



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0015093
(43) 공개일자 2024년02월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61P 37/04 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/283 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7044602
- (22) 출원일자(국제) 2022년05월27일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년12월22일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2022/055019
- (87) 국제공개번호 WO 2022/249146
국제공개일자 2022년12월01일
- (30) 우선권주장
63/193,665 2021년05월27일 미국(US)
21315127.7 2021년07월15일
유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
사노피
프랑스 75017 파리 아브뉴 드 라 그랑 아르메 46
- (72) 발명자
베닝가, 요헨
독일 65926 프랑크푸르트 암 마인 사노피-아벤티스
스 도이칠란트 게엠베하 내
카메론, 베아트리체
프랑스 75017 파리 아브뉴 드 라 그랑 아르메 46
사노피 페이턴트 디파트먼트 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 임근실

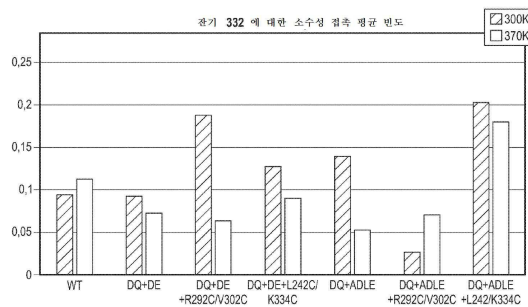
전체 청구항 수 : 총 139 항

(54) 발명의 명칭 Fc 수용체에 대한 향상된 친화성 및 개선된 열 안정성을 갖는 Fc 변이체

(57) 요약

본 개시내용은 효과기-적격 Fc 도메인 변이체를 포함하는 Fc 도메인 변이체를 제공한다. 본 개시내용은 또한 Fc 도메인 변이체를 제조하기 위한 Fc 도메인 변이체를 암호화하는 핵산 및 숙주 세포를 제공한다. Fc 도메인 변이체의 수율을 증가시키는 방법 및 질환을 치료하기 위해서 Fc 도메인 변이체를 사용하는 방법이 또한 제공된다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61P 37/04 (2018.01)
C07K 16/30 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/41 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/71 (2013.01)
C07K 2317/72 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/94 (2013.01)

(72) 발명자

포켄, 잉고

독일 65926 프랑크푸르트 암 마인 사노피-아벤티스
도이칠란트 게엠베하 내

카투리아, 사가르

미국 02141 매사추세츠 캠프리지 워터 스트리트
450 사노피 페이턴트 디파트먼트 내

랑게, 크리스티안

독일 65926 프랑크푸르트 암 마인 사노피-아벤티스
도이칠란트 게엠베하 내

마시예로, 알레산드로

프랑스 75017 파리 아브뉴 드 라 그랑 아르메 46
사노피 페이턴트 디파트먼트 내

박, 성해

미국 02141 매사추세츠 캠프리지 워터 스트리트
450 사노피 페이턴트 디파트먼트 내

털만, 보도

독일 65926 프랑크푸르트 암 마인 사노피-아벤티스
도이칠란트 게엠베하 내

명세서

청구범위

청구항 1

단리된 효과기-적격 폴리펩티드(effector-competent polypeptide)로서,

제1 중쇄 및 제2 중쇄를 포함하는 글리코실화된 Fc 도메인을 포함하되, 적어도 하나의 중쇄는,

(i) 아미노산 위치 242의 류신(L) 및 아미노산 위치 334의 리신(K);

또는

(iii) 아미노산 위치 292의 아르기닌(R) 및 아미노산 위치 302의 발린(V)

대신 치환된 시스테인(C)의 쌍에 의해서 매개되는 조작된 쇠내 이황화 결합을 포함하되;

상기 아미노산 위치는 EU 넘버링에 따르며;

상기 글리코실화된 Fc 도메인은 항체 효과기 분자와 상호작용할 수 있고;

상기 효과기-적격 폴리펩티드는 상기 조작된 쇠내 이황화 결합을 포함하지 않는 항체 효과기 분자와 상호작용할 수 있는 글리코실화된 Fc 도메인을 갖는 효과기-적격 폴리펩티드와 비해서 향상된 열 안정성을 갖는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 글리코실화된 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 297에 천연 글리칸을 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 글리코실화된 Fc 도메인은 조작된 또는 비-천연 글리칸을 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 조작된 또는 비-천연 글리칸은 치료용 분자에 접합될 수 있는 변형된 글리칸인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 N-글리코실화된, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 중쇄는 시스테인의 쌍을 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 및 상기 제2 중쇄는 각각 시스테인의 쌍을 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 IgG1 Fc 도메인은 인간 IgG1 Fc 도메인인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 효과기 분자는 FcRn인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인에 비해서 상기 FcRn에 대한 향상된 결합 친화도를 갖는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 12

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 효과기 분자는 Fc γ RIIIa인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩티드에 비해서 상기 Fc γ RIIIa에 대한 향상된 결합 친화도를 갖는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인에 비해서 변경된 혈청 반감기를 갖는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인에 비해서 향상된 혈청 반감기를 갖는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 332에 치환을 추가로 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 아미노산 위치 332의 치환은 글루탐산(E)인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236, 239 또는 330에 하나 이상의 치환을 추가로 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 아미노산 위치 236의 치환은 알라닌(A)인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 아미노산 위치 239의 치환은 아스파르트산(D)인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 21

제18항에 있어서, 상기 아미노산 위치 330의 치환은 류신(L)인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)을 추가로 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 23

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)을 추가로 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 24

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D), 아미노산 위치 330의 류신(L) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)을 추가로 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 256 및/또는 307에 치환을 추가로 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 아미노산 위치 256의 치환은 아스파르트산(D)인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 27

제25항에 있어서, 상기 아미노산 위치 307의 치환은 글루타민(Q)인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 256의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307의 글루타민(Q)을 추가로 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 29

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D), 아미노산 위치 332의 글루탐산(E), 아미노산 위치 256의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307의 글루타민(Q)을 추가로 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 30

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E), 아미노산 위치 256의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307의 글루타민(Q)을 추가로 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 31

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D), 아미노산 위치 330의 류신(L), 아미노산 위치 332의 글루탐산(E), 아미노산 위치 256의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307의 글루타민(Q)을 추가로 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 32

단리된 효과기-적격 폴리펩티드로서,

제1 중쇄 및 제2 중쇄를 포함하는 글리코실화된 Fc 도메인을 포함하되, 적어도 하나의 중쇄는

(i) 아미노산 위치 242의 류신(L) 및 아미노산 위치 334의 리신(K);

또는

(iii) 아미노산 위치 292의 아르기닌(R) 및 아미노산 위치 302의 발린(V)

대신 치환된 시스테인(C)의 쌍에 의해서 매개되는 조작된 쇠내 이황화 결합을 포함하고;

상기 글리코실화된 Fc 도메인은 항체 효과기 분자와 상호작용할 수 있고 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)을 포함하고;

상기 효과기-적격 폴리펩티드는 상기 조작된 쇠내 이황화 결합을 포함하지 않는 항체 효과기 분자와 상호작용할 수 있고 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)을 포함하는 글리코실화된 Fc 도메인을 갖는 효과기-적격 폴리펩티드와 비교할 때 향상된 열 안정성을 갖고,

상기 아미노산 위치는 EU 넘버링에 따르는. 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 글리코실화된 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 297에 천연 글리칸을 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 34

제32항 또는 제33항에 있어서, 상기 글리코실화된 Fc 도메인은 조작된 또는 비-천연 글리칸을 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 조작된 또는 비-천연 글리칸은 치료용 분자에 접합될 수 있는 변형된 글리칸인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 36

제32항에 있어서, 상기 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 N-글리코실화된, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 37

제32항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 중쇄는 시스테인의 쌍을 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 38

제32항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 및 상기 제2 중쇄는 각각 시스테인의 쌍을 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 39

제32항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 Fc 도메인은 변형된 인간 Fc 도메인인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 변형된 Fc 도메인은 변형된 인간 IgG1 Fc 도메인인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 41

제32항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 효과기 분자는 FcRn인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인에 비해서 상기 FcRn에 대한 향상된 결합 친화도를 갖는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 43

제32항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 효과기 분자는 Fc γ RIIIa인, 단리된 효과기-적격 폴리

펩티드.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩티드에 비해서 상기 Fc γ RIIIa에 대한 향상된 결합 친화도를 갖는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 45

제32항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인에 비해서 변경된 혈청 반감기를 갖는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인에 비해서 향상된 혈청 반감기를 갖는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 47

제32항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서,

- (i) 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D);
- (ii) 아미노산 위치 236의 알라닌(A);
- (iii) 아미노산 위치 330의 류신(L);
- (iv) 아미노산 위치 256의 아스파르트산(D); 및/또는
- (v) 아미노산 위치 307의 글루타민(Q)

을 추가로 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)을 추가로 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 49

제47항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)을 추가로 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 50

제47항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D), 아미노산 위치 330의 류신(L) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)을 추가로 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 51

제47항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 256의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307의 글루타민(Q)을 추가로 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 52

제47항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 치환은 상기 조작된 이황화 결합과 동일한 중쇄 상에 존재하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 53

제47항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 치환은 상기 조작된 이황화 결합과 상이한 중쇄 상에 존재하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 54

제32항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 결합 도메인을 추가로 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 결합 도메인은 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 하나 이상의 항원 결합 도메인은 종양-항원에 특이적으로 결합하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 57

제55항에 있어서, 상기 하나 이상의 항원 결합 도메인은 면역 세포 상의 항원에 특이적으로 결합하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 58

제32항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 항체인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 59

제58항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 단클론성 항체인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 60

제58항 또는 제59항에 있어서, 상기 항체는 키메라, 인간화 또는 인간 항체인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 61

제58항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 전장 항체인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 62

제32항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 단일-도메인 항체인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 63

제62항에 있어서, 상기 단일-도메인 항체는 VHH 항체인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 64

제32항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 다중 특이적 항체인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 다중 특이적 항체는, DVD-Ig, CODV-Ig인 CODV 기반 형식, CrossMab, CrossMab-Fab 또는 Tandem Fab로 이루어진 군으로부터 선택된 형식을 갖는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 66

제64항 또는 제65항에 있어서, 상기 다중 특이적 항체는 T 세포 관여자(T cell engager)인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 67

제64항 또는 제65항에 있어서, 상기 다중 특이적 항체는 NK 세포 관여자인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 68

제54항에 있어서, 상기 결합 폴리펩티드는 치료용 폴리펩티드를 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 69

제68항에 있어서, 상기 치료용 폴리펩티드는 수용체, 리간드 또는 효소일 수 있는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 70

제54항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 폴리펩티드는 상기 Fc 도메인의 N-말단 및/또는 C-말단에 연결되는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 71

제32항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 항체-의존적 세포 세포독성(ADCC) 및/또는 보체-의존적 세포독성(CDC)에 의해서 표적 세포를 고갈시킬 수 있는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 72

제71항에 있어서, 상기 표적 세포는 암 세포인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 73

제71항에 있어서, 상기 표적 세포는 면역 세포인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 74

제32항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 Fc-융합 폴리펩티드인, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드.

청구항 75

제1항 내지 제74항 중 어느 한 항의 단리된 효과기-적격 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 76

제75항의 단리된 핵산 분자를 포함하는, 벡터.

청구항 77

제76항에 있어서, 상기 벡터는 발현 벡터인, 벡터.

청구항 78

제76항 또는 제77항의 벡터를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 79

제78항에 있어서, 상기 숙주 세포는 진핵생물 또는 원핵생물 기원인, 숙주 세포.

청구항 80

제78항 또는 제79항에 있어서, 상기 숙주 세포는 포유동물 기원인, 숙주 세포.

청구항 81

제78항 또는 제79항에 있어서, 상기 숙주 세포는 박테리아 기원인, 숙주 세포.

청구항 82

제1항 내지 제74항 중 어느 한 항의 단리된 효과기-적격 폴리펩티드를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 83

단리된 효과기-적격 폴리펩티드의 수율을 증가시키는 방법으로서,

제1 중쇄 및 제2 중쇄를 포함하는 글리코실화된 Fc 도메인을 발현시키는 단계로서, 적어도 하나의 중쇄는,

(i) 아미노산 위치 242의 류신(L) 및 아미노산 위치 334의 리신(K);

또는

(iii) 아미노산 위치 292의 아르기닌(R) 및 아미노산 위치 302의 발린(V)

대신 치환된 시스테인(C)의 쌍에 의해서 매개되는 조작된 쇠내 이황화 결합을 포함하되;

상기 아미노산 위치는 EU 넘버링에 따르며;

상기 글리코실화된 Fc 도메인은 항체 효과기 분자와 상호작용할 수 있고;

상기 효과기-적격 폴리펩티드는 상기 조작된 쇠내 이황화 결합을 포함하지 않는 항체 효과기 분자와 상호작용할 수 있는 글리코실화된 Fc 도메인을 갖는 효과기-적격 폴리펩티드와 비교할 때 향상된 열 안정성을 갖는, 단계; 및

상기 효과기-적격 폴리펩티드를 정제시키는 단계로서, 상기 폴리펩티드의 수율은 야생형 글리코실화된 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩티드에 비해서 증가되는, 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 84

제83항에 있어서, 상기 글리코실화된 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 297에 천연 글리칸을 포함하는, 방법.

청구항 85

제83항에 있어서, 상기 글리코실화된 Fc 도메인은 선택적으로 치료용 분자에 접합될 수 있는 변형된 글리칸인 조작된 또는 비-천연 글리칸을 포함하는, 방법.

청구항 86

제83항에 있어서, 상기 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 N-글리코실화된, 방법.

청구항 87

제83항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 중쇄는 시스테인의 쌍을 포함하는, 방법.

청구항 88

제83항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 및 상기 제2 중쇄는 각각 시스테인의 쌍을 포함하는, 방법.

청구항 89

제83항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 인간 Fc 도메인인, 방법.

청구항 90

제89항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인인, 방법.

청구항 91

제83항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 효과기 분자는 FcRn인, 방법.

청구항 92

제91항에 있어서, 상기 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인에 비해서 상기 FcRn에 대한 향상된 결합 친화도를 갖는, 방법.

청구항 93

제83항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 효과기 분자는 Fc γ RIIIa인, 방법.

청구항 94

제93항에 있어서, 상기 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩티드에 비해서 상기 Fc γ RIIIa에 대한 향상된 결합 친화도를 갖는, 방법.

청구항 95

제83항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인에 비해서 변경된 혈청 반감기를 갖는, 방법.

청구항 96

제95항에 있어서, 상기 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인에 비해서 향상된 혈청 반감기를 갖는, 방법.

청구항 97

제83항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 폴리펩티드는 EU 넘버링에 따라서 하나 이상의 효과기 기능-향상 아미노산 치환, 선택적으로 아미노산 위치 332의 치환을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 98

제97항에 있어서, 상기 아미노산 위치 332의 치환은 글루탐산(E)인, 방법.

청구항 99

제98항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236, 239 또는 330에 하나 이상의 치환을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 100

제99항에 있어서, 상기 아미노산 위치 236의 치환은 알라닌(A)인, 방법.

청구항 101

제99항에 있어서, 상기 아미노산 위치 239의 치환은 아스파르트산(D)인, 방법.

청구항 102

제99항에 있어서, 상기 아미노산 위치 330의 치환은 류신(L)인, 방법.

청구항 103

제83항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 104

제83항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 105

제83항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D), 아미노산 위치 330의 류신(L) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 106

제83항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 256 및/또는 307의 치환을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 107

제106항에 있어서, 상기 아미노산 위치 256의 치환은 아스파르트산(D)인, 방법.

청구항 108

제106항에 있어서, 상기 아미노산 위치 307의 치환은 글루타민(Q)인, 방법.

청구항 109

제83항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 256의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307의 글루타민(Q)을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 110

제83항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D), 아미노산 위치 332의 글루탐산(E), 아미노산 위치 256의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307의 글루타민(Q)을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 111

제83항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E), 아미노산 위치 256의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307의 글루타민(Q)을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 112

제83항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D), 아미노산 위치 330의 류신(L), 아미노산 위치 332의 글루탐산(E), 아미노산 위치 256의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307의 글루타민(Q)을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 113

제97항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 치환은 상기 조작된 이황화 결합과 동일한 중쇄 상에 존재하는, 방법.

청구항 114

제97항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 치환은 상기 조작된 이황화 결합과 상이한 중쇄 상에 존재하는, 방법.

청구항 115

제83항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 결합 폴리펩티드를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 116

제115항에 있어서, 상기 결합 폴리펩티드는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 117

제116항에 있어서, 상기 하나 이상의 항원 결합 도메인은 중앙-항원에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 118

제117항에 있어서, 상기 하나 이상의 항원 결합 도메인은 면역 세포 상의 항원에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 119

제83항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 항체인, 방법.

청구항 120

제119항에 있어서, 상기 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 단클론성 항체인, 방법.

청구항 121

제119항 또는 제120항에 있어서, 상기 항체는 키메라, 인간화 또는 인간 항체인, 방법.

청구항 122

제119항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 전장 항체인, 방법.

청구항 123

제83항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 단일-도메인 항체인, 방법.

청구항 124

제123항에 있어서, 상기 단일-도메인 항체는 VHH 항체인, 방법.

청구항 125

제119항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 다중-특이적 항체인, 방법.

청구항 126

제125항에 있어서, 상기 다중 특이적 항체는 DVD-Ig, 선택적으로 CODV-Ig인 CODV 기반 형식, CrossMab, CrossMab-Fb 또는 Tandem Fab로 이루어진 군으로부터 선택된 형식인, 방법.

청구항 127

제125항 또는 제126항에 있어서, 상기 다중 특이적 항체는 T 세포 관여자인, 방법.

청구항 128

제125항 또는 제126항에 있어서, 상기 다중 특이적 항체는 NK 세포 관여자인, 방법.

청구항 129

제115항에 있어서, 상기 결합 폴리펩티드는 치료용 폴리펩티드를 포함하는, 방법.

청구항 130

제129항에 있어서, 상기 치료용 폴리펩티드는 수용체, 리간드 또는 효소일 수 있는, 방법.

청구항 131

제115항 내지 제130항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 폴리펩티드는 상기 Fc 도메인의 N-말단 및/또는 C-말단에 연결되는, 방법.

청구항 132

제83항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 항체-의존적 세포 세포독성(ADCC) 및/또는 보체-의존적 세포독성(CDC)에 의해서 표적 세포를 고갈시킬 수 있는, 방법.

청구항 133

제132항에 있어서, 상기 표적 세포는 암 세포인, 방법.

청구항 134

제132항에 있어서, 상기 표적 세포는 면역 세포인, 방법.

청구항 135

제83항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 Fc-융합 폴리펩티드인, 방법.

청구항 136

질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서, 상기 대상체에게 유효량의 제1항 내지 제74항 중 어느 한 항의 효과기-적격 폴리펩티드를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 137

제136항에 있어서, 상기 질환 또는 장애는 암인, 방법.

청구항 138

제136항에 있어서, 상기 질환 또는 장애는 염증성 질환인, 방법.

청구항 139

제136항에 있어서, 상기 질환 또는 장애는 자가면역 질환인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 2021년 5월 27일자로 출원된 미국 가출원 제63/193,665호, 및 2021년 7월 15일자로 출원된 유럽 출원 EP21315127.7에 대한 우선권을 주장하며, 이들의 개시내용은 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0003] 항체의 단편 결정성(fragment crystallizable: Fc) 영역과 Fc 감마 수용체(Fc γ R) 간의 특이적 결합은 항체-의존적 세포-매개 세포독성(ADCC)과 같은 효과기 기능의 초기 단계이다(Arnold et al., 2007). 인간에서, 활성화 Fc γ RIIIa는 자연 살해 세포의 표면에서 발현된다. Fc γ RIIIa는 저-친화도 수용체이며, 세포의 활성화는 항체-항원 면역 복합체에서 클러스터링된 Fc 영역의 결합 시 이러한 표면 수용체의 가교로 인해 발생한다. Fc 영역은 또한 신생아 Fc 수용체(FcRn)와 상호작용한다. 이러한 상호작용은 내피 세포에서 리소좀 분해를 감소시킴으로써 IgG의 반감기를 연장시키는 것으로 나타났다.

[0004] Fc 수용체에 대한 친화도를 향상시키고 이에 따라 ADCC 활성 및/또는 혈청 반감기를 향상시키는 Fc 도메인 변이체를 확인하기 위해 Fc 조각이 광범위하게 추구되어 왔다. 새로운 Fc 도메인 변이체가 필요하다.

발명의 내용

[0005] 본 개시내용은 부분적으로 변경된 효과기 기능을 갖는 Fc 도메인 변이체가 야생형 Fc 도메인에 비해 감소된 열 안정성을 갖는다는 발견에 관한 것이다. 따라서, 본 개시내용은 추가로, 부분적으로, 증가된 열 안정성 및 예상치 못하게 증가된 생체내 안정성을 갖는 신규한 Fc 도메인 변이체의 발견에 관한 것이다.

- [0006] 일 양태에서, 제1 중쇄 및 제2 중쇄를 포함하는 글리코실화된 Fc 도메인을 포함하는, 단리된 효과기-적격 (effector-competent) 폴리펩티드가 제공되며, 여기서 적어도 하나의 중쇄는 (i) 아미노산 위치 242의 류신(L) 및 아미노산 위치 334의 리신(K); (ii) 아미노산 위치 287의 알라닌(A) 및 아미노산 위치 306의 류신(L); 또는 (iii) 아미노산 위치 292의 아르기닌(R) 및 아미노산 위치 302의 발린(V) 대신 치환된 시스테인(C)의 쌍에 의해서 매개된 조작된 쇠내 이항화 결합을 포함하고; 여기서 아미노산 위치는 EU 넘버링에 따르며; 글리코실화된 Fc 도메인은 항체 효과기 분자와 상호작용할 수 있고; 효과기-적격 폴리펩티드는 조작된 쇠내 이항화 결합을 포함하지 않는 항체 효과기 분자와 상호작용할 수 있는 글리코실화된 Fc 도메인을 갖는 효과기-적격 폴리펩티드에 비해서 향상된 열 안정성을 갖는다.
- [0007] 특정 예시적인 실시형태에서, 글리코실화된 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 297에 천연 글리칸을 포함한다.
- [0008] 특정 예시적인 실시형태에서, 글리코실화된 Fc 도메인은 아미노산 위치 297에 조작된 또는 비-천연 글리칸을 포함한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 조작된 또는 비-천연 글리칸은 변형된 글리칸이다.
- [0009] 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 N-글리코실화된다.
- [0010] 특정 예시적인 실시형태에서, 글리코실화된 Fc 도메인은 치료용 분자에 접합된 변형된 글리칸을 포함한다.
- [0011] 특정 예시적인 실시형태에서, 제1 중쇄는 시스테인의 쌍을 포함한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 제1 중쇄 및 제2 중쇄 각각은 시스테인의 쌍을 포함한다.
- [0012] 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인이다. 특정 예시적인 실시형태에서, IgG1 Fc 도메인은 인간 IgG1 Fc 도메인이다.
- [0013] 특정 예시적인 실시형태에서, 항체 효과기 분자는 FcRn이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인에 비해서 상기 FcRn에 대한 향상된 결합 친화도를 갖는다.
- [0014] 특정 예시적인 실시형태에서, 항체 효과기 분자는 Fc γ R2a이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩티드에 비해서 Fc γ R2a에 대한 향상된 결합 친화도를 갖는다.
- [0015] 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인에 비해서 변경된 혈청 반감기를 갖는다. 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인에 비해서 향상된 혈청 반감기를 갖는다. 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인에 비해서 개선된 생체내 안정성을 갖는다.
- [0016] 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 332에 치환을 추가로 포함한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 아미노산 위치 332의 치환은 글루탐산(E)이다. 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236, 239 또는 330에 하나 이상의 치환을 추가로 포함한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 아미노산 위치 236의 치환은 알라닌(A)이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 아미노산 위치 239의 치환은 아스파르트산(D)이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 아미노산 위치 330의 치환은 류신(L)이다.
- [0017] 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)을 추가로 포함한다.
- [0018] 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)을 추가로 포함한다.
- [0019] 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D), 아미노산 위치 330의 류신(L) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)을 추가로 포함한다.
- [0020] 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 256 및/또는 307에 치환을 추가로 포함한다.
- [0021] 특정 예시적인 실시형태에서, 아미노산 위치 256의 치환은 아스파르트산(D)이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 아미노산 위치 307의 치환은 글루타민(Q)이다.
- [0022] 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 256의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307의 글루타민(Q)을 추가로 포함한다.

- [0023] 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D), 아미노산 위치 332의 글루탐산(E), 아미노산 위치 256의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307의 글루타민(Q)을 추가로 포함한다.
- [0024] 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E), 아미노산 위치 256의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307의 글루타민(Q)을 추가로 포함한다.
- [0025] 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D), 아미노산 위치 330의 류신(L), 아미노산 위치 332의 글루탐산(E), 아미노산 위치 256의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307의 글루타민(Q)을 추가로 포함한다.
- [0026] 또 다른 양태에서, 제1 중쇄 및 제2 중쇄를 포함하는 글리코실화된 Fc 도메인을 포함하는, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드가 제공되며, 여기서 적어도 하나의 중쇄는 (i) 아미노산 위치 242의 류신(L) 및 아미노산 위치 334의 리신(K); (ii) 아미노산 위치 287의 알라닌(A) 및 아미노산 위치 306의 류신(L); 또는 (iii) 아미노산 위치 292의 아르기닌(R) 및 아미노산 위치 302의 발린(V) 대신 치환된 시스테인(C)의 쌍에 의해서 매개된 조작된 쇠내 이황화 결합을 포함하고; 여기서 글리코실화된 Fc 도메인은 항체 효과기 분자와 상호작용할 수 있고, 아미노산 위치 332에 글루탐산(E)을 포함하고; 효과기-적격 폴리펩티드는 상기 조작된 쇠내 이황화 결합을 포함하지 않는 항체 효과기 분자와 상호작용할 수 있고 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)을 포함하는 글리코실화된 Fc 도메인을 갖는 효과기-적격 폴리펩티드와 비교할 때 향상된 열 안정성을 갖고; 아미노산 위치는 EU 넘버링에 따른다.
- [0027] 특정 예시적인 실시형태에서, 글리코실화된 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 297에 천연 글리칸을 포함한다.
- [0028] 특정 예시적인 실시형태에서, 글리코실화된 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 297에 천연 글리칸을 포함한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 조작된 또는 비-천연 글리칸은 변형된 글리칸이다.
- [0029] 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 N-글리코실화된다. 특정 예시적인 실시형태에서, 변형된 글리칸 치료용 분자에 접합된다.
- [0030] 특정 예시적인 실시형태에서, 제1 중쇄는 시스테인의 쌍을 포함한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 제1 중쇄 및 제2 중쇄 각각은 시스테인의 쌍을 포함한다.
- [0031] 특정 예시적인 실시형태에서, 변형된 Fc 도메인은 변형된 인간 Fc 도메인이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 변형된 Fc 도메인은 변형된 인간 IgG1 Fc 도메인이다.
- [0032] 특정 예시적인 실시형태에서, 항체 효과기 분자는 FcRn이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인에 비해서 상기 FcRn에 대한 향상된 결합 친화도를 갖는다.
- [0033] 특정 예시적인 실시형태에서, 항체 효과기 분자는 Fc γ R11a이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩티드에 비해서 Fc γ R11a에 대한 향상된 결합 친화도를 갖는다.
- [0034] 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인에 비해서 변경된 혈청 반감기를 갖는다. 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인에 비해서 향상된 혈청 반감기를 갖는다. 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인에 비해서 개선된 생체내 안정성을 갖는다.
- [0035] 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D); 아미노산 위치 236의 알라닌(A); 아미노산 위치 330의 류신(L); 아미노산 위치 256의 아스파르트산(D); 및/또는 아미노산 위치 30의 글루타민(Q)을 추가로 포함한다.
- [0036] 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)을 추가로 포함한다.
- [0037] 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)을 추가로 포함한다.

- [0038] 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D), 아미노산 위치 330의 류신(L) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)을 추가로 포함한다.
- [0039] 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 256의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307의 글루타민(Q)을 추가로 포함한다.
- [0040] 특정 예시적인 실시형태에서, 하나 이상의 치환은 조작된 이황화 결합과 동일한 중쇄 상에 존재한다.
- [0041] 특정 예시적인 실시형태에서, 하나 이상의 치환은 조작된 이황화 결합과 상이한 중쇄 상에 존재한다.
- [0042] 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 결합 도메인을 추가로 포함한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 결합 도메인은 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 하나 이상의 항원 결합 도메인은 종양-항원에 특이적으로 결합한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 하나 이상의 항원 결합 도메인은 면역 세포 상의 항원에 특이적으로 결합한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 치료용 폴리펩티드를 포함한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 치료용 폴리펩티드는 수용체, 리간드 또는 효소일 수 있다.
- [0043] 특정 예시적인 실시형태에서, 폴리펩티드는 항체이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 폴리펩티드는 단클론성 항체이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 항체는 키메라, 인간화 또는 인간 항체이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 항체는 전장 항체이다.
- [0044] 특정 예시적인 실시형태에서, 폴리펩티드는 단일-도메인 항체이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 단일-도메인 항체는 VHH 항체이다.
- [0045] 특정 예시적인 실시형태에서, 항체는 다중 특이적 항체이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 다중 특이적 항체는 DVD-Ig, CODV 기반 형식, 예컨대, CODV-Ig, CrossMab, CrossMab-Fab 및 Tandem Fab로 이루어진 군으로부터 선택된 형식이다. CROSSODILES® CODV 플랫폼을 기반으로 하는 다중 특이적 항체는 특히 WO 2012135345, WO 2016116626, WO 2017180913에 기재되어 있다. CROSSODILES®는 Sanofi의 등록 상표이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 다중 특이적 항체는 T 세포 관여자(T cell engager)이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 다중 특이적 항체는 NK 세포 관여자이다.
- [0046] 특정 예시적인 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 상기 Fc 도메인의 N-말단 및/또는 C-말단에 연결된다.
- [0047] 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 항체-의존적 세포 세포독성(ADCC) 및/또는 보체-의존적 세포독성(CDC)에 의해서 표적 세포를 고갈시킬 수 있다.
- [0048] 특정 예시적인 실시형태에서, 표적 세포는 암 세포이다.
- [0049] 특정 예시적인 실시형태에서, 표적 세포는 면역 세포이다.
- [0050] 특정 예시적인 실시형태에서, 폴리펩티드는 Fc-융합 폴리펩티드이다.
- [0051] 또 다른 양태에서, 상기에 기재된 단리된 효과기-적격 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 단리된 핵산 분자가 제공된다.
- [0052] 특정 예시적인 실시형태에서, 벡터는 단리된 핵산 분자를 포함한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 벡터는 발현 벡터이다.
- [0053] 또 다른 양태에서, 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.
- [0054] 특정 예시적인 실시형태에서, 숙주 세포는 진핵생물 또는 원핵생물 기원이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 숙주 세포는 포유동물 기원이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 숙주 세포는 박테리아 기원이다.
- [0055] 또 다른 양태에서, 상기에 기재된 단리된 효과기-적격 폴리펩티드를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.
- [0056] 또 다른 양태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드의 수율을 증가시키는 방법이 제공되며, 이 방법은 제1 중쇄 및 제2 중쇄를 포함하는 글리코실화된 Fc 도메인을 발현시키는 단계로서, 여기서 적어도 하나의 중쇄는 (i) 아미노산 위치 242의 류신(L) 및 아미노산 위치 334의 리신(K); (ii) 아미노산 위치 287의 알라닌(A) 및 아미노산 위치 306의 류신(L); 또는 (iii) 아미노산 위치 292의 아르기닌(R) 및 아미노산 위치 302의 발린(V) 대신 치환된 시스테인(C)의 쌍에 의해서 매개된 조작된 쇠내 이황화 결합을 포함하고; 여기서 아미노산 위치는 EU 넘버링에 따르며; 글리코실화된 Fc 도메인은 항체 효과기 분자와 상호작용할 수 있고; 효과기-적격 폴리펩티드는 조작

된쇄내 이황화 결합을 포함하지 않는 항체 효과기 분자와 상호작용할 수 있는 글리코실화된 Fc 도메인을 갖는 효과기-적격 폴리펩티드에 대해서 향상된 열 안정성을 갖는, 단계; 및 효과기-적격 폴리펩티드를 정제시키는 단계로서, 여기서 상기 폴리펩티드의 수율은 야생형 글리코실화된 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩티드에 대해서 증가되는, 단계를 포함한다.

- [0057] 특정 예시적인 실시형태에서, 글리코실화된 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 297에 천연 글리칸을 포함한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 글리코실화된 Fc 도메인은 선택적으로 변형된 글리칸인 아미노산 위치 297에 조작된 또는 비-천연 글리칸을 포함한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 N-글리코실화된다. 특정 예시적인 실시형태에서, 변형된 글리칸 치료용 분자에 접합될 수 있다.
- [0058] 특정 예시적인 실시형태에서, 제1 중쇄는 시스테인의 쌍을 포함한다.
- [0059] 특정 예시적인 실시형태에서, 제1 중쇄 및 제2 중쇄 각각은 시스테인의 쌍을 포함한다.
- [0060] 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 인간 Fc 도메인이다. 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인이다.
- [0061] 특정 예시적인 실시형태에서, 항체 효과기 분자는 FcRn이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인에 대해서 상기 FcRn에 대한 향상된 결합 친화도를 갖는다.
- [0062] 특정 예시적인 실시형태에서, 항체 효과기 분자는 FcγRIIIa이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩티드에 대해서 FcγRIIIa에 대한 향상된 결합 친화도를 갖는다.
- [0063] 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인에 대해서 변경된 혈청 반감기를 갖는다. 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인에 대해서 향상된 혈청 반감기를 갖는다.
- [0064] 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 폴리펩티드는 EU 넘버링에 따라서 하나 이상의 효과기 기능-향상 아미노산 치환, 선택적으로 아미노산 위치 332의 치환을 추가로 포함한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 아미노산 위치 332의 치환은 글루탐산(E)이다. 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236, 239 또는 330에 하나 이상의 치환을 추가로 포함한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 아미노산 위치 236의 치환은 알라닌(A)이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 아미노산 위치 239의 치환은 아스파르트산(D)이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 아미노산 위치 330의 치환은 류신(L)이다.
- [0065] 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)을 추가로 포함한다.
- [0066] 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)을 추가로 포함한다.
- [0067] 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D), 아미노산 위치 330의 류신(L) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)을 추가로 포함한다.
- [0068] 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 256 및/또는 307의 치환을 추가로 포함한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 아미노산 위치 256의 치환은 아스파르트산(D)이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 아미노산 위치 307의 치환은 글루타민(Q)이다.
- [0069] 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 256의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307의 글루타민(Q)을 추가로 포함한다.
- [0070] 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D), 아미노산 위치 332의 글루탐산(E), 아미노산 위치 256의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307의 글루타민(Q)을 추가로 포함한다.
- [0071] 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E), 아미노산 위치 256의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307의 글루타민(Q)을 추가로 포함한다.
- [0072] 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 위치

239의 아스파르트산(D), 아미노산 위치 330의 류신(L), 아미노산 위치 332의 글루탐산(E), 아미노산 위치 256의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307의 글루타민(Q)을 추가로 포함한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 하나 이상의 치환은 조작된 이황화 결합과 동일한 중쇄 상에 존재한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 하나 이상의 치환은 조작된 이황화 결합과 상이한 중쇄 상에 존재한다.

[0073] 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 결합 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 하나 이상의 항원 결합 도메인은 중앙-항원에 특이적으로 결합한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 하나 이상의 항원 결합 도메인은 면역 세포 상의 항원에 특이적으로 결합한다.

[0074] 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 항체이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 단클론성 항체이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 항체는 키메라, 인간화 또는 인간 항체이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 항체는 전장 항체이다.

[0075] 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 단일-도메인 항체이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 단일-도메인 항체는 VH8 항체이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 항체는 다중 특이적 항체이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 다중 특이적 항체는 DVD-Ig, CODV 기반 형식, 예컨대, CODV-Ig, CrossMab, CrossMab-Fb 및 Tandem Fab로 이루어진 군으로부터 선택된 형식이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 다중 특이적 항체는 T 세포 관여자이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 다중 특이적 항체는 NK 세포 관여자이다.

[0076] 특정 예시적인 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 치료용 폴리펩티드를 포함한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 치료용 폴리펩티드는 수용체, 리간드 또는 효소일 수 있다.

[0077] 특정 예시적인 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 상기 Fc 도메인의 N-말단 및/또는 C-말단에 연결된다.

[0078] 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 항체-의존적 세포 세포독성(ADCC) 및/또는 보체-의존적 세포독성(CDC)에 의해서 표적 세포를 고갈시킬 수 있다. 특정 예시적인 실시형태에서, 표적 세포는 암 세포이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 표적 세포는 면역 세포이다.

[0079] 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 Fc-융합 폴리펩티드이다.

[0080] 또 다른 양태에서, 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 제공되며, 상기 대상체에게 유효량의 상기에 기재된 효과기-적격 폴리펩티드를 투여하는 단계를 포함한다.

[0081] 특정 예시적인 실시형태에서, 질환 또는 장애는 암이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 질환 또는 장애는 염증성 질환이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 질환 또는 장애는 자가면역 질환이다.

도면의 간단한 설명

[0082] 본 발명의 상기 및 다른 특징 및 이점은 첨부된 도면과 함께 예시적인 실시형태의 하기 상세한 설명으로부터 더 완전히 이해될 것이다.

도 1a 내지 도 1b는 300 K 및 370 K의 소수성 접촉 빈도의 평균을 도시한다. **도 1a**는 아미노산 위치 332의 글루탐산(E) 잔기에 대한 소수성 접촉의 평균 빈도를 나타낸다. **도 1b**는 300 K에서 알파 탄소의 평균 제곱근 변동(root mean square fluctuation)(옹스트롬 단위)을 도시한다.

도 2는 구조적으로 매우 근접한 I332E(녹색 CPK 렌더링) 및 L242C + K334C 조작된 이황화 결합(주황색 CPK 렌더링)을 사용한 Fc CH2 도메인(라인 - 리본)에 대한 DSB 그래프팅의 예를 도시한다.

도 3은 I332(좌측 패널, 점선으로 강조된 소수성 접촉) 및 I332E(우측 패널, 점선으로 강조된 정전기 접촉)에 대한 비공유 결합 네트워크의 예를 도시한다.

도 4는 DSB 돌연변이를 위해 선택된 위치의 예를 도시한다. 좌측 패널에서, L242+K334(원 안의 막대). 우측 패널에서, R292 및 V302(원 안의 막대).

도 5는 음성 대조군으로 선택된 A287 및 L306(아래쪽 황색 막대) 위치를 도시한다. 2개의 잔기는 FcRn 결합 표면에 가깝고 IgG CH2 도메인의 경계에 존재하며, 예상되는 구조적 영향은 이전의 2개 DSB 체계보다 낮다.

도 6은 mAb1 ADLE 및 DSB 돌연변이체와의 이황화 결합의 추출된 이온 크로마토그램(XIC) 펩티드 정량 프로파일을 도시한다. ADLE의 경우, 데드 볼륨에서 용출된 218LC-223HC를 제외하고 8개의 이황화 다리가 검출되었다.

ADLE_DQ_R292C_V302C의 경우, 데드 볼륨에서 용출된 218LC-223HC를 제외하고 9개의 이황화 다리가 검출되었다. ADLE_DQ_L242C_K334C의 경우, 하나의 공통 펩티드(돌연변이 및 힌지에 대해 동일함)와 함께, 데드 볼륨에서 용출된 218LC-223HC를 제외하고 8개의 이황화 다리가 검출되었다.

도 7b는 mAb1 DE 및 DSB 돌연변이체(**도 7a**) 및 mAb1 ADE 및 DSB 돌연변이체(**도 7b**)와의 이황화 결합의 XIC 펩티드 정량 프로파일을 도시한다. DE의 경우, 데드 볼륨에서 용출된 218LC-223HC를 제외하고 8개의 이황화 다리가 검출되었다. DE_DQ_R292C_V302C의 경우, 데드 볼륨에서 용출된 218LC-223HC를 제외하고 9개의 이황화 다리가 검출되었다. DE_DQ_L242C_K334C의 경우, 하나의 공통 펩티드(돌연변이 및 힌지에 대해 동일함)와 함께, 데드 볼륨에서 용출된 218LC-223HC를 제외하고 9개의 이황화 다리가 검출되었다.

도 8은 나노 시차 주사 형광측정법(nanoDSF)에 의해 결정된 mAb1 ADLE 변이체에 대한 이황화 안정화의 열안정성 효과를 도시한다.

도 9a 내지 도 9b는 nanoDSF에 의해 결정된 mAb1 DE 변이체(**도 9a**) 및 ADE 변이체(**도 9b**)에 대한 이황화 안정화의 열안정성 효과를 도시한다.

도 10은 나노 시차 주사 형광측정법(nanoDSF)에 의해 결정된 mAb3 및 mAb4 DE, ADE, DE + DSB(R292C-V302C), 및 ADE + DSB(R292C-V302C) 변이체에 대한 이황화 안정화의 열안정성 효과를 도시한다. 좌측 패널은 mAb3 변이체를 도시하고, 우측 패널은 녹색 DE, 적색 ADE, DE+ DSB 보라색, ADE DSB 청색, WT 검정색 색상 코드를 갖는 mAb4 변이체를 도시한다.

도 11은 mAb1 +/- ADLE, DE 또는 ADE +/- DSB(L242C_K334C 또는 R292C_V302C)에 대한 IgG1 야생형과 비교한 ADLE 변이체, DE 변이체 및 ADE 변이체의 CDC 활성을 도시한다.

도 12는 mAb1 +/- ADLE, DE 또는 ADE +/- DQ +/- R292C_V302C에 대한 IgG1 야생형과 비교한 ADLE 변이체, DE 변이체 및 ADE 변이체의 CDC 활성을 도시한다.

도 13은 mAb1 + ADLE, DE 또는 ADE +/- DQ +/- L242C_K334C에 대한 IgG1 야생형과 비교한 ADLE 변이체, DE 변이체 및 ADE 변이체의 CDC 활성을 도시한다.

도 14는 mAb1 +/-ADLE, DE 또는 ADE +/- L242C_K334C 또는 R294C_V304C에 대한 IgG1 야생형과 비교한 ADLE 변이체, DE 변이체 및 ADE 변이체의 ADCC 활성을 도시한다.

도 15는 mAb1 +/- ADLE, DE 또는 ADE +/- DQ +/- R292C_V302C에 대한 IgG1 야생형과 비교한 ADLE 변이체, DE 변이체 및 ADE 변이체의 ADCC 활성을 도시한다.

도 16은 mAb1 +/- ADLE, DE 또는 ADE +/- DQ +/- DSB L242C_K334C에 대한 IgG1 야생형과 비교한 ADLE 변이체, DE 변이체 및 ADE 변이체의 ADCC 활성을 도시한다.

도 17은 R292C-V302C DSB 치환이 있거나 없는 ADE 변이체 및 DE 변이체의 세포독성 활성을 도시한다. 특이적 용해 백분율을 y축에 나타내고, mAb3 농도를 nM 단위로 x축에 나타낸다.

도 18은 Tg32 마우스에서 mAb1 항체의 평균 PK 프로파일을 도시한다(log 스케일).

도 19는 Tg32 마우스에서 추가적인 mAb1 항체의 평균 PK 프로파일을 도시한다(log 스케일).

도 20은 Tg32 마우스에서 mAb3 항체의 평균 PK 프로파일을 도시한다(log 스케일).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0083] 본 개시내용은 개선된 열 안정성을 갖는 신규한 Fc 도메인 변이체(예를 들어, Fc 도메인 변이체를 포함하는 신규한 결합 폴리펩티드)를 제공한다. 본 개시내용은 또한 Fc 수용체에 대한 개선된 결합을 갖는 신규한 Fc 도메인 변이체(예를 들어, Fc 도메인 변이체를 포함하는 신규한 결합 폴리펩티드)를 제공한다. 본 개시내용은 추가로 야생형(예를 들어, 비-변형된) Fc 도메인에 비해서 항체 효과기 분자와의 상호작용을 향상시키는 글리코실화된 Fc 도메인을 포함하는 신규한 Fc 도메인 변이체(예를 들어, Fc 도메인 변이체를 포함하는 결합 폴리펩티드)를 제공한다. 본 개시내용은 또한 Fc 도메인 변이체(예를 들어, Fc 도메인 변이체를 포함하는 신규한 결합 폴리펩티드)를 암호화하는 핵산, Fc 도메인 변이체(예를 들어, Fc 도메인 변이체를 포함하는 신규한 결합 폴리펩티드)를 제조하기 위한 재조합 발현 벡터 및 숙주 세포 및 단리된 Fc 도메인 변이체(예를 들어, Fc 도메인 변이체를 포함하는 신규한 결합 폴리펩티드)를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 하나 이상의 질환 또는 장애를 치료하기 위해서 본 개시내용의 Fc 도메인 변이체(예를 들어, Fc 도메인 변이체를 포함하는 신규한 결합 폴리펩티드)를 제공한다.

티드)를 사용하는 방법이 또한 제공된다.

- [0084] 본 발명에 기술된 방법은 본 명세서에 개시된 특정 방법 및 실험 조건이 변할 수 있으므로 이러한 방법 및 조건에 한정되지 않음이 이해되어야 한다. 본 명세서에 사용된 전문용어가 오직 특정 실시형태를 기술할 목적이고, 제한하고자 하는 것이 아님이 또한 이해되어야 한다.
- [0085] 또한, 본 명세서에 기술된 실험은, 달리 지시되지 않는 한, 본 기술 분야의 기술 내의 통상적인 분자 및 세포 생물학 및 면역학 기술을 사용한다. 이러한 기술은 숙련된 작업자에게 잘 알려져 있으며 문헌에 충분히 설명되어 있다. 예를 들어, 모든 보충 자료인 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition) by MR Green and J. Sambrook and Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (2013, 2nd edition)]을 포함하여 문헌[Ausubel, *et al.*, ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2008)]을 참조하기 바란다.
- [0086] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 과학 및 기술 용어는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 잠재된 모호성이 있는 경우, 본 명세서에 제공된 정의가 사전 정의 또는 외부 정보보다 우선한다. 맥락상 달리 요구되지 않는 한, 단수형 용어는 복수형을 포함하고, 복수형 용어는 단수형을 포함한다. "또는"의 사용은 달리 명시되지 않는 한, "및/또는"을 의미한다. "포함하는"이라는 용어뿐만 아니라 "포함한다" 및 "포함되는"과 같은 다른 형태의 사용은 제한적인 것이 아니다.
- [0087] 일반적으로, 본 명세서에 기술된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질 및 핵산 화학 및 혼성화와 관련하여 사용되는 명명법은 당업계에 잘 알려져 있고 일반적으로 사용된다. 일반적으로, 본 명세서에 제공된 방법 및 기술은 달리 명시되지 않는 한, 당업계에 잘 알려진 통상적인 방법에 따라, 그리고 본 명세서 전체에 걸쳐 인용되고 논의되는 다양한 일반적이고 보다 구체적인 참고문헌에 기재된 바와 같이 수행된다. 효소 반응 및 정제 기법은 당업계에서 보편적으로 달성된 바와 같이 또는 본 명세서에 기재된 바와 같이 제조업체의 설명서에 따라 수행된다. 본 명세서에서 기술된 분석 화학, 합성 유기 화학, 및 의약 및 제약 화학과 관련하여 이용되는 명명법 및 이들의 실험실 절차 및 기술은 당업계에서 잘 알려지고 일반적으로 사용되는 것들이다. 화학 합성, 화학 분석, 약제학적 제제, 제형화, 전달, 및 환자 치료를 위해 표준 기술이 사용될 수 있다.
- [0088] 본 개시가 보다 쉽게 이해될 수 있도록, 선택된 용어들이 아래에서 정의된다.
- [0089] 용어 "폴리펩티드"는 아미노산의 임의의 중합체 쇄를 지칭하고 문맥상 달리 모순되지 않는 한 천연 또는 인공 단백질, 폴리펩티드 유사체 또는 단백질 서열의 변이체, 또는 이들의 단편을 포함한다. 폴리펩티드는 단량체성 또는 중합체성일 수 있다. 폴리펩티드 단편은 예를 들어 약 5개 이상의 연속 아미노산, 약 10개 이상의 연속 아미노산, 약 15개 이상의 연속 아미노산, 또는 약 20개 이상의 연속 아미노산을 포함한다.
- [0090] 용어 "단리된 단백질", 또는 "단리된 폴리펩티드"는 이의 기원 또는 유래 원천으로 인해, 이의 원상태에서 수반되는 자연적으로 연관된 성분과 연관되지 않거나; 동일한 종으로부터의 다른 단백질이 실질적으로 없거나; 상이한 종으로부터의 세포에 의해 발현되거나; 자연에서 발생하지 않는 단백질 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 따라서, 화학적으로 합성되거나, 자연적으로 유래되는 세포와 상이한 세포계에서 합성되는 단백질 또는 폴리펩티드는 이의 자연적으로 연관된 성분으로부터 "단리될" 것이다. 단백질 또는 폴리펩티드는 또한 당업계에 널리 알려진 단백질 정제 기술을 사용하여 단리에 의해 자연적으로 연관된 성분이 실질적으로 없도록 제공될 수 있다.
- [0091] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "결합 단백질" 또는 "결합 폴리펩티드"는 관심 표적 항원(예를 들어, 인간 표적 항원)에 선택적으로 결합하는 것을 담당하는 적어도 하나의 결합 부위를 함유하는 단백질 또는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 또는 이뮤노노드헤신)를 지칭한다. 예시적 결합 부위는 항체 가변 도메인, 수용체의 리간드 결합 부위, 또는 리간드의 수용체 결합 부위를 포함한다. 특정 양태에서, 결합 단백질 또는 결합 폴리펩티드는 다수의(예를 들어, 2개, 3개, 4개, 또는 그 초과) 결합 부위를 포함한다. 특정 양태에서, 결합 단백질 또는 결합 폴리펩티드는 치료용 효소이다.
- [0092] 용어 "리간드"는 다른 물질에 결합할 수 있거나 결합될 수 있는 임의의 물질을 지칭한다. 이와 유사하게, 용어 "항원"은 항체가 생성될 수 있는 임의의 물질을 지칭한다. "항원"은 일반적으로 항체 결합 기질과 관련하여 사용되며 "리간드"는 수용체 결합 기질을 언급할 때 종종 사용되지만, 이러한 용어는 서로 구별되지 않으며 넓은 범위의 중첩 화학 엔티티를 포함한다. 의심의 여지를 피하기 위해, 항원 및 리간드는 본 명세서 전반에 걸쳐 상

효교환가능하게 사용된다. 항원/리간드는 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 압타머, 다당류, 당 분자, 탄수화물, 지질, 올리고뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 합성 분자, 무기 분자, 유기 분자 및 이들의 임의의 조합일 수 있다.

[0093] 결합 단백질의 해리 상수(K_D)는 예를 들어 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정될 수 있다. 일반적으로, 표면 플라즈몬 공명 분석에서는 BIAcore 시스템(Pharmacia Biosensor; 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)을 사용하여 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 리간드(바이오센서 매트릭스 상의 표적 항원)와 피분석물(용액 중 결합 단백질) 사이의 실시간 결합 상호작용을 측정한다. 표면 플라즈몬 분석은 피분석물(바이오센서 매트릭스 상의 결합 단백질)의 고정화 및 리간드(표적 항원)의 제시에 의해 수행될 수도 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 " K_D "는 특정 결합 단백질과 표적 항원 사이의 상호작용의 해리 상수를 나타낸다.

[0094] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "특이적으로 결합하다"는 최대 약 1×10^{-6} M, 약 1×10^{-7} M, 약 1×10^{-8} M, 약 1×10^{-9} M, 약 1×10^{-10} M, 약 1×10^{-11} M, 약 1×10^{-12} M, 또는 그 미만의 해리 상수(K_D)로 항원에 결합하고/하거나, 비특이적 항원에 대한 친화성보다 적어도 약 2배 더 큰 친화성으로 표적(예를 들어, 항원)에 결합하는 항체 또는 이뮤노어드헤신의 능력을 지칭한다. 항체의 특이적 결합은 CDR 서열을 통해서 표적 항원에 대한 것일 수 있다. 항체는 또한 Fc 영역을 통해서 FcR, 예컨대, FcRn 또는 Fc γ RIIIa에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0095] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항체"는 관심 항원(예를 들어, 종양 연관 항원)에 대한 유의미한 알려진 특이적 면역반응 활성을 갖는 어셈블리(예를 들어, 온전한 항체 분자, 이뮤노어드헤신, 또는 이의 변이체)를 나타낸다. 항체 및 면역글로불린은 경쇄와 중쇄 사이에 쇠간 공유 결합을 갖거나 갖지 않는 경쇄 및 중쇄를 포함한다. 척추동물계에서의 기본 면역글로불린 구조는 비교적 잘 이해되어 있다.

[0096] 하기에 보다 상세히 논의되는 바와 같이, 일반 용어 "항체"는 생화학적으로 구별될 수 있는 항체의 5가지의 별개의 클래스를 포함한다. 항체의 모든 5개의 클래스는 본 개시내용의 범위 내에 명백히 속하며, 하기 논의는 일반적으로 면역글로불린 분자의 IgG 클래스에 관한 것일 것이다. IgG와 관련하여, 면역글로불린은 분자량이 약 23,000 달톤인 2개의 동일한 경쇄 및 분자량이 53,000~70,000인 2개의 동일한 중쇄를 포함한다. 상기 4개의 쇠는 "Y" 구성으로 이황화 결합에 의해 연결되며, 여기서, 경쇄는 중쇄를 브라켓하고(bracket) 이는 "Y"의 입구에서 시작하여 가변 영역을 통해 계속된다.

[0097] 면역글로불린의 경쇄는 카파(κ) 또는 람다(λ)로 분류된다. 각각의 중쇄 클래스는 카파 또는 람다 경쇄와 결합될 수 있다. 일반적으로, 경쇄 및 중쇄는 서로 공유 결합되고, 면역글로불린이 하이브리도마, B 세포, 또는 유전자 조작된 숙주 세포에 의해 생성되는 경우, 두 중쇄의 "테일" 부분은 공유 이황화 연결 또는 비공유 연결에 의해 서로 결합된다. 중쇄에서, 아미노산 서열은 Y 형태의 포크형(forked) 말단의 N-말단으로부터 각각의 쇠의 하부의 C-말단으로 이어진다. 당업자는 중쇄가 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 또는 엡실론(ϵ)으로 분류되며, 이때 일부 하위클래스(예를 들어, $\gamma 1$ - $\gamma 4$)가 이들 중에 있음을 인지할 것이다. 항체의 "클래스"를 각각 IgG, IgM, IgA IgG 또는 IgE로 결정하는 것이 이러한 쇠의 성질이다. 면역글로불린 이소형(isotype) 하위클래스(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 등)는 잘 특성규명되어 있으며 기능적 특화를 부여하는 것으로 알려져 있다. 이들 클래스 및 이소형 각각의 변형된 버전은 본 개시에 비추어 당업자가 용이하게 식별할 수 있으며, 따라서, 본 개시내용의 범주 내에 있다.

[0098] 경쇄 및 중쇄 모두 구조적 및 기능적 상동 영역으로 나누어진다. 용어 "영역"은 면역글로불린 또는 항체 쇠의 부분 또는 일부를 지칭하며, 불변 영역 또는 가변 영역과, 상기 영역의 더욱 개별적인 부분 또는 일부를 포함한다. 예를 들어, 경쇄 가변 영역은 본 명세서에서 정의되는 바와 같이, "프레임워크 영역" 또는 "FR" 사이에 산재된 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"을 포함한다.

[0099] 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄의 영역은 "불변 영역"의 경우에 다양한 클래스의 구성원의 영역 내의 서열 변화의 상대적 결여를 기반으로 하여, 또는 "가변 영역"의 경우에 다양한 클래스의 구성원의 영역 내의 유의한 변화를 기반으로 하여 "불변"(C) 영역 또는 "가변"(V) 영역으로 정의될 수 있다. 용어 "불변 영역" 및 "가변 영역"은 또한 기능적으로 사용될 수 있다. 이와 관련하여, 면역글로불린 또는 항체의 가변 영역이 항원 인식 및 특이성을 결정함이 인지될 것이다. 역으로, 면역글로불린 또는 항체의 불변 영역은 중요한 효과기 기능, 예를 들어, 분비, 태반경유 이동, Fc 수용체 결합, 보체 결합 등을 제공한다. 다양한 면역글로불린 부류의 불변 영역의 소단위 구조 및 3차원 형태가 널리 공지되어 있다.

- [0100] 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 불변 및 가변 영역은 도메인으로 접힌다. 용어 "도메인"은, 예를 들어, β -플리드 시트(β -pleated sheet) 및/또는 쇠내 이황화 결합에 의해 안정화된 펩티드 루프를 포함하는(예를 들어, 3 내지 4개의 펩티드 루프를 포함하는) 중쇄 또는 경쇄의 구상 영역을 지칭한다. 면역글로불린의 경쇄 상의 불변 영역 도메인은 "경쇄 불변 영역 도메인", "CL 영역" 또는 "CL 도메인"으로 상호교환가능하게 지칭된다. 중쇄 상의 불변 도메인(예를 들어, 힌지, CH1, CH2 또는 CH3 도메인)은 "중쇄 불변 영역 도메인", "CH" 영역 도메인 또는 "CH 도메인"으로 상호교환가능하게 지칭된다. 경쇄 상의 가변 도메인은 "경쇄 가변 영역 도메인", "VL 영역 도메인" 또는 "VL 도메인"으로 상호 교환적으로 나타낸다. 중쇄 상의 가변 도메인은 "중쇄 가변 영역 도메인", "VH 영역 도메인" 또는 "VH 도메인"으로 상호 교환적으로 나타낸다.
- [0101] 관례적으로, 가변 불변 영역 도메인의 아미노산의 넘버링은 이들이 면역글로불린 또는 항체의 아미노-말단 또는 항원 결합 부위로부터 더 멀어질수록 증가한다. 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 각각의 N-말단은 가변 영역이고 C-말단은 불변 영역이다. CH3 및 CL 도메인은 각각 중쇄 및 경쇄의 카르복시-말단을 포함한다. 따라서, 경쇄 면역글로불린의 도메인은 VL-CL 배향으로 배열되는 반면, 중쇄의 도메인은 VH-CH1-힌지-CH2-CH3 배향으로 배열된다.
- [0102] 각각의 가변 영역 도메인에 대한 아미노산의 할당은 문헌[Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991)]의 정의에 따른다. Kabat는 또한 상이한 중쇄 가변 영역들 사이 또는 상이한 경쇄 가변 영역들 사이의 상응하는 잔기에 동일한 번호가 할당되는 널리 사용되는 넘버링 규칙(Kabat 넘버링)을 제공한다. VL 도메인의 CDR 1, 2 및 3은 또한 본 명세서에서, 각각 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3으로 나타낸다. VH 도메인의 CDR 1, 2 및 3은 또한 본 명세서에서, 각각 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3으로 나타낸다. 이와 같이 주지되는 경우, CDR의 할당은 Kabat 대신 IMGT®(Lefranc et al., *Developmental & Comparative Immunology* 27:55-77; 2003)에 따라 이루어질 수 있다. 중쇄 불변 영역의 넘버링은 Kabat(Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991)에 나타낸 바와 같은 EU 인덱스를 통해 이루어진다.
- [0103] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "VH 도메인"은 면역글로불린 중쇄의 아미노 말단 가변 도메인을 포함하고, 용어 "VL 도메인"은 면역글로불린 경쇄의 아미노 말단 가변 도메인을 포함한다.
- [0104] 본 명세서에서 사용되는 용어 "CH1 도메인"에는, 예를 들어, Kabat 넘버링 시스템에서 약 위치 114 내지 223(EU 위치 118 내지 215)에 걸쳐 있는 면역글로불린 중쇄의 첫 번째(가장 아미노 말단)의 불변 영역 도메인이 포함된다. CH1 도메인은 VH 도메인에 인접하여 있고, 면역글로불린 중쇄 분자의 힌지 영역에 대해 아미노 말단에 있으며, 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 부분을 형성하지 않는다.
- [0105] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "힌지 영역"은 CH1 도메인을 CH2 도메인에 연결시키는 중쇄 분자의 일부를 포함한다. 힌지 영역은 약 25개의 잔기를 포함하고, 가요성이어서, 2개의 N-말단 항원 결합 영역이 독립적으로 움직이는 것을 가능케 한다. 힌지 영역은 다음의 3개의 고유한 도메인으로 세분될 수 있다: 상부, 중간, 및 하부 힌지 도메인(문헌[Roux et al. *J. Immunol.* 1998, 161 :4083]).
- [0106] 본 명세서에서 사용되는 용어 "CH2 도메인"에는, 예를 들어, Kabat 넘버링 시스템에서 약 위치 244 내지 360(EU 위치 231 내지 340)에 걸쳐 있는 중쇄 면역글로불린 분자의 일부가 포함된다. CH2 도메인은 또 다른 도메인과 밀접하게 쌍을 이루지 않는다는 점에서 독특하다. 오히려, 2개의 N-결합된 분지형 탄수화물 쇠는 온전한 천연 IgG 분자의 2개의 CH2 도메인 사이에 삽입되어 있다. 하나의 실시형태에서, 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 IgG1 분자(예를 들어, 인간 IgG1 분자)로부터 유래된 CH2 도메인을 포함한다.
- [0107] 본 명세서에서 사용되는 용어 "CH3 도메인"에는, 예를 들어, Kabat 넘버링 시스템의 약 위치 361 내지 476(EU 위치 341 내지 445)의, CH2 도메인의 N-말단으로부터의 약 110개의 잔기에 걸쳐 있는 중쇄 면역글로불린 분자의 일부가 포함된다. CH3 도메인은 전형적으로 항체의 C-말단 일부를 형성한다. 그러나, 일부 면역글로불린에서, 추가 도메인은 CH3 도메인으로부터 연장되어 분자의 C-말단 부분(예를 들어, IgM의 μ 쇠 및 IgE의 e 쇠 내 CH4 도메인)을 형성할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 IgG1 분자(예를 들어, 인간 IgG1 분자)로부터 유래된 CH3 도메인을 포함한다.
- [0108] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "CL 도메인"은, 예를 들어, 대략 Kabat 위치 107A 내지 대략 Kabat 위치 216에 걸쳐 있는 면역글로불린 경쇄의 불변 영역 도메인을 포함한다. CL 도메인은 VL 도메인에 인접하여 있다. 일 실시형태에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 카파 경쇄(예를 들어, 인간 카파 경쇄)로부터 유래된 CL 도메인을 포함한다.
- [0109] 항체의 가변 영역은 항체가 항원 상의 에피토프를 선택적으로 인식하고 이에 특이적으로 결합하는 것을 가능케

한다. 즉, 항체의 VL 도메인 및 VH 도메인은 조합되어 3차원 항원 결합 부위를 규정하는 가변 영역(Fv)을 형성한다. 이러한 4차 항체 구조는 "Y" 배위의 각각의 아암의 단부에 존재하는 항원 결합 부위를 형성한다. 보다 구체적으로, 항원 결합 부위는 중쇄 및 경쇄 가변 영역 각각 상의 3개의 상보성 결정 영역(CDR)에 의해서 정의된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "항원 결합 부위"는 항원(예를 들어, 세포 표면 또는 가용성 항원)에 특이적으로 결합하는 부위를 포함한다. 항원 결합 부위는 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 가변 영역이 포함하고, 이들 가변 영역에 의해 형성된 결합 부위는 항체의 특이성을 결정한다. 항원 결합 부위는 항체마다 다양한 가변 영역에 의해 형성된다. 본 개시내용의 변경된 항체는 적어도 하나의 항원 결합 부위를 포함한다.

[0110] 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 결합 폴리펩티드와 선택된 항원의 회합을 제공하는 적어도 2개의 항원 결합 도메인을 포함한다. 항원 결합 도메인은 동일한 면역글로불린 분자로부터 유래될 필요는 없다. 이와 관련하여, 가변 영역은 체액성 반응을 개시하고, 목적하는 항원에 대한 면역글로불린을 생성하기 위해 유도될 수 있는 임의의 유형의 동물의 가변 영역일 수 있거나 이로부터 유래될 수 있다. 이와 같이, 결합 폴리펩티드의 가변 영역은, 예를 들어, 포유동물 기원일 수 있고, 예를 들어, 인간, 무린, 래트, 염소, 양, 비-인간 영장류(예를 들어, 시노몰거스 원숭이(cynomolgus monkey), 마카크(macaques) 등), 이리, 또는 낙타과(예를 들어, 낙타, 라마 및 관련 종) 기원일 수 있다.

[0111] 자연 발생 항체에서, 각각의 단량체 항체 상에 존재하는 6개의 CDR은 특이적으로 배치되어 항체가 수성 환경에서 이의 3차원 형태를 취함에 따라 항원 결합 부위를 형성하는 짧은 비연속적인 아미노산 서열이다. 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 나머지는 아미노산 서열에 있어서 덜한 분자간 변동성을 나타내며, 프레임워크 영역으로 언급된다. 프레임워크 영역은 주로 β -시트 형태를 채택하며, CDR은 β -시트 구조를 연결하는 루프, 일부 경우에는 β -시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 따라서, 이들 프레임워크 영역은 쇠간 비-공유 상호작용에 의해 정확한 배향으로 6개의 CDR의 배치를 제공하는 스캐폴드를 형성시키는 작용을 한다. 배치된 CDR에 의해 형성된 항원 결합 도메인은 면역반응성 항원 상의 에피토프와 상보적인 표면을 정의한다. 이러한 상보적 표면은 면역반응성 항원 에피토프에 대한 항체의 비공유 결합을 촉진한다.

[0112] 예시적 결합 폴리펩티드는 항체 변이체를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "항체 변이체"는 항체가 자연 발생이 아니도록 변경된 항체의 합성 및 조작된 형태, 예를 들어, 적어도 2개의 중쇄 부분을 포함하나, 2개의 완전한 중쇄가 아닌 항체(예를 들어, 도메인 결실된 항체 또는 미니바디(minibody)); 2개 이상의 상이한 항원 또는 단일 항원 상의 다양한 에피토프에 결합하도록 변경된 항체의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적, 삼중특이적 등) 형태; scFv 분자에 연결된 중쇄 분자 등을 포함한다. 또한, 용어 "항체 변이체"는 동일 항원의 3개, 4개 또는 그 초과 카피에 결합하는 다가 형태의 항체(예를 들어, 3가, 4가 등의 항체)를 포함한다.

[0113] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "결합가"는 폴리펩티드 내의 잠재적 표적 결합 부위의 수를 지칭한다. 각각의 표적 결합 부위는 하나의 표적 분자 또는 표적 분자 상의 특정 부위에 특이적으로 결합한다. 폴리펩티드가 1개 초과 표적 결합 부위를 포함하는 경우, 각각의 표적 결합 부위는 동일하거나 상이한 분자에 특이적으로 결합할 수 있다(예를 들어, 상이한 리간드 또는 상이한 항원, 또는 동일 항원 상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다). 본 발명의 결합 폴리펩티드는 전형적으로 인간 항원 분자에 특이적인 적어도 하나의 결합 부위를 갖는다. 예를 들어, 전형적인 IgG1 단클론성 항체는 하나의 표적 항원에 대해서 특이적이다. 2가 항체는 2개의 상이한 항원을 표적화하는 하나의 항원 결합 도메인 또는 하나의 항원을 표적화하는 2개의 항원 결합 도메인이다. 유사하게, 3가 항체는 단일 항원에 대해서 3개의 표적화 도메인을 갖는 단일특이적 항체일 수 있다. 3가 항체는, 그것이 2개의 결합 도메인을 갖는 제1 항원 및 또 다른 결합 도메인을 갖는 제2 항원에 결합하는 경우 이중특이적일 수 있다. 3가 항체는 삼중특이적일 수 있고 3개의 상이한 표적에 결합할 수 있다.

[0114] 용어 "특이성"은 제공된 표적 항원(예를 들어, 인간 표적 항원)에 특이적으로 결합하는(예를 들어, 면역반응하는) 능력을 지칭한다. 결합 폴리펩티드는 단일특이적일 수 있고, 표적에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 결합 부위를 함유할 수 있거나, 폴리펩티드는 다중특이적일 수 있고, 동일하거나 상이한 표적에 특이적으로 결합하는 2개 이상의 결합 부위를 함유할 수 있다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 동일 표적의 2개의 상이한(예를 들어, 중첩되지 않는) 부분에 특이적이다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 1개 초과 표적에 특이적이다. 중앙 세포 상에서 발현되는 항원에 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 예시적 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항체)는 당 분야에 공지되어 있으며, 상기 항체로부터의 하나 이상의 CDR이 본 명세서에 기재된 항체에 포함될 수 있다.

[0115] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "항원" 또는 "표적 항원"은 결합 폴리펩티드의 결합 부위에 의해 결합될 수 있는 분자 또는 분자의 일부를 지칭한다. 표적 항원은 하나 이상의 에피토프를 가질 수 있다.

- [0116] 용어 "약" 또는 "대약"은 주어진 값 또는 범위의 약 20% 이내, 예컨대 약 10% 이내, 약 5% 이내, 또는 약 1% 이하 이내를 의미한다.
- [0117] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "투여하다" 또는 "투여"는, 예컨대 비제한적으로 폐(예를 들어, 흡입), 점막(예를 들어, 비강내), 피내, 정맥내, 근육내 전달 및/또는 본 명세서에서 기재되거나 당분야에 알려진 임의의 다른 물리적 전달 방법에 의해, 신체 밖에 존재하는 물질(예를 들어, 본 명세서에서 제공되는 단리된 결합 폴리펩티드)을 환자 내로 주사하는 행위 또는 달리 물리적으로 전달하는 행위를 나타낸다. 질환 또는 이의 증상이 관리 또는 치료 중에 있을 때, 물질의 투여는 전형적으로 질환 또는 이의 증상의 발병 후에 일어난다. 질환 또는 이의 증상이 예방 중인 경우, 물질의 투여는 전형적으로 질환 또는 이의 증상의 발병 전에 일어나며, 만성적으로 계속되어 질환-관련 증상의 출현 또는 크기를 지연 또는 감소시킬 수 있다.
- [0118] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "조성물"은, 선택적으로, 명시된 양으로 명시된 성분(예를 들어, 본 명세서에서 제공되는 단리된 결합 폴리펩티드)을 함유하는 제품뿐만 아니라, 선택적으로, 명시된 양으로 명시된 성분들의 조합으로부터 직접적으로 또는 간접적으로 생성되는 임의의 제품을 포괄하는 것으로 의도된다.
- [0119] "유효량"은 작용제를 필요로 하는 개체에서 요망되는 생리적 결과를 달성하기 충분한 활성 약제학적 작용제(예를 들어, 본 개시내용의 단리된 결합 폴리펩티드)의 양을 의미한다. 유효량은 치료받을 개체의 건강 및 신체 상태, 치료받을 개체의 분류학적 그룹, 조성물의 제형, 개체의 의학적 병태의 평가, 및 다른 관련 요인에 따라 개체 간에 다를 수 있다.
- [0120] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "대상체" 및 "환자"는 상호교환가능하게 사용된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 대상체는 포유류, 예컨대 비-영장류(예를 들어, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 래트 등) 또는 영장류(예를 들어, 원숭이 및 인간)일 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에서 사용되는 용어 "대상체"는 척추동물, 예컨대 포유류를 나타낸다. 포유류에는 비제한적으로 인간, 비-인간 영장류, 야생 동물, 길들여지지 않은 동물, 농장 동물, 스포츠 동물, 및 애완동물이 포함된다.
- [0121] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "요법"은 질환 또는 이와 관련된 증상의 예방, 관리, 치료 및/또는 개선에 사용될 수 있는 임의의 프로토콜, 방법 및/또는 약제를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 용어 "요법"은 대상체에서 감염 또는 이와 관련되는 증상에 대한 면역 반응의 조절에서 사용될 수 있는 임의의 프로토콜, 방법 및/또는 작용제를 나타낸다. 일부 실시형태에서, 용어 "요법들" 및 "요법"은 당업자, 예컨대 의료인에게 알려져 있는 질환 또는 이와 관련된 증상의 예방, 관리, 치료 및/또는 개선에 유용한 생물학적 요법, 지지 요법 및/또는 다른 요법을 지칭한다. 다른 실시형태에서, 용어 "요법들" 및 "요법"은 당업자, 예컨대 의료인에게 알려져 있는 대상체에서의 감염 또는 이와 관련되는 증상에 대한 면역 반응의 조절에 유용한 생물학적 요법, 지지 요법 및/또는 다른 요법을 나타낸다.
- [0122] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 하나 이상의 요법의 시행(비제한적으로 하나 이상의 예방제 또는 치료제, 예컨대 본 명세서에서 제공되는 단리된 결합 폴리펩티드의 투여가 포함됨)으로 인한, 질환 또는 이와 관련되는 증상의 진행, 중증도, 및/또는 지속기간의 감소 또는 완화를 나타낸다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치료하는"은 또한 치료받는 대상체의 질환 경과를 변경하는 것을 지칭할 수 있다. 치료의 치료 효과는 제한 없이, 질환의 발생 또는 재발 방지, 증상(들)의 경감, 질환의 직간접적인 병리학적 결과의 감소, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 관해 또는 개선된 예후를 포함한다.
- [0123] **Fc 도메인**
- [0124] 본 개시내용의 특정 양태에서, Fc 도메인, 예를 들어, Fc 도메인 변이체가 제공된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "Fc 영역" 또는 "Fc 도메인"은 과파인 절단 부위(즉, IgG 내의 잔기 216, 중쇄 불변 영역의 첫 번째 잔기는 114로 간주함)의 바로 상류의 힌지 영역에서 시작하여 항체의 C-말단에서 종료되는 중쇄 불변 영역의 일부를 지칭한다. 따라서, 완전한 Fc 영역은 적어도 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함한다.
- [0125] 항체의 Fc 영역은 비-항원 결합에 포함되고, Fc 수용체에 대한 결합에 의해서 효과기 기능을 매개할 수 있다. Fc 수용체들에는, 이들이 인식하는 항체 유형에 기반하여 분류되는 몇몇 상이한 유형이 존재한다. 예를 들어, Fc-감마 수용체(Fc γ R)는 IgG 클래스 항체에 결합하며, Fc-알파 수용체(Fc α R)는 IgA 클래스 항체에 결합하고, Fc-엡실론 수용체(Fc ϵ R)는 IgE 클래스 항체에 결합한다. 신생 Fc 수용체(FcRn)는 *?*항체의 Fc 영역과 상호작용하여 정상적인 리소좀 분해로부터의 구조를 통한 재순환을 촉진한다. Fc γ R은 여러 구성원, 예를 들어 Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa, 및 Fc γ RIIIb를 포함하는 패밀리에 속한다.

- [0126] 본 명세서에서 사용되는 용어 "천연 Fc" 또는 "야생형 Fc"는 단량체 형태이든 다량체 형태이든 항체의 소화로부터 생성되거나 다른 수단에 의해 생산된 비-항원-결합 단편의 서열에 상응하는 분자를 지칭하며, 힌지 영역을 함유할 수 있다. 천연 Fc의 원래의 면역글로불린 공급원은 전형적으로 인간 기원이며, 임의의 면역글로불린, 예컨대 IgG1 및 IgG2일 수 있다. 천연 Fc 분자는 공유(즉, 이황화 결합) 및 비-공유 회합에 의해 이량체 또는 다량체 형태로 연결될 수 있는 단량체 폴리펩티드로 구성된다. 천연 Fc 분자의 단량체 소단위 사이의 분자간 이황화 결합의 수는 클래스(예를 들어, IgG, IgA, 및 IgE) 또는 하위클래스(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, 및 IgA2)에 따라 1개 내지 4개의 범위이다. 천연 Fc의 일례는 IgG의 파파인 분해로부터 생성되는 이황화 결합된 이량체이다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "천연 Fc"는 단량체, 이량체, 및 다량체 형태의 총칭이다.
- [0127] 본 명세서에서 사용되는 용어 "Fc 도메인 변이체", "Fc 변이체" 또는 "변형된 Fc"는 천연/야생형 Fc로부터 변형되지만 FcR에 대한 결합 부위를 여전히 포함하는 분자 또는 서열을 나타낸다. 따라서, 용어 "Fc 변이체"는 비-인간 천연 Fc로부터 인간화된 분자 또는 서열을 포함할 수 있다. 또한, 천연 Fc는 제거될 수 있는 영역을 포함하는데, 이는 상기 영역이 본 명세서에서 기재되는 항체-유사 결합 폴리펩티드에 필요하지 않은 구조적 특징 또는 생물학적 활성을 제공하기 때문이다. 따라서, 용어 "Fc 변이체"는 하나 이상의 천연 Fc 부위 또는 잔기가 결여되어 있거나 하나 이상의 Fc 부위 또는 잔기가 변형된 분자 또는 서열을 포함하고, 이는 하기에 영향을 미치거나 관여된다: (1) 이황화 결합 형성, (2) 선택된 숙주 세포와의 비상용성, (3) 선택된 숙주 세포에서 발현 시 N-말단 이종성, (4) 글리코실화, (5) 보체와의 상호작용, (6) 재생 수용체 이외의 Fc 수용체로의 결합, 또는 (7) 항체-의존성 세포독성(ADCC).
- [0128] 본 명세서에서 사용되는, "효과기-적격 Fc 변이체" 또는 "효과기-적격 폴리펩티드"는 본 명세서에 추가로 기재된 바와 같은 하나 이상의 Fc 효과기 기능을 갖는 Fc 도메인을 지칭한다.
- [0129] 특정 예시적인 실시형태에서, 본 명세서에서 특징으로 하는 Fc 변이체는 야생형 Fc에 비해서 증가된 혈청 반감기, 향상된 FcRn 결합 친화도, 산성 pH에서의 향상된 FcRn 결합 친화도, 향상된 Fc γ RIIIa 결합 친화도 및/또는 유사한 열 안정성 중 하나 이상을 갖는다.
- [0130] Fc γ RIIIa F158, 또는 인간 CD16a-F 수용체, 또는 CD16a^F는, 문헌에서 알로타입 CD16a F158로도 보고된 항체-의존적 세포의 세포독성을 매개하고 158번 위치에서 페닐알라닌(F)을 보유하는 천연 항체의 Fc 영역에 결합하는 CD16 인간 수용체의 단편을 포함하는 폴리펩티드 작제물을 지칭한다.
- [0131] Fc γ RIIIa F158, 또는 인간 CD16a-F 수용체, 또는 CD16a^F는, 문헌에서 알로타입 CD16a F158로도 보고된 항체-의존적 세포의 세포독성을 매개하고 158번 위치에서 페닐알라닌(F)을 보유하는 천연 항체의 Fc 영역에 결합하는 CD16 인간 수용체의 단편을 포함하는 폴리펩티드 작제물을 지칭한다.
- [0132] 본 명세서에서 사용되는 용어 "Fc 도메인"은 본 명세서에 정의된 바와 같은 천연/야생형 Fc 및 Fc 변이체 및 서열을 포괄한다. Fc 변이체 및 천연 Fc 분자와 같이, 용어 "Fc 도메인"에는 전체 항체로부터 소화되든 다른 수단에 의해 생산되든 간에 단량체 또는 다량체 형태의 분자가 포함된다.
- [0133] 특정 예시적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Fc 도메인은 열적으로 안정화된다.
- [0134] 특정 예시적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Fc 도메인은 글리코실화된다(예를 들어, N-연결된 글리코실화를 통해서). 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 예를 들어, 아미노산 서열 NXT 또는 NXS(X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산 잔기임)를 함유하는 N-연결된 글리코실화 모티프에 N-연결된 글리코실화를 포함한다. 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 297에서 글리코실화된다.
- [0135] 특정 예시적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Fc 도메인은 효과기-적격이다.
- [0136] 특정 예시적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Fc 도메인은 열적으로 안정화된, 글리코실화된, 및 효과기-적격의 임의의 조합이다.
- [0137] **열적으로 안정화된 Fc 도메인 변이체**
- [0138] 불변 항체 도메인의 구조는 루프 및 짧은 나선으로 연결된 β -가닥으로 이루어진 가변 도메인의 구조와 유사하다. 중 불변 영역의 CH2 도메인은 다른 도메인에서 나타나는 광범위한 쇠간 상호작용과 대조적으로 약한 탄수화물 매개 쇠간 단백질-단백질 상호작용을 나타낸다. 단리된 뮤린 CH2 도메인은 생리학적 온도에서 상대적으로 불안정하지만(Feige *et al.*, 2004, *J. Mol. Biol.* 344:107-118), 이전의 노력에서는 CH2 도메인의 열안정성이 쇠

내 이황화 결합의 첨가로 향상될 수 있고, 이것이 결합체를 위한 스캐폴드로서 사용될 수 있음을 입증한다(Gong *et al.*, 2009, *J. Biol. Chem.* 284:14203-210).

- [0139] 야생형 Fc 도메인에 비해 증가된 열적 불안정성(즉, 감소된 열 안정성)을 나타내는 효과기-향상 Fc 도메인 변이체가 알려져 있다. 예를 들어, S239D/I332E 및 S239D/I332E/A330L 변이체는 시차 주사 열량계(DSC) 분석에서 용융 온도(T_m)가 낮아지는 것으로 나타난 바와 같이 CH2 도메인의 안정성이 감소한다. G236A/S239D/A330L/I332E는 야생형에 비해서 단백질 열 이동 측정치가 감소했을 뿐만 아니라 hFc γ R 트랜스제닉 마우스에서 반감기가 상당히 감소하였다(검토를 위해 문헌[Liu *et al.* (2014) *J. Biol. Chem.* 289(6): 3571] 및 문헌[Liu *et al.* (2020) *Antibodies* 9(4): 64] 참조).
- [0140] 야생형에 비해 안정성이 크게 감소되지 않은 개선된 Fc γ R 결합을 갖는 효과기-향상 Fc 도메인 변이체가 알려져 있다(예를 들어, Igawa 등의 EP 2 940 135, 예를 들어, 실시예 10 참조).
- [0141] Fc 도메인에 하나 이상의 이황화 결합을 도입함으로써 열적으로 안정화된 Fc 도메인 변이체가 생성될 수 있다는 것이 추가로 밝혀져 있다. 따라서, 일 양태에서, 본 개시내용은 하나 이상의 조작된(예를 들어, 비-천연) 이황화 결합, 예를 들어, 하나 이상의 시스테인 쌍에 의해 매개되는 쇠내 이황화 결합을 포함하는 Fc 도메인 변이체를 제공한다.
- [0142] 특정 예시적인 실시형태에서, 이황화 결합은 Fc 도메인의 2개의 CH2 영역 사이의 쇠내 이황화 결합이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 이황화 결합은 Fc 도메인의 2개의 CH3 영역 사이의 쇠내 이황화 결합이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 2개 이상의 쇠내 이황화 결합은 Fc 도메인의 2개의 CH2 영역 사이 및/또는 Fc 도메인의 2개의 CH2 영역 사이에 존재한다.
- [0143] Fc 도메인(예를 들어, 결합 폴리펩티드가 있거나 없는 Fc 도메인)의 열 안정성 및 언폴딩 경향은 당업계에서 공지된 다양한 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 언폴딩 또는 변성 온도는 나노-형식 시차 주사 열량계(nanoDSC) 또는 나노-형식 시차 주사 형광계(nanoDSF)에 의해 측정될 수 있다(Wen *et al.*, 2020 *Anal. Biochem.* 593:113581). 단백질이 언폴딩을 시작하는 검출 가능한 온도는 Tonset이다. 본 명세서에서 사용되는, 용어 "T_m"은 분자의 녹는점을 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는, 용어 "T_{m1}"은 본 개시내용의 Fc 도메인의 언폴딩 온도, 특히 CH2 도메인의 전개 온도를 지칭한다.
- [0144] 특정 예시적인 실시형태에서, 열적으로 안정화된 Fc 도메인(예를 들어, 하나 이상의 조작된 이황화 결합을 가짐)의 Tonset은 열적으로 안정화되지 않은 Fc 도메인 변이체에 비해 증가된다. 특정 예시적인 실시형태에서, 열적으로 안정화된 Fc 도메인 변이체의 Tonset은 열적으로 안정화되지 않은 Fc 도메인 변이체에 비해서 약 1.0 °C, 약 1.5°C, 약 2.0°C, 약 2.5°C, 약 3.0°C, 약 3.5°C, 약 4.0°C, 약 4.5°C, 약 5.0°C, 약 5.5°C, 약 6.0°C, 약 6.5°C, 약 7.0°C, 약 7.5°C, 약 8.0°C, 약 8.5°C, 약 9.0°C, 약 9.5°C, 약 10.0°C, 약 10.5°C, 약 11.0°C, 약 11.5°C, 약 12.0°C, 약 12.5°C, 약 13.0°C, 약 13.5°C, 약 14.0°C, 약 14.5°C, 약 15.0°C, 약 15.5°C, 약 16.0°C, 약 16.5°C, 약 17.0°C, 약 17.5°C, 약 18.0°C, 약 18.5°C, 약 19.0°C, 약 19.5°C, 약 20.0°C, 약 20.5°C, 약 21.0°C, 약 21.5°C, 약 22.0°C, 약 22.5°C, 약 23.0°C, 약 23.5°C, 약 24.0°C, 약 24.5°C 또는 약 25.0°C만큼 증가된다.
- [0145] 특정 예시적인 실시형태에서, 열적으로 안정화된 Fc 도메인 변이체는 EU 넘버링에 따라서, 아미노산 위치 242 및 334; 아미노산 위치 240 및 334; 아미노산 위치 287 및 306; 아미노산 위치 292 및 302; 아미노산 위치 323 및 332; 아미노산 위치 259 및 306; 아미노산 위치 350 및 441; 아미노산 위치 343 및 431; 아미노산 위치 375 및 404; 아미노산 위치 375 및 396; 및 아미노산 위치 348 및 439에서의 시스테인 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환 쌍을 갖는다(예를 들어, 검토를 위해서 문헌[Wozniak-Knopp *et al.*, 2012, *PLoS One* 7: e30083; Jacobsen *et al.*, 2017 *J. Biol. Chem.* 202:1865-75]; W02014153063 참조).
- [0146] 특정 예시적인 실시형태에서, 열적으로 안정화된 Fc 도메인 변이체는 EU 넘버링에 따라서 (i) 아미노산 위치 242의 류신(L) 및 아미노산 위치 334의 리신(K); (ii) 아미노산 위치 287의 알라닌(A) 및 아미노산 위치 306의 류신(L); 또는 (iii) 아미노산 위치 292의 아르기닌(R) 및 아미노산 위치 302의 발린(V) 대신 치환된 시스테인(C)의 쌍에 의해서 매개된 조작된(예를 들어, 비-천연) 쇠내 이황화 결합을 포함한다.
- [0147] 특정 예시적인 실시형태에서, 열적으로 안정화된 Fc 도메인 변이체는 아미노산 위치 242의 류신(L) 및 아미노산 위치 334의 리신(K) 대신 치환된 시스테인 쌍에 의해서 매개된 조작된(예를 들어, 비-천연) 쇠내 이황화 결합을 포함한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 열적으로 안정화된 Fc 도메인 변이체는 아미노산 위치 287의 알라닌(A) 및 아미노산 위치 306의 류신(L) 대신 치환된 시스테인 쌍에 의해서 매개된 조작된(예를 들어, 비-천연) 쇠내

이황화 결합을 포함한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 열적으로 안정화된 Fc 도메인 변이체는 아미노산 위치 292의 아르기닌(R) 및 아미노산 위치 302의 발린(V) 대신 치환된 시스테인 쌍에 의해서 매개된 조작된(예를 들어, 비-천연) 쇠내 이황화 결합을 포함한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 열적으로 안정화된 Fc 도메인 변이체는 적어도 하나의 조작된 쇠내 이황화 결합을 포함할 수 있다. 특정 예시적인 실시형태에서, 열적으로 안정화된 Fc 도메인 변이체는 하나 초과인 쇠내 이황화 결합을 포함할 수 있다.

[0148] **효과기-항상 Fc 도메인 변이체**

[0149] 일 양태에서, 본 개시내용은 효과기-항상 아미노산 치환을 포함하는 Fc 도메인 변이체를 제공한다.

[0150] 일 실시형태에서, 변경된 Fc γ R111a 결합을 갖는 Fc 도메인 변이체는 본 명세서에 개시된 바와 같은 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일 실시형태에서, 향상된 Fc γ R111a 결합 친화도를 갖는 Fc 도메인 변이체는 본 명세서에 개시된 바와 같은 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는다. 일 실시형태에서, 향상된 Fc γ R111a 결합 친화도를 갖는 Fc 도메인 변이체는 본 명세서에 개시된 바와 같은 2개 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일 실시형태에서, 향상된 Fc γ R111a 결합 친화도를 갖는 Fc 도메인 변이체는 본 명세서에 개시된 바와 같은 3개 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일 실시형태에서, 향상된 Fc γ R111a 결합 친화도를 갖는 Fc 도메인 변이체는 본 명세서에 개시된 바와 같은 4개 이상의 아미노산 치환을 포함한다.

[0151] 일 실시형태에서, 변경된 FcRn 결합을 갖는 Fc 도메인 변이체는 본 명세서에 개시된 바와 같은 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 Fc 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 향상된 FcRn 결합 친화도를 갖는 Fc 도메인 변이체는 본 명세서에 개시된 바와 같은 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 Fc 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 향상된 FcRn 결합 친화도를 갖는 Fc 도메인 변이체는 본 명세서에 개시된 바와 같은 2개 이상의 아미노산 치환을 갖는 Fc 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 향상된 FcRn 결합 친화도를 갖는 Fc 도메인 변이체는 본 명세서에 개시된 바와 같은 3개 이상의 아미노산 치환을 갖는 Fc 도메인을 포함한다.

[0152] 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 중-특이적 FcRn 결합 친화도를 나타낼 수 있다. 일 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 인간 FcRn 결합 친화도를 나타낼 수 있다. 일 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 cyno FcRn 결합 친화도를 나타낼 수 있다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 교차-종 FcRn 결합 친화도를 나타낼 수 있다. 이러한 Fc 도메인 변이체는 하나 이상의 상이한 종에 걸쳐서 교차-반응성이라고 한다. 일 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 인간 및 cyno FcRn 결합 친화도 둘 다를 나타낼 수 있다.

[0153] 신생 Fc 수용체(FcRn)는 항체의 Fc 영역과 상호작용하여 정상적인 리소좀 분해의 구조를 통한 재순환을 촉진한다. 이 과정은 산성 pH(예를 들어, pH 6.5 미만)에서 엔도솜에서 발생하지만 혈류의 생리학적 pH 조건(예를 들어, 비-산성 pH) 하에서는 발생하지 않는 pH 의존적 과정이다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 야생형 Fc 도메인에 비해서 산성 pH에서 향상된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 야생형 Fc 도메인에 비해서 7 미만의 pH에서, 예를 들어, 약 pH 6.5, 약 pH 6.0, 약 pH 5.5, 약 pH 5.0에서 향상된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 상승된 비-산성 pH에서 야생형 Fc 도메인의 FcRn 결합 친화도에 비해서, 7 미만의 pH, 예를 들어, 약 pH 6.5, 약 pH 6.0, 약 pH 5.5, 약 pH 5.0에서 향상된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 상승된 비-산성 pH는 예를 들어, 7 초과인 pH, 약 pH 7, 약 pH 7.4, 약 pH 7.6, 약 pH 7.8, 약 pH 8.0, 약 pH 8.5, 약 pH 9.0일 수 있다.

[0154] 특정 실시형태에서, Fc 도메인 변이체가 야생형 Fc 도메인에 비해서 비-산성 pH에서 대략 동일한 FcRn 결합 친화도를 나타내는 것이 바람직할 수 있다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체가 EU 넘버링에 따라서 이중 아미노산 치환 M428L/N434S를 갖는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드보다 비-산성 pH에서 더 낮은 FcRn 결합 친화도를 나타내는 것이 바람직할 수 있다(USPN 8,088,376 참조). 따라서, Fc 도메인 변이체가 pH-의존적 FcRn 결합에 대한 최소한의 변화를 나타내는 것이 바람직할 수 있다.

[0155] 일부 실시형태에서, 산성 pH에서 향상된 FcRn 결합 친화도를 갖는 Fc 도메인 변이체는 야생형 Fc 도메인에 비해서 감소된(즉, 더 느린) FcRn 오프-레이트를 갖는다. 일부 실시형태에서, 상승된 비-산성 pH에서 결합 폴리펩티드의 FcRn 결합 친화도에 비해서 산성 pH에서 향상된 FcRn 결합 친화도를 갖는 Fc 도메인 변이체는 상승된 비-산성 pH에서 야생형 Fc 도메인의 FcRn 오프-레이트에 비해서 산성 pH에서 더 느린 FcRn 오프-레이트를 갖는다.

[0156] 특정 실시형태는 대략 동일한 면역원성의 완전한 변경되지 않은 항체와 비교하는 경우 바람직한 생화학적 특징, 예를 들어, 감소되거나 향상된 효과기 기능, 비-공유적으로 이량체화하는 능력, 종양의 부위에서 국소화시키는 증가된 능력, 감소된 혈청 반감기, 또는 증가된 혈청 반감기를 제공하기 위해 하나 이상의 불변 영역 도메인 중 적어도 하나의 아미노산이 결실되거나 달리 변경된 Fc 도메인 변이체를 포함한다.

- [0157] 특정 다른 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 상이한 항체 이소형으로부터 유래된 불변 영역(예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 중 둘 이상으로부터의 불변 영역)을 포함한다. 다른 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 키메라 힌지(즉, 상이한 항체 이소형의 힌지 도메인, 예를 들어, IgG4 분자로부터의 상부 힌지 도메인 및 IgG1 중간 힌지 도메인으로부터 유래된 힌지 부분을 포함하는 힌지)를 포함한다. 특정 실시형태에서, Fc 도메인은 당분야에 알려진 기법을 사용하여 효과기 기능을 증가시키거나 감소시키기 위해 돌연변이될 수 있다.
- [0158] 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 Fc 수용체에 대한 변경된 결합 친화도를 갖는다. Fc 수용체들에는, 이들이 인식하는 항체 유형에 기반하여 분류되는 몇몇 상이한 유형이 존재한다. 예를 들어, Fc-감마 수용체(Fc γ R)는 IgG 클래스 항체에 결합하며, Fc-알파 수용체(Fc α R)는 IgA 클래스 항체에 결합하고, Fc-엡실론 수용체(Fc ϵ R)는 IgE 클래스 항체에 결합한다. Fc γ R은 여러 구성원, 예를 들어 Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa, 및 Fc γ RIIIb를 포함하는 패밀리에 속한다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 변경된 야생형 Fc 도메인에 비해서 Fc γ RIIIa 결합 친화도를 갖는다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 감소된 야생형 Fc 도메인에 비해서 Fc γ RIIIa 결합 친화도를 갖는다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 향상된 야생형 Fc 도메인에 비해서 Fc γ RIIIa 결합 친화도를 갖는다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체 변형된 Fc 도메인에 야생형 Fc 도메인에 비해서 대략 동일한 Fc γ RIIIa 결합 친화도를 갖는다.
- [0159] 특정 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 하나 이상의 효과기 기능을 매개하는 항체 불변 영역(예를 들어, IgG 불변 영역, 예를 들어, 인간 IgG 불변 영역, 예를 들어, 인간 IgG1 불변 영역)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체 불변 영역에 대한 C1-복합체의 결합은 보체 시스템을 활성화할 수 있다. 보체 시스템의 활성화는 세포 병원체의 흡소닌화 및 용해에 중요하다. 보체 시스템의 활성화는 또한 염증성 반응을 자극하고 자가면역 과민증에도 관여될 수 있다. 또한, 항체는 Fc 도메인(세포 상의 Fc 수용체(FcR)에 결합하는 항체 Fc 영역 상의 Fc 수용체 결합 부위)을 통해 다양한 세포 상의 수용체에 결합한다. IgG(감마 수용체), IgE(엡실론 수용체), IgA(알파 수용체), 및 IgM(뮤 수용체)이 포함되는 상이한 클래스의 항체에 대해 특이적인 다수의 Fc 수용체가 존재한다. 세포 표면 상의 항체 Fc 수용체에 대한 항체의 결합은 항체-코팅 입자의 포획 및 파괴, 면역 복합체의 제거, 킬러 세포에 의한 항체-코팅 표적 세포의 용해(항체-의존적 세포-매개 세포독성, 또는 ADCC로 불림), 염증성 매개체의 방출, 태반 이동 및 면역글로불린 생산의 제어가 포함되는 다수의 중요하고 다양한 생물학적 반응을 유발한다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체, 예를 들어, 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항체 또는 면역접착 이뮤노어드헤신(immunoadhesin))는 Fc-감마 수용체에 결합한다. 대안적인 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 하나 이상의 효과기 기능(예를 들어, ADCC 활성화)이 없고/거나 Fc γ 수용체에 결합할 수 없는 불변 영역을 포함한다.
- [0160] 특정 예시적인 실시형태에서, 효과기-향상 Fc 도메인 변이체는 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 221의 아스파르트산(D); 아미노산 위치 222의 시스테인(C); 아미노산 위치 234의 티로신(Y); 아미노산 위치 236의 알라닌(A); 아미노산 위치 236의 트립토판(W); 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D); 아미노산 위치 243의 류신(L); 아미노산 위치 267의 글루탐산(E); 아미노산 위치 268의 페닐알라닌(F); 아미노산 위치 292의 프롤린(P); 아미노산 위치 298의 알라닌(A); 아미노산 위치 300의 류신(L); 아미노산 위치 305의 이소류신(I); 아미노산 위치 324의 트레오닌(T); 아미노산 위치 326의 트립토판(W); 아미노산 위치 326의 알라닌(A); 아미노산 위치 330의 류신(L); 아미노산 위치 332의 글루탐산(E); 아미노산 위치 333의 알라닌(A); 아미노산 위치 333의 세린(S); 아미노산 위치 334의 알라닌(A); 아미노산 위치 336의 알라닌(A); 아미노산 위치 345의 아르기닌(R); 및 아미노산 위치 396의 류신(L)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는다. (검토를 위해서 문헌[Saunders, 2009, *Front. Immunol.* doi: 10.3389/fimmu.2019.01296] 참조)
- [0161] 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236, 239, 330 및 332로부터 선택된 위치에 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 치환은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 239의 아스파르트산(D), 아미노산 위치 330의 류신(L) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 239의 아스파르트산(D), 아미노산 위치 330의 류신(L) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)으로부터 선택된 임의의 2개의 아미노산 위치에 이중 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 239의 아스파르트산(D), 아미노산 위치 330의 류신(L) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)으로부터 선택된 임의의 3개의 아미노산 위치에 삼중 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 239의 아스파르트산(D), 아미노산 위치 330의 류신(L) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)으로부터 선택된 임의의 4개의 아미노산 위치에 사중 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 아미노산 239의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)을 포함하는 아미노산 치환의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, Fc

도메인 변이체는 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 위치의 아스파르트산(D) 및 위치 332의 글루탐산을 포함하는 아미노산 치환의 조합을 포함할 수 있다.

[0162] 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 256 및/또는 307에 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 아미노산 위치 256의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307의 글루타민(Q)을 포함하는 아미노산 치환의 조합을 포함할 수 있다(전문이 본 명세서에 참조에 의해 포함된 문헌[Mackness *et al.*, 2019 *MAbs* 11:1276-88]; WO 2019147973A1 참조).

[0163] **글리코실화된 Fc 도메인 변이체**

[0164] 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 글리코실화된다. 불변 영역의 보존된 위치에서 항체의 글리코실화는 항체 기능, 특히 상기에 기재된 것과 같은 효과기 기능에 상당한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 예를 들어 문헌[Boyd *et al* (*Mol. Immunol.*, 32: 1311-1318, 1996)] 참조). 하나 이상의 탄수화물 모이어티가 첨가, 치환, 결실 또는 변형된 본 발명의 Fc 도메인 변이체의 글리코실화가 고려된다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인의 글리코실화는 N-연결된 글리코실화이다. 아스파라긴-X-세린 또는 아스파라긴-X-트레오닌 모티프의 도입은 탄수화물 모이어티의 효소적 부착을 위한 잠재적인 부위를 생성하므로 Fc 도메인 변이체의 글리코실화를 조장하는 데 사용될 수 있다. 문헌[Raju *et al.* (*Biochemistry* 40: 8868-8876, 2001)에서, TNFR-IgG 이뮤노어드헤신의 말단 시알릴화는 β -1,4-갈락토실트랜스퍼라제 및/또는 알파, 2,3 시알릴트랜스퍼라제를 사용한 재갈락토실화 및/또는 재시알화 과정을 통해 증가되었다. 말단 시알릴화의 증가는 면역글로불린의 반감기를 증가시키는 것으로 여겨진다.

[0165] 대부분의 당단백질과 마찬가지로 항체는 전형적으로 글리코펩의 혼합물로서 생성된다. 이 혼합물은 항체가 진핵 생물, 특히 포유동물 세포에서 생산될 때 특히 분명하다. 정의된 글리코펩을 제조하기 위한 다양한 방법이 개발되어 있다(예를 들어, 문헌[Zhang *et al.* 2004, *Science* 303: 371; Sears *et al.*, 2001, *Science* 291: 2344; Wacker *et al.*, 2002, *Science* 298: 1790; Davis *et al.* 2002, *Chem. Rev.*102: 579; Hang *et al.*, 2001, *Acc. Chem. Res.* 34: 727] 참조). 일부 실시형태에서, 글리코실화된 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 297에 천연 글리칸을 포함한다. IgG1의 CH2 도메인의 아미노산 위치 297에서 아스파라긴의 글리코실화는 Fc 도메인과 Fc γ R 사이의 상호작용을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 이 글리코실화 부위의 제거는 효과기 기능을 제거한다(Leabman, *et al.*, 2013, *MAbs* 5:896-903). 특히 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따라서 아미노산 위치 297에서 야생형 수준 또는 야생형 수준에 가까운 글리코실화를 포함한다.

[0166] 일부 실시형태에서, 글리코실화된 Fc 도메인 변이체는 조각된 또는 비-천연 글리칸을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조각된 또는 비-천연 글리칸은 치료용 분자(예를 들어, 항체-약물 접합체)에 접합될 수 있는 변형된 글리칸이다.

[0167] **향상된 생체내 안정성을 갖는 Fc 도메인 변이체**

[0168] 일 양태에서, 본 개시내용은 향상된 생체내 안정성(예를 들어, 향상된 혈청 반감기 또는 감소된 청소율)을 포함하는 단리된 Fc 도메인 변이체를 제공한다. 본 명세서에서 사용되는, 용어 "생체내 안정성"은 온전하고(예를 들어, 제한된 분해 및/또는 언폴딩), 기능성(예를 들어, 결합 활성 유지)으로 유지되고, 측정 가능한 활성(예를 들어, 표적 종양- 세포 사멸)을 도출하기에 충분히 높은 농도로 혈청에서 유지되는 본 발명에 개시된 효과기-적격 폴리펩티드의 안정성을 지칭한다. 특정 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인에 비해서 개선된 생체내 안정성을 갖는다. 특정 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인에 비해서 감소된 생체내 청소율을 갖는다.

[0169] 본 명세서에서 사용되는, 용어 "혈청 반감기"는 물질(예를 들어, 단리된 Fc 도메인 변이체)이 혈청 내의 최대 농도에서 상기 혈청 내 최대 농도의 절반이 되는 데 걸리는 시간을 지칭한다. 혈청 반감기는 FcRn에 대한 향상된 결합 친화도를 통해 부분적으로 향상될 수 있다. 특정 예시적인 실시형태에서, 단리된 효과기-적격 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인에 비해서 상기 FcRn에 대한 향상된 결합 친화도를 갖는다.

[0170] 생체내 안정성, 혈청 반감기 및 청소율은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 결정될 수 있다(문헌[Valente, *et al.*, 2020 *MAbs* 12:13 <https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1829337>] 참조). 예로서, 약동학(PK) 분석을 수행하기 위해 실시예 7에 언급된 방법이 사용될 수 있다.

[0171] **Fc-함유 결합 폴리펩티드**

[0172] 일 양태에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 결합 도메인(예를 들어, 적어도 하나의 결합 폴리펩티드)을 포함하

거나 이와 복합체를 이룬(예를 들어, 이와 융합된), 단리된 Fc 도메인 변이체를 제공한다. 특정 실시형태에서, 결합 도메인은 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 항원 결합 도메인은 모 Fc 도메인과 동일한 분자로부터 유래될 필요는 없다. 특정 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 항체에 존재한다.

[0173] 일 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 항체에 존재하거나 항체와 복합체화된다. 임의의 소스 또는 종으로부터의 임의의 항체가 본 명세서에 개시된 Fc 도메인 변이체와 함께 사용될 수 있다. 적합한 항체에는 비제한적으로 키메라 항체, 인간화 항체, 또는 인간 항체가 포함된다. 적합한 항체에는 전장 항체, 단클론성 항체, 다클론성 항체, 또는 VHH 항체와 같은 단일 도메인 항체를 제한없이 포함한다.

[0174] 예시적인 특정 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 항체의 항원 결합 단편에 결합되거나 이와 복합체를 형성할 수 있다. 용어 "항원 결합 단편"은 항원에 결합하거나, 항원 결합(즉, 특이적 결합)에 대해 온전한 항체(즉, 항원 결합 단편이 유래되는 온전한 항체)와 경쟁하는 면역글로불린 또는 항체의 폴리펩티드 단편을 지칭한다. 항원 결합 단편은 당업계에 잘 알려진 재조합 또는 생화학적 방법에 의해 생성될 수 있다. 예시적 항원 결합 단편에는 Fv, Fab, Fab', 및 (Fab')₂가 포함된다. 예시적인 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 적어도 하나의 항원 결합 단편 및 Fc 도메인 변이체를 포함한다.

[0175] 일부 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 단일쇄 가변 영역 서열(ScFv)을 포함한다. 단일쇄 가변 영역 서열은 하나 이상의 항원 결합 부위, 예를 들어, 가요성 링커에 의해 VH 도메인에 연결된 VL 도메인을 갖는 단일 폴리펩티드를 포함한다. ScFv 분자는 VH-링커-VL 배향 또는 VL-링커-VH 배향으로 작제될 수 있다. 항원 결합 부위를 구성하는 VL 및 VH 도메인을 연결하는 가요성 힌지는 약 10개 내지 약 50개의 아미노산 잔기를 포함한다. 연결 펩티드는 당업계에 알려져 있다. 결합 폴리펩티드는 적어도 하나의 scFv 및/또는 적어도 하나의 불변 영역을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 Fc 도메인 변이체에 연결되거나 융합된 적어도 하나의 scFv를 포함할 수 있다.

[0176] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 항체를 암호화하는 DNA 서열과 ScFv 분자(예를 들어, 변경된 ScFv 분자)를 융합시킴으로써 생성되는 다가(예를 들어, 4가) 항체이다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 이들 서열은 ScFv 분자(예를 들어, 변경된 ScFv 분자)가 이의 N-말단 또는 C-말단에서 가요성 링커(예를 들어, gly/ser 링커)를 통해 Fc 도메인 변이체에 연결되도록 조합된다. 다른 실시형태에서, 본 개시내용의 4가 항체는 Fc 도메인 변이체에 융합된 연결 펩티드에 ScFv 분자를 융합하여 ScFv-Fab 4가 분자를 작제함으로써 생성될 수 있다.

[0177] 다른 실시형태에서, 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 변경된 미니바디이다. 본 개시내용의 변경된 미니바디는 연결 펩티드를 통해 Fc 도메인 변이체에 융합된 ScFv 분자를 각각 포함하는 2개의 폴리펩티드 쇠로 구성된 이량체 분자이다. 미니바디는 당업계에 기술된 방법(예를 들어, 미국 특허 제5,837,821호 또는 W094/09817A1호 참조)을 사용하여 ScFv 구성요소를 작제하고, 펩티드 구성요소를 연결함으로써 생성될 수 있다. 다른 실시형태에서, 4가 미니바디가 작제될 수 있다. 4가 미니바디는 2개의 ScFv 분자가 가요성 링커를 이용하여 연결되는 것을 제외하고는 미니바디와 동일한 방식으로 작제될 수 있다. 연결된 scFv-scFv 작제물은 이후 Fc 도메인 변이체에 연결된다.

[0178] 다른 실시형태에서, 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 디아바디(diabody)를 포함한다. 디아바디는 이량체 4가 분자로서, 각각 scFv 분자와 유사한 폴리펩티드를 갖지만, 보통 양 가변 도메인을 연결시키는 짧은(10개 미만, 예를 들어 약 1 내지 약 5개) 아미노산 잔기의 링커를 가져, 동일 폴리펩티드 쇠 상의 VL 및 VH 도메인이 상호 작용할 수 없는 이량체형 4가 분자이다. 대신, 하나의 폴리펩티드 쇠의 VL 및 VH 도메인은 두 번째 폴리펩티드 쇠 상의 VH 및 VL 도메인과 (각각) 상호작용한다(예를 들어, W002/02781호 참조). 본 발명의 디아바디는 Fc 도메인 변이체에 융합된 scFv-유사 분자를 포함한다.

[0179] 또 다른 실시형태에서, 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 VHH 또는 나노바디라고도 지칭되는 단일-도메인 항체(sdAb)를 포함한다. Nanobody®는 Ablynx의 등록 상표이다. VHH는 경쇄가 없는 가변 중쇄 도메인을 포함한다. 통상적인 VH 도메인과 마찬가지로, VHH는 네 개의 FR과 세 개의 CDR을 함유한다. VHH는 통상적인 항체에 비해 장점이 있다. 이들은 IgG 분자보다 약 10배 더 작기 때문에, 적절하게 폴딩된 기능성 VHH가 높은 수율로 시험관 내 발현에 의해서 생산될 수 있다. 추가로, VHH는 매우 안정적이며, 단백질 가수분해효소의 작용에 대해 저항성을 나타낸다. VHH의 특성 및 생산은 문헌[Harmsen and De Haard H J (Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007 November; 77(1):13-22)]에 검토되어 있다.

[0180] 특정 예시적인 실시형태에서, Fc 도메인은 하나 이상의 VHH와 융합된다.

- [0181] 다른 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 동일 폴리펩티드 쇠 상에 하나 이상의 가변 도메인을 연속하여 포함하는 다중특이적 또는 다가 항체, 예를 들어, 탠덤 가변 도메인(tandem variable domain; TVD) 폴리펩티드를 포함한다. 예시적인 TVD 폴리펩티드는 미국 특허 제5,989,830호에 기술된 "이중 헤드" 또는 "이중-Fv" 구성을 포함한다. 이중-Fv 구성에서, 2개의 상이한 항체의 가변 도메인은 2개의 별개의 쇠(하나의 중쇄 및 하나의 경쇄) 상에서 탠덤 배향으로 발현되고, 하나의 폴리펩티드 쇠는 펩티드 링커에 의해 분리된 2개의 VH 도메인을 연속하여 가지며(VH1-링커-VH2), 다른 하나의 폴리펩티드 쇠는 펩티드 링커에 의해 연속하여 연결된 상보적 VL 도메인으로 이루어진다(VL1-링커-VL2). 교차하는 더블 헤드 구성에서, 2개의 상이한 항체의 가변 도메인은 2개의 별개의 폴리펩티드 쇠(하나의 중쇄 및 하나의 경쇄) 상에서 탠덤 배향으로 발현되고, 하나의 폴리펩티드 쇠는 펩티드 링커에 의해 분리된 2개의 VH 도메인을 연속하여 가지며(VH1-링커-VH2), 다른 하나의 폴리펩티드 쇠는 반대 배향으로 펩티드 링커에 의해 연속하여 연결된 상보적 VL 도메인으로 이루어진다(VL2-링커-VL1). "이중-Fv" 형식에 기반하는 추가적인 항체 변이체에는 이중-가변-도메인 IgG(DVD-IgG) 이중특이적 항체(미국 특허 제7,612,181호 참고 및 TBTI 형식(미국 제2010/0226923 A1호 참고)가 포함된다. 일부 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 Fc 도메인 변이체에 융합된 동일 폴리펩티드 쇠 상에 하나 이상의 가변 도메인을 연속하여 포함하는 다중특이적 또는 다가 항체를 포함한다.
- [0182] 다른 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 "더블 헤드" 구성을 기반으로 하는 교차 이중 가변 도메인 IgG(CODV-IgG) 이중특이적 항체를 포함한다(본 명세서에 전체가 참조로 포함되는 US20120251541 A1호 참조).
- [0183] 다른 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 CrossMab 또는 CrossMab-Fab 다중특이적 형식을 포함한다(WO 2009080253호 및 문헌[Schaefer, et al., PNAS (2011), 108: 11187-1191] 참조). CrossMab 형식을 기반으로 하는 항체 변이체는 올바른 쇠 결합을 가능하게 하는 이중특이적 IgG 항체의 한 아암(arm) 내에 항체 도메인의 교차가 있다.
- [0184] 다른 실시형태에서, 글리코실화된 효과기-적합 폴리펩티드는 T세포 관여자 형식의 다중특이적 항체를 포함한다. "T세포 관여자(T-cell engager)"는 중앙 표적 단백질에 대해 유도되는 결합 단백질뿐만 아니라 숙주의 면역계, 보다 구체적으로는 T세포의 세포독성 활성화에 대해 유도되는 결합 단백질을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 단리된 효과기-적합 폴리펩티드는 NK세포 관여자 형식의 다중특이적 항체를 포함한다. "NK 세포 관여자(NK cell engager)"는 활성화 NK세포 수용체, 항원 특이적 표적화 영역, 및 Fc 영역을 표적화하는 단클론성 항체 단편을 포함하는 결합 단백질을 지칭한다(문헌[Gauthier, et al. Cell (2019), 177: 1701-13]).
- [0185] 본 명세서에 기술된 Fc 도메인 변이체를 포함하는 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 알려진 "모" 항체의 CDR 서열 또는 가변 도메인 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 모 항체 및 본 개시내용의 항체는 본 명세서에 개시된 바와 같이 Fc 도메인에 대한 변형을 제외하고는 유사하거나 동일한 서열을 공유할 수 있다.
- [0186] 또 다른 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 치료용 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 치료용 폴리펩티드는 수용체, 리간드 또는 효소일 수 있다. 일부 실시형태에서, 치료용 폴리펩티드는 응고 인자일 수 있다. 일부 실시형태에서, 응고 인자는 FI, FII, FIII, FIV, FV, FVI, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII, FXIII), VWF, 프리칼리크레인, 고분자량 키노젠, 피브로넥틴, 안티트롬빈 III, 헤파린 보인자 II, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 단백질 Z-관련 프로테아제 억제제(ZPI), 플라스미노겐, 알파 2-안티플라스민, 조직 플라스미노겐 활성화자(tPA), 유로키나제, 플라스미노겐 활성화자 억제제-1(PAI-1), 플라스미노겐 활성화자 억제제-2(PAI2), 이의 임의의 지모겐, 이의 임의의 활성화 형태, 및 임의의 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 치료용 폴리펩티드는 성장 인자일 수 있다. 성장 인자는 당업계에 알려진 임의의 성장 인자로부터 선택될 수 있다. 일부 실시형태에서, 성장 인자는 호르몬이고, 다른 실시형태에서, 성장 인자는 사이토카인이다. 일부 실시형태에서, 성장 인자는 케모카인이다. 일부 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 본 발명의 Fc 도메인에 연결된 N-말단 및/또는 the C-말단에 연결된 치료용 분자 또는 치료용 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 Fc-융합 폴리펩티드이다.
- [0187] **핵산 및 벡터**
- [0188] 일 양태에서, 본 명세서에 개시된 Fc 도메인 변이체 및/또는 결합 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드가 제공된다. 이들 폴리뉴클레오티드를 발현하는 단계를 포함하는, Fc 도메인 변이체 및/또는 결합 폴리펩티드를 제조하는 방법도 제공된다.
- [0189] 본 명세서에 개시된 Fc 도메인 변이체 및/또는 결합 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 전형적으로 바람직한 양의 청구된 항체 치료용 폴리펩티드 및 Fc-융합 단백질을 생산하는 데 사용될 수 있는 숙주 세포로의 도입을 위해서 발현 벡터에 삽입된다. 따라서, 특정 양태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 폴리뉴클레오티드

를 포함하는 발현 벡터 및 이러한 벡터 및 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

- [0190] 용어 "벡터" 또는 "발현 벡터"는, 세포 내의 요망되는 유전자 내에 도입되고 이를 발현하는 데 사용되는 벡터를 의미하기 위한, 명세서 및 청구범위의 목적을 위해 본 명세서에서 사용된다. 당업자에게 알려진 바와 같이, 이러한 벡터는 플라스미드, 파지, 바이러스 및 레트로바이러스로 구성되는 군으로부터 용이하게 선택될 수 있다. 일반적으로, 벡터는 선택 마커, 요망되는 유전자의 클로닝을 촉진하기 위한 적절한 제한 부위, 및 진행 또는 원핵 세포에 진입하고/하거나 상기 세포에서 복제되는 능력을 포함할 것이다.
- [0191] 많은 발현 벡터 시스템이 사용될 수 있다. 예를 들어, 한 부류의 벡터는 소 유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 마콜로바이러스, 레트로바이러스(RSV, MMTV, 또는 MOMLV), 또는 SV40 바이러스와 같은 동물 바이러스로부터 유래된 DNA 요소를 활용한다. 다른 것들은 내부 리보솜 결합 부위가 있는 폴리시스트론 시스템의 사용을 포함한다. 또한, 염색체에 DNA를 통합한 세포는 형질주입된 숙주 세포의 선택을 가능하게 하는 하나 이상의 마커를 도입하여 선택될 수 있다. 마커는 영양요구성에 대한 원형양성, 살생물제 내성(예를 들어, 항생제), 또는 구리와 같은 중금속에 대한 내성을 제공할 수 있다. 선별 마커 유전자는 발현될 DNA 서열에 직접 연결되거나, 공동 형질전환에 의해 동일한 세포에 도입될 수 있다. mRNA의 최적 합성을 위해 추가 요소가 필요할 수도 있다. 이러한 요소는 신호 서열, 스플라이스 신호, 뿐만 아니라 전사 프로모터, 인핸서, 및 종결 신호를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 클로닝된 가변 영역 유전자는 위에서 논의된 바와 같이 합성된 중쇄 및 경쇄 불변 영역 유전자(예컨대 인간 유전자)를 따라 발현 벡터 내에 삽입된다.
- [0192] 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 바와 같은 글리코실화된 효과기-적격 폴리펩티드는 폴리시스트론 작제물을 이용하여 발현될 수 있다. 이러한 발현 시스템에서, 단일 폴리시스트론 구성체로부터 항체의 중쇄 및 경쇄와 같은 여러 관심 유전자 산물이 생성될 수 있다. 이들 시스템은 진행 숙주 세포에서 비교적 높은 수준의 폴리펩티드를 제공하기 위해 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 사용하는 것이 유리하다. 양립가능한 IRES 서열이 미국 특허 제6,193,980호에 개시되어 있으며, 이는 본 명세서에 참조로 포함된다. 당업자는 이러한 발현 시스템이 본 출원에 개시된 전체 범위의 폴리펩티드를 효과적으로 생성하는 데 사용될 수 있음을 이해할 것이다.
- [0193] 보다 일반적으로, 일단 본 개시내용의 도메인 변이체 및/또는 결합 폴리펩티드를 인코딩하는 벡터 또는 DNA 서열이 제조되면, 발현 벡터는 적절한 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 즉, 숙주 세포가 형질전환될 수 있다. 플라스미드를 숙주 세포에 도입하는 것은 당업자에게 잘 알려진 다양한 기술에 의해 달성될 수 있다. 여기에는 형질주입(전기영동 및 전기천공 포함), 원형질체 융합, 인산칼슘 침전, 외피 DNA와의 세포 융합, 미세주입, 및 온전한 바이러스 감염이 포함되나 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 문헌[Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Chapter 24.2, pp. 470-472 Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, MA 1988)]을 참고한다. 형질전환된 세포는 경쇄 및 중쇄의 생성에 적합한 조건에서 성장되고, 중쇄 및/또는 경쇄 단백질 합성에 대해 분석된다. 예시적인 분석 기술은 효소결합 면역흡착 측정법(ELISA), 방사면역측정법(RIA), 또는 형광 활성화 세포 분류기 분석(FACS), 면역조직화학 등을 포함한다.
- [0194] 본 명세서에서 사용되는 용어 "형질전환"은 넓은 의미에서, 유전형을 변화시키고 결과적으로 수혜 세포의 변화를 초래하는, 수혜 숙주 세포 내로의 DNA의 도입을 지칭하는 데 사용될 것이다.
- [0195] 같은 방식으로, "숙주 세포"는, 재조합 DNA 기법을 사용하여 작제되고 적어도 하나의 이종성 유전자를 인코딩하는 벡터로 형질전환된 세포를 나타낸다. 재조합 숙주로부터 폴리펩티드를 단리하는 프로세스의 설명에서, 용어 "세포" 및 "세포 배양물"은 달리 명시되지 않는 한, 항체의 공급원을 나타내기 위해 상호교환적으로 사용된다. 즉, "세포"로부터 폴리펩티드의 회수는 회전 침강된(spun down) 전체 세포로부터의 회수, 또는 배지 및 현탁된 세포 둘 모두를 함유하는 세포 배양물로부터의 회수를 의미할 수 있다.
- [0196] 하나의 실시형태에서, Fc 도메인 변이체 및/또는 결합 폴리펩티드의 발현을 위해 사용되는 숙주 세포주는 진핵 생물 또는 원핵생물 기원이다. 하나의 실시형태에서, Fc 도메인 변이체 및/또는 결합 폴리펩티드의 발현을 위해 사용되는 숙주 세포주는 박테리아 기원이다. 하나의 실시형태에서, Fc 도메인 변이체 및/또는 결합 폴리펩티드의 발현을 위해 사용되는 숙주 세포주는 포유동물 기원이다. 당업자는 원하는 유전자 산물이 발현되기에 가장 적합한 특정 숙주 세포주를 결정할 수 있다. 예시적인 숙주 세포주에는 비제한적으로 DG44 및 DUXB11(차이니스 햄스터 난소주, DHFR 음성), HELA(인간 경부암종), CVI(원숭이 신장주), COS(SV40 T 항원을 갖는 CVI의 유도체), R1610(차이니스 햄스터 섬유아세포) BALBC/3T3(마우스 섬유아세포), HAK(햄스터 신장주), SP2/O(마우스 골수종), BFA-1c1BPT(소 내피 세포), RAJI(인간 림프구), 293(인간 신장)이 포함된다. 일 실시형태에서, 세포주는 세포주에서 발현된 항체의 변경된 글리코실화, 예를 들어, 비푸코실화(afucosylation)를 제공한다(예를 들어, PER.C6.RTM. (CruCell) 또는 FUT8-녹아웃 CHO 세포주(POTELLIGENTM 세포)(Biowa, 미국 뉴저지주 프린스

턴 소재)). 하나의 실시형태에서, NSO 세포가 사용될 수 있다. 숙주 세포주는 전형적으로 상업적 서비스인 아메리칸 티슈 컬처 컬렉션(American Tissue Culture Collection) 또는 공개된 문헌으로부터 이용 가능하다.

[0197] 시험관 내 생산은 많은 양의 바람직한 Fc 도메인 변이체 및/또는 결합 폴리펩티드를 제공하기 위한 규모 확대를 가능하게 한다. 조직 배양 조건 하의 포유류 세포 배양 기술은 당업계에 알려져 있으며, 균질한 현탁 배양(예를 들어, 에어리프트 반응기 또는 연속 교반 반응기에서의 배양), 또는 고정화 또는 포획 세포 배양(예를 들어, 중공 섬유, 마이크로캡슐, 아가로스 마이크로비드, 또는 세라믹 카트리지에서 배양)을 포함한다. 필요한 경우 및/또는 원하는 경우, 폴리펩티드 용액은 통상적인 크로마토그래피 방법, 예를 들어 겔 여과, 이온 교환 크로마토그래피, DEAE-셀룰로스 크로마토그래피, 및/또는 (면역-) 친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다.

[0198] 글리코실화된 Fc 도메인 변이체 및/또는 결합 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 유전자는 또한 비-포유동물 세포, 예컨대 박테리아 또는 효모 또는 식물 세포에서 발현될 수 있다. 이와 관련하여, 박테리아와 같은 다양한 단세포 비포유동물 미생물, 즉 배양 또는 발효에서 성장될 수 있는 것들이 또한 형질전환될 수 있음이 이해될 것이다. 형질전환되기 쉬운 박테리아에는 장내세균과, 예컨대 에스체리키아 콜라이(Escherichia coli) 또는 살모넬라(Salmonella) 균주; 간균과, 예컨대 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis); 뉴모코커스(Pneumococcus); 스트렙토코커스(Streptococcus), 및 헤모필러스 인플루엔자(Haemophilus influenzae)의 구성원이 포함된다. 추가로, 박테리아에서 발현되는 경우, Fc 도메인 변이체 및/또는 결합 폴리펩티드는 봉입체의 일부가 될 수 있음이 이해될 것이다. Fc 도메인 변이체 및/또는 결합 폴리펩티드는 단리되고, 정제된 후, 기능성 분자로 조립되어야 한다.

[0199] 원핵생물뿐만 아니라, 진핵 미생물도 사용될 수 있다. 사카로마이세스 세레비지에(Saccharomyces cerevisiae), 또는 일반적인 빵 효모가 진핵 미생물 중에서 가장 일반적으로 사용되지만, 다수의 다른 균주가 일반적으로 이용 가능하다. 사카로마이세스에서의 발현을 위해, 예를 들어, 플라스미드 YRp7(Stinchcomb *et al.*, Nature, 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene, 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, Gene, 10:157 (1980))이 일반적으로 사용된다. 이러한 플라스미드는 이미 트립토판에서 성장하는 능력이 결여된 효모의 돌연변이주, 예를 들어, ATCC 번호 44076 또는 PEP4-1에 대한 선발 마커를 제공하는 TRP1 유전자를 함유한다(문헌[Jones, Genetics, 85:12 (1977)]). 그런 다음, 효모 숙주 세포 계놈의 특성으로서 trp1 손상의 존재는 트립토판의 부재 하에서의 성장에 의해 형질전환을 검출하기 위한 효과적인 환경을 제공한다.

[0200] **사용/치료 방법**

[0201] 일 양태에서, 본 발명은 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 유효량의 본 명세서에 개시된 Fc 도메인 변이체를 투여하는 단계를 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 개시내용은 질환 및 장애의 치료를 필요로 하는 포유동물 대상체에서 질환 및 장애, 예를 들어, 암일 치료하기 위한 키트 및 방법을 제공한다.

[0202] 본 개시내용의 Fc 도메인 변이체는 다수의 다양한 적용에 유용하다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체는 Fc 도메인 변이체의 결합 도메인에 의해 인지되는 에피토프를 갖는 세포를 감소시키거나 제거하는데 유용하다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체는 순환 중의 가용성 항원의 농도를 감소시키거나 가용성 항원을 제거하는데 효과적이다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체는 T-세포 관여자로서 효과적이다. 일 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 종양 크기를 감소시키고/시키거나, 종양 성장을 억제하고/하거나, 종양을 갖는 동물의 생존 기간을 연장시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 개시내용은 또한 효과적인 비독성 양의 Fc 도메인 변이체를 인간 또는 다른 동물에 투여함으로써 인간 또는 다른 동물에서 종양을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0203] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 Fc 도메인 변이체는 감염성 질환, 자가면역 장애, 염증성 장애, 폐 질환, 신경 또는 신경퇴행성 질환, 간 질환, 척추 질환, 자궁 질환, 우울증 장애 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다른 장애의 치료에 유용하다. 감염성 질환의 비제한적인 예는 RNA 바이러스(예를 들어, 오쏘믹소바이러스(orthomyxoviruse)(예를 들어, 인플루엔자), 파라믹소바이러스(paramyxoviruse)(예를 들어, 호흡기 세포융합 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 메타뉴모바이러스), 랩도바이러스(예를 들어, 광견병 바이러스), 코로나바이러스(예를 들어, SARS-CoV), 알파바이러스(예를 들어, 치쿤구니야(Chikungunya) 바이러스) 렌티바이러스(예를 들어, HIV) 등) 또는 DNA 바이러스에 의해 유래되는 질환을 포함한다. 감염성 질환의 예는 또한 예를 들어, 스타필로코커스 아우레우스(Staphylococcus aureus), 스타필로코커스 에피더미디스(Staphylococcus epidermidis), 엔테로코커스(Enterococcus), 스트렙토코커스(Streptococcus), 에스체리키아 콜라이 및 예를 들어, 칸디다 알비칸스(Candida albicans)에 의해서 유발되는 것을 비롯한 다른 감염성 질환을 포함하지만 이들로

제한되지 않는다. 다른 감염성 질환은 말라리아, SARS, 황열병, 라임 보렐리아증, 레슈마니아증, 탄저병 및 수막염을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 예시적인 자가면역 장애는 건선 및 루푸스를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 따라서, 본 개시내용은 예를 들어, 향상된 반감기를 갖는 본 발명의 효과기-적격 폴리펩티드를 사용함으로써 이익을 얻을 수 있는 다양한 병태를 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0204] 당업자는, 악성종양을 치료하기 위해, Fc 도메인 변이체의 효과적인 무독성 양이 얼마일지 일상적인 실험에 의해 결정할 수 있을 것이다. 예를 들어, 본 개시내용의 Fc 도메인 변이체의 치료적 활성량은 질환 상태(예컨대, 단계 I 대 단계 IV), 대상체의 연령, 성별, 의학적 합병증(예컨대, ss면역억제 병태 또는 질환) 및 체중 및 대상체에서 원하는 반응을 유발하는 변형된 항체의 능력과 같은 인자들에 따라 달라질 수 있다. 투여량 요법은 최적 치료 반응을 제공하기 위해 조정될 수 있다. 예를 들어, 몇몇의 나누어진 투여량이 매일 투여될 수 있거나, 치료 상황의 급박함에 의해 지시되는 바에 비례하여 용량이 감소될 수 있다.

[0205] 일반적으로, 본 발명의 개시내용에 제공된 조성물은 Fc 도메인 변이체에 의한 암성 세포의 표적화를 가능케 하는 항원성 마커를 포함하는 임의의 신생물을 예방적 또는 치료적으로 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0206] **약제학적 조성물 및 이의 투여**

[0207] 본 개시내용의 Fc 도메인 변이체를 제조하고 대상체에게 투여하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있거나 당업자에 의해 용이하게 결정된다. 본 개시내용의 결합 폴리펩티드의 투여 경로는 경구, 비경구, 흡입 또는 국소일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "비경구"는 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 피하, 직장 또는 질 투여를 포함한다. 이러한 투여의 형태 모두가 본 개시내용의 범위 내에 있는 것으로 명확히 고려되나, 투여 형태는 특히 정맥내 또는 동맥내 주사 또는 점적주입을 위한 주사용수일 것이다. 보통, 주사에 적합한 약제학적 조성물은 완충액(예를 들어, 아세트이트, 포스페이트, 또는 시트레이트 완충액), 계면활성제(예를 들어, 폴리소르베이트), 선택적으로 안정화제(예컨대, 인간 알부민) 등을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 유해한 세포 모집단 부위로 직접적으로 전달됨으로써 치료제에 대한 이환 조직의 노출을 증가시킬 수 있다.

[0208] 비경구 투여용 제제는 멸균된 수성 또는 비수성 용액, 현탁액, 및 에멀전을 포함한다. 수용성 담체는, 염수 및 완충 매질을 포함하는, 물, 알코올성/수성 용액, 에멀션, 또는 현탁액을 포함한다. 본 발명의 조성물 및 방법에서, 약제학적으로 허용 가능한 담체는 0.01 내지 0.1 M, 예를 들어 0.05 M 포스페이트 완충액 또는 0.8% 염수를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 다른 일반적인 비경구 비히클은 인산나트륨 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화나트륨, 유산화 링거, 또는 고정 오일을 포함한다. 정맥 비히클은 수액 및 영양 보충제, 전해질 보충제, 예컨대 링거 텍스트로스 기반의 것 등을 포함한다. 예를 들어 항균제, 항산화제, 킬레이트제, 및 불활성 기체 등과 같은 보존제 및 기타 첨가제가 또한 존재할 수 있다. 보다 구체적으로, 주사용 용도에 적합한 약제학적 조성물은 멸균 수용액(수용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균 주사용 용액 또는 분산액의 즉석 조제를 위한 멸균 분말을 포함한다. 이러한 경우, 조성물은 멸균되어야 하고, 용이하게 주사기에 주입할 수 있을 정도로 유체여야 한다. 조성물은 제조 및 저장의 조건 하에 안정해야 하고, 전형적으로 박테리아 및 진균류와 같은 미생물의 오염 작용으로부터 보존될 것이다. 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.

[0209] 많은 경우에, 등장화제, 예를 들어, 당, 폴리알코올, 예컨대 만니톨, 소르비톨 또는 염화나트륨이 조성물에 포함될 것이다. 주사용 조성물의 장기간의 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에 포함함으로써 이루어질 수 있다.

[0210] 임의의 경우, 살균 주사용 용액은, 본 명세서에 열거된 성분들 중 하나 또는 상기 성분들의 조합물과 함께, 적절한 용매 내로 활성 화합물(예컨대, 단독의 또는 다른 활성제와 조합된 Fc 도메인 변이체)을 요구되는 양으로 혼입시키고, 요구될 경우, 그 후 여과 살균함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산 매질 및 상기에 열거된 것들로부터 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내로 활성 화합물을 혼입시킴으로써 제조된다. 살균 주사용 용액의 제조를 위한 살균 분말의 경우, 예시적인 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조(이는 이전에 살균 여과된 용액으로부터의 임의의 추가의 원하는 성분 + 활성 성분의 분말을 생성함)를 포함한다. 주사용 제제는 가공되어 앰플, 백, 병, 주사기, 또는 바이알과 같은 용기에 채워지고, 당업계에 알려진 방법에 따라 무균 조건에서 밀봉된다. 또한, 제제는 키트 형태로 패키징되어 판매될 수 있다. 이러한 제조 물품은 전형적으로 연관된 조성물이 자가면역 또는 신생물성 장애를 앓고 있거나 이에 걸리기 쉬운 대상체의 치료에 유용함을 시사하는 표지 또는 패키지 인서트를 가질 것이다.

- [0211] 상기 기재된 병태의 치료를 위한 본 개시내용의 조성물의 유효 용량은 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리학적 상태, 환자가 인간 또는 동물인지의 여부, 투여되는 다른 약물, 및 치료가 예방적 또는 치료적인지의 여부를 포함한 많은 상이한 요인에 따라 다양하다. 통상적으로 환자는 인간이지만, 트랜스제닉 포유동물을 비롯한 비인간 포유동물도 치료가 가능하다. 치료 투여량은 안전성 및 효능을 최적화하기 위해 당업자에게 알려진 일상적인 방법을 사용하여 적정될 수 있다.
- [0212] 본 개시내용의 Fc 도메인 변이체는 다수의 기간에 투여될 수 있다. 단일 용량 사이의 간격은 매주, 매월, 또는 매년일 수 있다. 간격은 또한 환자에서의 Fc 도메인 변이체 또는 항원의 혈중 수준을 측정함으로써 지시되는 바와 같이 불규칙할 수 있다. 일부 방법에서, 투여량은 약 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 일부 방법에서 약 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 혈장 변형된 결합 폴리펩티드 농도를 달성하도록 조정된다. 대안적으로, Fc 도메인 변이체는 서방형 제형으로 투여될 수 있으며, 이 경우 덜 빈번한 투여가 요구된다. 항체의 경우, 투여량과 빈도는 환자의 항체 반감기에 따라 달라진다. 일반적으로, 인간화 항체는 가장 긴 반감기를 보여주며, 키메라 항체 및 비인간 항체가 그 뒤를 잇는다.
- [0213] 투여의 용량 및 빈도는 치료가 예방적인지 치료적인지 여부에 따라 달라질 수 있다. 예방적 적용에서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 이의 카테일을 함유하는 조성물은 환자의 내성을 증강시키기 위해 아직 질환 상태에 있지 않은 환자에게 투여된다. 이러한 양은 "예방적 유효 용량"인 것으로 정의된다. 이러한 용도에서, 정확한 양은, 다시, 환자의 건강 상태 및 일반적인 면역에 의존하지만, 일반적으로 용량당 약 0.1 내지 약 25 mg, 특히 용량당 약 0.5 내지 약 2.5 mg의 범위이다. 상대적으로 낮은 투여량은 장기간에 걸쳐 상대적으로 덜 빈번한 간격으로 투여된다. 일부 환자는 남은 일생 동안 계속 치료를 받는다. 치료적 적용에서, 상대적으로 짧은 간격에서 상대적으로 높은 투여량(예를 들어, 용량당 약 1 내지 400 mg/kg의 항체이며, 약 5 내지 25 mg의 투여량이 방사성 면역 접합체에 더 보편적으로 사용되고 세포독소-약물 변형된 항체에는 더 높은 용량이 사용됨)은 때때로, 질환의 진행이 감소되거나 종료될 때까지 또는 환자가 질환 증상의 부분적 또는 완전한 개선을 보여줄 때까지 필요하다. 그 후, 환자는 예방 요법을 투여받을 수 있다.
- [0214] 본 개시내용의 Fc 도메인 변이체는 임의로 치료(예를 들어, 예방적 또는 치료적 치료)를 필요로 하는 장애 또는 병태를 치료하는 데 효과적인 다른 작용제와 조합하여 투여될 수 있다. 유효 단일 치료 투여량(즉, 치료적 유효량)의 본 개시내용의 ^{90}Y -표지 변형된 항체는 약 5 내지 약 75 mCi, 예컨대 약 10 내지 약 40 mCi 범위이다. ^{131}I -변형된 항체의 효과적인 단일 치료 비-골수 절제 조사량은 약 5 내지 약 70 mCi 또는 약 5 내지 약 40 mCi의 범위이다. ^{131}I -표지 항체의 유효 단일 치료 파괴 투여량(즉, 자가유래 골수 이식을 필요로 할 수 있음)은 약 30 내지 약 600 mCi, 예컨대 약 50 내지 약 500 mCi 미만의 범위이다. 키메라 항체와 관련하여, 무린 항체와 비교하여 더 긴 순환 반감기로 인해, 요오드-131 표지된 키메라 항체의 효과적인 단일 치료 비-골수 절제 조사량은 약 5 내지 약 40 mCi, 예컨대, 약 30 mCi 미만의 범위이다. 예컨대, ^{111}In 표지에 대한 영상화 범주는 통상적으로 약 5 mCi 미만이다.
- [0215] Fc 도메인 변이체는 바로 위에 기재된 바와 같이 투여될 수 있으나, 다른 실시형태에서 폴리펩티드는 일차 치료로서 달리 건강한 환자에게 제공될 수 있음이 강조되어야 한다. 이러한 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 정상적인 또는 평균 적색 골수 비축물을 갖는 환자 및/또는 치료를 받은 적이 없고, 받고 있지 않은 환자에게 투여될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 부가(adjunct) 요법과 함께 또는 조합되어 폴리펩티드의 투여는 요법 및 개시된 항체의 순차적인, 동시, 동연(coextensive), 병행(concurrent), 동반(concomitant), 또는 동시발생적(contemporaneous) 투여 또는 적용을 의미한다. 당업자는, 조합된 치료 계획의 다양한 구성요소의 투여 또는 적용 시간이 치료의 전체 효과성을 증강시키기 위해 조정될 수 있음을 이해할 것이다.
- [0216] 이미 논의된 바와 같이, 본 개시내용의 Fc 도메인 변이체, 항체, 치료용 폴리펩티드 또는 이의 Fc 도메인 변이체-융합 폴리펩티드는 포유동물 장애의 생체내 치료를 위해서 약제학적 유효량으로 투여될 수 있다. 이러한 측면에서, 개시된 Fc 도메인 변이체는 활성제의 투여를 용이하게 하고 안정성을 촉진하기 위해 제형화될 것임이 이해될 것이다.
- [0217] 본 개시내용에 따른 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한, 무독성, 멸균 담체, 예컨대 생리 식염수, 무독성 완충액, 보존제 등을 포함할 수 있다. 본 출원의 목적을 위해, 치료제에 접합되거나 접합되지 않은, Fc 도메인 변이체의 약제학적 유효량은 항원에 대한 효과적인 결합을 달성하고 이익을 달성하기 위해, 예를 들어, 질환 또는 장애의 증상을 개선하기 위해 또는 성분 또는 세포를 검출하기 위해 충분한 양을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 종양 세포의 경우에서, 폴리펩티드는 종양 또는 면역반응성 세포 상의 선택된 항원과 상호작용할 수

있고, 이러한 세포 사멸의 증가를 제공할 것이다. 물론, 본 발명의 개시내용의 약제학적 조성물은 약제학적 유효량의 변형된 결합 폴리펩티드를 제공하기 위해 단일 용량 또는 다용량으로 투여될 수 있다.

[0218] 본 개시내용의 범위와 일관되게, 본 개시내용의 Fc 도메인 변이체는 치료적 또는 예방적 효과를 일으키기에 충분한 양으로 상기 언급된 치료 방법에 따라 인간 또는 다른 동물에게 투여될 수 있다. 본 개시내용의 Fc 도메인 변이체는 본 개시내용의 항체를 종래의 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제와 알려진 기법에 따라 조합함으로써 제조되는 종래의 투여량 형태로 이러한 인간 또는 다른 동물에게 투여될 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제의 형태 및 특징은 그와 조합될 활성 성분의 양, 투여 경로, 및 다른 잘 알려진 변수에 좌우되는 것으로 당업자는 인식할 것이다. 당업자는 추가로, 본 개시내용에 기재된 결합 폴리펩티드의 하나 이상의 종을 포함하는 카테일이 특히 효과적인 것으로 입증될 수 있음을 이해할 것이다.

[0219] 본 명세서에 언급되거나 인용된 논문, 특허 및 특허 출원, 및 모든 다른 문서 및 전자적으로 이용가능한 정보의 내용은 마치 각 개별 간행물이 구체적으로 그리고 개별적으로 참고로 포함된 것으로 표시되는 것과 동일한 정도로 그 전체가 본 명세서에 참고로 포함된다. 본 출원인은 이러한 논문, 특허, 특허 출원 또는 기타 물리적 및 전자 문서의 모든 자료 및 정보를 본 출원 내에 물리적으로 포함시킬 수 있는 권리를 보유한다.

[0220] 본 발명은 이의 특정 실시형태를 참조하여 설명되었지만, 본 발명의 진정한 사상 및 범주를 벗어나지 않으면서 다양한 변화가 이루어질 수 있고 균등물이 치환될 수 있음이 당업자에 의해 이해되어야 한다. 본 명세서에 개시된 실시형태의 범위를 벗어나지 않고 적절한 균등물을 사용하여 본 명세서에 기재된 방법의 다른 적절한 변형 및 응용이 이루어질 수 있다는 것은 당업자에게 명백할 것이다. 또한, 특정 상황, 재료, 물질의 조성, 공정, 공정 단계(들)를 본 발명의 목적, 사상 및 범주에 맞추기 위해 많은 변경이 이루어질 수 있다. 모든 그러한 변경은 첨부된 청구범위의 범주 내에 있는 것으로 의도된다. 이제 특정 실시형태가 상세히 기재되어 하기 실시예를 참조함으로써 더 명확하게 이해될 것이며, 이러한 실시예는 단지 예시 목적을 위해 포함되고 제한적인 것으로 의도되지 않는다.

[0221] **실시예**

[0222] 본 발명은 하기의 실시예에 의해 추가로 예시되며, 이는 추가의 제한으로 간주되어서는 안 된다.

[0223] **실시예1: 증가된 안정성에 대한 이황화 결합의 인실리코 모델 및 식별**

[0224] Fc 도메인의 CH2 영역에서 조작된 이황화 결합의 잠재적인 안정화 효과를 특징규명하기 위해, 분자 역학(MD) 시뮬레이션을 PDB 구조 1HZH로부터 취한 Fc 도메인에 대해 수행하였다. 모든 시스템을 300K 및 370K에서 시뮬레이션하여 열 충격의 영향을 추정하고 그 영역에서 잠재적인 약한 상호작용을 결정하였다. 다음 Fc 변이체에 대해 시뮬레이션을 수행하였다. WT IgG1 Fc 도메인, DE+DQ, ADLE+DQ, DE+DQ+ L242C/K334C, DE+DQ+R292C/V302C, ADLE+DQ+L242C/K334C 및 ADLE+DQ+R292C/V302C. 결과는 300K 또는 370K의 온도에서 잔기 I332E에 대한 소수성 접촉의 평균 빈도(도 1a)뿐만 아니라 각각의 탄소 알파의 평균 제공근 변종(RMSF) 지수로 표현된 돌연변이를 포함하는 영역의 평균 유연성으로 보고되었다(도 1b).

[0225] **결과**

[0226] CH2 도메인에 음전하(I332E)가 도입되면 소수성 접촉 평균 빈도(예를 들어, DQ+DE 및 DQ+ADLE 시스템 - 도 1a)가 손실되고 도메인의 소수성 코어가 붕괴될 가능성이 있다. R292C+V302C 또는 L242C+K334C 돌연변이의 도입은 이러한 접촉을 부분적으로 복원하거나 개선한다.

[0227] DQ 돌연변이의 유연성 지수(RMSF - 도 1b)를 모든 시스템에 대해 모니터링하여 모든 변이체에 대한 반감기 연장에 대한 잠재적 영향을 추정하였다. DQ 돌연변이와 관련하여 I332E 돌연변이를 포함하는 시스템은 위치 256 및 307에서 WT와 관련하여 더 높은 유연성을 나타내는 것으로 보인다. DSB 안정화의 도입은 WT 거동(예를 들어, DQ DE L242C+K334C - 도 1b)에 대한 유연성 지수를 부분적으로 개선시키는 것으로 보인다.

[0228] 도 2는 구조적으로 매우 근접한 I332E(녹색 CPK 렌더링) 및 L242C+K334C 조작된 이황화 결합(주황색 CPK 렌더링)을 사용한 Fc CH2 도메인(라인 - 리본)에 대한 DSB 그래프팅의 예를 도시한다.

[0229] 도 3은 I332(좌측 패널, 점선으로 강조된 소수성 접촉) 및 I332E(우측 패널, 점선으로 강조된 정전기 접촉)에 대한 비공유 결합 네트워크의 예를 도시한다.

[0230] 도 3의 두 영상 사이의 구조적 비교는 I332E 돌연변이가 CH2 도메인의 소수성 코어 내에 음전하를 도입했음을 지적하였다. 이 돌연변이는 소수성 코어 내의 소수성 접촉의 손실을 초래하므로 불량한 열 안정성과 관련하여

잠재적인 추진 현상으로 확인되었다.

- [0231] 인실리코 연구의 이론적 근거는 소수성 네트워크 붕괴로 인한 엔탈피 손실을 복원하고 일반적으로 N-글리코실화된 CH2 도메인 폴드의 기초가 되는 소수성 네트워크를 구제하기 위해 새로운 공유 황-황 접촉을 생성하기 위해 이황화 안정화를 위한 가능한 위치를 찾는 것이었다. 여러 이황화 결합은 비글리코실화된 IgG1을 안정화하기 위해 이전에 시험되었다(문헌[Gong et al. 2009. J. Biol. Chem. 284,14203-14210; Jacobsen et al.2017. J. Biol. Chem. 292,1865-1875] 참조). 그 중 두 가지 이황화 체계가 이미 언급된 가설에 부합하며, 위치 및 돌연변이는 L242C+K334C 및 R292C+V302C였다(도 4 참조).
- [0232] 음성 대조군으로서, 이황화 가교를 도입하기 위해 위치 332에서 멀리 떨어진 2개의 잔기를 선택하였으며, 위치 및 돌연변이는 A287C + L306C였다. 이러한 이황화 안정화는 소수성 코어에 축적하며 IgG CH2 도메인을 특징으로 하는 베타 폴드의 경계에 위치한다(도 5 참조). 공유 황-황 결합의 도입이 비글리코실화된 IgG1 스캐폴드를 안정화시킬 수 있지만, I332E 돌연변이로부터의 거리가 I332E 돌연변이를 포함하는 향상된 효과기 기능 스캐폴드 내에서 비효율적인 것으로 간주되는 이러한 이황화 안정화를 만들어야 한다.
- [0233] 도 4는 DSB 돌연변이를 위해 선택된 위치의 예를 도시한다. 좌측 패널에서, L242+K334(왼 안의 막대). 우측 패널에서, R292 및 V302(왼 안의 막대).
- [0234] 도 5는 음성 대조군으로 선택된 A287 및 L306(아래쪽 황색 막대) 위치를 도시한다. 2개의 잔기는 FcRn 결합 표면에 가깝고 IgG CH2 도메인의 경계에 존재하며, 예상되는 구조적 영향은 이전의 2개 DSB 체계보다 낮다.
- [0235] 인 실리코 모델 및 C1q, FcγRIIIa, FcγRIIa 및 FcRn에 대한 결합에 대한 이황화 결합의 영향
- [0236] C1q, FcγRIIIa, FcγRIIa 및 FcRn에 대한 결합에 대한 이황화 결합의 영향을 인실리코 모델을 사용하여 결정하였다.
- [0237] 물질 및 방법
- [0238] 이 분석은 6FCZ - C1q, GASDALIE Fc와 복합체를 이루는 5D6D - FcγRIIIa, 3RY6 - FcγRIIa 및 4NOU - FcRn에 대해 수행되었다. 구조 중 2개(6FCZ - C1q와 복합체를 이루는 Fc의 cryo-EM 구조에 기초한 모델 및 3RY6 - FcγRIIIa와 복합체를 이루는 Fc의 3.80 Å 분해능을 갖는 X선 구조)의 낮은 분해능을 고려해야 하며 결론은 불량한 분해능으로 인해서 편향이 있을 수 있다. 수용체로부터 5 Å 이내의 모든 Fc 잔기를 선택하여 상호작용하는 잔기를 결정하고, 향상된 효과기 기능 돌연변이 및 DSB 돌연변이와 교차 확인하였다. 선택된 상호작용 거리가 상기에 언급된 2개의 결정 구조(각각 5Å 및 3.80Å)의 분해능보다 크기 때문에, 이것은 편향을 줄여야 하며, 이는 잔기-잔기 직접 상호 작용 평가를 결정하는 경우에만 결정 요인이어야 하고, 현재의 경우 전체 상호작용 표면을 결정한다.
- [0239] C1q와의 접촉 잔기
- [0240] 이 분석은 2개의 CH2 도메인에서 발견된 가장 가까운 잔기가 각각 Fc 쇠 1 및 쇠 2에 대해 다음과 같다는 것을 나타내었다.
- [0241] Fc 쇠 1: E233, L234, L235, G236, G237, K322, S324, N325, K326, A327, L328, P329, A330, P331, E333. 잔기 G236 및 A330은 각각 ADLE 및 ADE 체계에서 돌연변이 G236A 및 A330L을 보유하고 있다. A330(ADLE에서 L)은 C1q 수용체와 직접 접촉하고 있고, 류신으로 돌연변이될 때 결합에 직접적인 영향을 가질 수 있다. 더욱이, P331은 C1q와 직접 접촉하고 있고, I332 바로 앞에 존재한다(ADE/DE/ADLE에서 E).
- [0242] Fc 쇠 2: H268, E269, E294, S298, Y300. 이러한 위치는 어떠한 조각된 돌연변이도 포함하지 않고, 효과기 기능이 향상되거나 안정화되지 않는다.
- [0243] 이 분석에 기초하여, DE, ADE 및 ADLE 돌연변이는 C1q 수용체와 접촉하거나 가까이 있는 잔기로 인해서 C1q에 대한 결합에 영향을 미칠 수 있다. DSB 위치는 C1q에 가장 가까운 잔기 내에서 발견되지 않으며 C1q에 대한 결합에 영향을 미쳐서는 안 된다. T256D 및 T307Q 돌연변이는 상호작용 표면에서 멀리 떨어져 있으므로 C1q와의 결합에 영향을 미쳐서는 안 된다.
- [0244] FcγRIIIa와의 접촉 잔기
- [0245] 이 분석은 2개의 CH2 도메인에서 발견된 가장 가까운 잔기가 각각 Fc 쇠 1 및 쇠 2에 대해 다음과 같다는 것을 나타내었다.

- [0246] Fc쇄 1: A236, G237, P238, D239, D265, V266, S267, H268, D270, Y296, N297, S298, T299 및 A327.
- [0247] Fc쇄 2: G236, G237, P238, S239, K326, A327, L328, P329, A330, I332.
- [0248] 볼드체의 잔기는 DE, ADE 및 ADLE 향상 효과기 기능 돌연변이에 속한다. 그것은 Fc γ RIIIa에 대한 결합을 증가시키는 것으로 설명되어 보고되었다. 상기에 언급된 위치 중 어느 것도 DSB 돌연변이를 포함하지 않으며 이는 Fc γ RIIIa에 대한 결합에 영향을 미쳐서는 안 된다. T256D 및 T307Q 돌연변이는 상호작용 표면에서 멀리 떨어져 있으므로 Fc γ RIIIa와의 결합에 영향을 미쳐서는 안 된다.
- [0249] Fc γ RIIIa와의 접촉 잔기
- [0250] 이 분석은 2개의 CH2 도메인에서 발견된 가장 가까운 잔기가 각각 Fc쇄 1 및 쇠 2에 대해 다음과 같다는 것을 나타내었다.
- [0251] Fc쇄 1: L235, G236, G237, P238, K326, A327, L328, P329. 잔기 G236은 ADLE 및 ADE 체계에서 돌연변이 G236A를 보유한다.
- [0252] Fc쇄 2: L234, L235, G236, G237, P238, S239, V264, D265, V266, S267, N297, S298, T299.
- [0253] 잔기 G236 및 S239는 각각 ADLE, ADE 및 DE 체계에서 돌연변이 G236A 및 S239D를 보유하고 있다. 이 분석에 기초하여, ADLE 돌연변이는 Fc γ RIIIa에 대한 결합에 영향을 미칠 수 있다. DSB 위치는 Fc γ RIIIa에 가장 가까운 잔기 내에서 발견되지 않았지만 Fc γ RIIIa에 대한 결합에 영향을 미쳐서는 안 된다. T256D 및 T307Q 돌연변이는 상호작용 표면에서 멀리 떨어져 있으므로 Fc γ RIIIa와의 결합에 영향을 미쳐서는 안 된다.
- [0254] FcRn과의 접촉 잔기
- [0255] 구조 분석에 기초하여, DSB 위치는 FcRn 결합 표면에 영향을 갖지 않아야 한다. DSB 돌연변이의 위치는 FcRn 결합 표면의 일부가 아니며 결합 표면이 포함된 CH2 - CH3 엘보우에 근접하지 않는다.
- [0256] DSB의 낱-인투-홀(Knob-Into-Hole: KIH) 및 RF 돌연변이에 대한 영향
- [0257] 구조 분석에 기초하여, DSB는 Fc쇄의 상이한 IgG 도메인(DSB의 경우 CH2 도메인 및 KIH 및 RF 돌연변이의 경우 CH3 도메인)에 속하기 때문에 RF 또는 KIH 체계에 영향을 미쳐서는 안 된다.
- [0258] **실시예 2: 안정화된 변이체의 작제 및 특징규명**
- [0259] 단클론성 항체(mAbs)를 점 돌연변이를 도입함으로써 향상된 효과기-적격 Fc 골격으로 형식화하였다(Lazar, *et al.*, PNAS, 103:4005-10 (2006)). Fc 도메인에 도입된 돌연변이는 1) 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)("DE" 변이체); 2) 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)("ADE" 변이체); 또는 3) 아미노산 위치 236의 알라닌(A), 아미노산 위치 239의 아스파르트산(D), 아미노산 위치 330의 류신(L) 및 아미노산 위치 332의 글루탐산(E)("ADLE" 변이체)였다(문헌[Smith, *et al.*, PNAS, 109:6181-86 (2012)] 참조). Fc-보유 폴리펩티드의 반감기를 증가시키기 위해서 반감기를 증가시키기 위해서 추가적인 돌연변이를 도입하였다. 아미노산 위치 256에 아스파르트산(D)을 도입하고, 아미노산 위치 307에 글루타민(Q)을 도입하였다. 아미노산 위치 넘버링은 EU 넘버링에 기초하였다.
- [0260] 더 높은 열안정성을 갖는 DE, ADE 및 ADLE 변이체를 생성시키기 위해서, 시스테인 치환을 도입하여 쇠내 이황화 결합을 조작하였다. 다음 위치의 아미노산을 시스테인 쌍으로 대체하였다: 1) 아미노산 위치 242의 류신(L) 및 아미노산 위치 334의 리신(K); 및 2) 아미노산 위치 292의 아르기닌(R) 및 아미노산 위치 302의 발린(V). 아미노산 위치 넘버링은 EU 넘버링에 기초하였다.
- [0261] 인간 IgG1 Fc 도메인을 암호화하는 핵산 서열에 점 돌연변이를 도입하였다. 그런 다음 이러한 핵산 서열을 mAb1(면역 세포 표면에 존재하는 단백질 항원에 대한 IgG1 항체)의 가변 도메인의 암호 서열에 융합시키고 거대 세포바이러스(CMV) 인핸서/프로모터 및 SV40 polyA 신호를 함유하는 포유동물 발현 플라스미드에 클로닝하였다. 생성된 플라스미드를 제조사의 지시에 따라 HEK293 세포에 형질주입시켰다.

mAb1 변이체의 인간 IgG1 중쇄 불변 도메인의 아미노산 서열

mAb1

mAb1 (wt) (IgG1)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG
 TQTYICNVNHKFSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPDVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPAEKTIISKAKGQPREPQV
 YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 SVMHEALHNNHTQKSLSLSPG

mAb1-DE (잔기 D239 및 E332 는 밑줄로 나타냄)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG
 TQTYICNVNHKFSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPDVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPAEEEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 SVMHEALHNNHTQKSLSLSPG

mAb1-DE-DQ (잔기 D239, E332, D256, Q307 은 밑줄로 나타냄)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG
 TQTYICNVNHKFSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPDVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPAEEEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 SVMHEALHNNHTQKSLSLSPG

mAb1-DE-DQ-L242C-K334C (잔기 D239, E332, D256, Q307, C242 및 C334 는 밑줄로 나타냄)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG
 TQTYICNVNHKFSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPDVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPAEEECTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 SVMHEALHNNHTQKSLSLSPG

mAb1-DE-DQ-R292C-V302C (잔기 D239, E332, D256, Q307, C292 및 C302 는 밑줄로 나타냄)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG
 TQTYICNVNHKFSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPDVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPAEEEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 SVMHEALHNNHTQKSLSLSPG

mAb1-DE-R292C-V302C (잔기 D239, E332, C292 및 C302 는 밑줄로 나타냄)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG
 TQTYICNVNHKFSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPDVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPAEEEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 SVMHEALHNNHTQKSLSLSPG

mAb1-DE-L242C-K334C (잔기 sD239, E332, C242andC334 는 밑줄로 나타냄)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG
 TQTYICNVNHKFSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPDVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPAEEECTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 SVMHEALHNNHTQKSLSLSPG

[0262]

mAb1-ADE (잔기 A236, D239 및 E332 는 밑줄로 나타냄)

ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKFSNTKVDKKEVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMI SRDPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPAEKTIISKAKGQPREPOV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
SVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG

mAb1-ADE-DQ (잔기 A236, D239, E332, D256 및 Q307 는 밑줄로 나타냄)

ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKFSNTKVDKKEVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMI SRDPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLQVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPAEKTIISKAKGQPREPOV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRW

mAb1-ADE-DQ-R292C-V302C (잔기 A236, D239, E332, D256, Q307, C292 및 C302 는 밑줄로 나타냄)

ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKFSNTKVDKKEVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMI SRDPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLQVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPAEKTIISKAKGQPREPOV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
SVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG

mAb1-ADE-DQ-L242C-K334C (잔기 A236, D239, E332, D256, Q307, C242 및 C334 는 밑줄로 나타냄)

ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKFSNTKVDKKEVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMI SRDPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLQVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPAEKTIISKAKGQPREPOV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
SVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG

mAb1-ADE-R292C-V302C (잔기 A236, D239, E332, C292, 및 C302 는 밑줄로 나타냄)

ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKFSNTKVDKKEVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMI SRDPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPAEKTIISKAKGQPREPOV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
SVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG

mAb1-ADE-L242C-K334C (잔기 A236, D239, E332, C242, 및 C334 는 밑줄로 나타냄)

ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKFSNTKVDKKEVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMI SRDPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPAEKTIISKAKGQPREPOV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
SVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG

mAb1-ADLE (잔기 A236, D239, L330, E332 는 밑줄로 나타냄)

ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKFSNTKVDKKEVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMI SRDPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPAEKTIISKAKGQPREPOV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
SVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG

mAb1-ADLE-DQ (잔기 A236, D239, L330, E332 D256, Q307 은 밑줄로 나타냄)

ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKFSNTKVDKKEVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMI SRDPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLQVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPAEKTIISKAKGQPREPOV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
SVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG

mAb1-ADLE-DQ-L242C-K334C (잔기 A236, D239, L330, E332, D256, Q307, C242 및 C334 는 밑줄로 나타냄)

ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKFSNTKVDKKEVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMI SRDPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLQVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPAEKTIISKAKGQPREPOV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
SVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG

mAb1-ADLE-DQ-R292C-V302C (잔기 A236, D239, L330, E332, D256, Q307, C242 및 C334 는 밑줄로 나타냄)

ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKFSNTKVDKKEVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMI SRDPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLQVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPAEKTIISKAKGQPREPOV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
SVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG

mAb1-ADLE-R292C-V302C (잔기 A236, D239, L330, E332, C292 및 C302 는 밑줄로 나타냄)

ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKFSNTKVDKKEVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMI SRDPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPAEKTIISKAKGQPREPOV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
SVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG

mAb1-ADLE-L242C-K334C (잔기 A236, D239, L330, E332, C242 및 C334 는 밑줄로 나타냄)

ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKFSNTKVDKKEVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMI SRDPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPAEKTIISKAKGQPREPOV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
SVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG

[0263]

[0264]

[0265] mAb1 변이체를 1.5리터 규모로 생산하였고 단백질 A 친화성 크로마토그래피(HI Screen MAbSelect Sure 단백질 A, Cytiva) 및 크기 배제 크로마토그래피(HI Load 26/600 superdex 200 pg, Cytiva)를 포함한 2단계 공정으로 정제시켰다. 분획 풀을 Sartorius Vivaspin 10 KDa를 사용하여 10 mg/ml까지 농축시켰다. 그런 다음 샘플을 필터 멸균하고 사용할 때까지 4°C에서 보관하였다. 배치를 UV, 환원 및 비환원 조건의 LabChip GXII 터치 HT 단백질, SEC-HPLC 및 LC-MS로 정량, 순도 및 확인을 위해 분석하였다. 조각된 이황화 결합을 펩티드 매핑을 위해 Lys-C, 트립신 또는 트립신 + Glu-C 세린 프로테아제 혼합물을 사용한 효소 분해 후 LC_MS(Q-ToF)를 포함하는 추출 이온 크로마토그래피(XIC)를 통해 분석하였다.

[0266] 결과

[0267] [표 1]

항체 생산

배치	설명	샘플 수율 (mg/L) 1.5-L 규모의 시리즈 1	샘플 수율 (mg/L) 0.6-L 규모의 시리즈 2
VA2-21-262-1	MAb1-ADE-DQ-R292C_V302C		87
VA2-21-261-1	MAb1-ADE-DQ-L242C_K334C		68
VA2-21-266-1	MAb1-ADE-DQ		36
VA2-21-260-1	MAb1-ADE-R292C_V302C		76
VA2-21-259-1	MAb1-ADE-L242C_K334C		66
VA2-21-264-1	MAb1-ADE-A287C_L306C		6
VA2-19-943-1	MAb1-ADE	55	
VA2-20-953-1	MAb1-ADLE-DQ-R292C_V302C	47	
VA2-20-954-1	MAb1-ADLE-DQ-L242C_K334C	28	
VA2-20-952-1	MAb1-ADLE-DQ	27	
VA2-21-268-1	MAb1-ADLE-R292C_V302C		88
VA2-21-267-1	MAb1-ADLE-L242C_K334C		38
VA2-21-265-1	MAb1-ADLE-A287C_L306C		4
VA2-20-949-1	MAb1-ADLE	40	
VA2-20-956-1	MAb1-DE-DQ-R292C_V302C	46	
VA2-20-957-1	MAb1-DE-DQ-L242C_K334C	36	
VA2-20-955-1	MAb1-DE-DQ	37	
VA2-21-270-1	MAb1-DE-R292C_V302C		83
VA2-21-269-1	MAb1-DE-L242C_K334C		61
VA2-21-263-1	MAb1-DE-A287C_L306C		9
VA2-20-951-1	MAb1-DE	59	
VA2-20-950-1	Mab1-WT	40	

[0268]

[0269] 배치를 생성시켰고 예상되는 프로파일로 특징규명하였다. A287C+L306C 작제물의 샘플 수율은 임의의 다른 작제물에 비해 매우 낮았다. 이황화 결합을 XIC에 의해 결정하였고, 추가적인 이황화 결합이 도 6(mAb1 ADLE DQ 및 DSB 돌연변이체를 갖는 이황화 결합의 XIC 프로파일) 및 도 7a 및 도 7b(mAb1_DE 및 DSB 돌연변이체 및 mAb1_ADE & DSB 돌연변이체를 갖는 이황화 결합의 XIC 프로파일)에 도시된 바와 같이 예상된 바와 같이 존재하였다.

[0270] Fc 변이체를 갖는 mAb의 열안정성을 시험하기 위해서, mAb를 PBS에 10 mg/ml로 희석시켰다. 열안정성을 표준 모세관을 사용하여 Prometheus NT48을 사용하는 시차 주사 형광법의 나노-형식(nanoDSF)으로 결정하였고, 온도의 선형 구배를 분당 1°C의 가열 속도로 20° 에서 95°C까지 적용하였다.

[0271] NanoDSF는 단백질의 고유 형광 변화를 사용하여 온도 증가에 따른 단백질 언폴딩을 모니터링한다. 단백질 용액을 266 nm 파장 광원 및 330 nm 및 350 nm에서 티로신 및 트립토판 잔기의 형광 방출을 사용하여 여기시킨다. 방출 최대 및 티로신 및 트립토판 잔기의 강도는 즉각적인 환경에 크게 의존하며 열 변성 동안 단백질이 언폴딩됨에 따라 변경될 수 있다. 온도의 함수로서 330 nm 및 350 nm에서 형광 강도 비율의 변화를 모니터링하면 단백질의 언폴딩 전이를 나타내는 시그모이드 형상의 곡선이 생성된다. 시그모이드 곡선의 중간점은 용융 온도(T_m)를 나타낸다. 단백질이 언폴딩을 시작하는 검출 가능한 온도는 Tonset이다. 3개의 변곡점(IP)이 존재하는데 2개는 Fc 도메인의 CH2 및 CH3에 상응하고 세 번째 하나는 Fab 도메인에 상응한다. Tagg는 단백질이 응집되는 경향을 나타내는 온도이다.

[0272] ADE, DE 및 ADLE 변이체의 열안정성 연구 결과를 표 2 및 도 8 및 도 9a 및 도 9b에서 찾아볼 수 있다.

NanoDSF는 단백질의 고유 형광 변화를 사용하여 온도 증가에 따른 단백질 언폴딩을 모니터링한다. 온도의 함수로서 330 nm 및 350 nm에서 형광 강도 비율의 변화를 모니터링하면 단백질의 언폴딩 전이를 나타내는 시그모이드 곡선이 생성된다. 시그모이드 곡선의 중간점은 용융 온도(T_m)를 나타낸다. 단백질이 언폴딩을 시작하는 검출 가능한 온도는 Tonset이다. 3개의 변곡점(IP)이 기록된다: 2개는 Fc 도메인의 CH2 및 CH3에 상응하고 세 번째 하나는 Fab 도메인에 상응한다. Tagg는 단백질이 응집되기 시작하는 온도이다.

[0273] [표 2]

야생형 IgG1 또는 향상된 Fc 도메인을 갖는 mAb1의 열안정성

mAb1								
ADE +/- DQ +/-	IgG1_ADE DQ	IgG1_ADE DQ	IgG1_ADE DQ	IgG1_ADE -	IgG1_ADE -	IgG1_ADE -	IgG1_ADE -	IgG1
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	R292C_V302C	L242C_K334C	A287C_L306C	-	-
배치	VA2-21-262-1	VA2-21-261-1	VA2-21-266-1	VA2-21-260-1	VA2-21-259-1	VA2-21-264-1	VA2-19-943-1	VA2-20-950-1
Tonset °C	56	55	44	61	58	42	46	65
IP Fc	65 (74)	64 (75)	50 (73)	69	66 (75)	51 (73)	51 (66)	71
IP Fab	82	83	82	83	83	82	83	82
Tagg	73	72	75	73	73	74	72	73

mAb1								
ADLE +/- DQ +/-	IgG1_ADLE DQ	IgG1_ADLE DQ	IgG1_ADLE DQ	IgG1_ADLE -	IgG1_ADLE -	IgG1_ADLE -	IgG1_ADLE -	IgG1
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	R292C_V302C	L242C_K334C	A287C_L306C	-	-
배치	VA2-20-953-1	VA2-20-954-1	VA2-20-952-1	VA2-21-268-1	VA2-21-267-1	VA2-21-265-1	VA2-20-949-1	VA2-20-950-1
Tonset °C	58	54	39	60	57	41	45	65
IP Fc	64	62	47 (66)	67	64 (75)	50 (73)	50 (65)	71
IP Fab	82	83	82	82	83	82	83	82
Tagg	74	73	74	73	72	75	72	73

mAb1								
DE +/- DQ +/-	IgG1_DE DQ	IgG1_DE DQ	IgG1_DE DQ	IgG1_DE -	IgG1_DE -	IgG1_DE -	IgG1_DE -	IgG1
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	R292C_V302C	L242C_K334C	A287C_L306C	-	-
배치	VA2-20-956-1	VA2-20-957-1	VA2-20-955-1	VA2-21-270-1	VA2-21-269-1	VA2-21-263-1	VA2-20-951-1	VA2-20-950-1
Tonset °C	59	55	42	58	59	41	47	65
IP Fc	66	65	49 (65)	69	67	52 (74)	53 (66)	71
IP Fab	82	83	82	82	83	82	82	82
Tagg	73	73	73	73	73	75	74	73

[0274]

[0275]

모든 Fab는 82°C와 83°C 사이의 T_m으로 매우 안정적이었다.

[0276]

WT IgG1(mAb1)의 경우 Tonset은 65°C였고, DQ 돌연변이가 있거나 없는 mAb1 ADLE, ADE 및 DE의 경우에는 50°C 미만이었다. 다른 한편, R292C_V302C 또는 L242C_K334C DSB를 도입한 경우 Tonset은 야생형 IgG1 분자와 마찬가지로 50°C를 훨씬 초과하였다. 야생형 IgG1과 같이 R292C_V302C 또는 L242C_K334C DSB를 포함하는 분자의 경우 IP Fc는 60°C 초과이다. R292C_V302C 또는 L242C_K334C DSB의 도입은 DQ 향상된 반감기 돌연변이가 있거나 없는 ADCC-향상된 Fc ADLE, ADE 또는 DE의 맥락에서 열안정성을 회복시켰다.

[0277]

A287C_L306C DSB는 DQ 향상된 반감기 돌연변이가 없는 ADCC-향상된 Fc ADLE, ADE 또는 DE에서 열안정성을 회복시키지 못했다.

[0278]

mAb2

[0279]

mAb2(면역 세포 표면의 G-결합 단백질 수용체(GCPR)에 대한 IgG1 단클론성 항체)에 기초하여 다음의 추가 Fc 변이체를 만들었다: mAb2(wt)(야생형 IgG1 Fc), mAb2-DE(추가적인 치환 S239D 및 I332E를 갖는 mAb2에 상응함), mAb2-DE-R292C/V302C(추가적인 치환 R292C 및 V302C를 갖는 mAb2-DE에 상응함) 및 mAb2-R292C/V302C(치환 R292C 및 V302C를 갖는 mAb2 wt에 상응함).

[0280]

mAb2wt, mAb2-DE, mAb2-DE-R292C/V302C 및 mAb2-R292C/V302C의 열안정성을 mAb1에 대해 상기에 기재된 것과 동일한 방법으로 시험하였고 결과를 표 3에 제공한다.

[0281] [표 3]

이황화 결합을 갖거나 갖지 않는, 야생형 IgG1 또는 향상된 Fc 도메인을 갖는 mAb2의 열안정성

클론	Tm1 (°C)
mAb2-R292C/V302C	73.0
mAb2 wt (ctrl)	71.9
mAb2-DE-R292C/V302C	67.9
mAb2-DE	51.0

[0282]

[0283] 이러한 결과는 mAb2에서의 DE 돌연변이가 더 낮은 열 안정성을 초래하였고(mAb2 wt의 경우 Tm 71.9°C 대 mAb2-DE의 경우 Tm 51.0°C), 이황화 결합의 도입이 열 안정성을 회복시켰음(Tm 67.9°C)을 나타낸다.

[0284] **mAb3**

[0285] mAb3(면역 세포 표면에 존재하는 단백질 항원 및 암세포 표면에 존재하는 단백질 항원에 대한 IgG1 단클론성 2가 이중특이적 CODV-OL1 항체)에 기초하여 다음의 추가 Fc 변이체를 만들었다: mAb3(wt)(야생형 IgG1 Fc), mAb3-DE(추가적인 치환 S239D 및 I332E를 갖는 mAb3에 상응함), mAb3-DE-R292C/V302C(추가적인 치환 R292C 및 V302C를 갖는 mAb3-DE에 상응함), mAb3-ADE(추가적인 치환 G236A, S239D 및 I332E를 갖는 mAb3에 상응함) 및 mAb3-ADE-R292C/V302C(추가적인 치환 R292C 및 V302C를 갖는 mAb3-ADE에 상응함).

[0286] mAb3 항체를 다음과 같이 생산하였다:

[0287] 상응하는 작제물의 상이한 쇄를 암호화하는 발현 플라스미드를 이.콜라이(*E. coli*) DH5a에서 증식시켰다. 형질주입에 사용된 플라스미드는 EndoFree Plasmid Mega kit(Qiagen)를 사용하여 이. 콜라이로부터 제조하였다. F17 무혈청 현탁 배양(Invitrogen)에서 성장하는 HEK 293-FS 세포를 폴리에틸렌이민 형질주입 시약을 사용하여 제시된 플라스미드로 형질주입시켰다. 37°C 및 8% CO2에서 6일 동안 배양한 후, 원심분리로 세포를 제거하고 상정액을 0.22 µm 필터에 통과시켜 입자를 제거하였다. 단백질을 MabSelect SuRe(Cytiva)에서 포획하였고, 0.1 M 시트레이트 완충액 pH 3.0으로 용출시켰고, 1M Tris pH 9로 중화시켰다. Superdex200 26/60(Cytiva)을 사용한 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 및 0.22 µm 여과 및 UV280 농도 결정 후 단백질을 추가 특징규명을 위해서 사용하였다. 수율을 하기 표 4에 보고한다.

[0288] [표 4]

이황화 결합을 갖거나 갖지 않는, 야생형 IgG1 또는 향상된 Fc 도메인을 갖는 mAb3의 수율

클론	샘플 수율 (mg/L)
mAb3-WT	>20
mAb3-DE	<10
mAb3-ADE	<10
mAb3-DE-R292C/V302C	>20
mAb3-ADE-R292C/V302C	>20

[0289]

[0290] 정상 IgG1 Fc 골격을 갖는 항체는 20 mg/l 초과인 샘플 수율을 나타낸 반면, Fc 골격에 ADE 또는 DE 돌연변이를 갖는 항체는 샘플 수율이 10 mg/l 미만의 감소를 나타낸다. ADE 또는 DE 돌연변이를 갖고 이황화 결합을 갖는 IgG1 Fc를 갖는 항체는 WT와 유사한 샘플 수율 및 4 내지 6배만큼의 샘플 수율 증가를 나타내었고, mAb3-DE-R292C/V302C 및 mAb3-ADE-R292C/V302C는 20 mg/l 초과인 샘플 수율을 나타내었다.

[0291] mAb3 항체의 열안정성의 열안정성을 mAb1에 대해 상기에 기재된 것과 동일한 방법으로 시험하였고 결과를 표 5에 제공한다.

[0292] [표 5]

이황화 결합을 갖거나 갖지 않는, 야생형 IgG1 또는 향상된 Fc 도메인을 갖는 mAb3의 열안정성

클론	Tonset	Tm1
mAb3-WT	58.5	64.3
mAb3-DE	40.4	47.5
mAb3-ADE	41.2	46.8
mAb3-DE-R292C/V302C	57.8	65.9
mAb3-ADE-R292C/V302C	57.5	65.9

[0293]

[0294] 정상 IgG1 Fc 골격을 갖는 mAb3은 안정적이었고 Tm1이 64.3°C이고 Tonset이 58.5°C였다. IgG1 Fc에 ADE 또는

DE 돌연변이를 갖는 mAb3 분자는 50°C 미만에서 Tm1 및 Tonset을 나타낸다. ADE 또는 DE 돌연변이를 갖고 이황화 결합을 갖는 IgG1 Fc를 갖는 분자는 열안정성 증가를 나타낸다. mAb3-DE-DSB 분자는 65.9°C의 Tm1 및 57.8°C의 Tonset을 나타내고 mAb3-ADE-DSB는 65.9°C의 Tm1 및 57.5°C의 Tonset을 나타낸다.

[0295] mAb3 내의 이황화-결합 R292C/V302C의 화학적 안정성

[0296] Fc CH2 도메인 상의 이황화 결합(DSB)의 조작용 안정성을 증가시킨다. mAb3 내의 조작된 DSB, R292C_V302C 및 ADE 돌연변이(G236A/S239D/I332E)가 DSB 환원 거동에 비정상적으로 영향을 미치지 않는 것을 보장하기 위해서, 환원 속도를 DTT 및 후속 트립신 펩티드 맵핑으로 측정하였다.

[0297] 물질 및 방법

[0298] 환원 감도 검정

[0299] PBS-E에서 DTT의 연속 희석을 수행하였다(검정에서 최종 DTT 농도: 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2 및 0.1 mM). 단백질 배치 FF-20-819-1, FF-20-821-1 및 FF-21-170-5를 스핀-탈염 컬럼을 사용하여 PBS-E 완충액으로 투석하여 환원 동안 pH 7.2가 얻어지는 것을 보장하였다. 단백질 샘플을 PBS-E에서 1.5 mg/ml로 정규화하였다. 정규화된 샘플 2부분을 각각의 DTT 희석액 1부분에 대해 PCR 플레이트에 첨가하고 첨가 후 혼합하였다. 이 단계를 1분 이내에 최저 농도에서 최고 농도의 DTT 농도까지 수행하였다. Thermo C Thermoblock에서 25°C에서 10분 동안 인큐베이션시켜 환원을 수행하였다. 모든 웰에 NEM 스톱 용액 3부를 첨가하여 반응을 쉼시켰다. 검정 일관성을 보장하기 위해서, NEM 첨가를 1분 이내에 최저 농도에서 최고 DTT 농도까지 수행하고 첨가 후 혼합하였다. 준비된 플레이트를 모세관 겔 전기영동(cGE) 및 질량 분석법(펩티드 맵핑)으로 측정할 때까지 실온에서 보관하였다.

[0300] 하기 표 6a 및 표 6b는 각각 환원 감도 검정 및 모세관 겔 전기영동법에 대한 시약 및 물질 목록을 포함한다.

[0301] [표 6A]

환원 감도 검정에 대한 시약 및 물질 목록

시약/물질	제조사	카탈로그 번호	스톡 농도
PBS 완충액 pH7.2	Gibco/Thermo-Fisher	20012043	1x
디티오프레일(DTT)	Pierce/Thermo-Fisher	A39255	고체, PBS-E 에서 100 mM 로 분할됨
N-에틸말레이미드(NEM)	Pierce/Thermo-Fisher	23030	고체, PBS-E 에서 200 mM 로 분할됨
Invitrogen EDTA, pH8.0	Thermo-Fisher	AM9260G	0.5M
하드-웰 96 웰 플레이트	Bio-Rad	HSP9601	/
스핀 탈염 컬럼, 7K MWCO	ZEBA	89883	/
기기	제조사	카탈로그 번호	
Thermostat C Thermoblock	Eppendorf	5383000027	
검정 완충액	조성물		
PBS-E	Gibco 1X PBS Buffer pH7.2 + 1 mM EDTA		

[0302]

[0303] [표 6B]

겔 전기영동법(cGE)에 대한 시약 및 물질 목록

시약/물질	제조사	카탈로그 번호	스톡 농도
물 MS 등급	Thermo	#51140	/
아이오도아세트아미드 (IAM)	Thermo-Fisher	#A39271	고체, 물에서 250 mM 로 분할됨
하드-웰 96 웰 플레이트	Bio-Rad	#HSP9601	/
Protein Clear HR Assay Kit	PerkinElmer	#CLS960014	/
Protein Clear HR Chip	PerkinElmer	#CLS148695	/
기기	제조사	카탈로그 번호	
LabChip GXII Touch	PerkinElmer	CLS138160	
Thermostat C Thermoblock	Eppendorf	5383000027	
검정 완충액	조성물 / 농도		
비-환원 샘플 완충액	단백질 발현 샘플 완충액+ 8.75 mM IAM		

[0304]

[0305]

환원 감도 검정을 수행한 후 제조사의 지침에 따라 Protein Clear HR 검정의 비환원 프로토콜을 사용하여 샘플을 측정하였다.

[0306]

칩을 준비하기 위해서, 모든 검정 성분을 실온과 평형을 이루도록 하였다. Protein Clear HR Gel 매트릭스를 Protein Clear HR Dye 용액과 혼합하고 여과한 후 제조사의 지침에 따라 세척된 칩 웰에 첨가하였다.

[0307]

제공된 검정 대조군 VeriMAB-표준을 비-환원 샘플 완충액에 희석시키고, 70°C에서 10분 동안 변성시키고, 제조사의 지침에 따라 물과 혼합하고 검정 보정을 위해 LabChip GXII Touch 기기에 넣었다. Protein Clear HR Ladder를 물에 1:10으로 희석시킨 후 제시된 부피의 래더 용액 및 Protein Clear HR 세척 완충액을 상응하는 튜브로 옮기고 LabChip GXII Touch 기기에 넣었다. 교정 과정을 성공적으로 완료한 후 샘플을 측정하였다.

[0308]

샘플을 준비하기 위해서, 환원 감도 검정으로부터 유래한 각각의 샘플 5 µl를 밀봉된 PCR 플레이트의 비-환원 샘플 완충액 18 µl에 첨가하고, 샘플을 Thermostat C Thermoblock에서 70°C에서 10분 동안 변성시켰다. 변성 후, 샘플을 35 µl의 물로 희석시켰다. 준비된 검정 플레이트를 LabChip GXII Touch 기기로 측정할 때까지 실온에 보관하였다.

[0309]

측정 후, LabChip Reviewer Software를 사용하여 데이터를 분석하였다. 상대 피크 면적이 0.85% 이상인 모든 피크를 적분하였다. 남아있는 온전한 분자의 상대 피크 면적[%]을 DTT 농도에 대해 플로팅하고, 곡선을 4 매개변수 로지스틱 모델/S자형 용량-반응 모델(XLfit, Dose Response One Site, Model 205)에 의해서 피팅하였다. DTT를 첨가하지 않은 샘플의 면적을 표준화를 위해 사용하였고 100%로 설정하였다. 온전한 분자의 50%가 남아 있는 각각의 샘플의 DTT 농도를 EC50 값으로 사용하여 환원에 대한 분자의 감도를 평가하였다.

[0310]

트립신 펩티드 맵핑 실험을 위한 환원 검정 후 항체 샘플 준비

[0311]

환원 감도 검정을 수행한 후 샘플에 소화 절차를 수행하였다. 항체 샘플당 100 µg을 0.5 ml Zeba 스핀 탈염 컬럼(Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 번호 89883)을 사용한 완충액 교환에 의해서 0.2 mol/l 히스티딘 클로라이드, 5.6 mmol/l 구아니디늄 염산염 pH 6을 사용하여 변성시켰다. NEM이 완전히 제거되도록 완충액 교환을 1회 반복하였다. 그 다음, 37°C에서 1시간 동안 10 mmol/l TCEP(트리스(2-카르복시에틸)포스핀, Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 번호 T2556)를 첨가하여 샘플을 환원시켰다. 그 후, 완충액을 0.5 ml Zeba 스핀 탈염 컬럼(Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 번호 89883)을 사용하여 20 mmol/l 히스티딘 클로라이드, 0.5 mmol/l TCEP, pH 6으로 교환시켰다. 항체를 1:20의 효소 대 기질 비율로 37°C에서 밤새 트립신으로 소화시켰다. 10% 포름산 용액 7 µl를 첨가하여 분해를 중단시키고, 샘플을 추가 분석할 때까지 -80°C에서 동결시켰다.

[0312]

액체 크로마토그래피 탠덤 질량분석법에 의한 변형된 펩티드의 검출

[0313]

EASY-ETD 이온 소스(Thermo Fisher Scientific)가 장착된 orbitrap FUSION™ LUMOS™ TRIBRID™ 질량 분석기에 커플된 VANQUISH™ Flex UHPLC 시스템을 사용하여 펩티드를 분석하였다.

[0314]

펩티드 분리를 위해 (A) 0.1% 포름산 및 (B) 90% 아세토니트릴, 0.1% 포름산의 이원 용매 시스템을 사용하였다. HYPERSIL GOLD™ C18 LC-컬럼(1.9 µm 입자 크기를 갖는 150 mm x 2.1 mm, Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 번호 25003-152130-V)에서 50분 동안 선형적으로 증가하는 농도의 용매 B에 이어 5분 동안 95% B 세척 및 5분 동안 5% 용매 B로 재평형화하는 1시간 구배로 2 µg의 트립신 분해 샘플을 분리하였다. 컬럼에서 분리된 펩티

드는 다음과 같은 중요한 설정으로 검출하였다: 전체 MS 스펙트럼은 375~2,000으로 설정된 질량 범위, 4.0e5의 자동 게인 제어(AGC) 타겟, 50 ms의 최대 주입 시간, 및 1 μ scan을 사용하여 120,000의 분해능(200 m/z에서 정의)으로 수집하였다. 데이터 종속(MS/MS) 스펙트럼은 200 ms의 주입 시간 내에 5.0e4 AGC 타겟을 축적한 후 15,000의 분해능(200 m/z에서 정의)을 사용하여 상위 5개 데이터 종속 모드에서 수집하였다. 이온은 1.6 Th 단리 창에서 단리되었고 HCD, EThcD 또는 ETciD를 사용하여 30% 정규화된 충돌 에너지로 단편화되었다. 동적 제는 10초로 설정하였다.

[0315] 데이터 가공

[0316] 수집된 MS 데이터는 Expressionist 소프트웨어(GeneData 버전 13.5)를 사용하여 처리하고, 올바른 할당 및 상대적 질량 정확도를 보장하기 위해 수동으로 검사하였다. 질량 스펙트럼을 샘플 분자의 아미노산 서열에 대해 검색하였다. 중요한 설정은 각각 10 ppm으로 설정된 MS 및 MS/MS 스펙트럼의 질량 허용오차이다. 검색 매개변수 내에서 고려된 번역 후 변형은 Expressionist로부터의 IgG N-글리칸 라이브러리를 사용한 시스템에 대한 NEM 변형 및 일반적인 N-말단 글리코실화였다.

[0317] 결과

[0318] 하기 표 6C에 나타난 바와 같은 EC50 값을 용량 반응 곡선으로부터 계산하였다. 모세관 전기영동(cGE)에 의해서 측정된 DTT에 의한 비환원 샘플의 주요 피크 감소는 mAb3 wt, mAb3ADE 및 mAb3 ADE-DSB에 대해 동일하였는데, 이는 CH2 도메인 내의 ADE 돌연변이와 조작된 이황화 결합 모두가 단백질의 환원 감도에 영향을 가지지 않음을 나타낸다.

[0319] 펩티드 매핑에 의해서 분석된 환원 감도 검정에서 얻은 단백질인 mAb3 wt, mAb3 ADE 및 mAb3 ADE-DSB는 환원 가능한 분자간 이황화 결합(DSB)과 유사한 환원 거동을 나타낸다. 용량 반응 곡선에 기초하여 3가지 단백질에 대한 EC50 값이 1.2~1.5 mM DTT 범위에 있는 것으로 추정되었는데, 이는 조작된 DSB가 전형적인 분자간 DSB와 유사하게 환원 안정성을 나타냄을 나타낸다.

[0320] [표 6C]

모세관 전기영동(cGE)에 의해서 측정된 DTT에 의한 비환원 샘플의 주요 피크의 환원의 용량 반응 곡선으로부터 계산된 EC50 값

단백질 샘플	EC50 [mM DTT]
Adapt Standard (mAb ctrl)	0.8
mAb3 wt	1.2
mAb3 ADE	1.2
mAb3 ADE-DSB	1.2

[0321]

[0322] mAb4

[0323] mAb4(면역 세포 표면에 존재하는 단백질 항원 및 암세포 표면에 존재하는 단백질 항원에 대한 IgG1 단클론성 4가 이중특이적 CODV 항체)에 기초하여 다음의 추가 Fc 변이체를 만들었다: mAb4(wt)(야생형 IgG1 Fc), mAb4-DE(추가적인 치환 S239D 및 I332E를 갖는 mAb4에 상응함), mAb4-DE-R292C/V302C(추가적인 치환 R292C 및 V302C를 갖는 mAb4-DE에 상응함), mAb4-R292C/V302C(치환 R292C 및 V302C를 갖는 mAb4 wt에 상응함), mAb4-ADE(추가적인 치환 G236A, S239D 및 I332E를 갖는 mAb4에 상응함) 및 mAb4-ADE-R292C/V302C(추가적인 치환 R292C 및 V302C를 갖는 mAb4-ADE에 상응함).

[0324] MAb4 항체를 다음과 같이 생산하였다:

[0325] 상응하는 작제물의 상이한 쇄를 암호화하는 발현 플라스미드를 이.콜라이 DH5a에서 증식시켰다. 형질주입에 사용된 플라스미드는 EndoFree Plasmid Mega kit(Qiagen)를 사용하여 이. 콜라이로부터 제조하였다. F17 무혈청 현탁 배양(Invitrogen)에서 성장하는 HEK 293-FS 세포를 폴리에틸렌민 형질주입 시약을 사용하여 제시된 플라스미드로 형질주입시켰다. 37°C 및 8% CO2에서 6일 동안 배양한 후, 원심분리로 세포를 제거하고 상청액을 0.22 μ m 필터에 통과시켜 입자를 제거하였다. 단백질을 MabSelect SuRe(Cytiva)에서 포획하였고, 0.1 M 시트레이트 완충액 pH 3.0으로 용출시켰고, 1M Tris pH 9로 중화시켰다. Superdex200 26/60(Cytiva)을 사용한 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 및 0.22 μ m 여과 및 UV280 농도 결정 후 단백질을 추가 특정규명을 위해서 사용하였다. 수율을 하기 표 7에 보고한다.

[0326] [표 7]

이황화 결합을 갖거나 갖지 않는, 야생형 IgG1 또는 향상된 Fc 도메인을 갖는 mAb4 의 수율

클론	샘플 수율 (mg/L)
mAb4-WT	30.6
mAb4-DE	2.7
mAb4-ADE	4.7
mAb4-DE-R292C/V302C	17.9
mAb4-ADE-R292C/V302C	19.4

[0327]

[0328]

정상 IgG1 Fc 골격을 갖는 mAb4 분자는 30.6 mg/l 의 샘플 수율을 나타낸 반면, Fc 부분에 ADE 또는 DE 돌연변이를 갖는 mAb4 분자는 샘플 수율이 5 mg/l 미만 값으로 상당한 감소를 나타낸다. ADE 또는 DE 돌연변이를 갖고 이황화 결합을 갖는 IgG1 Fc를 갖는 mAb4 분자는 샘플 수율의 증가를 나타내었다. mAb4-DE- R292C/V302C는 17.9 mg/l 의 샘플 수율을 나타내고, mAb4-ADE- R292C/V302C는 19.4 mg/l 의 샘플 수율을 나타낸다.

[0329]

mAb4 항체의 열안정성의 열안정성을 mAb1에 대해 상기에 기재된 것과 동일한 방법으로 시험하였고 결과를 표 8에 제공한다.

[0330]

[표 8]

이황화 결합을 갖거나 갖지 않는, 야생형 IgG1 또는 향상된 Fc 도메인을 갖는 mAb4 의 열안정성

클론	Tonset	Tm1
mAb4-WT	59.0	66.4
mAb4-DE	45.3	50.3
mAb4-ADE	44.6	49.9
mAb4-DE-R292C/V302C	59.4	67.2
mAb4-ADE-R292C/V302C	58.2	66.6

[0331]

[0332]

정상 IgG1 Fc를 갖는 mAb4 분자는 안정적이었고 Tm1이 66.4°C이고 Tonset이 59 °C였다. IgG1 Fc에 ADE 또는 DE 돌연변이를 갖는 mAb4 분자는 50°C에서 또는 그 미만에서 Tm1 및 Tonset을 나타낸다. ADE 또는 DE 돌연변이를 갖고 이황화 결합을 갖는 IgG1 Fc를 갖는 mAb4 분자는 열안정성증가를 나타낸다. mAb4-DE-R292C/V302C 분자는 67.2°C의 Tm 및 59.4°C의 Tonset을 나타내고, mAb4-ADE-R292C/V302C는 66.6°C의 Tm 및 58.2°C의 Tonset을 나타낸다.

[0333]

도 10은 나노 시차 주사 형광측정법(nanoDSF)에 의해 결정된 DE, ADE, DE + DSB 및 ADE + DSB에 대한 이황화 안정화의 열안정성 효과를 도시한다. 좌측 패널은 mAb3을 도시하고, 우측 패널은 mAb4를 도시한다. R292C/V302C로의 안정화는 열안정성에서 약 10 °C만큼의 증가를 초래한다.

[0334]

실시예 3: 안정화된 mAb1 변이체의 결합 매개변수

[0335]

방법 및 물질

[0336]

유세포 분석법을 사용하여 표적 항원을 발현하는 몇몇 재조합 세포주: 인간 preB-300.19 세포, 시노몰거스 preB-300.19 세포, HEK293T-Fc γRIIIa F158, Fc γRIIIa V158 및 CHO-인간 FcRn 발현 세포(GenScript; M00603)에 대한 mAb1의 2가 EC50 결합을 결정하였다. 40,000개 세포/웰의 밀도에 도달할 때까지 세포를 96웰 플레이트에서 배양하였다. mAb(100 μl/웰)를 4°C에서 45분 동안 첨가하였다. 인큐베이션 후, 웰을 PBS+1% BSA로 3회 세척하였다. 염소 항-인간 IgG-Alexa488 항체를 4°C에서 45분 동안 첨가하고, PBS+1% BSA로 3회 세척하였다. 200 ml/웰 PBS + 1% BSA를 첨가하여 세포를 원심분리 및 재현탁시킨 후 항체 결합을 평가하고, Guava easyCyte 8HT 유세포 측정 시스템을 사용하여 결합을 평가하였다. 각각 BIOST@T-BINDING 및 BIOST@T-SPEED 소프트웨어를 사용하여 겔보기(apparent) KD 및 EC50 값을 추정하였다.

[0337]

HBS-EP+완충액(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA 및 0.05% v/v Surfactant P20, pH 7.4)에서 25°C에서 Biacore T200 기기에서 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 검정으로 huFc γRIIIa 단백질에 결합하는 항체의 동역학을 측정하였다. 인간 Fc γRIIIa_His 단백질(huFc γRIIIa_V158; huFc γRIIIa_F158)을 항-His 표면(항-His 항체로 고정된 CM5 센서칩)에서 0.05 ug/ml로 포획하였다. 2.5 μM부터 시작하는 일련의 항체 농도를 1분 동안 주입하고 해리를 3.5분(30 μl/min) 동안 모니터링하였다. 항-His 표면을 10 mM 글리신-HCl pH 1.5(10 μl/분)의 1분 펄스로 재생시킨다.

[0338]

PBST 완충액(1.5 mM KH2PO4, 2.7 mM Na2HPO4-7H2O, 300 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 6.0)에서 25° 에서 Biacore T200 기기에서 SPR에 의해 인간 FcRn(huFcRn) 단백질에 결합하는 항체의 동역학을 측정하였다. huFcRn

을 센서칩_CAP-Streptavidin에 포획하였다. 그 다음 2 μM부터 시작하는 일련의 항체 농도를 1분 동안 주입하고 해리를 1.5분(30 μl/분) 동안 모니터링하였다. 표면을 6 M 구아니딘 염산염, 0.25 M NaOH(10 μl/분)의 2분 펄스 1회를 사용하여 재생시켰다.

[0339] 항원 결합(FACS)

[0340] 인간 및 시노몰거스 표적 항원 둘 다에 결합하는 mAb1 변이체의 결과를 표 9에서 확인할 수 있다. Fc 도메인에 도입된 돌연변이와 관계없이, 표적 항원에 대한 결합은 유사하였다. EC50 값은 인간 표적 항원에 대해 0.65 내지 0.85 nM이었고, EC50 값은 시노몰거스 표적 항원에 대해 1.36 내지 1.78이었다. 조작된 이황화 결합의 도입은 표적 항원에 대한 결합에 영향을 미치지 않았다.

[0341] [표 9]

FACS 에 의해서 측정된 표적 항원에 대한 결합

mAb1 +/- ADE +/- DQ +/- DSB							
ADE +/-	IgG1_ADE	IgG1_ADE	IgG1_ADE	IgG1_ADE	IgG1_ADE	IgG1_ADE	IgG1
DQ +/-	DQ	DQ	DQ	-	-	-	-
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	R292C_V302C	L242C_K334C	-	-
배치	VA2-21-262-1	VA2-21-261-1	VA2-21-266-1	VA2-21-260-1	VA2-21-259-1	VA2-19-943-1	VA2-20-950-1
FACS EC50 (nM) 검정 1 에 의한 결합 n=3							
인간 항원	0.62 ± 0.05	0.59 ± 0.07	0.61 ± 0.04	0.60 ± 0.14	0.60 ± 0.12	0.55 ± 0.09	0.63 ± 0.11
Cyno 항원	1.52 ± 0.22	1.45 ± 0.24	1.52 ± 0.20	1.47 ± 0.19	1.51 ± 0.16	1.38 ± 0.10	1.49 ± 0.13

mAb1 +/- ADLE +/- DQ +/- DSB						
ADLE +/-	IgG1_ADLE	IgG1_ADLE	IgG1_ADLE	IgG1_ADLE	IgG1_ADLE	IgG1
DQ +/-	DQ	DQ	-	-	-	-
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	R292C_V302C	L242C_K334C	-	-
배치	VA2-20-953-1	VA2-20-954-1	VA2-21-268-1	VA2-21-267-1	VA2-20-949-1	VA2-20-950-1
FACS EC50 (nM) 검정 1 에 의한 항원에 대한 결합, n=3						
인간 항원			0.62 ± 0.06	0.62 ± 0.07	0.60 ± 0.14	0.63 ± 0.11
Cyno 항원			1.54 ± 0.16	1.50 ± 0.20	1.48 ± 0.21	1.49 ± 0.13
FACS EC50 (nM) 검정 2 에 의한 항원에 대한 결합, n=1						
인간 항원	0.84	0.85			0.65	0.72
Cyno 항원	1.70	1.67			1.36	1.39

mAb1 +/- DE +/- DQ +/- DSB						
DE +/-	IgG1_DE	IgG1_DE	IgG1_DE	IgG1_DE	IgG1_DE	IgG1
DQ +/-	DQ	DQ	-	-	-	-
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	R292C_V302C	L242C_K334C	-	-
배치	VA2-20-956-1	VA2-20-957-1	VA2-21-270-1	VA2-21-269-1	VA2-20-951-1	VA2-20-950-1
FACS EC50 (nM) 검정 1 에 의한 항원에 대한 결합, n=3						
인간 항원			0.64 ± 0.09	0.62 ± 0.06	0.63 ± 0.11	0.63 ± 0.11
Cyno 항원			1.55 ± 0.28	1.49 ± 0.19	1.50 ± 0.19	1.49 ± 0.13
FACS EC50 (nM) 검정 2 에 의한 항원에 대한 결합, n=1						
인간 항원	0.86	0.75			0.79	0.72
Cyno 항원	1.78	1.62			1.45	1.39

[0342]

[0343] huFc γRIIIa V/F158 동역학 및 FACS

[0344] 인간 Fc γRIIIa 단백질에 대한 mAb의 결합을 SPR 및 FACS로 측정하였다. 결과는 표 10에서 확인할 수 있다. DE, ADE 및 ADLE 돌연변이를 포함하는 Fc 도메인을 갖는 모든 변이체의 경우, Fc γRIIIa V158 또는 F158에 대한 결합은 FACS 및 SPR에 의해서 측정되는 경우 Fc γRIIIa V158 또는 F158에 대한 WT IgG1을 갖는 항체의 결합에 비해 상당히 개선되었다. Fc γRIIIa V158(각각 Fc γRIIIa F158)에 대해 FACS로 측정된 경우 10 내지 100배 개선, SPR로 측정되는 경우 6 내지 20배(각각 18 내지 29배) 개선되었다. 조작된 이황화 결합(L242C/K334C 또는 R292C/V302C)의 도입은 Fc γRIIIa V158 또는 F158에 대한 mAb1 결합에 영향을 미치지 않았다.

[0345] [표 10]

FACS 및 SPR 에 의해서 측정된 FcγRIIIa V158 및 F158 에 대한 결합

mAb1 +/- ADE +/- DQ +/- DSB							
ADE +/-	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1
DQ +/-	DQ	DQ	DQ	-	-	-	-
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	R292C_V302C	L242C_K334C	-	-
배치	VA2-21-262-1	VA2-21-261-1	VA2-21-266-1	VA2-21-260-1	VA2-21-259-1	VA2-19-943-1	VA2-20-950-1
FACS (EC50 nM) 검정 1 에 의한 FcγRIIIa 에 대한 결합, n=3							
V158	10 ± 3	7 ± 4	4 ± 1	12 ± 4	5 ± 2	3 ± 1	186 ± 70
F158	17 ± 1	19 ± 3	13 ± 4	19 ± 1	18 ± 4	9 ± 1	1064 ± 70
SPR (KD nM) 검정 1 에 의한 FcγRIIIa 에 대한 결합, n=3							
V158	214 ± 25	191 ± 18	155 ± 5	172 ± 18	162 ± 4	107 ± 4	1623 ± 153
F158	202 ± 71	211 ± 47	183 ± 14	211 ± 16	193 ± 14	150 ± 6	3870 ± 397

mAb1 +/- ADLE +/- DQ +/- DSB							
ADLE +/-	IgG1 ADLE	IgG1 ADLE	IgG1 ADLE	IgG1 ADLE	IgG1 ADLE	IgG1 ADLE	IgG1
DQ +/-	DQ	DQ	DQ	-	-	-	-
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	R292C_V302C	L242C_K334C	-	-
배치	VA2-20-953-1	VA2-20-954-1	VA2-20-952-1	VA2-21-268-1	VA2-21-267-1	VA2-20-949-1	VA2-20-950-1
FACS (EC50 nM) 검정 1 에 의한 FcγRIIIa 에 대한 결합, n=3							
V158				12 ± 3	5 ± 2	3 ± 1 (2.71 ± 0.42)	186 ± 70
F158				25 ± 3	11 ± 4	4 ± 1 (4.37 ± 0.53)	1064 ± 70
FACS (EC50 nM) 검정 2 에 의한 FcγRIIIa 에 대한 결합, n=1							
V158	26	9				5	244
F158	52	13				7	744
SPR (KD nM) 검정 1 에 의한 FcγRIIIa 에 대한 결합, n=3							
V158			88 ± 4	258 ± 5	161 ± 21	77 ± 4	1623 ± 153
F158			105 ± 7	296 ± 16	148 ± 23	94 ± 3	3870 ± 397
SPR (KD nM) 검정 2 에 의한 FcγRIIIa 에 대한 결합, n=3							
V158	56 ± 4	33 ± 1	28 ± 4			22 ± 2	386 ± 29
F158	70 ± 18	49 ± 2	38 ± 2			46 ± 27	1331 ± 111

mAb1 +/- DE +/- DQ +/- DSB							
DE +/-	IgG1 DE	IgG1 DE	IgG1 DE	IgG1 DE	IgG1 DE	IgG1 DE	IgG1
DQ +/-	DQ	DQ	DQ	-	-	-	-
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	R292C_V302C	L242C_K334C	-	-
배치	VA2-20-956-1	VA2-20-957-1	VA2-20-955-1	VA2-21-270-1	VA2-21-269-1	VA2-20-951-1	VA2-20-950-1
FACS (EC50 nM) 검정 1 에 의한 FcγRIIIa 에 대한 결합, n=3							
V158				4 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	186 ± 70
F158				11 ± 1	24 ± 12	11 ± 3	1064 ± 70
FACS (EC50 nM) 검정 2 에 의한 FcγRIIIa 에 대한 결합, n=1							
V158	7	3				4	244
F158	20	27				18	744
SPR (KD nM) 검정 1 에 의한 FcγRIIIa 에 대한 결합, n=3							
V158			60 ± 5	101 ± 26	109 ± 27	57 ± 5	1623 ± 153
F158			142 ± 11	88 ± 27	297 ± 43	141 ± 8	3870 ± 397
SPR (KD nM) 검정 2 에 의한 FcγRIIIa 에 대한 결합, n=3							
V158	29 ± 2	18 ± 1	19 ± 1			17 ± 1	386 ± 29
F158	50 ± 1	72 ± 6	58 ± 4			48 ± 11	1331 ± 111

[0346]

[0347]

huFcγRIIIa H/R131 동역학 및 FACS

[0348]

인간 FcγRIIIa 단백질에 대한 mAb의 결합을 SPR 및 FACS로 측정하였다. 결과는 표 11에서 확인할 수 있다. DSB R292C_V302C 또는 L242C_K334C 돌연변이가 DQ 돌연변이의 존재 여부에 관계없이 도입되는 경우 IgG1과 비교하여 IgG1_ADE 형식에서 FcγRIIIa에 대한 개선된 친화도가 사라졌다. IgG1_ADLE 또는 DE 형식에서 FcγRIIIa에 대한 친화도는 DSB 돌연변이 유무에 관계없이 낮게 유지되었다.

[0349] [표 11]

FACS 및 SPR 에 의해서 측정된 FcγRIIIa H131 및 R131 에 대한 결합

mAb1 +/- ADE +/- DQ +/- DSB							
ADE +/- DQ +/-	IqG1 ADE DQ	IqG1 ADE DQ	IqG1 ADE DQ	IqG1 ADE DQ	IqG1 ADE DQ	IqG1 ADE DQ	IqG1
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	R292C_V302C	L242C_K334C	-	-
배치	VA2-21-262-1	VA2-21-261-1	VA2-21-266-1	VA2-21-260-1	VA2-21-259-1	VA2-19-943-1	VA2-20-950-1
FACS (EC50 nM) 검정 1 에 의한 FcγRIIIa 에 대한 결합, n=3							
H131	101 ± 33	68 ± 27	14 ± 2	92 ± 12	102 ± 34	20 ± 2	341 ± 64
R131	45 ± 21	152 ± 56	18 ± 5	43 ± 12	142 ± 19	20 ± 1	303 ± 27

mAb1 +/- ADLE +/- DQ +/- DSB				
ADLE +/- DQ +/-	IqG1 ADLE DQ	IqG1 ADLE DQ	IqG1 ADLE DQ	IqG1
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	-
배치	VA2-21-268-1	VA2-21-267-1	VA2-20-949-1	VA2-20-950-1
FACS (EC50 nM) 검정 1 에 의한 FcγRIIIa 에 대한 결합, n=3				
H131	155 ± 28	145 ± 85	70 ± 12	341 ± 64
R131	144 ± 19	428 ± 170	85 ± 14	303 ± 27

mAb1 +/- DE +/- DQ +/- DSB				
DE +/- DQ +/-	IqG1 DE DQ	IqG1 DE DQ	IqG1 DE DQ	IqG1
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	-
배치	VA2-21-270-1	VA2-21-269-1	VA2-20-951-1	VA2-20-950-1
FACS (EC50 nM) 검정 1 에 의한 FcγRIIIa 에 대한 결합, n=3				
H131	337 ± 142	319 ± 55	106 ± 29	341 ± 64
R131	254 ± 6	319 ± 8	198 ± 44	303 ± 27

[0350]

[0351] huFcRn 동역학 및 FACS

[0352] huFcRn 결합 연구의 결과를 표 12에서 확인할 수 있다. DQ 돌연변이를 갖는 Fc 변이체를 갖는 모든 mAb의 경우, huFcRn에 대한 결합은 DQ 돌연변이를 갖지 않는 Fc에 비해 개선되었다. DSB의 도입은 Fc가 DQ 돌연변이를 함유할 때 이러한 개선을 유지하였다.

[0353] [표 12]

FACS 및 SPR 에 의해서 측정된 huFcRn 에 대한 결합

mAb1 +/- ADE +/- DQ +/- DSB							
ADE +/- DQ +/-	IqG1 ADE DQ	IqG1 ADE DQ	IqG1 ADE DQ	IqG1 ADE DQ	IqG1 ADE DQ	IqG1 ADE DQ	IqG1
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	R292C_V302C	L242C_K334C	-	-
배치	VA2-21-262-1	VA2-21-261-1	VA2-21-266-1	VA2-21-260-1	VA2-21-259-1	VA2-19-943-1	VA2-20-950-1
SPR (KD nM) 검정 1 에 의한 huFcRn 에 대한 결합, n=3							
	198 ± 3	161 ± 19	217 ± 2	1310 ± 221	829 ± 129	1040 ± 155	1210 ± 81

mAb1 +/- ADLE +/- DQ +/- DSB							
ADLE +/- DQ +/-	IqG1 ADLE DQ	IqG1 ADLE DQ	IqG1 ADLE DQ	IqG1 ADLE DQ	IqG1 ADLE DQ	IqG1 ADLE DQ	IqG1
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	R292C_V302C	L242C_K334C	-	-
배치	VA2-20-953-1	VA2-20-954-1	VA2-20-952-1	VA2-21-268-1	VA2-21-267-1	VA2-20-949-1	VA2-20-950-1
SPR (KD nM) 검정 1 에 의한 huFcRn 에 대한 결합, n=3							
		193 ± 15	1130 ± 111	965 ± 126	993 ± 153		1210 ± 81
SPR (KD nM) 검정 2 에 의한 huFcRn 에 대한 결합, n=3							
	184 ± 11	156 ± 20	196 ± 27		811 ± 28		941 ± 130

mAb1 +/- DE +/- DQ +/- DSB							
DE +/- DQ +/-	IqG1 DE DQ	IqG1 DE DQ	IqG1 DE DQ	IqG1 DE DQ	IqG1 DE DQ	IqG1 DE DQ	IqG1
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	R292C_V302C	L242C_K334C	-	-
배치	VA2-20-956-1	VA2-20-957-1	VA2-20-955-1	VA2-21-270-1	VA2-21-269-1	VA2-20-951-1	VA2-20-950-1
SPR (KD nM) 검정 1 에 의한 huFcRn 에 대한 결합, n=3							
		199 ± 6	864 ± 271	798 ± 88	996 ± 104		1210 ± 81
SPR (KD nM) 검정 2 에 의한 huFcRn 에 대한 결합, n=3							
	234 ± 41	169 ± 15	249 ± 41		761 ± 89		941 ± 130

[0354]

[0355] 실시예 4: 안정화된 mAb2 변이체의 결합 매개변수

[0356] 방법 및 물질

[0357] 표면 플라즈몬 공명 검정

[0358] 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 을 사용한 Fc γ 수용체 결합

[0359] 재조합 인간 Fc γ RIIIa-V158에 대한 항체 결합의 분석을 항-His 포획을 사용하여 Biacore T200 기기에서 수행하였다. 항-테트라 His(Qiagen)를 PBS pH 7.2(Gibco)로 완충제 교환시키고, 10 mM 아세트산나트륨 pH 4.0에서 25 μ g/ml로 희석시키고, GE Healthcare에서 제공하는 아민 커플링 키트를 사용하여 약 10,000 RU의 표면 밀도로 시리즈 S CM5 칩에 직접 고정시켰다. His-태깅된 재조합 인간 Fc γ RIIIa-V158(자체 생산)을 HBS-EP+(10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% 계면활성제 P20)에 0.5 및 1 μ g/ml로 희석시키고, 10 μ l/분 유량에서 30초 동안 주입하여 6 및 14 RU의 포획 수준을 얻었다. mAb2-wt 항체를 3000내지 37 nM로 3배 연속 희석시켰고, mAb2-DE 항체를 전개 완충액에서 111, 37, 12 및 4 nM로 희석시켰고 포획된 수용체 상에 2분 동안 이중으로 주입시킨 후 완충액에서 2분 동안 해리시켰다. 표면을 10 mM 글리신 pH 1.5로 30초 동안 재생시켰다. 센서그램을 BiaEvaluation 소프트웨어(GE Healthcare)를 사용하여 처리하고 1:1 결합 모델에 피팅하여 동역학 상수를 얻었다. 보고된 KD를 두 포획 수준 모두로부터 평균 내었다.

[0360] 표면 플라즈몬 공명(SPR)을 사용한 FcRn 수용체 결합

[0361] 재조합 인간, 시노물거스(cyno) 및 마우스 FcRn에 대한 항체 결합의 분석을 항-Fab 포획 방법을 사용하여 Carterra LSA 기기에서 수행하였다. 염소 항-인간 IgG(F(ab')₂ 특이적)(Jackson Labs)를 10 mM 아세트산나트륨 pH 4.5에서 20 μ g/ml로 희석시키고, 25 mM MES pH 6.0, 0.05% Tween-20 전개 완충액에서 Carterra에서 제공된 아민 커플링 시약을 사용하여 약 9,000 RU의 표면 밀도로 HC200M 칩에 직접 고정시켰다. mAb2 항체를 PBSP+ pH 6.0(20 mM NaPi, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, 0.05% 계면활성제 P20)에서 6 및 15 μ g/ml의 포획 어레이 형식으로 항-Fab 표면에 별도의 사분면으로 이중으로 인쇄하였다. FcRn(자체 생산)의 각각의 중을 PBSP+ pH 6.0에서 2배 연속 희석시키고, 2분 또는 3분 회합 후 5분 해리 동안 포획된 mAb2 상에 주입하여 pH 6.0에서 친화도를 측정하였다. 각각의 농도 시리즈는 총 10개 농도의 FcRn을 함유하였고, 최고 농도는 FcRn 중 특이적이다: 4000 nM, 2000 nM cyno, 및 500 nM 마우스 FcRn. 적절한 블랭크 차감을 위해 수용체 주입 사이에 완충액 주입을 균등하게 분배하였다. pH 7.4에서 FcRn 결합을 측정하기 위해, mAb2 항체를 상기에 기재된 바와 같이 포획하였고, 인간 및 cyno FcRn을 1000 nM로 희석시키고, 마우스 FcRn을 PBSP+ pH 7.4에서 500 nM로 희석시키고, 2분 회합 후 2분 해리 동안 포획된 mAb2 상에 주입하였다. 센서그램을 Carterra K.I.T. Inspection Tool로 처리하고, 1:1 결합 모델에 피팅하여 pH 6.0에서 동역학 상수를 얻거나 pH 7.4에서 회합 단계가 끝날 때 정상 상태 반응을 계산하였다. 보고된 결합 친화도를 인간 FcRn에 대한 2개의 개별 검정 실험 및 cyno 및 마우스 FcRn에 대한 단일 검정 실험으로부터의 모든 mAb2 프린트에서 평균 내었다.

[0362] 결과:

[0363] [표 13]

huFcγRIIIa-V158에 대한 결합 친화도

mAb2 변이체	WT 대조군	WT	_DE	_DE
		R292C_V302C		R292C_V302C
검정				
huFcγRIIIa-V158 (SPR)결합, KD (M)	3.97E-07	5.24E-07	1.33E-08	1.83E-08

[0364]

[0365] huFcγRIIIa-V158에 대한 결합에 대한 SPR 결과는 mAb2-wt, mAb2-R292C/V302C에 대해 대등한 친화도를 나타낸다. mAb2-DE 및 mAb2-DE-R292C/V302C는 WT 또는 WT 변이체보다 huFcγRIIIa-V158에 대해 22 내지 39배 더 높은 결합 친화도를 나타내며, 서로 대등한 친화도를 갖는다.

[0366] [표 14]

pH 6.0 에서 FcRn 에 대한 결합 친화도

mAb2 (IgG1)	WT	WT	_DE	_DE
	대조군	R292C_V302C		R292C_V302C
검정				
huFcRn (SPR)에 대한 결합, KD (nM)	103.23 ± 530.64	111.58 ± 551.15	83.83 ± 506.15	50.61 ± 509.15
cyFcRn (SPR)에 대한 결합, KD (nM)	313.41 ± 35.52	324.54 ± 120.97	349.73 ± 70.81	325.91 ± 39.44
moFcRn (SPR)에 대한 결합, KD (nM)	146.64 ± 21.77	147.51 ± 59.87	142.08 ± 40.41	142.09 ± 21.06

[0367]

[0368] 결과는 mAb2-wt 또는 mAb2-DE에 대한 R292_V302C 돌연변이의 첨가가 인간, cyno 또는 마우스 FcRn에 대한 결합 친화도에 유의한 영향을 미치지 않았음을 나타낸다. 친화도는 각각의 종에 대한 모든 분자에 대해 대등하였다.

[0369] [표 15]

pH 7.4 에서 FcRn 에 대한 정상 상태 결합 반응

mAb2 (IgG1)	WT 대조군	WT	_DE	_DE
		R292C_V302C		R292C_V302C
배치				
huFcRn(SPR)에 대한 결합, 정상 상태 반응(RU)	0.06 ± 0.83	-0.03 ± 0.95	0.28 ± 0.18	0.08 ± 1.06
cyFcRn(SPR)에 대한 결합, 정상 상태 반응(RU)	0.32 ± 0.68	0.20 ± 0.77	0.36 ± 0.74	0.20 ± 0.83
moFcRn(SPR)에 대한 결합, 정상 상태 반응(RU)	0.87 ± 0.95	0.66 ± 1.14	0.54 ± 0.91	0.58 ± 0.19

[0370]

[0371] 결과는 시험된 조건 하에서 중성 pH에서 mAb2 분자 중 어느 것도 인간, cyno 또는 마우스 FcRn에 결합하지 않았음을 나타낸다.

[0372] **실시예 5: 인간 CD16a에 대한 안정화된 mAb3 변이체의 결합 매개변수**

[0373] mAb3 및 mAb4 둘 다는 CD16a에 결합할 수 있는 Fc 도메인을 보유한다. DSB 치환(R292C/V302C)이 CD16a 결합을 제거하지 않는다는 것을 입증하기 위해 CD16a에 대한 결합을 측정하였다. 표 16에 나타난 바와 같이, 모든 DSB 변이체는 DE 또는 ADE 변이체 단독과 비교하여 두 CD16a 변이체(V158 또는 F158) 모두에 동등하거나 더 큰 결합을 가졌다.

[0374] [표 16]

인간 CD16a 에 대한 mAb3 및 mAb4 결합 매개변수

항체	huCD16a (V158)에 대한 결합, KD [nM]	huCD16a (F158)에 대한 결합, KD [nM]
mAb3 WT	705 ± 214	1265 ± 287
mAb3-DE	66 ± 25	67.2 ± 11
mAb3-ADE	113 ± 40	87.5 ± 6
mAb3-DE-DSB (R292C/V302C)	110	113
mAb3-ADE-DSB (R292C/V302C)	165	121
mAb4	618 ± 59	1376 ± 456
mAb4-DE	87 ± 48	63.5
mAb4-ADE	116 ± 37	86.9
mAb4-DE-DSB (R292C/V302C)	87	80.4 ± 9
mAb4-ADE-DSB (R292C/V302C)	155	114

[0375]

[0376] 실시예6: 이황화 결합 안정화된 변이체의 시험관내 특징규명

[0377] **mAb1**

[0378] A - 시험관내에서 보체-의존적 세포독성(CDC)을 유도하는 변이체의 능력의 평가

[0379] 물질 및 방법:

[0380] mAb1의 CDC 능력을 표적을 발현하는 DND41 세포주(T-ALL, T 세포 급성 림프구성 백혈병 세포, Leukemia 8:425-434(1994))를 사용하여 평가하였다. 세포를 RHPB 배지(페놀 레드가 없는 RPMI 1640, 0.1% BSA, 2mM HEPES, 2mM 글루타민)에 3.106으로 현탁시켰다.

[0381] 세포를 96웰 플레이트에 웰당 1.5 x 10⁵개 세포로 플레이팅하고, 희석 인자 2를 사용하여 167.5 nM에서 0.08 nM 까지 연속 희석 농도로 25 μl의 항체 변이체와 함께 4°C에서 30분 동안 사전 인큐베이션시켰다.

[0382] 제2 단계에서, 웰당 25 μl의 인간 보체를 첨가하고(Sigma, Ref: S1764-1ml, 1ml H2O + 4ml RHPB에 재현탁), 플레이트를 5.5% CO₂와 함께 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다. WST-1 용액(Roche, Ref 11 644 807 001; 10 μl/웰)을 첨가하고, 플레이트를 5.5% CO₂와 함께 37°C에서 2시간 동안 다시 인큐베이션시켰다.

[0383] 제조사의 프로토콜에 따라 SpectraMax Plus 분광 광도계(Molecular Devices)에서 440 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 지점을 3중으로 수행하였다.

[0384] 생존율(%)을 다음과 같이 계산하였다.

[0385] $생존율 \% = ((OD_샘플 - OD_배지) \times 100) / OD_항체가\ 없는\ 세포 - OD_배지$.

[0386] OD: 광학 밀도

[0387] 데이터는 3회의 독립적인 실험의 요약이다.

[0388] 보고된 결과는 사망률의 IC50 값, CV 및 델타의 기하 평균(표 17 내지 표 19)일뿐만 아니라 ADE 형식, ADLE 형식 및 DE 형식의 CDC 활성에 대한 대표적인 예이다(도 11, 도 12 및 도 13). 값은 Biost@t-SPEED v2.4를 사용하여 계산하였다.

[0389] 결과:

[0390] [표 17]

mAb1 +/- ADLE, DE 또는 ADE +/- DSB(L242C_K334C 또는 R292C_V302C)에 대한 CDC 활성

IC50 값

가변 영역	mAb1									
	iso ADLE	ADLE L242C_K334C	ADLE R292C_V302C	iso DE	DE R292C_V302C	DE L242C_K334C	iso ADE	ADE R292C_V302C	ADE L242C_K334C	WT 대조군
배치	VA2-20-034.2	VA2-21-267-1	VA2-21-268-1	VA2-20-1117-1	VA2-21-270-1	VA2-21-269-1	VA2-19-943-1	VA2-21-260-1	VA2-21-259-2	VA2-20-950-1
IC50 (nM)	NA	NA	NA	3,03	1,89	3,11	3,49	3,33	4,13	2,10
IC50 [95%CI]	NA	NA	NA	[2,63 ; 3,49]	[1,75 ; 2,04]	[2,56 ; 3,77]	[3,12 ; 3,92]	[3,06 ; 3,61]	[3,62 ; 4,71]	[1,88 ; 2,34]
IC50 CV %	NA	NA	NA	6,59	3,66	8,94	5,43	4,07	6,25	5,08
델타(상단-하단) %	NA	NA	NA	79,56	88,63	72,93	68,29	70,16	59,99	87,19

[0391] NA: 피팅 얻지 못함

[0392] ADLE 형식 및 ADLE 형식을 포함하는 모든 추가적인 돌연변이에서는 CDC 활성이 검출되지 않는다(표 17 및 도 11). CDC 활성은 DE 또는 ADE 형식에서 측정되며 DE 또는 ADE 형식에 도입된 추가적인 이황화 결합 돌연변이에서는 변경되지 않는다.

[0393] [표 18]

mAb1 +/- ADLE, DE 또는 ADE +/- DQ +/- R292C_V302C 에 대한 CDC 활성 IC50 값

가변 영역	mAb1									
	iso ADLE	ADLE DQ	ADLE DQ_R292C_V302C	iso DE	DE DQ	DE DQ_R292C_V302C	iso ADE	ADE DQ	ADE DQ_R292C_V302C	WT 대조군
배치	VA2-20-034.2	VA2-20-952-1	VA2-20-953-1	VA2-20-1117-1	VA2-20-955-1*	VA2-20-956-1**	VA2-19-943-1	VA2-21-266-1	VA2-21-262-1	VA2-20-950-1
IC50 (nM)	NA	NA	NA	3,12	2,84	3,87	3,17	NA	NA	2,01
IC50 [95%CI]	NA	NA	NA	[2,72 ; 3,58]	[2,31 ; 3,49]	[2,93 ; 5,12]	[2,82 ; 3,57]	NA	NA	[1,78 ; 2,27]
IC50 CV %	NA	NA	NA	6,38	10,17	13,56	5,58	NA	NA	5,85
델타(상단-하단) %	NA	NA	NA	87,47	87,60	44,51	80,22	NA	NA	88,32

*3 개 검정 중 1 개에서만 피팅을 얻음

**3 개 검정 중 2 개에서 피팅을 얻음

[0394]

[0395] ADLE 형식 및 추가적인 DQ 및 R292C_V302C 이황화 결합 돌연변이에서는 CDC 활성이 검출되지 않았다. 반면에 CDC 활성은 DE 형식 및 ADE 형식에서 측정되었다. 추가적인 DQ 및 R292C_V302C 이황화 결합 돌연변이가 DE 형식에 도입된 경우 활성이 감소하였다. 추가적인 DQ 및 R292C_V302C 이황화 결합 돌연변이가 ADE 형식에 도입된 경우 CDC 활성이 손실되었다(표 18 및 도 12).

[0396] [표 19]

mAb1 + ADLE, DE 또는 ADE +/- DQ +/- L242C_K334C 에 대한 CDC 활성 IC50 값

가변 영역	mAb1										
	IgG1	iso ADLE	ADLE DQ	ADLE DQ_L242C_K334C	iso DE	DE DQ	DE DQ_L242C_K334C	iso ADE	ADE DQ	ADE DQ_L242C_K334C	WT 대조군
배치	VA2-20-034.2	VA2-20-952-1	VA2-20-954-1	VA2-20-1117-1	VA2-20-955-1*	VA2-20-957-1*	VA2-19-943-1**	VA2-21-266-1	VA2-21-261-1	VA2-20-950-1	
IC50 (nM)	NA	NA	NA	2,65	5,62	5,25	2,46	NA	NA	2,44	
IC50 [95% CI]	NA	NA	NA	[2,34 ; 3,01]	[3,18 ; 9,95]	[3,12 ; 8,85]	[2,19 ; 2,76]	NA	NA	[2,14 ; 2,79]	
IC50 CV %	NA	NA	NA	5,98	28,57	26,06	5,18	NA	NA	6,46	
델타(상단-하단) %	NA	NA	NA	89,47	29,77	25,36	82,94	NA	NA	76,02	

[0397]

[0398]

ADLE 형식 및 추가적인 DQ 및 L242C_K334C 이항화 결합 돌연변이에서는 CDC 활성이 검출되지 않았다. 반면에 CDC 활성은 DE 형식 및 ADE 형식에서 측정되었다. 추가적인 DQ 및 L242C_K334C 이항화 결합 돌연변이가 DE 형식에 도입된 경우 활성이 감소하였다. 추가적인 DQ 및 L242C_K334C 이항화 결합 돌연변이가 ADE 형식에 도입된 경우 CDC 활성이 손실되었다(표 19 및 도 13).

[0399]

B - 시험관내에서 항체-의존적 세포 세포독성(ADCC)을 유도하는 변이체의 능력의 평가

[0400]

물질 및 방법:

[0401]

ADCC 능력을 표적 세포로서 mAb1에 의해 인식되는 항원을 발현하는 LP1 세포주(MM, 인간 다발성 골수종 세포, Blood. 1989 Mar;73(4):1020-7) 및 효과기 세포로서 자연 살해 세포주 NK92 FCGR3A 158V(Conkwest)를 사용하여 평가하였다.

[0402]

표적 세포를 칼세인-아세톡시메틸(2 mM; Invitrogen, Ref C3100MP)로 표지하고 검정 배지(페놀 레드가 없는 RPMI 1640, 1% SVF, 0.77 mg/ml Probenecid, Invitrogen, P36400)에 2×10^5 로 재현탁시켰다.

[0403]

표적 세포(T)를 96웰 플레이트에 웰당 2×10^4 개 세포로 시딩하고, IgG1 야생형의 경우 희석 인자 3을 사용하여 2.3 nM에서 시작하고, ADLE, ADE 및 DE 변이체의 경우 희석 인자 7을 사용하여 1.25 nM부터 시작하는 연속 희석 농도에서 5% CO₂ 및 50 μl의 항체 변이체와 함께 37°C에서 30분 동안 사전 인큐베이션시켰다.

[0404]

최대 칼세인 방출 수준의 양성 대조군으로서, 표적 세포를 0.5% 트리톤과 함께 인큐베이션시킨다.

[0405]

효과기 세포(E)를 검정 배지에 6×10^5 개로 재현탁시키고, 100 μl 또는 6×10^4 개 효과기 세포를 웰당 표적 세포에 첨가한다(T:E 비율 1:3). 5% CO₂, 37°C에서 3시간 동안 인큐베이션시킨 후, 배양 상청액 100 μl를 검은색 96웰 플레이트로 옮기고 칼세인 방출을 492 nm 여기 및 515 nm 방출에서 EnVision 2104 플레이트 판독기(PerkinElmer)의 형광으로 측정하였다. 각각의 지점을 3중으로 수행하였다.

[0406]

세포독성 %를 다음과 같이 계산하였다.

[0407]

세포독성 % = ((RLU_샘플 - RLU 배지) × 100) / (RLU_양성 대조군 Triton - RLU 배지).

[0408]

RLU: 상대 광 단위

[0409]

데이터는 적어도 3회의 독립적인 실험의 요약이다. 각각의 변이체 및 각각의 실험에 대해, IC50 값 및 사망률 백분율의 델타를 계산하였다. 보고된 결과는 IC50 값, CV 및 사망률의 델타의 기하 평균(표 20)일뿐만 아니라 ADLE 형식, ADE 형식 및 DE 형식의 ADCC 활성에 대한 대표적인 예이다(도 14 내지 도 16). 값은 Biost@t-SPEED v2.4를 사용하여 계산하였다.

[0410]

결과:

[0411] [표 20]

mAb1 +/-ADLE, DE 또는 ADE +/-DSB (L242C_K334C 또는 R292C_V302C)에 대한 ADCC 활성

IC50 값

가변 영역	mAb1									
	iso ADLE	ADLE L242C_K334C	ADLE R292C_V302C	iso DE	DE R292C_V302C	DE L242C_K334C	iso ADE	ADE R292C_V302C	ADE L242C_K334C	WT 대조군
배치	VA2-20-034.2	VA2-21-267-1	VA2-21-268-1	VA2-20-1117-1	VA2-21-270-1	VA2-21-269-1	VA2-19-943-1	VA2-21-260-1	VA2-21-259-2	VA2-20-950-1
IC50 (nM)	2.51E-04	4.08E-04	4.86E-04	4.51E-04	3.56E-04	4.01E-04	1.67E-04	5.41E-04	5.45E-04	1.76E-02
IC50 [95%CI]	[1.65E-04; 3.84E-04]	[2.66E-04; 6.27E-04]	[2.92E-04; 8.07E-04]	[2.59E-04; 7.86E-04]	[2.41E-04; 5.27E-04]	[2.65E-04; 6.07E-04]	[1.09E-04; 2.56E-04]	[2.77E-04; 1.06E-03]	[3.51E-04; 8.48E-04]	[1.19E-02; 2.60E-002]
IC50 CV %	20.91	19.91	24.01	25.10	19.01	19.61	20.58	30.43	21.72	19.16
멜타(상단-하단) %	48.18	43.52	47.05	53.71	45.51	48.73	44.70	45.26	47.63	51.23

NA: 피팅 얻지 못함

[0412]

[0413]

ADLE 형식으로 측정된 ADCC 활성은 DSB 돌연변이 L242C_K334C 또는 R292C_V302C가 이 형식에 도입된 경우 동일한 범위에서 유지되었다. 유사하게, DE 및 ADE 형식으로 측정된 ADCC 활성은 이들 DSB 돌연변이가 이들 형식에 도입된 경우 유지되었다(표 20 및 도 14).

[0414]

[표 21]

mAb1 +/- ADLE, DE 또는 ADE +/- DQ +/- R292C_V302C 에 대한 ADCC 활성 IC50 값

가변 영역	mAb1									
	iso ADLE	ADLE DQ	ADLE R292C_V302C	iso DE	DE DQ	DE R292C_V302C	iso ADE	ADE DQ	ADE R292C_V302C	WT 대조군
배치	VA2-20-034.2	VA2-20-952-1	VA2-20-953-1	VA2-20-1117-1	VA2-20-955-1	VA2-20-956-1	VA2-19-943-1	VA2-21-266-1	VA2-21-262-1	VA2-20-950-1
IC50 (nM)	8.11E-05	1.03E-04	1.71E-04	1.08E-04	9.01E-05	1.16E-04	1.13E-04	1.44E-04	2.97E-04	1.60E-02
IC50 [95%CI]	[4.83E-05; 1.36E-04]	[6.58E-05; 1.63E-04]	[1.06E-04; 2.75E-04]	[6.54E-05; 1.79E-04]	[6.52E-05; 1.25E-04]	[7.21E-05; 1.86E-04]	[8.21E-05; 1.54E-04]	[9.12E-05; 2.28E-04]	[2.11E-04; 4.17E-04]	[9.58E-03; 2.67E-02]
IC50 CV %	25.05	21.98	23.54	24.30	15.94	23.37	15.54	19.86	16.74	24.61
멜타(상단-하단) %	46.26	43.43	42.02	43.22	45.12	41.80	42.15	42.10	39.71	46.07

[0415]

[0416]

ADLE 형식으로 측정된 ADCC 활성은 R292C_V302C가 있거나 없는 추가적인 DQ 돌연변이가 이 형식에 도입된 경우 동일한 범위에서 유지되었다. 유사하게, DE 및 ADE 형식으로 측정된 ADCC 활성은 R292C_V302C가 있거나 없는 추가적인 DQ 돌연변이가 이러한 형식에 도입된 경우 유지되었다(표 21 및 도 15).

[0417] [표 22]

mAb1 +/- ADLE, DE 또는 ADE +/- DQ +/- DSB L242C_K334C 에 대한 ADCC 활성 IC50 값

가변 영역	mAb1									
	iso ADLE	ADLE DQ	ADLE L242C_K334C	iso DE	DE DQ	DE L242C_K334C	iso ADE	ADE DQ	ADE L242C_K334C	WT 대조군
배치	VA2-20-034.2	VA2-20-952-1	VA2-20-954-1	VA2-20-1117-1	VA2-20-955-1	VA2-20-957-1	VA2-19-943-1	VA2-21-266-1	VA2-21-261-1	VA2-20-950-1
IC50 (nM)	8,11E-05	1,03E-04	1,54E-04	1,08E-04	9,01E-05	1,54E-04	1,13E-04	1,44E-04	1,62E-04	1,60E-02
IC50 [95%CI]	[4,83-05; 1,36E-04]	[6,58E-05; 1,63E-04]	[1,00E-04; 2,37E-04]	[6,54E-05; 1,79E-04]	[6,52E-05; 1,25E-04]	[1,08E-04; 2,20E-04]	[8,21E-05; 1,54E-04]	[9,12E-05; 2,28E-04]	[1,07E-04; 2,46E-04]	[9,58E-03; 2,67E-02]
IC50 CV %	25,05	21,98	20,60	24,30	15,94	17,45	15,54	19,86	19,53	24,61
멜타(상단-하단) %	46,26	43,43	46,62	43,22	45,12	44,93	42,15	42,10	39,20	46,07

[0418]

[0419] ADLE 형식으로 측정된 ADCC 활성은 L242C_K334C가 있거나 없는 추가적인 DQ 돌연변이가 이 형식에 도입된 경우 동일한 범위로 유지되었다. 유사하게, DE 및 ADE 형식으로 측정된 ADCC 활성은 L242C_K334C가 있거나 없는 추가적인 DQ 돌연변이가 이러한 형식에 도입된 경우 유지되었다(표 22 및 도 16).

[0420] **mAb3**

[0421] ADE 또는 DE 치환과 조합된 DSB 치환을 갖는 항체의 효력이 손실되지 않았음을 입증하기 위해서, mAb3을 사용하여 세포독성 검정을 수행하였다.

[0422] 도 17에 나타난 바와 같이, DSB 치환(R292C_V302C)의 포함은 ADE 또는 DE 배경에서 mAb3의 활성에 영향을 미치지 않았다.

[0423] **실시예 7: 이황화 결합 안정화된 변이체의 PK 분석**

[0424] 이 예에서는 DSB 안정화 변이체가 PK 프로파일에 미치는 영향을 설명한다.

[0425] **mAb1**

[0426] 물질 및 방법:

[0427] 마우스 실험을 C57BL/6 마우스로부터 유래된 동형접합성 트랜스제닉 Tg32(B6.Cg-Fcgrt^{tm1Dcr}Tg(FCGRT)32Dcr/DcrJ) 마우스에서 수행하였고, 이것은 Jackson Laboratory(미국 메인주 바 하버 소재)에서 구입하였다. FcRn^{-/-} hFcRn(세포주 32) Tg 마우스는 마우스 유전자 및 이의 자연 인간 프로모터의 제어 하에 hFcRn α-쇄 트랜스진을 발현하는 트랜스진에 대한 넬 돌연변이를 보유한다.

[0428] 모든 마우스는 연구 시작 시 8주에서 12주 사이에 치료 경험이 없는 암컷이었다. 투여를 위해, 항체를 DPBS 1X 제형 완충액에서 제조하고, 1 mg/kg의 단일 정맥내 투여량으로 10 ml/kg의 투여량으로 꼬리 정맥에 투여하였다. 28일의 연구 기간에 걸쳐 일련의 샘플링 접근법(0.08, 4, 24, 72, 168, 240, 336, 504 및 672시간)을 사용하여 각각의 항체에 대해 총 3마리의 동물 복제물을 평가하였다. 샘플링 시간별로 혈액 샘플(약 20 μl)을 수집하였다. 혈액 샘플을 1500 g에서 10분 동안 4°C에서 원심분리시키고, 혈장 샘플 6 μl를 DPBS 1X 60μl에 희석시킨 후 분석할 때까지 -80°C에서 보관하였다.

[0429] mAb1 WT 항체의 경우, 각각의 시점에서의 각각의 항체의 농도를 다음의 일반적인 방법을 사용하여 상향식 LC-MS/MS 검정으로 결정하였다. 혈장 분취물을 침전시킨 후, 혈장 펠릿을 단백질 변성, 환원, 알킬화, 트립신 소화 및 고체상 추출시킨 후 대용 펩티드를 분석하였다. mAb1의 경쇄에 속하는 17개 아미노산 잔기의 서열에 상응하는 대용 펩티드를 선택성 및 반응 인자에 따라 정량화를 위해 각각의 항체에 대해 선택하였다. 항체를 혈장에 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 및 400 μg/ml로 스파이킹하여 보정 표준을 준비하였다. 역상 XBridge BEH C18 컬럼(2.1x150 mm, 3.5 μm, 300 Å, Waters)을 사용하는 Waters Acquity UPLC 시스템에서 수 중 0.1% 포름산 및 아세트오닐트릴 중 0.1% 포름산의 단계별 구배에서 300 μl/분의 유량으로 펩티드 분리를 수행하였다. 검출을 위해 Sciex API6500+ 질량 분석기를 양이온 모드에서 사용하였고 소스 온도는 700°C, 이온스프레이 전압은 5500 V, 커튼 및 분무기 가스는 40, 충돌 가스는 중간이었다. 체류 시간은 30 ms였고, 각각의 전환에 대한 진입 전위는 10 V였다. 디클러스터링 전위는 90 V였고, 충돌 에너지는 26V였다. 항체의 고유한 대용 펩티드의 다중 반응

모니터링 전이(626.0 ^a 807.4 m/z)를 Analyst 소프트웨어의 MQIII 통합 알고리즘으로부터의 피크 면적을 사용하여 표준 및 대조군에 대한 농도 측정에 사용하였다.

[0430] mAb1 변이체(ADE, DE, ADLE, DE-DQ 및 ADLE-DQ 변이체)의 경우, 각각의 시점에서의 각각의 항체의 농도는 Gyrolab 플랫폼(Gyros)을 사용하는 일반적인 면역검정 방법으로 결정하였고, 이는 단계식 샌드위치 형식이었다. 샘플(표준품, 품질 제어 및 연구 샘플)을 완충액에 100배 희석시켜 96웰 마이크로타이터 플레이트에 분배하였다. 포획 및 검출 시약을 두 번째 96웰 마이크로타이터 플레이트에 분배하였다. 그 다음 96웰 마이크로타이터 플레이트 및 bioaffy CD(CD200 - 112개의 미세구조 분절 포함)를 Gyrolab 플랫폼에 로딩하였다. 다음 단계는 Gyrolab 플랫폼에 의해 자동으로 시작되었다: Gyrolab Bioaffy 디스크(CD200) 내의 스트렙타비딘 비드 컬럼에 비오틴화된 당나귀 항 hu-IgG(포획)의 첨가, 그 다음 표준품, 품질 제어 및 연구 샘플의 분포, 그 다음 AlexaFluor-염소 항 hu-IgG(검출)의 첨가. 1%로 설정된 포토멀티플리케이터(photomultiplier)를 사용하여 각각의 미세구조 분절에서 컬럼 내 형광 측정(λ_{exc} 633 nm, λ_{emm} 650 nm)을 수행하였다. 모든 분석을 이중으로 수행하였고, 정량 범위는 100 내지 200,000ng/ml였다.

[0431] PK 매개변수를 Phoenix WinNonlin 버전 8.1(Certara L.P.)의 비구획 분석을 사용하여 개별 동물 데이터로부터 결정하였다.

[0432] 전형적인 ADA 간섭의 급격한 농도 저하를 나타낸 mAb1-ADLE_DQ_L242C_K334C를 투여한 동물 1마리로부터의 PK 프로파일은 PK 계산에서 제외하였다. mAb1-DE_DQ_R292C_V302C를 투여한 동물 한 마리도 투여량 문제로 인해 PK 분석에서 제외하였다.

[0433] 결과:

[0434] [표 23]

Tg32 마우스에서 시험된 상이한 항체의 PK 매개변수의 요약(평균(CV%))

mAb1 화합물	C0	AUC	CL	Vss	t1/2z
	($\mu\text{g/mL}$)	(일* $\mu\text{g/mL}$)	(mL/일/kg)	(mL/kg)	(일)
ADLE-DQ	22.9	42.6	23.5	97.3	3
ADLE-DQ-L242C/K334C	19.0	219	4.59	119	19
ADLE-DQ-R292C/V302C	18.1	244	4.49	136	23
DE-DQ	15.5	60.3	16.9	180	9
DE-DQ-L242C/K334C	13.5	150	6.89	152	16
DE-DQ-R292C/V302C	14.7	157	6.51	145	16
WT	19.7	127	7.88	163	16

[0435]

[0436] DE_DQ 및 ADLE_DQ에 대한 2개의 DSB 위치(L242C-K334C 및 R292C-V302C)에서 유사한 PK 프로파일 및 매개변수가 관찰되었다. DSB 위치는 DE_DQ 및 ADLE_DQ 돌연변이 작제물의 PK 특성을 개선시켰는데, 제거 반감기가 3 내지 9 배 증가하고 청소율이 4 내지 10배 감소하였다. ADLE_DQ_DSB의 제거 반감기는 WT보다 약간 긴 반면, DE_DQ_DSB의 t1/2z는 WT와 유사하였다(도 18).

[0437] 마찬가지로 DQ 치환이 없는 mAb1 변이체에 대해서도 프로파일링된 PK가 생성되었다. 결과를 표 24 및 도 19에 제시한다.

[0438] 돌연변이(ADE, DE 또는 ADLE)에 관계없이, DE_DQ 및 ADLE_DQ에 대한 2개의 DSB 위치(L242C-K334C 및 R292C-V302C)에서 유사한 PK 프로파일 및 매개변수가 관찰되었다. DSB 위치는 DE 및 ADLE 돌연변이 작제물의 PK 특성을 명확하게 개선시켰으며, DE 및 ADLE 돌연변이 작제물에 비해 제거 반감기가 2.5 내지 3배 증가하고 청소율은 2.5 내지 3배 감소하였다. DSB 첨가에 의한 PK 특성의 개선은 ADE 돌연변이 작제물의 경우 덜 명확하였다. 그럼에도 불구하고, DSB를 갖는 모든 돌연변이 작제물의 PK 매개변수는 WT 구조물과 유사하였고, DSB는 돌연변이 작제물을 생체내에서 안정화시켰다.

[0439] [표 24]

Tg32 마우스에서 시험된 상이한 항체의 PK 매개변수의 요약(평균(CV%))

mAb1 화합물	C0 ($\mu\text{g/mL}$)	AUC (일* $\mu\text{g/mL}$)	CL (mL/일/kg)	Vss (mL/kg)	t1/2z (일)
ADE	20.9	98.8	10.5	135	10
ADE L242C K334C	17.5	125	8.86	180	15
ADE R292C V302C	14.3	129	7.82	156	14
ADLE	17.9	51.9	19.3	137	6
ADLE L242C K334C	14.2	127	7.89	157	14
ADLE R292C V302C	18.1	186	5.39	114	15
DE	16.7	53.5	18.7	132	6
DE L242C K334C	13.2	108	9.29	243	19
DE R292C V302C	14.2	95.9	10.5	188	13
WT	19.7	127	7.88	163	16

[0440]

[0441] **mAb3**

[0442] 물질 및 방법:

[0443] mAb3 ADE 및 ADE-DSB (R292C/V302C) 변이체의 경우, 각각의 시점에서의 농도를 다음의 일반적인 방법을 사용하여 상향식 LC-MS/MS 검정으로 결정하였다. 혈장 분취물을 침전시킨 후, 혈장 펠릿을 단백질 변성, 환원, 알킬화, 트립신 소화 및 고체상 추출시킨 후 대용 펩티드를 분석하였다. Fab 영역(경쇄)에 속하는 대용 펩티드 VYACEVTHQGLSSPVTK를 선택성 및 반응 인자에 따라 정량화를 위해 각각의 항체에 대해 선택하였다. 항체를 혈장에 1, 2.8, 7, 14, 40, 80 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 로 스파이킹하여 보정 표준을 준비하였다. 역상 XBridge BEH C18 컬럼 (2.1x150 mm, 3.5 μm , 300 Å, Waters)을 사용하는 Shimadzu UHPLC 시스템에서 수 중 0.1% 포름산 및 아세트 니트릴 중 0.1% 포름산의 단계별 구배에서 600 μL /분의 유량으로 펩티드 분리를 수행하였다. 검출을 위해 Sciex API6600 TripleTOF 질량 분석기를 양이온 생성물 모드에서 사용하였고 소스 온도는 500°C, 이온스프레이 전압은 5500 V, 커튼 가스는 35이고 분무기 가스는 50이었다. 체류 시간은 각각의 실험의 경우 15 ms였다. 디클러스터 링 전위는 90 V였고, 충돌 에너지는 26V였다. 항체의 고유한 대용 펩티드의 626.0 m/z 모 이온의 807.4098 m/z 단편을 MultiQuant 소프트웨어의 MQ4 통합 알고리즘에서으로부터의 피크 면적을 사용하여 표준 및 대조군에 대한 농도 측정에 사용하였다.

[0444] mAb3 WT 항체의 경우, 각각의 시점에서 농도는 Gyrolab 플랫폼(Gyros)을 사용하는 일반적인 면역검정 방법으로 결정하였고, 이는 단계식 샌드위치 형식이었다. 샘플(표준품, 품질 제어 및 연구 샘플)을 완충액에 100배 희석시켜 96웰 마이크로타이터 플레이트에 분배한다. 포획 및 검출 시약을 두 번째 96웰 마이크로타이터 플레이트에 분배하였다. 그 다음 96웰 마이크로타이터 플레이트 및 bioaffy CD(CD200 - 112개의 미세구조 분절 포함)를 Gyrolab 플랫폼에 로딩하였다. 다음 단계는 Gyrolab 플랫폼에 의해 자동으로 시작되었다: Gyrolab Bioaffy 디스크(CD200) 내의 스트랩타비딘 비드 컬럼에 비오틴화된 당나귀 항 hu-IgG(포획)의 첨가, 그 다음 표준품, 품질 제어 및 연구 샘플의 분포, 그 다음 AlexaFluor-염소 항 hu-IgG(검출)의 첨가. 1%로 설정된 포토멀티플리케이터 (photomultiplier)를 사용하여 각각의 미세구조 분절에서 컬럼 내 형광 측정(λ_{exc} 633 nm, λ_{emm} 650 nm)을 수행하였다. 모든 분석을 이중으로 수행하였고, 정량 범위는 100 내지 200,000ng/mL였다.

[0445] 유사한 PK 연구를 mAb3으로 수행하였다. 표 25 및 도 20에 나타난 바와 같이, mAb3 상의 ADE 돌연변이는 Ab3 WT에 비해서 더 높은 CL 및 더 짧은 제거 반감기를 초래하였다. mAb3-ADE 작제물 상의 DSB(R292C/V302C)의 첨가는 화합물의 PK 특성을 명확하게 개선시켰다. mAb3 WT 및 mAb3-ADE-DSB 작제물은 유사한 청소율 및 제거 반감기를 나타내었다.

[0446] [표 25]

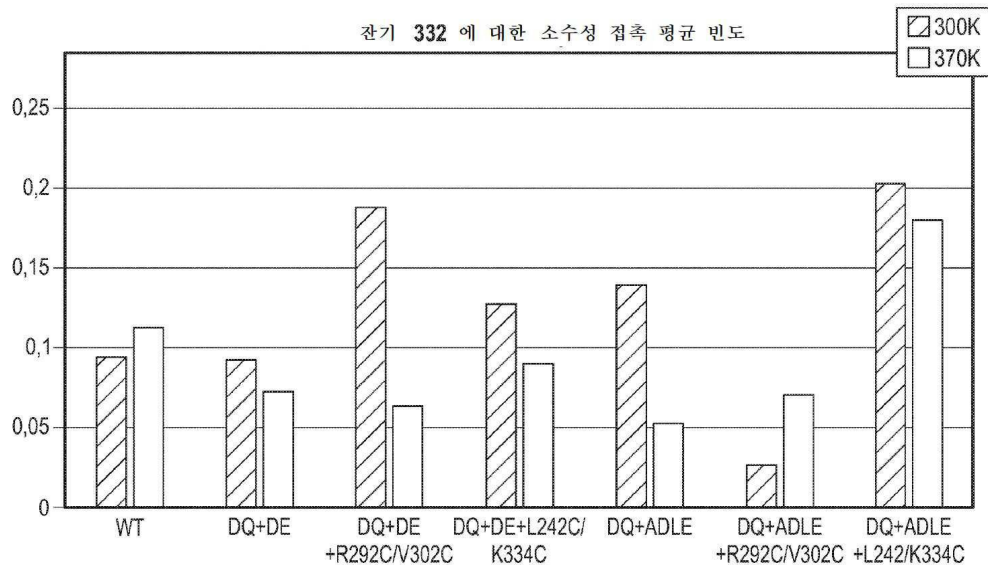
Tg32 마우스에서 시험된 상이한 mAb3 항체의 PK 매개변수의 요약(평균(CV%))

항체	C0 ($\mu\text{g/mL}$)	AUC (일* $\mu\text{g/mL}$)	CL (mL/일/kg)	Vss (mL/kg)	t1/2z (일)
mAb3	66.8	491	5.15	99.9	14.1
mAb3-ADE	72.0 (18)	181 (15)	14.0 (17)	85.3 (18)	4.8
mAb3-ADE-DSB (R292C/V302C)	59.0 (4)	392 (8)	6.41 (9)	121 (8)	13.7

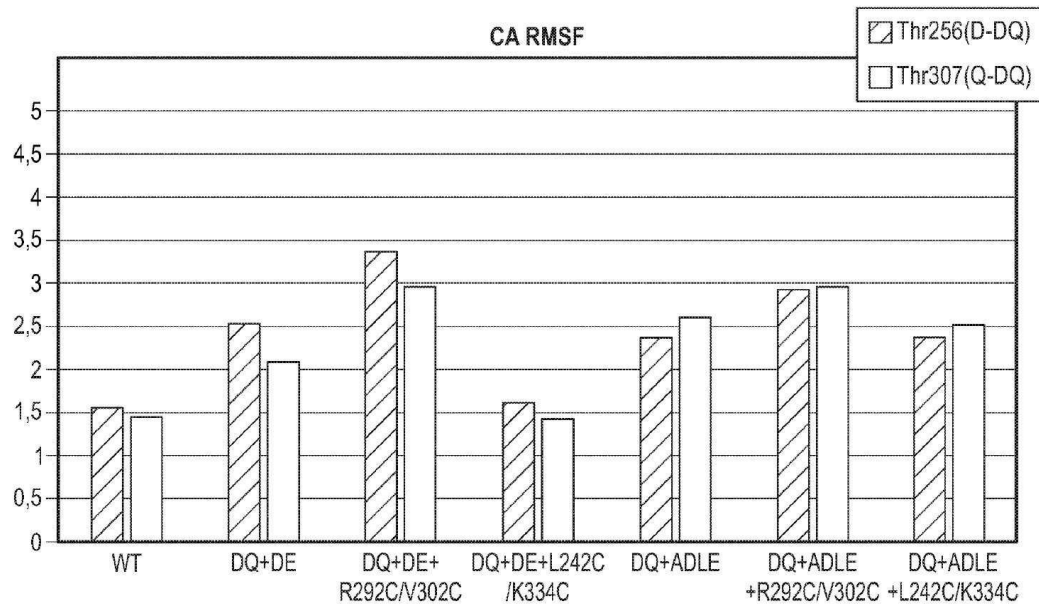
[0447]

도면

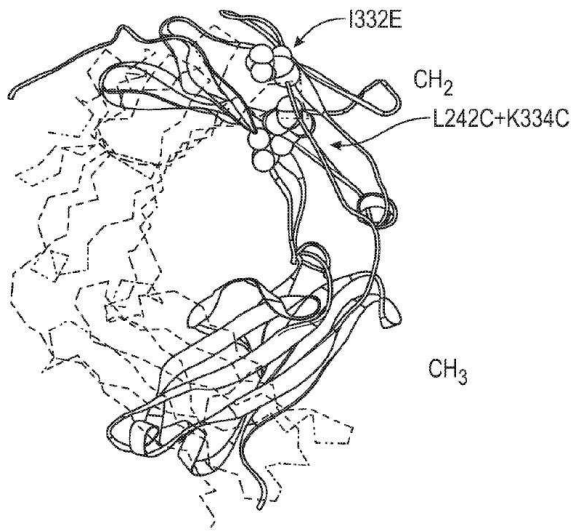
도면1a



도면1b



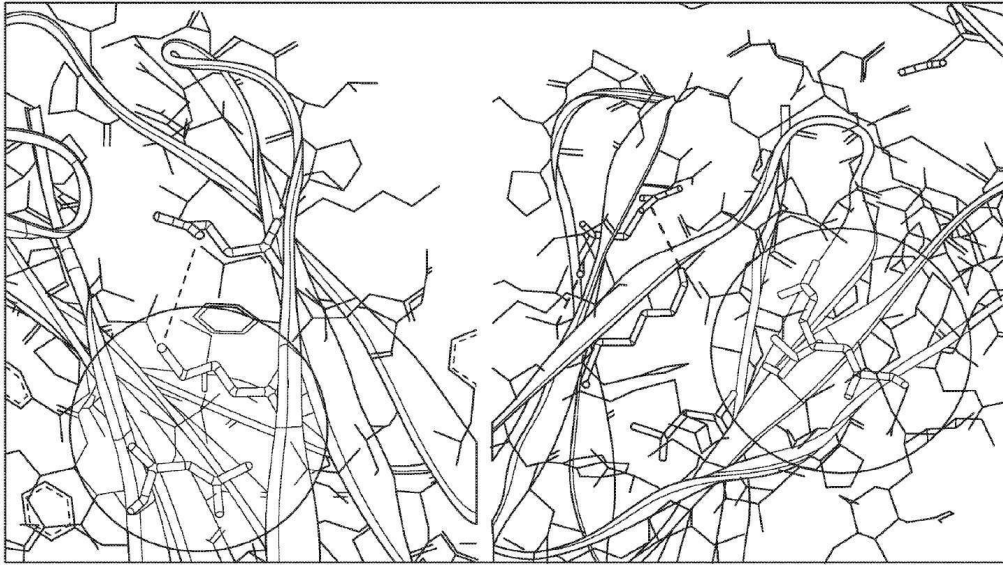
도면2



도면3



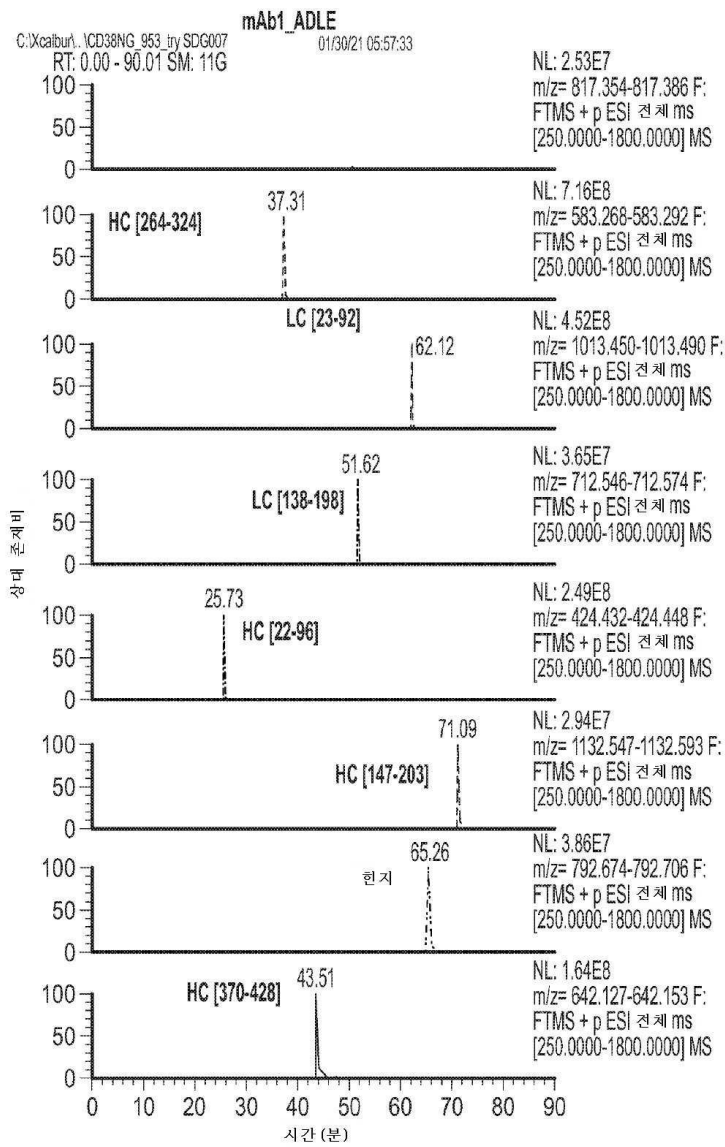
도면4



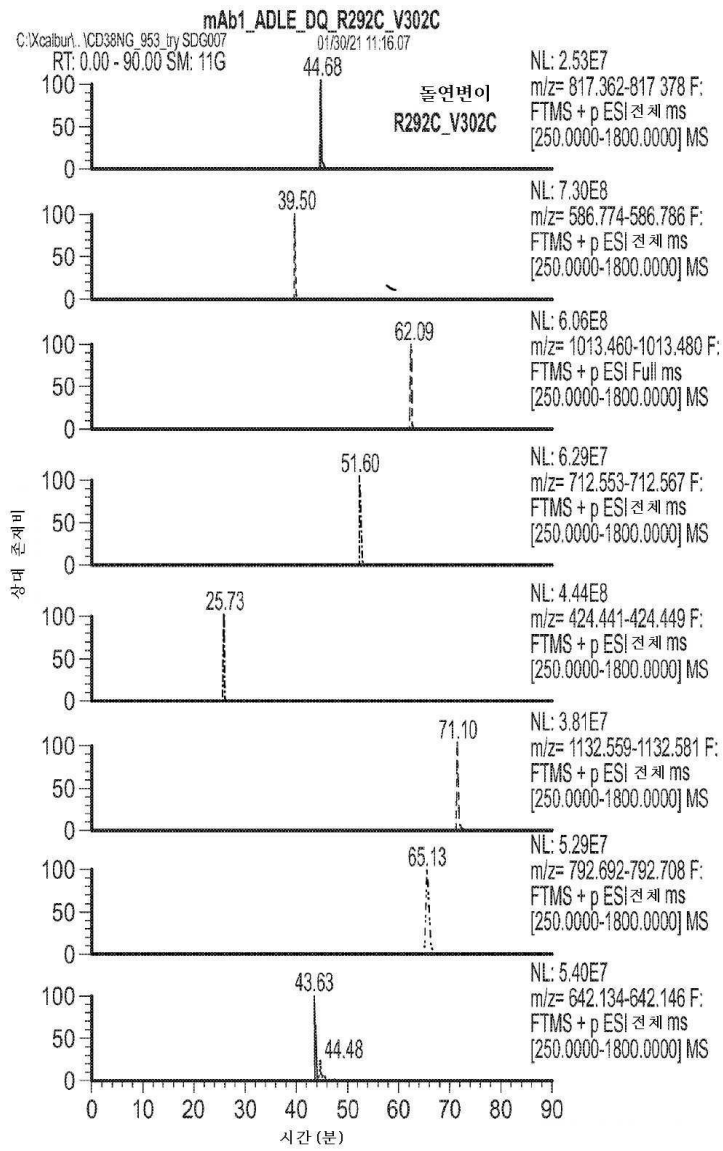
도면5



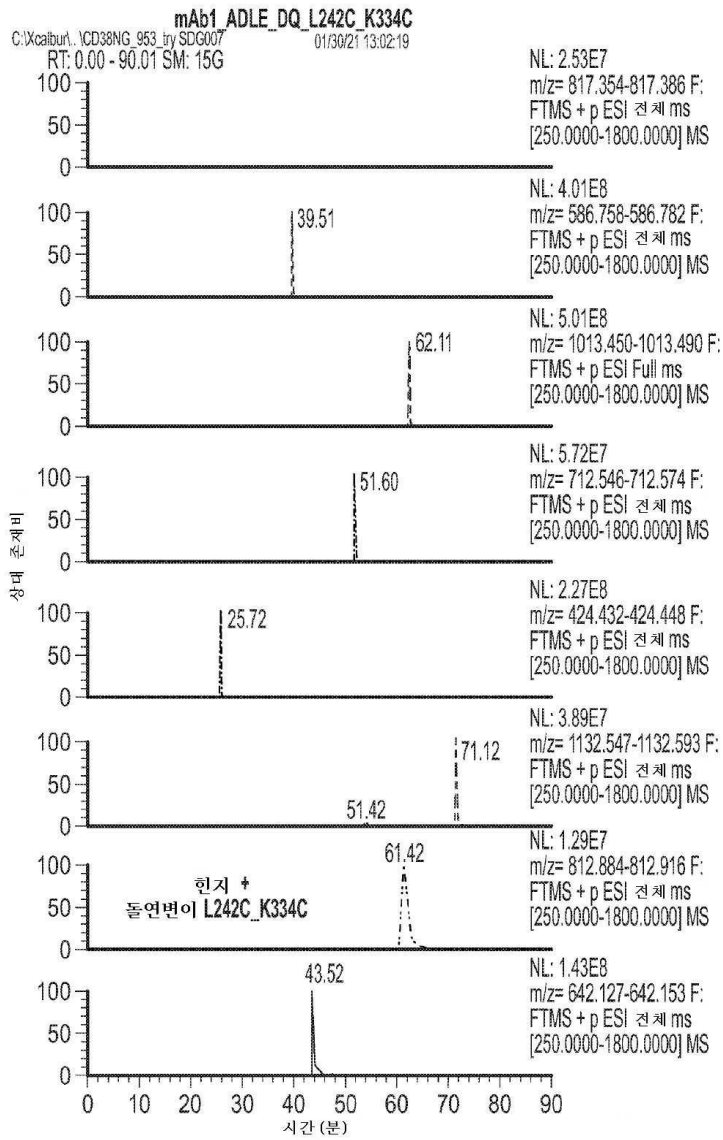
도면6a



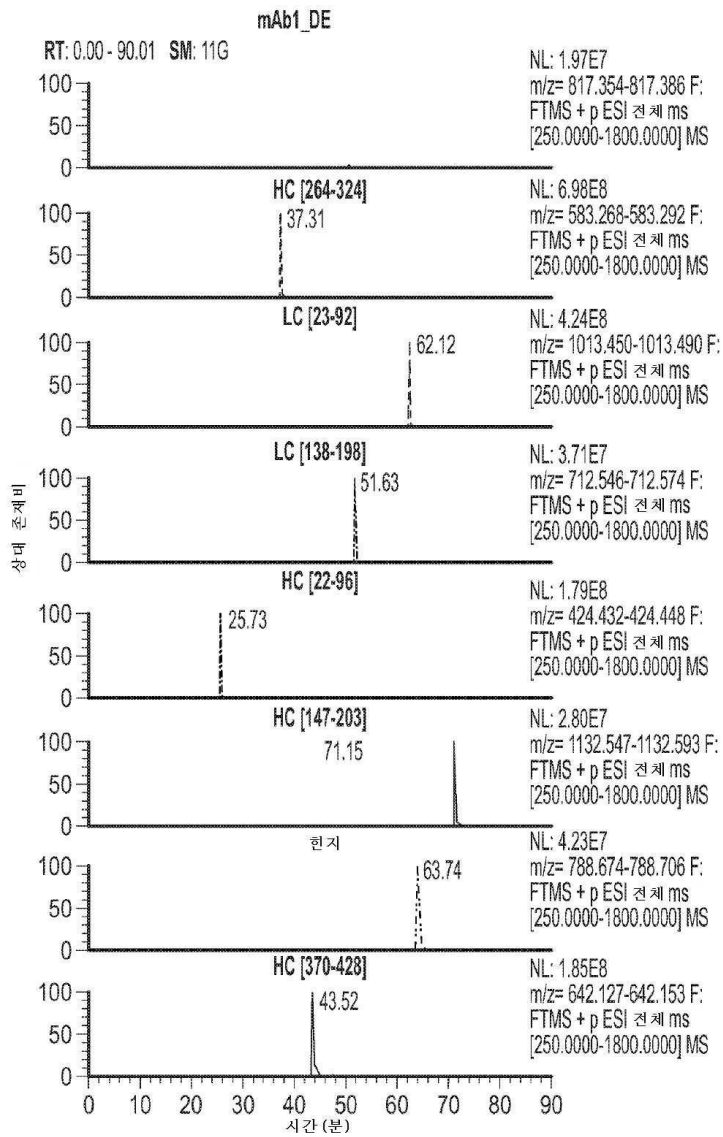
도면6b



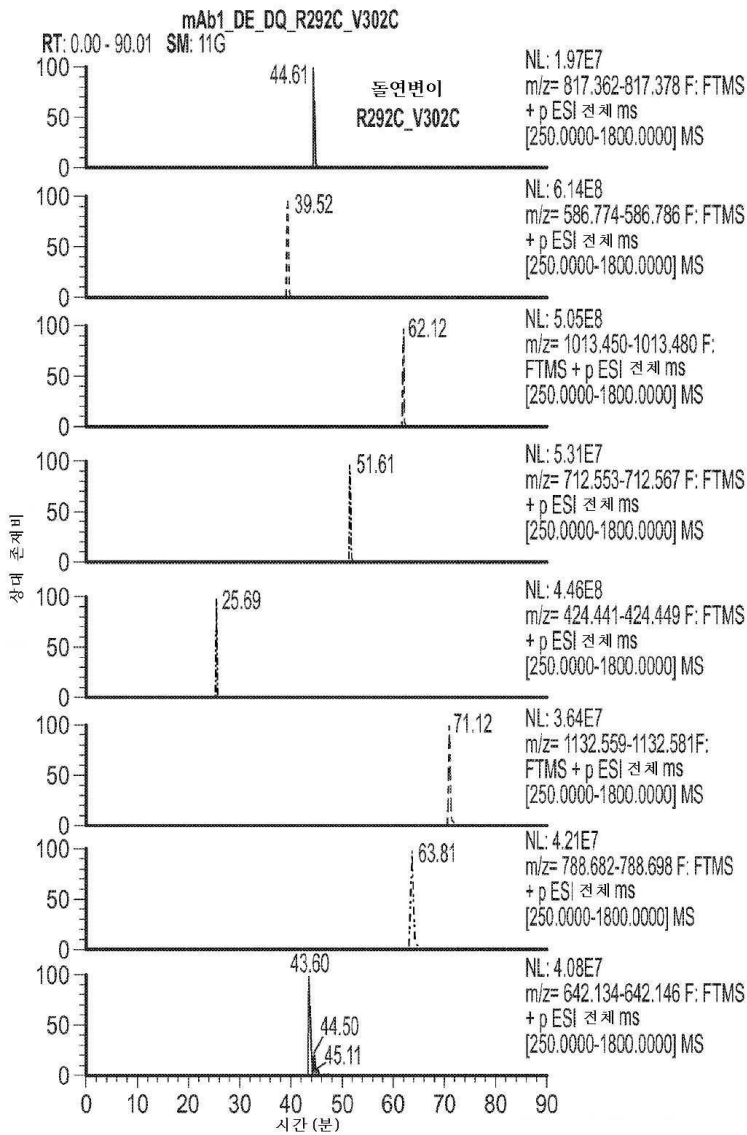
도면6c



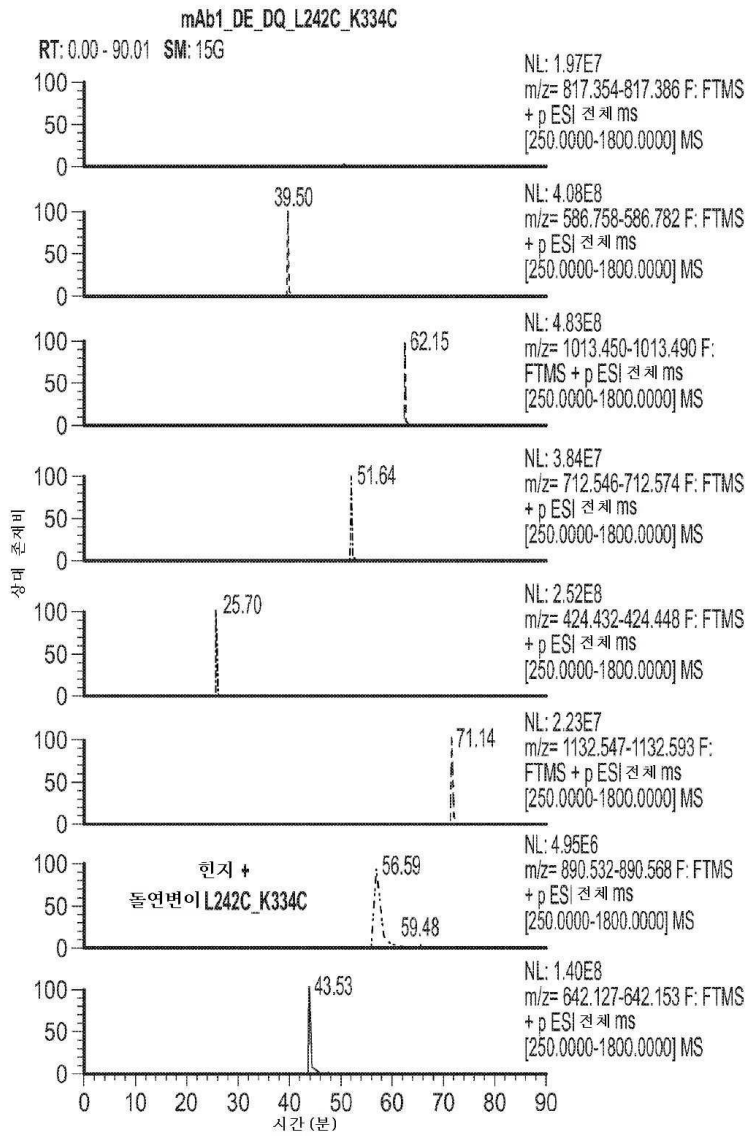
도면7aa



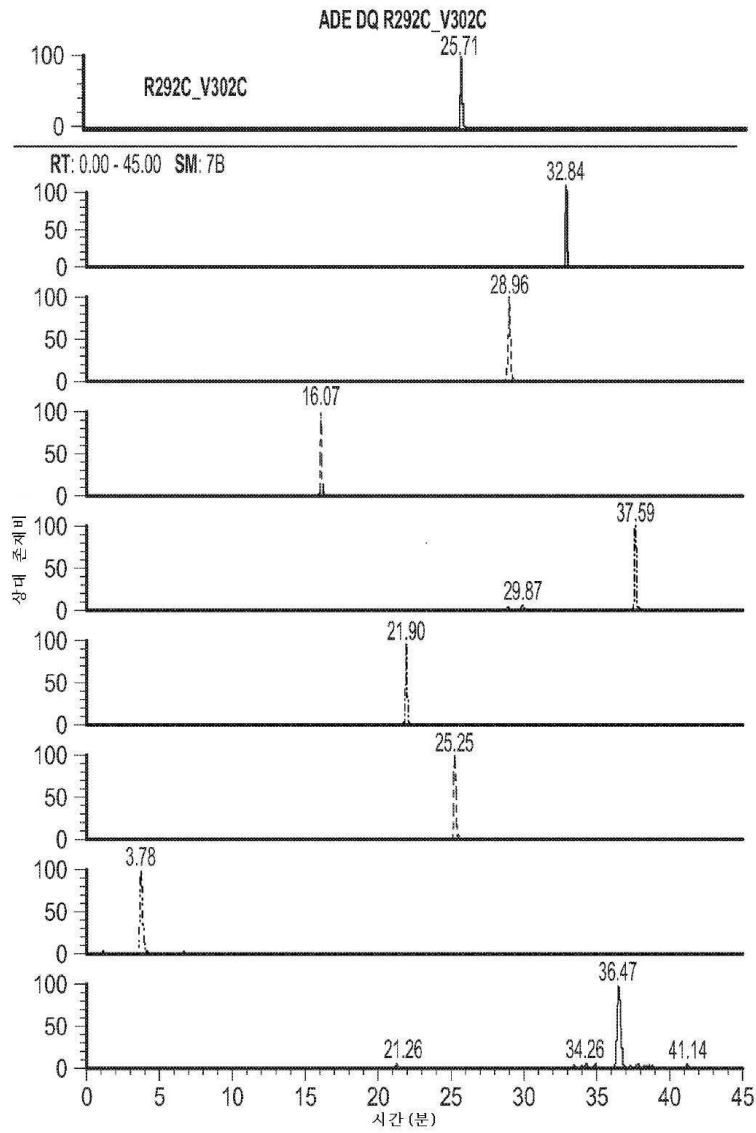
도면7ab



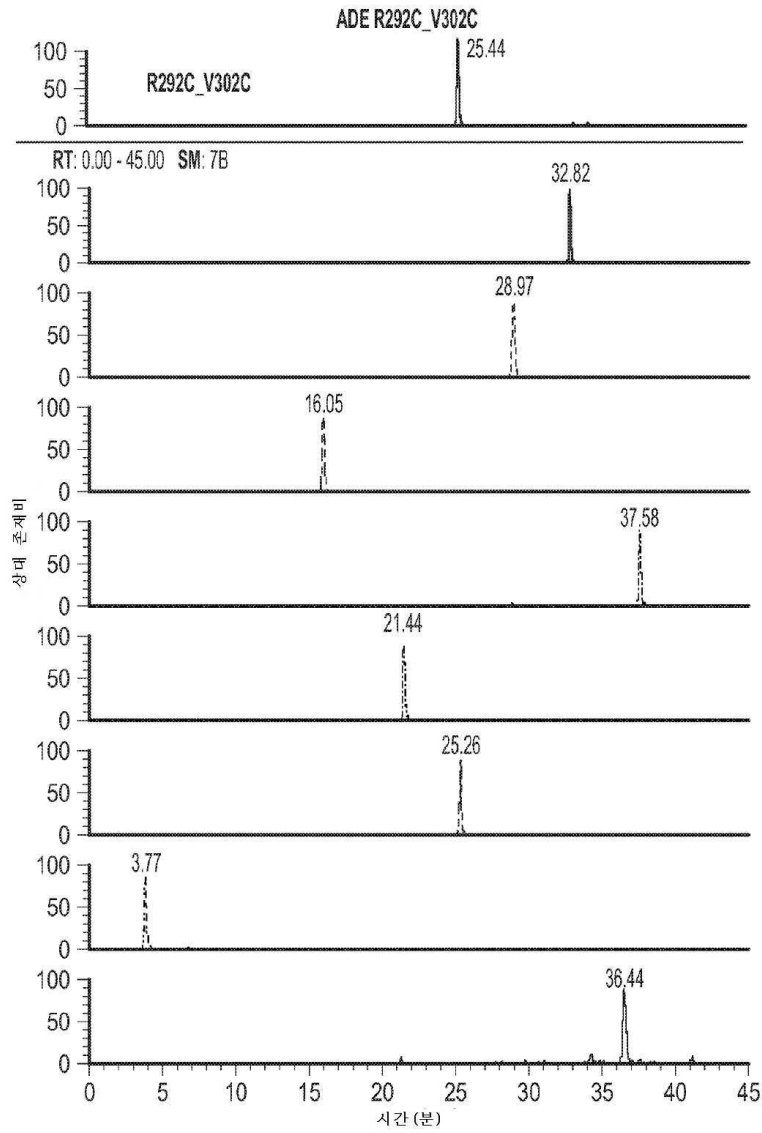
도면7ac



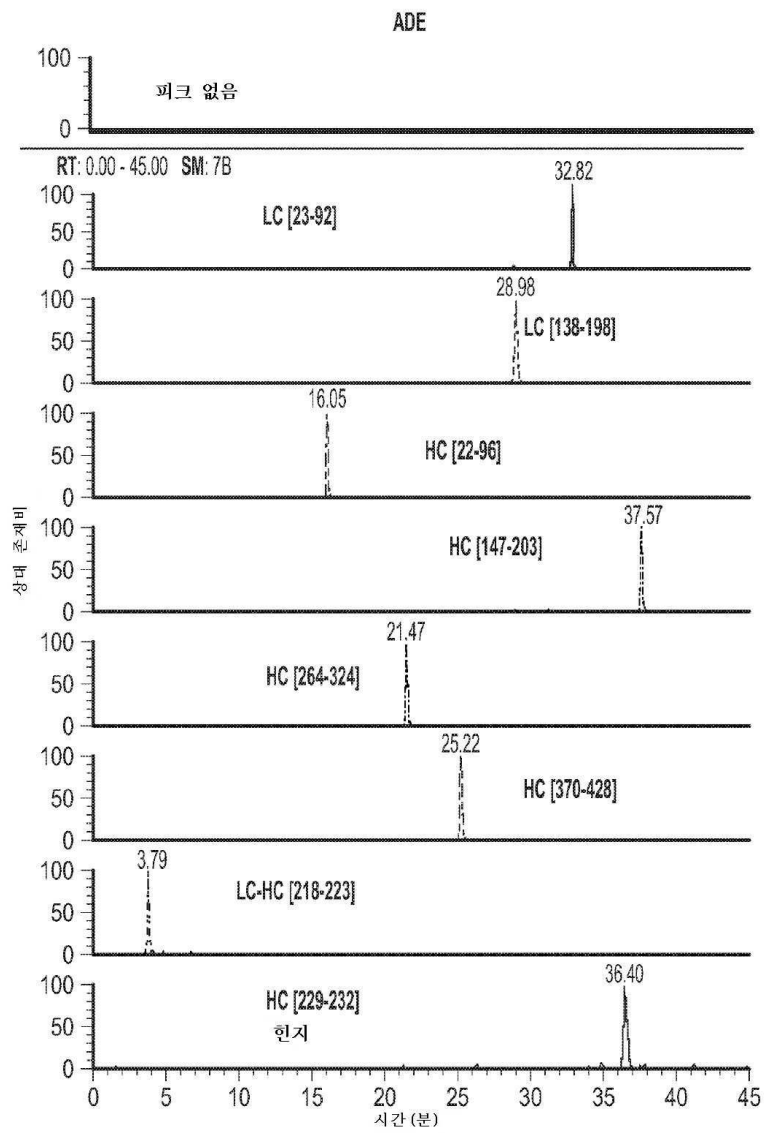
도면 7ba



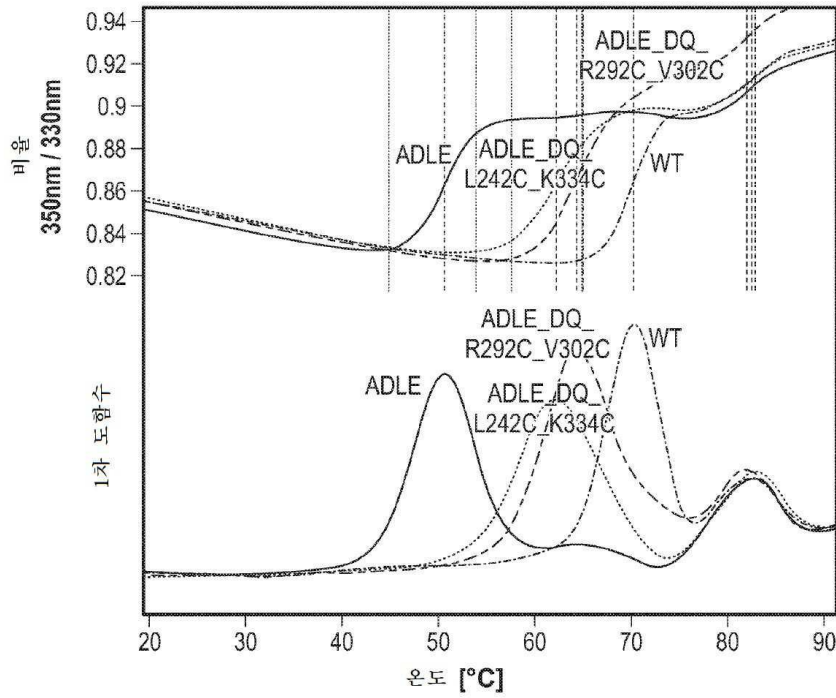
도면 7bb



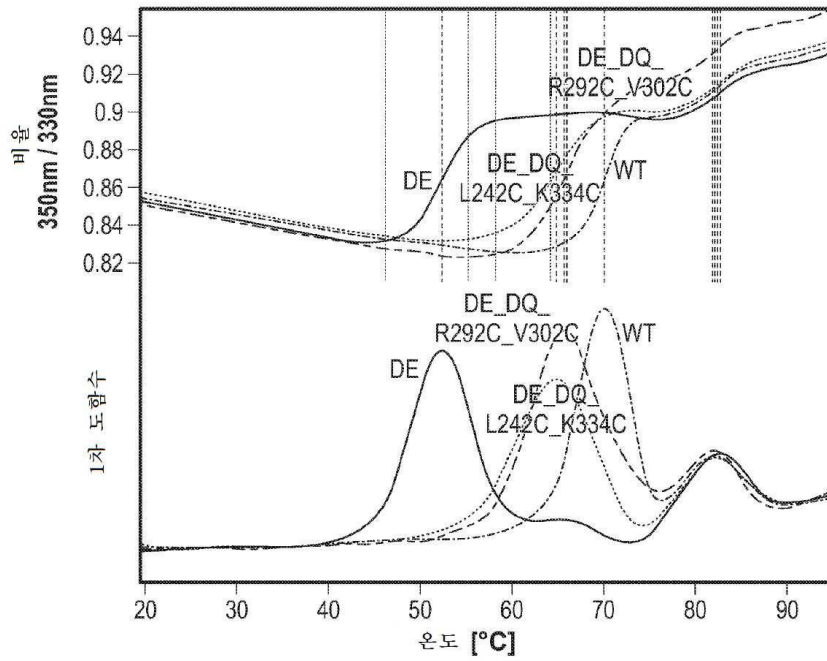
도면 7bc



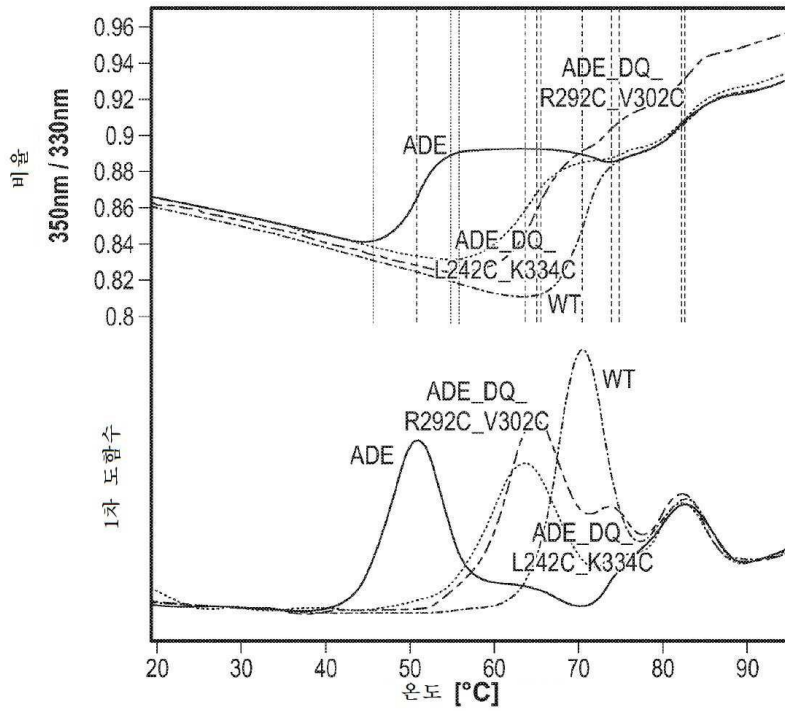
도면8



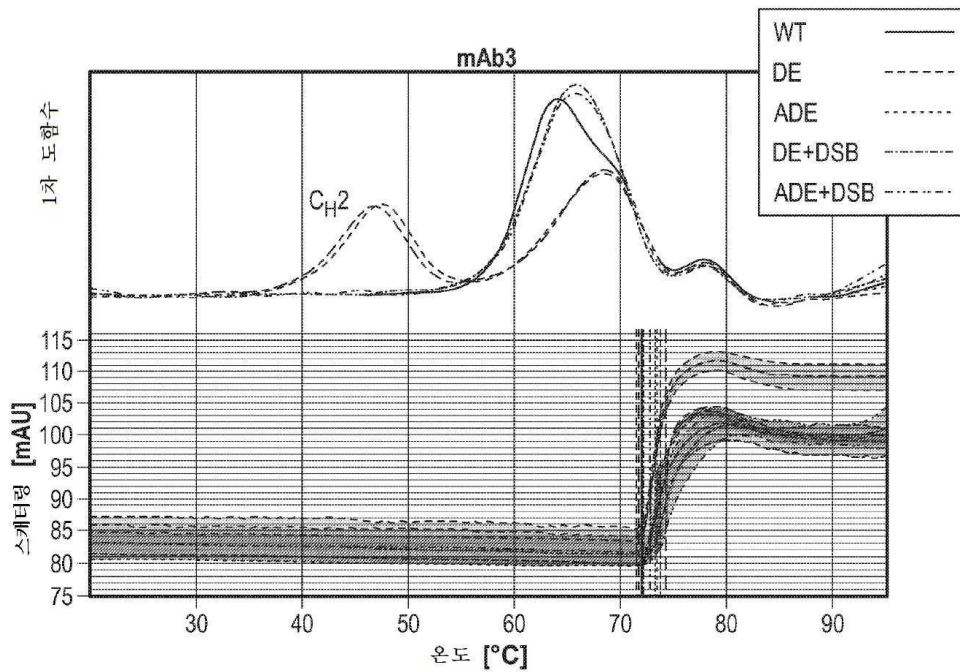
도면9a



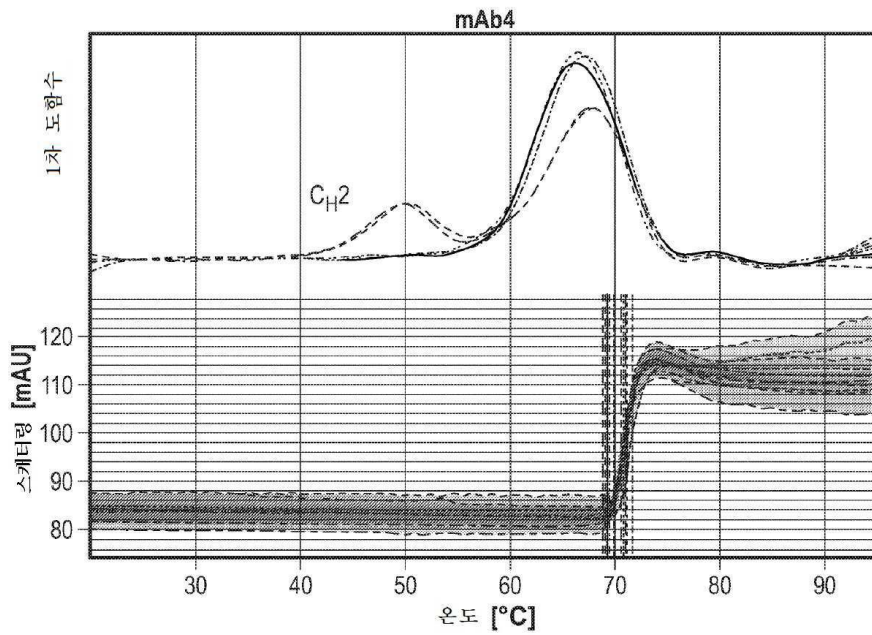
도면9b



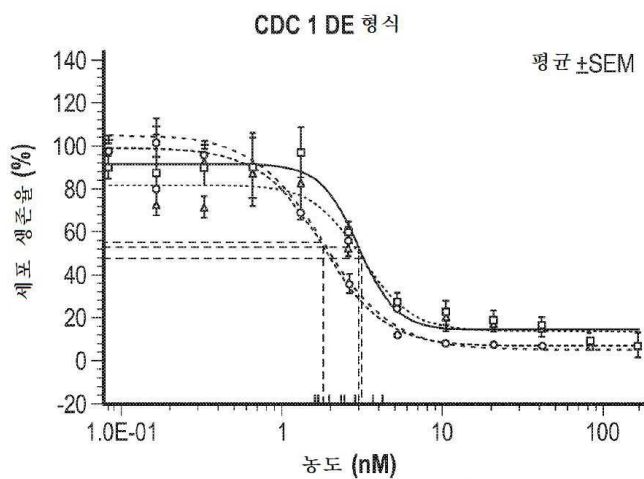
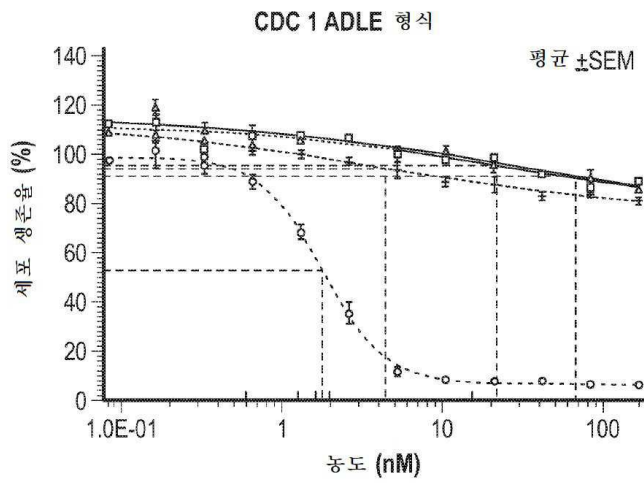
도면10a



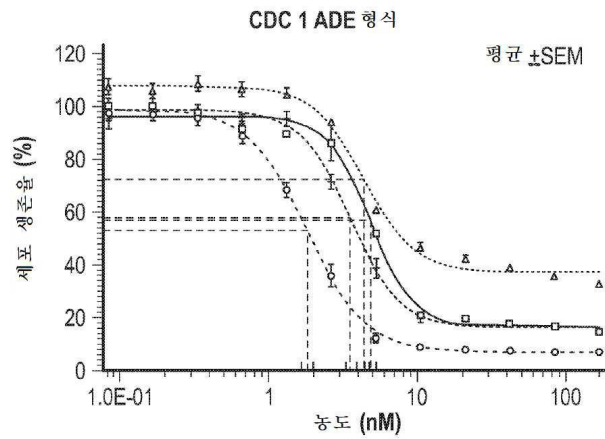
도면10b



도면11a

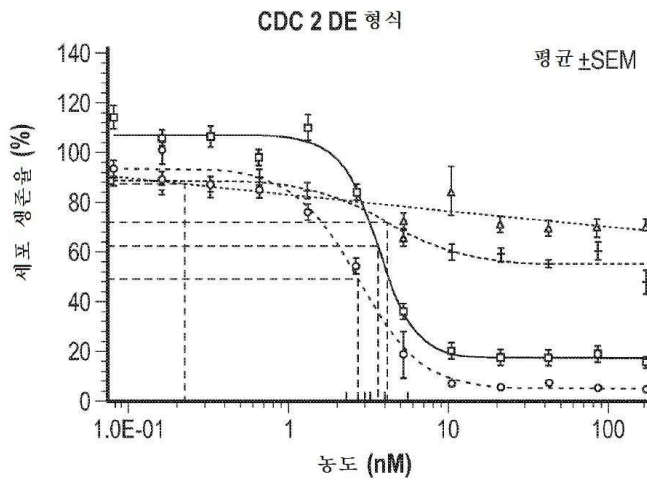
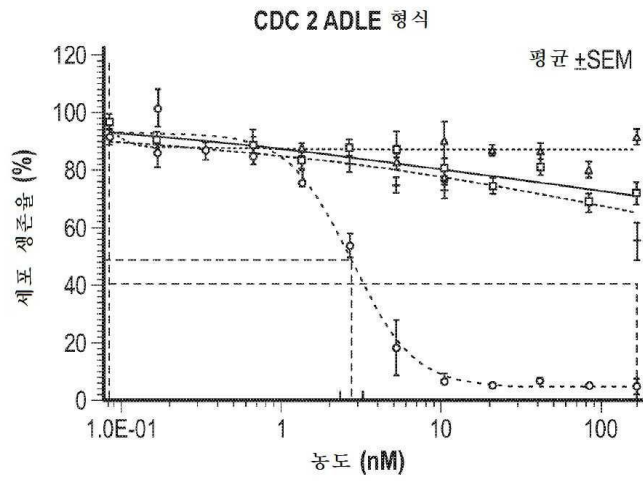


도면11b

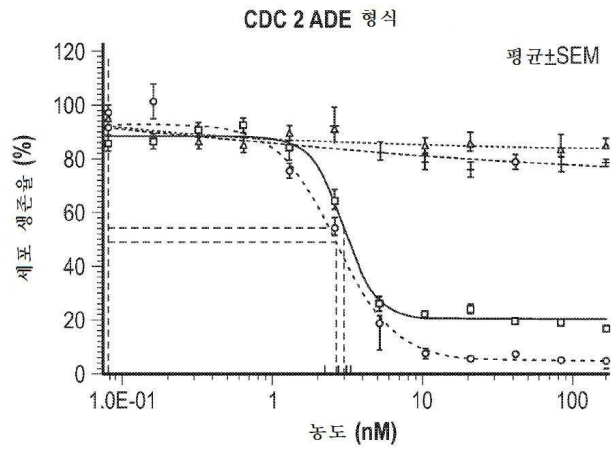


CDC ADLE 형식		CDC DE 형식		CDC ADE 형식	
□	VA2-20-034.2 (IgG1 ADLE)	□	VA2-20-1117-1 (IgG1 DE)	□	VA2-19-943-1 (IgG1 ADE)
△	VA2-21-267-1(IgG1 ADLE_L242C_K334C)	△	VA2-21-269-1 (IgG1 DE_L242C_K334C)	△	VA2-21-259-2(IgG1 ADE_L242C_K334C)
+	VA2-21-268-1 (IgG1 ADLE_R292C_V302C)	+	VA2-21-270-1(IgG1 DE_R292C_V302C)	+	VA2-21-260-1(IgG1 ADE_R292C_V302C)
○	VA2-20-950-1 (IgG1 WT)	○	VA2-20-950-1 (IgG1 WT)	○	VA2-20-950-1 (IgG1 WT)

도면12a

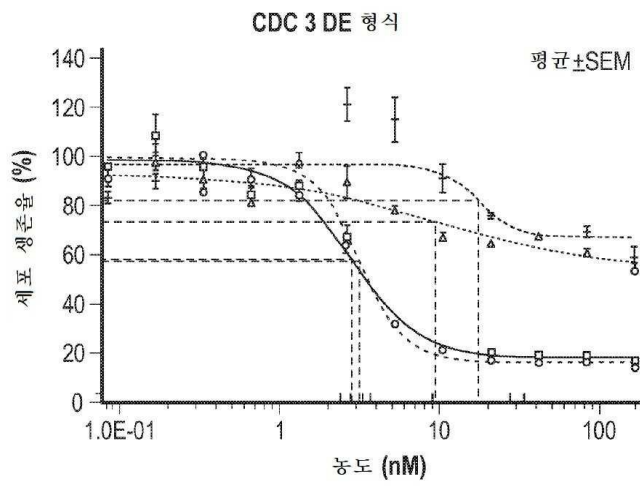
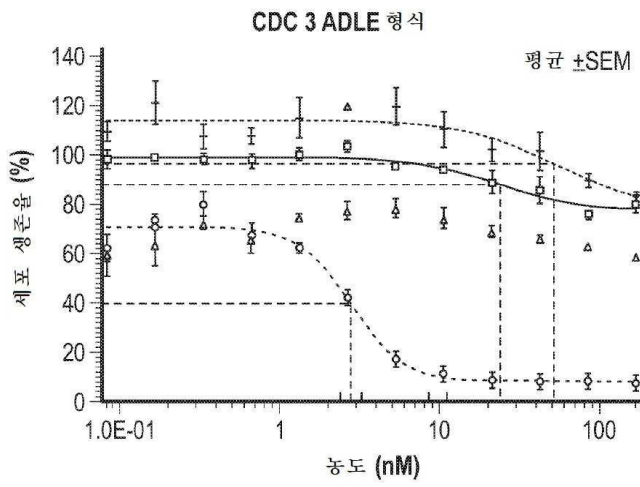


도면12b

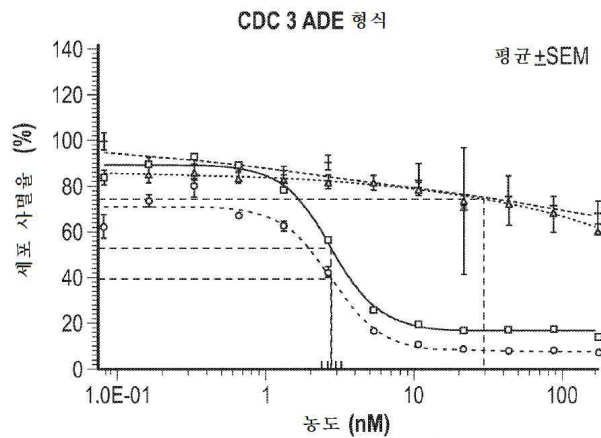


	CDC ADLE 형식		CDC DE 형식		CDC ADE 형식
□	VA2-20-034.2 (IgG1 ADLE)	□	VA2-20-1117-1 (IgG1 DE)	□	VA2-19-943-1 (IgG1 ADE)
△	VA2-20-952-1 (ADLE_DQ)	△	VA2-20-955-1 (DE_DQ)	△	VA2-21-266-1 (ADE_DQ)
+	VA2-20-953-1 (ADLE_DQ_R292C_V302C)	+	VA2-20-956-1 (DE_DQ_R292C_V302C)	+	VA2-21-262-1 (ADE_DQ_R292C_V302C)
○	VA2-20-950-1 (IgG1 WT)	○	VA2-20-950-1 (IgG1 WT)	○	VA2-20-950-1 (IgG1 WT)

도면13a

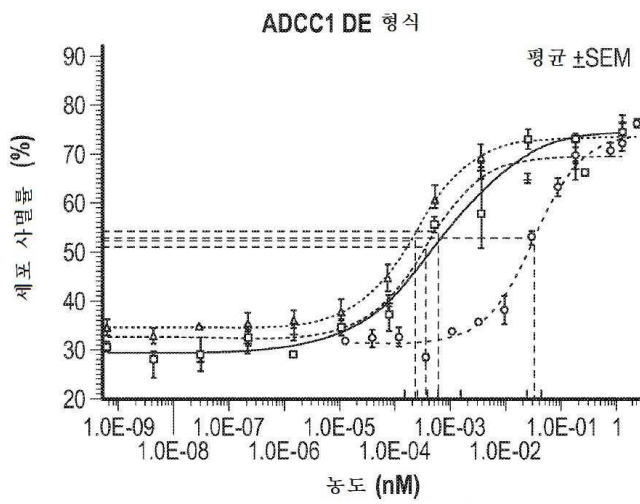
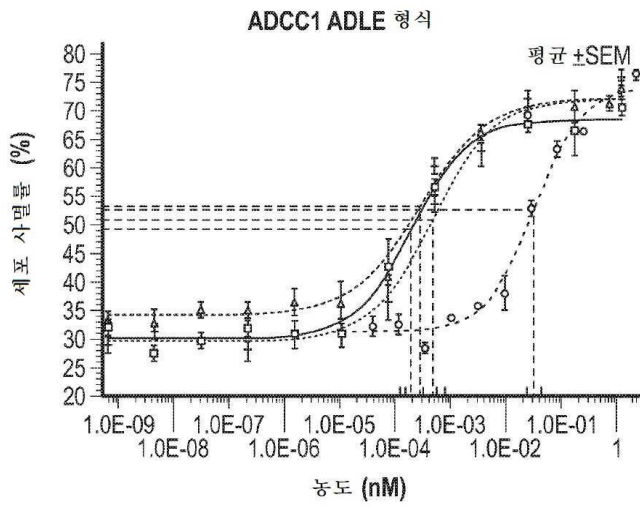


도면13b

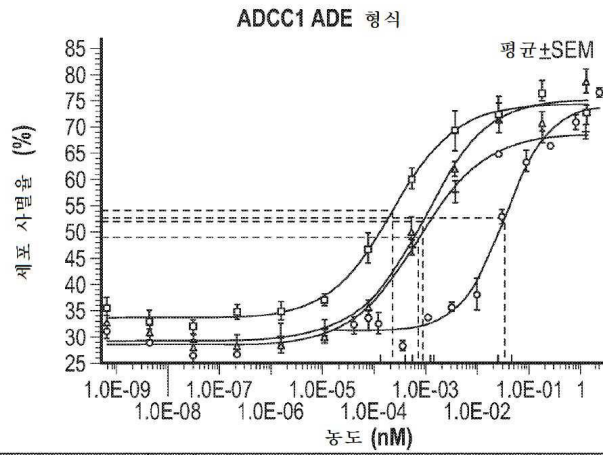


	CDC ADLE 형식		CDC DE 형식		CDC ADE 형식
□	VA2-20-034.2 (IgG1 ADLE)	□	VA2-20-1117-1 (IgG1 DE)	□	VA2-19-943-1 (IgG1 ADE)
△	VA2-20-952-1 (ADLE_DQ)	△	VA2-20-955-1(DE_DQ)	△	VA2-21-266-1 (ADE_DQ)
+	VA2-20-954-1(DQ_L242C_K334C)	+	VA2-20-957-1(DQ_L242C_K334C)	+	VA2-21-261-1(DQ_L242C_K334C)
○	VA2-20-950-1 (IgG1 WT)	○	VA2-20-950-1 (IgG1 WT)	○	VA2-20-950-1 (IgG1 WT)

도면14a

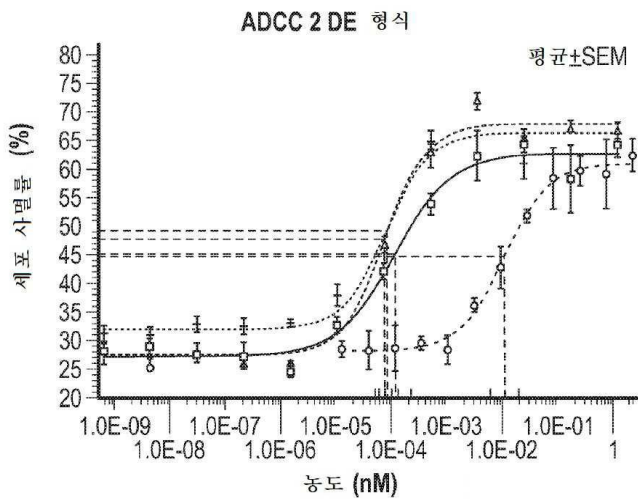
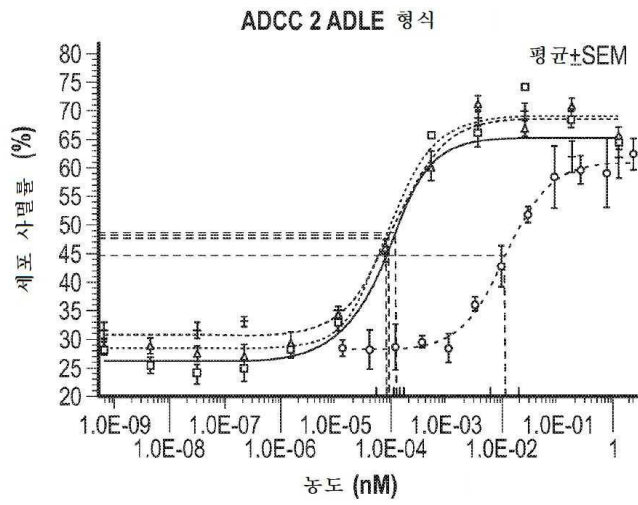


도면14b

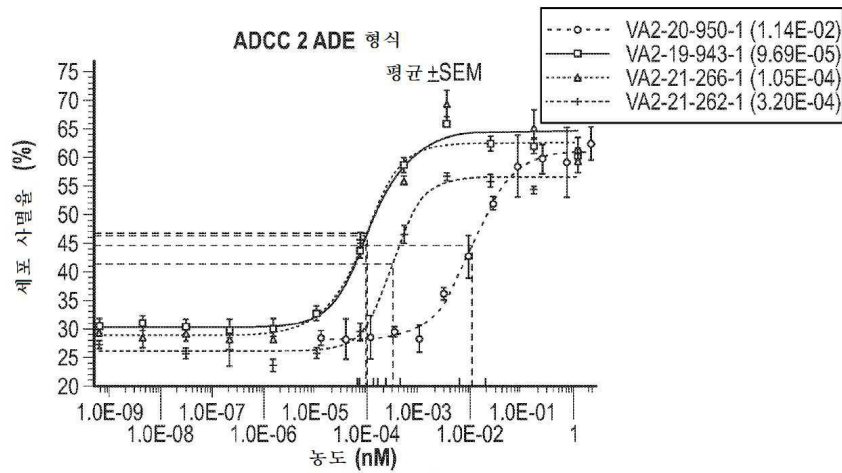


	ADCC ADLE 형식		ADCC DE 형식		ADCC ADE 형식
□	VA2-20-034.2 (IgG1 ADLE)	□	VA2-20-1117-1 (IgG1 DE)	□	VA2-19-943-1 (IgG1 ADE)
△	VA2-21-267-1 (IgG1 ADLE_L242C_K334C)	△	VA2-21-269-1 (IgG1 DE_L242C_K334C)	△	VA2-21-259-2 (IgG1 ADE_L242C_K334C)
+	VA2-21-268-1 (IgG1 ADLE_R292C_V302C)	+	VA2-21-270-1 (IgG1 DE_R292C_V302C)	+	VA2-21-260-1 (IgG1 ADE_R292C_V302C)
○	VA2-20-950-1 (IgG1 WT)	○	VA2-20-950-1 (IgG1 WT)	○	VA2-20-950-1 (IgG1 WT)

도면15a

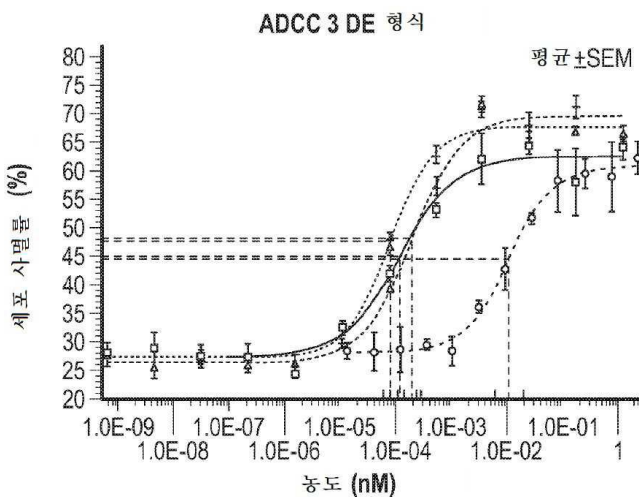
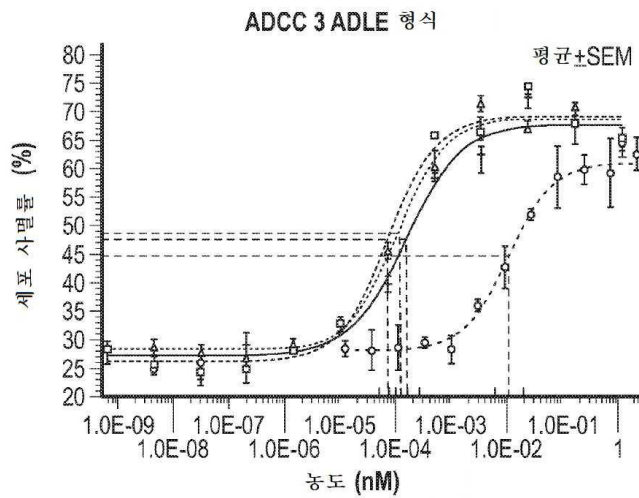


도면15b

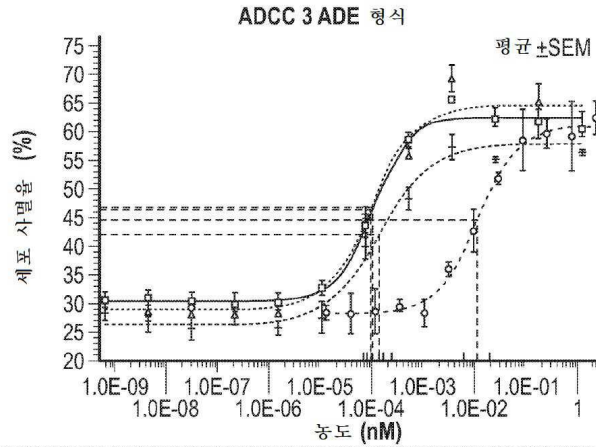


	ADCC ADLE 형식	ADCC DE 형식	ADCC ADE 형식
□	VA2-20-034.2 (IgG1 ADLE)	□ VA2-20-1117-1 (IgG1 DE)	□ VA2-19-943-1 (IgG1 ADE)
△	VA2-20-952-1 (ADLE_DQ)	△ VA2-20-955-1 (DE_DQ)	△ VA2-21-266-1 (ADE_DQ)
+	VA2-20-953-1 (ADLE_DQ_R 292C_V302C)	+ VA2-20-956-1 (DE_DQ_R292C_V302C)	+ VA2-21-262-1 (ADE_DQ_R292C_V302C)
○	VA2-20-950-1 (IgG1 WT)	○ VA2-20-950-1 (IgG1 WT)	○ VA2-20-950-1 (IgG1 WT)

도면16a

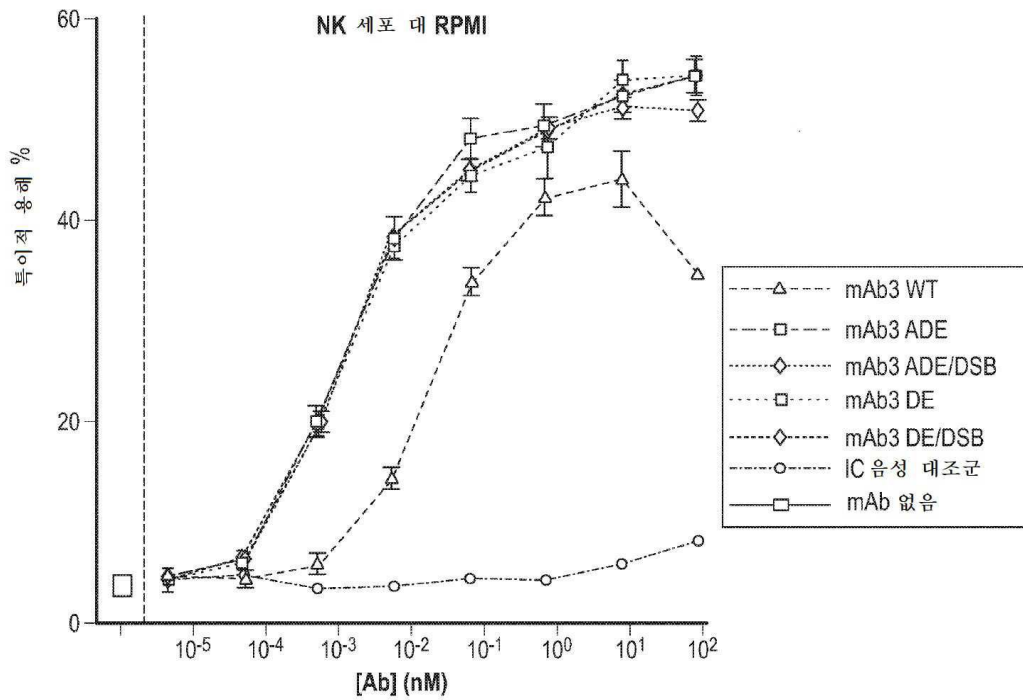


도면16b

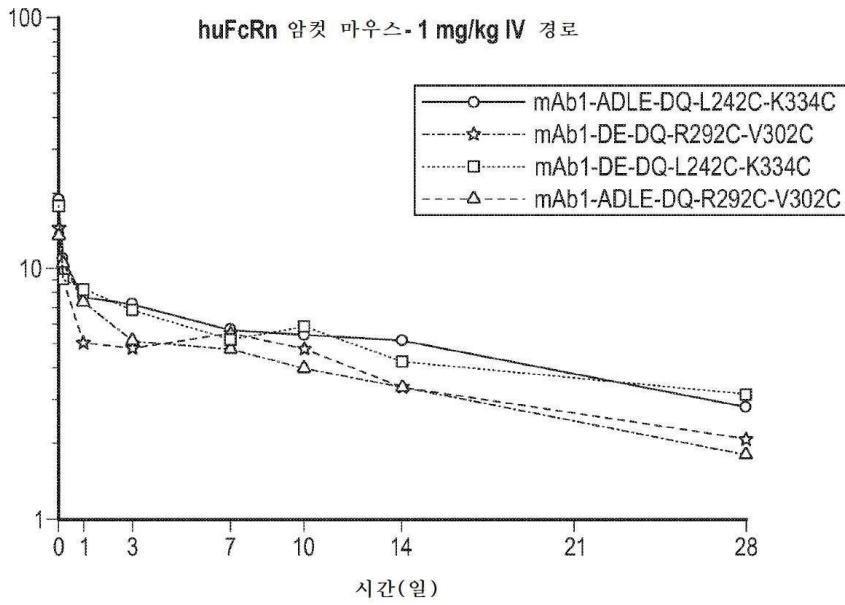


	ADCC ADLE 형식		ADCC ADLE 형식		ADCC ADE 형식
□	VA2-20-034.2 (IgG1 ADLE)	□	VA2-20-1117-1 (IgG1 DE)	□	VA2-19-943-1 (IgG1 ADE)
△	VA2-20-952-1 (ADLE_DQ)	△	VA2-20-955-1 (DE_DQ)	△	VA2-21-266-1 (ADE_DQ)
+	VA2-20-954-1 (DQ_L242 C_K334C)	+	VA2-20-957-1 (DQ_L242C_K334C)	+	VA2-21-261- 1(DQ_L242C_K334C)
○	VA2-20-950-1 (IgG1 WT)	○	VA2-20-950-1 (IgG1 WT)	○	VA2-20-950-1 (IgG1 WT)

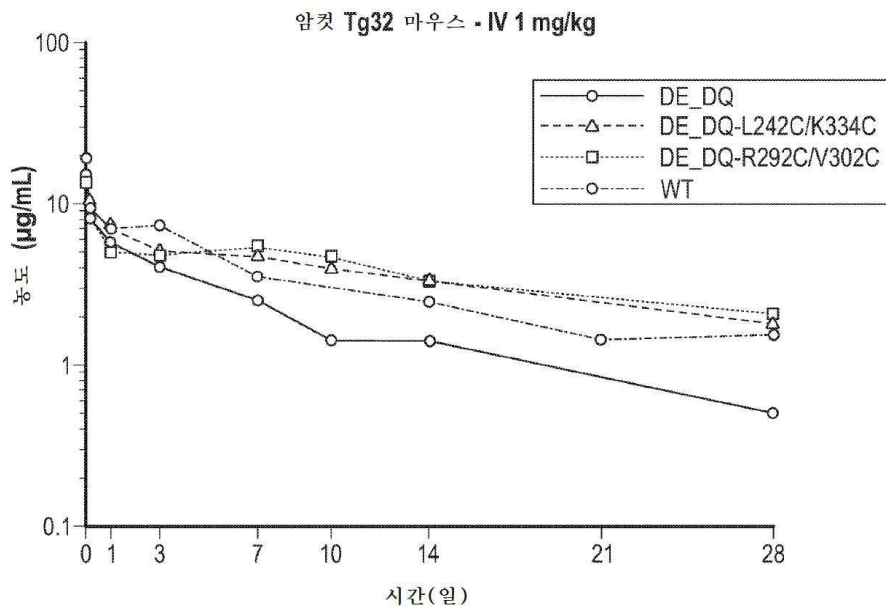
도면17



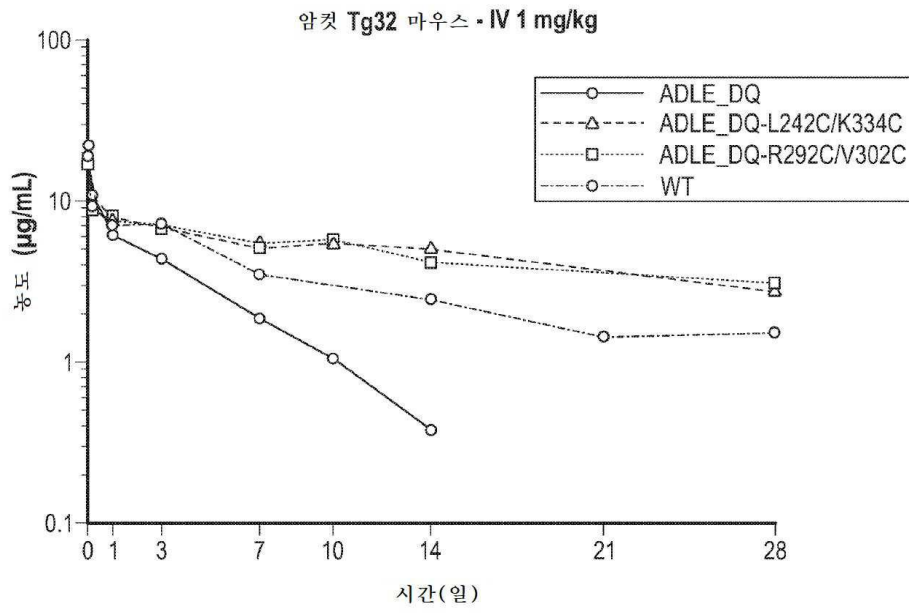
도면18a



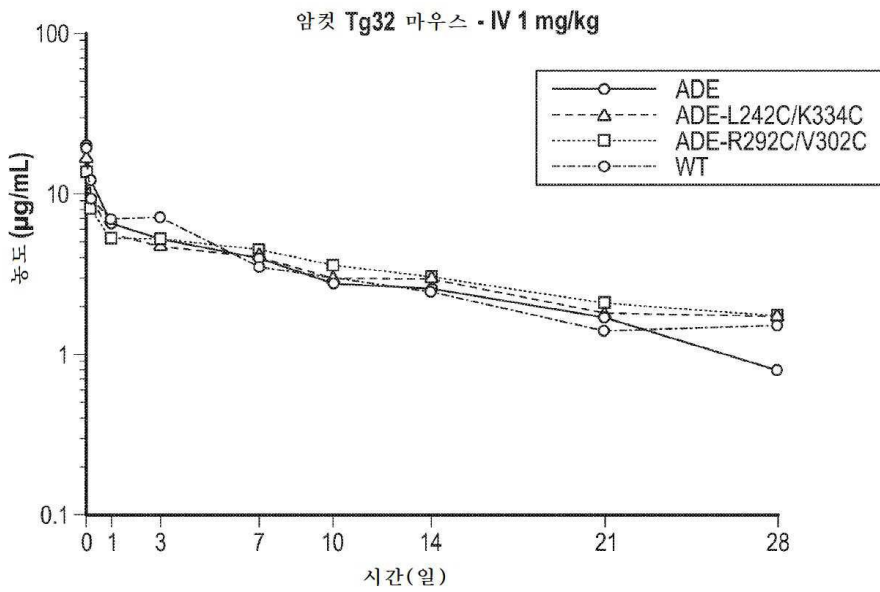
도면18b



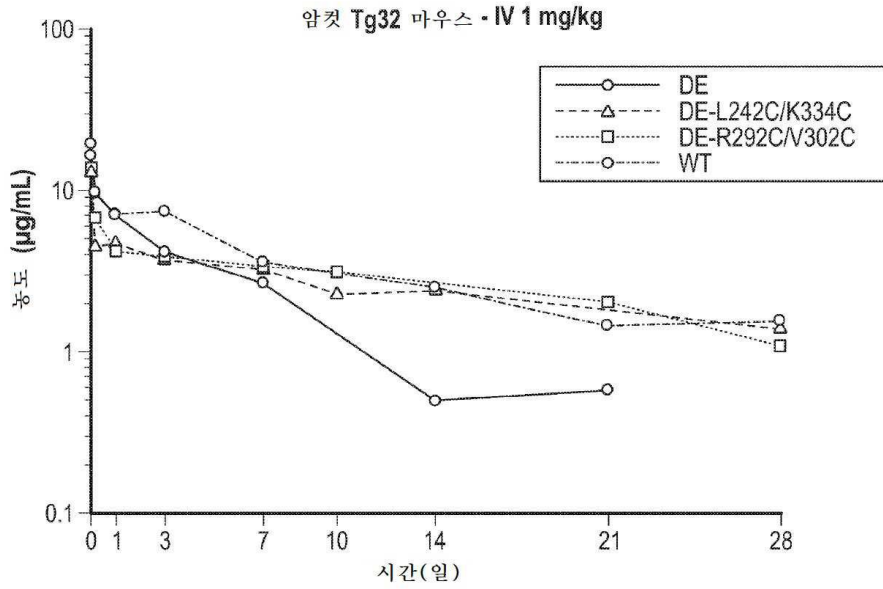
도면18c



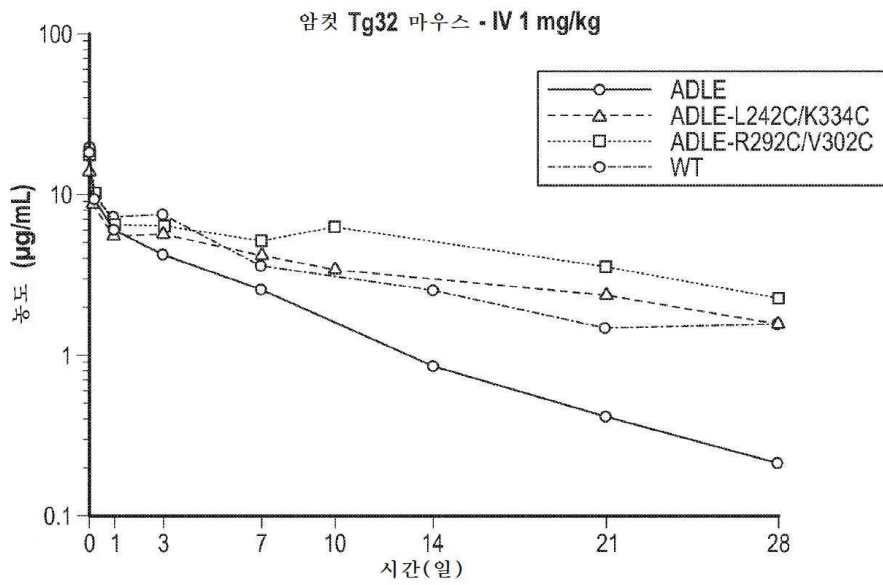
도면19a



도면19b



도면19c



도면20

