 도메인 변이체의 제조방법을 제공한다.

[0019] 아울러, 본 발명은 Fc 감마 수용체에 특이적인 항체의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 신규한 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 항체 Fc 도메인 및 종래의 항체 치료제로서 승인 받은 항체들보다도 면역 저해 수용체인 Fc γ RIIb와의 결합력이 감소되고, 면역 활성화 수용체인 Fc γ RIIIa와의 결합력이 향상되어 (A/I 비율 증가), 현저히 향상된 ADCC 유도능을 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

[0021] 도 1은 hFc γ RIIIa-158V-스트렙타비딘-His, hFc γ RIIb-스트렙타비딘-His, hFc γ RIIIa-158V-GST, hFc γ RIIIa-158F-GST, hFc γ RIIb-GST 및 hFcRn-GST의 발현 및 정제 후 SDS-PAGE 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 pH-의존적 FcRn 결합력 및 Fc γ RIIIa 결합 선택성이 향상된 Fc 변이체 선별을 위한 효모 디스플레이 라이브러리 제작 모식도를 나타낸 도이다.

도 3은 FACS를 이용한 효모 디스플레이 라이브러리에 대한 각 라운드의 선별(sorting)에 대한 Alexa647 컨주게이트된 사합체(conjugated tetrameric) Fc γ RIIIa, 무형광 사합체 Fc γ RIIb 및 Alexa488 컨주게이션된 Protein A의 농도와 게이팅(gating) 전략을 나타낸 도이다.

도 4는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 세포벽 디스플레이를 통해 스크리닝한 각 라운드의 Fc sub-라이브러리를 Fc γ RIIIa-Alexa647 결합에 의한 형광세기 (A) 및 무형광 Fc γ RIIb에 의해 마스킹(masking)된 상태에서의 Fc γ RIIIa-Alexa647 결합 형광세기 (즉, Fc γ RIIIa에 대한 선택적 결합 세기) (B)를 FACS로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 Fc 변이체가 포함된 트라스트주맙 Fc 변이체의 발현 및 정제 후 SDS-PAGE 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 Fc 변이체가 포함된 트라스트주맙 Fc 변이체의 pH 6.0 및 7.4에서의 FcRn 결합력을 ELISA로 분석한 결과이다.

도 7은 Fc 변이체가 포함된 트라스트주맙 Fc 변이체의 Fc γ Rs에 대한 결합력을 ELISA로 분석한 도이다.

도 8은 트라스트주맙-Fc 변이체들의 pFc γ RIIIa에 대한 정량적 결합력을 BLI(Biolayer Interferometry) 분석을 통해 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 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.

[0023] 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.

[0024] 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.

- [0025] 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:
- [0026] 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.
- [0028] 일 측면에서, 본 발명은 야생형(Wild type) 인간 항체 Fc 도메인에서, 카밧 넘버링 시스템(Kabat numbering system)에 따라 넘버링된 235, 259, 311, 332, 378 및 428 위치의 아미노산이 야생형의 아미노산과 다른 서열로 치환된, 인간 항체 Fc 도메인 변이체에 관한 것이다.
- [0029] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 L235P, V259I, Q311R, I332E, A378V 및 M428L의 아미노산 치환을 포함하는 인간 항체 Fc 도메인 변이체 MFc2일 수 있으며, 인간 항체 Fc 도메인 변이체 MFc2는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 이는 서열번호 2의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [0030] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 Fc 도메인과 비교하여 Fc γ RIIIa와의 향상된 결합력을 나타낼 수 있다.
- [0031] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 ADCC(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) 유도능을 증강시킬 수 있다.
- [0032] 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.
- [0033] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 변이체는 pH 5.6 내지 6.5에서 야생형 면역글로불린 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.
- [0034] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 변이체는 pH 7.0 내지 7.8에서 야생형 면역글로불린 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.
- [0035] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 항체 Fc 도메인에 비해 생체 내 반감기(Half-life)가 증가될 수 있다.
- [0036] 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.
- [0037] 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 과파인 분해는 2개의 Fab 도메인과 1개의 Fc 도메인을 형성하며, 인간 IgG 분자에서, Fc 영역은 Cys

226의 N-말단을 과파인 분해함으로써 생성된다 (Deisenhofer, Biochemistry 20: 2361-2370, 1981).

- [0038] 일 구현예에서, 야생형 인간 항체 Fc 도메인은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 서열번호 4의 염기 서열을 포함하는 핵산분자로 암호화될 수 있다.
- [0039] 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).
- [0040] 본 발명에서 사용된, 용어 "Fc 도메인 변이체"는 "Fc 변이체"와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 사용된, 용어 "야생형 (wild-type) 폴리펩타이드"는 후에 변형되어 유도체를 생산하는 비변형 폴리펩타이드를 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.
- [0042] 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.
- [0043] 본 명세서에 사용된 용어 "Fc 변이체"는 야생형 항체 Fc 도메인과 비교하여 하나 이상의 아미노산 잔기의 변형을 포함하는 것을 의미한다.
- [0044] 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.
- [0045] 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.
- [0046] 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.
- [0047] 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.
- [0048] 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, 마우

스, 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.

[0049] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 도메인 변이체를 포함하는 Fc 감마 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편에 관한 것이다.

[0050] 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 야생형 인간 항체에 비해 증가된 생체 내 반감기를 가질 수 있다.

[0051] 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.

[0052] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 효과기 작용을 증가시킬 수 있으며, 야생형 Fc 도메인과 비교하여 Fc γ RIIIa와의 결합력이 향상되고 Fc γ RIIb와의 결합력이 감소됨으로써 높은 Fc γ RIIIa 결합 선택성을 가져 A/I 비율이 높은 특성을 가지므로, 항체-매개성 세포독성 작용(antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC)이 증가될 수 있다.

[0053] 본 발명에서, A/I 비율은 항체의 Fc 도메인이 활성화 Fc γ R에 결합하는 능력(A)과 저해 Fc γ RIIb에 결합하는 능력(I)의 비율(A/I ratio)로서, A/I 비율이 높을수록 우수한 ADCC 유도능을 보이기 때문에 저해 수용체인 Fc γ RIIb 결합력 대비 활성화 수용체 결합력을 선택적으로 높이는 것이 중요하다.

[0054] 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 용합 파트너에 의한 정제가 가능할 수 있다.

[0055] 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 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) W094/13804) 등을 포함한다.

[0056] 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.

[0057] 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.

[0058] 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 집착능(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.

- [0059] 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.
- [0060] 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.
- [0061] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 도메인 변이체, 또는 이를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산분자에 관한 것이다.
- [0062] 일 구현예에서, 본 발명에 따른 Fc 변이체를 코딩하는 핵산분자는 서열번호 2의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0063] 일 측면에서, 본 발명은 상기 핵산분자를 포함하는 벡터, 상기 벡터를 포함하는 숙주세포에 관한 것이다.
- [0064] 본 발명의 핵산분자는 단리된 것이거나 재조합된 것일 수 있으며, 단일쇄 및 이중쇄 형태의 DNA 및 RNA뿐만 아니라 대응하는 상보성 서열이 포함된다. 단리된 핵산은 천연 생성 원천에서 단리된 핵산의 경우, 핵산이 단리된 개체의 게놈에 존재하는 주변 유전 서열로부터 분리된 핵산이다. 주형으로부터 효소적으로 또는 화학적으로 합성된 핵산, 예컨대 PCR 산물, cDNA 분자, 또는 올리고뉴클레오타이드의 경우, 이러한 절차로부터 생성된 핵산이 단리된 핵산분자로 이해될 수 있다. 단리된 핵산분자는 별도 단편의 형태 또는 더 큰 핵산 구축물의 성분으로서의 핵산 분자를 나타낸다. 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 작동가능하게 연결된다. 예를 들면, 전서열 또는 분비 리더(leader)의 DNA는 폴리펩타이드가 분비되기 전의 형태인 전단백질(preprotein)로서 발현되는 경우 폴리펩타이드의 DNA에 작동가능하게 연결되고, 프로모터 또는 인핸서는 폴리펩타이드 서열의 전사에 영향을 주는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되며, 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 촉진하도록 배치될 때 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로 작동가능하게 연결된 연결될 DNA 서열들이 인접하여 위치함을 의미하며, 분비 리더의 경우 인접하여 동일한 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나 인핸서는 인접하여 위치할 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커를 통상적인 방법에 따라 사용한다.
- [0065] 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.
- [0066] 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.
- [0067] 본 발명의 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이

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

[0068] 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).

[0069] 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.

[0070] 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.

[0071] 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.

[0072] 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.

[0073] 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.

[0074] 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, 랩틴, 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) 아트리오펙틴, 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 핵산 항원으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 혈중 반감기를 증가시킬 필요가 있는 것이면 어느 것이나 특별한 제한이 없이 사용할 수 있다.

[0075] 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 폴리펩타

이드 결합체는 생체 내 반감기가 현저히 증가한 지속성 약물 제제로 사용될 수 있다.

- [0076] 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.
- [0077] 일 구현예에서, 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 포함하는 생리활성 폴리펩타이드 결합체에 항체 약물이 결합될 수 있으며, 암 치료용 항체 약물은 트라스투주맙(Trastuzumab), 세특시맙(cetuximab), 베바시주맙(bevacizumab), 리툽시맙(rituximab), 바실릭시맙(basiliximab), 인플릭시맙(infliximab), 이필리무맙(Ipilimumab), 펄브롤리주맙(Pembrolizumab), 니볼루맙(Nivolumab), 아테졸리주맙(Atezolizumab) 또는 아벨루맙(Avelumab)일 수 있다.
- [0078] 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(Fc γ R)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.
- [0079] 본 발명은 상기 본 발명의 인간 항체 Fc 도메인 변이체를 비펩타이드성 중합체를 통해 생리활성 폴리펩타이드에 공유결합으로 연결하여 지속성 약물 제제를 제조하는 방법을 포함한다.
- [0080] 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.
- [0081] 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.
- [0082] 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 수노관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0083] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 높은 Fc γ RIIIa 결합 선택성을 가져 높은 A/I 비율을 가지므로, 자연살해세포(NK 세포)를 통해 효과기 작용을 증가시켜 항체-매개성 세포독성작용 (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC)을 증가시킬 수 있다. 가장 강력한 암세포 사멸 효능을 가지고 있는 자연살해세포(NK 세포)는 다른 면역세포들 (예: monocytes, macrophages, dendritic cells)과는 달리 표면에 Fc γ RIIIa를 발현하고, Fc γ RI와 Fc γ RIIa, Fc γ RIIb 및 Fc γ RIIIb는 발현하지 않으므로, 본 발명의 Fc γ RIIIa 결합 선택성을 가지는 Fc 도메인 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편이 NK 세포를 통해 암세포 사멸 작용 기작을 극대화할 수 있다.
- [0084] 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 파클

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

- [0085] 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), 부술헌(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.
- [0086] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 암의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0087] 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, 대한의학 협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.
- [0088] 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.
- [0089] 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.
- [0090] 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, 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.
- [0091] 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 방

법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

- [0092] 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, 배설물 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.
- [0093] 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 과라핀 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.
- [0094] 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.
- [0095] 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 제조방법.
- [0096] 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.
- [0098] 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.

[0100] 실시예 1. 표적 물질 발현 및 정제

- [0101] Fc γ RIIIa 선택적 결합력 향상 Fc 변이체 발굴, Fc 변이체의 Fc γ Rs 및 FcRn 결합력 분석을 위해, 표적물질을 발현 및 정제하였다. 구체적으로, pMAZ-hFc γ RIIIa-158V-스트렙타비딘-His, pMAZ-hFc γ RIIb-스트렙타비딘-His, pMAZ-hFc γ RIIIa-158V-GST, pMAZ-hFc γ RIIIa-158F-GST, pMAZ-hFc γ RIIb-GST 및 pMAZ-hFcRn-GST 6종의 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℃, 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 μ m 바틀탑 필터(bottle top filter) (Corning, 430513)로 여과하였다. 여과된 pMAZ-hFc γ RIIIa-158V-스트렙타비딘-His 및 pMAZ-hFc γ RIIb-스트렙타비딘-His를 각각 트랜스펙션한 배양액에 Ni-NTA 레진(resin) (QIAGEN, 40724) 500 μ l을 넣고 4℃에서 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 pMAZ-hFc γ RIIIa-158V-GST, pMAZ-hFc γ RIIIa-158F-GST, pMAZ-hFc γ RIIb-GST 및 pMAZ-hFcRn-GST를 각각 트랜스펙션한 배양액에 GST 레진 (Incospharm, 1101-3) 500 μ l을 넣어 주고 4℃에서 16 시간 교반한 후 디스포저블 폴리프로필렌 컬럼에 패킹하여 레진을 회수하였다. 100 ml 1×PBS (pH 7.4)로 세척하고 4 ml의 1×PBS에 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 hFc γ RIIIa-158V-스트렙타비딘-His, hFc γ RIIb-스트렙타비딘-His, hFc γ RIIIa-158V-GST, hFc γ RIIIa-158F-GST, hFc γ RIIb-GST 및 hFcRn-GST이 성공적으로 정제되었음을 SDS-PAGE 젤로 확인하였다 (도 1). 이 중, 정제된 hFc γ RIIIa-158V-스트렙타비딘-His는 Alexa FluorTM 647 Protein Labeling Kit (Invitrogen, A20173)를 이용하여 Alexa647

가 컨쥬게이트된(conjugated) 사합체(사량체, tetrameric)의 Fc γ RIIIa를 제작하였다.

[0103] 실시예 2. pH-의존적 FcRn 결합력 및 Fc γ RIIIa 결합 선택성이 향상된 Fc 변이체 선별을 위한 효모 디스플레이 라이브러리 제작

[0104] pH-의존적 FcRn 결합력과 Fc γ RIIIa에 대한 선택적 결합력이 동시에 향상된 Fc 변이체를 효율적으로 선별하기 위해, FcRn에 대한 pH-의존적 결합을 향상시키는 Q311R/M428L, L309Y/Q311M/M428L, L309E/Q311M/M428L 및 L309E/Q311W/M428L이 각각 도입된 항체 Fc 서열에 Fc γ RIIIa 결합력을 향상시킬 수 있는 S239D, I332E 및 S239D/I332E의 돌연변이들을 각각 도입한 총 12개의 주형을 제작하였고, error-prone PCR을 통해 Fc 전체 서열 중 0.68% 확률로 돌연변이가 도입된 DNA 라이브러리를 제작하였다. 제작된 DNA 라이브러리 총 24 μ g은 효모 디스플레이를 위한 효모 세포벽 고정 단백질인 Aga2 단백질과 형질전환 선발표지 유전자 (Trp1)가 암호화된 pCTCON 벡터 8 μ g과 함께 MicroPulser Electroporator (Bio-Rad, #1652100)를 이용한 전기천공법을 통해 효모 중 사카로마이세스 세레비시에(Saccharomyces cerevisiae) 컴피턴트(Competent) 세포 800 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)5.4g/l,NaH₂PO₄·H₂O(SAMCHUN,10049-21-5)8.56g/l및 Glucose (DUKSAN, 50-99-7) 20 g/l] 500 ml에서 배양함으로써 형질전환된 효모종만 선택적으로 생존시켜 총 5.5×10^7 개의 항체 Fc의 다양성이 확보된 효모 디스플레이 라이브러리를 제작하였다 (도 2).

[0106] 실시예 3. Fc γ RIIIa에 대한 선택적 결합력이 향상된 Fc 변이체 발굴

[0107] 제작된 효모 라이브러리의 5.5×10^8 개 세포를 트립토판이 결핍된 SD 배지 100 ml에서 30℃ 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/l및 Galactose (Sigma-Aldrich, 59-23-4) 20 g/l] 100 ml에서 20℃ 조건으로 48 시간 배양하여 디스플레이된 Fc 라이브러리의 발현량을 향상시켰다. 배양한 세포 중 1×10^8 개 세포를 4℃에서 14,000 $\times$ g로 30초간 원심분리 후 상층액을 제거한 뒤 1 ml PBSB (1 $\times$ PBS, 0.1% bovine serum albumin (gibco, 30063-572)) (pH 7.4)로 세척한 뒤 40 nM Alexa488 conjugated Protein A, 10 nM Alexa647 컨쥬게이트된 사합체 Fc γ RIIIa(Alexa647 conjugated tetrameric Fc γ RIIIa) 및 40 nM 무형광 사합체 Fc γ RIIb이 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, Alexa647 컨쥬게이트된 사합체 Fc γ RIIIa 및 무형광 Fc γ RIIb의 경쟁적 결합을 유도한 후 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 Fc γ RIIIa의 농도를 줄이거나 무형광 사합체 Fc γ RIIb의 농도를 높이며, 총 4라운드의 선별(sorting) 과정을 거쳐 Fc γ RIIIa에 대한 선택적 결합력이 우수한 Fc 변이체들을 디스플레이하고 있는 세포들을 농축(enrichment)시켰으며 (도 3 및 4), 농축된 마지막 서브 라이브러리에서 무작위 선택을 통해, 최종적으로, 총 3종의 pH-의존적 FcRn 결합력과 Fc γ RIIIa/Fc γ RIIb 선택적 결합력이 모두 향상된 Fc 변이체로서 MFc2(MFc2: L235P/V259I/Q311R/I332E/A378V/M428L)을 확보하였다 (도 4 및 표 1).

표 1

변이체 이름	도입된 돌연변이
MFc2	L235P/V259I/Q311R/I332E/A378V/M428L

[0110] 실시예 4. Fc γ RIIIa 선택적 결합력 향상 트라스트주맙 Fc 변이체의 발현 및 정제

[0111] 상기 실시예 3에서 선발한 Fc 변이체를 포함하는 트라스트주맙(Trastuzumab) Fc 변이체를 발현 및 정제하기 위해, 트라스트주맙 Fc 변이체의 발현 벡터인 pMAZ-Trastuzumab-HC-MFc2를 제작하였다. Freestyle 293

expression 배양액 (Gibco, 12338-018) 3 ml에 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 바틀탑 필터 (Corning, 430513)로 여과하였다. 여과된 배양액에 Protein A resin 100 μl을 넣어 주고 4°C에서 16 시간 교반 한 뒤 디스포저블 폴리프로필렌 컬럼에 패키징하여 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 항체 트라스트주맵-Fc 변이체가 높은 순도로 성공적으로 정제되었음을 확인하였다 (도 5).

[0113] 실시예 5. 트라스트주맵-Fc 변이체의 FcRn 결합력 분석

[0114] 상기 실시예 4에서 발현 및 정제한 Fc 변이체 MFc2가 포함된 트라스트주맵-Fc 변이체의 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°C로 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 (pH 7.4) 150 μl로 4 회 세척한 뒤, 1×PBS (pH 7.4)에 희석된 1% 스킵 밀크에 20 μg/ml로 희석된 트라스트주맵 Fc 변이체를 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 1 μg/ml 농도로 희석된 hFcRn-GST를 50 μl씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 0.05% PBST 100 μl로 4 회 세척한 후, 1×PBS에 희석된 1% 스킵 밀크 (pH 6.0/pH 7.4)에 희석된 항-GST-HRP 컨주게이트(conjugate) (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 μl씩 첨가하여 발색한 뒤 2 M H₂SO₄를 50 μl씩 넣어주어 반응을 종료시키고, Epoch microplate spectrophotometer (BioTek)를 이용해 흡광도를 분석하였다. 그 결과, 본 발명의 MFc2 Fc 변이체를 포함하는 트라스트주맵 MFc2 변이체가 야생형 트라스트주맵 또는 DE(DE: S239D/I332E) 변이체가 도입된 트라스트주맵-Fc 변이체보다 pH 7.4 대비 pH 6.0에서의 hFcRn에 대한 의존적 결합이 현저히 향상된 것을 확인하였다 (도 6). 또한, 본 발명자가 개발한 PFc29 (Q311R/M428L), YML (L309Y/Q311M/M428L), EML (L309E/Q311M/M428L) 및 EWL (L309E/Q311W/M428L) 변이체가 각각 도입된 트라스트주맵-Fc 변이체들과 비교했을 때도 MFc2 트라스트주맵 변이체가 이들만큼 pH 7.4 대비 pH 6.0에서의 hFcRn에 대한 pH 의존적 결합이 현저히 향상된 것을 확인하였다 (도 6).

[0116] 실시예 6. 트라스트주맵-Fc 변이체의 FcγRs에 대한 결합력 분석

[0117] Fc 변이체 MFc2가 포함된 트라스트주맵-Fc 변이체의 FcγRs 결합력을 확인하기 위해 ELISA 분석을 수행하였다. 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°C로 16 시간 동안 인큐베이션하여 고정화한 후 100 μl의 1×PBS (pH 7.4)에 희석된 4% 스킵 밀크 (GenomicBase, SKI400)로 상온에서 2 시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST (1 ×PBS, 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 20 μg/ml로 희석된 트라스트주맵-Fc 변이체 50 μl을 웰에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 0.05% PBST 100 μl로 4 회 세척한 뒤 1×PBS (pH 7.4)에 희석된 1% 스킵 밀크로 1 μg/ml 농도로 희석된 hFcγRs-GST (hFcγRIIIa-158V-GST, hFcγRIIIa-158F-GST 또는 hFcγRIIb-GST)를 50 μl 각 웰에 각각 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 0.05% PBST (pH 7.4) 100 μl로 4 회 세척 후 항-GST-HRP 컨주게이트 (GE Healthcare, RPN1236V) 50 μl을 이용해 상온에서 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 종료시킨 후 Epoch microplate spectrophotometer (BioTek)를 이용해 흡광도를 분석하였다. 그 결과, 본 발명의 Fc 변이체 MFc2가 포함된 트라스트주맵-Fc 변이체가 PFc29 (Q311R/M428L) 변이체가 도입된 트라스트주맵보다 hFcγRIIIa-158V에 대

한 결합력 및 hFc γ RIIIa-158F에 대한 결합력이 현저히 향상된 것을 확인하였다 (도 7). 또한, 야생형 트라스트주맙보다 저해 수용체인 Fc γ RIIb에 대한 결합력이 현저히 향상된 것으로 알려진 DE (S239D/I332E) 및 Pfc29와 비교하였을 때, Fc γ RIIb에 대한 결합력이 현저히 감소한 것을 확인하여 (도 7), DE와 Pfc29, YML, EML 및 EWL 변이체들보다 현저한 Fc γ RIIb 대비 Fc γ RIIIa 선택적 결합력을 보이는 것을 확인하였다.

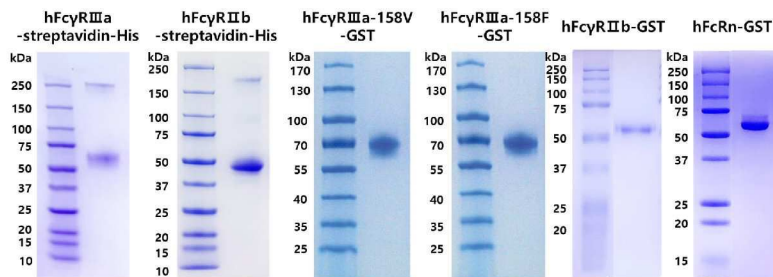
[0119] 실시예 7. 트라스트주맙-Fc 변이체의 Fc γ RIIIa에 대한 결합력 분석

[0120] Fc 변이체 MFc2가 포함된 트라스트주맙-Fc 변이체의 Fc γ RIIIa에 대한 정량적 결합력을 확인하기 위해, Octet® R8 (Sartorius) 기기 및 Octet® Ni-NTA (NTA) Biosensors (Sartorius, 18-5101)를 이용하여 BLI(Biolayer Interferometry) 분석을 수행하였다. 구체적으로, 96웰 플레이트의 웰에 200 μ l의 탈이온수를 넣고 바이오센서를 꽂아 10분 동안 수화시켰다. 그 후 96웰 플레이트의 웰에 각 200 μ l의 탈이온수 및 1 $\times$ PBS (pH 7.4)에 4 μ g/ml 농도로 희석된 hFc γ RIIIa-158V-스트렙타비딘-His 또는 hFc γ RIIIa-158F-스트렙타비딘-His, 및 1,000 nM 내지 15.6 nM로 2배씩 연속 희석된 대조군 또는 트라스트주맙-Fc 변이체 순으로 각 웰에 분주하여 샘플 플레이트를 구성한 뒤, 바이오센서와 샘플 플레이트를 Octet® R8 기기에 넣어, 탈이온수 60 초 (baseline), hFc γ RIIIa 300 초 (loading), 1 $\times$ PBS (pH 7.4) 120 초 (baseline), 트라스트주맙-Fc 변이체 90 초 (association), 및 1 $\times$ PBS (pH 7.4) 150 초 (dissociation)로 바이오센서와 반응시켜 결합력을 측정하였다.

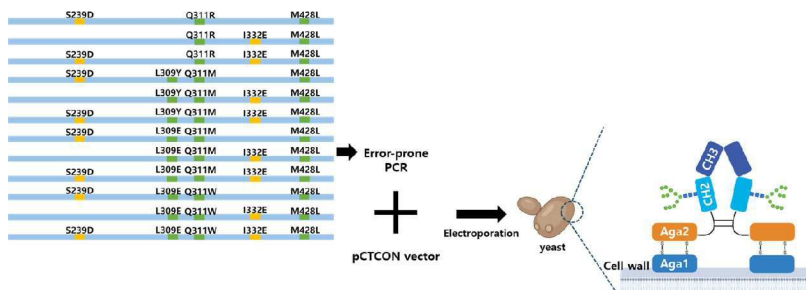
[0121] 그 결과, 본 발명의 트라스트주맙-MFc2 변이체가 Xencor 사의 DE (S239D/I332E)와 마찬가지로 야생형 Fc를 가지는 트라스트주맙에 비해 hFc γ RIIIa-158V와 hFc γ RIIIa-158Fdp 대한 결합력이 각각 14.1 및 23.4배로 현저히 향상된 것을 확인하였다 (도 8).

도면

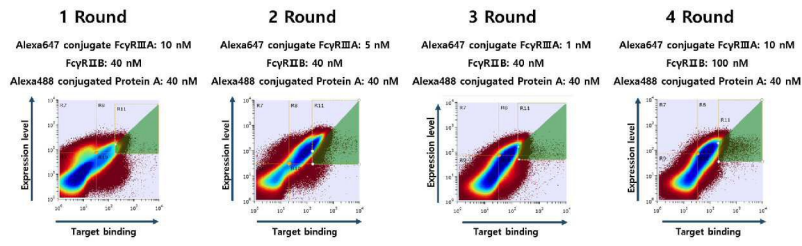
도면1



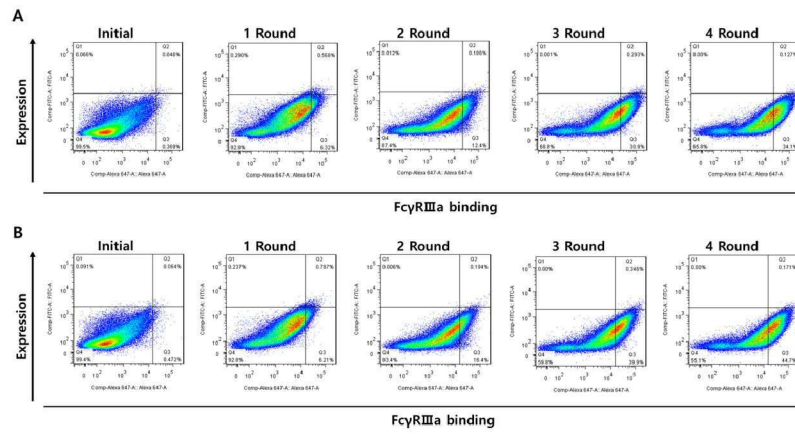
도면2



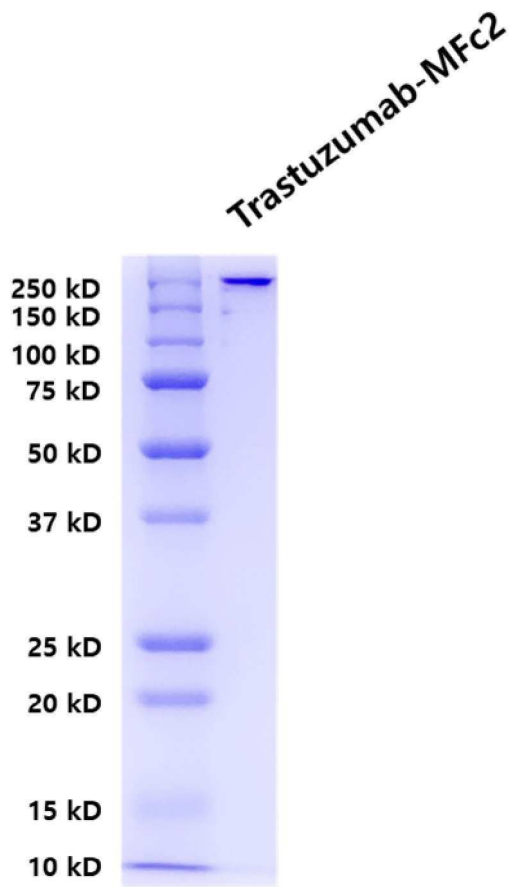
도면3



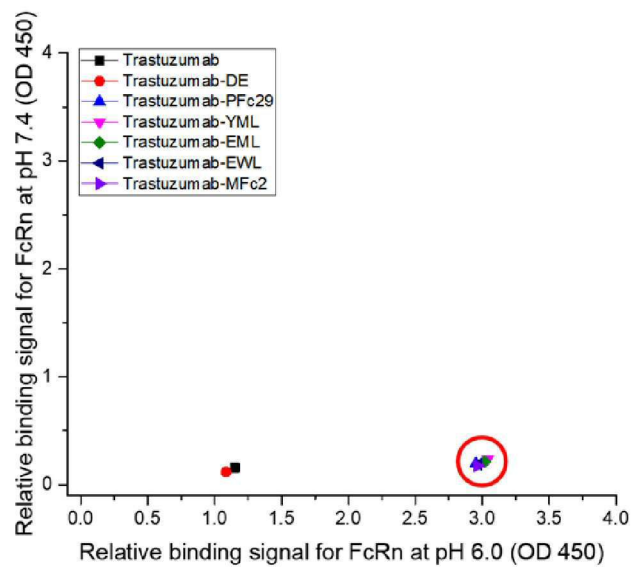
도면4



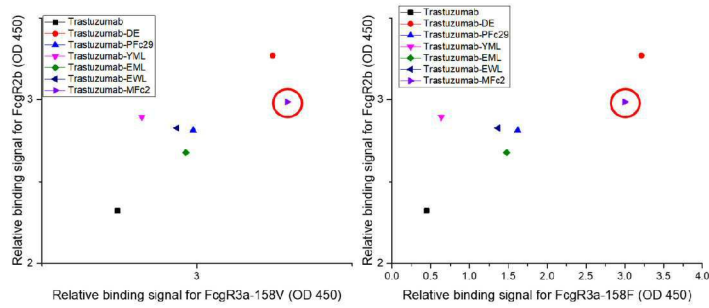
도면5



도면6



도면7



도면8

	hFcγRⅢa-158V				hFcγRⅢa-158F			
	KD (M)	Kon (1/Ms)	Kdis (1/s)	Full R ²	KD (M)	Kon (1/Ms)	Kdis (1/s)	Full R ²
Trastuzumab	9.04E-07	9.04E-07	4.68E-03	0.9952	1.33E-06	6.66E+03	8.84E-03	0.9889
Trastuzumab-DE	4.65E-08	2.71E+04	1.26E-03	0.9968	6.73E-08	2.72E+04	1.83E-03	0.997
Trastuzumab-MFc2	6.39E-08	4.42E+04	2.83E-03	0.988	5.68E-08	5.65E+04	3.20E-03	0.9847

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.