



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0014379
(43) 공개일자 2020년02월10일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/46 (2006.01) C07K 16/10 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 16/468 (2013.01)
C07K 16/1027 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-7038922</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2018년06월04일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2019년12월30일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/IB2018/053997</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2018/224951
국제공개일자 2018년12월13일</p> <p>(30) 우선권주장
62/515,316 2017년06월05일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
얀센 바이오테크 인코포레이티드
미국 펜실베이니아주 19044 호삼 릿지뷰 드라이브 800/850</p> <p>(72) 발명자
치우 마크
미국 19355 펜실베이니아주 말번 그레이트 벨리 파크웨이 200
즈왈락 아담
미국 19477 펜실베이니아주 스프링 하우스 매킨 로드 1400</p> <p>(74) 대리인
특허법인한성</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 79 항

(54) 발명의 명칭 **비대칭 CH2-CH3 영역 돌연변이를 갖는 조작된 다중특이성 항체 및 다른 다량체 단백질**

(57) 요약

본 발명은 비대칭 CH2-CH3 영역 돌연변이를 갖는 조작된 다중특이성 항체 및 다른 다량체 단백질 및 이들의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다.

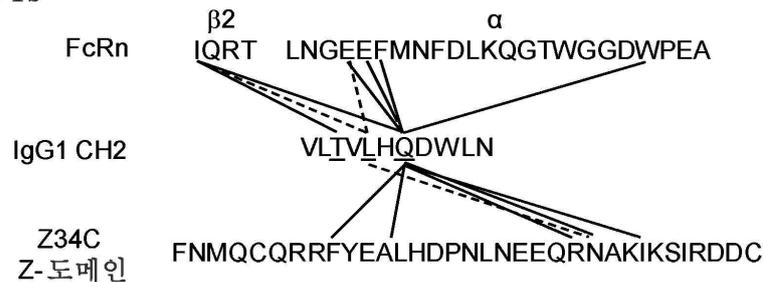
대표도

도 1a

인간 IgG1 CH2 VLTVLHQDWLN (서열 번호 104)

마우스 IgG2a, CH2 ALPIQHQDWMS (서열 번호 105)

도 1b



(52) CPC특허분류

C07K 16/1063 (2013.01)

C07K 16/241 (2013.01)

C07K 16/2809 (2013.01)

C07K 16/46 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/524 (2013.01)

C07K 2317/526 (2013.01)

C07K 2317/70 (2013.01)

C07K 2317/72 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역 및 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따르는, 단리된 다중특이성 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, IgG1, IgG2, 또는 IgG4 동종형인 단리된 다중특이성 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 제1 CH2-CH3 영역이 제2 CH2-CH3 영역에 비교할 때 단백질 A 리간드에 대한 감소된 결합을 갖는 단리된 다중특이성 항체.

청구항 4

제3항에 있어서, 단백질 A 리간드가 스타필로코커스 단백질 A, Z-도메인, 또는 Y-도메인을 포함하는 단리된 다중특이성 항체.

청구항 5

제4항에 있어서, Z-도메인이 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단리된 다중특이성 항체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 내에 비대칭 안정화 돌연변이를 추가로 포함하는 단리된 다중특이성 항체.

청구항 7

제6항에 있어서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 또는 제2 CH2-CH3 영역 및 제1 CH2-CH3 영역 내의 비대칭 안정화 돌연변이가

- a) 각각 F405L 및 K409R;
- b) 각각 야생형 및 F405L/R409K;
- c) 각각 T366W 및 T366S/L368A/Y407V;
- d) 각각 T366Y/F405A 및 T394W/Y407T;
- e) 각각 T366W/F405W 및 T394S/Y407A;
- f) 각각 F405W/Y407A 및 T366W/T394S;
- g) 각각 L351Y/F405A/Y407V 및 T394W;
- h) 각각 T366I/K392M/T394W 및 F405A/Y407V;
- i) 각각 T366L/K392M/T394W 및 F405A/Y407V;
- j) 각각 L351Y/Y407A 및 T366A/K409F;
- k) 각각 L351Y/Y407A 및 T366V/K409F;
- l) 각각 Y407A 및 T366A/K409F;
- m) 각각 D399K/E356K 및 K409D/K392D; 또는

n) 각각 D399K/E356K/E357K 및 K409D/K392D/K370인 단리된 다중특이성 항체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역이

- a) 각각 서열 번호 2 및 22;
- b) 각각 서열 번호 3 및 22;
- c) 각각 서열 번호 4 및 22;
- d) 각각 서열 번호 5 및 22;
- e) 각각 서열 번호 6 및 23;
- f) 각각 서열 번호 7 및 23;
- g) 각각 서열 번호 8 및 23;
- h) 각각 서열 번호 9 및 23;
- i) 각각 서열 번호 10 및 24;
- j) 각각 서열 번호 11 및 24;
- k) 각각 서열 번호 12 및 24;
- l) 각각 서열 번호 13 및 24;
- m) 각각 서열 번호 14 및 25;
- n) 각각 서열 번호 15 및 25;
- o) 각각 서열 번호 16 및 25;
- p) 각각 서열 번호 17 및 25;
- q) 각각 서열 번호 18 및 26;
- r) 각각 서열 번호 19 및 26;
- s) 각각 서열 번호 20 및 26;
- t) 각각 서열 번호 21 및 26;
- u) 각각 서열 번호 52 및 54;
- v) 각각 서열 번호 52 및 55;
- w) 각각 서열 번호 53 및 54;
- x) 각각 서열 번호 53 및 55;
- y) 각각 서열 번호 56 및 54; 또는
- z) 각각 서열 번호 56 및 55의 아미노산 서열을 포함하는 단리된 다중특이성 항체.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, Fc γ R 또는 FcRn에 대한 항체의 결합을 조절하는 하나 이상의 돌연 변이를 추가로 포함하는 단리된 다중특이성 항체.

청구항 10

제9항에 있어서, Fc γ R 또는 FcRn에 대한 항체의 결합을 조절하는 하나 이상의 돌연변이가 L234A, F234A, V234A, L235A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330A, P331S, L234A/L235A, F234A/L235A, V234A/L235A, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S239D/I332E,

S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L, G236A/S239D/I332E, S267E, S267E/L328F, S267E/I332E, 또는 M252Y/S254T/T256E인 단리된 다중특이성 항체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 경쇄 및 제2 경쇄를 포함하는 단리된 다중특이성 항체.

청구항 12

제11항에 있어서, 제1 경쇄 및 제2 경쇄가 동일한 아미노산 서열을 갖는 단리된 다중특이성 항체.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 2개 이상의 항원에 결합하는 단리된 다중특이성 항체.

청구항 14

제13항에 있어서, 2개의 항원이 PD1, CD27, CD28, NKP46, ICOS, GITR, OX40, CTLA4, LAG3, TIM3, KIRa, CD73, CD39, IDO, BTLA, VISTA, TIGIT, CD96, CD30, HVEM, DNAM-1, LFA, 종양 항원, EGFR, cMet, FGFR, ROR1, CD123, IL1RAP, FGFR, 메소텔린, CD3, T 세포 수용체, CD32b, CD32a, CD16a, CD16b, NKG2D, NKP46, CD28, CD47, DLL, CD8, CD89, HLA, B 세포 수용체, 또는 CD137 중 임의의 2개인 단리된 다중특이성 항체.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이성 항체인 단리된 다중특이성 항체.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 단리된 다중특이성 항체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 17

- a) 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나;
- b) 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역 및 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나;
- c) 서열 번호 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 87, 88, 또는 91의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 18

- a) 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역을 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드;
- b) 서열 번호 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 87, 88, 또는 91의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드;
- c) 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역 및 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드;
- d)
 - i) 각각 서열 번호 27 및 47;
 - ii) 각각 서열 번호 28 및 47;
 - iii) 각각 서열 번호 29 및 47;
 - iv) 각각 서열 번호 30 및 47;

- v) 각각 서열 번호 31 및 48;
- vi) 각각 서열 번호 32 및 48;
- vii) 각각 서열 번호 33 및 48;
- viii) 각각 서열 번호 34 및 48;
- ix) 각각 서열 번호 35 및 49;
- x) 각각 서열 번호 36 및 49;
- xi) 각각 서열 번호 37 및 49;
- xii) 각각 서열 번호 38 및 49;
- xiii) 각각 서열 번호 39 및 50;
- xiv) 각각 서열 번호 40 및 50;
- xv) 각각 서열 번호 41 및 50;
- xvi) 각각 서열 번호 42 및 50;
- xvii) 각각 서열 번호 43 및 51;
- xviii) 각각 서열 번호 44 및 51;
- xix) 각각 서열 번호 45 및 51;
- xx) 각각 서열 번호 46 및 51;
- xxi) 각각 서열 번호 87 및 89;
- xxii) 각각 서열 번호 87 및 90;
- xxiii) 각각 서열 번호 88 및 89;
- xxiv) 각각 서열 번호 88 및 90;
- xxv) 각각 서열 번호 92 및 89; 또는
- xxvi) 각각 서열 번호 92 및 90을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 19

제18항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 20

제19항에 있어서, 숙주 세포가 하이브리도마, 골수종, SP2/0, NS0, U266, CHO, CHO-K1SV, CHO-K1, DG44, 또는 Hek293인 숙주 세포.

청구항 21

- a) 다중특이성 항체가 발현되는 조건 하에 제19항의 숙주 세포를 배양하는 단계; 및
- b) 단백질 A 리간드 친화성 크로마토그래피를 사용하여 다중특이성 항체를 정제하는 단계를 포함하는, 제1항의 단리된 다중특이성 항체의 제조 방법.

청구항 22

- a) 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 중쇄 또는 이의 단편 및 제1 경쇄를 포함하는 제1 모 항체를 제공하는 단계;
- b) 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 중쇄 또는 이의 단편 및 제2 경쇄를 포함

하는 제2 모 항체를 제공하는 단계;

c) 제1 모 항체 및 제2 모 항체를 샘플 내에서 접촉시키는 단계;

d) 샘플을 인큐베이션하는 단계; 및

e) 단백질 A 리간드 친화성 크로마토그래피를 사용하여 다중특이성 항체를 정제하는 단계를 포함하는, 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 중쇄 또는 이의 단편 및 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 중쇄 또는 이의 단편을 포함하는 단리된 다중특이성 항체의 제조 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 단리된 다중특이성 항체가 제1 중쇄 또는 이의 단편 및 제2 중쇄 또는 이의 단편 내에 비대칭 안정화 돌연변이를 추가로 포함하는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 제1 중쇄 또는 이의 단편 및 제2 중쇄 또는 이의 단편 또는 제2 중쇄 또는 이의 단편 및 제1 중쇄 또는 이의 단편 내의 비대칭 안정화 돌연변이가

- a) 각각 F405L 및 K409R;
- b) 각각 야생형 및 F405L/R409K;
- c) 각각 T366W 및 T366S/L368A/Y407V;
- d) 각각 T366Y/F405A 및 T394W/Y407T;
- e) 각각 T366W/F405W 및 T394S/Y407A;
- f) 각각 F405W/Y407A 및 T366W/T394S;
- g) 각각 L351Y/F405A/Y407V 및 T394W;
- h) 각각 T366I/K392M/T394W 및 F405A/Y407V;
- i) 각각 T366L/K392M/T394W 및 F405A/Y407V;
- j) 각각 L351Y/Y407A 및 T366A/K409F;
- k) 각각 L351Y/Y407A 및 T366V/K409F;
- l) 각각 Y407A 및 T366A/K409F;
- m) 각각 D399K/E356K 및 K409D/K392D; 또는
- n) 각각 D399K/E356K/E357K 및 K409D/K392D/K370인 방법.

청구항 25

제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 다중특이성 항체가 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 동종형인 방법.

청구항 26

제22항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 경쇄 및 제2 경쇄가 동일한 아미노산 서열을 갖는 방법.

청구항 27

제22항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 모 항체 및 제2 모 항체가 정제된 항체로서 제공되는 방법.

청구항 28

제22항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 모 항체 및 제2 모 항체가 제1 모 항체 및 제2 모 항체를 발현하는 세포로부터 수집된 세포 배양 배지 중에 제공되는 방법.

청구항 29

제22항에 있어서, 환원제가 단계 d) 중에 첨가되는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 환원제가 2-메르캅토에틸아민(2-MEA), 다이티오프레이톨(DTT), 다이티오에리트리톨(DTE), 글루타티온, 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(TCEP), L-시스테인, 또는 베타-메르캅토에탄올인 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 2-MEA가 약 10 mM 내지 약 100 mM의 농도로 존재하는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 2-MEA가 약 25 mM 내지 약 75 mM의 농도로 존재하는 방법.

청구항 33

제22항에 있어서, 단계 d)가 약 20℃ 내지 약 37℃의 온도에서 약 90 분 내지 약 6 시간 수행되는 방법.

청구항 34

제22항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질 A 리간드 친화성 크로마토그래피가 pH 구배를 사용하는 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, pH 구배가 약 pH 7.0 내지 약 pH 3.0인 방법.

청구항 36

제34항에 있어서, pH 구배가 약 pH 4.6 내지 약 pH 3.4인 방법.

청구항 37

제34항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 다량체 항체가 약 pH 4.4 내지 약 pH 4.1에서 용출되는 방법.

청구항 38

제34항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질 A 리간드 친화성 크로마토그래피가 시트레이트 완충제를 사용하는 방법.

청구항 39

제22항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 다중특이성 항체가 이중특이성 항체인 방법.

청구항 40

동일한 아미노산 서열을 갖는 2개의 중쇄 또는 이들의 단편 및 2개의 경쇄 또는 이들의 단편을 포함하며, 여기서 2개의 중쇄는 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하고, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따르는, 단리된 항체.

청구항 41

제40항에 있어서, 2개의 중쇄 또는 이들의 단편이 돌연변이 F405L, K409R, F405L/R409K, T366W, 또는 T366S/L368A/Y407V를 추가로 포함하는 단리된 항체.

청구항 42

제40항 또는 제41항에 있어서, IgG1, IgG2, 또는 IgG4 동종형인 단리된 항체.

청구항 43

제40항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 52, 53, 또는 56의 중쇄 CH2-CH3 영역을 포함하는 단리된 항체.

청구항 44

- a) 서열 번호 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 52, 53, 또는 56의 CH2-CH3 영역을 포함하는 항체 중쇄를 암호화하거나; 또는
- b) 서열 번호 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 87, 88, 또는 91의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 45

제44항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 46

제45항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 47

항체가 발현되는 조건 하에 제46항의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 항체를 정제하는 단계를 포함하는, 제40항의 단리된 항체의 제조 방법.

청구항 48

제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 제1 폴리펩티드는 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역을 포함하고 제2 폴리펩티드는 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따르는, 다량체 단백질.

청구항 49

제48항에 있어서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역이 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 동종형인 다량체 단백질.

청구항 50

제48항 또는 제49항에 있어서, 제1 CH2-CH3 영역이 제2 CH2-CH3 영역에 비교할 때 단백질 A 리간드에 대한 감소된 결합을 갖는 다량체 단백질.

청구항 51

제50항에 있어서, 단백질 A 리간드가 스타필로코커스 단백질 A, Z-도메인, 또는 Y-도메인을 포함하는 다량체 단백질.

청구항 52

제51항에 있어서, Z-도메인이 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 다량체 단백질.

청구항 53

제48항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 내에 비대칭 안정화 돌연변이를 추가로 포함하는 다량체 단백질.

청구항 54

제53항에 있어서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 또는 제2 CH2-CH3 영역 및 제1 CH2-CH3 영역 내의 비대칭 안정화 돌연변이가

- a) 각각 F405L 및 K409R;
- b) 각각 야생형 및 F405L/R409K;
- c) 각각 T366W 및 T366S/L368A/Y407V;
- d) 각각 T366Y/F405A 및 T394W/Y407T;
- e) 각각 T366W/F405W 및 T394S/Y407A;
- f) 각각 F405W/Y407A 및 T366W/T394S;
- g) 각각 L351Y/F405A/Y407V 및 T394W;
- h) 각각 T366I/K392M/T394W 및 F405A/Y407V;
- i) 각각 T366L/K392M/T394W 및 F405A/Y407V;
- j) 각각 L351Y/Y407A 및 T366A/K409F;
- k) 각각 L351Y/Y407A 및 T366V/K409F;
- l) 각각 Y407A 및 T366A/K409F;
- m) 각각 D399K/E356K 및 K409D/K392D; 또는
- n) 각각 D399K/E356K/E357K 및 K409D/K392D/K370인 다량체 단백질.

청구항 55

제48항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역이

- a) 각각 서열 번호 2 및 22;
- b) 각각 서열 번호 3 및 22;
- c) 각각 서열 번호 4 및 22;
- d) 각각 서열 번호 5 및 22;
- e) 각각 서열 번호 6 및 23;
- f) 각각 서열 번호 7 및 23;
- g) 각각 서열 번호 8 및 23;
- h) 각각 서열 번호 9 및 23;
- i) 각각 서열 번호 10 및 24;
- j) 각각 서열 번호 11 및 24;
- k) 각각 서열 번호 12 및 24;
- l) 각각 서열 번호 13 및 24;
- m) 각각 서열 번호 14 및 25;
- n) 각각 서열 번호 15 및 25;
- o) 각각 서열 번호 16 및 25;
- p) 각각 서열 번호 17 및 25;
- q) 각각 서열 번호 18 및 26;
- r) 각각 서열 번호 19 및 26;
- s) 각각 서열 번호 20 및 26;

- t) 각각 서열 번호 21 및 26;
- u) 각각 서열 번호 52 및 54;
- v) 각각 서열 번호 52 및 55;
- w) 각각 서열 번호 53 및 54;
- x) 각각 서열 번호 53 및 55;
- y) 각각 서열 번호 56 및 54; 또는
- z) 각각 서열 번호 56 및 55의 아미노산 서열을 포함하는 다량체 단백질.

청구항 56

제48항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 CH2-CH3 영역 및/또는 제2 CH2-CH3 영역이 이중 단백질에 커플링되는 다량체 단백질.

청구항 57

제56항에 있어서, 이중 단백질이 펩티드, 수용체의 세포외 도메인, 리간드의 세포외 도메인, 분비된 단백질, scFv, Fab, 중쇄 가변 영역(VH), 경쇄 가변 영역(VL), 피브로넥틴 III형 도메인, 및/또는 파이노머인 다량체 단백질.

청구항 58

제57항에 있어서, 이중 단백질이 임의로 링커를 통해 제1 CH2-CH3 영역 및/또는 제2 CH2-CH3 영역의 N-말단 또는 C-말단에 커플링되는 다량체 단백질.

청구항 59

제68항에 있어서, 링커가 서열 번호 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 또는 98의 아미노산 서열을 포함하는 다량체 단백질.

청구항 60

제48항에 있어서, 항체인 다량체 단백질.

청구항 61

제60항에 있어서, 항체가 다중특이성, 이중특이성, 또는 단일특이성인 다량체 단백질.

청구항 62

제48항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 2개, 3개, 또는 4개의 폴리펩티드 사슬을 함유하는 다량체 단백질.

청구항 63

제48항 내지 제62항 중 어느 한 항의 다량체 단백질을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 64

- a) 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역을 포함하는 제1 모 단백질을 제공하는 단계;
- b) 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하는 제2 모 단백질을 제공하는 단계;
- c) 제1 모 단백질 및 제2 모 단백질을 샘플 내에서 접촉시키는 단계;
- d) 샘플을 인큐베이션하는 단계; 및

e) 단백질 A 리간드 친화성 크로마토그래피를 사용하여 다중특이성 단백질을 정제하는 단계를 포함하는, 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역 및 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하는 단리된 다량체 단백질의 제조 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 단리된 다량체 단백질이 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 내에 비대칭 안정화 돌연변이를 추가로 포함하는 방법.

청구항 66

제65항에 있어서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 또는 제2 CH2-CH3 영역 및 제1 CH2-CH3 영역 내의 비대칭 안정화 돌연변이가

- a) 각각 F405L 및 K409R;
- b) 각각 야생형 및 F405L/R409K;
- c) 각각 T366W 및 T366S/L368A/Y407V;
- d) 각각 T366Y/F405A 및 T394W/Y407T;
- e) 각각 T366W/F405W 및 T394S/Y407A;
- f) 각각 F405W/Y407A 및 T366W/T394S;
- g) 각각 L351Y/F405A/Y407V 및 T394W;
- h) 각각 T366I/K392M/T394W 및 F405A/Y407V;
- i) 각각 T366L/K392M/T394W 및 F405A/Y407V;
- j) 각각 L351Y/Y407A 및 T366A/K409F;
- k) 각각 L351Y/Y407A 및 T366V/K409F;
- l) 각각 Y407A 및 T366A/K409F;
- m) 각각 D399K/E356K 및 K409D/K392D; 또는
- n) 각각 D399K/E356K/E357K 및 K409D/K392D/K370인 방법.

청구항 67

제64항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역이 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 동종형인 방법.

청구항 68

제64항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역이

- a) 각각 서열 번호 2 및 22;
- b) 각각 서열 번호 3 및 22;
- c) 각각 서열 번호 4 및 22;
- d) 각각 서열 번호 5 및 22;
- e) 각각 서열 번호 6 및 23;
- f) 각각 서열 번호 7 및 23;
- g) 각각 서열 번호 8 및 23;
- h) 각각 서열 번호 9 및 23;

- i) 각각 서열 번호 10 및 24;
- j) 각각 서열 번호 11 및 24;
- k) 각각 서열 번호 12 및 24;
- l) 각각 서열 번호 13 및 24;
- m) 각각 서열 번호 14 및 25;
- n) 각각 서열 번호 15 및 25;
- o) 각각 서열 번호 16 및 25;
- p) 각각 서열 번호 17 및 25;
- q) 각각 서열 번호 18 및 26;
- r) 각각 서열 번호 19 및 26;
- s) 각각 서열 번호 20 및 26;
- t) 각각 서열 번호 21 및 26;
- u) 각각 서열 번호 52 및 54;
- v) 각각 서열 번호 52 및 55;
- w) 각각 서열 번호 53 및 54;
- x) 각각 서열 번호 53 및 55;
- y) 각각 서열 번호 56 및 54; 또는
- z) 각각 서열 번호 56 및 55의 아미노산 서열을 포함하는 방법.

청구항 69

제64항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 CH2-CH3 영역 및/또는 제2 CH2-CH3 영역이 이중 단백질에 커플링되는 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, 이중 단백질이 펩티드, 수용체의 세포외 도메인, 리간드의 세포외 도메인, 분비된 단백질, scFv, Fab, 중쇄 가변 영역(VH), 경쇄 가변 영역(VL), 피브로넥틴 III형 도메인, 및/또는 파이노머인 방법.

청구항 71

제69항 또는 제70항에 있어서, 이중 단백질이 임의로 링커를 통해 제1 CH2-CH3 영역 및/또는 제2 CH2-CH3 영역의 N-말단 또는 C-말단에 커플링되는 방법.

청구항 72

제71항에 있어서, 링커가 서열 번호 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 또는 98의 아미노산 서열을 포함하는 방법.

청구항 73

제64항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 모 단백질 및 제2 모 단백질이 정제된 단백질로서 제공되는 방법.

청구항 74

제64항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 모 단백질 및 제2 모 단백질이 제1 모 단백질 및 제2 모 단백질을 발현하는 세포로부터 수집된 세포 배양 배지 중에 제공되는 방법.

청구항 75

제64항에 있어서, 환원제가 단계 d) 중에 첨가되는 방법.

청구항 76

제75항에 있어서, 환원제가 2-메르캅토에틸아민(2-MEA), 다이티오프레이톨(DTT), 다이티오에리트리톨(DTE), 글루타티온, 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(TCEP), L-시스테인, 또는 베타-메르캅토에탄올인 방법.

청구항 77

제76항에 있어서, 2-MEA가 약 10 mM 내지 약 100 mM의 농도로 존재하는 방법.

청구항 78

제76항에 있어서, 2-MEA가 약 25 mM 내지 약 75 mM의 농도로 존재하는 방법.

청구항 79

제64항에 있어서, 단계 d)가 약 25°C 내지 약 37°C의 온도에서 약 90 분 내지 약 6 시간 동안 수행되는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비대칭 CH₂-CH₃ 영역 돌연변이를 갖는 조작된 다중특이성 항체 및 다른 다량체 단백질 및 이들의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다.

[0002] **서열 목록**

[0003] 본 출원은 EFS-웹을 통해 제출한 서열 목록을 포함하며, 이의 전체 내용이 본 명세서에 참고로 포함된다. 2018년 5월 29일자로 생성된 ASCII 텍스트 파일은 JBI5124WOPCT_ST25.txt로 명명되고 크기가 164 킬로바이트이다.

배경 기술

[0004] 치료적 생물제제 프로그램은 이중-표적화, 세포 재지정(cell redirection) 노력, 및 면역 체크포인트 조절을 위한 이중특이성 항체로 점점 더 전환되고 있으며; 실제로 많은 이중특이성 치료제가 현재 임상 시험 중이다(문헌 [Jachimowicz *et al.* *BioDrugs*. 2014 (4):331-43]). 이중특이성 항체의 개발은, 재현가능하고 규모변경이 가능한 방식으로 높은 역가의 순수한 생성물을 생성할 수 있고, 과량의 모 분자 또는 중간체 분자로부터 이중특이성 분자를 분리할 수 있는, 상류 및 하류 과정 둘 모두의 난점에 의해 제한되어 왔다. IgG 중쇄 또는 하프 분자를 특이적으로 짝짓기 위한 방법이 개발되었고, 노브-인-홀(knob-in-hole), 제어된 Fab 아암 교환, CrossMAb, 및 공통 경쇄 및 직교 Fab 계면을 포함한다. Fv-기반 분자(즉, BiTE, 다이아바디) 및 비-IgG 기반 스캐폴드(즉, DARPIn, 아드넥틴, 파이노머, 및 센티린)의 생성은 이들 분자를 치료제로서 개발함에 있어서 증가된 관심을 받았다.

[0005] Fv-단독 또는 대안적인 스캐폴드-기반 분자의 단점은, FcRn에 의해 그들이 재순환될 수 없음으로 인해 리소좀 분해 또는 비뇨기 배설로부터 유발되는 전형적으로 더 짧은 그들의 혈청 수명이다. 따라서, 온전한 Fc 도메인을 함유하는 IgG-기반 다중특이성 분자는 그들의 더 긴 혈청 반감기, 이펙터 기능을 용이하게 하는 능력, 및 아포토시스 경로의 유도에 기초하여 매력적이다.

[0006] 이중특이성 항체의 정제는 잔류 모 및 다른 중간체 mAb 및 Ab 단편 분자를 제거하기 위해 필요한 다중 단계로 인해 난제일 수 있다. 그러한 분자는 유도된 이중특이성 항체와 유사한 생물물리학적 특성을 가질 수 있으며, 따라서 크로마토그래피 방법에 의해 용이하게 분리될 수 없다. 이러한 정제의 난점은 이중특이성 분자의 수율 또는 순도의 감소로 이어질 수 있다.

[0007] 따라서, 항체와 같은 이중특이성 및 다중특이성 분자의 정제를 위한 대안적인 이중특이성 및 다중특이성 포맷 및 방법이 여전히 필요하다.

발명의 내용

- [0008] 본 발명은 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역 및 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하는 단리된 다중특이성 항체를 제공하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0009] 본 발명은 또한 돌연변이 Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역 및 위치 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하는 단리된 다중특이성 항체를 제공하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0010] 본 발명은 또한 돌연변이 Q311K를 포함하는 제1 CH2-CH3 영역 및 위치 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하는 단리된 다중특이성 항체를 제공하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0011] 본 발명은 또한 돌연변이 T307P/L309Q를 포함하는 제1 CH2-CH3 영역 및 위치 307 및 309에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하는 단리된 다중특이성 항체를 제공하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0012] 본 발명은 또한 돌연변이 T307P/V309Q를 포함하는 제1 CH2-CH3 영역 및 위치 307 및 309에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하는 단리된 다중특이성 항체를 제공하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0013] 본 발명은 또한 돌연변이 T307P/L309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역 및 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하는 단리된 다중특이성 항체를 제공하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0014] 본 발명은 또한 돌연변이 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역 및 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하는 단리된 다중특이성 항체를 제공하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0015] 본 발명은 또한,
- [0016] 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나;
- [0017] 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역 및 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나;
- [0018] 서열 번호 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 87, 88, 또는 91의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0019] 본 발명은 또한,
- [0020] 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역을 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드;
- [0021] 서열 번호 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 87, 88, 또는 91의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드;
- [0022] 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역 및 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드; 또는
- [0023] 각각 서열 번호 27 및 47;
- [0024] 각각 서열 번호 28 및 47;
- [0025] 각각 서열 번호 29 및 47;
- [0026] 각각 서열 번호 30 및 47;
- [0027] 각각 서열 번호 31 및 48;

- [0028] 각각 서열 번호 32 및 48;
- [0029] 각각 서열 번호 33 및 48;
- [0030] 각각 서열 번호 34 및 48;
- [0031] 각각 서열 번호 35 및 49;
- [0032] 각각 서열 번호 36 및 49;
- [0033] 각각 서열 번호 37 및 49;
- [0034] 각각 서열 번호 38 및 49;
- [0035] 각각 서열 번호 39 및 50;
- [0036] 각각 서열 번호 40 및 50;
- [0037] 각각 서열 번호 41 및 50;
- [0038] 각각 서열 번호 42 및 50;
- [0039] 각각 서열 번호 43 및 51;
- [0040] 각각 서열 번호 44 및 51;
- [0041] 각각 서열 번호 45 및 51;
- [0042] 각각 서열 번호 46 및 51;
- [0043] 각각 서열 번호 87 및 89;
- [0044] 각각 서열 번호 87 및 90;
- [0045] 각각 서열 번호 88 및 89;
- [0046] 각각 서열 번호 88 및 90;
- [0047] 각각 서열 번호 92 및 89; 또는
- [0048] 각각 서열 번호 92 및 90을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0049] 본 발명은 또한 본 발명의 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0050] 본 발명은 또한,
- [0051] 다중특이성 항체가 발현되는 조건 하에 본 발명의 숙주 세포를 배양하는 단계; 및
- [0052] 단백질 A 리간드 친화성 크로마토그래피를 사용하여 다중특이성 항체를 정제하는 단계를 포함하는, 본 발명의 단리된 다중특이성 항체의 제조 방법을 제공한다.
- [0053] 본 발명은 또한,
- [0054] 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 중쇄 및 제1 경쇄를 포함하는 제1 모 항체를 제공하는 단계;
- [0055] 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 중쇄 및 제2 경쇄를 포함하는 제2 모 항체를 제공하는 단계;
- [0056] 제1 모 항체 및 제2 모 항체를 샘플 내에서 접촉시키는 단계;
- [0057] 샘플을 인큐베이션하는 단계; 및
- [0058] 단백질 A 리간드 친화성 크로마토그래피를 사용하여 다중특이성 항체를 정제하는 단계를 포함하는, 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 중쇄 및 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 중쇄를 포함하는 단리된 다중특이성 항체의 제조 방법을 제공한다.
- [0059] 본 발명은 또한 동일한 아미노산 서열을 갖는 2개의 중쇄 또는 이들의 단편 및 2개의 경쇄 또는 이들의 단편을

포함하는 단리된 항체를 제공하며, 여기서 2개의 중쇄는 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하고, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.

- [0060] 본 발명은 또한,
- [0061] 서열 번호 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 52, 53, 또는 56의 CH2-CH3 영역을 포함하는 항체 중쇄를 암호화하거나;
- [0062] 서열 번호 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 87, 88, 또는 91의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0063] 본 발명은 또한 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 다량체 단백질을 제공하며, 여기서 제1 폴리펩티드는 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역을 포함하고 제2 폴리펩티드는 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0064] 본 발명은 또한 본 발명의 다량체 단백질을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0065] 본 발명은 또한,
- [0066] 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역을 포함하는 제1 모 단백질을 제공하는 단계;
- [0067] 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하는 제2 모 단백질을 제공하는 단계;
- [0068] 제1 모 단백질 및 제2 모 단백질을 샘플 내에서 접촉시키는 단계;
- [0069] 샘플을 인큐베이션하는 단계; 및
- [0070] 단백질 A 리간드 친화성 크로마토그래피를 사용하여 다중특이성 단백질을 정제하는 단계를 포함하는, 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역 및 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하는 단리된 다량체 단백질의 제조 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0071] **도 1a**는 아미노산 잔기 305 내지 315로부터의 인간 IgG1과 마우스 IgG2a CH2 도메인 사이의 정렬을 나타내며; 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- 도 1b**는 IgG1 CH2 잔기 T307, L309, 및 Q311(도면에서 밑줄 친 잔기)과 FcRn 또는 Z-도메인(Z34C 펩티드)의 상호작용을 나타낸다. 각각의 잔기는 FcRn 내의 잔기 및 Z-도메인과 측쇄 상호작용을 이루었다. T307은 FcRn의 β2 마이크로글로불린 도메인 상에서 I1과 상호작용하였다. L309 및 Q311R은 FcRn 및 Z-도메인 둘 모두와의 상호작용을 담당하였다(L309 및 Q311에 대해 각각 파선 및 실선). IQR: **서열 번호 102**(FcRn의 β2 사슬의 부분); LNGEEFMDFDLKQGTWGGDWPEA: **서열 번호 103**(FcRn의 α 사슬의 부분); VLTVLHQDWLN: **서열 번호 104**(IgG1 CH2 도메인의 부분); FNMQCORRFYEALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDDC: **서열 번호 99**.
- 도 2a**는 알파스크린(AlphaScreen) 검정을 사용하여 FcRn에 대한 mAb RSV-L과 표시된 단일특이성 항체의 경쟁 결합의 용량 반응 곡선을 나타낸다. 그래프는 경쟁자의 농도에 대해 플로팅된 % 최대 신호를 나타낸다.
- 도 2b**는 알파스크린 검정을 사용하여 FcRn에 대한 mAb RSV-L과 표시된 단일특이성 또는 이중특이성 항체의 경쟁 결합의 용량 반응 곡선을 나타낸다. 그래프는 경쟁자의 농도에 대해 플로팅된 % 최대 신호를 나타낸다.
- 도 3a**는 알파스크린 검정을 사용하여 FcγRI에 대한 mAb RSV-L과 표시된 단일특이성 또는 이중특이성 항체의 경쟁 결합의 용량 반응 곡선을 나타낸다. 그래프는 경쟁자의 농도에 대해 플로팅된 % 최대 신호를 나타낸다.
- 도 3b**는 알파스크린 검정을 사용하여 FcγRIIa에 대한 mAb RSV-L과 표시된 단일특이성 또는 이중특이성 항체의 경쟁 결합의 용량 반응 곡선을 나타낸다. 그래프는 경쟁자의 농도에 대해 플로팅된 % 최대 신호를 나타낸다.
- 도 3c**는 알파스크린 검정을 사용하여 FcγRIIb에 대한 mAb RSV-L과 표시된 단일특이성 또는 이중특이성 항체의 경쟁 결합의 용량 반응 곡선을 나타낸다. 그래프는 경쟁자의 농도에 대해 플로팅된 % 최대 신호를 나타낸다.

도 3d는 알파스크린 검정을 사용하여 Fc γ RIIIa에 대한 mAb RSV-L과 표시된 단일특이성 또는 이중특이성 항체의 경쟁 결합의 용량 반응 곡선을 나타낸다. 그래프는 경쟁자의 농도에 대해 플로팅된 % 최대 신호를 나타낸다.

도 4a는 개발된 조건 하에 이중특이성 항체가 모 단일특이성 mAb로부터 분리될 수 있음을 입증하는 소수성 상호 작용 크로마토그래피(HIC) 크로마토그램을 나타낸다.

도 4b는 Fab 아암 교환을 사용하여 생성된 등몰량의 항체 RSV-L[TLQ] 및 gp120-R 및 bsRSV-L[TLQ]의 혼합물의 샘플의 HIC 크로마토그램을 나타낸다.

도 4c는 단백질 A 수지로부터의 Fab 아암 교환을 사용하여 생성된 항체 RSV-L[TLQ], gp120-R, 및 bsRSV-L[TLQ]의 혼합물의 샘플의 용출 프로파일을 나타낸다.

도 4d는 단백질 A 용출 피크의 HIC 크로마토그램을 나타낸다.

도 5a는 상청액내 Fab 아암 교환된 bsRSV-L[TLQ]의 샘플의 용출 프로파일을 나타낸다.

도 5b는 상청액내 Fab 아암 교환된 bsRSV-L[TLQ]로부터의 샘플의 단백질 A 친화성 컬럼 pH 4.7 용출액의 HIC 분석을 나타낸다.

도 5c는 상청액내 Fab 아암 교환된 bsRSV-L[TLQ]로부터의 샘플의 단백질 A 친화성 컬럼 pH 4.2 용출액의 HIC 분석을 나타낸다.

도 5d는 상청액내 Fab 아암 교환된 bsRSV-L[TLQ]로부터의 샘플의 단백질 A 친화성 컬럼 pH 3.4 용출액의 HIC 분석을 나타낸다.

도 6a는 pH 4.6, 4.2, 및 3.4에서 용출되는 3개의 별개의 피크를 나타내는, 상청액내 Fab 아암 교환된 bsRSV-L[Q311R]의 샘플의 단백질 A 크로마토그램을 나타낸다.

도 6b는 상청액내 Fab 아암 교환된 bsRSV-L[Q311R]로부터의 샘플의 단백질 A 친화성 컬럼 pH 4.6 용출액의 HIC 분석을 나타낸다.

도 6c는 상청액내 Fab 아암 교환된 bsRSV-L[Q311R]로부터의 샘플의 단백질 A 친화성 컬럼 pH 4.2 용출액의 HIC 분석을 나타낸다.

도 6d는 상청액내 Fab 아암 교환된 bsRSV-L[Q311R]로부터의 샘플의 단백질 A 친화성 컬럼 pH 3.4 용출액의 HIC 분석을 나타낸다.

도 7a는 공통 경쇄 기술을 사용하여 생성된 bsTNF-[TLQ]의 샘플의 단백질 A 크로마토그램을 나타낸다.

도 7b는 공통 경쇄 기술을 사용하여 생성된 bsTNF-[TLQ]의 샘플의 단백질 A 친화성 컬럼 pH 4.7 용출액의 HIC 분석을 나타낸다.

도 7c는 공통 경쇄 기술을 사용하여 생성된 bsTNF-[TLQ]의 샘플의 단백질 A 친화성 컬럼 pH 4.2 용출액의 HIC 분석을 나타낸다.

도 7d는 공통 경쇄 기술을 사용하여 생성된 bsTNF-[TLQ]의 샘플의 단백질 A 친화성 컬럼 pH 3.4 용출액의 HIC 분석을 나타낸다.

도 8은 Tg32 반접합성 마우스에서 표시된 항체의 약동학적 분석을 나타낸다. 그래프는 시간에 대해 플로팅된 선형 상의 초기 시점에 대해 정규화된 각각의 mAb의 농도를 나타낸다. 각각의 지점은 군당 4 마리의 동물의 평균 \pm 표준 오차를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0072] 본 명세서에 인용된, 특허 및 특허 출원을 포함하지만 이에 한정되지 않는 모든 간행물은 마치 완전히 기재된 것처럼 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0073] 본 명세서에서 사용되는 용어는 단지 특정 실시 형태를 설명하기 위한 것이며, 한정하려는 것이 아님을 이해해야 한다. 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 용어 및 과학 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다.

[0074] 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 시험을 실시하는 데 사용될 수

있지만, 예시적인 재료 및 방법이 본 명세서에 기재되어 있다. 본 발명을 설명하고 청구함에 있어서, 하기 용어가 사용될 것이다.

- [0075] **정의**
- [0076] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단수형("a", "an" 및 "the")은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면, 복수의 지시 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "세포"에 대한 언급은 2개 이상의 세포의 조합 등을 포함한다.
- [0077] "다량체 단백질"은 단일 단백질을 형성하도록 조합되는 2개 이상의 별개의 폴리펩티드 사슬로 구성된 단백질을 지칭한다. 폴리펩티드 사슬은 예를 들어 다이설파이드 결합을 통해 비공유적으로 또는 공유적으로 커플링될 수 있다.
- [0078] "결합하다"는 2개의 단백질의 특이적 결합, 예컨대 항체의 항원에 대한 결합 또는 다중특이성 단백질의 그의 리간드에 대한 결합을 지칭한다. "특이적 결합"은, 전형적으로 약 1×10^{-8} M 이하, 예를 들어 약 1×10^{-9} M 이하, 약 1×10^{-10} M 이하, 약 1×10^{-11} M 이하, 또는 약 1×10^{-12} M 이하의 평형 해리 상수(K_D)로, 전형적으로 비특이적 항원(예를 들어, BSA, 카세인)에의 결합에 대한 그의 K_D 보다 100배 이상 더 작은 K_D 로 2개의 단백질이 우선적으로 결합하는 것을 지칭한다.
- [0079] "감소된 결합"은, 돌연변이가 없는 모 분자의 결합에 비교할 때, CH2-CH3 영역 내에 하나 이상의 돌연변이를 갖는 본 발명의 항체 또는 다중특이성 단백질의 단백질 A 리간드에 대한 결합에 있어서 측정가능한 감소를 지칭한다.
- [0080] "결합을 조절하다"는, CH2-CH3 영역 내에 하나 이상의 돌연변이를 갖는 본 발명의 항체 또는 다중특이성 단백질의 Fc γ R 또는 FcRn에 대한 결합에 있어서 측정가능한 차이를 지칭한다.
- [0081] "항원"은 대상에서 면역 반응을 마운팅할 수 있는 단백질 또는 단백질의 단편과 같은 분자를 지칭한다.
- [0082] "비대칭 안정화 돌연변이"는 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 내의 돌연변이를 지칭하며, 이들은 제1 및 제2 CH2-CH3 영역 내의 상이한 위치에 존재하고 제1 CH2-CH3 영역과 제2 CH2-CH3 영역 사이의 동종이량체 형성에 비해 제1 CH2-CH3 영역과 제2 CH2-CH3 영역 사이의 이종이량체 형성을 촉진한다(예를 들어 안정화시킴).
- [0083] "이종 단백질"은 천연적으로 내인성 세포에서 CH2-CH3 영역을 포함하는 폴리펩티드의 부분 또는 일부가 아닌 폴리펩티드 또는 단백질을 지칭한다.
- [0084] "피브로넥틴 III형(FN3) 도메인"(FN3 도메인)은 피브로넥틴, 테나신, 세포내 세포골격 단백질, 사이토카인 수용체, 및 원핵생물 효소를 포함하는 단백질에서 빈번하게 나타나는 도메인을 지칭한다(문헌[Bork and Doolittle, *Proc Nat Acad Sci USA* 89:8990-8994, 1992]; 문헌[Meinke *et al.*, *J Bacteriol* 175:1910-1918, 1993]; 문헌[Watanabe *et al.*, *J Biol Chem* 265:15659-15665, 1990]). 예시적인 FN3 도메인은 인간 테나신 C에 존재하는 15개의 상이한 FN3 도메인, 인간 피브로넥틴(FN)에 존재하는 15개의 상이한 FN3 도메인, 및 예를 들어 미국 특허 제8,278,419호에 기재된 바와 같은 비천연 합성 FN3 도메인이다. 개별적인 FN3 도메인은 도메인 번호 및 단백질 명칭(예를 들어, 테나신의 제3 FN3 도메인(TN3), 또는 피브로넥틴의 제10 FN3 도메인(FN10))에 의해 지칭된다. FN3 도메인은 높은 특이성 및 친화성으로 항원에 결합하도록 조작될 수 있다.
- [0085] "파이노머"는 높은 특이성 및 친화성으로 항원에 결합하도록 조작될 수 있는 인간 Fyn SH3 도메인으로부터 유래된 항원-결합 단백질을 지칭한다.
- [0086] "항체"는 넓은 의미를 의미하며, 무린, 토끼, 인간, 인간화 및 키메라 단일클론 항체를 포함하는 단일클론 항체, 항원-결합 단편, 단일특이성, 이종특이성, 또는 다중특이성 항체, 이량체, 사량체, 또는 다량체 항체, 단일쇄 항체, 도메인 항체, 및 필요한 특이성의 항원 결합 부위를 포함하는 면역글로불린 분자의 임의의 다른 변형된 구성을 포함하는 면역글로불린 분자를 포함한다. "전장 항체"는 다이설파이드 결합에 의해 상호연결된 2개의 중쇄(HC) 및 2개의 경쇄(LC)뿐만 아니라 이들의 다량체(예를 들어, IgM)로 이루어진다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(VH) 및 중쇄 불변 영역(도메인 CH1, 힌지 CH2 및 CH3으로 구성됨)으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(VL) 및 경쇄 불변 영역(CL)으로 구성된다. VH 및 VL은 프레임워크 영역(FR)이 사이에 들어간(interspersed), 상보성 결정 영역(CDR)으로 불리는 초가변(hypervariability) 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 3개의 CDR 및 4개의 FR 세그먼트로 구성되며, 아미노-말단부터 카르복실-말단까지 하기

의 순서대로 배열된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4.

- [0087] "상보성 결정 영역(CDR)"은 항원에 결합하는 항체 내의 영역이다. VH 내의 3개의 CDR(HCDR1, HCDR2, HCDR3) 및 VL 내의 3개의 CDR(LCDR1, LCDR2, LCDR3)이 존재한다. 카바트(Kabat)(문헌[Wu and Kabat, *J Exp Med* 132:211-250, 1970]; 문헌[Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991]), 초티아(Chothia)(문헌 [Chothia and Lesk, *J Mol Biol* 196: 901-917, 1987]), 및 IMG(T)(문헌[Lefranc *et al.*, *Dev Comp Immunol* 27:55-77, 2003])와 같은 다양한 도해를 사용하여 CDR을 정의할 수 있다. 다양한 도해와 가변 영역 넘버링 사이의 상용성이 기재되어 있다(예를 들어, 문헌[Lefranc *et al.*, *Dev Comp Immunol* 27: 55-77, 2003]; 문헌 [Honegger and Pluckthun, *J Mol Biol* 309:657-70, 2001]; 문헌[International ImMunoGeneTics (IMGT) database; Web resources, <http://www.imgt.org>]을 참조한다). UCL Business PLC에 의한 abYsis와 같은 이용 가능한 프로그램을 사용하여 CDR을 도해할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "CDR", "HCDR1", "HCDR2", "HCDR3", "LCDR1", "LCDR2" 및 "LCDR3"은 본 명세서에서 달리 명시적으로 기재되어 있지 않는 한, 상기 기재된 카바트, 초티아 또는 IMGT 중 어느 하나의 방법에 의해 정의된 CDR을 포함한다.
- [0088] 면역글로불린은 중쇄 불변 영역 아미노산 서열에 따라 5개의 주요 부류, IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM으로 배정될 수 있다. IgA 및 IgG는 동종형(isotype) IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 추가로 하위-분류된다. 임의의 척추동물 종의 항체 경쇄는 이들의 불변 영역의 아미노산 서열에 기초하여, 명확하게 별개의 2개의 유형, 즉 카파(κ) 및 람다(λ) 중 하나로 배정될 수 있다.
- [0089] "항원-결합 단편"은 모 전장 항체의 항원 결합 특성을 유지하는 면역글로불린 분자의 일부분을 지칭한다. 예시적인 항원-결합 단편은 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR) 1, 2, 및/또는 3, 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR) 1, 2, 및/또는 3, VH, VL, VH 및 VL, Fab, F(ab')₂, Fd 및 Fv 단편뿐만 아니라 하나의 VH 도메인 또는 하나의 VL 도메인으로 이루어진 도메인 항체(dAb)이다. VH 및 VL 도메인은 합성 링커를 통해 함께 연결되어 다양한 유형의 단일쇄 항체 설계를 형성할 수 있으며, 여기서 VH/VL 도메인 쌍은 VH 및 VL 도메인이 별개의 단일쇄에 의해 발현되는 경우에 분자간에 또는 분자내에서 쌍을 이루어서, 1가 항원 결합 부위, 예컨대 단일쇄 Fv(scFv) 또는 이중항체(diabody)를 형성하며, 이는 예를 들어 국제 특허 출원 공개 제W01998/44001호, 국제 특허 출원 공개 제W01988/01649호; 국제 특허 출원 공개 제W01994/13804호; 국제 특허 출원 공개 제W01992/01047호에 기재되어 있다.
- [0090] "CH2-CH3 영역"은 인간 항체 불변 도메인의 일부를 지칭하며, 아미노산 잔기 231 내지 446(잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따름)을 포함한다. CH2-CH3 영역은 위치 447에서 C-말단 라이신이 결실될 수 있다.
- [0091] "단일클론 항체"는, 항체 중쇄에서 C-말단 라이신을 제거하는 것과 같은 가능한 잘 알려진 변형을 제외하고는, 각각의 중쇄 및 각각의 경쇄 내에 단일 아미노산 조성을 갖는 항체 집단을 지칭한다. 단일클론 항체는, 이중특이성 또는 다중특이성 단일클론 항체가 2개 이상의 별개의 항원 에피토프에 특이적으로 결합하는 것을 제외하고는, 전형적으로 하나의 항원 에피토프에 특이적으로 결합한다. 단일클론 항체는 항체 집단 내에 이중 글리코실화를 가질 수 있다. 단일클론 항체는 단일특이성 또는 다중특이성이거나, 1가, 2가 또는 다가일 수 있다. 이중특이성 항체는 용어 단일클론 항체에 포함된다.
- [0092] "단리된"은 분자가 생성되는 시스템, 예컨대 재조합 세포의 다른 성분으로부터 실질적으로 분리되고/되거나 정제된 분자(예컨대 합성 폴리뉴클레오티드 또는 단백질, 예컨대 항체)의 상동 집단뿐만 아니라 적어도 하나의 정제 또는 단리 단계를 거친 단백질을 지칭한다. "단리된 항체"는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 없는 항체를 지칭하며, 더 높은 순도로, 예컨대 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 순도로 단리된 항체를 포함한다.
- [0093] "인간화 항체"는 CDR 서열이 인간 이외의 종으로부터 유래되고 프레임워크가 인간 면역글로불린 서열로부터 유래되는 항체를 지칭한다. 인간화 항체는 프레임워크 내에 치환을 포함할 수 있으므로, 프레임워크는 발현된 인간 면역글로불린 또는 인간 면역글로불린 생식세포계열 유전자 서열의 정확한 카피가 아닐 수 있다.
- [0094] "인간 항체"는 인간 대상에게 투여될 때 최소 면역 반응을 갖도록 최적화된 항체를 지칭한다. 인간 항체의 가변 영역은 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열로부터 유래된다. 항체가 불변 영역 또는 불변 영역의 일부를 함유하는 경우, 불변 영역은 또한 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열로부터 유래된다.
- [0095] 항체의 가변 영역이 인간 생식세포계열 면역글로불린 유전자를 사용하는 시스템으로부터 얻어지는 경우, 인간 항체는 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열"로부터 유래되는" 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 이러한

예시적인 시스템은 파지 또는 포유류 세포 상에 디스플레이된 인간 면역글로불린 유전자 라이브러리, 및 인간 면역글로불린 유전자좌를 담지하는 마우스 또는 래트와 같은 인간 이외의 유전자도입(transgenic) 동물이다. 예를 들어 체세포 돌연변이의 도입, 프레임워크 또는 CDR 내로의 치환의 의도적 도입, 및 인간 이외의 동물에서 클로닝 및 VJD 재조합 중에 도입된 아미노산 변화로 인해, 인간에서 발견된 면역글로불린에 비교할 때 "인간 항체"는 아미노산 차이를 전형적으로 포함한다. "인간 항체"는 아미노산 서열이 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열과 전형적으로 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일하다. 일부 경우에, "인간 항체"는, 예를 들어 문헌[Knappik *et al.*, *J Mol Biol* 296: 57-86, 2000]에 기재된 바와 같이 인간 프레임워크 서열 분석으로부터 유래되는 공통 프레임워크 서열 또는, 예를 들어 문헌[Shi *et al.*, *J Mol Biol* 397: 385-396, 2010] 및 국제 특허 출원 공개 제W02009/085462호에 기재된 바와 같이 파지 상에 디스플레이된 인간 면역글로불린 유전자 라이브러리 내로 혼입된 합성 HCDR3을 함유할 수 있다. CDR이 인간 이외의 종으로부터 유래되는 항체는 "인간 항체"의 정의에 포함되지 않는다.

- [0096] "제조합"은 제조합 방법에 의해 제조되거나, 발견되거나, 생성되거나, 단리된 항체 및 다른 단백질을 지칭한다.
- [0097] "다중특이성"은 2개 이상의 별개의 항원 또는 동일한 항원 내의 2개 이상의 별개의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체와 같은 단백질을 지칭한다. 다중특이성 단백질은 다른 관련 항원들에 대한, 예를 들어 다른 종, 예컨대 인간 또는 원숭이, 예를 들어 마카카 파시쿨라리스(*Macaca fascicularis*)(사이노물거스, 사이노), 판 트로글로디테스(*Pan troglodytes*)(침팬지, 침프), 또는 칼리트릭스 자쿠스(*Callithrix jacchus*)(코먼 마모셋, 마모셋)로부터의 동일한 항원(상동체)에 대한 교차-반응성을 가질 수 있거나, 2개 이상의 별개의 항원들 사이에 공유되는 에피토프에 결합할 수 있다.
- [0098] "이중특이성"은 2개의 별개의 항원 또는 동일한 항원 내의 2개의 별개의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체와 같은 단백질을 지칭한다. 이중특이성 단백질은 다른 관련 항원들에 대한, 예를 들어 다른 종, 예컨대 인간 또는 원숭이, 예를 들어 마카카 파시쿨라리스(사이노물거스, 사이노), 판 트로글로디테스(침팬지, 침프), 또는 칼리트릭스 자쿠스(코먼 마모셋, 마모셋)로부터의 동일한 항원(상동체)에 대한 교차-반응성을 가질 수 있거나, 2개 이상의 별개의 항원들 사이에 공유되는 에피토프에 결합할 수 있다.
- [0099] "단일특이성"은 하나의 별개의 항원 또는 별개의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체와 같은 단백질을 지칭한다. 단일특이성 단백질은 다른 관련 항원들에 대한, 예를 들어 다른 종, 예컨대 인간 또는 원숭이, 예를 들어 마카카 파시쿨라리스(사이노물거스, 사이노), 판 트로글로디테스(침팬지, 침프), 또는 칼리트릭스 자쿠스(코먼 마모셋, 마모셋)로부터의 동일한 항원(상동체)에 대한 교차-반응성을 가질 수 있거나, 2개 이상의 별개의 항원들 사이에 공유되는 에피토프에 결합할 수 있다.
- [0100] "백터"는 생물학적 시스템 내에서 복제가 가능하거나, 이러한 시스템 사이에서 이동할 수 있는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 백터 폴리뉴클레오티드는 전형적으로 생물학적 시스템, 예컨대 세포, 바이러스, 동물, 식물, 및 재구성된 생물학적 시스템에서 이들 폴리뉴클레오티드의 복제 또는 유지를 용이하게 하는 기능을 하는 요소, 예컨대 복제 기점, 폴리아데닐화 신호, 또는 선택 마커를 함유한다.
- [0101] "단백질 A 리간드 친화성 크로마토그래피"는 면역글로불린 분자의 Fc 영역에 대한 단백질 A 리간드의 IgG 결합 도메인의 친화성을 이용하는 친화성 크로마토그래피 방법을 지칭한다. 이 Fc 영역은 인간 또는 동물 면역글로불린 불변 도메인 CH2 및 CH3 또는 이들과 실질적으로 유사한 면역글로불린 도메인을 포함한다. 단백질 A 리간드는 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)의 세포벽으로부터의 천연 단백질 A, 제조합 또는 합성 방법에 의해 생성된 단백질 A, 및 Fc 영역에 결합하는 능력을 보유하는 변이체를 포함한다. 실제로, 단백질 A 리간드 크로마토그래피는 고체 지지체에 고정된 단백질 A 리간드를 사용하는 것을 수반한다. 문헌[Gagnon, Protein A Affinity Chromatography, Purification Tools for Monoclonal Antibodies, pp. 155-198, Validated Biosystems, 1996]을 참조한다. 고체 지지체는 단백질 A 리간드가 부착되는 비수성 매트릭스이다. 그러한 잘 알려진 지지체는 아가로스, 세파로스, 유리, 실리카, 폴리스티렌, 니트로셀룰로스, 차콜, 모래, 셀룰로스, 및 임의의 다른 적합한 재료를 포함한다. 임의의 적합한 잘 알려진 방법을 사용하여 제2 단백질을 고체 지지체에 부착할 수 있다. 고정된 단백질 A 리간드가 있거나 없는 이러한 고체 지지체는 예컨대 Vector Laboratory(미국 캘리포니아주 벨링게임 소재), Santa Cruz Biotechnology(미국 캘리포니아주 산타 크루즈 소재), BioRad(미국 캘리포니아주 허큘리스 소재), Amersham Biosciences(스웨덴 업살라 소재의 GE Healthcare의 일부), Pall(미국 뉴욕주 포트 워싱턴 소재), 및 EMD-Millipore(미국 매사추세츠주 빌레리카 소재)를 포함하는 많은 상업적 공급원으로부터 용이하게 입수가능하다. 기공 유리 매트릭스에 고정된 단백질 A 리간드는 PROSEP

®-A(Millipore)로 구매가능하다. 고체 상은 또한 아가로스-기반 매트릭스일 수 있다. 아가로스 매트릭스 상에 고정된 단백질 A 리간드는 MABSELECT™(Amersham Biosciences)로 구매가능하다.

- [0102] "발현 벡터"는 발현 벡터 내에 존재하는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩티드의 번역을 유도하기 위하여 생물학적 시스템 또는 재구성된 생물학적 시스템에서 이용될 수 있는 벡터를 지칭한다.
- [0103] "폴리뉴클레오티드"는 당-포스페이트 골격 또는 다른 균등한 공유결합적 화학 특성에 의해 공유 연결된 뉴클레오티드의 쇄를 포함하는 합성 분자를 지칭한다. cDNA는 합성 폴리뉴클레오티드의 전형적인 예이다.
- [0104] "폴리펩티드" 또는 "단백질"은 폴리펩티드를 형성하도록 펩티드 결합으로 결합된 적어도 2개의 아미노산 잔기를 포함하는 분자를 지칭한다. 50개 미만의 아미노산의 작은 폴리펩티드는 "펩티드"로 지칭될 수 있다.
- [0105] "변이체"는 하나 이상의 변형, 예를 들어 하나 이상의 치환, 삽입, 또는 결실에 의해 참조 폴리펩티드 또는 참조 폴리뉴클레오티드와 상이한 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다.
- [0106] "결합가(valent)"는 분자 내의 항원에 특이적인 명시된 수의 결합 부위의 존재를 지칭한다. 그렇기 때문에, 용어 "1가", "2가", "4가", 및 "6가"는 분자 내의 항원에 특이적인 각각 1개, 2개, 4개, 및 6개의 결합 부위의 존재를 지칭한다.
- [0107] "단백질 A 리간드"는 천연 발생 또는 변형된 스타필로코커스 단백질 A를 지칭하며, 조작된 단백질 A 도메인을 포함한다. 조작된 단백질 A는, 예를 들어 Z-도메인, Z-도메인의 변이체, Y-도메인, 또는 D 및 E 도메인이 결합된 조작된 단백질 A일 수 있다. 조작된 단백질 A 도메인은 면역글로불린의 VH3 도메인에 결합할 수 없을 수 있지만(또는 결합한다고 해도 매우 낮은 친화성으로 결합함), 여전히 IgG1, IgG2, 및 IgG4의 CH2-CH3 영역에 결합할 수 있다.
- [0108] "Z-도메인"은 단백질 A의 야생형 B 도메인에 비교할 때 돌연변이 A1V 및 G29A를 갖는 스타필로코커스 아우레우스 단백질 A의 B 도메인의 조작된 합성 변이체이다. Z-도메인은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함한다. 추가의 Z-도메인 변이체는 서열 번호 99, 100, 및 101의 아미노산 서열을 갖는 변이체, 및 제US2006/0194950호에 기재된 것들이다.
- [0109] **서열 번호 1**
- [0110] VDNKFNKEQQNAFYELHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK
- [0111] **서열 번호 99**
- [0112] FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNAIKSIRDDC
- [0113] **서열 번호 100**
- [0114] VDNKFNKEQQNAFYELHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK
- [0115] **서열 번호 101**
- [0116] FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNAIKSIRDD
- [0117] 달리 명백하게 언급되지 않는 한, 본 명세서 전체에 걸쳐 항체 불변 영역 내의 아미노산 잔기의 넘버링은 문헌 [Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]에 기재된 바와 같이 EU 인덱스에 따른다. 다양한 불변 도메인 넘버링 시스템들 사이의 상응성이 문헌[International ImMunoGeneTics (IMGT) database; Web resources, <http://www.imgt.org>]에서 입수가능하다.
- [0118] 표 1에 나타난 바와 같은 종래의 1-문자 및 3-문자 아미노산 코드가 본 명세서에 사용된다.

[0119] [표 1]

아미노산	3-문자 코드	1-문자 코드
알라닌	Ala	A
아르기닌	Arg	R
아스파라긴	Asn	N
아스파르테이트	Asp	D
시스테인	Cys	C
글루타메이트	Gln	E
글루타민	Glu	Q
글리신	Gly	G
히스티딘	His	H
아이소류신	Ile	I
라이신	Lys	K
메티오닌	Met	M
페닐알라닌	Phe	F
프롤린	Pro	P
세린	Ser	S
트레오닌	Thr	T
트립토판	Trp	W
티로신	Tyr	Y
발린	Val	V

[0120]

[0121] **물질의 조성: 다중특이성 항체**

[0122] 본 발명은 단백질 A 리간드 크로마토그래피를 사용하는 그의 정제를 용이하게 하는 비대칭 돌연변이를 CH2-CH3 영역 내에 갖는 다중특이성 항체 및 다른 다량체 CH2-CH3 영역 함유 단백질, 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 벡터 및 숙주 세포, 및 이들의 제조 및 사용 방법을 제공한다.

[0123] 전장 이중특이성 치료 항체의 생성 및 정제는 과량의 모 분자 및/또는 중간체 분자로부터 이중특이성 항체의 효율적인 분리를 필요로 한다. 돌연변이된 중쇄의 단백질 A 리간드에 대한 결합을 감소시키는 Fc 돌연변이가 본 명세서에서 확인되었다. 따라서, 이들 Fc 돌연변이를 비대칭 방식으로(예를 들어, 하나의 중쇄 내에만) 갖는 이중특이성 항체는 단백질 A 리간드 친화성 결핍으로부터의 이들의 차등 용출 프로파일에 기초하여 모 항체로부터 정제될 수 있다.

[0124] IgG 중쇄 또는 하프 분자를 특이적으로 짝짓기 위한 다양한 방법이 개발되었고, 노브-인-홀(예를 들어 미국 특허 제7,695,936호 참조) CrossMAb(문헌[Schaefer *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:11187-11192, 2011]), 제어된 Fab 야암 교환(문헌[Labrijn *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:5145-5150, 2013]), 공통 경쇄(예를 들어 미국 특허 제7,951,917호 참조), 및 직교 Fab 계면(문헌[Lewis *et al.*, *Nat Biotechnol* 32:191-198, 2014])을 포함한다. 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법은 이중특이성 항체를 생성하고 정제하기 위한 추가의 개선된 방법을 제공한다.

[0125] FcRn은 태아에 대한 모체 IgG의 전달을 담당하고, 리소좀 분해로부터 혈청 IgG를 보호한다. 이들 과정 둘 모두는 재순환 엔도솜에서 산성 pH(6.5 미만)에서 ~600 nM의 K_D로 IgG에 결합하고 중성 pH에서 해리되어 IgG를 다시 혈청 내로 방출하는 FcRn의 능력에 의존한다(문헌[Roopenian and Akilesh, *Nat Rev Immunol* 7: 715-725, 2007]). IgG는 CH2-CH3 계면에서 FcRn에 결합하여, 단일 Fc가 2개의 동일한 FcRn 결합 부위를 함유하게 한다. 구조적 연구 및 생화학적 연구에서, 세포내이입 수송은 FcRn 자체의 막 표면 상에서의 다량체화를 수반할 수 있지만 단일 Fc가 2개의 FcRn 이중이량체에 결합하는 것으로 나타났다. 몇몇 연구에서는 Fc와 FcRn 사이의 상호작용을 조절하는 것이 혈청 수명에 강하게 영향을 주는 것으로 나타남으로써(문헌[Dall'Acqua *et al.*, *J Immunol* 169: 5171-5180, 2002]; 문헌[Hinton *et al.*, *J Biol Chem* 279(8): 6213-6216, 2004]; 문헌[Hinton *et al.*, *J Immunol* 176: 346-356, 2006]; 문헌[Vaccaro *et al.*, *Nat Biotechnol* 23: 1283-1288, 2005]; 문헌[Yeung *et al.*, *J Immunol* 182: 7663-7671, 2009]; 문헌[Stapleton *et al.*, *Nat Commun* 2: 599, 2011]) 성인에서 IgG의 혈청 수명을 결정하는 것을 FcRn이 주로 담당한다는 결론으로 이어졌다.

[0126] 단백질 A 및 신생아 Fc 수용체(FcRn) 둘 모두가 Fc 상의 결합 부위를 공유하므로, Ab의 단백질 A 리간드 결합 특성을 조절하기 위한 노력은 종종 유의하게 감소된 혈청 반감기와 관련된다. 본 명세서에서 도입된 돌연변이는 FcRn에 대한 Fc의 결합을 감소시키지 않으며, 따라서 조작된 항체의 혈청 반감기를 감소시키지 않는다. 도입된 돌연변이 중 하나인 Q311R은 FcRn에 대한 약간 향상된 결합 및 항체의 증가된 혈청 반감기를 유발하였다.

- [0127] 예는 모 항체로부터의 다중특이성 전장 항체의 성공적인 조작 및 정제를 기재하지만, 본 명세서에 기재된 기술은 2개의 CH2-CH3 영역을 함유하는 임의의 다량체 단백질에 적용가능하다.
- [0128] 본 발명은 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역 및 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하는 단리된 다중특이성 항체를 제공하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0129] 비대칭 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R 돌연변이를 갖는 단리된 다중특이성 항체는 단백질 A 리간드 친화성 크로마토그래피를 사용하여 모 항체로부터 효율적으로 정제될 수 있다. 도입된 Q311K, T307P/L309Q, 및 T307P/L309Q/Q311R 돌연변이는 FcRn 또는 FcγR에 대한 조작된 항체의 결합을 감소시키지 않으며, 따라서 항체 반감기 또는 이펙터 기능을 변경할 것으로 예상되지 않는다. 도입된 Q311R 돌연변이는 항체의 FcRn에 대한 결합 및 혈청 반감기를 향상시켰다.
- [0130] 본 발명은 또한 돌연변이 Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역 및 위치 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하는 단리된 다중특이성 항체를 제공하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0131] 본 발명은 또한 돌연변이 Q311K를 포함하는 제1 CH2-CH3 영역 및 위치 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하는 단리된 다중특이성 항체를 제공하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0132] 본 발명은 또한 돌연변이 T307P/L309Q를 포함하는 제1 CH2-CH3 영역 및 위치 307 및 309에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하는 단리된 다중특이성 항체를 제공하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0133] 본 발명은 또한 돌연변이 T307P/V309Q를 포함하는 제1 CH2-CH3 영역 및 위치 307 및 309에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하는 단리된 다중특이성 항체를 제공하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0134] 본 발명은 또한 돌연변이 T307P/L309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역 및 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하는 단리된 다중특이성 항체를 제공하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0135] 본 발명은 또한 돌연변이 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역 및 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하는 단리된 다중특이성 항체를 제공하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0136] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역은 제2 CH2-CH3 영역에 비교할 때 단백질 A 리간드에 대한 감소된 결합을 갖는다.
- [0137] 단백질 A 리간드에 대한 결합은 임의의 적합한 방법을 사용하여 실험적으로 결정할 수 있다. 이러한 방법은 ProteOn XPR36, Biacore 3000, 또는 KinExA 기기를 이용할 수 있다. 측정된 친화성은 상이한 조건(예를 들어, 오스몰 농도(osmolarity), pH) 하에 측정되는 경우에 변동될 수 있다. 따라서, 친화성 및 다른 결합 파라미터(예를 들어, K_D , k_{on} , k_{off})의 측정은 전형적으로 표준화된 조건 및 표준화된 완충제, 예컨대 본 명세서에 기재된 완충제를 이용하여 실행된다. 대안적으로, 단백질 A 리간드에 대한 결합은 pH 구배를 사용하는 단백질 A 리간드 크로마토그래피를 사용하여 직접 평가할 수 있다. 단백질 A 리간드에 대한 감소된 결합을 갖는 분자는 더 높은 pH에서 용출된다. 예시적인 단백질 A 리간드 크로마토그래피는 mAbSelect Sure 컬럼(GE Healthcare)을 사용할 수 있으며, 샘플은 약 pH 4.7, pH 4.2, 또는 pH 3.4의 pH에서 50 mM 시트레이트를 함유하는 완충제를 사용하여 3 단계로 용출된다.
- [0138] 일부 실시 형태에서, 단백질 A 리간드는 스타필로코커스 단백질 A를 포함한다.
- [0139] 일부 실시 형태에서, 단백질 A 리간드는 Z-도메인을 포함한다.
- [0140] 일부 실시 형태에서, Z-도메인은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0141] 일부 실시 형태에서, 단백질 A 리간드는 Y-도메인을 포함한다.
- [0142] 일부 실시 형태에서, 단백질 A 리간드는 서열 번호 99의 아미노산 서열을 포함한다.

- [0143] 일부 실시 형태에서, 단백질 A 리간드는 서열 번호 100의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0144] 일부 실시 형태에서, 단백질 A 리간드는 서열 번호 101의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0145] 스타필로코커스 단백질 A(spA)는 E, D, A, B, 및 C로 표기된 5개의 상동 나선 IgG-결합 도메인을 함유한다(문헌 [Uhlen, Guss et al. 1984]). 이들 도메인 각각은 Fc 영역에 결합하기에 충분하지만, spA는 또한 인간 VH3-패밀리 구성원의 VH 영역에 결합한다(문헌[Romagnani et al., *J Immunol* 129:596-602, 1982]; 문헌[Sasso et al., *J Immunol* 147: 1877-1883, 1991]). spA B 도메인 또는 C 도메인 내로 도입된 안정화-향상 돌연변이는 각각 합성 Z-도메인 및 Y-도메인으로 이어졌으며, 이는 높은 pH 처리에 대해 내성이 있고 Fc에만 결합한다. 탠덤(tandem) 또는 사량체 Z-도메인, 사량체 Y-도메인, 또는 천연 spA를 MabSelect SuRe(GE), TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F, 및 MabSelect Xtra와 같은 상업적인 친화성 수지 내로 혼입시켰다.
- [0146] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 IgG1 동종형이다.
- [0147] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 IgG2 동종형이다.
- [0148] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 IgG4 동종형이다.
- [0149] 예는 IgG1 다중특이성 항체의 성공적인 생성 및 정제에 대한 실험 데이터를 제공하지만, 3개의 동종형 모두에 걸쳐 잔기 307 및 311이 보존되고 IgG2에서 Leu가 Val로 보존적으로 치환되는 것과 함께 IgG1과 IgG4 사이에서 위치 309가 보존되므로, 확인된 돌연변이는 또한 IgG2 및 IgG4 동종형에 대해서도 기능성일 것으로 예상된다.
- [0150] 일부 실시 형태에서, Fc γ R에 대한 다중특이성 항체의 결합은 돌연변이가 없는 모 항체의 결합과 유사하다.
- [0151] 일부 실시 형태에서, Fc γ R은 Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, 및/또는 Fc γ RIIIa이다.
- [0152] 일부 실시 형태에서, Fc γ R은 Fc γ RI이다.
- [0153] 일부 실시 형태에서, Fc γ R은 Fc γ RIIa이다.
- [0154] 일부 실시 형태에서, Fc γ R은 Fc γ RIIb이다.
- [0155] 일부 실시 형태에서, Fc γ R은 Fc γ RIIIa이다.
- [0156] Fc γ R과 유사한 결합을 갖는 예시적인 다중특이성 항체는 Q311R 또는 T307P/L309Q/Q311R 돌연변이를 갖는 다중특이성 항체이다.
- [0157] 일부 실시 형태에서, FcRn에 대한 다중특이성 항체의 결합은 돌연변이가 없는 모 항체의 결합과 유사하다.
- [0158] FcRn과 유사한 결합을 갖는 예시적인 다중특이성 항체는 Q311K 또는 T307P/L309Q/Q311R 돌연변이를 갖는 다중특이성 항체이다.
- [0159] 일부 실시 형태에서, FcRn에 대한 다중특이성 항체의 결합은 돌연변이가 없는 모 항체의 FcRn에 대한 결합에 비교할 때 향상된다.
- [0160] FcRn에 대한 향상된 결합을 갖는 예시적인 다중특이성 항체는 Q311R 돌연변이를 갖는 항체이다.
- [0161] 본 발명은 또한 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역 및 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하는 단리된 다중특이성 항체를 제공하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따르고, 여기서 다중특이성 항체는 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 내에 비대칭 안정화 돌연변이를 추가로 포함한다.
- [0162] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 또는 제2 CH2-CH3 영역 및 제1 CH2-CH3 영역 내의 비대칭 안정화 돌연변이는
- [0163] 각각 F405L 및 K409R;
- [0164] 각각 야생형 및 F405L/R409K;
- [0165] 각각 T366W 및 T366S/L368A/Y407V;
- [0166] 각각 T366Y/F405A 및 T394W/Y407T;

- [0167] 각각 T366W/F405W 및 T394S/Y407A;
- [0168] 각각 F405W/Y407A 및 T366W/T394S;
- [0169] 각각 L351Y/F405A/Y407V 및 T394W;
- [0170] 각각 T366I/K392M/T394W 및 F405A/Y407V;
- [0171] 각각 T366L/K392M/T394W 및 F405A/Y407V;
- [0172] 각각 L351Y/Y407A 및 T366A/K409F;
- [0173] 각각 L351Y/Y407A 및 T366V/K409F;
- [0174] 각각 Y407A 및 T366A/K409F;
- [0175] 각각 D399K/E356K 및 K409D/K392D; 또는
- [0176] 각각 D399K/E356K/E357K 및 K409D/K392D/K370이다.
- [0177] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 또는 제2 CH2-CH3 영역 및 제1 CH2-CH3 영역 내의 비대칭 안정화 돌연변이는 각각 F405L 및 K409R이다.
- [0178] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 또는 제2 CH2-CH3 영역 및 제1 CH2-CH3 영역 내의 비대칭 안정화 돌연변이는 각각 야생형 및 F405L/R409K이다.
- [0179] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 또는 제2 CH2-CH3 영역 및 제1 CH2-CH3 영역 내의 비대칭 안정화 돌연변이는 각각 T366W 및 T366S/L368A/Y407V이다.
- [0180] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 또는 제2 CH2-CH3 영역 및 제1 CH2-CH3 영역 내의 비대칭 안정화 돌연변이는 각각 T366Y/F405A 및 T394W/Y407T이다.
- [0181] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 또는 제2 CH2-CH3 영역 및 제1 CH2-CH3 영역 내의 비대칭 안정화 돌연변이는 각각 T366W/F405W 및 T394S/Y407A이다.
- [0182] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 또는 제2 CH2-CH3 영역 및 제1 CH2-CH3 영역 내의 비대칭 안정화 돌연변이는 각각 F405W/Y407A 및 T366W/T394S이다.
- [0183] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 또는 제2 CH2-CH3 영역 및 제1 CH2-CH3 영역 내의 비대칭 안정화 돌연변이는 각각 L351Y/F405A/Y407V 및 T394W이다.
- [0184] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 또는 제2 CH2-CH3 영역 및 제1 CH2-CH3 영역 내의 비대칭 안정화 돌연변이는 각각 T366I/K392M/T394W 및 F405A/Y407V이다.
- [0185] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 또는 제2 CH2-CH3 영역 및 제1 CH2-CH3 영역 내의 비대칭 안정화 돌연변이는 각각 T366L/K392M/T394W 및 F405A/Y407V이다.
- [0186] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 또는 제2 CH2-CH3 영역 및 제1 CH2-CH3 영역 내의 비대칭 안정화 돌연변이는 각각 L351Y/Y407A 및 T366A/K409F이다.
- [0187] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 또는 제2 CH2-CH3 영역 및 제1 CH2-CH3 영역 내의 비대칭 안정화 돌연변이는 각각 L351Y/Y407A 및 T366V/K409F이다.
- [0188] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 또는 제2 CH2-CH3 영역 및 제1 CH2-CH3 영역 내의 비대칭 안정화 돌연변이는 각각 Y407A 및 T366A/K409F이다.
- [0189] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 또는 제2 CH2-CH3 영역 및 제1 CH2-CH3 영역 내의 비대칭 안정화 돌연변이는 각각 D399K/E356K 및 K409D/K392D이다.
- [0190] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 또는 제2 CH2-CH3 영역 및 제1 CH2-CH3 영역 내의 비대칭 안정화 돌연변이는 각각 D399K/E356K/E357K 및 K409D/K392D/K370이다.
- [0191] 비대칭 안정화 돌연변이는 이중특이성 또는 다중특이성 항체 내로 도입되어 과량의 모 분자 또는 중간체 분자로 부터 이들을 분리하는 하류 과정을 용이하게 할 수 있다.

- [0192] 예시적인 비대칭 안정화 돌연변이는 2개의 모 항체 사이의 Fab 아암 교환(예를 들어, 하프 분자 교환, 중쇄-경쇄 쌍에 대한 교환)을 촉진하는 것들이다. 이 기술에서, 시험관내무세포 환경에서 또는 공동-발현을 사용하여 2개의 모 항체 하프 분자의 이중이량체 형성을 촉진하는 돌연변이는 각각의 모 항체 내의 중쇄 CH3 계면에 도입된다. 예를 들어, 제1 모 항체 내의 돌연변이 F405L 및 제2 모 항체 내의 K409R을 사용하여 IgG1의 Fab 아암 교환을 촉진할 수 있다. IgG4 항체의 경우, 야생형 제1 모 항체 및 제2 모 항체 내의 F405L/R409K 돌연변이가 사용될 수 있다.
- [0193] 추가의 비대칭 안정화 돌연변이는 노브-인-홀 돌연변이(Genentech) 또는 정전기적으로 매칭된 잔기를 도입하는 돌연변이(Chugai, Amgen, NovoNordisk, Oncomed)이다. 예시적인 노브-인-홀 돌연변이(제1 모 항체 내의 돌연변이된 위치/제2 모 항체 내의 돌연변이된 위치로서 표현됨)는 T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S, 및 T366W/T366S_L368A_Y407V이다. 정전기적으로 매칭된 잔기를 도입하는 예시적인 돌연변이는 미국 특허 출원 공개 제US2010/0015133 호; 미국 특허 출원 공개 제US2009/0182127호; 미국 특허 출원 공개 제US2010/028637호, 또는 미국 특허 출원 공개 제US2011/0123532호에 기재된 것들이다. 추가의 비대칭 안정화 돌연변이는 미국 특허 출원 공개 제US2012/0149876호 또는 미국 특허 출원 공개 제US2013/0195849호에 기재된 바와 같은 L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F, 또는 T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W이다.
- [0194] 돌연변이는 전형적으로 표준 방법을 사용하여 항체의 불변 도메인과 같은 분자에 대해 DNA 수준에서 실행된다.
- [0195] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 제1 CH2-CH3 영역 내의 Q311R/F405L 돌연변이 및 제2 CH2-CH3 영역 내의 K409R 돌연변이를 포함한다.
- [0196] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 제1 CH2-CH3 영역 내의 Q311K/F405L 돌연변이 및 제2 CH2-CH3 영역 내의 K409R 돌연변이를 포함한다.
- [0197] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 제1 CH2-CH3 영역 내의 T307P/L309Q/F405L 돌연변이 및 제2 CH2-CH3 영역 내의 K409R 돌연변이를 포함한다.
- [0198] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 제1 CH2-CH3 영역 내의 T307P/L309Q/Q311R/F405L 돌연변이 및 제2 CH2-CH3 영역 내의 K409R 돌연변이를 포함한다.
- [0199] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 제1 CH2-CH3 영역 내의 Q311R/K409R 돌연변이 및 제2 CH2-CH3 영역 내의 F405L 돌연변이를 포함한다.
- [0200] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 제1 CH2-CH3 영역 내의 Q311K/K409R 돌연변이 및 제2 CH2-CH3 영역 내의 F405L 돌연변이를 포함한다.
- [0201] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 제1 CH2-CH3 영역 내의 T307P/L309Q/K409R 돌연변이 및 제2 CH2-CH3 영역 내의 F405L 돌연변이를 포함한다.
- [0202] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 제1 CH2-CH3 영역 내의 T307P/L309Q/Q311R/K409R 돌연변이 및 제2 CH2-CH3 영역 내의 F405L 돌연변이를 포함한다.
- [0203] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 제1 CH2-CH3 영역 내의 Q311R 돌연변이 및 제2 CH2-CH3 영역 내의 F405L/R409K 돌연변이를 포함한다.
- [0204] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 제1 CH2-CH3 영역 내의 Q311K 돌연변이 및 제2 CH2-CH3 영역 내의 F405L/R409K 돌연변이를 포함한다.
- [0205] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 제1 CH2-CH3 영역 내의 T307P/V309Q 돌연변이 및 제2 CH2-CH3 영역 내의 F405L/R409K 돌연변이를 포함한다.
- [0206] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 제1 CH2-CH3 영역 내의 T307P/V309Q/Q311R 돌연변이 및 제2 CH2-CH3 영역 내의 F405L/R409K 돌연변이를 포함한다.
- [0207] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 제1 CH2-CH3 영역 내의 Q311R/T366W 돌연변이 및 제2 CH2-CH3 영역 내의 T366S/L368A/Y407V 돌연변이를 포함한다.
- [0208] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 제1 CH2-CH3 영역 내의 Q311K/T366W 돌연변이 및 제2 CH2-CH3 영역 내

의 T366S/L368A/Y407V 돌연변이를 포함한다.

- [0209] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 제1 CH2-CH3 영역 내의 T307P/L309Q/T366W 돌연변이 및 제2 CH2-CH3 영역 내의 T366S/L368A/Y407V 돌연변이를 포함한다.
- [0210] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 제1 CH2-CH3 영역 내의 T307P/L309Q/Q311R/T366W 돌연변이 및 제2 CH2-CH3 영역 내의 T366S/L368A/Y407V 돌연변이를 포함한다.
- [0211] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 제1 CH2-CH3 영역 내의 Q311R/T366S/L368A/Y407V 돌연변이 및 제2 CH2-CH3 영역 내의 T366W 돌연변이를 포함한다.
- [0212] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 제1 CH2-CH3 영역 내의 Q311K/T366S/L368A/Y407V 돌연변이 및 제2 CH2-CH3 영역 내의 T366W 돌연변이를 포함한다.
- [0213] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 제1 CH2-CH3 영역 내의 T307P/L309Q/T366S/L368A/Y407V 돌연변이 및 제2 CH2-CH3 영역 내의 T366W 돌연변이를 포함한다.
- [0214] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 제1 CH2-CH3 영역 내의 T307P/L309Q/Q311R/T366S/L368A/Y407V 돌연변이 및 제2 CH2-CH3 영역 내의 T366W 돌연변이를 포함한다.
- [0215] 본 발명의 다중특이성 항체 내의 예시적인 CH2-CH3 영역의 아미노산 서열을 표 2 및 표 3에 나타낸다.
- [0216] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역은 각각 서열 번호 2 및 22의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0217] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역은 각각 서열 번호 3 및 22의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0218] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역은 각각 서열 번호 4 및 22의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0219] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역은 각각 서열 번호 5 및 22의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0220] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역은 각각 서열 번호 6 및 23의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0221] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역은 각각 서열 번호 7 및 23의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0222] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역은 각각 서열 번호 8 및 23의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0223] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역은 각각 서열 번호 9 및 23의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0224] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역은 각각 서열 번호 10 및 24의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0225] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역은 각각 서열 번호 11 및 24의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0226] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역은 각각 서열 번호 12 및 24의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0227] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역은 각각 서열 번호 13 및 24의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0228] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역은 각각 서열 번호 14 및 25의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0229] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역은 각각 서열 번호 15 및 25의 아미노산 서열을 포함한다.

- [0230] 일부 실시 형태에서, 제1 CH₂-CH₃ 영역 및 제2 CH₂-CH₃ 영역은 각각 서열 번호 16 및 25의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0231] 일부 실시 형태에서, 제1 CH₂-CH₃ 영역 및 제2 CH₂-CH₃ 영역은 각각 서열 번호 17 및 25의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0232] 일부 실시 형태에서, 제1 CH₂-CH₃ 영역 및 제2 CH₂-CH₃ 영역은 각각 서열 번호 18 및 26의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0233] 일부 실시 형태에서, 제1 CH₂-CH₃ 영역 및 제2 CH₂-CH₃ 영역은 각각 서열 번호 19 및 26의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0234] 일부 실시 형태에서, 제1 CH₂-CH₃ 영역 및 제2 CH₂-CH₃ 영역은 각각 서열 번호 20 및 26의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0235] 일부 실시 형태에서, 제1 CH₂-CH₃ 영역 및 제2 CH₂-CH₃ 영역은 각각 서열 번호 21 및 26의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0236] 일부 실시 형태에서, 제1 CH₂-CH₃ 영역 및 제2 CH₂-CH₃ 영역은 각각 서열 번호 52 및 54의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0237] 일부 실시 형태에서, 제1 CH₂-CH₃ 영역 및 제2 CH₂-CH₃ 영역은 각각 서열 번호 52 및 55의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0238] 일부 실시 형태에서, 제1 CH₂-CH₃ 영역 및 제2 CH₂-CH₃ 영역은 각각 서열 번호 53 및 54의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0239] 일부 실시 형태에서, 제1 CH₂-CH₃ 영역 및 제2 CH₂-CH₃ 영역은 각각 서열 번호 53 및 55의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0240] 일부 실시 형태에서, 제1 CH₂-CH₃ 영역 및 제2 CH₂-CH₃ 영역은 각각 서열 번호 56 및 54의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0241] 일부 실시 형태에서, 제1 CH₂-CH₃ 영역 및 제2 CH₂-CH₃ 영역은 각각 서열 번호 56 및 55의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0242] 본 발명의 다중특이성 항체는 과량의 모 분자 또는 중간체 분자로부터 이들을 분리하는 하류 과정을 추가로 용이하게 하기 위해 공통 경쇄를 추가로 포함할 수 있다.
- [0243] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 제1 경쇄 및 제2 경쇄를 포함한다.
- [0244] 일부 실시 형태에서, 제1 경쇄 및 제2 경쇄는 동일한 아미노산 서열을 갖는다.
- [0245] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 이중특이성 항체이다.

[0246] [표 2]

CH2-CH3 도메인	단백질 서열 번호	cDNA 서열 번호
IgG1 CH2-CH3 Q311K	2	27
IgG1 CH2-CH3 Q311R	3	28
IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q	4	29
IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q311R	5	30
IgG1 CH2-CH3 Q311K/F405L	6	31
IgG1 CH2-CH3 Q311R/F405L	7	32
IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/F405L	8	33
IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q311R/F405L	9	34
IgG1 CH2-CH3 Q311K/K409R	10	35
IgG1 CH2-CH3 Q311R/K409R	11	36
IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/K409R	12	37
IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q311R/K409R	13	38
IgG1 CH2-CH3 Q311K/ T366W	14	39
IgG1 CH2-CH3 Q311R/T366W	15	40
IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/ T366W	16	41
IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q311R/ T366W	17	42
IgG1 CH2-CH3 Q311K/T366S/L368A/Y407V	18	43
IgG1 CH2-CH3 Q311R/T366S/L368A/Y407V	19	44
IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/ T366S/L368A/Y407V	20	45
IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q311R/ T366S/L368A/Y407V	21	46
야생형 IgG1 CH2-CH3	22	47
IgG1 CH2-CH3 K409R	23	48
IgG1 CH2-CH3 F405L	24	49
IgG1 CH2-CH3 T366S/L368A/Y407V	25	50
IgG1 CH2-CH3 T366W	26	51
IgG2 CH2-CH3 Q311R	52	87
IgG2 CH2-CH3 T307P/V309Q/Q311R	53	88
야생형 IgG2 CH2-CH3	54	89
IgG2 CH2-CH3 F405L/K409R	55	90
IgG4 CH2-CH3 T307P/V309Q	56	91

[0247]

[0248] [표 3]

CH2-CH3 도메인	단백질 서열 번호	단백질 아미노산 서열
IgG1 CH2-CH3 Q311K	2	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHKDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG1 CH2-CH3 Q311R	3	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHRDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q	4	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLPVQHQRDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q311R	5	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLPVQHQRDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG1 CH2-CH3 Q311K/F405L	6	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHKDRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG1 CH2-CH3 Q311R/F405L	7	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHRDRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/F405L	8	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLPVQHQRDRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q311R/F405L	9	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLPVQHQRDRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0249]

		HYTQKLSLSLSPGK
IgG1 CH2-CH3 Q311K/K409R	10	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHKD WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHN HYTQKLSLSLSPGK
IgG1 CH2-CH3 Q311R/K409R	11	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHRD WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHN HYTQKLSLSLSPGK
IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/K40 9R	12	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLPVQHOD WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHN HYTQKLSLSLSPGK
IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q31 1R/K409R	13	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLPVQHRD WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHN HYTQKLSLSLSPGK
IgG1 CH2-CH3 Q311K/ T366W	14	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHKD WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALH NHYTQKLSLSLSPGK
IgG1 CH2-CH3 Q311R/T366W	15	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHRD WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALH NHYTQKLSLSLSPGK
IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/ T366W	16	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLPVQHOD WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALH NHYTQKLSLSLSPGK
IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q31 1R/ T366W	17	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLPVQHRD WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALH NHYTQKLSLSLSPGK
IgG1 CH2-CH3 Q311K/T366S/L36 8A/Y407V	18	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHKD WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT

[0250]

		PPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
IgG1 CH2-CH3 Q311R/T366S/L36 8A/Y407V	19	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQRD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT PPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/ T366S/L368A/Y40 7V	20	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLPVQHQRD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT PPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
IgG1 CH2-CH3 IgG1 T307P/L309Q/Q31 1R/ T366S/L368A/Y40 7V	21	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLPVQHQRD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT PPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
IgG1 CH2-CH3 야생형	22	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT PPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
IgG1 CH2-CH3 K409R	23	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT PPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
IgG1 CH2-CH3 F405L	24	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT PPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
IgG1 CH2-CH3 T366S/L368A/Y40 7V	25	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT PPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
IgG1 CH2-CH3 T366W	26	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT

[0251]

		TPPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
IgG2 CH2-CH3 Q311R	52	PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHRDWL NGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPM LDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
IgG2 CH2-CH3 T307P/V309Q/Q31 1R	53	PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLPVQHQRDWL NGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPM LDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
야생형 IgG2 CH2- CH3	54	PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPM LDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
IgG2 CH2-CH3 F405L/K409R	55	PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPM LDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
IgG4 CH2-CH3 T307P/V309Q	56	PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGDSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK

[0252]

[0253]

IgG2가 위치 309에 발린을 갖는 점을 제외하고는 동종형들에 걸쳐 위치 307, 309, 및 311이 보존되므로, 돌연변이는 IgG2 및 IgG4 동종형으로 전달될 수 있다. 위치 366, 368, 407은 또한 항체 동종형에 걸쳐 보존된다.

F405L은 보존되지만, IgG4는 위치 409에 R을 갖는다. 인간 IgG4 항체의 Fab 아암 교환을 촉진하기 위하여, 하나의 모 항체는 F405L/R409K 돌연변이를 갖도록 조작될 것이고, 다른 모 항체는 야생형이다.

[0254] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 2개 이상의 항원에 결합한다.

[0255] 일부 실시 형태에서, 항체는 ABCF1, ACVR1, ACVR1B, ACVR2, ACVR2B, ACVRL1, ADORA2A, 아그레칸, AGR2, AICDA, AIF1, AIG1, AKAP1, AKAP2, 알부민, AMH, AMHR2, ANGPT1, ANGPT2, ANGPTL3, ANGPTL4, ANPEP, APC, APOC1, APOE, AR, AZGP1(아연-a-당단백질), B7.1, B7.2, BAD, BAFF, BAG1, BAI1, BCL2, BCL6, BDNF, BLNK, BLR1(MDR15), BlyS, BMP1, BMP2, BMP3B(GDF10), BMP4, BMP6, BMP8, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2, BPAG1(플렉틴), BRCA1, BTLA, C19orf10(IL27w), C3, C4A, C5, C5R1, CANT1, CASP1, CASP4, CAV1, CCBP2(D6/JAB61), CCL1(1-309), CCL11(에오타신), CCL13(MCP-4), CCL15(MIP-1d), CCL16(HCC-4), CCL17(TARC), CCL18(PARC), CCL19(MIP-3b), CCL2(MCP-1), MCAF, CCL20(MIP-3a), CCL21(MIP-2), SLC, 엑소두스-2, CCL22(MDC/STC-1), CCL23(MPIF-1), CCL24(MPIF-2/에오타신-2), CCL25(TECK), CCL26(에오타신-3), CCL27(CTACK/ILC), CCL28, CCL3(MIP-1a), CCL4(MIP-1b), CCL5(RANTES), CCL7(MCP-3), CCL8(mcp-2), CCNA1, CCNA2, CCND1, CCNE1, CCNE2, CCR1(CKR1/HM145), CCR2(mcp-1RB/RA), CCR3(CKR3/CMKBR3), CCR4, CCR5(CMKBR5/ChemR13), CCR6(CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6), CCR7(CKR7/EBI1), CCR8(CMKBR8/TER1/CKR-L1), CCR9(GPR-9-6), CCRL1(VSHK1), CCRL2(L-CCR), CD123, CD137, CD164, CD16a, CD16b, CD19, CD1C, CD20, CD200, CD-22, CD24, CD28, CD3, CD30, CD32a, CD32b, CD37, CD38, CD39, CD3E, CD3G, CD3Z, CD4, CD40, CD40L, CD44, CD45RB, CD47, CD52, CD69, CD72, CD73, CD74, CD79A, CD79B, CD8, CD80, CD81, CD83, CD86, CD89, CD96, CDH1(E-카드헤린), CDH10, CDH12, CDH13, CDH18, CDH19, CDH20, CDH5, CDH7, CDH8, CDH9, CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK9, CDKN1A(p21Wap1/Cip1), CDKN1B(p27Kip1), CDKN1C, CDKN2A(p16INK4a), CDKN2B, CDKN2C, CDKN3, CEBPB, CER1, CHGA, CHGB, 키티나제, CHST10, CKLFSF2, CKLFSF3, CKLFSF4, CKLFSF5, CKLFSF6, CKLFSF7, CKLFSF8, CLDN3, CLDN7(클라우딘-7), CLN3, CLU(클러스테린), CMKLR1, CMKOR1(RDC1), CNR1, COL18A1, COL1A1, COL4A3, COL6A1, CR2, CRP, CSF1(M-CSF), CSF2(GM-CSF), CSF3(GCSF), CTLA4, CTNBN1(b-카테닌), CTSB(카텝신 B), CX3CL1(SCYD1), CX3CR1(V28), CXCL1(GRO1), CXCL10(IP-10), CXCL11(I-TAC/IP-9), CXCL12(SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL16, CXCL2(GRO2), CXCL3(GRO3), CXCL5(ENA-78/LIX), CXCL6(GCP-2), CXCL9(MIG), CXCR3(GPR9/CKR-L2), CXCR4, CXCR6(TYMSTR/STRL33/분조), CYB5, CYC1, CYSLTR1, DAB2IP, DES, DKFZp451J0118, DNAM-1, DNCL1, DPP4, E2F1, ECGF1, EDG1, EFNA1, EFNA3, EFN2, EGF, EGFR, ELAC2, ENG, ENO1, ENO2, ENO3, EPHB4, EPO, ERBB2(Her-2), EREG, ERK8, ESR1, ESR2, F3(TF), FADD, FasL, FASN, FCER1A, FCER2, FCGR3A, FGF, FGF1(aFGF), FGF10, FGF11, FGF12, FGF12B, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF2(bFGF), FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3(int-2), FGF4(HST), FGF5, FGF6(HST-2), FGF7(KGF), FGF8, FGF9, FGFR, FGFR3, FIGF(VEGFD), FIL1(엡실론), FIL1(제타), FLJ12584, FLJ25530, FLRT1(피브로넥틴), FLT1, FOS, FOSL1(FRA-1), FY(DARC), GABRP(GABAa), GAGEB1, GAGEC1, GALNAC4S-6ST, GATA3, GDF5, GF11, GGT1, GITR, GITRL, GM-CSF, GNAS1, GNRH1, GPR2(CCR10), GPR31, GPR44, GPR81(FKSG80), GRCC10(C10), GRP, GSN(겔슬린), GSTP1, HAVCR2, HDAC4, HDAC5, HDAC7A, HDAC9, HGF, HIF1A, HIP1, 히스타민 및 히스타민 수용체, HLA, HLA-A, HLA-DRA, HM74, HMOX1, HUMCYT2A, HVEM, ICEBERG, ICOS, ICOSL, IDO, ID2, IFN-a, IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNB1, IFN감마, IFNW1, IGBP1, IGF1, IGF1R, IGF2, IGF2BP2, IGF2BP3, IGF2BP6, IL-1, IL10, IL10RA, IL10RB, IL11, IL11RA, IL-12, IL12A, IL12B, IL12RB1, IL12RB2, IL13, IL13RA1, IL13RA2, IL14, IL15, IL15RA, IL16, IL17, IL17B, IL17C, IL17R, IL18, IL18BP, IL18R1, IL18RAP, IL19, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9, IL1HY1, IL1R1, IL1R2, IL1RAP, IL1RAPL1, IL1RAPL2, IL1RL1, IL1RL2, IL1RN, IL2, IL20, IL20RA, IL21R, IL22, IL22R, IL22RA2, IL23, IL24, IL25, IL26, IL27, IL28A, IL28B, IL29, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3, IL30, IL3RA, IL4, IL4R, IL5, IL5RA, IL6, IL6R, IL6ST(당단백질 130), IL7, IL7R, IL8, IL8RA, IL8RB, IL8RB, IL9, IL9R, ILK, INHA, INHBA, INSL3, INSL4, 인슐린, 인슐린 수용체, IRAK1, IRAK2, ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA6(a6 인테그린), ITGAV, ITGB3, ITGB4(b 4 인테그린), JAG1, JAK1, JAK3, JUN, K6HF, KAI1, KDR, KITLG, KIR, KLF5(GC Box BP), KLF6, KLK10, KLK12, KLK13, KLK14, KLK15, KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK9, KRT1, KRT19(케라틴 19), KRT2A, KRTHB6(모발-특이적 II형 케라틴), LAG-3, LAMA5, LDL, LEP(렙틴), LFA, 렙고-p75, 렙고-트로이, LPS, LTA(TNF-b), LTb, LTb4R(GPR16), LTb4R2, LTBR, MACMARCKS, MAG 또는 Omgp, MAP2K7(c-Jun), MDK, 메소텔린, MIB1, 미드카인, MIF, MIP-2, MKI67(Ki-67), MMP2, MMP9, MS4A1, MSMB, MT3(메탈로티오넥틴-III), MTSS1, MUC1(뮤신), MYC, MYD88, NCK2, 뉴로칸, NFKB1, NFKB2, NGFB(NGF), NGFR, NgR-렙고, NgR-Nogo66(노고), NgR-p75, NgR-트로이, NKG2D, NKp46, NME1(NM23A), NOX5, NPPB, NROB1, NROB2, NR1D1, NR1D2, NR1H2, NR1H3, NR1H4, NR1I2, NR1I3, NR2C1, NR2C2, NR2E1, NR2E3, NR2F1, NR2F2, NR2F6, NR3C1, NR3C2, NR4A1, NR4A2, NR4A3, NR5A1, NR5A2, NR6A1, NRP1, NRP2, NT5E, NTN4,

ODZ1, OPRD1, OX-40, OX-40L, P2RX7, PAP, PART1, PATE, PAWR, PCA3, PCNA, PD-1, PDGFA, PDGFB, PECAM1, PF4(CXCL4), PGF, PGR, 포스파칸, PIAS2, PIK3CG, PLAU(uPA), PLG, PLXDC1, PPBP(CXCL7), PPID, PR1, PRKCQ, PRKD1, PRL, PROC, PROK2, PSAP, PSCA, PTAFR, PTEN, PTGS2(COX-2), PTN, RAC2(p21Rac2), RARB, RGS1, RGS13, RGS3, RNF110(ZNF144), ROBO2, ROR1, SI00A2, SCGB1D2(리포필린 B), SCGB2A1(맘마글로빈 2), SCGB2A2(맘마글로빈 1), SCYE1(내피 단핵구-활성화 사이토카인), SDF2, SERPINA1, SERPINA3, SERPINB5(마스핀), SERPINE1(PAI-1), SERPINF1, SHBG, SLA2, SLC2A2, SLC33A1, SLC43A1, SLIT2, SPP1, SPRR1B(Spr1), ST6GAL1, STAB1, STAT6, STEAP, STEAP2, TB4R2, TBX21, TCP10, TDGF1, TEK, Tf(트랜스페린 수용체), TGFA, TGFBI, TGFBI11, TGFBI2, TGFBI3, TGFBI, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, TH1L, THBS1(트롬보스폰딘-1), THBS2, THBS4, THPO, TIE(Tie-1), TIGIT, TIM-3, TIMP3, 조직 인자, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TNF, TNF-a, TNFAIP2(B94), TNFAIP3, TNFRSF11A, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF21, TNFRSF5, TNFRSF6(Fas), TNFRSF7, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFSF10(TRAIL), TNFSF11(TRANCE), TNFSF12(APO3L), TNFSF13(April), TNFSF13B, TNFSF14(HVEM-L), TNFSF15(VEGI), TNFSF18, TNFSF4(OX40 리간드), TNFSF5(CD40 리간드), TNFSF6(FasL), TNFSF7(CD27 리간드), TNFSF8(CD30 리간드), TNFSF9(4-1BB 리간드), TOLLIP, To11-유사 수용체, TOP2A(토포아 이소머라제 IIa), TP53, TPM1, TPM2, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF5, TRAF6, TREM1, TREM2, TRPC6, TSLP, TWEAK, VEGF, VEGFB, VEGFC, 베르시칸, VHL C5, VISTA, VLA-4, XCL1(림포택틴), XCL2(SCM-1b), XCR1(GPR5/CCXCR1), YY1, 및 ZFPM2이다.

- [0256] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 CD3에 결합한다.
- [0257] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 CD3 및 종양 항원에 결합한다.
- [0258] 일부 실시 형태에서, 다중특이성 항체는 2개의 항원에 결합하며, 여기서 2개의 항원은 PD1, CD27, CD28, NKP46, ICOS, GITR, OX40, CTLA4, LAG3, TIM3, KIRa, CD73, CD39, IDO, BTLA, VISTA, TIGIT, CD96, CD30, HVEM, DNAM-1, LFA, 종양 항원, EGFR, cMet, FGFR, ROR1, CD123, IL1RAP, FGFR, 메소텔린, CD3, T 세포 수용체, CD32b, CD32a, CD16a, CD16b, NKG2D, NKP46, CD28, CD47, DLL, CD8, CD89, HLA, B 세포 수용체, 또는 CD137 중 임의의 2개이다.
- [0259] **본 발명의 다중특이성 항체의 조작**
- [0260] 본 발명의 다중특이성 항체에 추가의 Fc 돌연변이를 실행하여 이펙터 기능 및 약동학적 특성을 조절할 수 있다. 전통적인 면역 기능에서, 면역 시스템의 세포와 항체-항원 복합체의 상호작용은 이펙터 기능, 예컨대 항체-의존성 세포독성 및 식작용으로부터 면역조절 신호, 예컨대 림프구 증식 및 항체 분비의 조절에 이르기까지 광범위한 반응을 유발한다. 이들 모든 상호작용은 특성화된 세포 표면 수용체에 대한 면역 복합체 또는 항체의 Fc 영역의 결합을 통해 개시된다. 항체 및 면역 복합체에 의해 촉발되는 세포 반응의 다양성은 Fc 수용체의 구조적 이종성으로부터 유발된다: Fc γ RI(CD64), Fc γ RIIA(CD32A), 및 Fc γ RIII(CD16)은 활성화 Fc γ 수용체(즉, 면역 시스템을 향상시킴)이고, Fc γ RIIB(CD32B)는 억제성 Fc γ 수용체(즉, 면역 시스템을 감소시킴)이다. FcRn 수용체에 대한 결합은 항체 반감기를 조절한다.
- [0261] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 다중특이성 항체는 Fc γ R에 대한 항체의 결합을 조절하는 하나 이상의 돌연변이를 추가로 포함한다.
- [0262] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 다중특이성 항체는 FcRn에 대한 항체의 결합을 조절하는 하나 이상의 돌연변이를 추가로 포함한다.
- [0263] 다중특이성 항체의 반감기를 증가시키는 예시적인 돌연변이는 돌연변이 M428L/N434S, M252Y/S254T/T256E, T250Q/M428L, N434A, 및 T307A/E380A/N434A이다. 다중특이성 항체의 반감기를 감소시키는 예시적인 돌연변이는 돌연변이 H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A, 및 H435R이다.
- [0264] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 다중특이성 항체는 활성화 Fc γ 수용체(Fc γ R)에 대한 항체의 결합을 감소시키고/시키거나 Fc 이펙터 기능, 예컨대 C1q 결합, 보체 의존성 세포독성(CDC), 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC), 또는 식작용(ADCP)을 감소시키는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다.
- [0265] 활성화 Fc γ R에 대한 본 발명의 다중특이성 항체의 결합을 감소시키고/시키거나 항체 이펙터 기능을 최소화하는 예시적인 돌연변이는 IgG1 상의 L234A/L235A, IgG2 상의 V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, IgG4 상의 F234A/L235A, IgG4 상의 S228P/F234A/L235A, 모든 Ig 동종형 상의 N297A, IgG2 상의 V234A/G237A, IgG1 상의 K214T/E233P/L234V/L235A/G236-결실/A327G/P331A/D365E/L358M, IgG2 상의 H268Q/V309L/A330S/P331S, IgG1 상의 S267E/L328F, IgG1 상의 L234F/L235E/D265A, IgG1 상의 L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S,

IgG4 상의 S228P/F234A/L235A/G237A/P238S, 및 IgG4 상의 S228P/F234A/L235A/G236-결실/G237A/P238S이다.

- [0266] 활성화 Fc γ 에 대한 본 발명의 다중특이성 항체의 결합을 증가시키고/시키거나 항체 이펙터 기능을 향상시키는 예시적인 돌연변이는 S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L 및 G236A/S239D/I332E, K326A/E333A, K326W/E333A, H268F/S324T, S267E/H268F, S267E/S324T, 및 S267E/H268F/S324T이다.
- [0267] 잘 알려진 S228P를 IgG4 항체에 실행하여 IgG4 안정성을 향상시킬 수 있다.
- [0268] "항체-의존성 세포성 세포독성", "항체-의존성 세포-매개 세포독성" 또는 "ADCC"는, 이펙터 세포 상에서 발현되는 Fc 감마 수용체(Fc γ R)를 통한, 항체-코팅된 표적 세포와 용해 활성을 갖는 이펙터 세포, 예컨대 자연 살해 세포, 단핵구, 대식세포 및 호중구의 상호작용에 의존하는 세포사를 유도하기 위한 기전이다. 예를 들어, NK 세포는 Fc γ RIIIa를 발현하며, 한편 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIIIa를 발현한다. 항체 코팅된 표적 세포의 사멸은 막 기공-형성 단백질 및 프로테아제의 분비를 통한 이펙터 세포 활성의 결과로서 일어난다. 본 발명의 항체의 ADCC 활성을 평가하기 위하여, 면역 이펙터 세포와 조합되어 원하는 항원을 발현하는 세포에 항체를 첨가할 수 있으며, 이는 항원 항체 복합체에 의해 활성화되어 표적 세포의 세포용해를 유발할 수 있다. 세포용해는 용해된 세포로부터의 표지(예를 들어, 방사성 기질, 형광 염료, 또는 천연 세포내 단백질)의 방출에 의해 검출될 수 있다. 그러한 검정을 위한 예시적인 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 NK 세포를 포함한다. 예시적인 표적 세포는 내인성으로 또는 재조합에 의해 원하는 항원을 발현하는 세포를 포함한다. 예시적인 검정에서, 표적 세포는 1 표적 세포 대 50 이펙터 세포의 비로 사용된다. 표적 세포를 37°C에서 20 분 동안 BATDA(PerkinElmer)로 사전-표지하고, 2회 세척하고, DMEM, 10% 열-불활성화 FBS, 2 mM L-글루타민(모두 Invitrogen으로부터) 중에 재현탁한다. 표적(1×10^4 개 세포) 및 이펙터 세포(0.5×10^6 개 세포)를 합하고, 100 μ l의 세포를 96-웰 U-바닥 플레이트의 웰에 첨가한다. 시험 항체가 있거나 없는 추가적인 100 μ l를 첨가한다. 플레이트를 200 g에서 3 분 동안 원심분리하고, 37°C에서 2 시간 동안 인큐베이션 후, 200 g에서 3 분 동안 다시 원심분리한다. 웰 당 총 20 μ l의 상청액을 제거하고, 200 μ l의 DELPHIA 유로폼-기반의 시약(PerkinElmer)의 첨가에 의해 세포 용해를 측정한다. 0.67% Triton X-100(Sigma Aldrich)을 이용하는 최대 세포독성, 및 임의의 항체의 부재 하에 표적 세포로부터의 BATDA의 자발적인 방출에 의해 결정된 최소 대조군에 대해 데이터를 정규화한다.
- [0269] "항체-의존성 세포 식작용("ADCP")은 식세포, 예컨대 대식세포 또는 수지상 세포에 의한 내재화에 의한 항체-코팅된 표적 세포의 제거의 기전을 지칭한다. 이펙터 세포로서 단핵구-유래 대식세포를 사용하고, GFP 또는 다른 표지된 분자를 발현하도록 조작된 표적 세포로서 원하는 항원을 발현하는 다우디 세포(ATCC[®] CCL-213[™]) 또는 B 세포 백혈병 또는 림프종 또는 종양 세포를 사용함으로써 ADCP를 평가할 수 있다. 이펙터:표적 세포 비는, 예를 들어 4:1일 수 있다. 본 발명의 항체의 존재 또는 부재 하에 이펙터 세포를 표적 세포와 4 시간 동안 인큐베이션할 수 있다. 인큐베이션 후에, 세포는 아큐타제를 사용하여 탈착될 수 있다. 대식세포는 형광 표지에 커플링된 항-CD11b 및 항-CD14 항체로 확인할 수 있으며, % 식작용은 표준 방법을 사용하여 CD11⁺CD14⁺ 대식세포에서의 % GFP 형광에 기초하여 결정할 수 있다.
- [0270] "보체-의존성 세포독성(CDC)"은, 표적-결합된 항체의 Fc 이펙터 도메인이 보체 성분 C1q에 결합하여 활성화하고, 이는 결국 보체 캐스케이드를 활성화하여 표적 세포사로 이어지는 세포사 유도 기전을 지칭한다. 보체의 활성화는 또한 표적 세포 표면 상의 보체 성분의 침착을 가져올 수 있는데, 이는 백혈구 상의 보체 수용체(예를 들어, CR3)에 결합함으로써 ADCC를 용이하게 한다. 예를 들어 RPMI-B(1% BSA로 보충된 RPMI) 중에 1×10^5 개 세포/웰(50 μ l/웰)로 다우디 세포를 플레이팅하고, 0 내지 100 μ g/ml의 최종 농도로 50 μ l의 시험 항체를 웰에 첨가하고, 실온에서 15 분 동안 반응물을 인큐베이션하고, 11 μ l의 혼주된 인간 혈청을 웰에 첨가하고, 37°C에서 45 분 동안 반응물을 인큐베이션함으로써 CDC를 측정할 수 있다. 용해된 세포의 백분율(%)은 표준 방법을 사용하여 FACS 검정에서 % 프로피듐 요오다이드 염색된 세포로서 검출될 수 있다.
- [0271] Fc γ RIIb에 대한 항체의 결합을 향상시키는 추가의 돌연변이를 본 발명의 다중특이성 항체에 추가로 실행할 수 있다. 예시적인 그러한 돌연변이는 돌연변이 S267E, S267D, S267E/I332E, S267E/L328F, G236D/S267E, 및 E233D/G237D/H268D/P271G/A330R/P238D이다.
- [0272] 일반적으로, 예컨대 암 및 감염의 치료를 위해, 대상에서 면역 반응을 향상시키기 위해 사용할 항체 내로 활성화 Fc γ R에 대한 결합을 향상시키고 억제성 Fc γ RIIb에 대한 결합을 감소시키는 돌연변이를 조작할 수 있다.

예컨대 염증성 또는 자가면역 질환의 치료를 위해, 대상에서 면역 반응을 감쇠시키기 위해 사용되는 항체 내로 활성화 Fc γ R에 대한 결합을 감소시키거나 억제성 Fc γ RIIb에 대한 결합을 향상시키는 돌연변이를 조작할 수 있다. 억제성 Fc γ RIIb에 대한 결합을 향상시키는 돌연변이는 또한 TNFR 슈퍼패밀리 구성원에 결합하여 이들의 효능적 활성을 향상시키는 효능적 항체 내로 도입될 수 있다.

[0273] ADCC를 유도하는 본 발명의 다중특이성 항체의 능력은 이들의 올리고당 성분을 조작함으로써 향상시킬 수 있다. 인간 IgG1은 잘 알려진 바이안테나리(biantennary) G0, G0F, G1, G1F, G2, 또는 G2F 형태의 대부분의 글리칸에 의해 Asn297에서 N-글리코실화된다. 조작되지 않은 CHO 세포에 의해 생성된 항체는 전형적으로 약 85% 이상의 글리칸 푸코스 함량을 갖는다. Fc 영역에 부착된 바이안테나리 복합체-유형의 올리고당으로부터의 코어(core) 푸코스의 제거는, 항원 결합 또는 CDC 활성을 변경시키지 않고서, 개선된 Fc γ RIIIa 결합을 통해 항체의 ADCC를 향상시킨다. 바이안테나리 복합체형의 Fc 올리고당을 보유하는 비교적 높은 탈푸코실화된 항체의 성공적인 발현으로 이어지는 것으로 보고된 상이한 방법, 예컨대 배양 삼투압의 제어, 숙주 세포주로서 변이체 CHO 주 Lec13의 응용, 숙주 세포주로서 변이체 CHO 주 EB66의 응용, 숙주 세포주로서 래트 하이브리도마 세포주 YB2/0의 응용, 특이적으로 α 1,6-푸코실트랜스페라제(FUT8) 유전자에 대한 작은 간섭 RNA의 도입, 또는 β -1,4-N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제 III 및 골지 α -만노시다제 II 또는 강력한 알파-만노시다제 I 억제제, 키푸넨신의 공동발현을 사용하여 그러한 mAb를 달성할 수 있다.

[0274] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 다중특이성 항체는 푸코스 함량이 약 0% 내지 약 15%, 예를 들어 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 0%인 바이안테나리 글리칸 구조를 갖는다.

[0275] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 다중특이성 항체는 푸코스 함량이 약 50%, 40%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 0%인 바이안테나리 글리칸 구조를 갖는다.

[0276] "푸코스 함량"은 Asn297에서의 당 사슬 내의 푸코스 단당의 양을 의미한다. 푸코스의 상대량은 모든 당구조(glycostructure)에 대한 푸코스-함유 구조의 백분율이다. 이들은, 예를 들어 하기와 같은 다중 방법에 의해 특성화되고 정량화될 수 있다: 1) N-글리코시다제 F 처리된 샘플(예를 들어, 복합체, 하이브리드, 및 올리고- 및 고급-만노스 구조)의 MALDI-TOF를 사용하는 방법; 2) Asn297 글리칸의 효소적 방출을 행하고, 후속으로, 유도체화하고, 형광 검출을 사용하는 HPLC(UPLC) 및/또는 HPLC-MS(UPLC-MS)에 의해 검출/정량화함에 의한 방법; 3) 엔도(Endo) S, 또는 제1 GlcNAc 단당과 제2 GlcNAc 단당 사이를 절단하여 푸코스가 제1 GlcNAc에 부착된 상태로 남겨 두는 다른 효소로 Asn297 글리칸을 처리하거나 처리하지 않고서, 천연 또는 환원된 mAb의 온전한 단백질질을 분석하는 방법; 4) 효소적 분해(예를 들어, 트립신 또는 엔도펩티다제 Lys-C)에 의해 mAb를 구성성분 펩티드로 분해하고, 이어서 HPLC-MS(UPLC-MS)에 의해 분리, 검출, 및 정량화하는 방법; 또는 5) Asn 297에서의 PNGase F를 이용한 특이적 효소적 탈글리코실화에 의해 mAb 단백질로부터 mAb 올리고당을 분리하는 방법. 방출된 올리고당은 형광단으로 표지되고, 실험 질량과 이론 질량의 비교에 의한 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화(MALDI: matrix-assisted laser desorption ionization) 질량 분석법에 의한 글리칸 구조의 미세 특성화, 이온교환 HPLC(GlycoSep C)에 의한 시알릴화도(degree of sialylation)의 결정, 순상 HPLC(GlycoSep N)에 의한 친수성 기준에 따른 올리고당 형태의 분리 및 정량화, 및 고성능 모세관 전기영동-레이저 유도 형광(HPCE-LIF: high performance capillary electrophoresis-laser induced fluorescence)에 의한 올리고당의 분리 및 정량화를 가능하게 하는 다양한 상보적 기술에 의해 분리 및 확인될 수 있다.

[0277] "저 푸코스" 또는 "저 푸코스 함량"은 푸코스 함량이 약 0% 내지 15%인 항체를 지칭한다.

[0278] "정상 푸코스" 또는 "정상 푸코스 함량"은 푸코스 함량이 약 50% 초과, 전형적으로 약 60%, 70%, 80% 초과, 또는 85% 초과인 항체를 지칭한다.

[0279] 본 발명의 다중특이성 항체는 글리코실화, 이성체화, 탈글리코실화, 또는 비-천연 발생 공유적 변형, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 모이어티의 첨가(페길화) 및 지질화와 같은 과정에 의해 번역-후 변형될 수 있다. 그러한 변형은 생체내에서 또는 시험관내에서 일어날 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 본 발명의 항체는 폴리에틸렌 글리콜에 접합되어(페길화) 그의 약동학적 프로파일을 개선할 수 있다. 접합은 당업자에게 알려진 기법에 의해 수행될 수 있다. 치료 항체와 PEG의 접합은 기능을 간섭하지 않으면서, 약력학을 증진시키는 것으로 보인다.

[0280] 본 발명의 다중특이성 항체는 안정성, 선택성, 교차-반응성, 친화성, 면역원성, 또는 다른 바람직한 생물학적 특성 또는 생물물리학적 특성을 개선하도록 변형될 수 있으며, 이는 본 발명의 범주 내에 있다. 항체의 안정성

은 (1) 이들의 고유한 안정성에 영향을 주는 개별 도메인의 코어 패킹(core packing), (2) HC 및 LC 짝짓기에 영향을 주는 단백질/단백질 계면 상호작용, (3) 극성 또는 하전된 잔기의 매몰(burial), (4) 극성 및 하전된 잔기에 대한 H-결합 네트워크, 및 (5) 다른 분자내 및 분자간 힘 중에서 표면 전하 및 극성 잔기 분포를 포함하는 다수의 인자에 의해 영향을 받는다(문헌[Worn and Pluckthun 2001]). 잠재적인 구조 불안정화 잔기를 항체의 결정 구조에 기초하거나, 또는 소정 경우에는 분자 모델링에 의해 확인할 수 있으며, 확인된 잔기 내에 돌연변이를 보유하는 변이체를 생성하고 평가함으로써, 항체 안정성에 대한 잔기의 영향력을 시험할 수 있다. 항체 안정성을 증가시키기 위한 방법 중 하나는 시차 주사 열량법(DSC)에 의해 측정되는 바와 같은 열 전이 중간점(T_m)을 상승시키는 것이다. 일반적으로, 단백질 T_m 은 그의 안정성과는 상관관계에 있고, 용액 중에서의 폴립(unfolding) 및 변성, 및 단백질이 풀리는 경향에 의존하는 분해 과정에 대한 그의 감수성과는 역상관계에 있다. 제형 연구는 Fab T_m 이 상응하는 mAb의 장기적인 물리적 안정성에 영향을 준다는 것을 시사한다.

- [0281] 혈류 내의 내인성 순환 카르복시펩티다제에 의해 C-말단 라이신(CTL)을 주입된 항체로부터 제거할 수 있다. 미국 특허 출원 공개 US20140273092호에 기재된 바와 같이, 세포의 Zn^{2+} , EDTA 또는 EDTA - Fe^{3+} 의 농도를 제어하여 제조 동안 CTL 제거를 최대 수준 미만으로 제어할 수 있다. 항체 내의 CTL 함량은 공지된 방법을 사용하여 측정할 수 있다.
- [0282] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 다중특이성 항체의 C-말단 라이신 함량은 약 10% 내지 약 90%, 약 20% 내지 약 80%, 약 40% 내지 약 70%, 약 55% 내지 약 70%, 또는 약 60%이다.
- [0283] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 다중특이성 항체의 C-말단 라이신 함량은 약 0%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%이다.
- [0284] 본 발명은 또한 동일한 아미노산 서열을 갖는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 단리된 항체를 제공하며, 여기서 2개의 동일한 중쇄는 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하고, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0285] 본 발명은 또한 동일한 아미노산 서열을 갖는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 단리된 항체를 제공하며, 여기서 2개의 동일한 중쇄는 돌연변이 Q311R을 포함하고, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0286] 본 발명은 또한 동일한 아미노산 서열을 갖는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 단리된 항체를 제공하며, 여기서 2개의 동일한 중쇄는 돌연변이 Q311K를 포함하고, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0287] 본 발명은 또한 동일한 아미노산 서열을 갖는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 단리된 항체를 제공하며, 여기서 2개의 동일한 중쇄는 돌연변이 T307P/L309Q를 포함하고, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0288] 본 발명은 또한 동일한 아미노산 서열을 갖는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 단리된 항체를 제공하며, 여기서 2개의 동일한 중쇄는 돌연변이 T307P/V309Q를 포함하고, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0289] 본 발명은 또한 동일한 아미노산 서열을 갖는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 단리된 항체를 제공하며, 여기서 2개의 동일한 중쇄는 돌연변이 T307P/L309Q/Q311R을 포함하고, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0290] 본 발명은 또한 동일한 아미노산 서열을 갖는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 단리된 항체를 제공하며, 여기서 2개의 동일한 중쇄는 돌연변이 T307P/V309Q/Q311R을 포함하고, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0291] 단리된 항체는 본 발명의 다중특이성 항체를 생성하기 위한 모 항체로서 유용하다.
- [0292] 일부 실시 형태에서, 단리된 항체는 돌연변이 F405L, K409R, F405L/R409K, T366W, 또는 T366S/L368A/Y407V를 추가로 포함한다.
- [0293] 일부 실시 형태에서, 단리된 항체는 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 동종형이다.
- [0294] **본 발명의 조작된 다중특이성 항체의 생성 방법**
- [0295] 표준 클로닝 및 발현 기술을 사용하여 모 다중특이성 항체에 비교할 때 변경된 아미노산 서열을 갖는 본 발명의 조작된 다중특이성 항체를 생성할 수 있다. 예를 들어, 부위-지향적 돌연변이생성 또는 PCR-매개 돌연변이생성을 수행하여 돌연변이(들)를 도입할 수 있으며, 잘 공지된 방법 및 실시예에서 본 명세서에 기재된 방법을 사용

하여 항체 결합 또는 다른 관심 있는 특성에 대한 효과를 평가할 수 있다.

[0296] **항체 동종이형(allotype)**

[0297] 치료 항체의 면역원성은 주입 반응의 위험성 증가 및 치료 반응의 지속 기간의 감소와 관련이 있다(문헌[Baert *et al.*, (2003) *N Engl J Med* 348:602-08]). 치료 항체가 숙주에서 면역 반응을 유도하는 정도는 항체의 동종이형에 의해 부분적으로 결정될 수 있다(문헌[Stickler *et al.*, (2011) *Genes and Immunity* 12:213-21]). 항체 동종이형은 항체의 불변 영역 서열의 특정 위치에서의 아미노산 서열 변화와 관련이 있다.

[0298] 표 4는 선택된 IgG1, IgG2, 및 IgG4 동종이형을 나타낸다.

[0299] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 다중특이성 항체는 G2m(n), G2m(n-), G2m(n)/(n-), nG4m(a), G1m(17), 또는 G1m(17,1) 동종이형의 것이다.

[0300] [표 4]

동종이형	다양성 위치에서의 아미노산 잔기(잔기 넘버링: EU 인덱스)							
	IgG2		IgG4		IgG1			
	189	282	309	422	214	356	358	431
G2m(n)	T	M						
G2m(n-)	P	V						
G2m(n)/(n-)	T	V						
nG4m(a)			L	R				
G1m(17)					K	E	M	A
G1m(17,1)					K	D	L	A

[0301]

[0302] **본 발명의 다중특이성 항체의 생성 및 단리**

[0303] 표준 분자 생물학 기술을 사용하고 모 항체의 Fab 아암 교환을 촉진하여 본 발명의 다중특이성 항체를 생성할 수 있다. 본 발명의 다중특이성 항체는 단백질 A 리간드 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있다.

[0304] 본 발명은 또한,

[0305] 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 중쇄 또는 이의 단편 및 제1 경쇄를 포함하는 제1 모 항체를 제공하는 단계;

[0306] 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 중쇄 또는 이의 단편 및 제2 경쇄를 포함하는 제2 모 항체를 제공하는 단계;

[0307] 제1 모 항체 및 제2 모 항체를 샘플 내에서 접촉시키는 단계;

[0308] 샘플을 인큐베이션하는 단계; 및

[0309] 단백질 A 리간드 친화성 크로마토그래피를 사용하여 다중특이성 항체를 정제하는 단계를 포함하는, 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 중쇄 또는 이의 단편 및 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 중쇄 또는 이의 단편을 포함하는 단리된 다중특이성 항체의 제조 방법을 제공한다.

[0310] 본 발명은 또한,

[0311] 돌연변이 T307P/L309Q를 포함하는 제1 중쇄 또는 이의 단편 및 제1 경쇄를 포함하는 제1 모 항체를 제공하는 단계;

[0312] 위치 307 및 309에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 중쇄 또는 이의 단편 및 제2 경쇄를 포함하는 제2 모 항체를 제공하는 단계;

[0313] 제1 모 항체 및 제2 모 항체를 샘플 내에서 접촉시키는 단계;

[0314] 샘플을 인큐베이션하는 단계; 및

[0315] 단백질 A 리간드 친화성 크로마토그래피를 사용하여 다중특이성 항체를 정제하는 단계를 포함하는, 돌연변이 T307P/L309Q를 포함하는 제1 중쇄 또는 이의 단편 및 위치 307 및 309에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 중쇄 또는 이의 단편을 포함하는 단리된 다중특이성 항체의 제조 방법을 제공한다.

- [0316] 본 발명은 또한,
- [0317] 돌연변이 T307P/V309Q를 포함하는 제1 중쇄 또는 이의 단편 및 제1 경쇄를 포함하는 제1 모 항체를 제공하는 단계;
- [0318] 위치 307 및 309에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 중쇄 또는 이의 단편 및 제2 경쇄를 포함하는 제2 모 항체를 제공하는 단계;
- [0319] 제1 모 항체 및 제2 모 항체를 샘플 내에서 접촉시키는 단계;
- [0320] 샘플을 인큐베이션하는 단계; 및
- [0321] 단백질 A 리간드 친화성 크로마토그래피를 사용하여 다중특이성 항체를 정제하는 단계를 포함하는, 돌연변이 T307P/V309Q를 포함하는 제1 중쇄 또는 이의 단편 및 위치 307 및 309에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 중쇄 또는 이의 단편을 포함하는 단리된 다중특이성 항체의 제조 방법을 제공한다.
- [0322] 본 발명은 또한,
- [0323] 돌연변이 T307P/L309Q/Q311R을 포함하는 제1 중쇄 또는 이의 단편 및 제1 경쇄를 포함하는 제1 모 항체를 제공하는 단계;
- [0324] 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 중쇄 또는 이의 단편 및 제2 경쇄를 포함하는 제2 모 항체를 제공하는 단계;
- [0325] 제1 모 항체 및 제2 모 항체를 샘플 내에서 접촉시키는 단계;
- [0326] 샘플을 인큐베이션하는 단계; 및
- [0327] 단백질 A 리간드 친화성 크로마토그래피를 사용하여 다중특이성 항체를 정제하는 단계를 포함하는, 돌연변이 T307P/L309Q/Q311R을 포함하는 제1 중쇄 또는 이의 단편 및 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 중쇄 또는 이의 단편을 포함하는 단리된 다중특이성 항체의 제조 방법을 제공한다.
- [0328] 본 발명은 또한,
- [0329] 돌연변이 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 중쇄 또는 이의 단편 및 제1 경쇄를 포함하는 제1 모 항체를 제공하는 단계;
- [0330] 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 중쇄 또는 이의 단편 및 제2 경쇄를 포함하는 제2 모 항체를 제공하는 단계;
- [0331] 제1 모 항체 및 제2 모 항체를 샘플 내에서 접촉시키는 단계;
- [0332] 샘플을 인큐베이션하는 단계; 및
- [0333] 단백질 A 리간드 친화성 크로마토그래피를 사용하여 다중특이성 항체를 정제하는 단계를 포함하는, 돌연변이 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 중쇄 또는 이의 단편 및 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 중쇄 또는 이의 단편을 포함하는 단리된 다중특이성 항체의 제조 방법을 제공한다.
- [0334] 다중특이성 항체의 VH 및 VL 영역은 원하는 항원에 특이적인 항체의 기존의 VH/VL 영역으로부터, 또는 드 노보 (*de novo*) 생성된 모 항체의 VH/VL 도메인으로부터 유래될 수 있다.
- [0335] 모 항체는 다양한 기술을 사용하여 드 노보 생성될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Kohler and Milstein, *Nature* 256:495, 1975]의 하이브리도마 방법을 사용하여 이들을 생성할 수 있다. 하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 다른 숙주 동물, 예컨대 햄스터, 래트, 또는 원숭이를 항원으로 면역화한 후, 면역화된 동물로부터의 비장 세포를 표준 방법을 사용하여 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성한다(문헌[Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103, Academic Press, 1986]). 단일 불멸화(immortalized) 하이브리도마 세포로부터 발생하는 콜로니를 원하는 특성, 예컨대 항원에 대한 결합의 특이성, 교차-반응성 또는 그의 결여, 및 친화성을 갖는 항체의 생성에 대해 스크리닝한다.
- [0336] 인간 면역글로불린(Ig) 유전자좌를 그들의 게놈 내에 담지하는 유전자도입 마우스를 사용하여 원하는 항원에 대한 모 항체를 생성할 수 있으며, 예를 들어 국제 특허 출원 공개 제W090/04036 호, 미국 특허 제6150584 호, 국제 특허 출원 공개 제W099/45962호, 국제 특허 출원 공개 제W002/066630호, 국제 특허 출원 공개 제W002/43478

호, 문헌[Lonberg *et al.*, *Nature* 368:856-9, 1994]; 문헌[Green *et al.*, *Nature Genet* 7:13-21, 1994]; 문헌[Green & Jakobovits, *Exp. Med.* 188:483-95, 1998]; 문헌[Lonberg and Huszar, *Int Rev Immunol* 13:65-93, 1995]; 문헌[Bruggemann *et al.*, *Eur J Immunol* 21:1323-1326, 1991]; 문헌[Fishwild *et al.*, *Nat Biotechnol* 14:845-851, 1996]; 문헌[Mendez *et al.*, *Nat Genet* 15:146-156, 1997]; 문헌[Green, *J Immunol Methods* 231:11-23, 1999]; 문헌[Yang *et al.*, *Cancer Res* 59:1236-1243, 1999]; 문헌[Bruggemann and Taussig, *Curr Opin Biotechnol.* 8:455-458, 1997]; 국제 특허 출원 공개 제W002/043478호에 기재되어 있다. 이러한 마우스 내의 내인성 면역글로불린 유전자좌는 파괴되거나 결실될 수 있고, 적어도 하나의 완전한 또는 부분적인 인간 면역글로불린 유전자좌가 상동 또는 비상동 재조합을 사용하거나, 도입염색체(transchromosome)를 사용하거나, 미니유전자(minigene)를 사용하여 마우스 게놈 내로 삽입될 수 있다. Regeneron(<http://www.regeneron.com>), Harbour Antibodies(<http://www.harbourantibodies.com>), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT)(<http://www.omtinc.net>), KyMab(<http://www.kymab.com>), Trianni(<http://www.trianni.com>), 및 Ablexis(<http://www.ablexis.com>)와 같은 회사들이 상기 기재된 바와 같은 기술을 사용하여 선택된 항원에 대해 지향된 인간 항체를 제공하는 데에 관여할 수 있다.

- [0337] 모 항체는 또한 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택될 수 있으며, 여기서 파지는 인간 면역글로불린 또는 이들의 일부, 예컨대 Fab, 단일쇄 항체(scFv), 또는 쌍을 이루지 않거나 쌍을 이루는 항체 가변 영역을 발현하도록 조작된다. 모 항체는, 예를 들어 문헌[Shi *et al.*, *J Mol Biol* 397:385-96, 2010] 및 국제 특허 출원 공개 제W009/085462호에 기재된 바와 같이 박테리오파지 pIX 외피 단백질과의 융합 단백질로서 항체 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 발현하는 파지 디스플레이 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 라이브러리는 원하는 항원에 결합하는 파지에 대해 스크리닝될 수 있고, 얻어진 양성 클론은 추가로 특성화될 수 있으며, Fab는 클론 용해물로부터 단리되고, 전장 IgG로서 발현된다. 인간 항체를 단리하기 위한 이러한 파지 디스플레이 방법은 예를 들어 미국 특허 제5,223,409 호; 제5,403,484호, 제5,571,698호, 제5,427,908호, 제5,580,717호, 제5,969,108호, 제6,172,197호, 제5,885,793호, 제6,521,404호; 제6,544,731호; 제6,555,313호; 제6,582,915호 및 제6,593,081호에 기재되어 있다.
- [0338] 표준 클로닝 방법을 사용하여 임의의 Ig 동종형 또는 항체 불변 도메인의 일부, 예컨대 CH2-CH3 영역으로서 단리된 VH/VL 영역을 클로닝할 수 있다. 표준 방법을 사용하여 모 항체에 Fc 돌연변이를 도입할 수 있다.
- [0339] 일부 실시 형태에서, 제1 모 항체 및 제2 모 항체는 정제된 항체로서 제공된다.
- [0340] 일부 실시 형태에서, 제1 모 항체 및 제2 모 항체는 제1 모 항체 및 제2 모 항체를 발현하는 세포로부터 수집된 세포 배양 배지 중에 제공된다.
- [0341] 일부 실시 형태에서, 제1 모 항체 및 제2 모 항체는 세포에서 공동-발현된다.
- [0342] 본 발명의 다중특이성 항체의 생성은 모 항체가 정제되지 않은 항체로서 조 추출물 중에 제공될 때 발생한다는 것이 본 명세서에 입증되었다. 조 추출물로부터 다중특이성 항체를 정제하는 능력은 단지 하나의 정제 단계가 필요하므로 하류 처리의 비용을 감소시킨다.
- [0343] 일단 모 항체가 함께 접촉되면, 인큐베이션 단계가 수행된다.
- [0344] 일부 실시 형태에서, 인큐베이션은 약 20°C 내지 약 37°C의 온도에서 수행된다.
- [0345] 일부 실시 형태에서, 인큐베이션은 약 25°C 내지 약 37°C의 온도에서 수행된다.
- [0346] 일부 실시 형태에서, 인큐베이션은 약 25°C 내지 약 37°C의 온도에서 약 90 분 내지 약 6 시간 수행된다.
- [0347] 일부 실시 형태에서는, 인큐베이션 단계 중에 환원제가 첨가된다.
- [0348] 일부 실시 형태에서, 환원제는 2-메르캅토에틸아민(2-MEA)이다.
- [0349] 일부 실시 형태에서, 환원제는 다이티오프레이트(DTT)이다.
- [0350] 일부 실시 형태에서, 환원제는 다이티오에리트릴(DTE)이다.
- [0351] 일부 실시 형태에서, 환원제는 글루타티온이다.
- [0352] 일부 실시 형태에서, 환원제는 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(TCEP)이다.
- [0353] 일부 실시 형태에서, 환원제는 L-시스테인이다.

- [0354] 일부 실시 형태에서, 환원제는 베타-메르캅토에탄올이다.
- [0355] 일부 실시 형태에서, 환원제는 약 10 mM 내지 약 100 mM의 농도로 존재한다.
- [0356] 일부 실시 형태에서, 2-MEA는 약 10 mM 내지 약 100 mM의 농도로 존재한다.
- [0357] 일부 실시 형태에서, 2-MEA는 약 25 mM 내지 약 75 mM의 농도로 존재한다.
- [0358] 예를 들어, pH 5 내지 8에서, 예를 들어 pH 7.0에서 또는 pH 7.4에서 적어도 25 mM 2-MEA의 존재 하에서 또는 적어도 0.5 mM 다이티오프라이탈의 존재 하에서 20°C 이상의 온도에서 90분 이상 동안의 인큐베이션이 사용될 수 있다.
- [0359] 일부 실시 형태에서, 단백질 A 리간드 크로마토그래피는 pH 구배를 사용한다.
- [0360] 일부 실시 형태에서, pH 구배는 약 pH 7.0 내지 약 pH 3.0이다.
- [0361] 일부 실시 형태에서, pH 구배는 약 pH 4.6 내지 약 pH 3.4이다.
- [0362] 일부 실시 형태에서, 다량체 항체는 약 pH 4.4 내지 약 pH 4.1에서 용출된다.
- [0363] 일부 실시 형태에서, pH 구배는 pH 4.6, pH 4.1, 및 pH 3.4의 단계 구배이다.
- [0364] 일부 실시 형태에서, 단백질 A 리간드 크로마토그래피는 시트레이트 완충제를 사용한다.
- [0365] 일부 실시 형태에서, 단백질 A 리간드 크로마토그래피는 50 mM 시트레이트 완충제를 사용한다.
- [0366] 일부 실시 형태에서, 단백질 A 리간드 크로마토그래피는 아세테이트 완충제를 사용한다.
- [0367] 일부 실시 형태에서, 단백질 A 리간드 크로마토그래피는 40 mM 아세테이트 완충제를 사용한다.
- [0368] 단백질 A 크로마토그래피는 mAbSelect Sure 컬럼(GE Healthcare)을 사용하거나 회분 방식으로 실행될 수 있다. 제조사의 컬럼 사양에 따라 배양 상청액을 추가의 처리 없이 컬럼 상에 직접 로딩한다. 50 mM 시트레이트 pH 4.7, pH 4.2, 또는 pH 3.4를 함유하는 완충제를 사용하는 pH 단계 구배를 사용하여 항체를 용출시킨다. 용출 분획을 수집하고, 분석 전에 1 mg/mL 초과로 농축한다. 단리된 다량체 항체의 순도는 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)를 사용하여 평가할 수 있다.
- [0369] **물질의 조성: 본 발명의 다량체 단백질**
- [0370] 다량체 단백질이 비대칭 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R 돌연변이를 갖는 CH2-CH3 영역을 각각 갖는 2개 이상의 폴리펩티드 사슬을 갖는 한, 본 명세서에서 확인된 돌연변이를 사용하여 임의의 다량체 단백질을 그의 모 단백질로부터 단리할 수 있다.
- [0371] 본 발명은 또한 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 다량체 단백질을 제공하며, 여기서 제1 폴리펩티드는 돌연변이 Q311R, Q311K, T307P/L309Q, T307P/V309Q, T307P/L309Q/Q311R, 또는 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역을 포함하고 제2 폴리펩티드는 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0372] 본 발명은 또한 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 다량체 단백질을 제공하며, 여기서 제1 폴리펩티드는 돌연변이 Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역을 포함하고 제2 폴리펩티드는 위치 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0373] 본 발명은 또한 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 다량체 단백질을 제공하며, 여기서 제1 폴리펩티드는 돌연변이 Q311K를 포함하는 제1 CH2-CH3 영역을 포함하고 제2 폴리펩티드는 위치 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0374] 본 발명은 또한 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 다량체 단백질을 제공하며, 여기서 제1 폴리펩티드는 돌연변이 T307P/L309Q를 포함하는 제1 CH2-CH3 영역을 포함하고 제2 폴리펩티드는 위치 307 및 309에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0375] 본 발명은 또한 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 다량체 단백질을 제공하며, 여기서 제1 폴리펩티드는 돌연변이 T307P/V309Q를 포함하는 제1 CH2-CH3 영역을 포함하고 제2 폴리펩티드는 위치 307 및 309에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.

- [0376] 본 발명은 또한 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 다량체 단백질을 제공하며, 여기서 제1 폴리펩티드는 돌연변이 T307P/L309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역을 포함하고 제2 폴리펩티드는 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0377] 본 발명은 또한 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 다량체 단백질을 제공하며, 여기서 제1 폴리펩티드는 돌연변이 T307P/V309Q/Q311R을 포함하는 제1 CH2-CH3 영역을 포함하고 제2 폴리펩티드는 위치 307, 309, 및 311에서 야생형 아미노산 잔기를 포함하는 제2 CH2-CH3 영역을 포함하며, 여기서 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.
- [0378] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역은 IgG1 동종형이다.
- [0379] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역은 IgG2 동종형이다.
- [0380] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역은 IgG4 동종형이다.
- [0381] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역은 제2 CH2-CH3 영역에 비교할 때 단백질 A 리간드에 대한 감소된 결합을 갖는다.
- [0382] 일부 실시 형태에서, 단백질 A 리간드는 스타필로코커스 단백질 A를 포함한다.
- [0383] 일부 실시 형태에서, 단백질 A 리간드는 Z-도메인을 포함한다.
- [0384] 일부 실시 형태에서, 단백질 A 리간드는 Y-도메인을 포함한다.
- [0385] 일부 실시 형태에서, Z-도메인은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0386] 일부 실시 형태에서, 단백질 A 리간드는 서열 번호 99, 100, 또는 101의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0387] 일부 실시 형태에서, 다량체 단백질은 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 내에 비대칭 안정화 돌연변이를 추가로 포함한다.
- [0388] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역 또는 제2 CH2-CH3 영역 및 제1 CH2-CH3 영역 내의 비대칭 안정화 돌연변이는
- [0389] 각각 F405L 및 K409R;
- [0390] 각각 야생형 및 F405L/R409K;
- [0391] 각각 T366W 및 T366S/L368A/Y407V;
- [0392] 각각 T366Y/F405A 및 T394W/Y407T;
- [0393] 각각 T366W/F405W 및 T394S/Y407A;
- [0394] 각각 F405W/Y407A 및 T366W/T394S;
- [0395] 각각 L351Y/F405A/Y407V 및 T394W;
- [0396] 각각 T366I/K392M/T394W 및 F405A/Y407V;
- [0397] 각각 T366L/K392M/T394W 및 F405A/Y407V;
- [0398] 각각 L351Y/Y407A 및 T366A/K409F;
- [0399] 각각 L351Y/Y407A 및 T366V/K409F;
- [0400] 각각 Y407A 및 T366A/K409F;
- [0401] 각각 D399K/E356K 및 K409D/K392D; 또는
- [0402] 각각 D399K/E356K/E357K 및 K409D/K392D/K370이다.
- [0403] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및 제2 CH2-CH3 영역은
- [0404] 각각 서열 번호 2 및 22;

- [0405] 각각 서열 번호 3 및 22;
- [0406] 각각 서열 번호 4 및 22;
- [0407] 각각 서열 번호 5 및 22;
- [0408] 각각 서열 번호 6 및 23;
- [0409] 각각 서열 번호 7 및 23;
- [0410] 각각 서열 번호 8 및 23;
- [0411] 각각 서열 번호 9 및 23;
- [0412] 각각 서열 번호 10 및 24;
- [0413] 각각 서열 번호 11 및 24;
- [0414] 각각 서열 번호 12 및 24;
- [0415] 각각 서열 번호 13 및 24;
- [0416] 각각 서열 번호 14 및 25;
- [0417] 각각 서열 번호 15 및 25;
- [0418] 각각 서열 번호 16 및 25;
- [0419] 각각 서열 번호 17 및 25;
- [0420] 각각 서열 번호 18 및 26;
- [0421] 각각 서열 번호 19 및 26;
- [0422] 각각 서열 번호 20 및 26;
- [0423] 각각 서열 번호 21 및 26;
- [0424] 각각 서열 번호 52 및 54;
- [0425] 각각 서열 번호 52 및 55;
- [0426] 각각 서열 번호 53 및 54;
- [0427] 각각 서열 번호 53 및 55;
- [0428] 각각 서열 번호 56 및 54; 또는
- [0429] 각각 서열 번호 56 및 55의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0430] 일부 실시 형태에서, 제1 CH2-CH3 영역 및/또는 제2 CH2-CH3 영역은 이중 단백질에 커플링된다.
- [0431] 일부 실시 형태에서, 이중 단백질은 펩티드이다.
- [0432] 일부 실시 형태에서, 이중 단백질은 수용체의 세포외 도메인이다.
- [0433] 일부 실시 형태에서, 이중 단백질은 리간드의 세포외 도메인이다.
- [0434] 일부 실시 형태에서, 이중 단백질은 분비된 단백질이다.
- [0435] 일부 실시 형태에서, 이중 단백질은 scFv이다.
- [0436] 일부 실시 형태에서, 이중 단백질은 중쇄 가변 영역(VH)이다.
- [0437] 일부 실시 형태에서, 이중 단백질은 경쇄 가변 영역(VL)이다.
- [0438] 일부 실시 형태에서, 이중 단백질은 피브로넥틴 III형 도메인이다.
- [0439] 일부 실시 형태에서, 이중 단백질은 파이노머이다.
- [0440] 일부 실시 형태에서, 이중 단백질은 임의로 링커를 통해 제1 CH2-CH3 영역 및/또는 제2 CH2-CH3 영역의 N-말단

에 커플링된다.

- [0441] 일부 실시 형태에서, 이중 단백질은 임의로 링커를 통해 제1 CH2-CH3 영역 및/또는 제2 CH2-CH3 영역의 C-말단에 커플링된다.
- [0442] 일부 실시 형태에서, 링커는 서열 번호 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 또는 98의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0443] 일부 실시 형태에서, 다량체 단백질은 항체이다.
- [0444] 일부 실시 형태에서, 항체는 다중특이성이다.
- [0445] 일부 실시 형태에서, 항체는 이중특이성이다.
- [0446] 일부 실시 형태에서, 항체는 단일특이성이다.
- [0447] 일부 실시 형태에서, 다량체 단백질은 2개의 폴리펩티드 사슬을 함유한다.
- [0448] 일부 실시 형태에서, 다량체 단백질은 3 개의 폴리펩티드 사슬을 함유한다.
- [0449] 일부 실시 형태에서, 다량체 단백질은 4 개의 폴리펩티드 사슬을 함유한다.
- [0450] 본 발명에 포함되는 예시적인 다량체 단백질 포맷을 표 5에 나타낸다. 포맷에서, 펩티드(P)는 수용체의 세포외 도메인, 리간드의 세포외 도메인, 분비된 단백질, scFv, Fab, 중쇄 가변 영역(VH), 경쇄 가변 영역(VL), 피브로넥틴 III형 도메인, 또는 파이노머일 수 있다. 포맷에서, 임의로 링커(L)는 부재할 수 있다. 예시적인 링커를 표 6에 나타낸다. 표에서 별표(*)는 2개의 CH2-CH3 도메인이 본 명세서에 기재된 바와 같은 비대칭 돌연변이를 보유함을 표시한다.
- [0451] 본 발명의 다량체 단백질은 다중특이성 항체에 대해 본 명세서에 기재된 바와 같이 표준 방법을 사용하여 추가로 변형될 수 있다. 본 발명의 다량체 단백질은 표준 클로닝 방법을 사용하여 제조될 수 있다.

[표 5]

포맷	폴리펩티드 사슬
포맷 1	(P-L) _n -CH2-CH3 (P-L) _n -CH2-CH3*
포맷 2	CH2-CH3-(L-P) _n CH2-CH3*-(L-P) _n
포맷 3	(P-L) _n -CH2-CH3-(L-P) _n (P-L) _n -CH2-CH3*-(L-P) _n
포맷 4	VH1-CH1-힌지-CH2-CH3 VH2-CH1-힌지-CH2-CH3* VL1 VL2
포맷 5	VH1-L-VH2-L-CH2-CH3 VH1-L-VH2-L-CH2-CH3* VL1 VL2
포맷 6	VH1-CH1-힌지-CH2-CH3 VH2-CH1-힌지-CH2-CH3* VL1
포맷 7	VH1-L-VH2-L-CH2-CH3 VH1-L-VH2-L-CH2-CH3* VL1
포맷 8	VH1-L-VL2-L-CH2-CH3 VL1-L-VH2-L-CH2-CH3*
포맷 9	VH1-L-VL2-L-CH2-CH3 VL1-L-VH2 L-CH2-CH3*
포맷 10	(P-L) _n -VH1-CH1-힌지-CH2-CH3-(L-P) _n (P-L) _n -VH2-CH1-힌지-CH2-CH3*-(L-P) _n VL1 VL2
	n=1-5

[0453]

- [0469] 일부 실시 형태에서, 벡터는 서열 번호 32 및 48의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0470] 일부 실시 형태에서, 벡터는 서열 번호 33 및 48의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0471] 일부 실시 형태에서, 벡터는 서열 번호 34 및 48의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0472] 일부 실시 형태에서, 벡터는 서열 번호 35 및 49의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0473] 일부 실시 형태에서, 벡터는 서열 번호 36 및 49의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0474] 일부 실시 형태에서, 벡터는 서열 번호 37 및 49의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0475] 일부 실시 형태에서, 벡터는 서열 번호 38 및 49의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0476] 일부 실시 형태에서, 벡터는 서열 번호 39 및 50의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0477] 일부 실시 형태에서, 벡터는 서열 번호 40 및 50의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0478] 일부 실시 형태에서, 벡터는 서열 번호 41 및 50의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0479] 일부 실시 형태에서, 벡터는 서열 번호 42 및 50의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0480] 일부 실시 형태에서, 벡터는 서열 번호 43 및 51의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0481] 일부 실시 형태에서, 벡터는 서열 번호 44 및 51의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0482] 일부 실시 형태에서, 벡터는 서열 번호 45 및 51의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0483] 일부 실시 형태에서, 벡터는 서열 번호 46 및 51의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0484] 일부 실시 형태에서, 벡터는 서열 번호 87 및 89의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0485] 일부 실시 형태에서, 벡터는 서열 번호 87 및 90의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0486] 일부 실시 형태에서, 벡터는 서열 번호 88 및 89의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0487] 일부 실시 형태에서, 벡터는 서열 번호 88 및 90의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0488] 일부 실시 형태에서, 벡터는 서열 번호 92 및 89의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0489] 일부 실시 형태에서, 벡터는 서열 번호 92 및 90의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0490] 표 7은 예시적인 CH2-CH3 영역의 cDNA 서열을 나타낸다.

[0491]

[표 7]

CH2-CH3 도메인	cDNA 서열 번호	cDNA 폴리뉴클레오티드 서열
IgG1 CH2- CH3 Q311K	27	CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACAAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CAAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACGCAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A
IgG1 CH2- CH3 Q311R	28	CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACAAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CAAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACGCAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A
IgG1 CH2- CH3 T307P/L30 9Q	29	CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCCCCGTC CAGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CAAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACGCAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A
IgG1 CH2- CH3	30	CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACACATGCGTG

[0492]

T307P/L30 9Q/Q311R		GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCTCCCGTC CAGCACCGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTCCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA A
IgG1 CH2- CH3 Q311K/F40 5L	31	CCTGAAGTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCCTTCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCTCCCGTC CTGCACAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTGCTTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA
IgG1 CH2- CH3 Q311R/F40 5L	32	CCTGAAGTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCCTTCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCTCCCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTGCTTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA
IgG1 CH2- CH3 T307P/L30 9Q/F405L	33	CCTGAAGTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCCTTCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCTCCCGTC CAGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG

[0493]

		GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTGCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA
IgG1 CH2- CH3 T307P/L30 9Q/Q311R/ F405L	34	CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAAACC CAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCCCCGTC CAGCACCGGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAAACCATCTCCAAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTGCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA
IgG1 CH2- CH3 Q311K/K40 9R	35	CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAAACC CAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTC CTGCACAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAAACCATCTCCAAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCCGGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A
IgG1 CH2- CH3 Q311R/K40 9R	36	CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAAACC CAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAAACCATCTCCAAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCCGGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A
IgG1 CH2- CH3 T307P/L30	37	CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAAACC CAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT

[0494]

9Q/K409R		ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCCCGTC CAGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCC GACCGCTCCTTCTCTACAGCCGGCTACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A
IgG1 CH2-CH3 T307P/L30 9Q/Q311R/ K409R	38	CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACC CAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCCCGTC CAGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCC GACCGCTCCTTCTCTACAGCCGGCTACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A
IgG1 CH2-CH3 Q311K/ T366W	39	CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACC CAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGTGGTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCC GACCGCTCCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A
IgG1 CH2-CH3 Q311R/T366W	40	CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACC CAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGTGGTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCC

[0495]

		GACGGCTCCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A
IgG1 CH2- CH3 T307P/L30 9Q/ T366W	41	CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCCCGGTC CAGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGTGGTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A
IgG1 CH2- CH3 T307P/L30 9Q/Q311R/ T366W	42	CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCCCGGTC CAGCACCGGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGTGGTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A
IgG1 CH2- CH3 Q311K/T36 6S/L368A/ Y407V	43	CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCT CTGCACAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGAGTGCCTGCGCGTCA AAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTCTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA
IgG1 CH2- CH3 Q311R/T36 6S/L368A/	44	CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA

[0496]

Y407V		GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTC CTGCACCCGGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGAGCTGCGCCGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA
IgG1 CH2-CH3 T307P/L30 9Q/ T366S/L36 8A/Y407V	45	CCTGAACCTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCCCGGTC CAGCACCCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGAGCTGCGCCGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA
IgG1 CH2-CH3 T307P/L30 9Q/Q311R/ T366S/L36 8A/Y407V	46	CCTGAACCTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCCCGGTC CAGCACCCGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGAGCTGCGCCGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA
IgG1 CH2-CH3 야생형	47	CCTGAACCTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTC CTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG

[0497]

		GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A
IgG1 CH2- CH3 K409R	48	CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGGA GGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCT CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCT CCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTTACAGCCGGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A
IgG1 CH2- CH3 F405L	49	CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGGA GGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCT CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCT CCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTGCTTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA AA
IgG1 CH2- CH3 T366S/L36 8A/Y407V	50	CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGGA GGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCT CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCT CCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGAGCTGCGCCGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTTCTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA AA
IgG1 CH2- CH3 T366W	51	CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGGA GGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCT

[0498]

		CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGTGGTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A
IgG2 CH2- CH3 Q311R	87	CCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAA GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTACAGTGCCTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGA GCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTACGCGTCTCACCGTTGTGC ACCGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGGCTCCAGCCCCATCGAGAAAAACCATCTCCAAAACCCAA GGGACGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGG AGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGG CTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCACACTCCATGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
IgG2 CH2- CH3 T307P/V30 9Q/Q311R	88	CCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAA GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTACAGTGCCTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGA GCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTACGCGTCTCCCCGTTACG ACCGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGGCTCCAGCCCCATCGAGAAAAACCATCTCCAAAACCCAA GGGACGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGG AGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGG CTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCACACTCCATGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
야생형 IgG2 CH2- CH3	89	CCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAA GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTACAGTGCCTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGA GCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTACGCGTCTCACCGTTGTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGGCTCCAGCCCCATCGAGAAAAACCATCTCCAAAACCCAA GGGACGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGG AGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGG CTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCACACTCCATGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

[0499]

		CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
IgG2 CH2- CH3 F405L/K40 9R	90	CCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAA GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTACAGTGCCTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGA GCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTACGCGTCTCACCGTTGTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGGCTCCAGCCCCATCGAGAAAAACCATCTCCAAAACCCAA GGGACGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGG AGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGG CTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCACACTCCATGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
IgG2 CH2- CH3 T307P/V30 9Q	91	CCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAA GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTACAGTGCCTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGA GCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTACGCGTCTCCCCGTTACG ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGGCTCCAGCCCCATCGAGAAAAACCATCTCCAAAACCCAA GGGACGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGG AGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGG CTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCACACTCCATGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

[0500]

[0501]

적합한 발현 벡터는 전형적으로 숙주 유기체 내에서 에피솜으로서 또는 숙주 염색체 DNA의 필수 부분으로서 복제가 가능하다. 통상적으로, 발현 벡터는 선택 마커, 예를 들어 암피실린-저항성, 하이그로마이신-저항성, 테트라사이클린 저항성, 카나마이신 저항성 또는 네오마이신 저항성을 함유하여, 원하는 DNA 서열로 형질전환된 세포의 검출을 가능하게 한다.

[0502]

적합한 프로모터 및 인핸서 요소가 당업계에 알려져 있다. 진핵 세포에서의 발현을 위하여, 예시적인 프로모터

는 경쇄 및/또는 중쇄 면역글로불린 유전자 프로모터 및 인핸서 요소, 거대세포바이러스 즉시 초기 프로모터, 단순 헤르페스 바이러스 티미딘 키나제 프로모터, 초기 및 후기 SV40 프로모터, 레트로바이러스로부터의 긴 말단 반복에 존재하는 프로모터, 마우스 메탈로티오네인-I 프로모터, 및 당업계에 알려진 다양한 조직 특이적 프로모터를 포함한다. 적절한 벡터 및 프로모터의 선택은 충분히 당업자의 수준 내에 있다.

[0503] 다수의 적합한 벡터 및 프로모터가 알려져 있으며; 재조합 작제물을 생성하기 위해 많은 것이 구매가능하다. 예시적인 벡터는 박테리아 발현을 위한 벡터, 예컨대 pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a(미국 캘리포니아주 라호이아 소재의 Stratagene); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, 및 pRIT5(스웨덴 옘살라 소재의 Pharmacia) 및 진핵생물 벡터, 예컨대 pWNeo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG(Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, 및 pSVL(Pharmacia)이다.

[0504] 본 발명은 또한 본 발명의 하나 이상의 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. "숙주 세포"는 벡터가 내부에 도입된 세포를 지칭한다. 용어 숙주 세포는 특정 대상 세포뿐만 아니라 그러한 세포의 자손, 그리고 또한 특정 대상 세포로부터 생성된 안정한 세포주도 지칭하고자 함이 이해된다. 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 후세대에서 소정의 변형이 일어날 수 있기 때문에, 그러한 자손은 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 여전히 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "숙주 세포"의 범주 내에 포함된다. 그러한 숙주 세포는 진핵 세포, 원핵 세포, 식물 세포, 또는 고세균(archaeal) 세포일 수 있다. 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 간균강(bacilli), 예컨대 바실루스 수브틸리스(*Bacillus subtilis*), 및 다른 장내세균과(enterobacteriaceae), 예컨대 살모넬라(*Salmonella*), 세라티아(*Serratia*), 및 다양한 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종이 원핵 숙주 세포의 예이다. 다른 미생물, 예컨대 효모가 또한 발현에 유용하다. 사카로미세스(*Saccharomyces*)(예를 들어, *S. 세레비시아*(*S. cerevisiae*)) 및 피키아가 적합한 효모 숙주 세포의 예이다. 예시적인 진핵 세포는 포유류, 곤충, 조류 또는 다른 동물 기원의 것일 수 있다. 포유류 진핵 세포는 불멸화 세포주, 예컨대 하이브리도마 또는 골수종 세포주, 예컨대 SP2/0(미국 버지니아주 머내서스 소재의 ATCC (American Type Culture Collection), CRL-1581), NS0 (영국 윌트셔주 솔즈베리 소재의 ECACC (European Collection of Cell Cultures), ECACC No. 85110503), FO (ATCC CRL-1646) 및 Ag653 (ATCC CRL-1580) 무린 세포주를 포함한다. 예시적인 인간 골수종 세포주는 U266(ATCC CRL-TIB-196)이다. 다른 유용한 세포주는 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, 예를 들어 CHO-K1SV (미국 메릴랜드주 워커스빌 소재의 Lonza Biologics), CHO-K1 (ATCC CRL-61) 또는 DG44로부터 유래된 것을 포함한다.

[0505] 본 발명은 또한, 다중특이성 항체가 발현되는 조건 하에 본 발명의 숙주 세포를 배양하는 단계 및 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 사용하여 다중특이성 항체를 정제하는 단계를 포함하는, 본 발명의 단리된 다중특이성 항체의 제조 방법을 제공한다.

[0506] **약제학적 조성물, 투여, 및 치료 방법**

[0507] 본 발명은 또한, 본 발명의 다중특이성 항체 또는 다량체 단백질 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 치료적 용도를 위하여, 본 발명의 다중특이성 항체 또는 다량체 단백질은 약제학적으로 허용가능한 담체 중에 활성 성분으로서 본 발명의 다중특이성 항체 또는 다량체 단백질의 유효량을 함유하는 약제학적 조성물로서 제조될 수 있다. "담체"는 활성 화합물과 함께 투여되는 희석제, 애드juvant(adjuvant), 부형제, 또는 비히클을 지칭한다. 그러한 비히클은 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 것들, 예컨대 낙화생유, 대두유, 팜유, 참기름 등을 포함하는, 물 및 오일과 같은 액체일 수 있다. 예를 들어, 0.4% 식염수 및 0.3% 글리신이 사용될 수 있다. 이들 용액은 무균성이고 일반적으로 미립자 물질이 없다. 이들은 통상적인 잘 알려진 멸균 기법 (예를 들어, 여과)에 의해 멸균될 수 있다. 조성물은 pH 조절제 및 완충제, 안정화제, 증점제, 윤활제, 및 착색제 등과 같은 생리적 조건에 근접시키기 위하여 필요한 약제학적으로 허용가능한 보조 물질을 함유할 수 있다. 그러한 약제학적 제형에서 본 발명의 다중특이성 항체 또는 다량체 단백질의 농도는 광범위하게, 즉, 약 0.5 중량% 미만부터, 통상적으로 약 1 중량% 이상, 많게는 15 또는 20 중량%까지 변동될 수 있으며, 선택된 특정 투여 방식에 따라, 필요한 용량, 유체 부피, 점도 등에 기초하여 주로 선택될 것이다. 다른 인간 단백질, 예를 들어 인간 혈청 알부민을 포함하는 적합한 비히클 및 제형이, 예를 들어 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092, 특히 pp. 958-989 참조]에 기재되어 있다.

[0508] 본 발명의 다중특이성 항체 또는 다량체 단백질의 치료적 용도를 위한 투여 방식은 약제를 숙주에 전달하는 임의의 적합한 경로, 예컨대 정제, 캡슐, 용액, 분말, 겔, 입자 등의 제형을 사용하는, 비경구 투여, 예를 들어,

피내, 근육내, 복막내, 정맥내, 또는 피하, 폐; 경점막(경구, 비강내, 질내, 직장)일 수 있으며; 당업계에 잘 알려진 바와 같이 주사기, 이식된 장치, 삼투압 펌프, 카트리지, 마이크로펌프; 또는 당업자에 의해 인식되는 다른 수단에 함유된다. 부위 특이적 투여는, 예를 들어, 관절내, 기관지내, 복강내, 관절낭내, 연골내, 강내, 체강내, 소뇌내, 뇌실내, 결장내, 자궁경부내, 위내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심장주위내, 복막내, 흉막내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척수내, 활막내, 흉부내, 자궁내, 혈관내, 방광내, 병변내, 질, 직장, 협측, 설하, 비강내, 또는 경피 전달에 의해 달성될 수 있다.

[0509] 약제학적 조성물은 본 명세서에 기재된 바와 같은 약제학적 조성물을 포함하는 용기를 포함하는 키트로서 공급될 수 있다. 약제학적 조성물은, 예를 들어, 단일 용량 또는 다중 용량을 위한 주사용 용액의 형태로, 또는 주사 전에 재구성될 멸균 분말로서 제공될 수 있다. 대안적으로, 그러한 키트는 약제학적 조성물의 투여를 위한 건조-분말 분산기, 액체 에어로졸 발생기, 또는 네블라이저를 포함할 수 있다. 그러한 키트는 약제학적 조성물에 대한 지시사항 및 용법에 대한 서면 정보를 추가로 포함할 수 있다.

[0510] 다중특이성 항체 및 다른 다량체 단백질을 사용하여, 인간 대상에서 임의의 병태를 이들의 특이성에 따라 치료할 수 있다.

[0511] 본 발명을 일반적인 개념으로 설명하였지만, 본 발명의 실시 형태는 하기 실시예에서 추가로 개시될 것이며, 이때 실시예는 청구범위의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0512] **실시예 1. 단백질 A에 대한 Fc 결합을 잠재적으로 감소시키는 Fc 돌연변이의 설계**

[0513] 단백질 A의 FcRn 및 Z-도메인은 CH2와 CH3 도메인 사이의 계면에서 Fc에 결합하여, Fc 상의 동일한 잔기들 중 다수에 접촉된다. 마우스 IgG2a/b는 모두 FcRn에 결합하지만 인간 IgG1보다 더 약하게 Z-도메인에 결합하므로, 마우스 IgG2a CH2 도메인에서 보존되지 않은 인간 IgG1 CH2 도메인의 Z-도메인 결합 계면 내의 위치를 확인하였다. **도 1a**는 잔기 305와 315 사이의 인간 IgG1 및 마우스 IgG2a CH2 도메인의 정렬을 나타낸다. 위치 305, 307, 309, 314, 및 315에서의 잔기는 인간 서열과 마우스 서열 사이에서 상이하므로, 역방향 돌연변이 T307P 및/또는 L309Q를 인간 IgG1 내로 도입하는 것은 FcRn 상호작용에 영향을 주지 않으면서 단백질 A에 대한 감소된 결합을 갖는 조작된 IgG1 변이체를 생성할 수 있다는 가설이 제기되었다. 인간 IgG1 내의 발린 305는 CH2 도메인 내의 β-가닥 내에 위치되고, 단백질 A 또는 FcRn과 상호작용하지 않는다. 류신 314와 아스파라긴 315는 인간 IgG와 마우스 IgG 사이에서 상이하지만, 이들의 차이는 보존적이다(예를 들어, 인간 IgG 내의 L314는 다른 소수성 잔기: 마우스 IgG 내의 L/M314로 변화되고 N315는 다른 극성 잔기: 마우스 IgG 내의 S315로 변화됨). 따라서, 위치 307 및 309에서의 변화는 단백질 A 및 FcRn과의 인간 IgG1 상호작용에 가장 유의한 효과를 가질 것으로 추론되었다.

[0514] Z-도메인(Z34C 펩티드, Z-도메인으로부터 유래된 다이설파이드-결합된 2개의 나선 번들, PDB ID 1L6X)과 Fc의 복합체의 결정 구조의 분석은 IgG1 Fc 잔기 Q311이 주로 소수성 상호작용을 통해 Z-도메인 상의 F9, L13, R23, N24, 및 I27(서열 번호 99에 따른 잔기 넘버링)과 상호작용했음을 규명하였다(**도 1b**). 역으로, IgG1 Fc 잔기 Q311은 FcRn의 α-서브유닛(PDB ID 4NOU)의 E115 및 E116(서열 번호 103의 잔기 E4 및 E5에 상응함)을 함유하는, FcRn의 주로 산성인 표면과 상호작용했다. Fc 잔기 Q311을 돌연변이시키는 것은 생성된 변이체(들)의 Z-도메인 및 FcRn에 대한 결합에 차등적으로 영향을 줄 수 있다는 가설이 제기되었다. **도 1b**는 컷오프 거리 5 Å에서 FcRn 또는 Z-도메인과 접촉되는 Fc 잔기를 나타낸다.

[0515] **실시예 2. 연구에 사용된 단일특이성 및 이중특이성 항체의 생성**

[0516] 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 다양한 단일특이성 항체의 중쇄 둘 모두 내로 돌연변이 T307A, Q311A, Q311K, Q311E, T307P/L309Q, 또는 T307P/L309Q/Q311R을 조작하였다.

[0517] 공통 경쇄 기술을 사용하거나, Duobody[®] 기술 또는 노브-인-홀 기술을 사용하여 Fab 아암 교환을 촉진함으로써 이중특이성 mAb를 생성하였다. 공통 경쇄 기술에서는, 경쇄를 공유하는 것으로 알려진 항-TNF α 및 항-αVβ5 항체를 사용하였다. 노브-인-홀 기술에서는, 노브(T366W 돌연변이) 또는 홀(T366S, L368A, Y407V 돌연변이)을 모 단일특이성 항체 내로 도입하였다. Duobody[®] 기술에서는, F405L 또는 K409R 돌연변이를 모 단일특이성 항체 내로 도입하였다.

[0518] 생성된 이중특이성 항체는 단백질 A 결합을 잠재적으로 방해하거나 감소시키는 돌연변이(들)(T307A, Q311A, Q311K, Q311E, T307P/L309Q, 및 T307P/L309Q/Q311R)를 하나의 중쇄 내에만 보유하였다(예를 들어, 비대칭 돌연변이).

[0519] 3:1의 경쇄: 중쇄 플라스미드의 물비를 사용하여, 제조사의 프로토콜에 따라 Expi293F 세포(Invitrogen)에서 Ab를 발현시켰다. 3:0.5:0.5 물비의 경쇄: 중쇄 1: 중쇄 2 플라스미드를 사용하여 공동-형질감염을 제조하였다. 5-일 발현 기간 후에 여과에 의해 배양 상청액을 수확하였다. 알려진 농도의 동종형 대조군 표준에 대한 표면 이중층 간섭법(surface bilayer interferometry)을 사용하여 역가를 추정하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 MabSelect SuRe 수지(GE Healthcare)를 사용하여 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 모 Ab를 정제하였다. 변경된 단백질 A 결합을 갖는 변이체를 제조사의 프로토콜에 따라 단백질 G 친화성 크로마토그래피(GE Healthcare)에 의해 정제하였다.

[0520] 표 8은 생성된 단일특이성 항체를 나타낸다.

[0521] 표 9는 생성된 이중특이성(bs) 항체를 나타낸다.

[0522] [표 8]

mAb 명칭	특이성	Fc 돌연변이(들)	HC 서열 번호	LC 서열 번호
gp120-R	gp120	K409R	68	69
RSV-L	RSV	F405L	70	71
RSV-L[Q311A]	RSV	Q311A/F405L	72	71
RSV-L[Q311K]	RSV	Q311K/F405L	73	71
RSV-L[Q311R]	RSV	Q311R/F405L	74	71
RSV-L[Q311H]	RSV	Q311H/F405L	75	71
RSV-L[TL]	RSV	T307P/L309Q/F405L	76	71
RSV-L[TLQ]	RSV	T307P/L309Q/Q311R/F405L	77	71
RSV-[I253D]	RSV	I253D	78	71
aVb5	α V β 5 인테그린	야생형	79	80
TNF	TNF- α	야생형	81	80
TNF-[Q311R]	TNF- α	Q311R	82	80
TNF-[TLQ]	TNF- α	T307P/L309Q/Q311R	83	80
TNF-노브[Q311R]	TNF- α	Q311R/T366W	84	80
TNF-노브[TLQ]	TNF- α	T307P/L309Q/Q311R/T366W	85	80
aVb5-홀	α V β 5 인테그린	T366S/L368A/Y407V	86	80

[0523]

[0524] [표 9]

항체 명칭	아암 1	아암 2
bs RSV-L	gp120-R	RSV-L
bsRSV-L[Q311A]	gp120-R	RSV-L[Q311A]
bsRSV-L[Q311K]	gp120-R	RSV-L[Q311K]
bsRSV-L[Q311R]	gp120-R	RSV-L[Q311R]
bsRSV-L[TL]	gp120-R	RSV-L[TL]
bsRSV-L[TLQ]	gp120-R	RSV-L[TLQ]
bsTNF	aVb5	TNF
bsTNF-[Q311R]	aVb5	TNF-[Q311R]
bsTNF-[TLQ]	aVb5	TNF-[TLQ]
bsTNF-노브[Q311R]	aVb5-홀	TNF-노브[Q311R]
bsTNF-노브[TLQ]	aVb5-홀	TNF-노브[TLQ]

[0525]

[0526] 생성된 항체의 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열:

[0527] 서열 번호 68 gp120-R HC

[0528] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVRQAPGQRFQFEWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVTFADTSANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPY SWDDSPQDNYYMDVWVGKGTIVIVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVSVTVTPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

[0529] 서열 번호 69 gp120-R LC
 EIVLTQSPGTLSPGERATFSCRSSHSIRSRRAVWYQHKPGQAPRLV IHGVSNRASGISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYCQVYGASSYTFGQG TKLERKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC

[0530] 서열 번호 70 RSV-L HC

[0531] QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVL TMTNMDPVDATATYYCARLYG
FTYGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLSSLTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL
LYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0532] 서열 번호 71 RSV LC

[0533] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSDYNGISYMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNPESEGVDRFSGSGSGTDFTLTITSSLAQEDVAVYYCQI IEDPWTF
GQGTQVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC

[0534] 서열 번호 72 RSV-L[Q311A] HC

[0535] QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVL TMTNMDPVDATATYYCARLYG
FTYGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLSSLTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHADWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL
LYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0536] 서열 번호 73 RSV-L[Q311K] HC

[0537] QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVL TMTNMDPVDATATYYCARLYG
FTYGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLSSLTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHKDWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL
LYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0538] 서열 번호 74 RSV-L[Q311R] HC(Q311R/ F405L)

[0539] QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVL TMTNMDPVDATATYYCARLYG
FTYGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLSSLTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHRDWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL
LYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0540] 서열 번호 75 RSV-L[Q311H] HC(Q311H/ F405L)

[0541] QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVL TMTNMDPVDATATYYCARLYG
FTYGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLSSLTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHHDWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL
LYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0542] 서열 번호 76 RSV-L[TL] HC(T307P/L309Q/ F405L)

[0543] QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVL TMTNMDPVDATATYYCARLYG
FTYGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLSSLTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLPVQHQDWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL
LYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0544] 서열 번호 77 RSV-L[TLQ] HC(T307P/L309Q/Q311R/F405L)

[0545] QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVL TMTNMDPVDATATYYCARLYG
FTYGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLSSLTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV

SVLPVQHRDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFL
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSMHEALHNHYTQKLSLSPGK

[0546] 서열 번호 78 RSV-L[I253D] HC(I253D/F405L)

[0547] QITLKESGPTLVKPTQTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVL TMTNMDPVDATATYYCARLYG
FTYGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFL
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSMHEALHNHYTQKLSLSPGK

[0548] 서열 번호 79 aVb5 HC

[0549] QVQLVESGGGVVQGRSRRLSCAASGFTFSRYTMHWVRQAPGKGLEWVAVIFSDGSKNYVGVSVKGRFTISRDNSENTLYLQVNLRAEDTAVYYCAREARG
SYAFDIWGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSQSMHEALHNHYTQKLSLSPGK

[0550] 서열 번호 80 TNF 및 항-aVb5 LC

[0551] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRATGIPARFSGSGSDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPG
TKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC

[0552] 서열 번호 81 TNF HC

[0553] EVQLVESGGGVVQPGGSLSCAASGFISSYAMHWVRQAPGNGLEWVAFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNSENTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGI
AAGGNYYYYGMDVWGGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSMHEALHNHYTQKLSLSPGK

[0554] 서열 번호 82 TNF-[Q311R] HC

[0555] EVQLVESGGGVVQPGGSLSCAASGFISSYAMHWVRQAPGNGLEWVAFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNSENTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGI
AAGGNYYYYGMDVWGGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHRDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSMHEALHNHYTQKLSLSPGK

[0556] 서열 번호 83 TNF-[TLQ] HC(T307P/L309Q/Q311R):

[0557] EVQLVESGGGVVQPGGSLSCAASGFISSYAMHWVRQAPGNGLEWVAFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNSENTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGI
AAGGNYYYYGMDVWGGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLPVQHRDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSMHEALHNHYTQKLSLSPGK

[0558] 서열 번호 84 TNF-노브[Q311R] HC(Q311R/T366W)

[0559] EVQLVESGGGVVQPGGSLSCAASGFISSYAMHWVRQAPGNGLEWVAFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNSENTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGI
AAGGNYYYYGMDVWGGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHRDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSMHEALHNHYTQKLSLSPGK

[0560] 서열 번호 85 TNF-노브[TLQ] HC(T307P/L309Q/Q311R/T366W)

[0561] EVQLVESGGGVVQPGGSLSCAASGFISSYAMHWVRQAPGNGLEWVAFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNSENTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGI

AAGGNYYYYGMDVWVGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTSSSLGT
 QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTPVQHRDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLVCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0562] 서열 번호 86 aVb5-홀 HC(T366S/L368A/Y407V)

[0563] QVQLVESGGGVVQPGRSRRLSCAASGFTFSRYTMHWVRQAPGKLEWVAVISFDGSKNYVGSVKGRFTISRDNSENTLYLQVNI LRAEDTAVYYCAREARG
 SYAFDIWQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTSSSLGTQTYICNV
 NHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVS
 NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQ
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0564] 실시예 3. Z 도메인 및 FcRn에 대한 결합에 대한 T307, L309, 및/또는 Q311 돌연변이의 효과

[0565] 단일특이성 IgG1 변이체의 Z 도메인에 대한 결합

[0566] 표 8에 나타난 바와 같이 Fc 돌연변이를 보유하는 단일특이성 항-RSV 항체를 본 연구에 사용하였다.

[0567] RSV-L은 pH 4.09에서 단백질 A 수지로부터 용출되었다. T307A 돌연변이는 단백질 A 결합에 영향을 주지 않은 반면에(데이터는 나타내지 않음), T307P/L309Q 돌연변이(mAb RSV-L[TL])는 단백질 A에 대한 결합에 있어서 보통 정도의 감소를 유발하여, 이 mAb가 pH 4.48에서 용출되게 하였다. 단백질 A 결합에 대한 추가의 약화 효과는 대칭 Q311K 또는 Q311R 돌연변이에 의해 달성될 수 있었으나, Q311A 돌연변이에 의해서는 달성되지 않았다. 삼중 돌연변이 T307P/L309Q/Q311R을 도입하는 것(mAb RSV-L[TLQ])은, 4.70의 상승된 용출 pH에 의해 입증되는 바와 같이, 단백질 A와의 상호작용을 추가로 방해하였다. 표 10은 생성된 IgG1 변이체의 용출 pH 값을 나타낸다.

[0568] 이들 결과는 Q311K, Q311R, T307P/L309Q, 및 T307P/L309Q/Q311R 대칭 돌연변이가 각각 단백질 A에 대한 변이체 IgG1의 결합을 감소시켰으며, 차등 단백질 A 용출에 기초하여 모 변이체 IgG1로부터 생성된 비대칭 돌연변이를 보유하는 이중특이성 항체의 정제 및 분리를 잠재적으로 가능하게 한다는 것을 입증하였다.

[0569] [표 10]

생성된 IgG1 변이체의 용출 pH 값

mAb	용출 pH	FcRn IC ₅₀ (nM)
RSV-L	4.09	79.3
RSV-L[Q311A]	4.07	41.1
RSV-L[Q311K]	4.72	45.6
RSV-L[Q311R]	4.67	18.2
RSV-L[Q311H]	NA	59.1
RSV-L[TL]	4.48	NA
RSV-L[TLQ]	4.70	79.6

[0570]

[0571] FcRn에 대한 IgG1 변이체의 결합

[0572] 위치 311에 도입된 단일 위치 돌연변이체(Q311R, Q311A, Q311K, 및 Q311H) 중 어느 것도 단일특이성 항체와 FcRn의 상호작용을 방해하지 않았다. Q311R 돌연변이는 보통 정도로 향상된 FcRn에 결합하는 능력을 유발했으며, 이는 이 돌연변이가 연장된 혈청 반감기를 제공할 수 있음을 시사한다. RSV-L[TLQ]는 RSV-L에 비교할 때 유사한 친화성으로 FcRn에 결합했다. 비대칭 F405L Q311R(bsRSV-L[Q311R]) 또는 F405L/T307P/L309Q/Q311R 돌연변이(bsRSV-L[TLQ])를 갖는 이중특이성 IgG1 항체는 또한 야생형 IgG1에 비교할 때 동일한 친화성으로 FcRn에 결합했다. 도 2a는 Q311R, Q311A, Q311K, 또는 Q311H 돌연변이를 갖는 IgG1 변이체의 FcRn에 대한 경쟁 결합에 대한 용량 반응 곡선을 나타낸다. 도 2b는 대칭(예를 들어 단일특이성 mAb RSV-L, RSV-L[Q311R], RSV-L[TLQ]) 또는 비대칭(예를 들어 이중특이성 mAb bsRSV-L[Q311R], bsRSV-L[TLQ]) Q311R 또는 T307P/L309Q/Q311R 돌연변이를 갖는 IgG1 변이체의 FcRn에 대한 경쟁 결합에 대한 용량 반응 곡선을 나타낸다. I253D 돌연변이는 FcRn 상호작용을 방해하는 것으로 알려져 있으며, 음성 대조군으로 사용되었다.

- [0573] Q311R, Q311A, Q311K, 또는 Q311H에서의 돌연변이는 FcRn 상호작용을 손상시키지 않았다. Q311R의 돌연변이는 FcRn 상호작용을 향상시켰다. 하나 또는 둘 모두의 중쇄에서의 T307P/L309Q/Q311R 돌연변이의 혼입은 FcRn 상호작용을 손상시키지 않았다. 이들 결과는 비대칭 Q311R 또는 T307P/L309Q/Q311R 돌연변이를 보유하는 이중특이성 항체가 차등 단백질 A 정제에 의해 이들의 모 단일특이성 항체로부터 분리되고 정제될 수 있음을 시사하였다. 추가로, 이들 항체는 야생형 IgG1에 비교할 때 더 긴 혈청 반감기를 가질 수 있다.
- [0574] **방법**
- [0575] 단일특이성 모 항-RSV 또는 항-gp120 항체 내로 T307A, Q311A, Q311K, Q311R, Q311H, T307P/L309Q, 및 T307P/L309Q/Q311R 돌연변이를 조작하였다. Fab 아암 교환을 사용하여 이중특이성 항-RSV/gp120 항체를 생성하기 위하여 F405L 돌연변이(항-RSV mAb) 또는 K409R 돌연변이(항-gp120 mAb)를 갖도록 모 항체를 추가로 조작하였다. 돌연변이가 Z-도메인 및 FcRn에 대한 결합을 조절할 수 있는 정도를 평가하였다.
- [0576] 실험에 사용된 Z-도메인은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0577] **단백질 A 결합**
- [0578] 둘 모두의 아암 상에 돌연변이를 보유하는 각각의 모 mAb에 대해, 1 mL의 mAbSelect sure 컬럼(GE Healthcare) 상에 1 mg을 로딩하고, 1 × PBS pH 7.2 내지 50 mM 시트레이트 pH 3.5의 30 mL 구배를 사용하여 1 mL/분으로 용출시켰다. 280 nm에서의 흡광도 및 pH를 모니터링하였다. 피크 최대에서의 pH 값을 사용하여 분취용 실험을 위한 용출 pH를 결정하였다.
- [0579] **FcRn 결합**
- [0580] 알파-스크린 검정을 사용하여 FcRn 결합을 시험관내에서 평가하였다. 이들 검정에서, 비오틴화 IgG를 스트랩타비딘-코팅된 공여자 비드에 결합시키고, His-태깅된 FcRn을 Ni-코팅된 수용자 비드에 결합시켰다. 2개의 단백질 사이의 결합은 발광 신호를 유발하였다. 표지되지 않은 야생형 또는 돌연변이체 IgG를 사용하여 결합을 경쟁시켰으며, 이는 신호의 용량-의존적 감소를 유발하였다. 제조사의 프로토콜에 따라, SureLINK Chromophoric Biotin Labeling kit(KPL Inc.)를 사용하여 mAb를 비오틴화하였다. His-태깅된 FcRn은 Sino Biological로부터 구매하였다. 0.05%(w/v) 소 혈청 알부민(BSA) 및 0.01%(w/v) Tween-20으로 보충된, pH 6.0으로 조정된 1 × PBS에서 검정을 수행하였다. 1 µg/mL의 비오틴화 야생형 IgG1을 스트랩타비딘-접합된 공여자 비드에 결합시키고, 0.2 µg/mL의 His-태깅된 FcRn을 니켈-접합된 수용자 비드에 결합시켰다. 경쟁자 Ab를 0.4 mg/mL로 제조하였고, 각각의 지점에 대해 3 배로 연속 희석하였다. EnVision 플레이트 판독기(Perkin Elmer)를 사용하여 520 내지 620 nm의 발광을 기록하였다. Prism 6.01 소프트웨어(GraphPad Software, Inc.)를 사용하여 데이터를 분석하고, 이전에 기재된 바와 같이 4-파라미터 경쟁 모델을 사용하여 적합시켰다(문헌 [Vafa *et al.*, *Methods* 65:114-126, 2014]).
- [0581] **실시예 4. T307P, L309Q, 및 Q311R 돌연변이는 Fc γ 수용체(Fc γ R) 결합 또는 항체 안정성에 효과를 갖지 않는다.**
- [0582] CH2-CH3 계면에서의 돌연변이는 Fc의 구조를 변경하여 Fc의 증가된 역학, 감소된 열 안정성, 및 Fc γ 수용체와의 변경된 상호작용으로 이어지는 것으로 보고되어 있다(문헌[Majumdar *et al.*, *Mabs* 7:84-95, 2015]). Q311R 또는 T307P/L309Q/Q311R 돌연변이가 Fc의 구조에 유사한 영향을 주는지 여부를 다루기 위하여, 이들 돌연변이를 보유하는 항체를 Fc γ 수용체에 결합하는 이들의 능력 및 이들의 열 안정성에 대해 평가하였다.
- [0583] 각각 단일특이성 또는 이중특이성 항체 내의 대칭 또는 비대칭 Q311R 또는 T307P/L309Q/Q311R 돌연변이 중 어느 것도 시험관내에서 Fc γ 수용체와 상호작용하는 변이체 IgG1의 능력에 효과를 갖지 않았다. Fc γ 수용체는 C_H2-C_H3 계면 대신에 C_H2-헐지 계면에 결합하므로, 이 결과는 어느 정도 예상된 것이었다. 결과는 또한 도입된 돌연변이가 Fc의 전체 구조를 교란하지 않았음을 시사하였다. **도 3a, 도 3b, 도 3c, 및 도 3d**는 각각 Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, 및 Fc γ RIIIa에 대한 선택된 항체의 경쟁 결합의 용량 반응 곡선을 나타낸다. 그래프는 경쟁자의 농도에 대해 플로팅된 % 최대 신호를 나타낸다.
- [0584] 조작된 IgG의 T_m 값의 비교는 Q311R 또는 T307P/L309Q/Q311R 돌연변이가 mAb의 열 안정성을 교란하지 않았음을 입증하였다. **표 11**은 시험한 항체에 대한 시차 주사 열량법(Tm 및 엔탈피 값)에 대한 파라미터를 나타낸다. 이들 결과는 함께, Q311R 및 T307P/L309Q/Q311R 돌연변이의 효과가 단백질 A 및 FcRn 상호작용에 국한되어 있음을 시사한다.

[0585] [표 11]

mAb	C _H 2 및 Fab T _m (°C)	C _H 2 및 Fab ΔH(cal/mol)	C _H 3 T _m (°C)	C _H 3 ΔH(cal/mol)
RSV-L	70.97 ± 0.01	6.78 ± 0.02 x 10 ⁵	81.75 ± 0.03	1.45 ± 0.02 x 10 ⁵
RSV- L[Q311R]	72.10 ± 0.02	6.45 ± 0.13 x 10 ⁵	81.66 ± 0.03	1.65 ± 0.02 x 10 ⁵
RSV-L[TLQ]	71.55 ± 0.01	6.81 ± 0.03 x 10 ⁵	81.55 ± 0.04	1.61 ± 0.03 x 10 ⁵

[0586]

[0587] **방법**

[0588] 실시예 2에 기재된 프로토콜을 약간의 변형과 함께 사용하여, Fc γ R에 대한 IgG1 변이체의 결합을 평가하기 위해 알파-스크린 검정을 사용하였다. C-말단 His-태그를 함유한 Fc γ R의 가용성 세포외 도메인은 R&D systems로부터 구매하였다. 0.05%(w/v) 소 혈청 알부민(BSA) 및 0.01%(w/v) Tween-20으로 보충된, 1 × PBS pH 7.2에서 검정을 수행하였다. 1 μg/mL의 비오틴화 야생형 IgG1을 스트렙타비딘-접합된 공여자 비드에 결합시키고, His-태깅된 Fc γ R을 니켈-접합된 수용자 비드에 결합시켰다. Fc γ RI의 경우, 야생형 IgG1보다 더 약하게 수용체에 결합하는 비오틴화 IgG1-L234A/L235A 돌연변이체를 사용하여 신호 원도우를 증가시켰다. 사용된 Fc γ R의 농도는 200 ng/mL(Fc γ RI 및 Fc γ RIIa), 10 ng/mL(Fc γ RIIa), 또는 14 ng/mL(Fc γ RIIb)였다. 경쟁자 Ab를 0.4 mg/mL로 제조하였고, 각각의 지점에 대해 3 배로 연속 희석하였다.

[0589] 시차 주사 열량법(DSC)을 사용하여 항체의 폴립의 엔탈피 및 T_m을 결정하였다. 샘플을 1 × PBS pH 7.2 중에 1 mg/mL로 희석하였다. 샘플을 15 분 동안 25°C로 평형을 이루게 한 후에, 1°C/분의 속도로 25°C로부터 95°C까지 온도를 상승시켰다. Origin 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0590] **실시예 5. 단백질 A 수지로부터의 용출에 의한 정제된 항체의 시험관내 Fab 아암 교환 후 모 단일특이성 mAb로부터의 이중특이성 항체의 분리**

[0591] 이중특이성 항체 내로의 비대칭 Q311R 또는 T307P/L309Q/Q311R 돌연변이의 도입은 모 단일특이성 mAb로부터의 이들의 정제를 용이하게 하였다.

[0592] 시험관내 Fab 아암 교환 후에 생성된 모 항체 RSV-L[TLQ]와 gp120-R과 이중특이성 bsRSV-L[TLQ]의 1:1:1 혼합물을 차등 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 정제하고, 용출 피크를 혼주하고, HIC에 의해 분석하였다.

[0593] 도 4a는 모 mAb 및 이중특이성 mAb 둘 모두가 개발된 조건을 사용하는 HIC 크로마토그래프를 사용하여 분리될 수 있음을 나타낸다. 도 4b는 단백질 A 컬럼 내로 주입되는 항체의 등물 혼합물의 HIC 크로마토그래프를 나타낸다. 도 4c는 2개의 모 항체 및 이중특이성 항체의 존재와 일치하는, pH 4.7, pH 4.2, 및 pH 3.4에서 3개의 별개의 용출 피크를 유발한, 단백질 A 수지로부터의 항체 혼합물의 용출 프로파일을 나타낸다. 도 4d는 단백질 A 용출 피크의 HIC 분석을 나타낸다. HIC에 의한 용출 피크의 분석은 높은 pH 용출(pH 4.8)이 주로 모 RSV-L[TLQ] mAb를 함유한 반면에 pH 3.4 용출은 주로 gp120-R 모 mAb를 함유하였음을 입증하였다. 중간 pH 용출(pH 4.2)은 약 94% 순도의 이중특이성 bsRSV-L[TLQ] mAb를 함유하였다. 표 12는 차등 단백질 A 정제로부터의 bsRSV-L[TLQ]의 용출 순도를 나타낸다.

[0594] [표 12]

용출 pH	% RSV-L[TLQ]	% bsRSV-L[TLQ]	% gp120-R
4.6	> 99	N.D.*	N.D.
4.2	N.D.	94	6
3.4	N.D.	3	97

*N.D. = 검출되지 않음

[0595]

[0596] **방법**

[0597] 모 항체 RSV-L[TLQ] 및 gp120-R 및 이중특이성 bsRSV-L[TLQ] mAb를 연구에 사용하였다.

[0598] 단백질 G 친화성 크로마토그래피를 사용하여 RSV-L[TLQ]를 정제하고, 1 × PBS 내로 투석하였다. 단백질 A 친

화성 크로마토그래피에 의해 gp120-R을 정제하고 1 × PBS 내로 투석하였다. 이어서, 2개의 모 mAb에 1 mg/mL에서 Fab 아암 교환을 적용하였다. 약술하면, 1 × PBS, 75 mM 2-메르kap토에틸아민을 함유하는 완충제 중에 5 mg의 각각의 모 항체를 혼합하고, 31°C에서 5 시간 동안 인큐베이션한 후, 1 × PBS에 대해 광범위하게 투석하였다. 이어서, 95% 초과 BsAb를 함유한 생성된 재료를 2개의 정제된 모 mAb와 1:1:1 몰비로 혼합하고, 혼합물을 차등 단백질 A 정제 실험에 사용하였다.

- [0599] 1 mL의 mAbSelect Sure 컬럼(GE Healthcare)을 사용하여 차등 단백질 A 정제를 실행하였다. 50 mM 시트레이트를 함유하는 완충제 pH 4.7, pH 4.2, 또는 pH 3.4를 사용하여 3 단계로 혼합물을 용출시켰다. 용출 분획을 수집하고, 분석 전에 1 mg/mL 초과로 농축하였다.
- [0600] 차등 단백질 A 정제로부터의 용출 피크의 분석은 부틸 NPR 컬럼(Tosoh Biosciences)을 사용하는 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)에 의해 분석하였다. 대략 30 ug의 각각의 샘플을 컬럼 상에 주입하고, 100 mM 인산나트륨 pH 6.0, 1.5 M (NH₄)₂SO₄, 또는 100 mM 인산나트륨 pH 6.0을 함유하는 완충제의 0 내지 100% 구배를 사용하여 용출시켰다.
- [0601] **실시예 6. 단백질 A 수지로부터의 용출에 의한 조 상청액 내의 시험관내 Fab 아암 교환 후 모 단일특이성 mAb로부터의 이중특이성 항체의 분리**
- [0602] 상청액내 교환된 재료로부터 생성된 이중특이성 항체 내로의 비대칭 Q311R 또는 T307P/L309Q/Q311R의 도입은 생성된 이중특이성 항체의 모 항체로부터의 정제를 용이하게 하였다.
- [0603] 이중특이성 항체를 생성하기 위한 Duobody[®] 기술은 Fab 아암 교환 전에 모 mAb가 개별적으로 정제될 것을 필요로 한다. 그러나, cFAE 반응은 종종 2가 모 mAb의 잔류량을 가지며, 이는 추가의 하류 폴리싱 단계에 대한 필요성으로 이어질 수 있다. 따라서, pH 구배를 사용하는 차등 단백질 A 크로마토그래피의 사용은 이중특이성 항체의 정제를 단순화할 수 있다. 정제 단계의 갯수를 감소시키는 다른 방법은 배양 상청액을 사용하여 Fab 아암 교환 프로토콜을 수행하는 것이다. 이 방법에서는, 모 mAb가 1:1 몰비로 혼합되도록 모 mAb 역가를 정밀하게 결정한다. 배양 상청액과의 제어된 Fab 아암 교환을 수행함으로써, 하나가 적은 단백질 A 정제 단계, 및 2개의 모 항체 정제 및 특성화를 실행하지 않아도 되는 시간 절약이 있으므로, 이중특이성 항체를 생성하는 단계의 비용이 감소될 수 있다.
- [0604] 균등한 양의 모 항체 RSV-L[TLQ] 및 gp120-R을 함유하는 세포 배양 상청액에서 Fab 아암 교환을 사용하여 bsRSV-L[TLQ] 및 bsFSV-L[Q311R]을 생성하고, 생성된 샘플에 단백질 A 친화성 컬럼을 적용하였다.
- [0605] **도 5a**는 pH 4.7, 4.2, 및 3.4에서 용출되는 3개의 별개의 피크를 나타내는, 상청액내 Fab 아암 교환된 bsRSV-L[TLQ]의 샘플의 단백질 A 크로마토그램을 나타낸다.
- [0606] **도 5b**는 상청액내 Fab 아암 교환된 bsRSV-L[TLQ]로부터의 샘플의 단백질 A 친화성 컬럼 pH 4.7 용출액의 HIC 분석을 나타낸다.
- [0607] **도 5c**는 상청액내 Fab 아암 교환된 bsRSV-L[TLQ]로부터의 샘플의 단백질 A 친화성 컬럼 pH 4.2 용출액의 HIC 분석을 나타낸다.
- [0608] **도 5d**는 상청액내 Fab 아암 교환된 bsRSV-L[TLQ]로부터의 샘플의 단백질 A 친화성 컬럼 pH 3.4 용출액의 HIC 분석을 나타낸다.
- [0609] **도 6a**는 pH 4.7, 4.2, 및 3.4에서 용출되는 3개의 별개의 피크를 나타내는, 상청액내 Fab 아암 교환된 bsRSV-L[Q311R]의 샘플의 단백질 A 크로마토그램을 나타낸다.
- [0610] **도 6b**는 상청액내 Fab 아암 교환된 bsRSV-L[Q311R]로부터의 샘플의 단백질 A 친화성 컬럼 pH 4.7 용출액의 HIC 분석을 나타낸다.
- [0611] **도 6c**는 상청액내 Fab 아암 교환된 bsRSV-L[Q311R]로부터의 샘플의 단백질 A 친화성 컬럼 pH 4.2 용출액의 HIC 분석을 나타낸다.
- [0612] **도 6d**는 상청액내 Fab 아암 교환된 bsRSV-L[Q311R]로부터의 샘플의 단백질 A 친화성 컬럼 pH 3.4 용출액의 HIC 분석을 나타낸다.
- [0613] bsRSV-L[TLQ]를 생성하는 상청액내 Fab 아암 교환의 경우, 잔류하는 모 RSV-L[TLQ]는 pH 4.7에서의 용출에 의해 제거하였고(**도 5b**), 잔류하는 모 gp120-R은 pH 3.4에서의 용출에 의해 제거하였다(**도 5d**). 단독으로 bsRSV-

L[TLQ]가 pH 4.2에서 용출되었다(도 5c). 일부 bsRSV-L[TLQ]는 pH 3.4(도 5d) 및 pH 4.7(도 5b)에서 용출되었으며, 이는 정제된 bsRSV-L[TLQ]의 감소된 최종 수율을 유발하였다. 표 13은 상청액내 Fab 아암 교환으로 생성한 bsRSV-L[TLQ]의 차등 단백질 A 정제로부터의 용출액의 순도를 나타낸다. bsRSV-L[TLQ]는 95% 초과 순도로 분리되었다.

[0614] [표 13]

용출 pH	% RSV-L[TLQ]	% bsRSV-L[TLQ]	% gp120-R
4.7	21.4	78.6	N.D.
4.2	N.D.	> 99	N.D.
3.4	N.D.	21.2	78.8

*N.D. = 검출되지 않음

[0615]

[0616] bsRSV-L[Q311R]을 생성하는 상청액내 Fab 아암 교환의 경우, 잔류하는 모 RSV-L[Q311R]은 pH 4.6에서의 용출에 의해 제거하였고(도 6b), 잔류하는 모 gp120-R은 pH 3.4에서의 용출에 의해 제거하였다(도 6d). 모 RSV-L[Q311R]의 효율적인 용출은 삼중 돌연변이체 T307P/L309Q/Q311R보다 더 강하게 단백질 A에 결합하는 단일 돌연변이로 인해 약간 더 산성인 pH를 필요로 하였다. 단독으로 BsAb가 pH 4.2에서 용출되었다(도 6c). 일부 bsRSV-L[Q311R]은 pH 3.4(도 6d) 및 pH 4.6(도 6b)에서 용출되었으며, 이는 정제된 BsAb의 감소된 최종 수율을 유발하였다.

[0617] 표 14는 상청액내 Fab 아암 교환으로 생성한 bsRSV-L[Q311R]의 차등 단백질 A 정제로부터의 용출액의 순도를 나타낸다. bsRSV-L[Q311R]은 95% 초과 순도로 정제되었다.

[0618] [표 14]

용출 pH	% RSV-L[Q311R]	% bsRSV-L[Q311R]	% gp120-R
4.6	14.5	85.5	N.D.
4.2	N.D.	> 99	N.D.
3.4	N.D.	17.1	82.9

*N.D. = 검출되지 않음

[0619]

[0620] 결론적으로, 이 실험은 상청액내 Fab 아암 교환에 의해 생성된 이중특이성 항체의 효율적인 분리를 위한 Q311R 및 T307P/L309Q/Q311R 돌연변이의 유용성을 입증하였다.

[0621] 방법

[0622] 모 mAb RSV-L[Q311R] 또는 RSV-L[TLQ] 및 gp120-R을 Expi293 세포에서 발현시키고 항체 역가를 결정하였다 (Octet, ForteBio). 이중특이성 항체 bsRSV-L[Q311R] 및 bsRSV-L[TLQ]를 생성하기 위하여, 균등한 밀리그램 양의 RSV-L[Q311R] 및 gp120-R 또는 RSV-L[TLQ] 및 gp120-R을 함유하는 배양 상청액을 합하고, 2-메르캅토에틸 아민을 75 mM의 최종 농도로 첨가한 후에 31°C에서 5 시간 동안 인큐베이션하고 1X DPBS pH 7.4 내로 광범위하게 투석함으로써(문헌[Labrijn Aran F, Meesters Joyce I et al. 2014]) 0.2 mg/mL의 최종 단백질 농도에서 Fab 아암 교환 반응을 수행하였다. 투석 후에 단백질을 1 mL의 mAbSelect Sure 컬럼(GE)에 적용하고, pH 단계 구배를 사용하여 용출시켰다.

[0623] 정제 전에, 균등한 1 mg 양의 정제된 모 mAb 및 이중특이성 항체를 함유하는 대조 혼합물을 1 mL의 mAbSelect Sure 컬럼(GE) 상에서 분리하여 최적의 용출 조건을 결정하였다. RSV-L[Q311R], gp120-R, 및 bsRSV-L[Q311R]을 함유하는 정제된 단백질 믹스는, 30 컬럼 부피(CV) 동안 50 mM 시트레이트 pH 4.6에 이어서 30 CV 동안 50 mM 시트레이트 pH 4.2에 이어서 20 CV 동안 50 mM 시트레이트 pH 3.4로 용출시키는 단계에 의해, BsAb로부터의 모 mAb의 최적의 분리를 나타냈다. RSV-L[TLQ], gp120-R, 및 bsRSV-L[TLQ]를 함유하는 정제된 단백질 믹스는, 30 CV 동안 50 mM 시트레이트 pH 4.7에 이어서 30 CV 동안 50 mM 시트레이트 pH 4.2에 이어서 20 CV 동안 50 mM 시트레이트 pH 3.4로 용출시키는 단계에 의해, 이중특이성 mAb로부터의 모 mAb의 최적의 분리를 나타냈다.

[0624] 따라서, 상청액내 교차된 모 mAb로부터 생성된 bsRSV-L[Q311R]은 후속 실험에서 30 CV 동안 50 mM 시트레이트 pH 4.6에 이어서 30 CV 동안 50 mM 시트레이트 pH 4.2에 이어서 20 CV 동안 50 mM 시트레이트 pH 3.4로 용출시켰다. 상청액내 교차된 모 mAb로부터 생성된 bsRSV-L[TLQ]는 후속 실험에서 30 CV 동안 50 mM 시트레이트 pH 4.7에 이어서 30 CV 동안 50 mM 시트레이트 pH 4.2에 이어서 20 CV 동안 50 mM 시트레이트 pH 3.4로 용출시켰다.

다. 각각의 이중특이성 항체 쌍에 대한 최적의 용출 조건을 후속 실험에서 사용하였다.

[0625] 소수성 상호작용 크로마토그래피를 사용하여 분리 효율을 평가하였다. 각각의 pH 단계로부터의 용출 분획을 혼합하고, 트리스 pH 7.5로 중화시키고, 분석을 위해 농축하였다. 균등한 단백질 농도로 샘플을 제조하고, 결합 완충제(0.1 M NaHPO₄ pH 6.5, 1.5 M (NH₄)₂SO₄) 중에 1:2로 희석하고, 0.1 M NaHPO₄ pH 6.5, 1.5 M (NH₄)₂SO₄ 중에 평형화된 4.6 mm × 10 cm TSKgel Butyl-NPR 컬럼(Tosoh Bioscience, LLC)에 적용하고, 25 분에 걸쳐 0.1 M NaHPO₄ pH 6.5까지의 구배를 사용하여 0.5 mL/분으로 용출시켰다.

[0626] **실시예 7. 공동-형질감염된 재료로부터 시작하는 시험관내 Fab 아암 교환 후 모 단일특이성 mAb로부터의 이중 특이성 항체의 분리**

[0627] Fab 아암 교환 대신에 공통 경쇄 기술을 이용하여 생성된 이중특이성 항체를 정제하기 위해 Q311R 또는 T307P/L309Q/Q311R 돌연변이를 이용하는 것의 적용가능성을 평가하였다.

[0628] 생성된 이중특이성 항체 bsTNF-[TLQ] 및 bsTNF-[Q311R]을 이전 실시예에 기재된 3 pH 단계 용출 방법을 사용하여 95% 초과 순도로 분리하였다. bsTNF-[TLQ] 및 bsTNF-[Q311R]을 pH 4.2에서 용출시켰다. 부가적으로, 모 TNF-[TLQ] 및 TNF-[Q311R]은 pH 4.7에서 효율적으로 용출되었으며, 다른 용출액에서는 mAb가 검출되지 않았다. pH 4.2 용출로부터 분리된 bsTNF-[TLQ] 및 bsTNF-[Q311R]의 순도는 높았지만, 이중특이성 항체의 수율은 Fab 아암 교환을 사용하여 생성된 이중특이성 항체에 비교할 때 약간 더 낮았으며, 이는 공동-형질감염될 때 2개의 모 mAb의 유의하게 상이한 발현 수준(TNF-[TLQ] 모에 대해 약 300 mg/L 대 aVb5에 대해 약 35 mg/L)에 기인한다. 모 mAb의 발현 수준의 약 10배 차이에도 불구하고, T307P/L309Q/Q311R 돌연변이의 도입은 95% 초과 순도의 bsTNF-[TLQ]의 분리를 용이하게 하였으며, 이는 초기 샘플에서 총 항체 집단의 단지 약 10%를 차지하였다. 표 15는 공통 경쇄 기술을 사용하여 생성된 bsTNF-[TLQ]의 차등 단백질 A 정제로부터의 용출액의 순도를 나타낸다. 표 16은 공통 경쇄 기술을 사용하여 생성된 i bsTNF-[Q311R]의 차등 단백질 A 정제로부터의 용출액의 순도를 나타낸다.

[0629] 도 7a는 pH 4.7, 4.2, 및 3.4에서 용출되는 3개의 별개의 피크를 나타내는 공통 경쇄 기술을 사용하여 생성된 bsTNF-[TLQ]의 샘플의 단백질 A 크로마토그램을 나타낸다.

[0630] 도 7b는 공통 경쇄 기술을 사용하여 생성된 bsTNF-[TLQ]의 샘플의 단백질 A 친화성 컬럼 pH 4.7 용출액의 HIC 분석을 나타낸다.

[0631] 도 7c는 공통 경쇄 기술을 사용하여 생성된 bsTNF-[TLQ]의 샘플의 단백질 A 친화성 컬럼 pH 4.2 용출액의 HIC 분석을 나타낸다.

[0632] 도 7d는 공통 경쇄 기술을 사용하여 생성된 bsTNF-[TLQ]의 샘플의 단백질 A 친화성 컬럼 pH 3.4 용출액의 HIC 분석을 나타낸다.

[0633] 공통 경쇄 기술을 사용하여 생성된 bsTNF-[Q311R]의 샘플로부터 유사한 크로마토그램을 얻었다.

[0634] [표 15]

용출 pH	% TNF-[TLQ]	% bsTNF-[TLQ]	% aVb5
4.7	2.9	89.6	7.4
4.2	1.3	96.8	1.9
3.4	N.D.	47.6	52.4

*N.D. = 검출되지 않음

[0635]

[0636] [표 16]

용출 pH	% TNF-[Q311R]	% bsTNF-[Q311R]	% aVb5
4.6	100(73.3)	N.D.	N.D.
4.2	1.9(0.3)	97.0(15.8)	1.1(0.18)
3.4	N.D.	51.4(5.3)	48.6(5.1)

*N.D. = 검출되지 않음

[0637]

[0638] **방법**

[0639] 모 항체 TNF-[Q311R], TNF-[TLQ], 및 aVb5(표 8 참조)를 실험에 사용하였다. 모 항-TNF 및 항-αVβV 항체는

공통 경쇄를 공유하므로, 경쇄를 잘못 짝지음으로써 생성될 수 있는 mAb 중을 최소화하기 위해 mAb를 실험에 사용하였다.

[0640] 제조사의 프로토콜에 따라 TNF-[Q311R] 또는 TNF-[TLQ] 중쇄 : aVb5 중쇄 : 경쇄에 대한 플라스미드의 0.5 : 0.5 : 3.0의 몰비를 사용하여, Expi293 세포에서 TNF-[Q311R] 및 aVb5 또는 TNF-[TLQ] 및 aVb5의 공동-형질감염을 실행하였다. 대략적인 상대적 발현 수준을 결정하기 위하여, 중쇄 : 경쇄 플라스미드의 1.0 : 3.0 몰비를 사용하여 모 mAb의 별도의 형질감염을 또한 수행하였으며, Octet를 사용하여 역가를 결정하였다. 대략 50 mL의 각각의 상청액을 1 mL의 mAbSelect Sure 컬럼에 적용하고, 50 mM 시트레이트 pH 4.7(또는 4.6), 4.2, 및 3.4의 3-단계 pH 단계 구배를 사용하여 용출시키고, 분획을 수집하고, 농축하고 HIC 분석 전에 1 × PBS로 완충제 교환하였다.

[0641] **실시예 8. Q311R 또는 T307P/L309Q/Q311R 돌연변이는 항체 혈청 반감기에 효과를 갖지 않는다.**

[0642] Tg32 반접합성 마우스를 사용하여 선택된 항체의 PK 특성을 연구하였다. 이들 실험에서, RSV-L은 반감기가 약 7 일이었다. Q311R 또는 T307P/L309Q/Q311R 돌연변이(항체 RSV-L[Q311R] 및 RSV-L[TLQ])를 보유하는 동종이량체 모 Ab 둘 모두는 적어도 야생형 mAb만큼 긴 반감기를 가졌다(각각 약 7 및 9 일). 돌연변이는 또한 이중특이성 항체 내에 비대칭적으로 도입될 때 혈청 반감기에 대한 효과를 거의 갖지 않았다. bsRSV-L[Q311R] 및 bsRSV-L[TLQ]는 각각 11/1 ± 3.6 및 4.8 ± 2.0 일의 혈청 반감기를 가졌다. RSV-L 혈청 반감기는 7.0 ± 3.9 일이었고, RSV-L[TLQ] 반감기는 9.0 ± 4.0 일이었으며, RSV-L[Q311R] 혈청 반감기는 6.7 ± 3.4 일이었다. I253D 돌연변이체 Ab는 FcRn에 결합하지 않으며 실험에서 대조군으로 사용되었다.

[0643] **도 8**은 선택된 변이체의 약동학적 분석의 결과를 나타낸다. 이들 결과는 시험관내 FcRn 결합 분석(**실시예 3**)과 일치한다. 실험 결과는, 다양한 기술을 사용하여 생성된 이중특이성 항체 내에 비대칭적으로 도입된 Q311R 또는 T307P/L309Q/Q311R 돌연변이가 이들의 정상적 혈청 반감기를 유지하는 항체를 유발하고 오염성 모 단일특이성 항체로부터의 이중특이성 항체의 차등 단백질 A 친화성 정제를 가능하게 한다는 것을 입증한다.

[0644] **방법**

[0645] Tg32 반접합성 마우스(Jackson Laboratories 재고 번호 014565)를 항체 약동학적(PK) 연구에 사용하였다. 이들 마우스는 FcRn의 인간 α-마이크로글로불린 서브유닛에 대해 유전자도입되므로 인간에서의 혈청 반감기를 예측하는 것을 돕는다. (문헌[Petkova *et al.*, *Int Immunol* 18:1759-1769, 2006]). 군당 4 마리의 동물로 마우스에 2 mg/kg의 용량으로 꼬리 정맥을 통해 시험 Ab를 정맥내 주입하였다. 1 시간, 1 일, 3 일, 7 일, 14 일, 및 21 일에 시점을 취하였다. 표시된 시점에 CO₂-마취된 마우스로부터 일련의 후안와 채혈이 얻어졌고, 최종 채혈은 심장 천자에 의해 얻어졌다. 실온에서 30 분 후에, 혈액 샘플을 3,000 × g로 15 분 동안 원심분리하고, 분석을 위해 혈청을 수집하였다.

[0646] 마우스 혈청 중의 시험 Ab의 검출을 위해, 전기화학발광 면역검정을 사용하였다. 스트렙타비딘 골드 다중-어레이 96-웰 플레이트(Meso Scale Discovery)를 50 μL/웰의 Starting Block(Thermo) 중의 3 μg/mL Fc 단편 특이적 비오틴-F(ab')₂ 단편 g 항-h IgG(Jackson ImmunoResearch 카탈로그 번호 109-066-008)로 밤새 코팅한 후; Tween 20을 갖는 트리스-완충 식염수(TBST)에 세척하였다. Starting Block 중의 5% CD-1 마우스 혈청에 혈청 샘플을 희석하고(1:20, 이어서 연속 2배 희석), 2 시간 동안 플레이트 상에서 인큐베이션하고 세척하였다. 1% BSA-TBST 중의 RU⁺⁺ 표시 항-h IgG F(ab')₂(Jackson 109-006-097로부터 제조됨)를 첨가하고, 1.5 시간 동안 플레이트 상에서 인큐베이션하고 세척하였다. 계면활성제를 갖는 판독 완충제 200 마이크로리터/웰을 첨가하고 MSD Sector Imager 6000 플레이트 판독기에서 플레이트를 판독하였다. Prism 6.01 소프트웨어에서 4-파라미터 비선형 회귀 프로그램을 사용하여 표준 곡선으로부터 IgG2b Ab의 혈청 농도를 결정하였다.

[0647] Prism 버전 6.01 소프트웨어를 사용하여 자연 로그 농도 대 시간의 비선형 회귀에 의해 적합된 1-단계 지수 감소 모델을 사용하여 PK 연구를 위한 제거 단계(β 단계)의 최종 반감기(t_{1/2}) 계산을 결정하였다. 적합된 농도의 역수에 의해 최소 제곱 비선형 감소 모델에 가중치를 주었다. 제거 단계(β 단계)의 반감기 계산은 수학적 t_{1/2} = ln2/β를 사용하여 결정하였으며, 여기서 β는 최초 용량 후에 시작하여 최소 제곱 회귀 분석에 의해 적합된 선의 -기울기이다. Ab에 대한 최종 반감기 값은 시험군 내의 각각의 동물에 대해 계산된 t_{1/2} 값의 평균을 취함으로써 결정하였다.

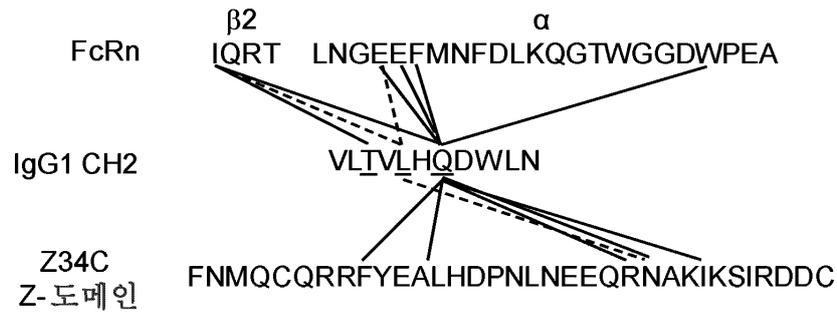
도면

도면1a

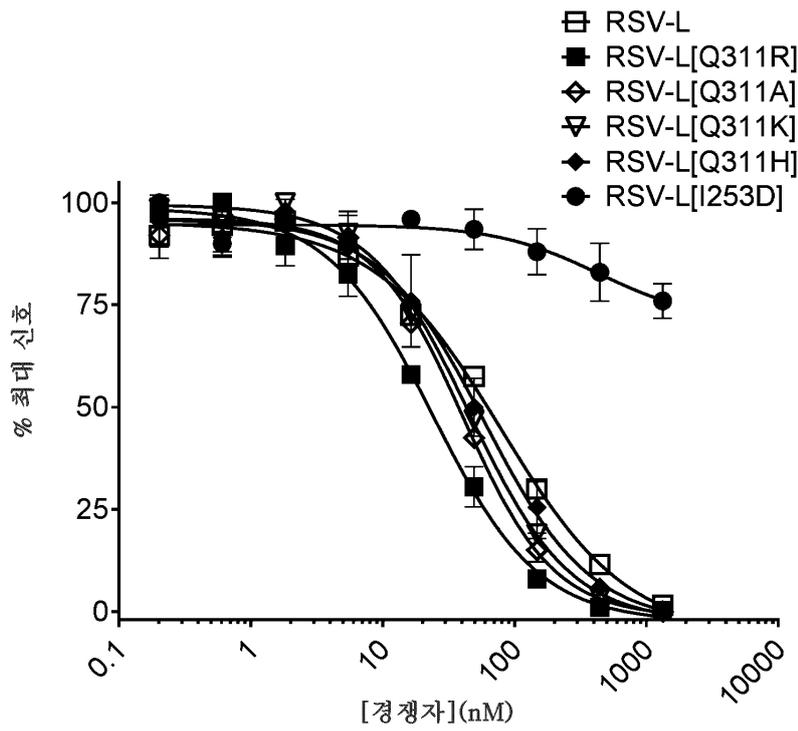
인간 IgG1 CH2 VLTVLHQDWLN (서열 번호 104)

마우스 IgG2a, CH2 ALPIQHQDWMS (서열 번호 105)

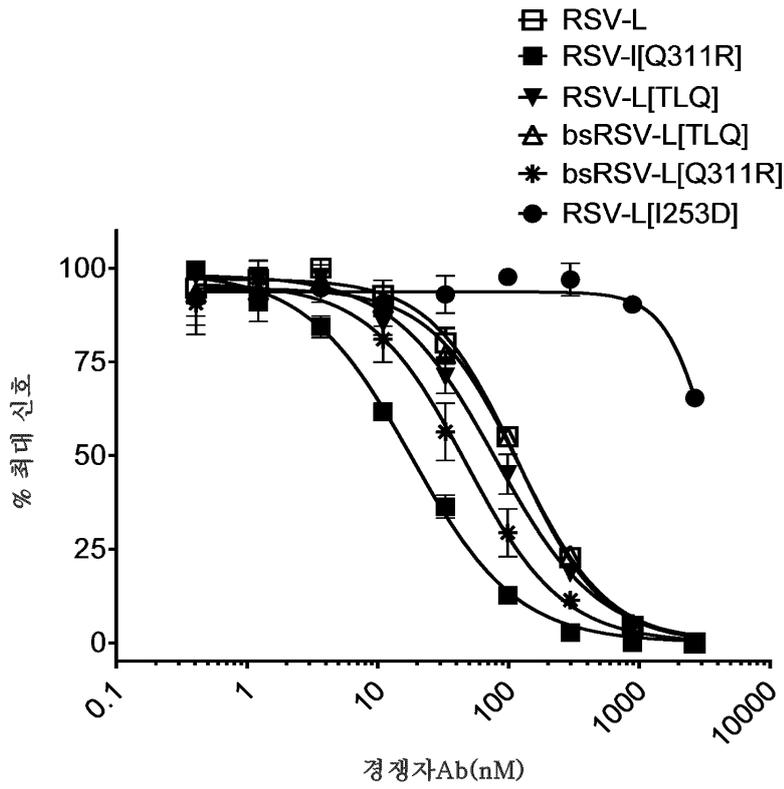
도면1b



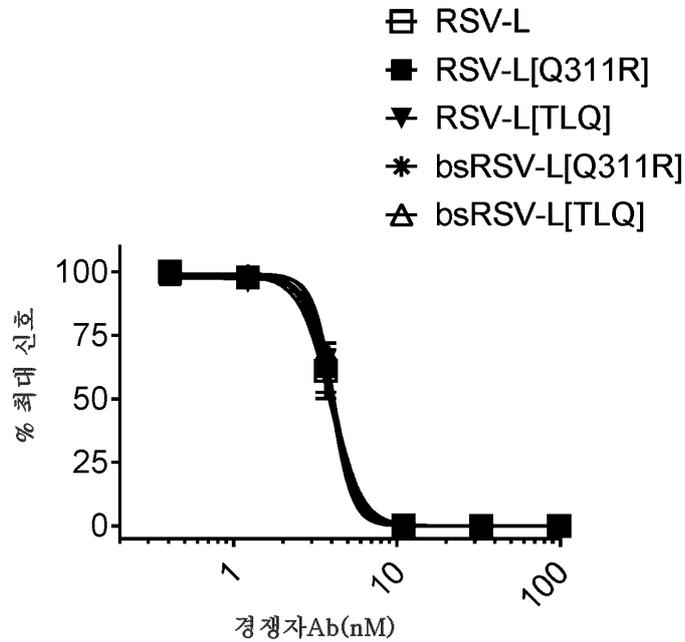
도면2a



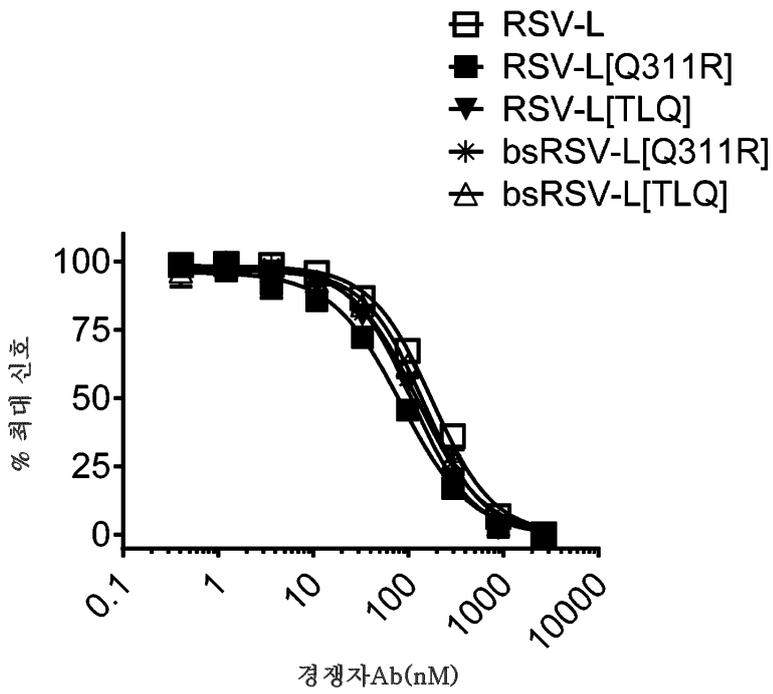
도면2b



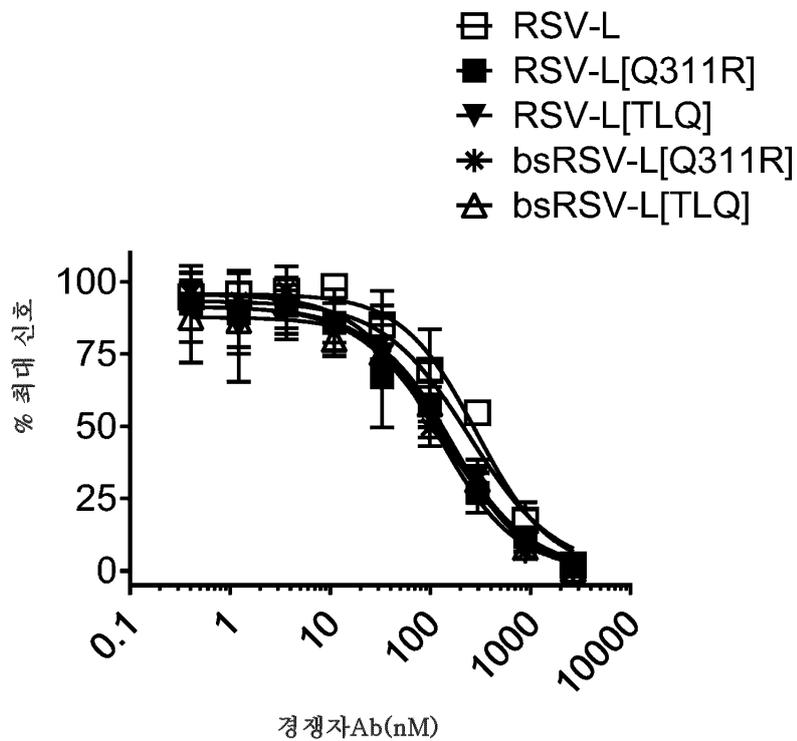
도면3a



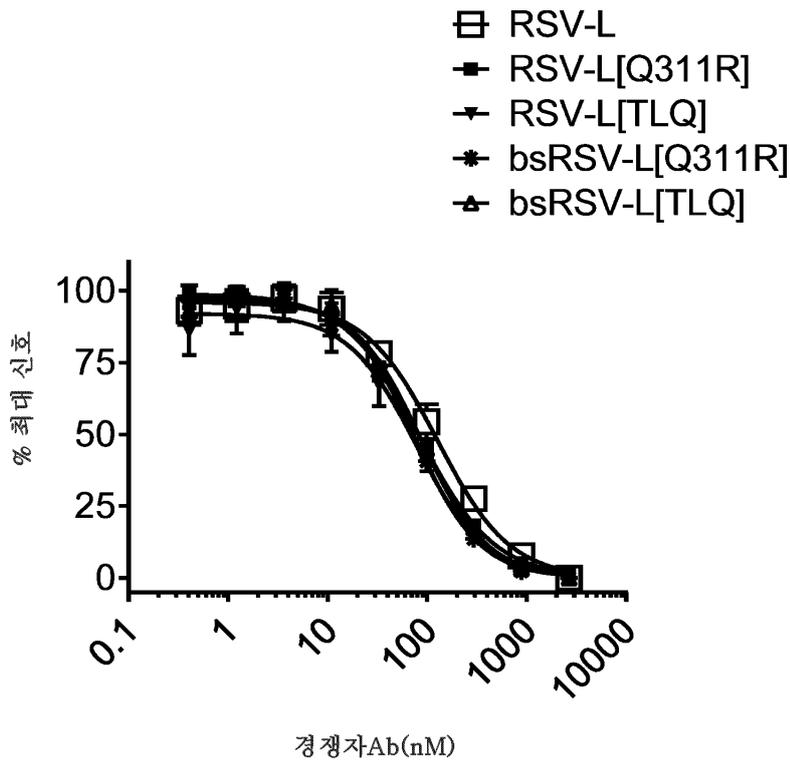
도면3b



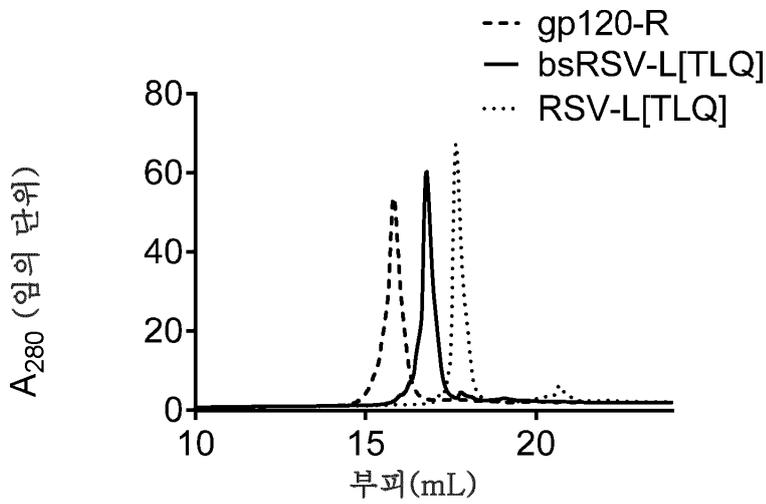
도면3c



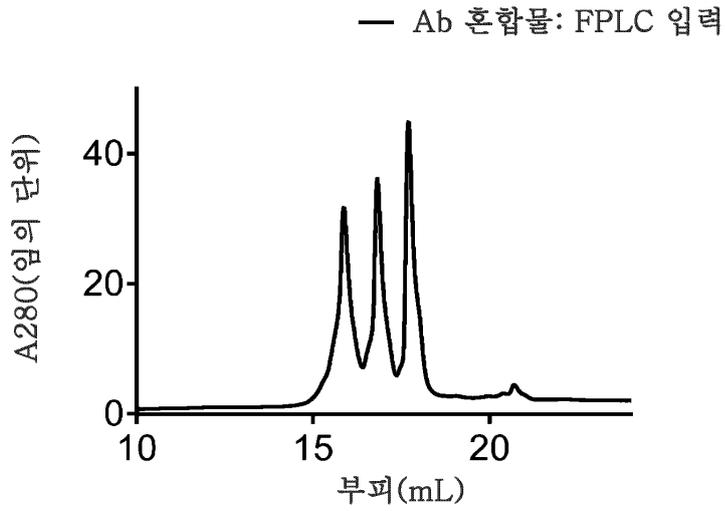
도면3d



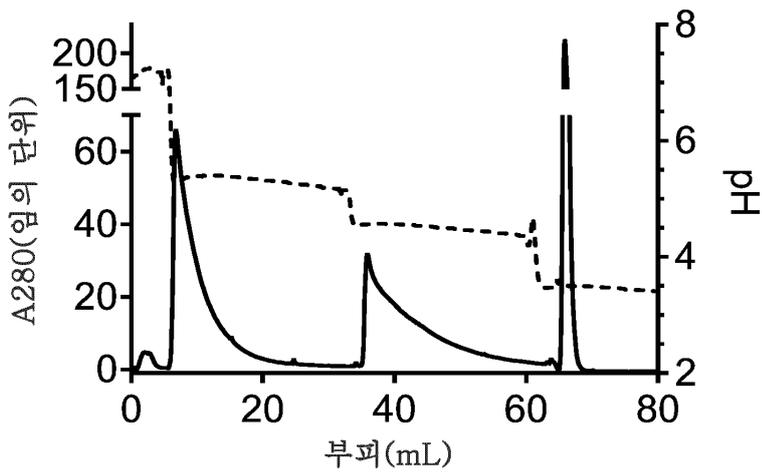
도면4a



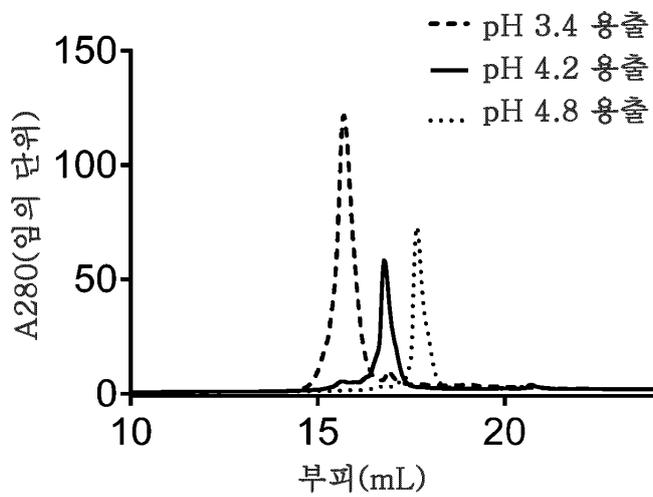
도면4b



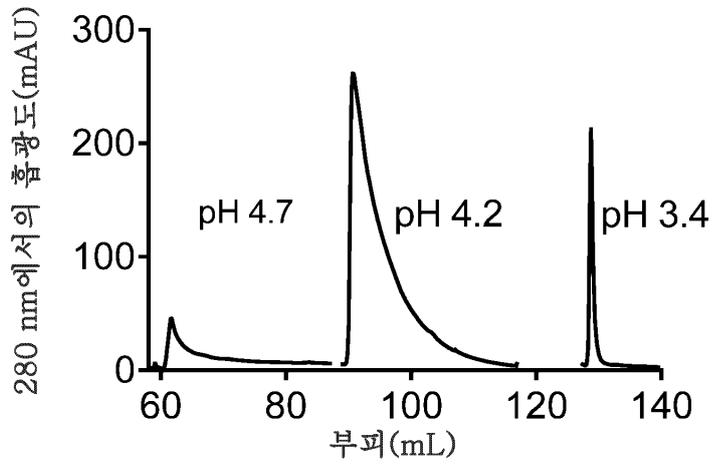
도면4c



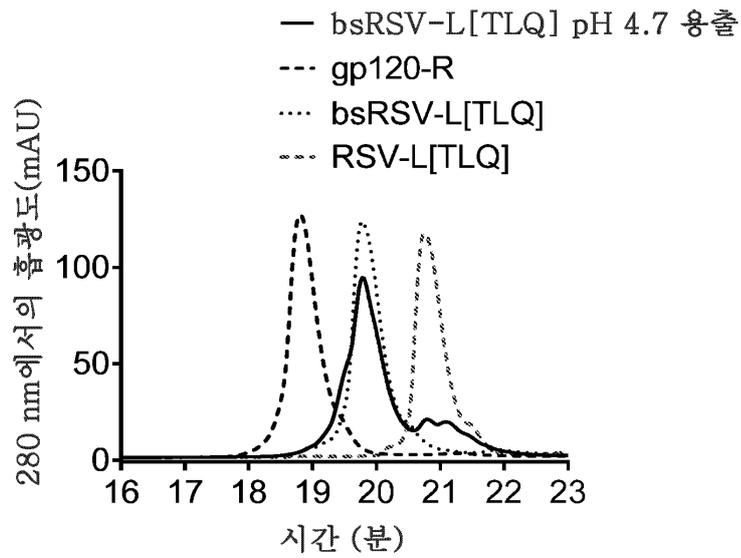
도면4d



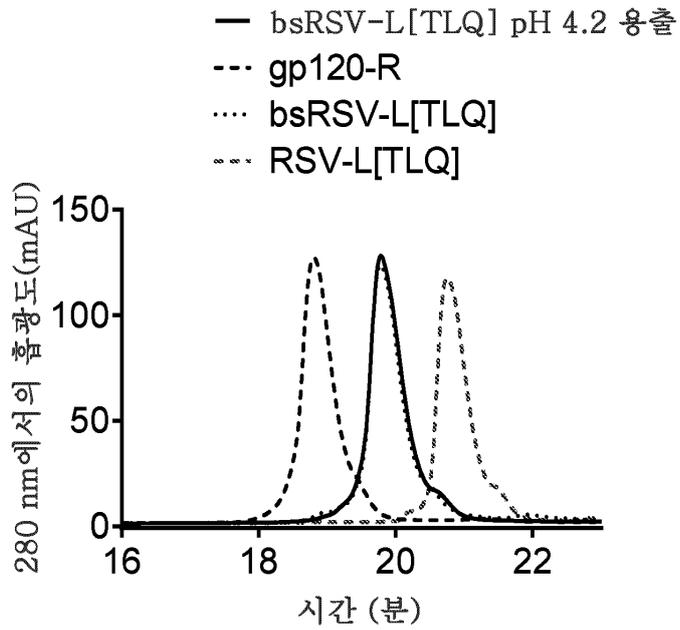
도면5a



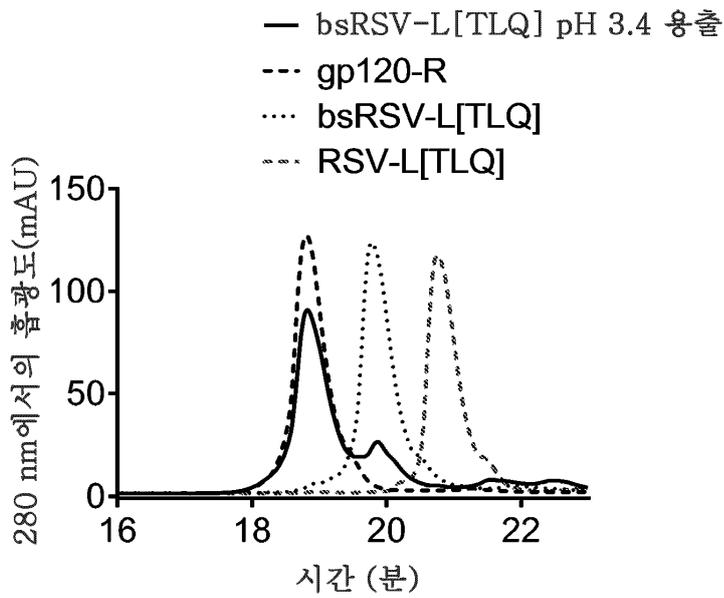
도면5b



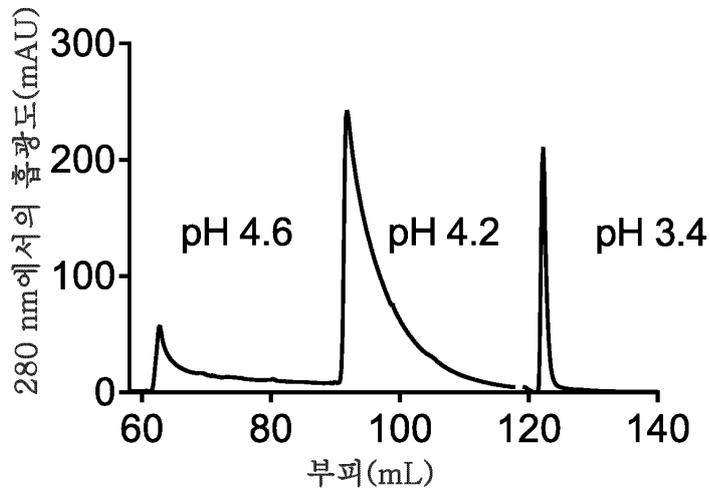
도면5c



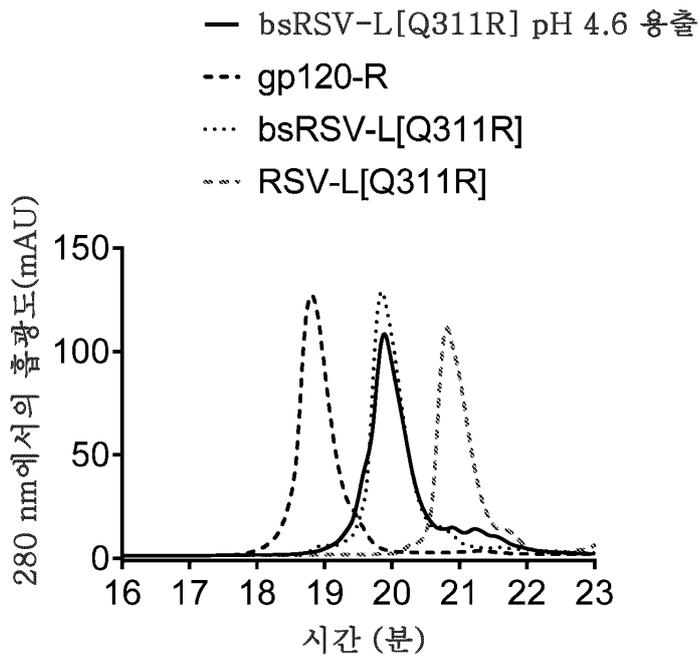
도면5d



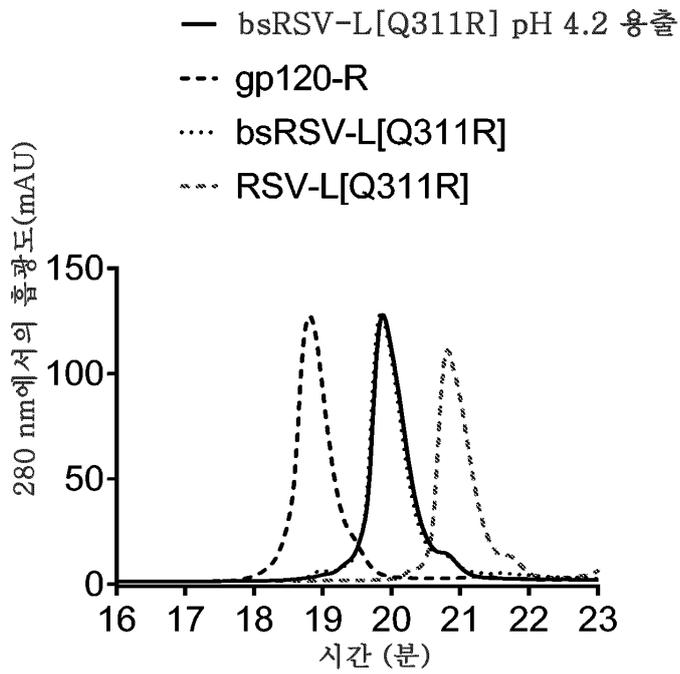
도면6a



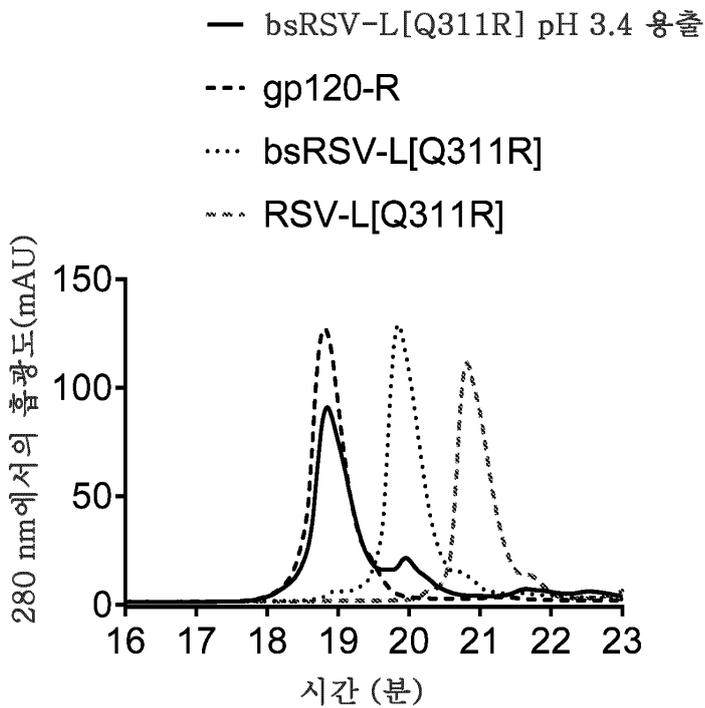
도면6b



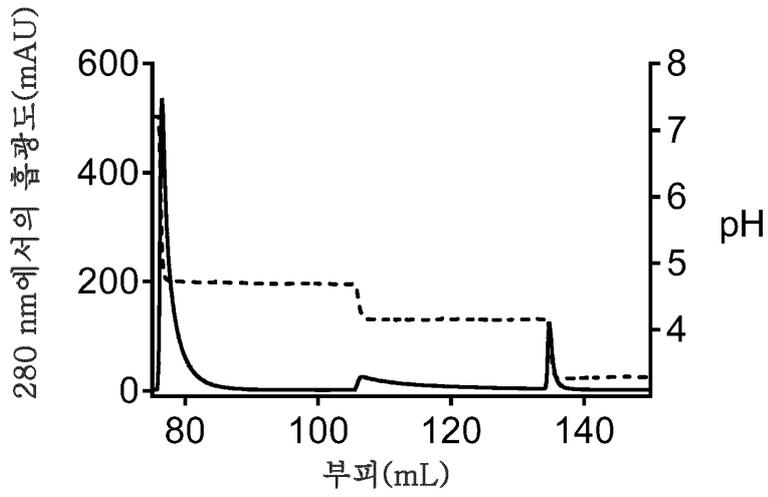
도면6c



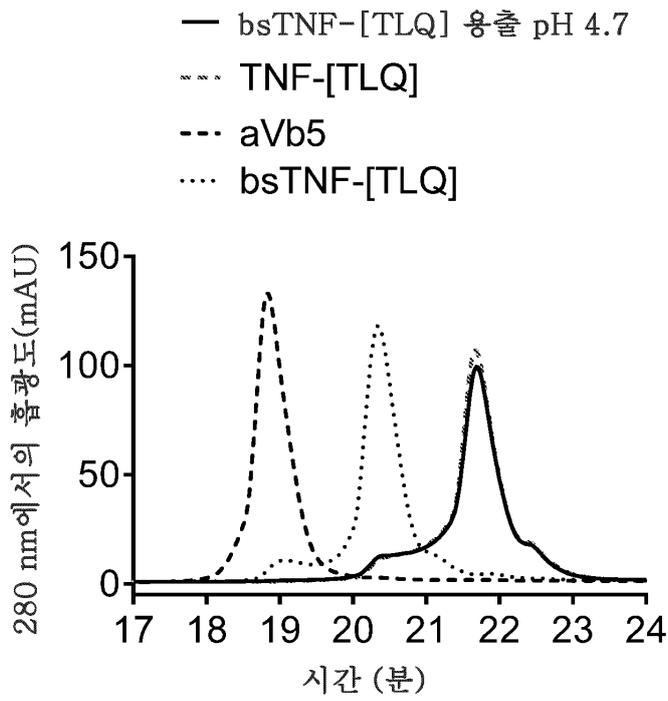
도면6d



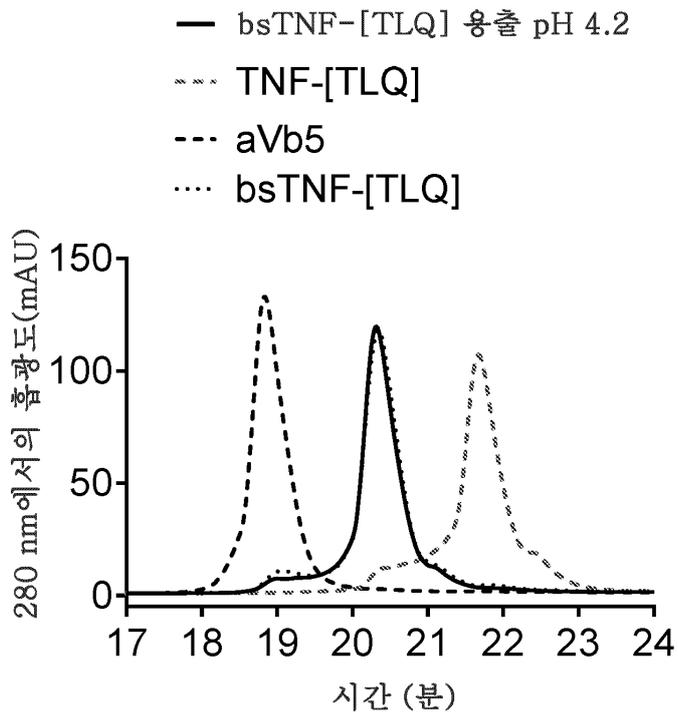
도면7a



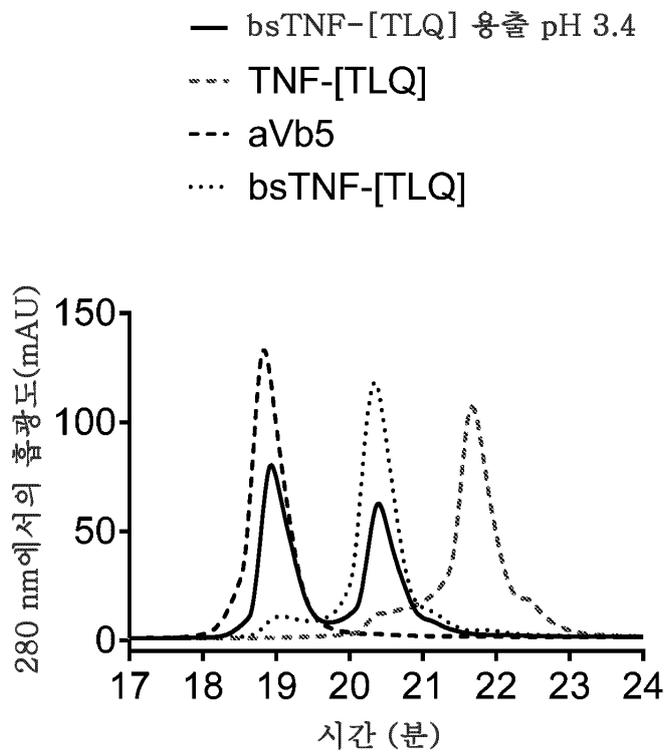
도면7b



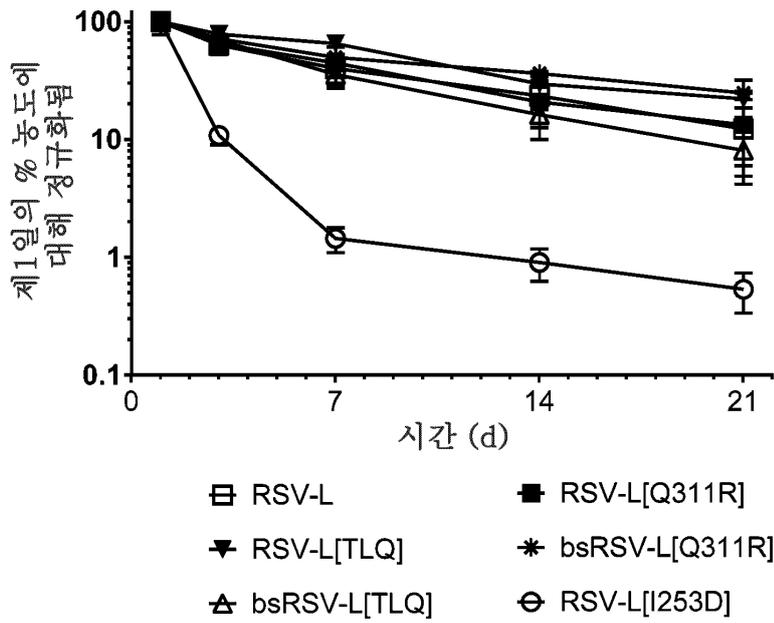
도면7c



도면7d



도면8



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Chiu, Mark
 Zwolak, Adam

<120> Engineered multispecific antibodies and other multimeric proteins
 with asymmetrical CH2-CH3 region mutations

<130> JBI5124WOPCT

<140> To Be Assigned

<141> 2018-06-04

<150> 62/515316

<151> 2017-06-05

<160> 105

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Z domain

<400> 1

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15
 Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
 20 25 30
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 2

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 HC2-HC3 Q311K

<400> 2

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Lys
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190

 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 3
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> IgG1 HC2-HC3 Q311R
 <400> 3
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30

 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95

 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 4

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> I IgG1 HC2-HC3 T307P/L309Q

<400> 4

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

50 55 60

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Gln
 65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr

115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

130 135 140

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

165 170 175

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

180 185 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210 215

<210> 5

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 HC2-HC3 T307P/L309Q/Q311R

<400> 5

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

50 55 60

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Arg

65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Gln
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 9

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 HC2-HC3 T307P/L309Q/Q311R/F405L

<400> 9

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45

 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Arg
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110

 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr
 165 170 175

 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 10
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> IgG1 HC2-HC3 Q311K/K409R
 <400> 10

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

50 55 60

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Lys

65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr

115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

130 135 140

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

165 170 175

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

180 185 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210 215

<210> 11

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 HC2-HC3 Q311R/K409R

<400> 11

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

 20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

 35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

 50 55 60

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg

65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

 85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

 100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr

 115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

 130 135 140

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

 165 170 175

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

 180 185 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

 195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

 210 215

<210> 12

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 HC2-HC3 T307P/L309Q/K409R

<400> 12

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

 20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

 35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

 50 55 60

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Gln

65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

 85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

 100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr

 115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

 130 135 140

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

 165 170 175

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

 180 185 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

 195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210 215

<210> 13

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 HC2-HC3 T307P/L309Q/Q311R/K409R

<400> 13

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

50 55 60

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Arg

65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr

115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

130 135 140

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

165 170 175

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

180 185 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 14

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 HC2-HC3 Q311K/ T366W

<400> 14

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Lys
 65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190

 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 16
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> IgG1 HC2-HC3 T307P/L309Q/ T366W
 <400> 16
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Gln
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 17

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 HC2-HC3 T307P/L309Q/Q311R/ T366W

<400> 17

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Arg
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 18
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> IgG1 HC2-HC3 Q311K/T366S/L368A/Y407V
 <400> 18

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Lys

65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 19
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> IgG1 HC2-HC3 Q311R/T366S/L368A/Y407V
 <400> 19
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30

 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg
 65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
 165 170 175

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 20

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 HC2-HC3 T307P/L309Q/ T366S/L368A/Y407V

<400> 20

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Gln
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr

 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 21
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> IgG1 HC2-HC3 T307P/L309Q/Q311R/ T366S/L368A/Y407V
 <400> 21
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15

 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 23

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 K409R

<400> 23

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 24
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IgG1 CH2-CH3 F405L

<400> 24

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr
 165 170 175

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 25

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 T366S/L368A/Y407V

<400> 25

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 26

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 T366W

<400> 26

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

195

200

205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210

215

<210> 27

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 Q311K

<400> 27

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 60
 atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 120
 gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 180
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcacaag 240
 gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 300

atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 360
 cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 420
 ttctatccca ggcacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggacagccgga gaacaactac 480
 aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 540
 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600
 ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 648

<210> 28

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 Q311R

<400> 28

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 60
 atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 120
 gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 180
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccgg 240
 gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 300
 atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 360

ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 420

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 480

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggtccttct tctctacag caagctcacc 540

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 648

<210> 29

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q

<400> 29

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 60

atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacct 120

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg 180

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcttccccgt ccagcaccag 240

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 300

atcgagaaaa ceatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 360

ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 420

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 480

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggtccttct tctctacag caagctcacc 540

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 648

<210> 30

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q311R

<400> 30

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 60

atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacct 120

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg 180

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctccccgt ccagcaccgg 240

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 300

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 360

ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 420

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 480

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 540

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 648

<210> 31

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 Q311K/F405L

<400> 31

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 60

atgatctccc ggaccctga ggtcacaatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 120

gaggtcaagt tcaactgcta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg 180

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcacaag 240

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 300

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 360

ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 420

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 480

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttcc tgctctacag caagctcacc 540

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 648

<210> 32

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 Q311R/F405L

<400> 32

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 60

atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 120

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg 180

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcacctg cctgcaccgg 240

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 300

atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 360

ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 420

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 480

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttcc tgctctacag caagctcacc 540

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 648

<210> 33

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/F405L

<400> 33

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 60

atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 120

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg 180

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctccccgt ccagcaccag 240

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 300

atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 360

ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 420

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 480

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttcc tgctctacag caagctcacc 540

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 648

<210> 34

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q311R/F405L

<400> 34

```

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc      60
atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct      120
gaggtcaagt tcaactggtg cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg      180
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctccccgt ccagcaccgg      240

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc      300
atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg      360
ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc      420
ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac      480
aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttcc tgctctacag caagctcacc      540
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct      600
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa      648
    
```

<210> 35

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 Q311K/K409R

<400> 35

```

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc      60
atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct      120
gaggtcaagt tcaactggtg cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg      180
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcacaag      240
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc      300
atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg      360

ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc      420
ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac      480
aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag ccggctcacc      540
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct      600
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa      648
    
```

<210> 36

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 Q311R/K409R

<400> 36

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttceccc caaaacccaa ggacaccctc 60

atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 120

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg 180

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccgg 240

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 300

atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 360

cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 420

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 480

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag ccggtcacc 540

gtggacaaga gcaggtgcca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 648

<210> 37

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/K409R

<400> 37

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttceccc caaaacccaa ggacaccctc 60

atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 120

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg 180

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctccccgt ccagcaccag 240

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 300

atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 360

cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 420

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 480

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag ccggtcacc 540

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 648

<210> 38

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q311R/K409R

<400> 38

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacacccctc 60

atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 120

gaggtcaagt tcaactgta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg 180

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctccccgt ccagcaccgg 240

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagcct cccagccccc 300

atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacacccctg 360

ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 420

ttctatccca gcgacatgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 480

aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag ccggtcacc 540

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 648

<210> 39

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 Q311K/ T366W

<400> 39

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacacccctc 60

atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 120

gaggtcaagt tcaactgta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg 180

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcacaag 240

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagcct cccagccccc 300

atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacacccctg 360

ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc 420
 ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 480
 aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 540
 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600
 ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 648

<210> 40

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 Q311R/T366W

<400> 40

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 60

atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 120
 gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg 180
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccgg 240
 gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 300
 atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 360
 cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc 420
 ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 480

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 540
 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600
 ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 648

<210> 41

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/ T366W

<400> 41

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 60
 atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 120
 gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg 180
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctccccgt ccagcaccag 240

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 300
 atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 360
 cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc 420
 ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 480
 aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 540
 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 648

<210> 42

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q311R/ T366W

<400> 42

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 60
 atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 120
 gaggtcaagt tcaactggtc cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 180
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctccccgt ccagcaccgg 240

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 300
 atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 360
 cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc 420
 ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 480
 aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 540
 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600
 ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 648

<210> 43

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 Q311K/T366S/L368A/Y407V

<400> 43

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 60
 atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 120

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 180
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcacaag 240
 gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 300

atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 360
 ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgagctgcgc cgtcaaaggc 420
 ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 480
 aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctcgtgag caagctcacc 540
 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600
 ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 648

<210> 44

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 Q311R/T366S/L368A/Y407V

<400> 44

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 60
 atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 120
 gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 180
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccgg 240
 gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 300
 atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 360

ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgagctgcgc cgtcaaaggc 420
 ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 480
 aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctcgtgag caagctcacc 540
 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600
 ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 648

<210> 45

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/ T366S/L368A/Y407V

<400>

> 45

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 60
 atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 120
 gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 180
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctccccgt ccagcaccag 240
 gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 300
 atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 360
 ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgagctgcgc cgtcaaaggc 420

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggagccgga gaacaactac 480
 aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctcgtgag caagctcacc 540
 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600
 ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 648

<210> 46

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q311R/ T366S/L368A/Y407V

<400> 46

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 60
 atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 120
 gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 180
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctccccgt ccagcaccgg 240
 gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 300
 atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 360
 ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgagctgcgc cgtcaaaggc 420
 ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggagccgga gaacaactac 480

aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctcgtgag caagctcacc 540
 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600
 ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 648

<210> 47

<211> 648

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 47

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 60

atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 120

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg 180

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 240

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 300

atcgagaaaa ccattctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 360

ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 420

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 480

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 540

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 648

<210> 48

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 K409R

<400> 48

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 60

atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 120

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg 180

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 240

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 300

atcgagaaaa ccattctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 360

ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 420

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 480

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag cggctcacc 540

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 648

<210> 49

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 F405L

<400> 49

```

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc      60
atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct      120
gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg      180
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tectcaccgt cctgcaccag      240
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagcct cccagcccc      300
atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg      360
cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc      420

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac      480
aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttcc tgctctacag caagctcacc      540
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct      600
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa                    648

```

<210> 50

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 T366S/L368A/Y407V

<400> 50

```

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc      60
atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct      120

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg      180
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tectcaccgt cctgcaccag      240
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagcct cccagcccc      300
atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg      360
cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgagctgagc cgtcaaaggc      420
ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac      480
aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tectcgtgag caagctcacc      540

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct      600

```

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 648

<210> 51

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 CH2-CH3 T366W

<400> 51

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc 60

atgatctccc ggaccctga ggtccatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacct 120

gaggtcaagt tcaactgta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 180

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcacctg cctgcaccag 240

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagcct cccagccccc 300

atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 360

cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc 420

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 480

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 540

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgagget 600

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 648

<210> 52

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG2 CH2-CH3 Q311R

<400> 52

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

1 5 10 15

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

 20 25 30

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

 35 40 45

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe

50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 50 55 60

Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Arg Asp
 65 70 75 80

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 85 90 95

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
 100 105 110

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 115 120 125

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 130 135 140

Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 145 150 155 160

Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 165 170 175

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 180 185 190

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 195 200 205

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 54
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 54

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 1 5 10 15

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 20 25 30

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 20 25 30
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 35 40 45
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 50 55 60
 Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp
 65 70 75 80

 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 85 90 95
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
 100 105 110
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 115 120 125
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 130 135 140

 Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 145 150 155 160
 Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser
 165 170 175
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 180 185 190
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 195 200 205

 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 56
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IgG4 CH2-CH3 T307P/V309Q
 <400> 56

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45

 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 85 90 95
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110

 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175

 Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210 215
 <210> 57
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220><223> 1FU1 linker

<400> 57

Ala Ser Leu Asp Thr Thr Ala Glu Asn Gln Ala Lys Asn Glu His Leu

1 5 10 15

Gln Lys Glu Asn Glu Arg Leu Leu Arg Asp Trp Asn Asp Val Gln Gly

 20 25 30

Arg Phe Glu Lys Gly Ser

 35

<210> 58

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1DC1(13AA)2 linker

<400> 58

Ala Ser Glu Lys Asn Lys Arg Ser Thr Pro Tyr Ile Glu Arg Ala Glu

1 5 10 15

Lys Asn Lys Arg Ser Thr Pro Tyr Ile Glu Arg Ala Gly Ser

 20 25 30

<210> 59

<211> 43

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1DC1(13AA)3 linker

<400> 59

Ala Ser Glu Lys Asn Lys Arg Ser Thr Pro Tyr Ile Glu Arg Ala Glu

1 5 10 15

Lys Asn Lys Arg Ser Thr Pro Tyr Ile Glu Arg Ala Glu Lys Asn Lys

 20 25 30

Arg Ser Thr Pro Tyr Ile Glu Arg Ala Gly Ser

 35 40

<210> 60

<211> 24

<212> PRT

<213>

Artificial sequence

<220><223> AS(AP)10GS linker

<400> 60

Ala Ser Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro

1 5 10 15

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Gly Ser

20

<210> 61

<211> 44

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> AS(AP)20GS linker

<400> 61

Ala Ser Ala Pro Ala Pro

1 5 10 15

Ala Pro Ala Pro

20 25 30

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Gly Ser

35 40

<210> 62

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> (EAAAK)4 linker

<400> 62

Ala Ser Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala

1 5 10 15

Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala Gly Ser

20 25

<210> 63

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> (EAAAK)₈ linker

<400> 63

Ala Ser Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala

1 5 10 15

Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala

 20 25 30

Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala Gly Ser

 35 40 45

<210> 64

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> GS(G4S)₄ linker

<400> 64

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser

 20

<210> 65

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> GS(G4S)₈ linker

<400> 65

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

 20 25 30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

 35 40

<210> 66

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> GS12X(G4S) linker

<400> 66

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25 30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

35 40 45

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

50 55 60

<210> 67

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> GS16X(G4S) linker

<400> 67

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25 30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

35 40 45

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

50 55 60

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

65 70 75 80

Gly Ser

<210> 68

<211> 457

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> gp120-R HC (K409R)

<400> 68

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn Phe
 20 25 30
 Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Phe Glu Trp Met
 35 40 45

 Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys Glu Phe Ser Ala Lys Phe
 50 55 60
 Gln Asp Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr
 100 105 110

 Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser Ala
 115 120 125
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 130 135 140
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 145 150 155 160
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 165 170 175

 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 180 185 190
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 195 200 205
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
 210 215 220

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> gp120-R LC

<400> 69

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Phe Ser Cys Arg Ser Ser His Ser Ile Arg Ser Arg

20 25 30

Arg Val Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val

35 40 45

Ile His Gly Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Gly Ala Ser Ser

85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Arg Lys Arg Thr Val Ala

100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser

115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu

130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser

145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu

165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val

180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys

195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215

<210> 70

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> anti-RSV-L HC (F405L)

<400> 70

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser

 20 25 30

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu

 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser

 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val

65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

 85 90 95

Cys Ala Arg Leu Tyr Gly Phe Thr Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 73
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> RSV-L[Q311K] HC (Q311K/ F405L)
 <400> 73

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Leu Tyr Gly Phe Thr Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Lys Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His His Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly Lys

450

<210> 77

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> RSV-L[TLQ] HC (T307P/L309Q/Q311R/F405L)

<400> 77

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val

65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Leu Tyr Gly Phe Thr Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly Lys

450

<210> 78

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> RSV-L[I253D] HC (I253D/F405L)

<400> 78

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Leu Tyr Gly Phe Thr Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Asp
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445
 Gly Lys

450

<210> 79

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> aVb5 HC

<400> 79

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15
 Ser Arg Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr

20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
 Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Gly Ser Val

50 55 60

305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

 435 440 445
 Lys

<210> 80

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> anti-TNF and anti-aVb5 LC

<400> 80

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro

85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala

100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser

115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu

130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser

145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu

165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val

180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys

195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 81

<211> 456

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TNF HC

<400> 81

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 355 360 365
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 82
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> TNF-[Q311R] HC
 <400> 82
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Leu Tyr

 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr

 130 135 140
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 145 150 155 160
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile

 195 200 205
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 210 215 220
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg

305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr

355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450 455

<210> 83

<211> 456

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TNF-[TLQ] HC (T307P/L309Q/Q311R)

<400> 83

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110

 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 130 135 140
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 145 150 155 160
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175

 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 195 200 205
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 210 215 220
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300

 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Arg
 305 310 315 320
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 355 360 365

 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430

 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 84
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220><223> TNF-knob[Q311R] HC (Q311R/T366W)

<400> 84

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly

100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr

130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro

145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val

165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser

180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile

195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val

210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

<213> Artificial sequence

<220><223> TNF-knob[TLQ] HC (T307P/L309Q/Q311R/T366W)

<400> 85

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr

 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val

 35 40 45

Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly

 100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr

130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro

145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val

 165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser

180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile

195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val

210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Arg
 305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 86

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> aVb5-hole HC (T366S/L368A/Y407V)

<400> 86

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Arg Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Gly Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Val Asn Ile Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Ala Arg Gly Ser Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

<210> 87

<211> 645

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG2 CH2-CH3 Q311R

<400> 87

```

ccacctgtgg caggaccgtc agtcttctc tccccccaa aaccaagga caccctcatg      60
atctcccga ccctgaggt cactgctgt gtggtggacg tgagccacga agaccccag      120
gtccagtta actggtactg ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg      180

gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccgggac      240
tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc      300
gagaaaacca tctccaaac caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc      360
ccatcccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc      420
taccacagcg acatgcctgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag      480
accacacctc ccatgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg      540
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg      600

cacaaccact acacgcagaa gagectctcc ctgtctccgg gtaaa                      645

```

<210> 88

<211> 645

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG2 CH2-CH3 T307P/V309Q/Q311R

<400> 88

```

ccacctgtgg caggaccgtc agtcttctc tccccccaa aaccaagga caccctcatg      60
atctcccga ccctgaggt cactgctgt gtggtggacg tgagccacga agaccccag      120
gtccagtta actggtactg ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg      180
gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg gtcagcgtcc tccccgttca gcaccgggac      240
tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc      300

gagaaaacca tctccaaac caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc      360
ccatcccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc      420
taccacagcg acatgcctgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag      480
accacacctc ccatgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg      540

```

gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 600
 cacaaccact acacgcagaa ggcctctcc ctgtctccgg gtaaa 645
 <210> 89
 <211> 645
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 89
 ccacctgtgg caggaccgtc agtcttctc tccccccaa aaccaagga caccctcatg 60
 atctcccga ccctgaggt cacgtgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccccgag 120
 gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg 180
 gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac 240
 tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc 300
 gagaaaacca tctccaaac caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 360
 ccatcccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggg caaagcttc 420
 taccccagcg acatgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 480
 accacacctc ccatgctgga ctccgacggc tcttcttcc tctacagca gtcaccgtg 540
 gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 600
 cacaaccact acacgcagaa ggcctctcc ctgtctccgg gtaaa 645

<210> 90
 <211> 645
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220><223> IgG2 F405L/K409R
 <400> 90
 ccacctgtgg caggaccgtc agtcttctc tccccccaa aaccaagga caccctcatg 60
 atctcccga ccctgaggt cacgtgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccccgag 120
 gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg 180
 gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac 240
 tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc 300
 gagaaaacca tctccaaac caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 360
 ccatcccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggg caaagcttc 420
 taccccagcg acatgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 480

accacacctc ccatgctgga ctccgacggc tccttctctgc tctacagccg gctcacctg 540

gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 600

cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaa 645

<210> 91

<211> 645

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG4 CH2-CH3 T307P/V309Q

<400> 91

ccacctgtgg caggaccgtc agtcttctc tccccccaa aaccaagga caccctcatg 60

atctcccga cccctgaggt cactgctg gtggtggacg tgagccacga agaccccag 120

gtccagtta actggtactg ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg 180

gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg gtcagcgtcc tccccgttca gcaccaggac 240

tggtgaacg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc 300

gagaaaacca tctccaaac caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 360

ccatcccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 420

tacccacg acatgcctgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 480

accacacctc ccatgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcacctg 540

gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 600

cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaa 645

<210> 92

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr

1 5 10

<210> 93

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu

1 5

<210> 94

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr

1 5 10

<210> 95

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Glu Ser Lys Tyr Gly

1 5

<210> 96

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 engineered hinge

<400> 96

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr

1 5 10

<210> 97

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser

1 5 10 15

Pro Ser

<210> 98

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu

1 5 10 15

Arg Glu Thr Lys Thr Pro

20

<210> 99

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> engineered Z domain

<400> 99

Phe Asn Met Gln Cys Gln Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp Pro

1 5 10 15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Lys Ile Lys Ser Ile Arg Asp

20

25

30

Asp Cys

<210> 100

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> engineered Z domain

<400> 100

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln

20

25

30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala

35

40

45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50

55

<210> 101

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> engineered Z domain

<400> 101

Phe Asn Met Gln Gln Gln Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp Pro

1

5

10

15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Lys Ile Lys Ser Ile Arg Asp

20

25

30

Asp

<210> 102

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Ile Gln Arg Thr

1

<210> 103

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Asp Phe Asp Leu Lys Gln Gly Thr Trp

1

5

10

15

Gly Gly Asp Trp Pro Glu Ala

20

<210> 104

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

1 5 10

<210> 105

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 105

Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser

1 5 10