



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년10월18일

(11) 등록번호 10-2590061

(24) 등록일자 2023년10월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/00 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/46* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/00 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7037345
 (22) 출원일자(국제) 2017년05월23일
 심사청구일자 2020년05월22일
 (85) 번역문제출일자 2018년12월21일
 (65) 공개번호 10-2019-0026684
 (43) 공개일자 2019년03월13일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2017/034087
 (87) 국제공개번호 WO 2017/205436
 국제공개일자 2017년11월30일
- (30) 우선권주장
 62/340,322 2016년05월23일 미국(US)
 62/443,451 2017년01월06일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 W02015168643 A2*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 모멘타 파머슈티컬스 인코포레이티드
 미국 뉴저지 08560 타이터스빌 토렌턴-하버턴 로드 1125
- (72) 발명자
 랜싱 조나단 씨.
 미국 매사추세츠주 01867 레딩 위번 스트리트 220
 보스웬스 카를로스 제이.
 미국 워싱턴주 02476 알링턴 브래들 스트리트 40
 에이퍼티. 7
 오르티즈 다니엘
 미국 매사추세츠주 02180 스톤햄 하이스트리트 15
- (74) 대리인
 장훈

전체 청구항 수 : 총 2 항

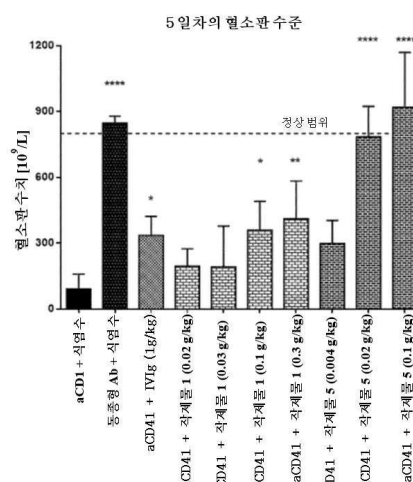
심사관 : 문영준

(54) 발명의 명칭 유전자 조작 Fc 작제물에 관한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 개시는 유전자 조작 IgG Fc 작제물의 조성물 및 방법에 관한 것이며, Fc 작제물은 하나 이상의 Fc 도메인을 포함한다.

대표도 - 도16



(52) CPC특허분류

C07K 16/46 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/53 (2013.01)

C07K 2317/60 (2013.01)

C07K 2317/94 (2013.01)

C07K 2319/30 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

Fc 작제물로서,

a) 식 A-L-B로 이루어진 제1 폴리펩타이드

- [i) A는 제1 Fc 도메인 단량체로 이루어지고,
- ii) L은 서열번호 51, 52, 53 또는 54로 이루어진 링커이며,
- iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체로 이루어짐];

b) 식 A'-L'-B'로 이루어진 제2 폴리펩타이드

- [i) A'는 제3 Fc 도메인 단량체로 이루어지고,
- ii) L'는 서열번호 51, 52, 53 또는 54로 이루어진 링커이며,
- iii) B'는 제4 Fc 도메인 단량체로 이루어짐];

c) 제5 Fc 도메인 단량체로 이루어진 제3 폴리펩타이드; 및

d) 제6 Fc 도메인 단량체로 이루어진 제4 폴리펩타이드로 이루어지되,

상기 제1 폴리펩타이드의 A와 상기 제2 폴리펩타이드의 A'는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 상기 제1 폴리펩타이드의 B와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 상기 제2 폴리펩타이드의 B'와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고;

상기 제1 Fc 도메인 단량체 및 상기 제3 Fc 도메인 단량체는 상기 제1 Fc 도메인 단량체와 상기 제3 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진시키는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고; 상기 제2 Fc 도메인 단량체 및 상기 제5 Fc 도메인 단량체는 상기 제2 Fc 도메인 단량체와 상기 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진시키는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고; 상기 제4 Fc 도메인 단량체 및 상기 제6 Fc 도메인 단량체는 상기 제4 Fc 도메인 단량체와 상기 제6 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진시키는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며;

상기 A, B, A', B', 제3 폴리펩타이드, 및 제4 폴리펩타이드는 각각 Fc 도메인 단량체를 포함하고, 각 Fc 도메인 단량체는 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하고;

상기 Fc 도메인 단량체의 적어도 하나는 S267E 돌연변이 및 L328F 돌연변이를 둘 다 포함하고, 이들 돌연변이는 함께 Fc γ RIIb 수용체에 대한 결합을 증가시키고;

상기 제1 및 제2 폴리펩타이드가 서열번호 45로 이루어지고, 상기 제3 및 제4 폴리펩타이드가 서열번호 46으로 이루어진 것인, Fc 작제물.

청구항 2

제1항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체가 S267E 돌연변이 및 L328F 돌연변이를 포함하고, 이들 돌연변이는 함께 Fc γ RIIb 수용체에 대한 결합을 증가시키는 것인, Fc 작제물.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2016년 5월 23일자로 출원되어 이전에 동시 계류 중인 미국 가출원 일련 번호 제62/340,322호 및/또는 2017년 1월 6일자로 출원되어 이전에 동시 계류 중인 미국 가출원 일련 번호 제62/443,451호의 우선권을 주장한다. 상기 출원의 개시 내용은 본원에 그 전문이 참조로서 포함된다.

배경 기술

[0003] 치료 단백질, 예컨대, 치료 항체 및 Fc-융합 단백질은 급속도로 면역 질환 및 염증성 질환이 있는 환자에게 임상적으로 중요한 약물군이 되었다.

발명의 내용

[0004] 본 개시는 생물학적 활성이 있는 Fc 도메인-함유 치료 작제물을 특징으로 한다. 이러한 작제물은 Fc 수용체에 대한 바람직한 혈청 반감기 및/또는 결합 친화도 및/또는 결합능을 가질 수 있다. 이들 작제물은 예컨대, 대상의 염증 감소, 대상의 자가항체의 제거 촉진, 대상의 항원 제시 억제, 대상의 면역 반응의 면역 복합체-기반 활성을 억제하는 것과 같은 면역 반응 억제, 및 대상의 면역 질환 및 염증성 질환(예컨대, 자가면역 질환) 치료에 유용하다. 본원에 기재된 Fc 작제물은 면역 세포의 현저한 자극없이 면역 질환 및 염증성 질환이 있는 환자를 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0005] 일반적으로, 본 개시는 2~10개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물, 예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물을 특징으로 하되, Fc 도메인 중 적어도 하나는 (i) 하나 이상의 Fc 수용체에 대한 결합 친화도, (ii) 효과기 기능, (iii) Fc 도메인 황산화 수준, (iv) 반감기, (v) 프로테아제 저항성, (vi) Fc 도메인 안정성, 및/또는 (vii) 열화에 대한 감수성 중 하나 이상을 변경하는 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 작제물은 2~10개의 Fc 도메인, 2~5개의 Fc 도메인, 2~4개의 Fc 도메인, 2~3개의 Fc 도메인, 3~5개의 Fc 도메인, 2~8개의 Fc 도메인, 또는 2~6개의 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 작제물은 5~10개의 Fc 도메인을 포함한다. 작제물은 2~6개(예컨대, 2, 3, 4, 5, 또는 6개)의 결합 폴리펩타이드, 적어도 하나의 Fc 도메인 단량체를 포함하는 각각의 폴리펩타이드를 포함할 수 있되, 작제물의 각각의 Fc 도메인 단량체는 작제물의 또 다른 단량체와 동일하거나 20개 이하의 아미노산(예컨대, 15개, 10개 이하의 아미노산), 예컨대, 20, 15, 10, 8, 7, 6, 5, 4, 3 또는 2개 이하의 아미노산이 상이하다. 본원에 기재된 Fc 작제물은 면역글로불린의 항원 결합 도메인을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, Fc 작제물(또는 Fc 작제물 내의 Fc 도메인)은 상이한 폴리펩타이드에 존재하는 Fc 도메인 단량체의 결합으로 전체적으로 또는 부분적으로 형성된다. 특정 구현예에서, Fc 작제물은 2개의 폴리펩타이드의 결합을 촉진하는 추가 도메인(예컨대, IgM 꼬리조각(tailpiece) 또는 IgA 꼬리조각)을 포함하지 않는다. 다른 구현예에서, 공유결합은 Fc 도메인을 형성하도록 접합하는 2개의 Fc 도메인 단량체 사이에서만 Fc 작제물에 존재한다. 다른 구현예에서, Fc 작제물은 Fc 도메인 사이에 공유결합을 포함하지 않는다. 또 다른 구현예에서, Fc 작제물은 Fc 작제물 중의 Fc 도메인 중 전부 또는 실질적으로 전부가 세포 표면 상의 Fc 수용체와 동시에 상호작용할 수 있도록 충분한 구조적 가요성을 제공한다. 일부 구현예에서, Fc 작제물은 링커(예컨대, 가요성 아미노산 스페이서)를 통해 접합된 적어도 2개의 Fc 도메인을 포함한다. 하나의 구현예에서, 도메인 단량체는 이량체화 선택성 모듈을 가진다는 점에서 야생형과 또는 서로간에 1차 서열이 상이하다.

- [0006] 본 개시의 Fc 작제물은 본원에 기재된 바와 같이, 2~10개의 Fc 도메인(예컨대, 2~8개의 Fc 도메인, 2~6개의 Fc 도메인, 2~4개의 Fc 도메인, 2~3개의 Fc 도메인, 3~5개의 Fc 도메인, 또는 5~10개의 Fc 도메인) 예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 Fc 도메인을 갖는 작제물을 갖는 Fc 작제물의 실질적으로 동질인(예컨대, 적어도 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동질인) 집단을 포함하는 약학 조성물일 수 있다. 따라서, Fc 작제물의 상당한 응집 또는 원치 않는 다량체화를 갖지 않는 약학 조성물이 제조될 수 있다.
- [0007] 하나의 양태에서, Fc 작제물은 2개의 Fc 도메인을 형성하는 3개의 폴리펩타이드를 포함한다. 제1 폴리펩타이드는 식 A-L-B를 갖되, A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고; L은 링커이며; B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 제2 폴리펩타이드는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하고, 제3 폴리펩타이드는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 본 양태에서, 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성한다. 유사하게, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성한다. 본 개시의 본 양태의 예시적인 Fc 작제물은 도 4 및 도 6에 예시된다.
- [0008] 특정 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 이들 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다. 다른 구현예에서, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 이들 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다.
- [0009] 특정 구현예에서, A, B, 제2 폴리펩타이드 및 제3 폴리펩타이드는 Fc 도메인 단량체로 이루어진다. 하나의 구현예에서, A, B, 제2 폴리펩타이드, 및 제3 폴리펩타이드 각각은 Fc 도메인 단량체로 이루어진다.
- [0010] 특정 구현예에서, Fc 작제물은 이중 모이어티, 예컨대 펩타이드, 예컨대 혈청 단백질을 결합시키는 펩타이드, 예컨대, 알부민-결합 펩타이드를 더 포함할 수 있다. 모이어티는 B의 N-말단 또는 카복시-말단 또는 제3 폴리펩타이드에, 예컨대 링커를 통해 접합될 수 있다.
- [0011] 특정 구현예에서, Fc 작제물은 IgG C_L 항체 불변 도메인 및 IgG C_{H1} 항체 불변 도메인을 더 포함한다. IgG C_{H1} 항체 불변 도메인은 A의 N-말단 또는 제2 폴리펩타이드에, 예컨대 링커를 통해 부착될 수 있다.
- [0012] 다른 구현예에서, Fc 작제물의 제2 및 제3 폴리펩타이드는 동일한 아미노산을 갖는다.
- [0013] 또 다른 양태에서, 본 개시는 3개의 Fc 도메인을 형성하는 4개의 폴리펩타이드를 포함하는 Fc 작제물을 특징으로 한다. 제1 폴리펩타이드는 식 A-L-B를 갖되, A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, L은 링커이며, B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 제2 폴리펩타이드는 식 A'-L'-B'를 갖되, A'는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하고, L'는 링커이며, B'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 제3 폴리펩타이드는 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하고, 제4 폴리펩타이드는 제6 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 본 양태에서, A와 A'는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, B와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, B'와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성한다. 본 개시의 본 양태의 예시적인 Fc 작제물은 도 5에 예시되어 있다.
- [0014] 특정 구현예에서, A 및 A'는 각각 이들 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 이량체화 선택성 모듈을 포함한다. 다른 구현예에서, B 및 제5 Fc 도메인 단량체는 각각 이들 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 이량체화 선택성 모듈을 포함한다. 또 다른 구현예에서, B' 및 제6 Fc 도메인 단량체는 각각 이들 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 이량체화 선택성 모듈을 포함한다.
- [0015] 특정 구현예에서, A, B, A', B', 제3 폴리펩타이드, 및 제4 폴리펩타이드 중 하나 이상은 Fc 도메인 단량체로 이루어진다. 하나의 구현예에서, A, B, A', B', 제3 폴리펩타이드, 및 제4 폴리펩타이드 각각은 Fc 도메인 단량체로 이루어진다.
- [0016] 특정 구현예에서, Fc 작제물은 IgG C_L 항체 불변 도메인 및 IgG C_{H1} 항체 불변 도메인을 더 포함하되, IgG C_L 항체 불변 도메인은 링커를 통해 IgG C_{H1} 항체 불변 도메인의 N-말단에 부착되고, IgG C_{H1} 항체 불변 도메인은, 예컨대 링커를 통해 A의 N-말단에 부착된다. 하나의 구현예에서, Fc 작제물은 제2 IgG C_L 항체 불변 도메인 및 제2 IgG C_{H1} 항체 불변 도메인을 더 포함하되, 제2 IgG C_L 항체 불변 도메인은, 예컨대 링커를 통해 제2 IgG C_{H1} 항체 불변 도메인에 부착되고, 제2 IgG C_{H1} 항체 불변 도메인은, 예컨대 링커를 통해 A'의 N-말단에 부착된다.
- [0017] 특정 구현예에서, Fc 작제물은 이중 모이어티, 예컨대, 펩타이드, 예컨대, B 또는 B'의 N-말단 또는 C-말단에 예컨대, 링커를 통해 접합된 알부민-결합 펩타이드를 더 포함한다.
- [0018] 다른 구현예에서, Fc 작제물의 제1 및 제2 폴리펩타이드는 동일한 아미노산 서열을 갖고, Fc 작제물의 제3 및

제4 폴리펩타이드는 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

- [0019] 또 다른 양태에서, 본 개시는 2개의 폴리펩타이드를 포함하는 Fc 작제물을 특징으로 한다. 제1 폴리펩타이드는 식 A-L-B를 갖되, A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, L은 링커이며, B는 혈청 단백질-결합 모이어티, 예컨대, 알부민 결합 펩타이드를 포함한다. 제2 폴리펩타이드는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 본 양태에서, 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체는 결합하여 Fc 도메인을 형성한다.
- [0020] 특정 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제2 Fc 도메인 단량체는 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다.
- [0021] 특정 구현예에서, A 및 제2 폴리펩타이드 각각은 Fc 도메인 단량체로 이루어진다.
- [0022] 또 다른 양태에서, 본 개시는 2개의 폴리펩타이드를 포함하는 Fc 작제물을 특징으로 한다. 제1 폴리펩타이드는 식 A-L1-B-L2-C를 갖되, A는 IgG C_L 항체 불변 도메인을 포함하고, L1 및 L2는 각각 링커이며, B는 IgG C_{H1} 항체 불변 도메인을 포함하고, C는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 제2 폴리펩타이드는 식 A'-L1'-B'-L2'-C'를 갖되, A'는 IgG C_L 항체 불변 도메인을 포함하고, L1' 및 L2'는 각각 링커이며, B'는 IgG C_{H1} 항체 불변 도메인을 포함하고, C'는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 본 양태에서, 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체는 결합하여 Fc 도메인을 형성한다. 본 개시의 본 양태의 예시적인 Fc 작제물은 도 7a에 예시되어 있다.
- [0023] 특정 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제2 Fc 도메인 단량체는 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 이량체화 선택성 모듈을 포함한다.
- [0024] 특정 구현예에서, C 및 C' 각각은 Fc 도메인 단량체로 이루어진다.
- [0025] 특정 구현예에서, Fc 작제물은 혈청 단백질 결합 모이어티, 예컨대, C 또는 C'의 N-말단 또는 C-말단에 링커를 통해 접합된 알부민-결합 펩타이드를 더 포함한다.
- [0026] 또 다른 양태에서, 본 개시는 4개 이상의 폴리펩타이드를 포함하는 Fc 작제물을 특징으로 한다. 제1 폴리펩타이드는 식 A-L1-B-L2-C를 갖되, A는 IgG C_L 항체 불변 도메인을 포함하고, L1 및 L2는 각각 링커이며, B는 IgG C_{H1} 항체 불변 도메인을 포함하고, C는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 제2 폴리펩타이드는 식 A'-L1'-B'-L2'-C'를 갖되, A'는 IgG C_L 항체 불변 도메인을 포함하고, L1' 및 L2'는 각각 링커이며, B'는 IgG C_{H1} 항체 불변 도메인을 포함하고, C'는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 본 양태에서, 제1 Fc 도메인 단량체는 제3 Fc 도메인 단량체와 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체는 제4 Fc 도메인 단량체 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성한다. 추가로, 제1 폴리펩타이드의 IgG C_{H1} 항체 불변 도메인은 제2 폴리펩타이드의 IgG C_L 항체 불변 도메인과 결합하고, 제2 폴리펩타이드의 IgG C_{H1} 항체 불변 도메인은 제1 폴리펩타이드의 IgG C_L 항체 불변 도메인과 결합하여 2개 이상의 Fc 도메인을 포함하는 Fc 작제물을 형성한다. 본 개시의 본 양태의 예시적인 Fc 작제물은 도 7b에 예시되어 있다.
- [0027] 또 다른 양태에서, 본 개시는 2개의 폴리펩타이드를 포함하는 Fc 작제물을 특징으로 한다. 제1 폴리펩타이드는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, 제2 폴리펩타이드는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 본 양태에서, 제1과 제2 Fc 도메인 단량체는 결합하여 Fc 도메인을 형성한다. 본 개시의 본 양태의 예시적인 Fc 작제물은 도 1에 예시되어 있다. 또한 본 양태에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제2 Fc 도메인 단량체 각각은 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 이량체화 선택성 모듈을 포함한다. 본 구현예의 예시적인 Fc 작제물은 도 2 및 3에 예시되어 있다.
- [0028] 특정 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은 Fc 도메인 단량체로 이루어진다.
- [0029] 특정 구현예에서, Fc 작제물은 혈청 단백질 결합 모이어티, 예컨대, 제1 또는 제2 폴리펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에, 예컨대 링커를 통해 접합된 알부민-결합 펩타이드를 더 포함한다.
- [0030] 또 다른 양태에서, 본 개시는 2개의 폴리펩타이드를 포함하는 Fc 작제물을 특징으로 한다. 제1 폴리펩타이드는 식 A-L-B를 갖되, A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, L은 링커이며, B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 제2 폴리펩타이드는 식 A'-L'-B'를 갖되, A'는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하고, L'는 링커이며, B'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 본 양태에서, 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체 각각은 그들 각각의 C_{H3} 항체 불변 도메인에 유전자 조작 함물부를 포함하고, 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체 각각은 그들 각각의 C_{H3} 항체 불변 도메인

에 유전자 조작 돌출부를 포함하되, 유전자 조작 함몰부와 유전자 조작 돌출부는 돌출부-함몰부(protuberance-into-cavity) 쌍을 형성하도록 위치된다. 또한 본 양태에서, 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성한다.

[0031] 특정 구현예에서, A, B, A', 및 B' 중 하나 이상은 Fc 도메인 단량체로 이루어진다. 하나의 구현예에서, A, B, A', 및 B' 각각은 Fc 도메인 단량체로 이루어진다.

[0032] 특정 구현예에서, Fc 작제물은 혈청 단백질 결합 모이어티, 예컨대, B 또는 B'의 N-말단 또는 C-말단에 예컨대 링커를 통해 접합된 알부민-결합 펩타이드를 더 포함한다.

[0033] 특정 구현예에서, Fc 작제물은 IgG C_L 항체 불변 도메인 및 IgG C_{H1} 항체 불변 도메인을 더 포함하되, IgG C_L 항체 불변 도메인은 IgG C_{H1} 항체 불변 도메인의 N-말단에, 예컨대, 링커를 통해 부착되고, IgG C_{H1} 항체 불변 도메인은 A의 N-말단에 링커를 통해 부착된다. 하나의 구현예에서, Fc 작제물은 제2 IgG C_L 항체 불변 도메인 및 제2 IgG C_{H1} 항체 불변 도메인을 더 포함하되, 제2 IgG C_L 항체 불변 도메인은, 링커를 통해 제2 IgG C_{H1} 항체 불변 도메인에 부착되고, 제2 IgG C_{H1} 항체 불변 도메인은, 링커를 통해 A'의 N-말단에 부착된다.

[0034] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L-B를 갖는 제1 폴리펩타이드(A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어지고, L은 링커이며, B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어짐); b) 식 A'-L'-B'를 갖는 제2 폴리펩타이드(A'는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어지고, L'는 링커이며, B'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어짐); c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어진 제3 폴리펩타이드; 및 d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어진 제4 폴리펩타이드로 이루어진 Fc 작제물을 특징으로 한다. 제1 폴리펩타이드의 A와 제2 폴리펩타이드의 A'는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제1 폴리펩타이드의 B와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제2 폴리펩타이드의 B'와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성한다. 제1 및 제3 Fc 도메인 단량체 각각은 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체 각각은 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제4 및 제6 Fc 도메인 단량체 각각은 제4 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하되, Fc 작제물은 3개 이하의 Fc 도메인을 함유한다.

[0035] 본 양태의 일부 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체 또는 제3 Fc 도메인 단량체 중 하나는 음하전 아미노산 치환을 포함하고, 또 다른 Fc 도메인 단량체는 양하전 아미노산 치환을 포함하며, 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체 또는 제5 및 제6 Fc 도메인 단량체 중 하나는 유전자 조작 돌출부를 포함하고, 또 다른 Fc 도메인 단량체는 유전자 조작 함몰부를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커 L1, L2, L1', 및/또는 L2'는 3~200개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 링커 L 및/또는 L'는 서열 번호 1 내지 27 및 51 내지 55 중 임의의 하나의 서열을 포함하거나 이로써 이루어지거나 이로써 본질적으로 이루어진다. 일부 구현예에서, 링커 L 및/또는 L'는 최대 10개(예컨대, 최대 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개)의 단일 아미노산 변형(예컨대, 치환, 예컨대, 보존성 치환)을 갖는 서열 번호 1 내지 27 및 51 내지 55 중 임의의 하나의 서열을 포함하거나 이로써 이루어지거나 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0036] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L1-B-L2-C를 갖는 제1 폴리펩타이드(A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어지고, L1은 링커이며, B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어지고, L2는 링커이며, C는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어짐); 및 b) 식 A'-L1'-B'-L2'-C'를 갖는 제2 폴리펩타이드(A'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어지고, L1'는 링커이며, B'는 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어지고, L2'는 링커이며, C'는 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어짐); c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어지는 제3 폴리펩타이드; d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어진 제4 폴리펩타이드; e) 제9 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어진 제5 폴리펩타이드; 및 f) 제10 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어진 제6 폴리펩타이드로 이루어진 Fc 작제물을 특징으로 한다. 제1 폴리펩타이드의 A와 제7 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제1 폴리펩타이드의 B와 제2 폴리펩타이드의 B'는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제1 폴리펩타이드의 C와 제8 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제4 Fc 도메인을 형성하고, 제2 폴리펩타이드의 A'와 제9 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제4 Fc 도메인을 형성하며, 제2 폴리펩타이드의 C'와 제10 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제5 Fc 도메인을 형성한다. 제1 및 제7 Fc 도메인 단량체 각각은 제1 Fc 도메인 단량체와 제7 Fc 도메인 단량체 사이의

이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체 각각은 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제3 및 제8 Fc 도메인 단량체 각각은 제3 Fc 도메인 단량체와 제8 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제4 및 제9 Fc 도메인 단량체 각각은 제4 Fc 도메인 단량체와 제9 Fc 도메인 단량체 사이의 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제6 및 제10 Fc 도메인 단량체 각각은 제6 Fc 도메인 단량체와 제10 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하되, Fc 작제물은 5개 이하의 Fc 도메인을 함유한다.

[0037] 본 양태의 일부 구현예에서, 제1, 제3, 제4, 및 제6 Fc 도메인 단량체 각각은 유전자 조작 돌출부를 포함하고, 제2 Fc 도메인 단량체는 음하전 아미노산 치환을 포함하며, 제5 Fc 도메인 단량체는 양하전 아미노산 치환을 포함하고, 제7, 제8, 제9, 및 제10 Fc 도메인 단량체 각각은 유전자 조작 함몰부를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커 L1, L2, L1', 및/또는 L2'는 3~200개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 링커 L1, L2, L1', 및/또는 L2'는 서열 번호 1, 2 및 3 중 임의의 하나의 서열을 포함하거나 이로써 이루어지거나 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0038] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L1-B-L2-C를 갖는 제1 폴리펩타이드(A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어지고, L1은 링커이며, B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어지고, L2는 링커이며, C는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어짐); 및 b) 식 A'-L1'-B'-L2'-C'를 갖는 제2 폴리펩타이드(A'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어지고, L1'는 링커이며, B'는 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어지고, L2'는 링커이며, C'는 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어짐); c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어지는 제3 폴리펩타이드; d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어진 제4 폴리펩타이드; e) 제9 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어진 제5 폴리펩타이드; f) 제10 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어진 제6 폴리펩타이드로 이루어진 Fc 작제물을 특징으로 한다. 제1 폴리펩타이드의 A와 제2 폴리펩타이드의 A'는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제1 폴리펩타이드의 B와 제7 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제1 폴리펩타이드의 C와 제8 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제2 폴리펩타이드의 B'와 제9 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제4 Fc 도메인을 형성하며, 제2 폴리펩타이드의 C'와 제10 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제5 Fc 도메인을 형성한다. 제1 및 제4 Fc 도메인 단량체 각각은 제1 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제2 및 제7 Fc 도메인 단량체 각각은 제2 Fc 도메인 단량체와 제7 Fc 도메인 단량체 사이의 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제3 및 제8 Fc 도메인 단량체 각각은 제3 Fc 도메인 단량체와 제8 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제5 및 제9 Fc 도메인 단량체 각각은 제5 Fc 도메인 단량체와 제9 Fc 도메인 단량체 사이의 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제6 및 제10 Fc 도메인 단량체 각각은 제6 Fc 도메인 단량체와 제10 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하되, Fc 작제물은 5개 이하의 Fc 도메인을 함유한다.

[0039] 본 양태의 일부 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체 각각은 음하전 아미노산 치환을 포함하고, 제4 Fc 도메인 단량체는 양하전 아미노산 치환을 포함하며, 제2, 제3, 제5 및 제6 Fc 도메인 단량체 각각은 유전자 조작 돌출부를 포함하고, 제7, 제8, 제9, 및 제10 Fc 도메인 단량체 각각은 유전자 조작 함몰부를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커 L1, L2, L1', 및/또는 L2'는 3~200개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 링커 L1, L2, L1', 및/또는 L2'는 서열 번호 1, 2 및 3 중 임의의 하나의 서열을 포함하거나 이로써 이루어지거나 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0040] 또 다른 양태에서, 본 개시는 하나 이상의 Fc 도메인을 포함하는 Fc 작제물을 특징으로 하되, Fc 작제물은 단일 폴리펩타이드 서열에서 조립된다. 폴리펩타이드는 식 A-L-B를 갖되, A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, L은 링커이며(선택적으로 예컨대, 하나, 둘 또는 그 이상의 절단 부위를 갖는 절단성 링커); 및 B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 링커는 폴리펩타이드의 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체가 결합하여 Fc 도메인을 형성하는 충분한 길이(예컨대, 적어도 15개의 아미노산, 바람직하게는 적어도 약 20개의 아미노산 잔기 길이, 예컨대, 15~200개의 아미노산 길이)의 아미노산 스페이스(spacer) 및 가요성일 수 있다. 특정 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제2 Fc 도메인 단량체는 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다. 이러한 작제물은 숙주 세포에서의 단일 폴리펩타이드 서열의 발현으로 형성될 수 있다. 하나의 구현예에서, 폴리펩타이드는 식 A-L1-B-L2-C를 갖되, A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, L1은 링커이며(선택적으로 예컨대, 하나, 둘 또는 그 이상의 절단 부위를 갖는 절단성

링커), B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함하고, L2는 링커이며, C는 제3 Fc 도메인 단량체이다. 링커는 폴리펩타이드의 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체가 결합하여 Fc 도메인을 형성하는 충분한 길이(예컨대, 적어도 15개의 아미노산, 바람직하게는 적어도 약 20개의 아미노산 잔기 길이, 예컨대, 15~200개의 아미노산 길이)의 아미노산 스페이서 및 가요성일 수 있다. 특정 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제2 Fc 도메인 단량체는 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다. 3개의 Fc 도메인을 포함하는 본 구현예의 Fc 작제물의 예는 도 10에 도시된다.

[0041] 본원에 기재된 Fc 작제물 중 임의의 것에 있어서, Fc 도메인 중 적어도 하나는 (i) 하나 이상의 Fc 수용체에 대한 결합 친화도, (ii) 효과기 기능, (iii) Fc 도메인 황산화의 수준, (iv) 반감기, (v) 프로테아제 저항성, (vi) Fc 도메인 안정성, 및/또는 (vii) 열화에 대한 감수성 중 하나 이상을 변경하는 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함한다. 본원에 기재된 Fc 작제물 중 임의의 것에 있어서, 하나 이상의 Fc 수용체에 대한 결합 친화도를 변경하는 아미노산 변형은 표 2에 있는 아미노산 변형 중 어느 하나이다. 본원에 기재된 Fc 작제물 중 임의의 것에 있어서, 하나 이상의 Fc 수용체에 대한 결합 친화도를 변경하는 아미노산 변형은 S267E/L328F이다. 일부 구현예에서, Fc 수용체는 Fc γ R1Ib이다. 일부 경우에 있어서, 본원에 기재된 변형은 Fc γ R1Ib 수용체에 대한 친화도를 증가시킨다. 일부 경우에 있어서, S267E/L328F 변형은 Fc γ R1Ib에 대한 결합 친화도를 증가시킨다. 본원에 기재된 Fc 작제물 중 임의의 것에 있어서, 효과기 기능을 변경하는 아미노산 변형은 표 6에 있는 아미노산 변형 중 임의의 하나이다. 본원에 기재된 Fc 작제물 중 임의의 것에 있어서, Fc 도메인 황산화의 수준을 변경하는 아미노산 변형은 241F, 243F, 246K, 260T, 또는 301R이다. 본원에 기재된 Fc 작제물 중 임의의 것에 있어서, 반감기를 변경하는 아미노산 변형은 표 4에 있는 아미노산 변형 중 임의의 하나이다. 본원에 기재된 Fc 작제물 중 임의의 것에 있어서, 프로테아제 저항성을 변경하는 아미노산 변형은 다음의 세트에서 선택된다: 233P, 234V, 235A, 및 236del; 237A, 239D, 및 332E; 237D, 239D, 및 332E; 237P, 239D, 및 332E; 237Q, 239D, 및 332E; 237S, 239D, 및 332E; 239D, 268F, 324T, 및 332E; 239D, 326A, 및 333A; 239D 및 332E; 243L, 292P, 및 300L; 267E, 268F, 324T, 및 332E; 267E 및 332E; 268F, 324T, 및 332E; 326A, 332E, 및 333A; 또는 326A 및 333A. 본원에 기재된 Fc 작제물 중 임의의 것에 있어서, Fc 도메인 안정성을 변경하는 아미노산 변형은 표 8에 있는 아미노산 변형 중 임의의 하나이다. 본원에 기재된 Fc 작제물 중 임의의 것에 있어서, 열화에 대한 Fc 도메인 감수성을 변경하는 아미노산 변형은 C233X, D234X, K235X, S236X, T236X, H237X, C239X, S241X, 및 G249X(X는 임의의 아미노산)이다.

[0042] 또 다른 양태에서, 본 개시는 (a) 식 A-L-B를 갖는 제1 폴리펩타이드(A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어지고, L은 링커이며, B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어짐); (b) 식 A'-L'-B'를 갖는 제2 폴리펩타이드(A'는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어지고, L'는 링커이며, B'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어짐); (c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어진 제3 폴리펩타이드; 및 (d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로써 이루어진 제4 폴리펩타이드를 포함하는 Fc 작제물을 특징으로 한다. 일부 경우에 있어서, 제1 폴리펩타이드의 a와 제2 폴리펩타이드의 A'는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제1 폴리펩타이드의 B와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제2 폴리펩타이드의 B'와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성한다. 일부 경우에 있어서, 제1 및 제2 폴리펩타이드는 서열번호 50의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나 이로써 본질적으로 이루어지며, 제3 및 제4 폴리펩타이드는 서열번호 48의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나 이로써 본질적으로 이루어진다. 본 개시의 일부 구현예에 있어서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은 최대 10개(예컨대, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개)의 단일 아미노산 변형(예컨대, 치환, 예컨대, 보존성 치환)을 갖는 서열번호 50의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나 이로써 본질적으로 이루어지며, 제3 및 제4 폴리펩타이드는 최대 10개(예컨대, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개)의 단일 아미노산 변형(예컨대, 치환, 예컨대, 보존성 치환)을 갖는 서열번호 48의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0043] 작제물의 Fc 도메인의 Fc 도메인 단량체는 동일한 1차 아미노산 서열을 가질 수 있다. 예를 들어, Fc 도메인의 Fc 도메인 단량체는 둘 다 야생형 서열일 수 있거나, Fc 도메인의 Fc 도메인 단량체 둘 다 동일한 이량체화 선택성 모듈을 가질 수 있다. 예컨대, Fc 도메인의 Fc 도메인 단량체는 C α 3 도메인 사이의 계면에서 하전된 잔기의 고리 내에 적어도 2개의 위치에서 동일한 역전하 돌연변이를 가질 수 있다.

[0044] 본원에 기재된 Fc 작제물 중 임의의 것에 있어서, 작제물의 Fc 도메인의 Fc 도메인 단량체는 2개의 Fc 단량체 사이(즉, Fc 도메인 단량체와 Fc 작제물의 다른 단량체 사이)에 상이한 서열, 예컨대 20개 이하의 아미노산(예컨대, 15개, 10개 이하의 아미노산), 예컨대, 20, 15, 10, 8, 7, 6, 5, 4, 3 또는 2개 이하의 아미노산까지 상이한 서열을 가질 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 작제물의 Fc 단량체 서열은 Fc 작제물 중 임의의 것의 상

보적 이량체화 선택성 모듈이 도메인 단량체 중 하나의 C_{H3} 항체 불변 도메인에 유전자 조작 함몰부 및 Fc 도메인 단량체 중 다른 하나의 C_{H3} 항체 불변 도메인에 유전자 조작 돌출부를 포함할 수 있되, 유전자 조작 함몰부와 유전자 조작 돌출부는 Fc 도메인 단량체의 돌출부-함몰부 쌍을 형성하도록 위치된다. 예시적인 유전자 조작 함몰부 및 돌출부는 표 9에 나타낸다. 다른 구현예에서, 상보적 이량체화 선택성 모듈은 도메인 단량체 중 하나의 C_{H3} 항체 불변 도메인에 조작된(치환된) 음하전 아미노산 및 Fc 도메인 단량체 중 다른 하나의 C_{H3} 항체 불변 도메인에 조작된(치환된) 양하전 아미노산을 포함하되, 음하전 아미노산 및 양하전 아미노산은 상보적 도메인 단량체 사이의 Fc 도메인의 형성을 촉진하도록 위치된다. 예시적인 상보적 아미노산 변화는 표 10에 나타낸다.

- [0045] 일부 구현예에서, 이량체화 선택성 모듈(예컨대, 유전자 조작 함몰부 및 돌출부, 또는 유전자 조작 양하전 및 음하전 아미노산(예컨대, 표 1 및 2에 있는 예시적인 아미노산 변화를 참조))에 추가하여, 본원에 기재된 Fc 작제물은 예컨대, Fc 작제물을 안정화시키거나 또는 단백질 응집을 예방하는 데 도움을 주기 위하여 Fc 단량체 서열의 야생형 서열에서 추가 아미노산 치환을 또한 포함할 수 있다.
- [0046] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 Fc 작제물은 2~10개의 Fc 도메인(예컨대, 2~8개의 Fc 도메인, 2~6개의 Fc 도메인, 2~4개의 Fc 도메인, 2~3개의 Fc 도메인, 3~5개의 Fc 도메인, 또는 5~10개의 Fc 도메인; 예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개의 도메인)을 포함하되, 작제물의 Fc 도메인의 적어도 2개는 상이한 이량체화 선택성 모듈을 갖는다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 Fc 작제물은 5~10개의 Fc 도메인(예컨대, 5, 6, 7, 8, 9, 10개의 도메인)을 포함하되, 작제물의 Fc 도메인의 적어도 2개는 상이한 이량체화 선택성 모듈을 갖는다. 예를 들어, 작제물 5, 8, 9 및 10개는 유전자 조작 함몰부와 돌출부를 포함하는 적어도 하나의 Fc 도메인 및 상보적 역전하 돌연변이를 포함하는 적어도 하나의 Fc 도메인을 갖는다.
- [0047] 다른 구현예에서, 본원에 기재된 Fc 작제물의 하나 이상의 링커는 결합(bond)이다.
- [0048] 다른 구현예에서, 본원에 기재된 Fc 작제물의 하나 이상의 링커는 스페이서, 예컨대, 2~200개의 아미노산의 아미노산 스페이서(예컨대, 2~100개, 3~200개, 3~150개, 3~100개, 3~60개, 3~50개, 3~40개, 3~30개, 3~20개, 3~10개, 3~8개, 3~5개, 4~30개, 5~30개, 6~30개, 8~30개, 10~20개, 10~30개, 12~30개, 14~30개, 20~30개, 15~25개, 15~30개, 18~22개, 및 20~30개의 아미노산)이다.
- [0049] 특정 구현예에서, 아미노산 스페이서는 글라이신 및/또는 세린 풍부 스페이서이고, 예컨대 스페이서는 서열 GS, GGS, GGGGS(서열 번호 1), GGS(서열 번호 2), 또는 SGGG(서열 번호 3)의 둘 이상의 모티프를 포함하거나 이로써 이루어지거나 이로써 본질적으로 이루어진다. 일부 경우에 있어서, 아미노산 스페이서는 오직 글라이신, 오직 세린, 또는 오직 세린 및 글라이신만 포함한다. 일부 경우에 있어서, 아미노산 스페이서는 2~30개의 아미노산(예컨대, 20개의 아미노산)을 포함하고 오직 글라이신만 포함한다. 일부 경우에 있어서, 스페이서는 3~20개의 아미노산(예컨대, 20개의 아미노산)을 포함하고 오직 글라이신 및 세린만 포함한다.
- [0050] 특정 구현예에서, Fc 작제물이 알부민-결합 펩타이드를 포함할 때, 알부민-결합 펩타이드는 DICLPRWGCLW(서열 번호 28)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다. 특정 구현예에서, Fc 작제물이 알부민-결합 펩타이드를 포함할 때, 알부민-결합 펩타이드는 최대 10개(예컨대, 최대 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개)의 단일 아미노산 변형(예컨대, 치환, 예컨대, 보존성 치환)을 갖는 DICLPRWGCLW(서열 번호 28)의 서열을 포함하거나 이로써 이루어지거나 이로써 본질적으로 이루어진다.
- [0051] 다른 구현예에서, 본원에 기재된 Fc 작제물의 Fc 도메인 단량체 중 하나 이상은 IgG 힌지(hinge) 도메인, IgG C_{H2} 항체 불변 도메인, 및 IgG C_{H3} 항체 불변 도메인을 포함한다.
- [0052] 특정 구현예에서, 전술한 Fc 작제물의 Fc 도메인 단량체 각각은 IgG 힌지 도메인, IgG C_{H2} 항체 불변 도메인, 및 IgG C_{H3} 항체 불변 도메인을 포함한다.
- [0053] 특정 구현예에서, IgG는 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, 및 IgG4로 이루어진 군에서 선택된 아형 중에 있다.
- [0054] 특정 구현예에서, Fc 도메인 단량체 각각은 10개 이하(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 이하)의 아미노산 변형을 갖는다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체 중 하나 이상은 인간 IgG Fc(예컨대, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, 또는 IgG4)이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체 중 하나 이상은 최대 10개(예컨대, 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개)의 아미노산 변형을 갖는 인간 IgG Fc 도메인 단량체이다.
- [0055] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인(예컨대, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 동질인) 집단을 포함하는 약학 조성물을 특징으로 한다. 하나의 구현예에서, 약학적 용도로 적합

한 멸균 주사기 또는 바이알은 유일한 또는 주요한 유효성분이 본원에 기술된 Fc 작제물 중 어느 하나의 실질적으로 동질인(예컨대, 적어도 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동질인) 집단인 약학 조성물을 함유한다. 약학 조성물은 예컨대, 염, 세척제, 계면활성제, 벌킹제(bulking agent), 중합체, 방부제, 및 기타 약학적 부형제에서 선택되는 하나 이상의 유효 성분을 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 실질적으로 동질인 약학 조성물은 10% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 1% 미만, 또는 0.5% 미만의 Fc 작제물의 응집 또는 원치 않는 다량체를 함유한다.

[0056] 또 다른 양태에서, 본 개시는 전술한 Fc 작제물 중 임의의 하나를 제조하는 방법을 특징으로 한다. 방법은 Fc 작제물을 조립하는 데 필요한 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들을 포함하는 숙주 세포를 제공하는 단계, Fc 작제물을 형성할 수 있는 조건 하에서 숙주 세포에서 폴리펩타이드를 발현하는 단계, 및 Fc 작제물을 회수하는 단계(예컨대 정제하는 단계)를 포함한다.

[0057] 일부 구현예에서, Fc 작제물은 상이한 폴리펩타이드에 존재하는 Fc 도메인 단량체의 결합으로 적어도 부분적으로 형성된다. 특정 구현예에서, Fc 작제물은 상이한 폴리펩타이드에 존재하는 Fc 도메인 단량체의 결합으로 형성된다. 이들 구현예에서, Fc 작제물은 2개의 폴리펩타이드의 결합을 촉진하는 추가 도메인(예컨대, IgM 꼬리조각 또는 IgA 꼬리조각)을 포함하지 않는다. 다른 구현예에서, 공유결합(예컨대, 이황화 결합)은 Fc 도메인을 형성하도록 접합하는 2개의 Fc 도메인 단량체 사이에서만 Fc 작제물에 존재한다. 다른 구현예에서, Fc 작제물은 Fc 도메인 사이에 공유결합(예컨대, 이황화 결합)을 포함하지 않는다. 또 다른 구현예에서, Fc 작제물은 Fc 작제물의 Fc 도메인 중 전부 또는 실질적으로 전부가 세포 표면 상의 Fc 수용체와 동시에 상호작용할 수 있도록 충분한 구조적 가요성을 제공한다. 이들 구현예의 임의의 특정 예에서, Fc 작제물은 링커(예컨대, 가요성 아미노산 스페이서)를 통해 접합된 적어도 2개의 Fc 도메인을 포함한다.

[0058] 하나의 구현예에서, Fc 도메인 중 Fc 도메인 단량체는 결합하여 Fc 도메인을 형성하는 상이한 폴리펩타이드 사슬에서 발견된다. 예를 들어, 도 4 및 도 6에 도시된 작제물은 3개의 결합된 폴리펩타이드를 포함하는 2개의 Fc 도메인을 갖는다. 3개의 폴리펩타이드 중 하나는 2개의 Fc 도메인 단량체를 포함하고, 폴리펩타이드 중 다른 2개는 각각 하나의 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 도 5에 도시된 작제물은 4개의 결합된 폴리펩타이드를 포함하는 3개의 Fc 도메인을 갖고, 4개의 폴리펩타이드 중 2개는 2개의 Fc 도메인 단량체를 가지며 4개의 폴리펩타이드 중 다른 2개는 각각 하나의 Fc 도메인 단량체를 갖는다. 도 7b에 도시된 Fc 작제물은 2n개의 폴리펩타이드를 포함하는 n개의 Fc 도메인(여기서, n은 2~10개), Fc 도메인 단량체, IgG C_L 항체 불변 도메인, 및 IgG C_{H1} 항체 불변 도메인을 포함하는 각각의 폴리펩타이드를 가질 수 있다. 도 8 및 도 9에 도시된 작제물은 각각 6개의 결합된 폴리펩타이드를 포함하는 5개의 Fc 도메인을 갖는다. 6개의 폴리펩타이드 중 2개는 3개의 Fc 도메인 단량체를 가지고 6개의 폴리펩타이드 중 다른 4개는 각각 하나의 Fc 도메인 단량체를 갖는다. 도 10에 도시된 작제물은 2개의 결합된 폴리펩타이드를 포함하는 3개의 Fc 도메인을 갖는다. 2개의 폴리펩타이드 각각은 일렬로 접합된 3개의 Fc 도메인 단량체를 함유한다.

[0059] 또 다른 양태에서, 본 개시는 Fc 도메인 단량체의 선택성 이량체화를 촉진하기 위한 조성물 및 방법을 특징으로 한다. 본 개시는 Fc 도메인의 2개의 Fc 도메인 단량체가 C_{H3} 항체 불변 도메인 사이의 계면에 하전된 잔기의 고리 내에 적어도 2개의 위치에 동일한 돌연변이를 포함하는 Fc 도메인을 포함한다. 본 개시는 또한 C_{H3} 항체 불변 도메인 사이의 계면에 하전된 잔기의 고리 내에 적어도 2개의 위치에 2개의 Fc 도메인 단량체에 동일한 돌연변이를 갖는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 도입하는 단계를 포함하는 이러한 Fc 도메인을 제조하는 방법을 포함한다. C_{H3} 항체 불변 도메인 사이의 계면은 하전된 잔기의 고리로 둘러싸인 소수성 패치(patch)로 이루어진다. 하나의 C_{H3} 항체 불변 도메인이 또 다른 하나와 합쳐지는 경우, 이들 하전된 잔기는 반대 전하 잔기와 쌍을 이룬다. 잔기의 둘 이상의 상보적인 쌍의 두 구성원의 전하를 서로 바꿈으로써, 돌연변이된 Fc 도메인 단량체는 동일한 돌연변이 서열의 Fc 도메인 단량체에 상보적으로 남아있지만, 이들 돌연변이가 없는 Fc 도메인 단량체에 더 낮은 상보성을 갖는다. 본 구현예에서, 동일한 이량체화 선택성 모듈은 동종이량체화(homodimerization)를 촉진한다. 예시적인 Fc 도메인은 이중 돌연변이 K409D/D339K, K392D/D399K, E357K/K370E, D356K/K439D, K409E/D339K, K392E/D399K, E357K/K370D, 또는 D356K/K439E를 함유하는 Fc 단량체를 포함한다. 또 다른 구현예에서, Fc 도메인은 이중 돌연변이, 예컨대, K409D/D399K/E357K/K370E의 임의의 쌍과 결합하는 4중 돌연변이를 포함하는 Fc 단량체를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 동일한 이량체화 선택성 모듈에 추가로, Fc 도메인의 Fc 도메인 단량체는 특이적 결합(예컨대, 유전자 조작 함몰부 및 유전자 조작 돌출부)을 촉진하는 비동일한 돌연변이를 가지는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다. 그 결과, 2개의 Fc 도메인 단량체는 2개의 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 서로 상보적으로 남아있지만, 다른 Fc 도메인 단량체

에 대한 상보성이 감소된다. 본 구현예는 함몰부-함유 Fc 도메인 및 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체 사이의 이중 이량체화(heterodimerization)를 촉진한다. 하나의 실시예에서, Fc 도메인 단량체 둘 다의 하전된 쌍 잔기에서의 동일한 돌연변이는 하나의 Fc 도메인 단량체상의 돌출부 및 다른 Fc 도메인 단량체상의 함몰부와 결합된다.

[0060] 또 다른 양태에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상의 염증을 감소시키는 방법을 특징으로 한다. 또 다른 양태에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상의 자가항체의 제거를 촉진하는 방법을 특징으로 한다. 또 다른 양태에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상의 항원 제시를 억제하는 방법을 특징으로 한다. 또 다른 양태에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상의 면역 반응을 감소시키는 방법, 예컨대, 이를 필요로 하는 대상의 면역 반응의 면역 복합체-기반 활성화를 감소시키는 방법을 특징으로 한다. 이들 방법은 본원에 기재된 Fc 작제물 또는 약학 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.

[0061] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 Fc 작제물 또는 약학 조성물(예컨대, 작제물 1~10 및 5* 중 임의의 하나)을 대상에게 투여함으로써 대상의 염증 또는 자가면역 또는 면역 질환을 치료하는 방법을 특징으로 한다. 예시적인 질환은 류마티스 관절염(RA); 전신 홍반성 루푸스(SLE); ANCA-관련 혈관염; 항인지질 항체 증후군; 자가면역 용혈성 빈혈; 만성 염증성 탈수초성 신경병증; 이식조직에서 항-알로(anti-allo), GVHD에서 항-자기, 항-교환(anti-replacement), IgG 치료법, IgG 파라단백질의 제거; 피부근염; 굿파스처 증후군(Goodpasture's Syndrome); 항체-의존성 세포 매개 세포 독성을 통해 매개된 조직계-표적형 II 과민성, 예컨대, 길랭바레 증후군(Guillain Barre syndrome), CIDP, 피부근염, 펠티 증후군(Felty's syndrome), 항체 매개 거부반응, 자가면역성 갑상선 질환, 췌장성 대장염, 자가면역성 간 질환; 특발성 혈소판 감소성 자반증; 중증 근무력증, 시신경 척수염; 수포창 및 기타 자가면역성 수포 질환; 쇼그렌 증후군(Sjogren's Syndrome); 항체-의존성 식균 작용을 통해 매개된 자가면역성 혈구감소증 및 기타 질환; 기타 FcR-의존성 염증 증후군, 예컨대, 활액막염, 피부근염, 전신성 혈관염, 사구체염 또는 혈관염을 포함한다.

[0062] 또 다른 양태에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상의 염증을 감소시키는 데 사용되는 본원에 기재된 Fc 작제물 또는 약학 조성물(예컨대, 작제물 1~10 및 5* 중 임의의 하나)을 특징으로 한다. 또 다른 양태에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상의 자가 항체의 제거를 촉진시키는 데 사용되는 본원에 기재된 Fc 작제물 또는 약학 조성물(예컨대, 작제물 1~10 및 5* 중 임의의 하나)을 특징으로 한다. 또 다른 양태에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상의 항원 제시를 억제하는 데 사용되는 본원에 기재된 Fc 작제물 또는 약학 조성물(예컨대, 작제물 1~10 및 5* 중 임의의 하나)을 특징으로 한다. 또 다른 양태에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상의 면역 반응을 감소시키는, 예컨대 이를 필요로 하는 대상의 면역 반응의 면역 복합체-기반 활성화를 감소시키는 데 사용되는 본원에 기재된 Fc 작제물 또는 약학 조성물(예컨대, 작제물 1~10 및 5* 중 임의의 하나)을 특징으로 한다.

[0063] 또 다른 양태에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상의 염증 또는 자가면역 또는 면역 질환을 치료하는 데 사용되는 본원에 기재된 Fc 작제물 또는 약학 조성물(예컨대, 작제물 1~10 및 5* 중 임의의 하나)을 특징으로 한다. 예시적인 질환은 염증, 자가면역, 또는 면역 질환(예컨대, 류마티스 관절염(RA); 전신 홍반성 루푸스(SLE); ANCA-관련 혈관염; 항인지질 항체 증후군; 자가면역 용혈성 빈혈; 만성 염증성 탈수초성 신경병증; 이식조직에서 항-알로, GVHD에서 항-자기, 항-교환, IgG 치료법, IgG 파라단백질의 제거; 피부근염; 굿파스처 증후군; 항체-의존성 세포 매개 세포 독성을 통해 매개된 조직계-표적형 II 과민성, 예컨대, 길랭바레 증후군, CIDP, 피부근염, 펠티 증후군, 항체 매개 거부반응, 자가면역성 갑상선 질환, 췌장성 대장염, 자가면역성 간 질환; 특발성 혈소판 감소성 자반증; 중증 근무력증, 시신경 척수염; 수포창 및 기타 자가면역성 수포 질환; 쇼그렌 증후군; 항체-의존성 식균 작용을 통해 매개된 자가면역성 혈구감소증 및 기타 질환; 기타 FcR-의존성 염증 증후군, 예컨대, 활액막염, 피부근염, 전신성 혈관염, 사구체염 또는 혈관염을 포함한다.

[0064] 본원에 기재된 Fc 작제물 중 임의의 것에 있어서, Fc 도메인 단량체의 순서는 상호 교환할 수 있음이 이해된다. 예를 들어, 식 A-L-B를 갖는 폴리펩타이드에서, A의 카복시 말단은 L의 아미노 말단에 접합될 수 있되, 그의 카복시 말단에서 B의 아미노 말단으로 차례로 접합된다. 대안으로, B의 카복시 말단은 L의 아미노 말단에 접합될 수 있되, 그의 카복시 말단에서 C의 아미노 말단으로 차례로 접합된다. 이들 구성 모두는 식 A-L-B에 포함된다.

[0065] 관련 양태에서, 본 개시는 전술한 Fc 작제물 중 임의의 하나를 발현하는 숙주 세포를 특징으로 한다. 숙주 세포는 Fc 작제물을 조립하는 데 필요한 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하되, 폴리뉴클레오타이드는 숙주 세포에서 발현된다.

[0066] 정의:

[0067] 본원에서 사용된 "Fc 도메인 단량체"라는 용어는 적어도 한지 도메인 및 제2와 제3 항체 불변 도메인(C_H2 및

C_H3) 또는 그의 기능성 단편(예컨대, (i) Fc 도메인을 형성하기 위해 또 다른 Fc 도메인 단량체와 이량체화, 및 (ii) Fc 수용체에 결합할 수 있는 단편)을 포함하는 폴리펩타이드 사슬을 지칭한다. Fc 도메인 단량체는 IgG, IgE, IgM, IgA, 또는 IgD를 포함하는 임의의 면역글로불린 항체 동종형(isotype)일 수 있다. 추가로, Fc 도메인 단량체는 IgG 아형(예컨대, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, 또는 IgG4)일 수 있다. Fc 도메인 단량체는 항원 인식 부위, 예컨대, 가변 도메인 또는 상보성 결정 영역(CDR)으로 작용할 수 있는 면역글로불린의 어떤 부분도 포함하지 않는다. Fc 도메인 단량체는 Fc 도메인과 Fc 수용체 사이의 상호 작용을 변경하는 야생형 Fc 도메인 단량체 서열에서부터 10개의 변화(예컨대, 1~10개, 1~8개, 1~6개, 1~4개의 아미노산 치환, 첨가, 또는 결실)만큼 함유할 수 있다. 적합한 변화의 예는 당업계에서 공지되어 있다.

[0068] 본원에서 사용된 "Fc 도메인"이란 용어는 Fc 수용체에 결합할 수 있는 2개의 Fc 도메인 단량체의 이량체를 지칭한다. 야생형 Fc 도메인에서, 2개의 Fc 도메인 단량체는 2개의 C_H3 항체 불변 도메인 사이의 상호작용뿐만 아니라 2개의 이량체화 Fc 도메인 단량체의 힌지 도메인 사이에 형성되는 하나 이상의 이황화 결합에 의해 이량체화된다.

[0069] 본 개시에서, "Fc 작제물"이란 용어는 본원에 기재된 2~10개의 Fc 도메인(예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 Fc 도메인; 2~8개의 Fc 도메인, 2~6개의 Fc 도메인, 2~4개의 Fc 도메인, 2~3개의 Fc 도메인, 5~10개의 Fc 도메인, 5~8개의 Fc 도메인, 또는 5~6개의 Fc 도메인) 사이에 형성되는 결합 폴리펩타이드 사슬을 지칭한다. 본원에 기재된 Fc 작제물은 동일한 서열 또는 상이한 서열을 갖는 Fc 도메인 단량체를 포함할 수 있다. 예를 들어, Fc 작제물은 2개의 Fc 도메인을 가질 수 있고, 그 중 하나는 IgG1 또는 IgG1-유래 Fc 도메인 단량체를 포함하고, 두 번째는 IgG2 또는 IgG2-유래 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 또 다른 예에서, Fc 작제물은 2개의 Fc 도메인을 가질 수 있고, 그 중 하나는 "돌출부-함몰부 쌍"을 포함하고, 두 번째는 "돌출부-함몰부 쌍"을 포함하지 않는다. 본 개시에서, Fc 도메인은 항체의 가변 영역, 예컨대, V_H, V_L, CDR, 또는 HVR을 포함하지 않는다. Fc 도메인은 Fc 수용체, 예컨대, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, FcγRIIIb, FcγRIV에 결합하는 최소 구조를 형성한다.

[0070] 본원에서 사용된 "항체 불변 도메인"이라는 용어는 항체의 불변 영역 도메인(예컨대, C_L 항체 불변 도메인, C_H1 항체 불변 도메인, C_H2 항체 불변 도메인, 또는 C_H3 항체 불변 도메인)에 상응하는 폴리펩타이드를 지칭한다.

[0071] 본원에서 사용된 "촉진시키다"라는 용어는 조장하고 장려하는 것, 예컨대 다른, 별개의 Fc 도메인 단량체보다 서로 간에 결합 친화도가 더 높은 2개의 Fc 도메인 단량체에서 Fc 도메인의 형성을 장려하는 것을 지칭한다. 본원에 기술된 바와 같이, 결합하여 Fc 도메인을 형성하는 2개의 Fc 도메인 단량체는 그들 각각의 C_H3 항체 불변 도메인의 계면에서 양립성(compatible) 아미노산 변형(예컨대, 유전자 조작 돌출부 및 유전자 조작 함몰부)을 가질 수 있다. 양립성 아미노산 변형은 이러한 아미노산 변형이 결여되거나 비양립성 아미노산 변형을 갖는 다른 Fc 도메인 단량체와 비교하여 이러한 Fc 도메인 단량체의 서로 간의 선택적 상호 작용을 촉진하거나 장려한다. 이는 2개의 상호작용하는 C_H3 항체 불변 도메인의 계면에서의 아미노산 변형으로 인해, 아미노산 변형이 결여된 다른 Fc 도메인 단량체보다 서로를 향해 더 높은 친화도를 갖는 Fc 도메인 단량체 때문에 발생한다.

[0072] 본원에서 사용된 "이량체화 선택성 모듈"이란 용어는 2개의 도메인 단량체 사이의 바람직한 짝짓기(pairing)를 용이하게 하는 Fc 도메인 단량체의 서열을 지칭한다. "상보적" 이량체화 선택성 모듈은 2개의 Fc 도메인 단량체의 서로 간의 선택적 상호 작용을 촉진하거나 장려하는 이량체화 선택성 모듈이다. 상보적 이량체화 선택성 모듈은 동일한 또는 상이한 서열을 가질 수 있다. 예시적인 상보적 이량체화 선택성 모듈은 본원에 기재된다.

[0073] 본원에서 사용된 "유전자 조작 함몰부"라는 용어는 원래의 아미노산 잔기보다 더 작은 측쇄 체적을 갖는 상이한 아미노산 잔기를 가진 C_H3 항체 불변 도메인에 있는 원래의 아미노산 잔기 중 적어도 하나의 치환을 지칭하며, 따라서 C_H3 항체 불변 도메인에 3차원 함몰부를 생성한다. "원래의 아미노산 잔기"라는 용어는 야생형 C_H3 항체 불변 도메인의 유전 암호에 의해 인코딩된 자연 발생 아미노산 잔기를 지칭한다.

[0074] 본원에서 사용된 "유전자 조작 돌출부"라는 용어는 원래의 아미노산 잔기보다 더 큰 측쇄 체적을 갖는 상이한 아미노산 잔기를 가진 C_H3 항체 불변 도메인에 있는 원래의 아미노산 잔기 중 적어도 하나의 치환을 지칭하며, 따라서 C_H3 항체 불변 도메인에 3차원 돌출부를 생성한다. "원래의 아미노산 잔기들"이라는 용어는 야생형 C_H3 항체 불변 도메인의 유전 암호에 의해 인코딩된 자연 발생 아미노산 잔기들을 지칭한다.

- [0075] 본원에서 사용된 "돌출부-함몰부 쌍"이라는 용어는 2개의 Fc 도메인 단량체를 포함하는 Fc 도메인을 설명하되, 제1 Fc 도메인 단량체는 그의 C_H3 항체 불변 도메인에 유전자 조작 함몰부를 포함하는 반면, 제2 Fc 도메인 단량체는 그의 C_H3 항체 불변 도메인에 유전자 조작 돌출부를 포함한다. 돌출부-함몰부 쌍에서, 제1 Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인에 있는 유전자 조작 돌출부는 C_H3 항체 불변 도메인간 계면에서 이량체의 정상 결합을 유의미하게 교란시키지 않으면서 제2 Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인의 유전자 조작 함몰부와 상호작용하도록 위치된다.
- [0076] 본원에서 사용된 "접합된"이라는 용어는 화학적 컨주게이션, 재조합 수단 및 화학 결합, 예컨대, 이황화 결합 및 아마이드 결합을 포함하는 수단에 의한 둘 이상의 요소, 성분, 또는 단백질 도메인, 예컨대, 폴리펩타이드의 조합 또는 부착을 기술하는 데 사용된다. 예를 들어, 2개의 단일 폴리펩타이드는 화학적 컨주게이션, 화학 결합, 펩타이드 링커, 또는 공유 결합의 임의의 다른 수단을 통해 접합되어 하나의 인접 단백질 구조를 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체는 펩타이드 링커를 통해 제2 Fc 도메인 단량체에 접합되되, 펩타이드 링커의 N-말단은 화학 결합, 예컨대, 펩타이드 결합을 통해 제1 Fc 도메인 단량체의 C-말단에 접합되고, 펩타이드 링커의 C-말단은 화학 결합, 예컨대, 펩타이드 결합을 통해 제2 Fc 도메인 단량체의 N-말단에 접합된다. 다른 구현예에서, 알부민-결합 펩타이드의 N-말단은 전술한 바와 동일한 방식으로 링커를 통해 Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인의 C-말단에 접합된다.
- [0077] 본원에서 사용된 "결합된"이라는 용어는 폴리펩타이드(또는 하나의 단일 폴리펩타이드 내의 서열)가 적어도 하나의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물을 형성하도록 위치되게 하는 폴리펩타이드(또는 하나의 단일 폴리펩타이드 내의 서열) 사이의 상호 작용, 예컨대, 수소 결합, 소수성 상호 작용, 또는 이온 결합을 기술하는 데 사용된다. 예를 들어, 각각 하나씩 Fc 도메인 단량체를 포함하는 2개의 폴리펩타이드는 결합하여 (예컨대, 도 1 내지 도 3에 도시된 바와 같은) Fc 작제물을 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, 3개의 폴리펩타이드, 예컨대, 2개의 Fc 도메인 단량체를 포함하는 하나의 폴리펩타이드 및 하나의 Fc 도메인 단량체를 각각 포함하는 2개의 폴리펩타이드는 결합하여 (예컨대, 도 4 및 도 6에 도시된 바와 같은) 2개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물을 형성한다. 일부 구현예에서, 4개의 폴리펩타이드, 예컨대, 2개의 Fc 도메인 단량체를 각각 포함하는 하나의 폴리펩타이드 및 하나의 Fc 도메인 단량체를 각각 포함하는 2개의 폴리펩타이드는 결합하여 (예컨대, 도 5에 도시된 바와 같은) 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물을 형성한다. 다른 구현예에서, 2n개의 폴리펩타이드, 예컨대를 Fc 도메인 단량체, IgG C_L 항체 불변 도메인, 및 IgG C_H1 항체 불변 도메인을 포함하는 각각의 폴리펩타이드는 결합하여 (예컨대, 도 7b에 도시된 바와 같은) n개의 Fc 도메인을 가지는 Fc 작제물을 형성한다. 2개의 폴리펩타이드는 그들의 각각의 Fc 도메인 단량체를 통해 또는 폴리펩타이드의 다른 성분을 통해 결합할 수 있다. 예를 들어, 도 7b에서, 폴리펩타이드 708은 이의 Fc 도메인 단량체를 통해 폴리펩타이드 706과 결합하고, 폴리펩타이드 710의 C_H1 도메인과 결합하는 이의 C_L 도메인을 통해 폴리펩타이드 710과 결합한다. 폴리펩타이드 사이의 결합은 공유 결합을 포함하지 않는다. 예를 들어, 도 10에서, 단일 폴리펩타이드 내의 Fc 단량체 서열 1014 및 1012는, Fc 단량체 서열 1004 및 1006이 하는 바와 같이, 결합하여 Fc 도메인을 형성한다.
- [0078] 본원에서 사용된 "링커"라는 용어는 2개의 요소, 예컨대, 단백질 도메인 사이의 결합을 지칭한다. 링커는 공유 결합 또는 스페이서일 수 있다. "결합"이라는 용어는 화학 결합, 예컨대, 아마이드 결합 또는 이황화 결합, 또는 화학 반응에 의해 생성된 임의의 종류의 결합, 예컨대, 화학적 컨주게이션을 지칭한다. "스페이서"라는 용어는 2개의 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 도메인 사이에 공간 및/또는 가요성을 제공하기 위해 2개의 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 도메인(예컨대, Fc 도메인 단량체) 사이에 발생하는 모이어티(예컨대, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 중합체) 또는 아미노산 서열(예컨대, 3~200개의 아미노산, 3~150개의 아미노산, 3~100개의 아미노산, 3~60개의 아미노산, 3~50개의 아미노산, 3~40개의 아미노산, 3~30개의 아미노산, 3~20개의 아미노산, 3~10개의 아미노산, 3~8개의 아미노산, 3~5개의 아미노산, 4~30개의 아미노산, 5~30개의 아미노산, 6~30개의 아미노산, 8~30개의 아미노산, 10~20개의 아미노산, 10~30개의 아미노산, 12~30개의 아미노산, 14~30개의 아미노산, 20~30개의 아미노산, 15~25개의 아미노산, 15~30개의 아미노산, 18~22개의 아미노산, 및 20~30개의 아미노산 서열)을 지칭한다. 아미노산 스페이서는 (예컨대, 이격된 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 도메인에 폴리펩타이드 백본(backbone)을 통해 접합된) 폴리펩타이드의 1차 서열의 부분이다. 예컨대, Fc 도메인을 형성하는 2개의 힌지 영역 또는 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 이황화 결합의 형성은 링커로 간주되지 않는다.
- [0079] 본원에서 사용된 "절단성 링커"라는 용어는 예컨대, 작제물이 형성된 후에, 선택적으로 절단될 수 있는 하나 이상의 요소를 지칭하고, 예컨대, 절단성 링커는 프로테아제에 의해 선택적으로 절단될 수 있는 폴리펩타이드 서

열을 포함한다.

- [0080] 본원에서 사용된 "알부민-결합 펩타이드"라는 용어는 혈청 알부민에 대한 친화도가 있고 혈청 알부민에 결합하도록 기능하는 12개 내지 16개의 아미노산의 아미노산 서열을 지칭한다. 알부민-결합 펩타이드는 상이한 기원, 예컨대, 인간, 마우스, 또는 래트의 것일 수 있다. 본 개시의 일부 구현예에서, 알부민-결합 펩타이드는 Fc 도메인 단량체의 C-말단에 융합되어 Fc 작제물의 혈청 반감기를 증가시킨다. 알부민-결합 펩타이드는 직접 또는 링커를 통해, Fc 도메인 단량체의 N-말단 또는 C-말단에 융합될 수 있다.
- [0081] 본원에서 사용된 "다량체"라는 용어는 본원에 기재된 적어도 2개의 결합된 Fc 작제물을 포함하는 분자를 지칭한다.
- [0082] 본원에서 사용된 "폴리뉴클레오타이드"라는 용어는 올리고뉴클레오타이드, 또는 뉴클레오타이드, 및 단편 또는 그의 부분, 및 게놈 또는 합성 근원의 DNA 또는 RNA를 지칭하고, 이는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있고, 센스 가닥 또는 안티-센스 가닥을 나타낼 수 있다. 단일 폴리뉴클레오타이드는 단일 폴리펩타이드로 번역된다.
- [0083] 본원에서 사용된 "폴리펩타이드"라는 용어는 단량체가 아미드 결합을 통해 서로 접합되는 아미노산 잔기인 단일 중합체를 말한다. 폴리펩타이드는 자연 발생이거나, 재조합, 또는 합성하여 제조된 것 중 하나의 임의의 아미노산 서열을 포괄하려는 것이다.
- [0084] 본원에서 사용된 "아미노산 위치"라는 용어는 단백질 또는 단백질 도메인의 아미노산의 위치 번호를 의미한다. 항체 또는 Fc 작제물에 대한 아미노산 위치는 카바트(Kabat) 넘버링 시스템(Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, Md., ed 5, 1991)을 사용하여 번호가 부여된다.
- [0085] 본원에서 사용된 "아미노산 변형"이란 용어는 기준 서열(예컨대, 야생형, 비돌연변이, 또는 비변형 Fc 서열)과 비교하여, 약물동력학(PK) 및/또는 약물력학(PD) 특성, 혈청 반감기, 효과기 기능(예컨대, 세포 용해(예컨대, 항체-의존성 세포-매개 독성(ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포 독성 활성화(CDC)), 식균 작용(예컨대, 항체 의존성 세포성 식균 작용(ADCP) 및/또는 보체-의존성 세포 독성(CDCC)), 면역 활성화, 및 T-세포 활성화), Fc 수용체에(예컨대, Fc-감마 수용체(Fc γ R)(예컨대, Fc γ RI(CD64), Fc γ RIIA(CD32), Fc γ RIIB(CD32), Fc γ RIIA(CD16a), 및/또는 Fc γ RIIB(CD16b)), Fc-알파 수용체(Fc α R), Fc-엡실론 수용체(Fc ϵ R), 및/또는 신생아의 Fc 수용체(FcRn)에) 대한 친화도, 보체 연쇄반응(complement cascade)(예컨대, C1q)에 관여하는 단백질에 대한 친화도, 번역후 변형(예컨대, 당화, 시알릴화), 응집 특성(예컨대, 이량체(예컨대, 동종이량체 및/또는 이종이량체) 및/또는 다량체를 형성하는 능력), 및 (예컨대, CH1 및 CL 사이의 상호작용을 변경, 안정성을 변경, 및/또는 온도 및/또는 pH에 대한 감수성을 변경하는) Fc 작제물의 생물물리학적 특성에 영향을 끼칠 수 있고, 면역성 질환 및 염증성 질환의 치료 효능 개선을 촉진시킬 수 있는 Fc 도메인 폴리펩타이드 서열의 변경을 지칭한다. 아미노산 변형은 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 포함한다. 일부 구현예에서, 아미노산 변형은 단일 아미노산의 변형이다. 다른 구현예에서, 아미노산 변형은 다수의(예컨대, 하나 초과) 아미노산의 변형이다. 아미노산 변형은 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입의 조합을 포함할 수 있다. Fc 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 점 돌연변이(point mutation)(예컨대, 단일 뉴클레오타이드를 또 다른 것과 교환), 삽입 및 결실(예컨대, 하나 이상의 뉴클레오타이드의 첨가 및/또는 제거)과 같은 유전자(즉, DNA 및 RNA) 변경은 아미노산 변형의 기재에 포함된다.
- [0086] 특정 구현예에서, Fc 작제물 내의 적어도 하나의(예컨대, 적어도 하나, 둘, 셋, 넷, 다섯, 여섯, 일곱, 여덟, 아홉, 또는 열 개의) Fc 도메인은 아미노산 변형을 포함한다. 일부 예시에서, 적어도 하나의 Fc 도메인은 하나 이상의(예컨대, 둘, 셋, 넷, 다섯, 여섯, 일곱, 여덟, 아홉, 열, 또는 스물 이상의) 아미노산 변형을 포함한다. 일부 예시에서, 적어도 하나의 Fc 도메인은 열 여섯 개 이하의 아미노산 변형(예컨대, 하나, 둘, 셋, 넷, 다섯, 여섯, 일곱, 여덟, 아홉, 열, 열 하나, 열 둘, 열 셋, 열 넷, 열 다섯, 또는 열 여섯 개 이하의 아미노산 변형)을 포함한다. 일부 경우에 있어서, Fc 도메인 단량체는 열 개 이하의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 경우에 있어서, Fc 도메인 단량체는 12개 이하의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 경우에 있어서, Fc 도메인 단량체는 14개 이하의 아미노산 변형을 포함한다.
- [0087] 본원에서 사용된 "숙주 세포"라는 용어는 필요한 세포 성분, 예컨대, 그의 상응하는 핵산에서부터 단백질을 발현하는 데 필요한 세포 기관을 포함하는 비히클(vehicle)을 지칭한다. 핵산은 전형적으로 당업계에 공지된 종래 기술(형질전환, 형질주입, 전기 천공법, 인산칼슘 침전, 직접 미세현미주입(direct microinjection) 등)로 숙주 세포에 도입될 수 있는 핵산 벡터에 포함된다. 숙주 세포는 원핵 세포, 예컨대, 세균 세포, 또는 진핵 세포, 예

컨대, 포유류 세포(예컨대, CHO 세포)일 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 이어서 결합하여 원하는 Fc 작제물을 형성할 수 있는 원하는 도메인을 인코딩하는 하나 이상의 폴리펩타이드를 발현하는 데 숙주 세포가 사용된다.

[0088] 본원에서 사용된 "약학 조성물"이란 용어는 유효 성분뿐 아니라 유효 성분을 투여 방법에 적합하게 하는 하나 이상의 부형제 및 희석제를 함유하는 의약적 또는 약학적 제형을 지칭한다. 본 개시의 약학 조성물은 Fc 작제물과 양립 가능한 약학적으로 허용가능한 성분을 포함한다. 약학 조성물은 전형적으로 정맥내 또는 피하 투여를 위한 수용성 형태이다.

[0089] 본원에서 사용된 폴리펩타이드 또는 Fc 작제물의 "실질적으로 동일한 집단"은 조성물(예컨대, 약학 조성물) 중에 폴리펩타이드 또는 Fc 작제물의 적어도 85%는 Fc 도메인의 동일한 수 및 동일한 Fc 도메인 구조를 갖는 집단이다. 다양한 구현예에서, 조성물 중에 폴리펩타이드 또는 Fc 작제물의 적어도 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 99.5%는 동일하다. 따라서, Fc 작제물의 실질적으로 동일한 집단을 포함하는 약학 조성물은 조성물 중 Fc 작제물의 적어도 85%는 동일한 구조 및 Fc 도메인의 동일한 수를 갖는 집단이다. Fc 작제물의 실질적으로 동일한 집단은 Fc 작제물의 10% 초과와 다량체 또는 응집을 포함하지 않는다(예컨대, 8% 이하, 5% 이하, 2% 이하, 또는 1% 이하).

[0090] 본원에서 사용된 "약학적으로 허용 가능한 담체"라는 용어는 약학 조성물 중의 부형제 또는 희석제를 지칭한다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 제형의 다른 성분과 양립 가능해야 하고 수용자에게 해가 없어야 한다. 본 개시에서, 약학적으로 허용 가능한 담체는 Fc 작제물에 적절한 약학적 안정성을 제공해야 한다. 담체의 특성은 투여 방식에 따라 다르다. 예를 들어, 경구 투여에서는 고형 담체가 바람직하고, 정맥내 투여에서는 수용액 담체(예컨대, WFI, 및/또는 완충액)가 일반적으로 사용된다.

[0091] 본원에서 사용된 "치료 유효량"은 어떤 양, 예컨대, 대상 또는 환자에서 원하는 생물학적 효과를 일으키거나 본원에 기재된 질병 또는 장애를 가진 환자를 치료하는 데 효과적인 약학적 투여량을 지칭한다. "치료 유효량"은 하나의 투여량 또는 임의의 투약 또는 경로로 섭취되거나 단일 또는 다른 치료제와 병용하여 섭취되어 원하는 치료효과를 주는 양으로 해석될 수 있음이 본원에서 또한 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0092] 도 1은 2개의 야생형(wt) Fc 도메인 단량체(102 및 104)의 이량체를 함유하는 Fc 작제물(작제물 1)의 도해이다.

도 2는 2개의 Fc 도메인 단량체의 이량체를 함유하는 Fc 작제물(작제물 2)의 도해이다. 제1 Fc 도메인 단량체(202)는 그의 C_H3 항체 불변 도메인의 돌출부를 함유하는 반면, 제2 Fc 도메인 단량체(204)는 그의 C_H3 항체 불변 도메인의 병렬 위치에 함몰부를 함유한다.

도 3은 또 다른 Fc 작제물(작제물 3)의 도해이다. 본 Fc 작제물은 2개의 Fc 도메인 단량체(302 및 304)의 이량체를 함유하되, Fc 도메인 단량체 둘 다 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 유리한 정전기적 상호작용을 촉진하는 wt 서열과 상이한 하전 아미노산을 그의 C_H3-C_H3 계면에 함유한다.

도 4는 2개의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물(작제물 4)의 도해이다. 본 작제물은 3개의 폴리펩타이드로 형성된다. 제1 폴리펩타이드(402)는 일렬로 접합된 2개의 wt Fc 도메인 단량체(404 및 406)를 함유한다. 제2 및 제3 폴리펩타이드(각각 408 및 410)는 wt Fc 도메인 단량체를 각각 함유한다.

도 5는 4개의 폴리펩타이드로 형성된 3개의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물(작제물 5 또는 작제물 5*)의 도해이다. 제1 폴리펩타이드(502)는 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(504)와 일렬로 접합된 wt 서열(506)과 상이한 하전 아미노산을 C_H3-C_H3 계면에 함유하는 하나의 Fc 도메인 단량체를 함유한다. 제2 폴리펩타이드(508)는 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(510)와 일렬로 접합된 wt 서열(512)과 상이한 하전 아미노산을 C_H3-C_H3 계면에 함유하는 Fc 도메인 단량체를 함유한다. 제3 및 제4 폴리펩타이드(각각 514 및 516)는 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체를 각각 함유한다.

도 6은 3개의 폴리펩타이드로 형성된 2개의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물(작제물 6)의 도해이다. 제1 폴리펩타이드(602)는 일렬로 접합된 2개의 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(604 및 606)를 함유하는 반면, 제2 및 제3 폴리펩타이드(각각 608 및 610)는 상응하는 함몰부를 함유하도록 조작된 Fc 도메인 단량체를 각각 함유한다.

도 7a는 또 다른 Fc 작제물(작제물 7)의 도해이다. 본 Fc 작제물은 2개의 C_L-C_H1-Fc 도메인 단량체(702 및 70

4)의 이량체를 함유한다. 본 구현예에서, C_L 항체 불변 도메인은 인접한 C_H1 항체 불변 도메인에 접합되었다.

도 7b는 다수의 Fc 도메인을 함유하는 C_L - C_H1 -Fc 도메인 단량체(예컨대, 706, 708, 및 710)의 다량체를 함유하는 Fc 작제물(작제물 8)의 도해이다. 본 Fc 작제물에서, 구성 폴리펩타이드는 작제물 7의 구성 폴리펩타이드와 동일할 수 있다. 하나의 Fc 작제물(예컨대, 712)의 C_L 항체 불변 도메인은 제2, 이웃하는 Fc 작제물(예컨대, 714)의 C_H1 항체 불변 도메인과 상호작용한다.

도 8은 6개의 폴리펩타이드로 형성된 5개의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물(작제물 9)의 도해이다. 제1 및 제2 폴리펩타이드(802 및 810)는 일렬로 접합된 3개의 Fc 도메인 단량체(각각 804, 806, 808, 및 812, 814, 816)를 각각 함유한다. 상세하게는, 폴리펩타이드 802 또는 810에서, 제1 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(804 또는 812)는 제3 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(808 또는 816)에 연결된 wt 서열(806 또는 814)과 상이한 하전 아미노산을 C_H3 - C_H3 계면에 함유하는 제2 Fc 도메인 단량체에 연결된다. 제3 내지 제6 폴리펩타이드(818, 820, 822, 및 824) 각각은 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체를 함유하고 Fc 도메인 단량체 804, 808, 812 및 816 각각과 Fc 도메인을 각각 형성한다.

도 9는 6개의 폴리펩타이드로 형성된 5개의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물(작제물 10)의 도해이다. 제1 및 제2 폴리펩타이드(902 및 910) 각각은 일렬로 접합된 3개의 Fc 도메인 단량체(각각 904, 906, 908, 및 912, 914, 916)를 함유한다. 상세하게는, 폴리펩타이드 902 또는 910에서, 제1 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(904 또는 912)는 wt 서열(908 또는 916)과 상이한 하전 아미노산을 C_H3 - C_H3 계면에 함유하는 제3 Fc 도메인 단량체에 연결된 제2 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(906 또는 914)에 연결된다. 제3 내지 제6 폴리펩타이드(918, 920, 922, 및 924)는 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체를 각각 함유하고 Fc 도메인 단량체 904, 906, 912 및 914 각각과 Fc 도메인을 각각 형성한다.

도 10은 동일한 서열의 2개의 폴리펩타이드로 형성된 3개의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물(작제물 11)의 도해이다. 2개의 폴리펩타이드(1002 및 1010)는 일렬로 접합된 3개의 Fc 도메인 단량체(각각 1004, 1006, 1008, 및 1012, 1014, 1016)를 각각 함유한다. 상세하게는, 각각의 폴리펩타이드는 C_H3 - C_H3 계면에서 wt 서열(1008 또는 1016)과 상이한 하전 아미노산을 갖는 제3 Fc 도메인 단량체에 연결된 제2 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체(1006 또는 1014)에 연결된 제1 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(1004 또는 1012)를 함유한다. Fc 도메인 단량체 1008 및 1016은 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, Fc 도메인 단량체 1004 및 1006은 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, Fc 도메인 단량체 1012 및 1014는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성한다. 작제물 11은 숙주 세포에서의 단일 폴리펩타이드 서열의 발현으로 형성될 수 있다.

도 11a-11b는 각각 작제물 4의 환원 및 비환원 SDS-PAGE를 나타낸다.

도 12a-12b는 각각 작제물 6의 환원 및 비환원 SDS-PAGE를 나타낸다.

도 13은 작제물 5의 SDS-PAGE 및 작제물 5의 정제 전후에 3개의 Fc 도메인(삼량체), 2개의 Fc 도메인(이량체), 또는 하나의 Fc 도메인(단량체)을 갖는 발현된 단백질의 맥분율을 나타내는 표이다.

도 14a 및 14b는 작제물 1, 5, 및 6을 사용한 THP-1 단핵구 활성화(도 14a) 및 차단(도 14b) 분석을 나타낸다.

도 15는 류마티스 관절염의 K/BxN 모델에서의 IVIG 및 작제물 5와 6의 효과를 나타낸다.

도 16은 만성 ITP 모델에서의 IVIG 및 작제물 5와 6의 효과를 나타낸다.

도 17은 THP-1 단핵구 세포에서의 IVIg 또는 작제물 5에 의한 식균 작용의 억제를 나타낸다.

도 18은 작제물 5(SIF) 및 작제물 5-Fc γ RIIB+ 돌연변이의 발현으로 얻어진 정화 배지의 비환원 SDS-PAGE에 의한 크기 분포를 나타낸다.

도 19는 IgG1 대조, 작제물 5(SIF3), 및 작제물 5-Fc γ RIIB+돌연변이(Fc γ RIIB+)의 Fc 감마 수용체에 대한 상대적 결합을 나타낸다.

도 20은 단핵구 유래 수지상 세포(moDC)상의 CD86 표면 발현을 나타낸다.

도 21은 단핵구 유래 수지상 세포(moDC)상의 CD86 표면 발현을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0093] IgG의 Fc 도메인을 포함하는 치료 단백질은 염증과 면역학적 질환 및 염증성 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다. 본 개시는 둘 이상(예컨대, 2~10개)의 Fc 도메인을 함유하는 다양한 Fc 작제물을 제조하기 위한 조성물 및 방법을 특징으로 한다.

[0094] I. Fc 도메인 단량체

[0095] Fc 도메인 단량체는 힌지 도메인, C_H2 항체 불변 도메인, 및 C_H3 항체 불변 도메인을 포함한다. Fc 도메인 단량체는 면역글로불린 항체 동종형 IgG, IgE, IgM, IgA, 또는 IgD일 수 있다. Fc 도메인 단량체는 또한 임의의 면역글로불린 항체 동종형(예컨대, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, 또는 IgG4)일 수 있다. Fc 도메인 단량체의 이량체는 백혈구의 표면에 위치된 수용체인, Fc 수용체, 예컨대, Fc γ RIIIa에 결합할 수 있는 (본원에서 추가로 정의된) Fc 도메인이다. 본 개시에서, Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인은 서로 결합을 촉진하기 위해 C_H3-C_H3 항체 불변 도메인의 계면에서 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체는 N-말단에 부착된 2개의 다른 불변 도메인, 예컨대, C_L 및 C_H1 항체 불변 도메인을 포함한다(도7). 다른 구현예에서, Fc 도메인 단량체는 C-말단에 부착된 추가 모이어티, 예컨대, 알부민-결합 펩타이드를 포함한다. 본 개시에서, Fc 도메인 단량체는 항체 가변 영역, 예컨대, V_H, V_L, 상보성 결정 영역(CDR), 또는 초가변 영역(HVR)의 임의의 유형을 함유하지 않는다. Fc 도메인 단량체는 상이한 기원 예컨대, 인간, 마우스, 또는 래트일 수 있다.

[0096] II. Fc 도메인

[0097] 본원에 정의된 바와 같이, Fc 도메인은 C_H3 항체 불변 도메인 사이의 상호 작용으로 이량체화된 2개의 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 본 개시에서, Fc 도메인은 항체, 예컨대, V_H, V_L, CDR, 또는 HVR의 가변 영역을 포함하지 않는다. Fc 도메인은 Fc 수용체, 예컨대, Fc-감마 수용체(즉, Fc γ 수용체(Fc γ R)), Fc-알파 수용체(즉, Fc α 수용체(Fc α R)), Fc-엡실론 수용체(즉, Fc ϵ 수용체(Fc ϵ R)), 및/또는 신생아의 Fc 수용체(FcRn)에 결합하는 최소 구조를 형성한다. 일부 구현예에서, 본 개시의 Fc 도메인은 Fc γ 수용체(예컨대, Fc γ RI(CD64), Fc γ RIIA(CD32), Fc γ RIIB(CD32), Fc γ RIIIA(CD16a), 및/또는 Fc γ RIIIB(CD16b)) 및/또는 신생아의 Fc 수용체(FcRn)에 결합한다.

[0098] III. Fc 도메인 변형

[0099] 비변형 Fc 도메인 단량체는 자연 발생 인간 Fc 도메인 단량체 또는 WT 인간 Fc 도메인 단량체일 수 있다. Fc 도메인 단량체는 힌지, CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 포함하는 자연 발생 인간 Fc 도메인 단량체; 또는 유도된 이량체화를 수용하거나 촉진하는 최대 16개(예컨대, 최대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16개)의 아미노산 변형(예컨대, 단일 아미노산 변형)을 가지는 이의 변이체일 수 있다. 일부 경우에 있어서, Fc 도메인은 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하되, 아미노산 변형은 (예컨대, 비변형 Fc 도메인과 비교했을 때) (i) 하나 이상의 Fc 수용체에 대한 결합 친화도, (ii) 효과기 기능, (iii) Fc 도메인 황산화의 수준, (iv) 반감기, (v) 프로테아제 저항성, (vi) Fc 도메인 안정성, 및/또는 (vii) 열화에 대한 감수성 중 하나 이상을 변경한다. 일부 경우에 있어서, Fc 도메인은 16개 이하의 아미노산 변형(예컨대, CH3 도메인에 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16개 이하의 아미노산 변형)을 포함한다.

[0100] 본 개시의 Fc 도메인은 위치 40, 92~103, 113~116, 118, 131, 137~146, 169~175, 196, 199, 203, 206, 211, 214, 217, 219~341, 344~346, 349~370, 372~374, 376~380, 382~405, 407~422, 424, 426~442, 및/또는 445~447에서 선택된 잔기에서 적어도 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100개)의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 아미노산 변형은 아미노산 치환이되, 치환된 아미노산은 천연 아미노산 또는 비천연 아미노산이다. 일부 구현예에서, 아미노산 변형은 적어도 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개)의 잔기가 Fc 도메인에서 결실된 아미노산 결실이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 변형은 적어도 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개)의 잔기가 Fc 도메인 내로 삽입된 아미노산 삽입이다. 아미노산 변형은 다수의 변형의 조합, 예를 들어, 하나 이상의 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입의 조합일 수 있다.

[0101] Fc 수용체 결합 친화도

[0102] 본 개시의 아미노산 변형은 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개)의 Fc 수용체(예컨대, Fc-감마 수용체(Fc γ R), Fc-알파 수용체(Fc α R), Fc-엡실론 수용체(Fc ϵ R), 및/또는 신생아의 Fc 수용체(FcRn))에 대한 Fc 도메인의 결합 친화도를 변경(즉, 증가 또는 감소)시킬 수 있다. 변형 Fc 도메인은 비변형 Fc 도메인과 비교하여

변경된(즉, 증가된 또는 감소된) 친화도로 $Fc\gamma R$ (예컨대, $Fc\gamma RI$ (CD64), $Fc\gamma RIIA$ (CD32), $Fc\gamma RIIB$ (CD32), $Fc\gamma RIIIA$ (CD16a), 및/또는 $Fc\gamma RIIB$ (CD16b)) 및/또는 신생아의 Fc 수용체($FcRn$)에 결합할 수 있다. 변형 Fc 도메인은 비변형 Fc 도메인과 비교하여 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개)의 Fc 수용체에 대한 변경된(즉, 증가된 또는 감소된) 해리 상수(K_d)를 가질 수 있다. 추가로, 변형 Fc 도메인은 비변형 Fc 도메인과 비교하여, 당화(예컨대, 글라이칸(glycan) 변형(예컨대, 만노스, 시알산, 푸코스(Fuc), 및/또는 갈락토스(Gal)))의 변경된(즉, 증가된 또는 감소된) 수준을 가질 수 있다. Fc 변형은 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개)의 Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 친화도를 변경할 수 있는 반면, 적어도 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개)의 다른 Fc 수용체에 대한 친화도를 역변경한다.

[0103] 표 1에 Fc 수용체 결합 친화도를 변경하도록 변형될 수 있는 예시적인 Fc 도메인 잔기가 열거되어 있다. 일부 구현예에서, 표 1에 열거된 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개)의 잔기는 변형되되, 변형 Fc 도메인은 비변형 Fc 도메인과 비교하여 Fc 수용체에 대한 변경된 결합 친화도를 갖는다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 변형은 표 1에 열거된 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개)의 잔기에서 발생하는 아미노산 치환이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 변형은 표 1에 열거된 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개)의 잔기에서 발생하는 아미노산 결실이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 변형은 표 1에 열거된 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개)의 잔기에서 발생하는 아미노산 삽입이다. Fc 도메인 변형은 다수의 변형의 조합일 수 있고, 예를 들어, 변형은 하나 이상의 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입일 포함할 수 있다.

[0104] 표 2에 Fc 수용체에 대한 Fc 도메인 결합 친화도를 변경하는 예시적인 아미노산 변형이 열거되어 있다. 변형 Fc 도메인은 표 2에 열거된 변형 중 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개)을 포함할 수 있다. 또한, 표 2의 변형은 표 1에 열거된 잔기 중 임의의 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개)의 변형과 조합될 수 있다.

[0105] Fc 도메인 변형은 하나 이상(예컨대, 둘, 셋, 넷, 다섯, 또는 여섯)의 Fc 수용체에 대한 변형 Fc 도메인 결합의 친화도를 비변형 Fc 도메인과 비교하여 적어도 1배(예컨대, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배) 만큼 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 변형은 $Fc\gamma$ 수용체(예컨대, $Fc\gamma RI$ (CD64), $Fc\gamma RIIA$ (CD32), $Fc\gamma RIIB$ (CD32), $Fc\gamma RIIIA$ (CD16a), 및/또는 $Fc\gamma RIIB$ (CD16b)) 및/또는 신생아의 Fc 수용체($FcRn$)에 대한 결합 친화도를 증가시킨다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 변형은 $Fc\gamma RIIIA$ (CD16a)에 대한 결합 친화도를 증가시킨다.

[0106] Fc 도메인 변형은 하나 이상(예컨대, 둘, 셋, 넷, 다섯, 또는 여섯)의 Fc 수용체에 대한 변형 Fc 도메인 결합의 친화도를 비변형 Fc 도메인과 비교하여 적어도 1배(예컨대, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배) 만큼 감소시킬 수 있다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 변형은 $Fc\gamma$ 수용체(예컨대, $Fc\gamma RI$ (CD64), $Fc\gamma RIIA$ (CD32), $Fc\gamma RIIB$ (CD32), $Fc\gamma RIIIA$ (CD16a), 및/또는 $Fc\gamma RIIB$ (CD16b)) 및/또는 신생아의 Fc 수용체($FcRn$)에 대한 결합 친화도를 감소시킨다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 변형은 $Fc\gamma RIIB$ (CD32)에 대한 결합 친화도를 감소시킨다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 변형은 $FcRn$ 에 대한 결합 친화도를 감소시킨다.

[0107] Fc 수용체에 대한 변경된 결합 친화도를 갖는 예시적인 Fc 도메인은 이중 돌연변이 S267E/L328F를 함유하는 Fc 단량체를 포함한다. S267E/L328F 돌연변이는 $Fc\gamma RIIB$ 수용체에 대한 IgG1 결합을 유의미하게 그리고 특이적으로 증가시킴을 이전에 보였다(Chu et al. Molecular Immunology. 2008 Sep; 45(15):3926-33).

[0108] 표 1. Fc 수용체 결합 친화도를 변경하도록 변형될 수 있는 Fc 도메인 잔기

Fc 도메인 잔기							
92	172	240	272	304	336	376	413
93	173	241	273	305	337	377	414
94	174	242	274	306	338	378	415
95	175	243	275	307	339	379	416
96	196	244	276	308	340	380	417
97	199	245	277	309	341	382	418
98	203	246	278	310	343	383	419
99	206	247	279	311	344	384	420
100	211	248	280	312	345	385	421
101	214	249	281	313	346	386	422
102	217	250	282	314	350	387	424
103	219	251	283	315	351	388	426
113	220	252	284	316	352	389	427
114	221	253	285	317	353	390	428
115	222	254	286	318	354	391	429
116	223	255	287	319	355	392	430
118	224	256	288	320	356	393	431
131	225	257	289	321	357	394	432
133	226	258	290	322	358	396	433
137	227	259	291	323	359	397	434
138	228	260	292	324	360	398	435
139	229	261	293	325	361	399	436
140	230	262	294	326	362	400	437
141	231	263	295	327	363	401	438
142	232	264	296	328	365	402	439
143	233	265	297	329	366	404	440
144	234	266	298	330	367	405	441
145	235	267	299	331	369	408	442
146	236	268	300	332	370	409	445
169	237	269	301	333	372	410	446
170	238	270	302	334	373	411	447
171	239	271	303	335	374	412	

[0109]

[0110] 표 2. Fc 수용체 결합 친화도를 변경하는 Fc 도메인 변형

아미노산 변형		
ins = 삽입 del = 결실 X = 임의의 아미노산		
100ins+A63A5:A85A5:A5:A42	250;291	322;299
101ins	250;299	323;275
102ins	250T;251L;252M;253I;254S	323;281
103ins	250X;314X	323;284
137ins	250X;314X;428X	323;291
138ins	250X;428X	323;299
139ins	252Y;254T;256E;433K;434F;	324;275
140ins	252Y;254T;256E;433K;434F;436Y	324;281
141ins	252Y;254T;256E;433K;434F;446del	324;284
142ins	252Y;428L	324;291
143ins	252Y;434S	324;299
144ins	255L;396L	325;275
145ins	256T;257P	325;281
146ins	258;275	325;284
169ins	258;281	325;291
170ins	258;284	325;299
171ins	258;291	325S;326A;327A;328F
172ins	258;299	325S;326K;327A;328F
173ins	259I;308F	326;275
174ins	259I;308F	326;281
175ins	259I;308F;428L	326;284
235insA	262;275	326;291
235insD	262;281	326;299
235insG	262;284	326A;I332E;333A
235insL	262;291	326A;333A
235insN	262;299	327;275
235insS	263;275	327;281
235insT	263;281	327;284
235insV	263;284	327;291
254insN	263;291	327;299
281insA	263;299	328;275
281insD	264;275	328;281
281insS	264;281	328;284
281insT	264;284	328;291
297insA	264;291	328;299
297insD	264;299	328D;332E
297insG	264E;297D;332E	328E;332E
297insS	264I;298A;332E	328H;332E

[0111]

아미노산 변형		
ins = 삽입 del = 결실 X = 임의의 아미노산		
326insA	264I;330L;332E	328I;332E
326insD	264I;330Y;332E	328M;332E
326insE	264I;332E	328N;332E
326insG	265;275	328Q;332E
326insT	265;281	328R;236insR
92ins	265;284	328R;236R
93ins	265;291	328T;332E
94ins	265;299	328V;332E
95ins	265A;269A	329;275
96ins	265F;297E;332E	329;281
97ins	265X;269X	329;284
98ins	265X;270X	329;291
99ins	265X;297X	329;299
281insA	265X;327X	330;275
281insD	265Y;297D;299L;332E	330;281
281insS	265Y;297D;332E	330;284
281insT	266;275	330;291
131C;133R;137E;138S;196K;199T; 203D;214R;217S;219Y;220G;221de l;222del;223del;224P;233D;237D ;238D;268D;271G;296D;330R;439E	266;281	330;299
221;275	266;284	330A;331P;339T
221;281	266;291	330L;332E
221;284	266;299	330Y;332E
221;291	267;275	331;275
221;299	267;281	331;281
221del;222del;223del;224del;22 5del;252Y;254T;256E;433K;434F; 446del	267;284	331;284
221E;270E;308A;311H;396L;402D	267;291	331;291
222;275	267;299	331;299
222;281	267;328	332;275
222;284	267E;268F;324T;I332E	332;281
222;291	267E;268F;324T;332E	332;284
222;299	267E;328F	332;291
223;275	267E;332E	332;299
223;281	267L;327S	332X;221X
223;284	267Q;327S	332X;222X
223;291	268;275	332X;223X
223;299	268;281	332X;224X
224;275	268;284	332X;227X
224;281	268;291	332X;228X

[0112]

아미노산 변형		
ins = 삽입 del = 결실 X = 임의의 아미노산		
224; 284	268; 299	332X; 230X
224; 291	268F; 324T; I332E	332X; 231X
224; 299	268F; 324T; 332E	332X; 233X
227; 275	268H; 355R; 419Q; 434N	332X; 234X
227; 281	268H; 355R; 419Q; 434N; I31C; I33R; I37E; I38S; 220C	332X; 235X
227; 284	268N; 396L	332X; 236X
227; 291	268P; 294K; 361S; 382V; 428L	332X; 237X
227; 299	268Q; 309L; 330S; 331S	332X; 238X
228; 275	269; 275	332X; 239X
228; 281	269; 281	332X; 240X
228; 284	269; 284	332X; 241X
228; 291	269; 291	332X; 243X
228; 299	269; 299	332X; 244X
230; 275	269X; 270X	332X; 245X
230; 281	269X; 297X	332X; 246X
230; 284	269X; 327X	332X; 247X
230; 291	270	332X; 249X
230; 299	270E	332X; 250X
231; 275	270; 275	332X; 258X
231; 281	270; 281	332X; 262X
231; 284	270; 284	332X; 263X
231; 291	270; 291	332X; 264X
231; 299	270; 299	332X; 265X
233; 275	270X; 297X	332X; 266X
233; 281	270X; 327X	332X; 268X
233; 284	271; 275	332X; 269X
233; 291	271; 281	332X; 270X
233; 299	271; 284	332X; 271X
233D; 237D; 238D; 264I; 267A; 268E; 271G; 272D; 296D; 439E	271; 291	332X; 272X
233D; 237D; 238D; 264I; 267A; 268E; 271G; 272P; 330R; 439E	271; 299	332X; 273X
233D; 237D; 238D; 264I; 267A; 268E; 271G; 296D; 327G; 330R; 396M; 439E	272; 275	332X; 274X
233D; 237D; 238D; 264I; 267A; 268E; 271G; 296D; 330R; 396L; 439E	272; 281	332X; 275X
233D; 237D; 238D; 264I; 267A; 268E; 271G; 296D; 330R; 396M; 439E	272; 284	332X; 276X
233D; 237D; 238D; 264I; 267A; 268E; 271G; 296D; 330R; 439E	272; 291	332X; 278X

[0113]

아미노산 변형		
ins = 삽입 del = 결실 X = 임의의 아미노산		
233D;237D;238D;264I;267A;268E; 271G;330R;396L;439E	272;299	332X;280X
233D;237D;238D;264I;267A;268E; 271G;330R;396M;439E	273;275	332X;281X
233D;237D;238D;264I;267A;268E; 271G;330R;439E	273;281	332X;283X
233D;237D;238D;264I;267A;268E; 271G;439E	273;284	332X;285X
233D;237D;238D;264I;267G;268E; 271G;330R;439E	273;291	332X;286X
233D;237D;238D;267A;268E;271G; 296D;330R;332T;439E	273;299	332X;288X
233D;237D;238D;268D;271G;296D; 327G;330R;439E	274;275	332X;290X
233D;237D;238D;268D;271G;296D; 330R;332T;439E	274;281	332X;291X
233D;237D;238D;268D;271G;296D; 330R;439E	274;284	332X;293X
233D;238D;264I;267A;268E;271G	274;291	332X;294X
233D;238D;264I;267A;268E;271G; 296D;439E	274;299	332X;295X
233P;234A;235A;237A;238P	275;275	332X;296X
233P;234A;235A;237A;238S	275;281	332X;297X
233P;234V;235A;236del	275;284	332X;298X
233S;234A;235A;237A;238S	275;291	332X;299X
234;275	275;299	332X;300X
234;281	276;275	332X;302X
234;284	276;281	332X;313X
234;291	276;284	332X;317X
234;299	276;291	332X;318X
234A;237A;238S;268A;309L;330S; 331S	276;299	332X;320X
234F;235L;409R	278;275	332X;322X
234L;235L;297N	278;281	332X;323X
234L;235L;297N;327A;330A;331P	278;284	332X;324X
234L;235L;327A;330A;331P	278;291	332X;325X
234L;235L;327A;330A;331P;268H; 274L;355R;356D;358L;419Q	278;299	332X;326X
234L;235L;327A;330A;331P;434N	280;275	332X;327X
234V;237G;297N	280;281	332X;328X
234V;237G;330A	280;284	332X;329X
234V;237G;330A;331P;339T;297N	280;291	332X;330X

[0114]

아미노산 변형		
ins = 삽입 del = 결실 X = 임의의 아미노산		
235;275	280;299	332X;331X
235;281	281;275	332X;333X
235;284	281;281	332X;334X
235;291	281;284	332X;335X
235;299	281;291	332X;336X
236;275	281;299	332X;428X
236;281	283;275	333;275
236;284	283;281	333;281
236;291	283;284	333;284
236;299	283;291	333;291
236A;239D	283;299	333;299
236N;267E	284M;298N;334E;355W;416T	334;275
236S;239D	285;275	334;281
237;275	285;281	334;284
237;281	285;284	334;291
237;284	285;291	334;299
237;291	285;299	334E;292L
237;299	286;275	335;275
237A;239D;I332E	286;281	335;281
237A;239D;332E	286;284	335;284
237D;238D;264I;267A;268E;271G;272P;296D;330R;439E	286;291	335;291
237D;238D;264I;267A;268E;271G;296D;330R;439E	286;299	335;299
237D;238D;264I;267A;268E;271G;330R;439E	288;275	336;275
237D;238D;267A;268E;271G;296D;330R;332T;439E	288;281	336;281
237D;238D;267A;268E;271G;296D;330R;439E	288;284	336;284
237D;238D;267G;268D;271G;296D;330R;439E	288;291	336;291
237D;238D;267G;268E;271G;296D;330R;439E	288;299	336;299
237D;238D;268D;271G;296D;330R;439E	288M;334E	370E;396L
237D;238D;268E;271G;296D;330R;439E	288N;330S;396L	378T;226G
237D;239D;I332E	290;275	378T;230L
237D;239D;332E	290;281	378T;230S
237P;239D;I332E	290;284	378T;230T

[0115]

아미노산 변형		
ins = 삽입 del = 결실 X = 임의의 아미노산		
237P;239D;332E	290;291	378T;241L
237Q;239D;1332E	290;299	378T;264E
237Q;239D;332E	291;275	378T;307P
237S;239D;1332E	291;281	378T;315D
237S;239D;332E	291;284	378T;330V
238	291;291	378T;362R
238;271	291;299	378T;389K
238;275	292;305	378T;389T
238;281	292P	378T;434S
238;284	292P;305I	378T;434Y
238;291	293;275	378T;P228L
238;299	293;281	378T;P228R
238;271;233;330	293;284	378V;226G
238;271;237;330	293;291	378V;230L
238;271;237;268	293;299	378V;230S
238;271;237;268;330	293del;294del	378V;230T
238D	293V;295E	378V;241L
238D;271G	294;275	378V;264E
238D;271G;233D;330R	294;281	378V;307P
238D;271G;237D;330R	294;284	378V;315D
238D;271G;237D;268D	294;291	378V;330V
238D;271G;237D;268D;330R	294;299	378V;362R
238D;264I;267A;268E;271G	295;275	378V;389K
238D;264I;267A;268E;271G;272D; 296D;439E	295;281	378V;389T
238D;264I;267A;268E;271G;296D; 439E	295;284	378V;434S
238D;264I;267A;268E;271G;439E	295;291	378V;434Y
239;275	295;299	378V;P228L
239;281	296;275	378V;P228R
239;284	296;281	380X;434X
239;291	296;284	382V;263E
239;299	296;291	382V;390D;428L
239;332	296;299	392E;382V;397M;428L
239;330;332	296D;297D;332E	392E;396L
239D;1332E	296E;297D;332E	392T;396L
239D;264I;298A;332E	296H;297D;332E	428;275
239D;264I;330L;332E	296N;297D;332E	428;281
239D;264I;332E	296Q;297D;332E	428;284
239D;265F;297D;332E	296T;297D;332E	428;291
239D;265H;297D;332E	297;275	428;299
239D;265I;297D;332E	297;281	428L;252X

[0116]

아미노산 변형		
ins = 삽입 del = 결실 X = 임의의 아미노산		
239D:265L;297D;332E	297;284	428L;308F
239D:265T;297D;332E	297;291	428L;434S
239D:265V;297D;332E	297;299	428L;434X
239D:265Y;297D;332E	297D;298A;330Y;332E	434S;226G
239D:266F;324T;I332E	297D;299E;332E	434S;230L
239D:266F;324T;332E	297D;299F;332E	434S;230S
239D:297D;332E	297D;299H;332E	434S;230T
239D:298A;332E	297D;299I;332E	434S;241L
239D:326A;333A	297D;299L;332E	434S;264E
239D:330L;332E	297D;299V;332E	434S;307P
239D:330Y;332E	297D;330Y;332E	434S;311I
239D:332D	297D;332E	434S;311V
239D:332E	297E;332E	434S;315D
239D:332E;330L	297N;298X;299S	434S;330V
239D:332N	297N;298X;299T	434S;362R
239D:332Q	297S;332E	434S;378T
239E:264I;298A;330Y;332E	297X;327X	434S;378V
239E:264I;330Y;332E	298;275	434S;389K
239E:264I;332E	298;281	434S;389T
239E:265G	298;284	434S;436I
239E:265N	298;291	434S;436V
239E:265Q	298;299	434S;P228L
239E:297D;332E	298A;332E	434S;P228R
239E:332D	298G;299A	434Y;226G
239E:332E	298X;299X;268X;294X;361X;382X;428X	434Y;230L
239E:332N	298X;299X;382X	434Y;230S
239E:332Q	298X;299X;382X;263X	434Y;230T
239N:298A;332E	298X;299X;382X;390X;428X	434Y;241L
239N:330L;332E	298X;299X;392X;382X;397X;428X	434Y;264E
239N:330Y;332E	298X;333X;334X	434Y;307P
239N:332D	298X;334X	434Y;315D
239N:332E	299;275	434Y;330V
239N:332N	299;281	434Y;362R
239N:332Q	299;284	434Y;378T
239Q:264I;332E	299;291	434Y;378V
239Q:332D	299;299	434Y;389K
239Q:332E	300;275	434Y;389T
239Q:332N	300;281	434Y;P228L
239Q:332Q	300;284	434Y;P228R

[0117]

아미노산 변형		
ins = 삽입 del = 결실 X = 임의의 아미노산		
240; 275	300; 291	436I; 434S
240; 281	300; 299	436I; 428L
240; 284	302; 275	436I; 434S
240; 291	302; 281	436V; 428L
240; 299	302; 284	436V; 434S
241; 275	302; 291	A330S; P331S; T339A
241; 281	302; 299	D265Y; N297D; T299L; I332E
241; 284	304D; 290D	F234A; L235A; R409L
241; 291	304D; 284D	F241E; F243Q; V262T; V264E
241; 299	304D; 284E	F241E; F243Q; V262T; V264E; I332E
241E; 243; R1262E; 264R; 332E	304D; 285D	F241E; F243R; V262E; V264R
241E; 243Q; 262T; 264E	304D; 285E	F241E; F243R; V262E; V264R; I332E
241E; 243Q; 262T; 264E; 332E	304D; 286D	F241E; F243Y; V262T; V264R
241E; 243R; 262E; 264R	304D; 286E	F241E; F243Y; V262T; V264R; I332E
241E; 243Y; 262T; 264R	304D; 288D	
241E; 243Y; 262T; 264R; 332E	304D; 288E	F241L; F243L; V262I; V264I
241L; 243L; 262I; 264I	304D; 290E	F241L; V262I
241L; 262I	304D; 305D	F241R; F243Q; V262T; V264R
241R; 243Q; 262T; 264R	304D; 305E	F241R; F243Q; V262T; V264R; I332E
241R; 243Q; 262T; 264R; 332E	304E; 284D	F241W; F243W; V262A; V264A
241W; 243W	304E; 284E	F241Y; F243Y; V262T; V264T
241W; 243W; 262A; 264A	304E; 285D	F241Y; F243Y; V262T; V264T; N297D; I332E
241Y; 243Y; 262T; 264T	304E; 285E	F243L; V262I; V264W
241Y; 243Y; 262T; 264T; 297D; 332E	304E; 286D	R292P
243; 275	304E; 286E	F243L; R292P
243; 281	304E; 288D	F243L; R292P; Y300L
243; 284	304E; 288E	F243L; R292P; P396L
243; 291	304E; 290D	H268G; R355Q; Q419E; N434A
243; 292	304E; 290E	H268Q; R355Q; Q419E; N434A; C131S; R133K; E137G; S138G; C220S
243; 299	304E; 305D	D270E
243; 292; 300	304E; 305E	H433K; N434F
243; 292; 396	305I; 292P	K326I; A327E; L328A
243I; 379L	V305I; R292P	K326I; A327Y; L328G
243I; 379L; 420V	306L; 307T; 308V; 309L; 310H; 311Q; 312D	L234A; L235A; A327G; A330S; P331S

[0118]

아미노산 변형		
ins = 삽입 del = 결실 X = 임의의 아미노산		
243L;255L	307Q;434S	L234A; L235A; A327G; A330S; P331S; H268Q; K274Q; R355Q; I356E; L358M; Q419E
243L;262I;264W	307X;380X	L234A; L235A; A327G; A330S; P331S; N434A
243L;264I	307X;380X;434X	L234A; L235A; N297A;
243L;292P	307X;434X	L234A; L235A; N297A; A327G; A330S; P331S
243L;292P;300L	311I;434S	L234A; L235D; A327G; A330S; P331S
243L;292P;396L	311V;434S	K267E; L328F
243L;292P;300L;305I;396L	313;275	S267E; L328F
243L;292P;300L;396L	313;281	N297D; S298A
243L;305I;378D;404S;396L	313;284	N297D; S298T
244;275	313;291	N297D; T299E; I332E
244;281	313;299	N297D; T299F; I332E
244;284	314L;315N;316G	N297D; T299H; I332E
244;291	314X;428X	N297D; T299I; I332E
244;299	315D;382V;428L	N297D; T299V; I332E
244H;245A;247V	315I;379M;399E	N297H; S298A
245;275	316D;378V;399E	N315D; A330V; A378V; N434Y
245;281	317;275	N315D; A330V; N361D; A378V; N434Y
245;284	317;281	N315D; A378V; N434Y
245;291	317;284	N315D; K334E; A378V; N434Y
245;299	317;291	P113E; V114L; A115L; I nG115/116; S118D; G206A; I211E
246;275	317;299	P228L; N315D; A330V; N361D; A378V; N434Y
246;281	318;275	P228L; P230S; N315D; A330V; N361D; A378V; N434Y
246;284	318;281	P228R; N315D; A330V; N361D; A378V; N434Y
246;291	318;284	P228R; P230S; N315D; A330V; N361D; A378V; N434Y
246;299	318;291	P230A; E233D
247;275	318;299	P230A; E233D; I332E
247;281	319F;352L;396L	P230S; N315D; A330V; N361D; A378V; N434Y
247;284	320;275	P230T; V264E; N315D; K370R; A378V
247;291	320;281	P244H; P245A; P247V

[0119]

아미노산 변형		
ins = 삽입 del = 결실 X = 임의의 아미노산		
247;299	320;284	S239D;I332E
248M;247L;420V	320;291	S239D;A330L;I332E
249;275	320;299	S239D;N297D;I332E;A330Y;F241S;F243H;V262T;V264T
249;281	322;275	V234A;G237A;A330S;P331S;T339A
249;284	322;281	V234A;G237A;A330S;P331S;T339A;N297A
249;291	322;284	V234A;G237A;N297A
249;299	322;291	P238D
250;275	252Y;254T;256E	P238D;P271G
250;281	V264E;N315D;A378V;N390S;G420R;N434Y	P238D;P271G;E233D;A330R
250;284	V264E;N315D;A378V	P238D;P271G;G237D;A330R
	R292P;V305I	P238D;P271G;G237D;H268D
		P238D;P271G;G237D;H268D;A330R

[0120]

[0121]

[0122]

반감기

반감기를 변경하는 Fc 도메인 변형은 FcRn에 대한 변형 Fc 도메인의 결합을, 예를 들어 pH 6.0 및/또는 pH 7.4에서의 상호 작용의 친화도를 변경함으로써 변경할 수 있다. 반감기를 변경하는 아미노산 변형은 FcRn 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합의 pH 의존성을 변경할 수 있다. 표 3에 Fc 도메인의 반감기(예컨대, 혈청 반감기)를 변경하도록 변형될 수 있는 예시적인 Fc 도메인 잔기가 열거되어 있다. 일부 구현예에서, 표 3에 열거된 하나 이상의 잔기(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개)는 변형될 수 있되, 변형 Fc 도메인은 비변형 Fc 도메인과 비교하여 변경된 반감기를 갖는다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 변형은 표 3에 열거된 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개)의 잔기에서 발생하는 아미노산 치환이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 변형은 표 3에 열거된 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개)의 잔기에서 발생하는 아미노산 결실이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 변형은 표 3에 열거된 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개)의 잔기에서 발생하는 아미노산 삽입이다. Fc 도메인 변형은 다수의 변형의 조합일 수 있고, 예를 들어, 변형은 하나 이상의 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입일 포함할 수 있다.

[0123]

표 4에 Fc 도메인 반감기를 변경하는 예시적인 변형이 열거되어 있다. 변형 Fc 도메인은 표 4에 열거된 변형 중 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개)을 포함할 수 있다. 또한, 표 4의 변형은 표 3에 열거된 잔기 위치의 변형과 조합될 수 있다.

[0124]

일부 구현예에서, Fc 도메인 변형은 비변형 Fc 도메인과 비교하여 변형 Fc 도메인의 반감기를 적어도 0.5배(예컨대, 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 또는 10배) 증가시킬 수 있다.

[0125]

일부 구현예에서, Fc 도메인 변형은 비변형 Fc 도메인과 비교하여 변형 Fc 도메인의 반감기를 적어도 0.5배(예컨대, 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 또는 10배) 만큼 감소시킬 수 있다.

[0126] 표 3. 반감기를 변경하도록 변형될 수 있는 Fc 도메인 잔기

Fc 도메인 잔기						
92	141	248	282	314	380	436
93	142	249	284	315	383	438
94	143	250	285	316	385	446
95	144	251	286	317	386	447
96	145	252	287	322	387	
97	146	253	288	330	388	
98	169	254	289	331	389	
99	170	255	290	335	419	
100	171	256	304	339	424	
101	172	257	305	340	426	
102	173	258	306	343	428	
103	174	259	307	344	429	
131	175	260	308	345	430	
133	219	268	309	346	431	
137	220	277	310	355	432	
138	234	279	311	374	433	
139	235	280	312	376	434	
140	236	281	313	378	435	

[0127]

[0128] 표 4. 반감기를 변경하는 Fc 도메인 변형

아미노산 변형		
ins = 삽입 del = 결실 X = 임의의 아미노산		
259I; 308F	258N	345T
434S; 311I	258Q	345N
434S; 311V	279R	345Q
434S; 436I	279H	376S
434S; 436V	279K	376T
H433K; N434F	279D	376N
428L; 434S	279E	376Q
C131X; R133X; C220X; E137X; S138X; H268X; R355X; Q419X	280R	376R
C131X; R133X; C220X; E137X; S138X; H268X; R355X; Q419X; G446del; 447Kdel	280H	376H
C131X; R133X; C220X; E137X; S138X; H268X; R355X; Q419X; A330K; P331X; T339X	280D	376K
C131X; R133X; C220X; E137X; S138X; H268X; R355X; Q419X; A330K; P331X; T339X; G446del; K447del	280E	376D
C219X; C220X	281R	376E
C219X; C220X; H268X; R355X; Q419X	281H	378S
C219X; C220X; H268X; R355X; Q419X; G446del; K447del	281K	383R
C219X; C220X; G446del; K447del	281D	383H
C219S; C220S	281E	383K
C219X; C220X; H268X; R355X; Q419X	282R	383D
C219S; C220S; H268X; R355X; Q419X	282H	383E
C219S; C220S; H268Q; R355Q; Q419E	282D	385R
C219X; C220X; H268X; R355X; Q419X; G446del; K447del	282E	385H
C219S; C220S; G446del; K447del	284S	385K
C219S; C220S; H268X; R355X; Q419X; G446del; K447del	284T	385D
C219S; C220S; H268Q; R355Q; Q419E; G446del; K447del	284N	385E
428L	284Q	389D
434S	284R	389E
251del	284H	424R
253del	284D	424H
255del	284E	424K
285del	285R	424D
286del	285H	424E
287del	285K	426R
288del	285D	426H
289del	285S	426K
290del	285T	426D
308del	285N	426E
309del	285Q	430R
310del	286E	430H

[0129]

아미노산 변형		
ins = 삽입 del = 결실 X = 임의의 아미노산		
322del	286T	430D
312del	286M	430E
313del	287S	430S
314del	287T	430T
385del	287N	430N
386del	287Q	430Q
387del	287R	431R
388del	287H	431H
389del	287K	431K
428del	287D	431D
429del	287E	431E
430del	288R	432S
431del	288H	432T
432del	288K	432N
433del	288D	432Q
434del	288E	434K
435del	304S	434R
436del	304T	434L
251ins	304N	436D
253ins	304Q	436E
255ins	304R	438R
285ins	304H	438H
286ins	304K	438K
287ins	304D	438D
288ins	304E	438E
289ins	305S	285E
290ins	305T	286D
308ins	305N	290E
309ins	305Q	250R
310ins	305R	250K
322ins	305H	251R
312ins	305K	251K
313ins	305D	254S
314ins	305E	255L
385ins	307S	255D
386ins	307T	255M
387ins	307N	260K
388ins	307R	257K
389ins	307H	277R
428ins	307K	277D

[0130]

아미노산 변형		
ins = 삽입 del = 결실 X = 임의의 아미노산		
429ins	307D	277Q
430ins	307E	277K
431ins	308R	281Q
432ins	308H	282K
433ins	308K	287P
434ins	308D	285F
435ins	308E	290D
436ins	309R	306R
436L	309H	306D
252Y;428L	309K	306E
252Y;434S	309D	306K
428L;252X	309E	310L
428L;434X	310R	374R
433K;434F;436H	310H	374K
255V	310K	374L
309N	310D	428R
312I	310E	428Q
386L	310S	428K
252Y	310T	431P
252F	310N	432R
252S	310Q	308F
252W	311R	259I
252T	311H	259I;308F
254T	311K	436I;428L
256S	312R	436I;434S
256R	312H	436V;434S
256Q	312K	436V;428L
256E	312S	259I;308F;428L
256D	312T	436I;434S
309P	312N	252Y;254T;256E
311S	312Q	308C
311E	313R	308Y
311L	313H	308W
433R	313K	428L;308F
433S	313D	308P;434A
433I	313E	234F
433P	315R	235A
433Q	315H	235N
434H	315K	235F
434F	315D	235Q

[0131]

아미노산 변형		
ins = 삽입 del = 결실 X = 임의의 아미노산		
434Y	315E	235V
251D	316R	322A
251E	316H	322D
307Q	316K	322E
308P	317R	322H
378V	317H	322N
430A	317K	322Q
430K	317D	331A
434A	317E	331G
436I	317S	92ins
380A	317T	93ins
250E	317N	94ins
250Q	317Q	95ins
428F	340R	96ins
248R	340H	97ins
248H	340K	98ins
248K	340D	99ins
248D	340E	100ins
248E	343R	101ins
249R	343H	102ins
249K	343K	103ins
251S	343D	137ins
251T	343E	138ins
251N	343S	139ins
251Q	343T	140ins
252N	343N	141ins
252Q	343Q	142ins
255S	344L	143ins
255T	345R	144ins
255N	345H	145ins
255Q	345K	146ins
256K	345D	169ins
257R	345E	170ins
257H	345S	171ins
257D	258T	172ins
257E	175ins	173ins
258S	174ins	252Y; 254T; 256E; 433K; 434F; 436Y

[0132]

[0133]

효과기 기능

[0134]

표 5에 Fc 도메인 효과기 기능(예컨대, 세포 용해(예컨대, 항체-의존성 세포-매개 독성(ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포 독성 활성화(CDC)), 식균 작용(예컨대, 항체 의존성 세포성 식균 작용(ADCP) 및/또는 보체-의존성 세포 독성(CDCC)), 면역 활성화, 및 T-세포 활성화)을 변경하도록 변형될 수 있는 예시적인 Fc 도메인 잔기가 열거되어 있다. 일부 구현예에서, 표 5에 열거된 하나 이상의(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40 개) 잔기는 변형될 수 있되, 변형된 Fc 도메인은 비변형 Fc 도메인과 비교하여 변경된 효과기 기능(예컨대, ADCC, CDC, ADCP, CDCC, 세포 활성화, 및/또는 T-세포 활성화)을 갖는다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 변형은 표 5에 열거된 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개)의 잔기에서 발생하는 아미노산 치환이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 변형은 표 5에 열거된 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개)의 잔기에서 발생하는 아미노산 결실이다. 일부 구현예에서, Fc 변형은 표 5에 열거된 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개)의 잔기에서 발생하는 아미노산 삽입이다.

[0135]

표 6에 Fc 도메인 효과기 기능(예컨대, ADCC, CDC, ADCP, CDCC, 세포 활성화, 및/또는 T-세포 활성화)을 변경하는 예시적인 변형이 열거되어 있다. 변형 Fc 도메인은 표 6에 열거된 변형 중 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5,

6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개)을 포함할 수 있다. 또한, 표 6의 변형은 표 5에 열거된 잔기의 변형과 조합될 수 있다.

[0136] Fc 도메인 변형은 변형 Fc 도메인의 효과기 기능(예컨대, ADCC, CDC, ADCP, CDCC, 세포 활성화, 및/또는 T-세포 활성화)을 비변형 Fc 도메인과 비교하여 적어도 0.5배(예컨대, 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 또는 10배) 증가시킬 수 있다.

[0137] Fc 도메인 변형은 변형 Fc 도메인의 효과기 기능(예컨대, 세포 용해(예컨대, ADCC, CDC, ADCP, CDCC, 세포 활성화, 및/또는 T-세포 활성화))을 비변형 Fc 도메인과 비교하여 적어도 0.5배(예컨대, 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 또는 10배) 만큼 감소시킬 수 있다.

[0138] 표 5. 효과기 기능을 변경하도록 변형될 수 있는 Fc 도메인 잔기

Fc 도메인 잔기					
40	264	297	332	390	436
224	265	298	333	391	439
225	266	299	334	393	440
228	267	300	339	394	441
230	268	301	345	399	442
234	269	304	355	404	445
235	273	305	356	408	446
236	276	306	358	409	447
239	278	307	359	411	
240	279	309	361	412	
241	280	311	362	414	
243	283	312	365	421	
244	285	315	370	422	
246	288	320	372	426	
247	289	322	376	427	
251	290	323	377	428	
252	291	324	378	430	
253	292	325	382	431	
254	293	328	383	432	
258	294	329	386	433	
261	295	330	388	434	
262	296	331	389	435	

[0139]

[0140] 표 6. 효과기 기능을 변경하는 Fc 도메인 변형

아미노산 변형		
ins = 삽입 del = 결실 X = 임의의 아미노산		
224N	301H	411I
224Y	301K	412A
225A	301N	414M
228L	301Q	421S
228P;235E	301R	422I
230S	301S	426F
234A;235A	301T	426P
234F	304G	427F
235A	305A	428T
236F	306F	430K
236N	306I	431S
236Q	307P	432P
236V	309K	433P
236A	309M	435A
236R;328R	309P	435G
239D;378F	311R	435N
239D;378G	312N	435Q
239D;378S	315D	435S
239D;378W	315K	435T
239D;378Y	315S	435Y
239E;378F	320R	439E
239E;378G	322A	439R
239E;378S	322D	440G
239E;378W	322E	441F
239E;378Y	322H	442T
239P	322N	445R
240A	322Q	446A
241H	323A	447E
241L	323F	A330H
241Q	324T	A330L
243G	325A	A378F
243H	328D	A378K
243I	328G	A378T
243L	328K	A378W
244L	328T	D265E
246E	329G	D356
247A	329R	E293D
247L	330H	E294S
251A	330L	E294T
251F	331A	E345
251G	331G	E356

[0141]

아미노산 변형		
ins = 삽입 del = 결실 X = 임의의 아미노산		
251I	332D	E382
251L	332D;261A	E430
251M	332D;378F	F241H
251P	332D;378K	F241Q
251S	332D;378W	G236A
251V	332D;378Y	H435A
251W	332D;435G	H435G
252S	332D;435S	H435S
252T	332E	I253
252W	332K	I332D
252Y	332Q	I332E
254P	333X;334X	I332K
254T	334R	I332Q
258K	355W	K334L
261A	355G	K334R
261Y	355W	K439D;S440H
262L	358T	K439D;S440K
264T	361D	K439D;S440R
265D	361Y	K439E;S440K
265E	362L	K447
265V	364C	L251A
266A	365P	L251G
266F	365Q	L261A
267G	370R	L268P
267N	372L	N376F
268D	376C	N376H
268E	376D	N376K
268N	376E	N376R
268P	376F	N376W
269G	376H	N434A
269K	376K	N434F
273A	376N	N434H
276D	376Q	N434W
278H	376R	N434Y
279M	376S	P247
280N	376T	Q311
283G	376W	Q386
285R	376Y	R301K
288R	377V	R301N
289A	378D	R301Q
290E	378E	R301S

[0142]

아미노산 변형		
ins = 삽입 del = 결실 X = 임의의 아미노산		
291L	378F	R301T
292Q	378H	S239P
293C	378K	S254
293D	378Q	S440W
294C	378R	S440Y
294R	378T	T299A; 297Z
294S	378W	T299C; 297Z
294T	378Y	T299C; N297Z
295C	383N	T299D; 297Z
296C	389S	T299E; 297Z
297C	390D	T299F; 297Z
297D	391C	T299G; 297Z
297G; 356E; 358M	393A	T299H; 297Z
297Q	394A	T299I; 297Z
298C	399G	T299K; 297Z
298N; 300S	399S	T299L; 297Z
298N; 300T	404S	T299M; 297Z
298X; 333X	408G	T299N; 297Z
298X; 334X	409R	T299P; 297Z
299A	40F	T299R; 297Z
299K	301E	T299V; 297Z
300C	Y436	T299W; 297Z
300H	T359	T299X; N297Z
301C	301D	T299Y; 297Z

[0143]

[0144]

안정성 변경

[0145]

Fc 도메인 안정성을 변경하는 것은 열적 안정성(예컨대, 용융 온도 또는 Tm) 및 응집 형성(예컨대, 산성 또는 낮은 pH, 조건 하에서의 응집 형성)에 영향을 줄 수 있다.

[0146]

일부 구현예에서, 변형 Fc 도메인의 열적 안정성은 적어도 약 0.1° C(예컨대, 약 0.25° C, 약 0.5° C, 약 0.75° C, 약 1° C, 약 1.25° C, 약 1.5° C, 약 1.75° C, 약 2° C, 약 3° C, 약 4° C, 약 5° C, 약 6° C, 약 7° C, 약 8° C, 약 9° C, 약 10° C, 약 20° C, 약 30° C, 약 40° C, 또는 약 50° C) 만큼 또는 비변형 Fc 도메인과 비교하여 변경될(즉, 증가될 또는 감소될) 수 있다. 일부 구현예에서, 변형 Fc 도메인의 열적 안정성은 비변형 Fc 도메인과 비교하여 증가된다. 일부 구현예에서, 변형 Fc 도메인의 열적 안정성은 비변형 Fc 도메인과 비교하여 감소된다. 특정 구현예에서, 변형 Fc 도메인은 비변형 Fc 도메인과 비교하여 적어도 1%이상(예컨대, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%)의 응집 특성을 변경(즉, 증가 또는 감소)시켰다. 일부 구현예에서, 변형 Fc 도메인의 응집 특성은 비변형 Fc 도메인과 비교하여 증가하였다. 일부 구현예에서, 응집 특성은 비변형 Fc 도메인과 비교하여 감소하였다.

[0147]

표 7에 Fc 도메인 안정성을 변경하도록 변형될 수 있는 예시적인 Fc 도메인 잔기가 열거되어 있다. 일부 구현예에서, 표 7에 열거된 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개)의 잔기는 변형될 수 있되, 변형 Fc 도메인은 비변형 Fc 도메인과 비교하여 변경된 안정성을 갖는다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 변형은 표 7에 열거된 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개)의 잔기에서 발생하는 아미노산 치환이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 변형은 표 7에 열거된 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개)의 잔기에서 발생하는 아미노산 결실이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 변형은 표 7에 열거된 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개)의 잔기에서 발생하는 아미노산 삽입이다.

[0148]

표 8에 Fc 도메인 안정성을 변경하는 예시적인 변형이 열거되어 있다. 변형 Fc 도메인은 표 8에 열거된 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개)의 변형을 포함할 수 있다. 또한, 표 8의 변형은 표 7에 열거된 잔기의 변형과 조합될 수 있다.

[0149]

Fc 도메인 변형은 비변형 Fc 도메인과 비교하여 변형 Fc 도메인의 안정성을 적어도 0.5배(예컨대, 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 또는 10배) 증가시킬 수 있다.

[0150] Fc 도메인 변형은 비변형 Fc 도메인과 비교하여 변형 Fc 도메인의 안정성을 적어도 0.5배(예컨대, 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 또는 10배) 만큼 감소시킬 수 있다.

[0151] 표 7. 안정성을 변경하도록 변형될 수 있는 Fc 도메인 잔기

Fc 도메인 잔기					
40	252	300	354	368	402
217	262	307	355	370	403
219	264	309	356	392	404
225	266	322	357	394	405
228	267	323	358	395	407
232	273	331	359	396	409
234	275	339	360	397	427
235	277	349	361	398	
236	279	351	362	399	
238	297	352	364	400	
250	299	353	366	401	

[0152]

[0153] 표 8. 안정성을 변경하는 Fc 도메인 변형

아미노산 변형					
ins = 삽입 del = 결실 X = 임의의 아미노산					
217R	228P; 235E	273R	359del	235Q	309L
219N	228P; 235E; 409K	273Y	360del	235V	309M
219Q	228P; 235E; 409L	275F	361del	236S	309P
225I	228P; 235E; 409M	275K	362del	236T	322A
225T	228P; 235E; 409T	275Q	392K	238R	322D
225V	228P; 235P	277E	397del	250E	322E
228E	228P; 235P; 409K	279D	397V	250Q	322H
228E; 235E	228P; 235P; 409L	279N	398del	252S	322N
228E; 235E; 409K	228P; 235P; 409M	279V	399del	252T	322Q
228E; 235E; 409L	228P; 235P; 409T	297D	399S	252W	323F
228E; 235E; 409M	232K	297G; 356E; 358M	400del	252Y	331A
228E; 235E; 409T	232R	297Q	401del	262L	331G
228E; 235P	234F	299K	402del	264T	339A
228E; 235P; 409K	234K	300Y	403del	266F	354del
228E; 235P; 409L	234N	307P	404del	267S	355del
228E; 235P; 409M	234R	309K	409K	267T	356del
228E; 235P; 409T	235A	427F	409L	273K	357del
228P	235E	235P	409M	273Q	
235N	235F	409T	40F	358del	

[0154]

[0155] 열화에 대한 감수성 변경

[0156] 열화에 대한 감수성은 분자를 함유하는 Fc 도메인이 어떻게 저장되고 수송될 수 있는 지에 영향을 줄 수 있다. 온도와 같은 환경적 조건들(예컨대, 온도, 습도, pH)에 대한 Fc 도메인의 감수성을 감소시키는 것은 더 오랜 기간에 걸쳐 보다 손쉽게 수송 가능하고/하거나 저장 가능한 분자를 포함하는 Fc 도메인을 만들 수 있다. 열화에 대한 Fc 도메인 감수성을 변경하도록 변형될 수 있는 예시적인 Fc 잔기는 233, 234, 235, 236, 237, 239, 241, 및 249를 포함한다. 일부 구현예에서, 잔기 233, 234, 235, 236, 237, 239, 241, 및 249로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개)의 잔기는 변형될 수 있되, 변형 Fc 도메인은 비변형 Fc 도메인과 비교하여 변경된 열화에 대한 감수성을 갖는다. 일부 구현예에서, Fc 변형은 233, 234, 235, 236, 237, 239, 241, 및 249로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개)의 잔기 위치에서 발생하는 아미노산 치환이다. 일부 구현예에서, Fc 변형은 233, 234, 235, 236, 237, 239, 241,

및 249로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개)의 잔기 위치에서 발생하는 아미노산 결실이다. 일부 구현예에서, Fc 변형은 233, 234, 235, 236, 237, 239, 241, 및 249로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개)의 잔기 위치에서 발생하는 아미노산 삽입이다.

[0157] 열화에 대한 Fc 도메인 감수성을 변경하는 예시적인 변형은 C233X, D234X, K235X, S236X, T236X, H237X, C239X, S241X, 및 G249X(여기서 X는 임의의 아미노산)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개)의 변형을 포함할 수 있다.

[0158] Fc 도메인 변형은 변형 Fc 도메인의 열화를 비변형 Fc 도메인과 비교하여 적어도 1% 이상(예컨대, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%)으로 감소시킬 수 있다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 변형은 변형 Fc 도메인의 열화를 비변형 Fc 도메인과 비교하여 가열 시에 적어도 1% 이상(예컨대, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%)으로 감소시킬 수 있다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 적어도 한 시간 이상(예컨대, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 1 일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 또는 1주일)의 기간에 걸쳐 가열된다. 일부 구현예에서, Fc 도메인이 가열되는 온도는 적어도 45° C 이상(예컨대, 50° C, 55° C, 60° C, 65° C, 70° C, 75° C, 85° C, 또는 95° C)이다. 변형 Fc 도메인이 감수성인 열화의 수준은 이에 제한되지 않지만, 환원 모 세관 겔 전기영동(reduced Capillary Gel Electrophoresis, rCGE), 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) 및 고성능 크기 배제 크로 마토그래피(high performance size exclusion 크로마토그래피, HPSEC)를 포함하여, 당업자에게 공지된 방법으로 응집, 열화, 또는 단편화의 정도를 평가함으로써 측정될 수 있다.

[0159] 황산화

[0160] Fc 도메인 황산화를 변경하도록 변형될 수 있는 예시적인 Fc 잔기는 잔기 241, 243, 246, 260, 및 301을 포함한다. 일부 구현예에서, 잔기 241, 243, 246, 260, 및 301로 이루어진 군에서 선택되는 하나(예컨대, 1, 2, 3, 4, 또는 5개)의 잔기는 변형될 수 있되, 변형 Fc 도메인은 비변형 Fc 도메인과 비교하여 황산화를 변경하였다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 변형은 잔기 241, 243, 246, 260, 및 301로 이루어진 군에서 선택되는 하나(예컨대, 1, 2, 3, 4, 또는 5개)의 잔기에서 발생하는 아미노산 치환이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 변형은 잔기 241, 243, 246, 260, 및 301로 이루어진 군에서 선택되는 하나(예컨대, 1, 2, 3, 4, 또는 5개)의 잔기에서 발생하는 아미노산 결실이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 변형은 Fc 도메인 잔기 241, 243, 246, 260, 및 301로 이루어진 군에서 선택되는 하나(예컨대, 1, 2, 3, 4, 또는 5개)의 잔기 위치에서 발생하는 아미노산 삽입이다.

[0161] Fc 도메인 황산화를 변경하는 예시적인 변형은 241F, 243F, 246K, 260T, 및/또는 301R을 포함한다. 변형 Fc 도메인은 241F, 243F, 246K, 260T, 및 301R로 이루어진 군에서 선택되는 하나(예컨대, 1, 2, 3, 4, 또는 5개)의 변형을 포함할 수 있다. 이들 변형 중 임의의 하나는 잔기 241, 243, 246, 260, 및/또는 301의 추가 변형과 조합될 수 있다.

[0162] Fc 도메인 변형은 비변형 Fc 도메인과 비교하여 변형 Fc 도메인의 황산화를 적어도 0.5배(예컨대, 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 또는 10배) 증가시킬 수 있다.

[0163] Fc 도메인 변형은 비변형 Fc 도메인과 비교하여 변형 Fc 도메인의 황산화를 적어도 0.5배(예컨대, 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 또는 10배)로 감소시킬 수 있다.

[0164] 프로테아제 저항성

[0165] Fc 도메인은 프로테아제 저항성, 예를 들어, 엔도솜 프로테아제(endosomal protease), 세포외 프로테아제(예컨대, 트립신, 키모트립신, 플라스민), 소화 프로테아제(예컨대, 펩신), 혈청 프로테아제(예컨대, 응고 인자), 백혈구에서 방출된 프로테아제(예컨대, 엘라스타제 및 카텝신 G) 및 조직-특이적 프로테아제(예컨대, 종양-특이적 프로테아제(예컨대 기질 금속단백분해효소)에 대한 저항성을 증가시키도록 변형될 수 있다. 프로테아제 열화에 대한 감수성은 Fc 도메인의 반감기를 조절하는 데 중요한 역할을 할 수 있으며, 증가된 감수성은 더 짧은 반감기에 기여하고 감소된 감수성은 더 긴 반감기에 기여한다. 프로테아제 저항성을 변경하기 위하여, 아미노산 변형은 프로테아제 절단 부위를 포함하거나 이에 영향을 끼치는 Fc 도메인의 영역 내에서 이루어질 수 있다. 대안으로, Fc 도메인의 당화 상태를 변경하는 아미노산 변형은 프로테아제 저항성 및/또는 Fc 도메인의 감수성 특성을 변경할 수 있다.

- [0166] 프로테아제 저항성을 변경하도록 변형될 수 있는 예시적인 Fc 잔기는 233, 234, 235, 236, 237, 239, 243, 267, 268, 292, 300, 324, 326, 332, 및 333을 포함한다. 일부 구현예에서, 233, 234, 235, 236, 237, 239, 243, 267, 268, 292, 300, 324, 326, 332, 및 333에서 선택되는 하나(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개)의 Fc 도메인 잔기는 변형될 수 있되, 비변형 Fc 도메인과 비교하여 변형 Fc 도메인은 변경된 프로테아제 저항성을 갖는다. Fc 도메인 변형은 잔기 233, 234, 235, 236, 237, 239, 243, 267, 268, 292, 300, 324, 326, 332, 및 333에서 선택되는 하나(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개)의 잔기에서 발생하는 아미노산 치환일 수 있다. Fc 변형은 또한 잔기 233, 234, 235, 236, 237, 239, 243, 267, 268, 292, 300, 324, 326, 332, 및 333에서 선택되는 하나(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개)의 잔기 위치에서 발생하는 아미노산 삽입이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 변형은 상술한 것(예컨대, 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입의 조합) 중 임의의 하나의 조합일 수 있다..
- [0167] Fc 도메인 프로테아제 저항성을 변경하는 예시적인 변형은 다음 233P, 234V, 235A, 및 236del; 237A, 239D, 및 332E; 237D, 239D, 및 332E; 237P, 239D, 및 332E; 237Q, 239D, 및 332E; 237S, 239D, 및 332E; 239D, 268F, 324T, 및 332E; 239D, 326A, 및 333A; 239D 및 332E; 243L, 292P, 및 300L; 267E, 268F, 324T, 및 332E; 267E 및 332E; 268F, 324T, 및 332E; 326A, 332E, 및 333A; 및 326A 및 333A 중 임의의 하나(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개)를 포함할 수 있다.
- [0168] Fc 도메인 변형은 비변형 Fc 도메인과 비교하여 변형 Fc 도메인의 프로테아제 저항성을 적어도 1% 이상(예컨대, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%) 증가시킬 수 있다.
- [0169] **IV. 이량체화 선택성 모듈**
- [0170] 본 개시에서, 이량체화 선택성 모듈은 Fc 도메인을 형성하는 2개의 Fc 도메인 단량체의 바람직한 짝짓기를 용이하게 하는 Fc 도메인 단량체의 부분이다. 상세하게는, 이량체화 선택성 모듈은 2개의 Fc 단량체의 상호 작용하는 C_H3 항체 불변 도메인의 계면에서 위치된 아미노산 치환을 포함하는 Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인의 부분이다. 이량체화 선택성 모듈에서, 아미노산 치환은 이들 치환을 위해 선택된 아미노산의 양립성의 결과로서 2개의 C_H3 항체 불변 도메인의 단량체화를 양호하게 한다. 유리한 Fc 도메인의 최종 형성은 이량체화 선택성 모듈을 결여하거나 이량체화 선택성 모듈내의 비양립성 아미노산 치환을 갖는 Fc 도메인 단량체로 형성되는 다른 Fc 도메인에 대해 선택적이다. 아미노산 치환의 이러한 유형은 QuikChange[®] 돌연변이 유발과 같이 당업계에 잘 알려진 통상적인 분자 클로닝 기술을 사용하여 이루어질 수 있다.
- [0171] 일부 구현예에서, 이량체화 선택성 모듈은 C_H3 항체 불변 도메인의 (본원에서 추가로 기술되는) 유전자 조작 함몰부를 포함한다. 다른 구현예에서, 이량체화 선택성 모듈 C_H3 항체 불변 도메인의 (본원에서 추가로 기술되는) 유전자 조작 돌출부를 포함한다. 선택적으로 Fc 도메인을 형성하기 위하여, 양립 가능한 이량체화 선택성 모듈을 갖는 2개의 Fc 도메인 단량체, 예컨대, 유전자 조작 함몰부를 함유하는 하나의 C_H3 항체 불변 도메인 및 유전자 조작 돌출부를 함유하는 다른 하나의 C_H3 항체 불변 도메인은 결합하여 Fc 도메인 단량체의 돌출부-함몰부 쌍을 형성한다.
- [0172] 다른 구현예에서, 양하전 아미노산 치환을 함유하는 이량체화 선택성 모듈을 갖는 Fc 도메인 단량체 및 음하전 아미노산 치환을 함유하는 이량체화 선택성 모듈을 갖는 Fc 도메인 단량체는 (본원에서 추가로 기술되는) 하전 아미노산의 유리한 정전기 스티어링(정전기 스티어링)을 통해 선택적으로 결합하여 Fc 도메인을 형성할 수 있다. 특이적 이량체화 선택성 모듈은 아래에서 더 기술되는 표 1 및 2에 제한 없이, 추가로 열거되어 있다.
- [0173] 다른 구현예에서, 2개의 Fc 도메인 단량체는 잔기 C_H3 도메인 사이의 계면에서 하전된 잔기의 고리 내의 적어도 2개의 위치에 동일한 역전하 돌연변이를 함유하는 이량체화 선택성 모듈을 포함한다. 2개의 Fc 도메인 단량체 잔기의 둘 이상의 상보적인 쌍의 두 구성원의 전하를 서로 바꿈으로써, 돌연변이된 Fc 도메인 단량체는 동일한 돌연변이 서열의 Fc 도메인 단량체에 상보적으로 남아있지만, 이들 돌연변이가 없는 Fc 도메인 단량체에 더 낮은 상보성을 갖는다. 하나의 구현예에서, Fc 도메인은 이중 돌연변이 K409D/D339K, K392D/D399K, E357K/K370E,

D356K/K439D, K409E/D339K, K392E/D399K, E357K/K370D, 또는 D356K/K439E를 포함하는 Fc 단량체를 포함한다. 또 다른 구현예에서, Fc 도메인은 이중 돌연변이, 예컨대, K409D/D399K/E357K/K370E의 임의의 쌍을 결합하는 4 중 돌연변이를 포함하는 Fc 단량체를 포함한다.

[0174] 이러한 Fc 도메인의 형성은 C_{H3} 항체 불변 도메인의 양립 가능한 아미노산 치환에 의해 촉진된다. 양립 불가능한 아미노산 치환을 함유하는 2개의 이량체화 선택성 모듈, 예컨대, C_{H3} - C_{H3} 계면에서 유전자 조작 함몰부를 함유하는 둘 모두, 유전자 조작 돌출부를 함유하는 둘 모두, 또는 동일한 하전 아미노산을 함유하는 둘 모두는 Fc 도메인의 형성을 촉진하지 않는다.

[0175] 또한, 정의된 Fc 도메인 단량체를 갖는 Fc 도메인의 형성을 촉진하는 데 사용된 다른 방법은 제한 없이, 이중이량체를 형성하도록 류신 지퍼(zipper)의 단량체 α -헬릭스의 C-말단 융합을 Fc 도메인 단량체 각각에 포함하는 LUZ-Y 접근법(미국 특허 출원 공개 번호 제W02011034605호)뿐 아니라, IgA 및 IgG C_{H3} 서열의 교차 조각을 각각 포함하는 이중이량체 Fc 도메인 단량체를 갖는 Fc 도메인을 생성하는 가닥-교환 조작된 도메인(SEED) 바디 접근법(Davis et al., *Protein Eng Des Sel.* 23:195-202, 2010)을 포함한다.

[0176] V. 유전자 조작 함몰부 및 유전자 조작 돌출부

[0177] 유전자 조작 함몰부 및 유전자 조작 돌출부(또는 "놉-인투-홀(knob-into-hole)" 전략)은 Carter 및 동료 연구자들에 의해 기술되었다(Ridgway et al., *Protein Eng.* 9:617-612, 1996; Atwell et al., *J Mol Biol.* 270:26-35, 1997; Merchant et al., *Nat Biotechnol.* 16:677-681, 1998). 놉과 홀의 상호작용은 이중이량체 형성을 용이하게 하되, 놉-놉과 홀-홀 상호작용은 입체적 충돌 및 양호한 상호작용의 결실로 인해 동종이량체 형성을 저해한다. "놉-인투-홀" 기술은 미국 특허 번호 제5,731,168호에도 개시되어 있다.

[0178] 본 개시에서, 유전자 조작 함몰부 및 유전자 조작 돌출부 본원에 기술된 Fc 작제물의 제조에 사용된다. 유전자 조작 함몰부는 단백질의 원래의 아미노산이 더 작은 측쇄 체적을 갖는 상이한 아미노산으로 대체될 때 생성되는 빈 공간이다. 유전자 조작 돌출부는 단백질의 원래의 아미노산이 더 큰 측쇄 체적을 갖는 상이한 아미노산으로 대체될 때 생성되는 용기이다. 상세하게는, 대체된 아미노산은 Fc 도메인 단량체의 C_{H3} 항체 불변 도메인에 있고 2개의 Fc 도메인 단량체의 이량체화에 관여한다. 일부 구현예에서, 하나의 C_{H3} 항체 불변 도메인의 유전자 조작 함몰부는 또 다른 C_{H3} 항체 불변 도메인의 유전자 조작 돌출부를 수용하도록 생성되어, C_{H3} 항체 불변 도메인 둘 모두는 2개의 Fc 도메인 단량체의 이량체화를 촉진하거나 용이하게 하는 (상술한) 이량체화 선택성 모듈로서 작용하게 된다. 다른 구현예에서, 하나의 C_{H3} 항체 불변 도메인의 유전자 조작 함몰부는 또 다른 C_{H3} 항체 불변 도메인의 원래의 아미노산을 더 잘 수용하도록 생성된다. 또 다른 구현예에서, 하나의 C_{H3} 항체 불변 도메인의 유전자 조작 돌출부는 또 다른 C_{H3} 항체 불변 도메인의 원래의 아미노산과 추가 상호작용을 형성하도록 생성된다.

[0179] 유전자 조작 함몰부는 타이로신 또는 트립토판과 같은 더 큰 측쇄를 함유하는 아미노산을 알라닌, 발린, 또는 트레오닌과 같은 더 작은 측쇄를 함유하는 아미노산으로 치환함으로써 구성될 수 있다. 상세하게는, (상기에 추가로 기술된) 일부 이량체화 선택성 모듈은 C_{H3} 항체 불변 도메인에 Y407V와 같은 유전자 조작 함몰부를 함유한다. 이와 유사하게, 유전자 조작 돌출부는 더 작은 측쇄를 함유하는 아미노산을 더 큰 측쇄를 함유하는 아미노산으로 치환함으로써 구성될 수 있다. 상세하게는, (상기에 추가로 기술된) 일부 이량체화 선택성 모듈은 C_{H3} 항체 불변 도메인에 Y366W와 같은 유전자 조작 돌출부를 함유한다. 본 개시에서, 유전자 조작 함몰부 및 유전자 조작 돌출부는 또한 이중이량체 형성을 강화하기 위해 C_{H3} 도메인간 이황화 결합 조작과 결합된다. 상세하게는, 함몰부 Fc는 Y349C 돌연변이를 함유하고, 돌출부 Fc는 S354C 돌연변이를 함유한다. 다른 유전자 조작 함몰부 및 유전자 조작 돌출부, 이황화 결합 조작 또는 구조 계산(혼합 HA-TF)과 함께 제한 없이 표 9에 포함된다.

[0180] 표 9

전략	Fc 도메인 단량체 1의 CH ₃ 항체 불변 도메인	Fc 도메인 단량체 2의 CH ₃ 항체 불변 도메인	참고 문헌
유전자 조작 함몰부 및 돌출부(“놉-인-투-홀(knob-into-hole)”))	Y407T	T366Y	US 8,216,805
	Y407A	T366W	US 8,216,805
	F405A	T394W	US 8,216,805
	Y407T	T366Y	US 8,216,805
	T394S	F405W	US 8,216,805
	T394W:Y407T	T366Y:F405A	US 8,216,805
	T394S:Y407A	T366W:F405W	US 8,216,805
	T366W:T394S	F405W:Y407A	US 8,216,805
유전자 조작 함몰부 및 돌출부(“놉-인-투-홀”), S-S 조작	T366S:L368A:Y407V:Y349C	T366W:S354C	Zeidler et al., <i>J immunol.</i> 163:1246-52,1999
혼합 HA-TF	S364H:F405A	Y349T:T394F	WO2006106905

[0181]

[0182] 상이한 아미노산 잔기를 갖는 C_H3 항체 불변 도메인의 원래의 아미노산 잔기를 치환하는 것은 원래의 아미노산 잔기를 인코딩하는 핵산을 변경함으로써 달성될 수 있다. 치환될 수 있는 원래의 아미노산 잔기 수의 상한은 계면에서의 충분한 상호작용이 여전히 유지되는 것을 고려하면 C_H3 항체 불변 도메인의 계면에서의 잔기의 총 수이다.

[0183] VI. 정전기 스티어링

[0184] 정전기 스티어링은 보다 고도로 정렬된 단백질 분자의 형성을 조절하기 위해 펩타이드, 단백질 도메인, 및 단백질의 반대로 하전된 아미노산 사이의 유리한 정전기 상호작용의 이용이다. 이중 특이적 항체의 생성에서 이중이량체 형성을 위하여 동중이량체의 형성을 감소시키는 항체 도메인의 상호작용을 변경하는 정전기 스티어링 효과를 이용하는 방법은 미국 특허 출원 공개 번호 제2014-0024111호에 개시되어 있다.

[0185] 본 개시에서, 정전기 스티어링은 Fc 도메인 단량체의 이량체화 및 Fc 작제물의 형성을 조절하는 데 사용된다. 특히, 정전기 스티어링을 사용하는 Fc 도메인 단량체의 이량체화를 조절하기 위하여, C_H3-C_H3 계면을 구성하는 하나 이상의 아미노산 잔기는 양하전 또는 음하전 아미노산 잔기로 치환되어 도입된 특정 하전 아미노산에 따라 상호작용은 유리하거나 불리하게 된다. 일부 구현예에서, 계면의 양하전 아미노산, 예를 들어 라이신, 아르기닌, 또는 히스티딘은 아스파르트산 또는 글루탐산과 같은 음하전 아미노산으로 치환된다. 다른 구현예에서, 계면의 음하전 아미노산은 양하전 아미노산으로 치환된다. 하전 아미노산은 상호작용 C_H3 항체 불변 도메인 중 하나, 또는 둘 다에 도입될 수 있다. 하전 아미노산을 상호작용 C_H3 항체 불변 도메인에 도입함으로써, 하전 아미노산 사이의 상호작용으로 발생한 정전기 스티어링 효과에 의해 조절되는 Fc 도메인 단량체의 이량체를 선택적으로 형성할 수 있는 (상기에서 추가로 기술된) 이량체화 선택성 모듈이 생성된다.

[0186] 하나의 특정 실시예에서, 역전하를 포함하는 이량체화 선택성 모듈을 생성하도록, C_H3 항체 불변 도메인의 아미노산 Asp399는 Lys으로 치환되고, 아미노산 Lys409는 Asp로 치환된다. Fc 도메인 단량체의 이중이량체화는 제한 없이 표 10에 포함된 전하 잔기 쌍과 같은 2개의 Fc 도메인 단량체의 상이하지만 양립 가능한 돌연변이를 도입함으로써 촉진될 수 있고, Fc 도메인 단량체의 동중이량체화는 이중 돌연변이 K409D/D339K 또는 K392D/D339K와 같은 대칭적인 방식으로 Fc 도메인 단량체들 다에 동일한 돌연변이를 도입함으로써 촉진될 수 있다.

[0187] 표 10

Fc 도메인 단량체 1의 CH ₃ 항체 불변 도메인	Fc 도메인 단량체 2의 CH ₃ 항체 불변 도메인	참고 문헌
K409D	D399K	US 2014/0024111
K409D	D399R	US 2014/0024111
K409E	D399K	US 2014/0024111
K409E	D399R	US 2014/0024111
K392D	D399K	US 2014/0024111
K392D	D399R	US 2014/0024111
K392E	D399K	US 2014/0024111
K392E	D399R	US 2014/0024111
K409D:K392D	D399K:E356K	Gunasekaran et al., <i>J Biol Chem.</i> 285:19637-46, 2010
K370E:K409D:K439E	E356K:E357K:D399K	Martens et al., <i>Clin Cancer Res.</i> 12:6144-52, 2006

[0188]

[0189] VII. 링커

[0190]

본 개시에서, 링커는 폴리펩타이드 또는 단백질 도메인 및/또는 결합된 비단백질 모이어티 사이의 결합 또는 연결을 기술하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 링커는 적어도 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 결합 또는 연결이고, 링커는 제1 Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인의 C-말단을 제2 Fc 도메인 단량체의 힌지 도메인의 N-말단에 연결하여, 2개의 Fc 도메인 단량체가 일련 연결로 서로 접합된다. 다른 구현예에서, 링커는 Fc 도메인 단량체와 그에 부착되는 임의의 다른 단백질 도메인 사이의 결합이다. 예를 들어, 링커는 Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인의 C-말단을 알부민-결합 펩타이드의 N-말단에 부착시킬 수 있다. 또 다른 실시예에서, 링커는 C_H1 항체 불변 도메인의 C-말단을 Fc 도메인 단량체의 힌지 도메인의 N-말단에 연결시킬 수 있다. 또 다른 구현예에서, 링커는 2개의 개별 단백질 도메인(Fc 도메인을 포함하지 않음)을 연결할 수 있고, 예를 들어, C_L 항체 불변 도메인의 C-말단은 링커를 통해 C_H1 항체 불변 도메인의 N-말단에 부착될 수 있다.

[0191]

링커는 단순 공유 결합, 예컨대, 펩타이드 결합일 수 있거나, 합성 중합체, 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 중합체일 수 있거나, 화학 반응으로 생성된 임의의 종류의 결합, 예컨대 화학적 컨쥬게이션일 수 있다. 링커가 펩타이드 결합인 경우, 하나의 단백질 도메인의 C-말단의 카복실산기는 펩타이드 결합을 형성하는 축합 반응에서 또 다른 단백질 도메인의 N-말단에서 아미노기와 반응할 수 있다. 상세하게는, 펩타이드 결합은 당업계에 잘 알려진 통상적인 유기 화학 반응을 통한 합성 수단으로 형성될 수 있거나 숙주 세포에서 천연 생성하여 형성될 수 있되, 단백질 둘 다의 DNA 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열, 예컨대, 직접 연결인 2개의 Fc 도메인 단량체는 필수 분자 기구, 예컨대, 숙주 세포의 DNA 중합효소 및 리보솜에 의해 단백질 둘 다를 인코딩하는 인접 폴리펩타이드로 직접 전사 및 번역될 수 있다.

[0192]

링커가 합성 중합체, 예컨대, PEG 중합체인 경우, 중합체는 2개의 단백질의 연결 단부의 말단 아미노산과 반응하는 각각의 단부의 반응성 화학 작용기로 기능화될 수 있다.

[0193]

(상술한 펩타이드 결합을 제외하고) 링커가 화학 반응으로 만들어지는 경우, 화학 작용기, 예컨대, 아민, 카복실산, 에스터, 아지드, 또는 당업계에서 통상 사용되는 기타 작용기는 하나의 단백질의 C-말단 및 또 다른 단백질의 N-말단에 각각 합성되어 부착될 수 있다. 이어서 2개의 작용기는 합성 화학 수단을 통해 반응하여 화학 결합을 형성하여, 2개의 단백질을 함께 연결할 수 있다. 이러한 화학적 컨쥬게이션 절차는 당업자에게 통상적인 것이다.

[0194]

스페이서

[0195]

본 개시에서, 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 링커는 3~200개의 아미노산(예컨대, 3~150개, 3~100개, 3~60개, 3~50개, 3~40개, 3~30개, 3~20개, 3~10개, 3~8개, 3~5개, 4~30개, 5~30개, 6~30개, 8~30개, 10~20개, 10~30개, 12~30개, 14~30개, 20~30개, 15~25개, 15~30개, 18~22개, 및 20~30개의 아미노산)을 포함하는 아미노산 스페이서일 수 있다. 적합한 펩타이드 스페이서는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, 글라이신 및 세린과 같은 가요

성 아미노산 잔기를 함유하는 펩타이드 링커를 포함한다. 특정 구현예에서, 스페이서는 모티프, 예컨대, GS, GGS, GGGGS(서열 번호 1), GSGG(서열 번호 2), 또는 SGGG(서열 번호 3)의 다중 모티프 또는 반복 모티프를 함유할 수 있다. 특정 구현예에서, 스페이서는 GS, 예컨대, GS, GSGS(서열 번호 4), GSGSGS(서열 번호 5), GSGSGSGS(서열 번호 6), GSGSGSGSGS(서열 번호 7), 또는 GSGSGSGSGSGS(서열 번호 8)의 모티프를 포함하는 2 내지 12개의 아미노산을 함유할 수 있다. 특정 다른 구현예에서, 스페이서는 GGS, 예컨대, GGS, GSGSGS(서열 번호 9), GSGSGSGS(서열 번호 10), 및 GSGSGSGSGS(서열 번호 11)의 모티프를 포함하는 3 내지 12개의 아미노산을 함유할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 스페이서는 GSGG(서열 번호 12), 예컨대, GSGG(서열 번호 13), GSGGGSGG(서열 번호 14), 또는 GSGGGSGGGSGG(서열 번호 15)의 모티프를 포함하는 4 내지 12개의 아미노산을 함유할 수 있다. 다른 구현예에서, 스페이서는 GGGGS(서열 번호 16), 예컨대, GGGSGGGSGGGSGG(서열 번호 17)의 모티프를 함유할 수 있다. 다른 구현예에서, 스페이서는 또한 글라이신 및 세린외의 아미노산, 예컨대, GENLYFQSGG(서열 번호 18), SACYCELS(서열 번호 19), RSIAT(서열 번호 20), RPACKIPNDLKQKVMNH(서열 번호 21), GSAGSGSGSGSGSGSGSGTGTAGGTGSGSGTGS(서열 번호 22), AAANSSIDLISVPVDSR(서열 번호 23), 또는 GSGSGGSEGGSEGGSEGGSEGGSEGGSEGGSGGGS(서열 번호 24)를 함유할 수 있다. 본 개시의 특정 구현예에서, 12-아미노산 또는 20-아미노산 펩타이드 스페이서는 2개의 Fc 도메인 단량체를 일렬 연결로 연결하는 데 사용되고(도 4 내지 도 6), 12-아미노산 및 20-아미노산 펩타이드 스페이서는 각각 서열 GGGSGGGSGGGS(서열 번호 25) 및 SGGSGGGSGGGSGGGSGGG(서열 번호 26)로 이루어진다. 다른 구현예에서, 서열 GSGGGSGGGSGGGSGGGS(서열 번호 27)로 이루어진 18-아미노산 펩타이드 스페이서는 CL 및 CH1항체 불변 도메인을 연결하는 데 사용된다(도 7a 내지 도 7b). 특정 구현예에서, 스페이서는 GGGG(서열 번호 51), 예컨대, GGGGGGGG(서열 번호 52), GGGGGGGGGGGG(서열 번호 53), GGGGGGGGGGGGGGGG(서열 번호 54), 또는 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG(서열 번호 55)의 모티프를 함유할 수 있다. 특정 구현예에서, 스페이서는 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG(서열 번호 55)이다.

[0196] VIII. 혈청 단백질-결합 펩타이드

[0197] 혈청 단백질 펩타이드에 결합하는 것은 단백질 의약품의 약물동력학을 개선할 수 있고, 특히 본원에 기술된 Fc 작제물 혈청 단백질-결합 펩타이드와 융합될 수 있다.

[0198] 하나의 실시예로서, 본원에 기술된 방법 및 조성물에서 사용될 수 있는 알부민-결합 펩타이드는 당업계에 일반적으로 알려져 있다. 하나의 구현예에서, 알부민 결합 펩타이드는 DICLPRWGCLW(서열 번호 28)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다. 하나의 구현예에서, 알부민 결합 펩타이드는 최대 10개(예컨대, 최대 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개)의 단일 아미노산 변형(예컨대, 치환, 예컨대, 보존성 치환)을 갖는 DICLPRWGCLW(서열 번호 28)의 서열을 포함하거나 이로써 이루어지거나 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0199] 본 개시에서, 알부민-결합 펩타이드는 작제물의 특정 폴리펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 부착될 수 있다. 하나의 구현예에서, 알부민-결합 펩타이드는 작제물 1, 2, 3, 또는 7A(각각 도 1, 도 2, 도 3, 및 도 7a)의 하나 이상의 폴리펩타이드의 C-말단에 부착될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 알부민-결합 펩타이드는 작제물 4, 5, 및 6(각각 도 4, 도 5, 및 도 6)에 일렬 연결로 연결된 2개의 Fc 도메인 단량체를 인코딩하는 폴리펩타이드의 C-말단에 융합될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 알부민-결합 펩타이드는 작제물 4 및 6(각각 도 4 및 도 6)에 나타난 일렬 연결로 연결된 2개의 Fc 도메인 단량체를 인코딩하는 폴리펩타이드의 제2 Fc 도메인 단량체에 접합되는 Fc 도메인 단량체의 C-말단에 부착될 수 있다. 알부민-결합 펩타이드는 Fc 작제물에 유전자 융합될 수 있거나 또는 Fc 작제물에 화학적 수단, 예컨대, 화학적 컨쥬게이션을 통해 부착될 수 있다. 원하는 경우, 스페이서는 Fc 작제물과 알부민-결합 펩타이드 사이에 삽입될 수 있다. 이론에 구속되지 않지만, 본 개시의 Fc 작제물의 알부민-결합 펩타이드를 포함시켜 혈청 알부민에 대한 이의 결합을 통해 치료 단백질을 오랫동안 유지할 수 있음이 기대된다.

[0200] IX. Fc 작제물

[0201] 일반적으로, 본 개시는 2~10개의 Fc 도메인(예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 Fc 도메인; 2~8개의 Fc 도메인, 2~6개의 Fc 도메인, 2~4개의 Fc 도메인, 2~3개의 Fc 도메인, 5~10개의 Fc 도메인, 5~8개의 Fc 도메인, 또는 5~6개의 Fc 도메인)을 갖는 Fc 작제물을 특징으로 한다. 이들은 Fc 수용체, 예컨대, Fc γ RIIIa에 대한 단일 야생형 Fc 도메인보다 더 큰 결합 친화도 및/또는 친화력을 가질 수 있다. 본 개시는 2개의 상호작용 C_H3 항체 불변 도메인의 계면에서 아미노산 조작 방법을 개시하여, Fc 도메인의 2개의 Fc 도메인 단량체는 서로 선택적으로 이량체를 형성함으로써, 원치 않는 다량체 또는 응집의 형성을 방지한다. Fc 작제물은 Fc 도메인을 형성하는 Fc 도메인 단량체의 각각의 쌍으로 짝수의 Fc 도메인 단량체를 포함한다. Fc 작제물은 2개의 Fc 도메인

단량체의 이량체로 형성된 하나의 작용성 Fc 도메인을 최소한으로 포함한다.

[0202] 일부 구현예에서, Fc 작제물은 2개의 Fc 도메인 단량체의 이량체를 포함하는 하나의 Fc 도메인을 함유한다(도 1 내지 도 3 및 도 7a). 상호작용 C_H3 항체 불변 도메인은 변형되지 않을 수 있거나(도 1) 또는 그의 계면에 아미노산 치환을 함유할 수 있다. 상세하게는, 아미노산 치환은 유전자 조작 함몰부(도 2), 유전자 조작 돌출부(도 2), 또는 하전 아미노산(도 3)일 수 있다.

[0203] 다른 구현예에서, Fc 작제물은 3개의 폴리펩타이드로 형성된 2개의 Fc 도메인(도 4 및 도 6)을 함유한다. 제1 폴리펩타이드는 링커를 통해 접합된 일렬 연결로 접합된 2개의 Fc 도메인 단량체를 함유하고, 제2 및 제3 폴리펩타이드는 하나의 Fc 도메인 단량체를 함유한다. 제2 및 제3 폴리펩타이드는 동일한 폴리펩타이드일 수 있거나 상이한 폴리펩타이드일 수 있다. 도 4는 이러한 Fc 작제물의 실시예를 도시한다. 제1 폴리펩타이드 링커를 통해 일렬 연결로 접합된 2개의 야생형 Fc 도메인 단량체를 함유하고, 제2 및 제3 폴리펩타이드는 하나의 야생형 Fc 도메인 단량체를 각각 함유한다. 제1 폴리펩타이드의 Fc 도메인 단량체 중 하나는 제2 폴리펩타이드를 갖는 제1 Fc 도메인을 형성하는 반면, 제1 폴리펩타이드의 다른 Fc 도메인 단량체는 제3 폴리펩타이드를 갖는 제2 Fc 도메인을 형성한다. 제2 및 제3 폴리펩타이드는 서로 부착되거나 연결되지 않는다. 도 6은 도 4의 작제물과 유사한 Fc 작제물을 도시한다. 도 6에서, 제1 폴리펩타이드의 Fc 도메인 단량체 둘 다는 C_H3 항체 불변 도메인의 유전자 조작 돌출부를 함유하는 반면, 제2 및 제3 폴리펩타이드는 C_H3 항체 불변 도메인의 유전자 조작 함몰부를 함유한다. 유전자 조작 돌출부-함몰부 C_H3-C_H3 계면은 Fc 도메인 단량체의 이중이량체의 형성을 용이하게 하고 원치 않는 다량체의 비제어 형성을 방지한다. 본원에 추가로 기술된 바와 같이, 실시예 4에서, 조작된 C_H3 항체 불변 도메인을 포함하는 이량체화 선택성 모듈은 이량체화 선택성 모듈을 결여한 Fc 도메인 단량체로 Fc 작제물을 형성하는 것을 기술하는 실시예 3에 보이는 원치 않는 다량체의 형성을 방지한다.

[0204] 또한, 다른 구현예에서, Fc 작제물은 4개의 폴리펩타이드로 형성된 3개의 Fc 도메인을 함유할 수 있다(도 5). 제1 및 제2 폴리펩타이드는 제3 및 제4 폴리펩타이드와 동일하거나 상이할 수 있다. 본 실시예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 둘 다는 링커를 통해 일렬 연결로 연결된 2개의 Fc 도메인 단량체를 인코딩하되, 하나의 Fc 도메인 단량체는 C_H3 항체 불변 도메인의 하전 아미노산 치환을 함유하는 반면, 다른 Fc 도메인 단량체는 C_H3 항체 불변 도메인의 돌출부를 함유한다. 제3 및 제4 폴리펩타이드 둘 다는 함몰부를 갖는 Fc 도메인 단량체를 인코딩한다. 제1 및 제2 폴리펩타이드는 그의 C_H3 항체 불변 도메인의 역전하의 상호작용을 통해 서로 제1 Fc 도메인을 형성한다. 제2 및 제3 Fc 도메인은 제1 및 제2 폴리펩타이드의 돌출부와 제3 및 제4 폴리펩타이드의 함몰부 사이의 함몰부에-돌출부 상호작용으로 형성된다. 본 Fc 작제물의 각각의 Fc 도메인 단량체는 특이적 Fc 도메인의 형성을 촉진하는 이량체화 선택성 모듈을 함유한다.

[0205] 또 다른 구현예에서, 단일 폴리펩타이드는 이량체(예컨대, 작제물 7A; 도 7a) 또는 다량체(예컨대, 작제물 7B; 도 7b)를 C_H3 항체 불변 도메인 사이의 상호작용을 통해서가 아니라, C_L 불변 도메인 및 C_H1 불변 도메인 사이의 상호작용을 통해서 형성할 수 있다. 도 7b는 하나의 Fc 도메인의 C_L 도메인이 이웃하는 Fc 도메인의 C_H1 도메인과 상호작용하는 다수의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물을 도시한다.

[0206] 또 다른 구현예에서, Fc 작제물은 6개의 폴리펩타이드로 형성되는 5개의 Fc 도메인을 함유할 수 있다. 2개의 실시예가 도 8 및 도 9에 도시된다. 이들 도시된 Fc 작제물은 6개의 폴리펩타이드로 구성되고, 폴리펩타이드 중 4개는 동일한 핵산으로 인코딩될 수 있고, 나머지 2개의 폴리펩타이드도 또한 동일한 핵산으로 인코딩될 수 있다. 그 결과, 이들 Fc 작제물은 적합한 숙주 세포의 2개의 핵산의 발현에 의해 제조될 수 있다.

[0207] 또 다른 구현예에서, 둘 이상의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물은 동일한 1차 서열을 갖는 2개의 폴리펩타이드로 형성될 수 있다. 이러한 작제물은 숙주 세포에서의 단일 폴리펩타이드 서열의 발현으로 형성될 수 있다. 하나의 실시예가 도 10에 도시된다. 본 실시예에서, 단일 핵산은 3개의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물을 인코딩하는 데 충분하다. 동일한 폴리펩타이드의 부분인 2개의 Fc 도메인 단량체는 충분한 길이 및 가요성의 가요성 링커의 포함으로 Fc 도메인을 형성 가능하게 하고, 이러한 링커는 절단성 링커일 수 있다. 이러한 동일한 폴리펩타이드는 또한 선택적인 가요성 링커를 통해 접합된 제3 Fc 도메인 단량체를 함유한다. 이러한 제3 Fc 도메인 단량체는 도 10에 도시된 Y-형 Fc 작제물을 제조하기 위해 또 다른 Fc 도메인 단량체와 접합할 수 있다. Fc 도메인의 형성은 이량체화 선택성 모듈의 사용으로 제어될 수 있고, 또한 이는 도 10에 도시되어 있다. 일부 경우에 있어서, 3개의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물은 예컨대, 도 5에 도시된 2개의 폴리펩타이드로 형성될 수 있다. 이러한 작제물은 숙주 세포에서의 2개의 폴리펩타이드 서열의 발현으로 형성될 수 있다.

[0208] 일부 구현예에서, Fc 작제물의 하나 이상의 Fc 폴리펩타이드는 말단 라이신 잔기를 함유한다. 일부 구현예에서, Fc 작제물의 하나 이상의 Fc 폴리펩타이드는 말단 라이신 잔기를 함유하지 않는다. 일부 구현예에서, Fc 작제물의 모든 Fc 폴리펩타이드는 말단 라이신 잔기를 함유한다. 일부 구현예에서, Fc 작제물의 모든 Fc 폴리펩타이드는 말단 라이신 잔기를 함유하지 않는다. 하나의 실시예에서, Fc 폴리펩타이드의 말단 라이신 잔기는 말단 라이신 잔기를 함유하지 않는 상응하는 Fc 폴리펩타이드를 생성하도록 제거될 수 있는 서열번호 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 45, 및 46(실시예 1 참조)의 임의의 하나의 서열을 포함하거나 이로써 이루어지거나 이로써 본질적으로 이루어진다. 하나의 실시예에서, Fc 폴리펩타이드의 말단 라이신 잔기는 말단 라이신 잔기를 함유하는 상응하는 Fc 폴리펩타이드를 생성하는 서열번호 48 또는 50(실시예 1 참조)의 서열을 포함하거나 이로써 이루어지거나 이로써 본질적으로 이루어지는 Fc 폴리펩타이드에 첨가될 수 있다. 하나의 실시예에서, Fc 폴리펩타이드의 말단 라이신 잔기는 최대 10개(예컨대, 최대 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개)의 단일 아미노산 변형(예컨대, 치환, 예컨대, 보존성 치환)을 갖는 말단 라이신 잔기를 함유하는 상응하는 Fc 폴리펩타이드를 생성하는 서열번호 48 또는 50(실시예 1 참조)의 서열을 포함하거나 이로써 이루어지거나 이로써 본질적으로 이루어지는 Fc 폴리펩타이드에 첨가될 수 있다.

[0209] X. 숙주 세포 및 단백질 생산

[0210] 본 개시에서, 숙주 세포는 본원에 기재된 폴리펩타이드 및 작제물을 그들의 상응하는 핵산으로부터 발현하는 데 필요한 필수 세포 성분, 예컨대, 세포 소기관을 포함하는 비핵질을 지칭한다. 핵산은 당업계에 공지된 종래 기술(형질전환, 형질주입, 전기 천공법, 인산칼슘 침전, 직접 미세현미주입 등)로 숙주 세포에 도입될 수 있는 핵산 벡터에 포함될 수 있다. 숙주 세포는 포유류 기원 또는 세균성 기원 중 하나일 수 있다. 포유류 숙주 세포는 이에 제한되지 않지만, CHO(또는 CHO-유래 세포주, 예컨대, CHO-K1, CHO-DXB11 CHO-DG44), 쥐 숙주 세포(예컨대, NSO, Sp2/0), VERY, HEK (예컨대, HEK293), BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, CRL7030 및 HsS78Bst 세포를 포함한다. 단백질 작제물의 발현을 조절하거나, 원하는 특정 방식으로 단백질 산물을 변형하고 처리하는 숙주 세포가 또한 선택될 수 있다. 상이한 숙주 세포는 단백질 산물의 번역후 처리 및 변형을 위한 특성과 특정 기구를 갖는다. 발현된 단백질의 올바른 변형 및 처리를 보장하도록 적절한 세포주 또는 숙주 시스템이 선택될 수 있다.

[0211] 그의 상응하는 DNA 플라스미드 작제물에서 단백질 산물의 발현 및 분비를 위해, 숙주 세포는 프로모터, 인핸서, 서열, 전사 종결자, 폴리아데닐화 부위 및 선별 마커를 포함하여, 당업계에 공지된 적절한 발현 조절 요소로 조절된 DNA로 형질주입되거나 형질전환될 수 있다. 치료 단백질의 발현 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, Paulina Balbas, Argelia Lorence (eds.) *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Humana Press; 2nd ed. 2004 edition (July 20, 2004); Vladimir Voynov and Justin A. Caravella (eds.) *Therapeutic Proteins: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)* Humana Press; 2nd ed. 2012 edition (June 28, 2012) 참조.

[0212] XI. 정제

[0213] Fc 작제물은 예를 들어, 크로마토그래피(예컨대, 이온 교환, 친화(예컨대, 단백질 A 친화), 및 크기-배제 컬럼 크로마토그래피), 원심 분리, 용해도 차이, 또는 단백질 정제용 임의의 기타 표준 기술 등 단백질 정제의 당업계에 공지된 임의의 방법으로 정제될 수 있다. 예를 들어, Fc 작제물은 크로마토그래피 컬럼, 여과, 한외여과, 염석 및 투석 절차(예컨대, *Process Scale Purification of 항체*, Uwe Gottschalk (ed.) John Wiley & Sons, Inc., 2009; and Subramanian (ed.) *항체-Volume I-Production and Purification*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (2004) 참조)로 단백질 A 컬럼과 같은 친화 컬럼을 적절하게 선택하고 결합함으로써 분리되고 정제될 수 있다. 일부 예시에서, Fc 작제물은 정제를 용이하게 하기 위해 펩타이드와 같은 마커 서열에 컨쥬게이트될 수 있다. 마커 아미노산 서열의 한 예는 마이크로몰 친화력으로 니켈-작용화된 아가로스 친화 컬럼에 결합하는 헥사-히스티딘 펩타이드이다. 정제에 유용한 기타 펩타이드 태그는 이에 제한되지 않지만, 인플루엔자 혈구응집소 단백질 유래 항원결정기에 상응하는 혈구응집소(hemagglutinin) "HA" 태그를 포함한다(Wilson et al., 1984, Cell 37:767).

[0214] Fc 작제물의 경우, 단백질 A 컬럼 크로마토그래피는 정제 과정으로 이용될 수 있다. 단백질 A 리간드는 Fc 영역을 통해 Fc 작제물과 상호작용하고, 단백질 A 크로마토그래피를 숙주 세포 단백질의 대부분을 제거할 수 있는 고도의 선별 포획 과정으로 만든다. 본 개시에서, Fc 작제물은 실시예 2에 기술된 단백질 A 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 정제될 수 있다.

[0215] **XII. 약학 조성물/제조**

[0216] 본 개시는 본원에 기술된 하나 이상의 Fc 작제물을 포함하는 약학 조성물을 특징으로 한다. 하나의 구현예에서, 약학 조성물은 구조에 있어서 동일하거나 실질적으로 동일한 Fc 작제물의 실질적으로 동일한 집단을 포함한다. 다양한 실시예에서, 약학 조성물은 작제물 1~10 및 5* 중 어느 하나의 실질적으로 동일한 집단을 포함한다.

[0217] 치료 단백질 작제물, 예컨대, 본 개시의 Fc 작제물은 약학 조성물에 혼입될 수 있다. 치료 단백질을 포함하는 약학 조성물은 당업자에게 공지된 방법으로 제형화될 수 있다. 약학 조성물은 물 또는 또 다른 약학적으로 허용 가능한 액체에서의 멸균 용액 또는 현탁액을 포함하는 주사 가능한 제형의 형태로 비경구 투여될 수 있다. 예를 들어, 약학 조성물은 주사용 멸균수(WFI), 생리 식염수, 유화제, 현탁제, 계면활성제, 안정화제, 희석제, 결합제, 부형제와 같은 약학적으로 허용 가능한 비히클 또는 매개물과 Fc 작제물을 적합하게 결합하고 이어서 일반적으로 허용되는 약무(pharmaceutical practice)에서 요구되는 단위 용량 형태로 혼합함으로써 제형화될 수 있다. 약제(pharmaceutical preparation)에 포함된 유효 성분의 양은 지정된 범위 내에서 제공되는 적합한 용량이다.

[0218] 주사용 멸균 조성물은 비히클로서 주사용 증류수를 사용하여 통상적인 약무에 따라 제형화될 수 있다. 예를 들어, 생리 식염수 또는 글루코스 함유 등장액 및 D-소비톨, D-만노스, D-만니톨, 및 염화나트륨과 같은 기타 보충제 통상 당업계에 공지되어 있는 적합한 안정화제, 예를 들어, 에탄올과 같은 알코올 및 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리알코올, 및 폴리소르베이트 80TM, HCO-50과 같은 비이온성 계면활성제 등과 선택적으로 조합하여 주사용 수용액으로 사용될 수 있다. 치료 단백질 산물용 제형 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예컨대, Banga (ed.) *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing and Delivery Systems* (2d ed.) Taylor & Francis Group, CRC Press (2006)을 참조한다.

[0219] **XIII. 투약**

[0220] 약학 조성물은 투약 제형과 양립 가능한 방식으로 그리고 증상의 개선 또는 치료를 가져오는 치료 유효량인 양으로 투여된다. 약학 조성물은 다양한 투약 형태, 예컨대, 정맥내 투약 형태, 피하 투약 형태, 섭취 가능 용액, 약물 방출 캡슐 등과 같은 경구 투약 형태로 투여된다. 개별 대상에 대한 적절한 투약은 치료 목적, 투여 경로 및 환자의 상태에 따라 다르다. 일반적으로, 재조합 단백질은 1~200 mg/kg, 예컨대, 1~100 mg/kg, 예컨대, 20~100 mg/kg으로 투여된다. 따라서, 의료 제공자는 투약을 조정 및 적정하고, 최적의 치료 유효량을 얻기 위해 요구되는 투약 경로를 수정하는 것이 필요할 것이다.

[0221] **XIV. 적응증(indication)**

[0222] 본 개시의 약학적 조성물 및 방법은 대상의 염증 감소, 대상의 자가항체의 제거 촉진, 대상의 항원 제시 억제, 대상의 면역 반응의 면역 복합체-기반 활성을 억제하는 것과 같은 면역 반응 감소, 및 대상의 면역 및 염증성 질병 또는 질환 치료에 유용하다. 예시적인 질병 및 질환은 류마티스 관절염(RA); 전신 홍반성 루푸스(SLE); ANCA-관련 혈관염; 항인지질 항체 증후군; 자가면역 용혈성 빈혈; 만성 염증성 탈수초성 신경병증; 이식조직에서 항-알로, GVHD에서 항-자기, 항-교환, IgG 치료법, IgG 파라단백질의 제거; 피부근염; 굿파스처 증후군; 항체-의존성 세포 매개 세포 독성을 통해 매개된 조직계-표적형 II 과민성, 예컨대, 길랭바레 증후군, CIDP, 피부근염, 펠티 증후군, 항체 매개 거부반응, 자가면역성 갑상선 질환, 췌양성 대장염, 자가면역성 간 질환; 특발성 혈소판 감소성 자반증; 중증 근무력증, 시신경 척수염; 수포창 및 기타 자가면역성 수포 질환; 쇼그렌 증후군; 항체-의존성 식균 작용을 통해 매개된 자가면역성 혈구감소증 및 기타 질환; 기타 FcR-의존성 염증 증후군, 예컨대, 활액막염, 피부근염, 전신성 혈관염, 사구체염 또는 혈관염을 포함한다.

[0223] **실시예**

[0224] **실시예 1 - DNA 플라스미드 작제물의 설계 및 클로닝**

[0225] 총 8개의 DNA 플라스미드 작제물을 8개의 Fc 작제물을 조립하는 데 사용하였다(도 1 내지 7b). DNA 플라스미드 작제물을 단백질 생산을 위해 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 형질주입하였다. 8개의 인코딩된 분비 폴리펩타이드는 하기에 기술된 일반 구조를 가졌다:

[0226] A. wt Fc: 야생형 Fc 도메인 단량체(도 1: 102 및 104; 도 4: 408 및 410).

[0227] B. 돌출부 Fc: C_H3 항체 불변 도메인의 유전자 조작 돌출부를 갖는 Fc 도메인 단량체(도 2: 202).

- [0228] C. *함몰부 Fc*: C_H3 항체 불변 도메인의 유전자 조작 함몰부를 갖는 Fc 도메인 단량체(도 2: 204; 도 5: 514 및 516).
- [0229] C*. *함몰부 Fc**: C_H3 항체 불변 도메인의 유전자 조작 함몰부를 갖는 Fc 도메인 단량체(도 2: 204; 도 5: 514 및 516). 함몰부 Fc*는 또한 함몰부 Fc에 대한 추가 아미노산 치환을 함유한다.
- [0230] D. *전하 Fc*: C_H3 항체 불변 도메인의 역전하를 갖는 Fc 도메인 단량체(도 3: 302 및 304).
- [0231] E. *wt-12-wt Fc2*: 12-아미노산 GGGG 펩타이드 링커를 통해 일렬로 접합된 2개의 Fc 도메인 단량체(도 4: 402).
- [0232] F. *돌출부-20-전하 Fc2*: 20-아미노산 SGGG 펩타이드 링커를 통해 일렬로 접합된 C_H3 항체 불변 도메인의 역전하를 갖는 Fc 도메인 단량체 및 C_H3 항체 불변 도메인의 유전자 조작 돌출부를 갖는 Fc 도메인 단량체(도 5: 502 및 508).
- [0233] F*. *돌출부-20-전하 Fc2**: 20-아미노산 SGGG 펩타이드 링커를 통해 일렬로 접합된 C_H3 항체 불변 도메인의 역전하를 갖는 Fc 도메인 단량체 및 C_H3 항체 불변 도메인의 유전자 조작 돌출부를 갖는 Fc 도메인 단량체(도 5: 502 및 508). 돌출부-20-전하 Fc2*는 또한 돌출부 Fc에 대한 추가 아미노산 치환을 함유한다.
- [0234] G. *돌출부-20-돌출부 Fc2*: 20-아미노산 GGGG 펩타이드 링커를 통해 일렬로 접합된 C_H3 항체 불변 도메인의 유전자 조작 돌출부를 갖는 2개의 Fc 도메인 단량체 둘 모두(도 6: 602).
- [0235] H. *C_HL Fc+*: 힌지 도메인에 부착된 C_H1 및 C_L 불변 도메인을 갖는 Fc 도메인 단량체(도 7a: 702 및 704; 도 7b: 706, 708, 710, 712, 714, 및 716). C_L 불변 도메인은 18개의 아미노산 GGGG 펩타이드 링커를 통해 C_H1 불변 도메인에 부착된다.
- [0236] Fc DNA 서열은 인간 IgG1 Fc에서 유래하였다. 돌출부, 함몰부 및 전하 돌연변이를 모 Fc 서열에서 치환하였다. 인간 면역글로불린 카파 경쇄 유래 선도 펩타이드를 인코딩하는 DNA를 5' 영역에 부착하였다. 폴리펩타이드(C_HL Fc+) 중 하나 빼고 모두는 이러한 인코딩된 펩타이드를 아미노 말단에 함유하여 조립 및 분비를 위해 소포체로의 단백질 전위를 유도한다. 다양한 선도 펩타이드 중 어느 하나는 본 개시와 관련하여 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 선도 펩타이드는 보통 ER 내강(lumen)에서 잘려져 나간다. 5' 말단 EcoR1 부위를 함유하는 11개의 뉴클레오타이드 서열을 ATG 개시 코돈의 상류에 첨가하였다. 3' 말단 Xho1 부위를 함유하는 30개의 뉴클레오타이드 서열을 3' 말단 TGA 번역 종결 코돈의 하류에 첨가하였다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하였고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝하였다.
- [0237] 돌연변이는 야생형 아미노산 잔기 뒤에 EU Kabat 넘버링 시스템(Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, Md., ed. 5, 1991)을 사용하는 위치에 의해 표시되고 치환 잔기를 단일-문자 코드로 표시한다.
- [0238] 상술한 분비 폴리펩타이드 A-H의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 하기에 제공된다(오직 아미노산 서열만 제공되는 함몰부 Fc* 및 돌출부-20-전하 Fc2*는 제외함).

wt Fc

서열 번호 29:

```

1      10      20      30      40      50
|      |      |      |      |      |
GACAAGACCCACACCTGTCGCGCTTGCCCTGCCCCTGAGCTGCTGGGAGGCC
CCAGCGTGTTCTGTTCCCCCAAAGCCAAAGGACACCTGATGATCAGCCG
GACCCCGGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCTGAA
GTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGCGTGGAAAGTGACACAACGCCAAGCCA
AGCCACAGAGAGGAACAGTACAAAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGAC
CGTGCTGCACCGAGACTGGCTGAACGGCAAAAGATACAAGTGCAAAAGTCTCC
AACAAGGCCCTGCGCTGCCCCATCGAGAAAAATCAGCAAGGCCAAGGGCC
AGCCCGCGAGGCCCAAGTGTACACACTGCCCCAGCCGGGACGAGCTGAC
CAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCGTGGTGAAGGCTTCTACCCAGCGAT
ATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACTACAAGACCA
CCCCCCTGTGCTGGAAGCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCAAGCTGAC
CGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTACGTGCAGCGTGATG
CACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCG
GCAAG

```

[0239]

서열 번호 30:

```

1      10      20      30      40      50
|      |      |      |      |      |
DKHTTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

[0240]

돌출부 Fc

서열 번호 31:

```

1      10      20      30      40      50
|      |      |      |      |      |
GACAAGACCCACACCTGTCGCGCTTGCCCTGCCCCTGAGCTGCTGGGAGGCC
CCAGCGTGTTCTGTTCCCCCAAAGCCAAAGGACACCTGATGATCAGCCG
GACCCCGGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCTGAA
GTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGCGTGGAAAGTGACACAACGCCAAGCCA
AGCCACAGAGAGGAACAGTACAAAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGAC
CGTGCTGCACCGAGACTGGCTGAACGGCAAAAGATACAAGTGCAAAAGTCTCC
AACAAGGCCCTGCGCTGCCCCATCGAGAAAAATCAGCAAGGCCAAGGGCC
AGCCCGCGAGGCCCAAGTGTACACACTGCCCCCTGCCGGGACGAGCTGAC
CAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGCCTGGTGAAGGCTTCTACCCAGCGAT
ATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACTACAAGACCA
CCCCCCTGTGCTGGAAGCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCAAGCTGAC
CGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTACGTGCAGCGTGATG
CACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCG
GCAAG

```

[0241]

서열 번호 32:

```

1      10      20      30      40      50
|      |      |      |      |      |
DKHTTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

[0242]

함몰부 Fc

서열 번호 33:

1	10	20	30	40	50
GACAAGACCCACACCTGTCGCGCTTGCCCTGCCCTGAGCTGCTGGGAGGCC					
CCAGCGTGTTCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCG					
GACCCCGAAAGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGTCCACGAGGACCCCTGAA					
GTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGCGTGGAAGTGACACAACGCCAAGACCA					
AGCCACAGAGGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCGTGCTGAC					
CGTGCTGCACAGGACTGGCTGAACGGCAAAATAAAGTGCAAAAGTCTCC					
AACAAGGCCCTGCTGCCCCATCGAGAAAAATCAGCAAGGCCAAGGGCC					
AGCCCGCGAGCCCAAGTGTGTACTGCCCCAGCCGGGACGAGCTGAC					
CAAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTGCGCCGTGAAAGGCTTCTACCCAGCGAT					
ATCGCGTGGAATGGGAGAGCAACGCCAGCCGAGAACAACTACAAGACCA					
CCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTTCTCCTGGTAGCAAGCTGAC					
CGTGACAAAGAGCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGCTGCAGCGTGATG					
CACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCG					
GCAAG					

[0243]

서열 번호 34:

1	10	20	30	40	50
DKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE					
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS					
NKAAPAIETIKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVLSLCAVKGFYPSD					
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM					
HEALHNHYTQKSLSLSPGK					

[0244]

함몰부 Fc*

서열 번호 45:

1	10	20	30	40	50
DKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE					
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS					
NKAAPAIETIKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVLSLCAVEGFYPSD					
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM					
HEALHNHYTQKSLSLSPGK					

[0245]

함몰부 Fc

서열 번호 47:

1	10	20	30	40	50
GACAAGACCCACACCTGTCGCGCTTGCCCTGCCCTGAGCTGCTGGGAGG					
CCCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCA					
GCCGAGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGCCACGAGGAC					
CCTGAAGTGAAAGTTCAATTGGTACGTGGACGCGTGGAAGTGACACAACGC					
CAAGACCAAGCCGAGAGGAAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGTGT					
CCGTGCTGACCGTGCTGCAACAGGACTGGCTGAACGGCAAGAATAAAG					
TGCAAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCTGCCCCATCGAGAAAAATCAG					
CAAGGCCAAGGGCCAGCCCGCGAGCCCAAGTGTTGTACATGCCCCCA					
GCCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAAGTGTCCCTGAGCTGCGCCGTGGAC					
GGCTTCTACCCACGCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGCCAGCC					
CGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCAT					
TCTTCTGGTTAGCAAGCTGACCGTGGAAGAGCCGGTGGCAGAGGGC					
AACGTGTTCAAGCTGACGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC					
CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCTAG					

[0246]

서열 번호 48:

1	10	20	30	40	50
DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED					
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK					
CKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVD					
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG					
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG					

전하 Fc

서열 번호 35:

1	10	20	30	40	50
GACAAGACCCACACCTGTCCGCTTGCCCTGCCCTGAGCTGCTGGGAGGCC					
CCAGCGTGTTCTGTCCCCCAAGGCCAAGCACCTGATGATCAGCCG					
GACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGTCCACGAGGACCTGAA					
GTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCA					
AGCCAGAGAGGAACAGTACAAAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGAC					
CGTGCTGCACGAGCTGGCTGAACGGCAAGAAATACAAGTGCAAGTCTCC					
AACAAAGGCCCTGCTGCCCTCGAGAAAAACATCAGCAAGGCCAAGGCC					
AGCCCGCGAGGCCCAAGGTGTACACACTGCCCTCAGCCGGAAGAGCTGAC					
CAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCTGGTGAAGGCTTCTACCCAGCGAT					
ATCGCGGTGAATGGGAGAGCAACGCCAGCCGAGAACAACTACAAGACCA					
CCCCCCTGTGCTGAAAAGCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCGACCTGAC					
CGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAAGTGCAGCGTGATG					
CACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCG					
GCAAG					

서열 번호 36:

1	10	20	30	40	50
DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE					
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS					
NKAALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD					
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFLYSLTVDKSRWQQGNVFSFSVM					
HEALHNHYTQKSLSLSPGK					

wt-12-wt Fc2

서열 번호 37:

```

1      10      20      30      40      50
|      |      |      |      |
GACAAGACCCACACCTGTCCTCCCTTGCCCTGCCCCTGAGCTGCTGGGAGGCC
CCAGCGTGTTCTGTTCCCTCCCAAGGCCAAGGACACCTGATGATCAGCCG
GACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCTGAA
GTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGCGTGGAGTGACACAACGCCAAGACCA
AGCCAGAGAGGAACAGTACAAAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGAC
CGTGCTGCACCGAGACTGGCTCAACGGCAAAAGTACAAAGTCAAGGTGTCC
AACAAGGCCCTGCTGCCCTCATCGAGAAAAATCAGCAAGGCCAAGGGCC
AGCCCGCGAGGCCCAAGTCTACACACTGCCCTCCAGCGGACGAGCTGAC
CAAGAACCAGGTCTCCCTGACCTGCTGGTGAAGGCTTCTACCCAGCGAT
ATCGCGTGGAAATGGGAGAGCAACGCCAGCCGAGAGCAACTACAAGACCA
CCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTATTCTTCTGTACAGCAAGCTGAC
CGTGAGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTGAGCTGCAGCGTATG
CAGAGGCCCTGCACAACCACTACACCAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCG
GCAAAGGCGGGGATCTGGGGAGGAGCGGAGGCGGAGCGATAGGACCA
TACCTGCCCTCCCTGTCCCGCTCCCGAACTGCTGGGGGACCTCCGTGTTT
CTGTTTCACCTAAGCTAAGGATACGCTCATGATCTCCAGAACCCCTGAAG
TCACATGTGTGGTGGTGTGTCTCATGAAGATCCCGAAGTCAAGTTAA
CTGGTATGTGGATGGGTGCGAGGTCCACAATGCCAAACAAAGCCTCGGAA
GAACAGTATAACTCCACCTACAGAGTCGTGCGTGTGACAGTCTTCATC
AGGATTGGCTGAATGGGAAAGAGTACAAATGTAAAGTGTCTAAAGAGCTCT
GCCCCGTCTATCGAAAAGACCATCTCCAAAGCCAAAGGCGCCAGACAGAA
CCTCAGGTGTACACCTGCCACCTCCAGAGATGAGCTGACAAAAATCAGG
TGTAAGTACATGTCTGGTGAAGGGTTTATCCCTCCGACATTGCTGTGGA
ATGGGAATCCAATGGGAGCCTGAAAAAATATAAGACAACCTCCCTGTG
CTGGAAGTCCGATGGCTCATTTTCTGTACTTAAACTGACAGTGGATAAGT
CCAGATGGCAGCAGGGAATGTGTTTCTGCTCTGTGATGATGAAGCTCT
GCATAATCACTATACACAGAAAAGCCTGTCCCTGTCCCGGCAAG

```

서열 번호 38:

```

1      10      20      30      40      50
|      |      |      |      |
DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSLKTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGGSGGSDKHTHTCPPCPAPELLGGPSV
LFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LDSDGSFFLYSLKTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

돌출부-20-전 하 Fc2

서열 번호 39:

1	10	20	30	40	50
GACAAGACCCACACCTGTCCTCCCTTGCCAGCCCTGAGCTGCTGGGAGGCC					
CCAGCGTGTTCTGTTCCCCCAAAGCCAGGACACCTGATGATCAGCCG					
GACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGCCACGAGGACCTGAA					
GTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCA					
AGCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGAC					
CGTGCTGCACGAGACTGGCTGAACGGCAAGTACAAAGTCAAGGTGTCC					
AACAAAGGCCCTGCTGCCCTCATCGAGAAAAATCAAGCAAGGCCAAGGCC					
AGCCCGCGAGGCCCAAGGTGTACACCTGCCCTTGAGAGATGAGCTGAC					
CAAGAACCAGGTGTCTGTGGTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCAGCGAT					
ATCGCGTGGAATGGGAGAGCAACGCCAGCCGAGAACAACTACAAGACCA					
CCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTTCTCTGTACAGCAAGCTGAC					
CGTGACAAAGAGCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGCTGCAGCGTGATG					
CACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCG					
GCAAGTCTGGGGGAGGATCAGGGGGTGGAAAGTGGCGGTGGATCTGGTGGTGG					
AAGCGGAGGCGGCATAGACACACATGCCCTCCCTGTCCAGCTCCCGAA					
CTGCTGGGGGACCTCCGTGTTTCTGTTTCCACCTAAGCCTAAGGATACGC					
TCATGATCTCCAGAACCCCTGAAGTCAATGTGTGGTGGTGGATGTGTCTCA					
TGAAATCCCGAAATCAAGTTTAAATGGTATGTCGATGGGGTCCAGGTGCAC					
AATGCCAAAAAACCCTCGGAAGAACAGTATAACTCCATACAGAGTGG					
TGTCTGTCTCACAGTCTGCATCAGGATTGGCTCAATGGGAAAGAGTACAA					
ATGTAAAATCTCTAACAAGGCTCTCCCCGCTCCGATCGAAAAGACCATCTCC					
AAAGCCAAAGGGCAGCCAGAGAACCTCAGGTCTACACTGCCTCCCGGCC					
GGGACGAGCTGACAAAAAATCAAGTGTCTCTGACCTGCTCGTGAAGGGCTT					
TTATCCCTCCGACATTGCCGTCGAGTGGGAGTCCAATGGAAGCCGGAAAAAC					
AATTATAAGACCAAGCTCCAGTGTGAAGTCCGACGCAAGCTTCTTTCTGT					
ACTCCGACCTGACAGTGGATAAGTCCAGATGGCAGCAAGGGAATGTGTTCTC					
CTGTTCCGTGATGCATGAAGCCCTCCATAATCACTATACCCAGAAAAAGCCTG					
TCCCTGTCCCTGGCAAG					

서열 번호 40:

1	10	20	30	40	50
DKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE					
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV					
NKAAPAIIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD					
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS					
HEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGDKHTCPPCPAPE					
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH					
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAAPAIIEKTI					
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQ					
PENNYKTTPPVKSDGSFFLYSLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSL					
SLSPGK					

돌출부-20-전 하 Fc2*

서열 번호 46:

1	10	20	30	40	50
DKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE					
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV					
NKAAPAIIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSD					
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS					
HEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGDKHTCPPCPAPE					
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH					
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAAPAIIEKTI					
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQ					
PENNYKTTPPVKSDGSFFLYSLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSL					
SLSPGK					

돌출부-20-돌출부 Fc2

서열 번호 41:

1	10	20	30	40	50
GACAAGACCCACACCTGTCCTCCCTTGCCCTGCCCCTGAGCTGCTGGGAGGCC					
CCAGCGTGTTCTGTTCCCCCAAAAGCCAAAGGACACCTGATGATCAGCCG					
GACCCCGAAAGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGTCCACGAGGACCTGAA					
GTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGCGTGGAAAGTGCACAACGCCAAGACCA					
AGCCACAGAGGGAACAGTACACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGAC					
CGTGTGTCACCCAGGACTGGCTGAACGGCAAAAGTACAAAGTCAAGGTGTCC					
AACAAGGCCCTGCTGCCCTCATCGAGAAAAACATCAACAAGGCCAAGGCC					
AGCCCGCGAGGCCCAAGGTGTACACCTGCCCTTGACAGATGAACTGAC					
CAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGCCTGTCAAGGGCTTCTACCCAGCGAT					
ATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGCCAGCCGAGAACAACTACAAGACCA					
CCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTATTCTTCTGTACAGCAAGCTGAC					
CGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAAGTGCAGCGTGATG					
CAGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCG					
GCAAAGTCTGGGGGAGGATCAGGGGGTGAAGTGGCGGTGGATCTGGTGGTGG					
AAGCGGAGGCGGCATAGACACACACATGCCCCCTGTCCAGCTCCCGAA					
CTGCTGGGGGACCTCCGTGTTCTGTTTCCACCTAAGCTAAGGATACGC					
TCATGATCTCCAGAACCTGAAAGTACATGTGTGGTGGTGCATGTGTCTCA					
TGAAAGTCCCGAAAGTCAAGTTTAACTGGTATGTGGATGGGGTCGAGGTCAC					
AATGCCAAAAAAGCCTCGGGAAGAACAGTATAACTCACTACAGAGTCG					
TCAGCGTGCTGACAGTCTGCATCAAGATTGGCTCAATGGGAAAGAGTATAA					
GTGTAAAGTCTCGAAACAAAGCCCTCCCCGCTCTATCGAAAGAACCTCTCC					
AAAGCCAAGGGCAGCCAGAGAACCTCAGGTCTACACACTGCCTCCATGTC					
GGGACGAGCTGACAAAAATCAGGTGTCACTGTGGTGTCTGGTGAAGGGGT					
TTACCTTCCGACATTGCTGTGGAATGGGAATCCAATGGGAGCCTGAAAC					
AATTATAAGCAACACCTCCGTGCTGGACTCCGATGGCTCATTTTCTGT					
ACTCTAACTGACAGTGGATAAGTCCAGATGGCAGCAGGGAATGTGTTTC					
CTGCTCTGTGATGCATGAAAGCTCTGCATAATCACTATACAGAAAAAGCTG					
TCCCTGTCCCCTGGCAAG					

서열 번호 42:

1	10	20	30	40	50
DKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE					
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV					
NKAAPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD					
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV					
HEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGSGGGSGGGSGGGSGGDKHTCPPCPAPE					
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV					
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI					
SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQ					
PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVHEALHNHYTQK					
SLSPGK					

돌출부-20-전 하 Fc2

서열 번호 49:

1	10	20	30	40	50
GACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGCCAGCCCCTGAGCTGCTGGGAGG					
CCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCA					
GCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGAC					
CCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGAAGTGCACAACGC					
CAAGACCAAGCCCAGAGAGGAA CAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGT					
CCGTGCTGACCGTGTGCA CCAAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAG					
TGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCATCGAGAAAA CCATCAG					
CAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCAGGTGTACACCTGCCCCCTT					
GCAGAGATAAGCTGACCAAGAACAGGTGTCCTGTGGTGCTGGTCAAG					
GGCTTCTACCCACGCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCC					
CGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCAT					
TCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAAGAGCCGGTGGCA GCAAGGC					
AACGTGTTCAAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC					
CCAGAACTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAGGGAGGGGGAGGAGGAGGGG					
GTGGAGGTGGCGGTGGAGGCGGTGGTGGAGGCGGAGGCGGCGATAAGACA					
CACACATGCCCCCCCTGTCCAGCTCCCGAACTGCTGGGGGACCCCTCCGT					
GTTTCTGTTTCCACCTAAGCCTAAGGATACGCTCATGATCTCCAGAACCC					
CTGAAGTCACATGTGTGGTGGTGGTGTGTCTCATGAAGATCCCGAAGTC					
AAGTTTAATTGGTATGTGATGGGGTCGAGGTGCACAATGCCAAAA CAAA					
ACCTCGGGAGAA CAGTATAACTCCACATACAGAGTGGTGTCTGTCCTCA					
CAGTCTGCATCAGGATTGGCTCAATGGGAAAGAGTACAAATGTAAAGTC					
TCTAACAAAGGCTCTCCCGCTCCGATCGAAAAGACATCTCCAAAGCCAA					
AGGGCAGCCCAGAGAACCTCAGGTCTACACACTGCCTCCAGCCGGGACG					
AGCTGACAAAAATCAAGTGTCTCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTTAT					
CCCTCCGACATTGCCGTGAGTGGGAGTCCAATGGACAGCCGGAACAA					
TTATAAGACCACGCTCCAGTGTCTGAAGTCCGACGGCAGCTTCTTTCTGT					
ACTCCGACCTGACAGTGGATAAGTCCAGATGGCAGCAAGGGAATGTGTT					
TCCTGTTCCGTGATGCATGAAGCCCTCCATAATCACTATACCCAGAAAA					
CCTGTCCCTGTCCCCTGGCTAG					

[0257]

서열 번호 50:

1	10	20	30	40	50
DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED					
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK					
CKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVK					
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG					
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGGGGGDKT					
HTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV					
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV					
SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY					
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVF					
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG					

[0258]

C₆H₅ Fc+

서열 번호 43:

1	10	20	30	40	50
AGGACAGTGGCCGCTCCAGCGTGTTCATCTTCCACCCAGCGACGAGCA GCTGAAGTCCGGCACA GCCAGCGTGGTCTGCCTGCTGAACAACCTTCTACC CCCGCGAGGCCAAAGGTGCA GTGGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGC AACAGCCAGGAAA GCGTCA CCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAG CCTGTCTAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGG TGTA CGCTGCGAAGTGACCCACCAAGGCCTGTCAGCCCCGTGACCAAG AGCTTCAACA GAGGCGAGTGCGGCGGCTCTGCGGAGGATCCGGGGGAGG ATCAGCGGGCGAAGCGGAGGAGCGCTAGCACAAAGGGCCCTCCGTGT TCCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTG GGCTGCCTGGTGAAGACTACTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAA CTCTGGCGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGA GCAGCGGCTGTACTCCTGAGCAGCGTGGTACAGTGCCTAGCAGCAGC CTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCAGCAACAC CAAA GTGGACAAGCGGTGGAA CCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACGT GTCCCCCTGCCAGCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTAGCGTGTCTCTG TTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCCGGA CCCCCGAGT GACCTGCGTGGTGGTGACGTGTCCACGAGGACCTGAA GTGAAGTTCA ATTGGTACGTGGACGGCGTGAAGTGCA CAATGC CAAGACCAAGCCAGAG GAGGAACAGTACAACAGCA CCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT GCACAGGACTGGCTGAACGGCAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAG CCCCGCGAGCCCAAGGTGTACACACTGCCCCCA GCCGGGACGAGCTGAC CAAGAAC CAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCG ATATCGCGTGAATGGGAGAGCAA CGGCCAGCCGAGAA CAACTACAA G ACCA CCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATCTCTCTGTACAGCAA GCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTACAGCTGCT CCGTGATGCA CGAGGCCCTGCACAA CCACTACCCAGAA GTCCCTGAGC CTGAGCCCCGGCAAA					

[0259]

서열 번호 44:

1	10	20	30	40	50
RTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GECGSGSGGSGGGSGGSGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDK RVEPKS CDKHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK					

[0260]

[0261]

일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물의 Fc 폴리펩타이드는 최대 10개(예컨대, 최대 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개)의 단일 아미노산 변형(예컨대, 치환, 예컨대, 보존성 치환)을 갖는 본원에 기술된 서열 중 임의의 것을 포함하거나 이로써 이루어지거나 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0262]

일부 구현예에서, Fc 작제물의 하나 이상의 Fc 폴리펩타이드는 말단 라이신 잔기를 함유한다. 일부 구현예에서, Fc 작제물의 하나 이상의 Fc 폴리펩타이드는 말단 라이신 잔기를 함유하지 않는다. 일부 구현예에서, Fc 작제물의 모든 Fc 폴리펩타이드는 말단 라이신 잔기를 함유한다. 일부 구현예에서, Fc 작제물의 모든 Fc 폴리펩타이드는 말단 라이신 잔기를 함유하지 않는다. 하나의 실시예에서, Fc 폴리펩타이드의 말단 라이신 잔기는 말단 라이신 잔기를 함유하지 않는 상응하는 Fc 폴리펩타이드를 생성하도록 제거될 수 있는 서열번호 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 45, 및 46의 임의의 하나의 서열을 포함하거나 이로써 이루어지거나 이로써 본질적으로 이루어진다. 하나의 실시예에서, Fc 폴리펩타이드의 말단 라이신 잔기는 말단 라이신 잔기를 함유하는 상응하는 Fc 폴

리펩타이드를 생성하는 서열번호 48 또는 50의 서열을 포함하거나 이로써 이루어지거나 이로써 본질적으로 이루어지는 Fc 폴리펩타이드에 첨가될 수 있다.

[0263] 실시예 2 - Fc 작제물 단백질의 발현

[0264] Fc 작제물의 단백질 발현의 경우, 실시예 1에 기술된 A-H에서 선택된 DNA 플라스미드 작제물 중 2개를 EXPI293 세포(LifeTechnologies)로 형질주입하였다. 리포솜 형질주입을 사용하여 플라스미드 DNA를 EXPI293 세포내로 도입하였다. 형질주입 플라스미드 작제물의 총량은 고정된 반면, 상이한 플라스미드 작제물의 비는 원하는 작제물의 수율을 최대화하기 위해 달라졌다(하기 표 11 참조). 각각의 Fc 작제물의 경우, 2개의 형질주입 DNA 플라스미드 작제물의 비(질량비)는 표 11에 나타나 있다. 작제물의 도해가 도 1 내지 도 7b에 나타나 있다.

[0265] 단백질 발현 후에, 발현된 작제물을 단백질 A-기반 친화 컬럼 크로마토그래피로 세포 배양 상청액에서 정제하였다. 배지 상청액을 AKTA Avant 분취 크로마토그래피 시스템(preparative chromatography system)(GE Healthcare Life Sciences)을 사용하여 Poros MabCapture A(LifeTechnologies) 컬럼상에 로딩하였다. 이어서 포획된 Fc 작제물을 인산염 완충 식염수로 세척(저염 세척)한 후 500mM NaCl로 보충된 인산염 완충 식염수로 세척(고염 세척)하였다. Fc 작제물을 100mM 글라이신, 150mM NaCl, pH 3 완충액으로 용리하였다. 컬럼에서 배출된 단백질 용액은 1M TRIS pH 7.4를 첨가하여 중화되어 100mM의 최종 농도가 된다. Fc 작제물을 Poros® XS 수지(Applied Biosciences Cat. # 4404336)를 사용하여 이온 교환 크로마토그래피에 의해 추가로 분류하였다. 컬럼을 10 mM MES, pH 6(완충액 A)로 사전평형화하였고 샘플을 10 mM MES, 500 mM 염화나트륨, pH 6(완충액 B)에 대한 구배로 용리하였다.

[0266] 총 7개의 Fc 작제물을 수득하였다(하기 표 11 및 도 1 내지 도 7b 참조). 정제된 Fc 작제물을 환원 및 비환원 조건 모두 하에서 SDS-PAGE(소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동)에 이어 쿠마씨 블루 염색(Coomassie Blue staining)으로 분석하여 기대 크기의 단백질 밴드의 존재를 확인하였다.

[0267] 표 11

작제물	형질주입된 플라스미드	플라스미드 A:B의 비	대략 MW(kDa) (환원 SDS-Page)	대략 MW(KDa) (비 환원 SDS-PAGE)
1	A: Wt Fc	n/a	25	50
2	A: 돌출부 Fc B: 함몰부 Fc	1:1	25	50
3	A: 전하 Fc		25	50
4	A: Wt-12-Wt Fc2 B: Wt FC	1:2	25, 50	100
5	A: 돌출부-20-전하 Fc2 B: 함몰부 Fc	2:1	25, 50	150
5*	A: 돌출부-20-전하 Fc2* B: 함몰부 Fc*	2:1	25, 50	150
6	A: 돌출부-20-돌출부 Fc2 B: 함몰부 Fc	1:1	25, 50	100
7 및 8	A: Ch, Cl, Fc+	n/a	50	100

[0268]

[0269] 실시예 3 - 작제물 4의 제조 및 SDS-PAGE 분석

[0270] 2개의 DNA 플라스미드 작제물, wt-12-wt Fc2(실시예 1의 DNA 플라스미드 작제물 E) 및 wt Fc(실시예 1의 DNA 플라스미드 작제물 A)를 작제물 4를 발현하는 데 사용하였다(도 4). 2개의 플라스미드 작제물 실시예 2에 기술된 바와 같이 단백질 발현 및 정제를 위해 HEK 293 세포로 형질주입하였다. 도 11a 내지 도 11b는 작제물 4의 환원 및 비환원 SDS-PAGE를 나타낸다. 환원 SDS-PAGE(도 11a)상에서, wt Fc 도메인 단량체에 상응하는 대략 25 kDa(레인 2 및 3, 도 11a)에서의 밴드 및 wt-12-wt Fc2 일량체(레인 1-3, 도 11a)에 상응하는 50 kDa에서의 밴드를 관찰하였다. 비환원 SDS-PAGE(도 11b)상에서, 레인 2 및 3 각각은 작제물 4의 최종 단백질 산물을 각각 더 높은 단백질양(1/2)과 더 낮은 단백질 양(1/3)으로 함유한다. 작제물 4를 형성하는 2개의 wt Fc 도메인 단량체와 wt-12-wt Fc2 일량체 이량체의 결합에 상응하는 대략 100 kDa에서의 하나의 대밴드 및 wt Fc 도메인 단량체와 접합되지 않은 자유 wt-12-wt Fc2 일량체 이량체에 상응하는 대략 50 kDa에서의 대략 동일한 신호 강도의 또 다른 대밴드를 관찰하였다.

[0271] 또한, wt-12-wt Fc2와 wt Fc 도메인 단량체의 다량체에 상응하는 150 kDa, 200 kDa 및 250 kDa(레인 2 및 3, 도 11b)에서의 더 높은 분자량의 밴드를 관찰하였다.

[0272] **실시예 4 - 작제물 6의 제조 및 SDS-PAGE 분석**

[0273] 2개의 플라스미드 작제물, 돌출부-20-돌출부 Fc2(실시예 1의 DNA 플라스미드 작제물 G) 및 함몰부 Fc(실시예 1의 DNA 플라스미드 작제물 C)를 작제물 6을 발현하는 데 사용하였다(도 6). 2개의 플라스미드 작제물 실시예 2에 기술된 바와 같이 단백질을 발현 및 정제를 위해 HEK 293 세포로 형질주입하였다. 도 12a 내지 도 12b는 작제물 6의 환원 및 비환원 SDS-PAGE를 나타낸다. 환원 SDS-PAGE(도 12a)상에서, 함몰부 Fc 도메인 단량체에 상응하는 대략 25 kDa(레인 2 및 3, 도 12a)에서의 밴드 및 돌출부-20-돌출부 Fc2 일련 이량체(레인 1~3, 도 12a)에 상응하는 50 kDa에서의 밴드를 관찰하였다. 비환원 SDS-PAGE(도 12b)상에서, 레인 2 및 3 각각은 작제물 6의 최종 단백질 산물을 더 높은 단백질 양(1/2)과 더 낮은 단백질 양(1/3)으로 함유한다. 작제물 4를 형성하는 2개의 함몰부 Fc 도메인 단량체와 돌출부-20-돌출부 일련 이량체의 결합에 상응하는 대략 100 kDa에서의 하나의 대밴드 및 함몰부 Fc 도메인 단량체와 결합되지 않은 자유 돌출부-20-돌출부 Fc2 일련 이량체에 상응하는 대략 50 kDa에서의 더 약한 신호 강도의 또 다른 대밴드를 관찰하였다.

[0274] 유사한 실험을 작제물 5로 수행하였다(도 13). 2개의 플라스미드 작제물, 돌출부-20-전하 Fc2(실시예 1의 DNA 플라스미드 작제물 F) 및 함몰부 Fc(실시예 1의 DNA 플라스미드 작제물 C)를 작제물 5를 발현하는 데 사용하였다(도 5). 2개의 플라스미드 작제물을 양이온 지질 형질주입으로 실험적으로 결정된 비에서 EXPI293 세포내로 형질주입하였다. 형질주입된 배양 조직을 세포 배양 배지에서 6~8일 동안 배양한다. 이번 후에, 세포를 원심분리로 제거하였다. 상층액(배지, 도 13의 레인 1)은 형질주입된 세포로 배지에 분비되는 작제물 5를 함유한다. 배지에 또한 오염시키는 숙주 세포 단백질이 있다. 작제물 5는 단백질-A 친화 크로마토그래피에 의해 배지에서 정제되었다. 이 지점에서, 배지는 3개의 Fc 도메인(삼량체)을 갖는 원하는 작제물 5뿐 아니라 2개의 Fc 도메인(이량체, 약 10~15%) 및 하나의 Fc 도메인(단량체, 5~10%)을 갖는 잘못 조립된 단백질의 일부 부분을 함유하였다. 여전히 존재하는 오염시키는 숙주 세포 단백질의 작은 양이 또한 있었다. 단백질 A 컬럼 용출액을 강 양이온 교환(SCX) 크로마토그래피에 의해 완충액 교환하고 농축하고 분류하였다. 간단히 요약하면, 작제물 5는 SCX 컬럼에 결합한 후 염 및 pH 구배로 용리되었다. 이 단계는 3개의 Fc 도메인을 갖는 원하는 작제물 5를 2개 또는 하나의 Fc 도메인을 갖는 잘못 조립된 단백질 중 대부분, 원치 않는 번역후 변형을 갖는 작제물 5, 및 오염시키는 숙주 세포 단백질과 분리할 가능하게 하였다. 또 다른 차례의 농축 및 완충액 교환 후에, 작제물 5의 순수한 최종 단백질 산물을 수득하였다(순수, 도 13의 레인 2).

[0275] 도 13은 작제물 5를 발현하도록 조작된 배양 숙주 세포에서 수득된 배지(레인 1), 및 정제된 작제물 5(레인 2)의 SDS-PAGE를 도시한다. 또한 각각의 샘플에 대한 SDS-PAGE의 대밴드의 백분율을 보여주는 표가 나타나 있다. 배지 샘플(레인 1)에서, 3개의 Fc 도메인을 갖는 작제물 5의 최종 단백질 산물에 상응하는 대략 150 kDa에서의 대밴드를 관찰하였다. 배지 샘플은 또한 2개의 Fc 도메인을 갖는 단백질에 상응하는 100 kDa에서의 보다 약한 신호 강도의 소밴드 및 하나의 Fc 도메인을 갖는 단백질에 상응하는 50 kDa에서의 가장 약한 신호 강도의 제2 소밴드를 함유하였다. 정제 후에(레인 2), 3개의 Fc 도메인을 갖는 작제물 5의 최종 단백질 산물에 상응하는 대략 150 kDa에서의 대밴드가 강화되었다. 작제물 5의 SDS-PAGE상의 단백질 밴드의 신호 강도의 정량은 배양 배지에서 단백질 정제 전에 총 단백질의 약 79%가 작제물 5의 원하는 단백질이었음을 보였다. 단백질 정제 후에, 약 95% 순도를 갖는 작제물 5의 실질적으로 동질인 집단을 수득하였다.

[0276] 이들 발견은 C_{H3} 항체 불변 도메인의 유전자 조작 돌출부 또는 유전자 조작 함몰부중 하나를 함유하는 선택성 이량체화 모듈은 자가-결합을 감소시키고, Fc-매개 응집 또는 다량체 형성을 방지한다는 것을 입증하고, 본원에 기술된 작제물의 이량체화 선택성 모듈의 사용은 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 제조물을 생산하는 데 사용될 수 있음을 보여주었다. 본 관찰은 예컨대, 생물학적 활성 및 효능을 조절하기 위해 작제물의 제조, 수율, 순도에 유리한 상당한 의미를 갖는다.

[0277] **실시예 5 - 결합 친화도 및 친화력**

[0278] 다수의 Fc γ 수용체에 대한 작제물의 결합은 세포-기반 FRET 경쟁 분석법(Cisbio Bioassays)을 사용하여 평가하였다. 작제물 5 및 6은 야생형 Fc 도메인(작제물 1)에 비해 Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, 및 Fc γ RIIIa에 대해 IC50이 적어도 10배 감소(즉, 증가된 결합)를 보였다.

[0279] **실시예 6 - 단핵구 활성 및 차단 분석**

[0280] 3개의 Fc 작제물, 각각 1개, 3개 및 2개의 Fc 도메인을 함유하는 작제물 1, 5, 및 6을 그들 자신의 THP-1 단핵

구를 활성화하는 능력에 대해 테스트하였다. IL-8 방출을 단핵구 활성을 나타내는 데 사용하였다. 작제물 1, 5, 및 6이 실시예 1 및 2에 기술된 바와 같이 발현되고 정제되었다. 정제된 Fc 작제물 각각을 THP-1 단핵구에 첨가하였다. 3개의 작제물 중 어느 것에서도 유의미한 IL-8 방출이 관찰되지 않았다. 데이터는 도 14a에 제공된다.

[0281] 그런 다음, 동일한 3개의 Fc 작제물을 Fc 수용체-매개 단핵구 활성을 억제하는 능력에 대해 테스트하였다. IgG1(100 μ g/mL)을 96 웰 플레이트 상에 고정하고 THP-1 단핵구에 의해 IL-8 방출을 유도하도록 사용하였다. 이어서, 작제물 1, 5 및 6 또는 대조 물질(정맥내 면역글로불린(IVIg), 인간 혈청 알부민(HSA), 및 글라이신 완충액)의 연속 희석을 조직 배양 플레이트에서 수행하였다. THP-1 단핵구(1.5×10^5 세포)를 완전히 섞어서 즉시 첨가하였다. 배양물을 18시간 동안 배양하였고, 상청액을 IL-8에 대해 분석하였다. 작제물 5 및 6은 낮은 투여량에서 작제물 1보다 더 효과적으로 IL-8 방출을 억제함을 발견하였다. 데이터는 도 14b에 제공된다.

[0282] **실시예 7 - K/BxN 관절염 모델**

[0283] Anthony, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105:19571-19578 (2008)에 기술된 방법을 사용하여 K/BxN 혈청 전환 (serum transfer) 모델에서 마우스의 관절 염증을 예방하는 능력에 대해 Fc 작제물 1, 5, 및 6 및 IVIg를 테스트하였다. 12주령 K/BxN 마우스를 Jackson Laboratories에서 생성/구입하였다. 총 30마리의 C57BL 마우스를 각각 6마리씩 5개의 그룹으로 분리하였다. 각각의 그룹에 200 μ l K/BxN 혈청(혈청을 포함하는 관절염)을 주사하기 한 시간 전에(0일), 200 μ l 작제물 6을 0.1 g/kg으로, 200 μ l 작제물 5를 0.1 g/kg으로, 200 μ l IVIg를 0.1 g/kg으로, 230 μ l IVIg를 1 g/kg으로, 또는 200 μ l 인산염-완충 식염수(PBS)를 정맥내(i.v.) 주사하였다. 염증은 발의 종창(paw swelling) 및 발목 두께의 임상 검사로 점수를 부여했다. 발 종창의 경우, 각각의 발을 0-3(0, 종창 없음; 3, 최대 종창)으로 점수를 부여했다. 4개의 발의 점수를 개별 마우스당 총 임상 점수에 추가하였다. 발목 두께의 경우, 캘리퍼(caliper) 측정을 사용하였다. 각각의 마우스를 일 단위로 0일부터 10일까지 점수를 부여했다. 마우스 6마리로 이루어진 각 그룹에 대한 일 단위 평균 임상 점수를 도 15에 표시하였다.

[0284] 도 15에 도시된 바와 같이, IVIg를 1 g/kg으로, 작제물 5를 0.1 g/kg으로 그리고 작제물 6을 0.1 g/kg으로 염증 방지의 유사한 수준으로 공급하였다. 작제물 5 및 6이 IVIg의 투여량보다 10배 낮은 투여량으로 투여된 것을 고려하면, 작제물 5 및 6이 IVIg보다 더 큰 효능을 나타낸다.

[0285] **실시예 8 - 만성 ITP 모델**

[0286] 작제물 1 및 5뿐 아니라 IVIg를 면역성 혈소판감소증(immune thrombocytopenia, ITP)에 걸린 마우스를 치료하는 능력에 대해 테스트하였다. 혈소판 고갈을 일으키는 항-혈소판 Ab로 ITP를 유도하였다. 45마리의 C57BL/6 마우스(18-22 g, Charles Rivers Labs, MA)에 4일 동안 매일(1일, 2일, 3일 및 4일에) 한 번씩 래트 항-CD41 항체(Ab)(클론 MWReg30 BioLegend cat#133910)의 1.5 μ g/마우스로 복강내(i.p.) 주사하였다. 정상 혈소판 수준을 결정하기 위해 래트 IgG1, k 동종형 대조 Ab(BioLegend cat# 400414)의 1.5 μ g/마우스로 5마리의 마우스에 주사하였다. Ab를 PBS 100 μ l로 주사하였다. 모든 마우스에 3일차에 제3 항-CD41 Ab 주사 후 2시간 후에 IVIg를 1 g/kg으로, 작제물 1을 0.02, 0.03, 0.1, 및 0.3 g/kg으로, 또는 작제물 5를 0.004, 0.02, 및 0.1 g/kg으로, 또는 식염수 대조를 200 μ l로 한 번 정맥내 투여하였다. 5일차(제4 항-CD41 Ab 주사 후 24시간)에 마우스의 피를 뽑아 VetScan Instrument로 총 혈소판 수준을 정량 분석하였다. 모든 절차는 동물복지법(the Animal Welfare Act) 및 실험 동물의 관리 및 사용에 관한 지침(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)을 따라 수행하였다.

[0287] 도 16에 도시된 바와 같이, 작제물 5를 0.02 및 0.1 g/kg으로 치료용으로 처리한 후에 식염수 대조와 비교했을 때 혈소판 수준은 유의미하게 증가하였다(다수의 비교 테스트에서 일원 분산분석(One-way ANOVA)으로 **** $p < 0.0001$). 이들 그룹의 혈소판 수준은 정상인, 동종형 치료-그룹의 수준과 유사하였다. IVIg를 1 g/kg으로 그리고 작제물 1을 0.1 및 0.3 g/kg으로 치료용으로 처리하면 또한 식염수 대조와 비교하여 혈소판 수준을 유의미하게 증가시키지만(다수의 비교 테스트에서 일원 분산분석으로 각각 * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) 이들 그룹의 혈소판 수준은 0.02 및 0.1 g/kg 작제물 5 처리-그룹보다 낮았다. 본 모델에서, 작제물 5는 IVIg보다 약 50배 더 효능이 큰 것으로 보인다.

[0288] **실시예 9 - 작제물 5*는 IVIg와 비교하여 Fc γ R 에 대해 증가된 결합 및 친화력을 보임**

[0289] 실시예 8에서 기술된 바와 동일한 다음의 프로토콜에서, 돌출부-20-전하 Fc2*(실시예 1의 작제물 F*) 및 함몰부 Fc*(실시예 1의 작제물 C*)를 인코딩하는 2개의 플라스미드 작제물을 사용하여 작제물 5*를 발현하고 정제하였다. 다양한 Fc 수용체에 대한 본 작제물의 결합 프로파일을 형광 공명 에너지 전이(fluorescence resonance

energy transfer, FRET) 경쟁 결합 분석법에서 IVIg의 결합 프로파일과 비교하였다.

[0290] 작제물 5*는 상이한 Fc γ -수용체에 대한 전체 결합 프로파일이 IVIg의 결합 프로파일과 유사함을 보였지만(Fc γ RIIb에 대해 관찰된 가장 낮은 결합 친화도), IVIg와 비교했을 때 모두 낮은 친화도 Fc γ R에 대한 결합이 크게 강화되었다. Fc γ R에 대한 증가된 결합은 더 높은 친화력에 상응하고, 이는 각각의 개별 결합 상호작용의 축적된 친화도의 누적 효과를 지칭한다. 작제물 5*에 대한 IC50값은 IVIg의 IC50값보다 일관되게 작았고, 이는 개별 IgG 분자와 비교하여 낮은 친화도 Fc γ R에 대한 결합이 현저하게 증가하였음을 나타낸다. 예를 들어, IVIg와 비교하여, 작제물 5*는 대략 170배 증가된 친화도의 Fc γ RIIa(H131 변종), Fc γ RIIb에 대해 55배 증가된 친화도를 보였다.

[0291] **실시예 10 - THP-1 단핵구 세포의 식균 작용의 억제**

[0292] 작제물 5* 및 IVIg를 식균 작용의 모델에서 테스트하였다.

[0293] 식균 작용은 세포(포식세포)가 세균과 같은 고체 입자를 완전히 에워싸서 포식소체로 알려진 내부 소포를 형성하는 과정이다. 면역계에서, 식균 작용 병원체 및 세포 잔해물을 제거하는 데 사용되는 주요 메커니즘이다. 단핵구 및 대식세포는 옅소닌화(항체 코팅된) 입자를 식균 작용, 주로 Fc γ R 매개 결합(engagement) 의존성 메커니즘을 통해 면역계에서 제거하는 데 특화된 세포 중에 있다. 하지만, 자가면역 질환에서, 포식세포는 전염증성 사이토카인의 해로운 방출 또는 몸의 다른 중요한 세포의 식균 작용을 일으키도록 활성화될 수 있다. 일 천명이 넘는 헌혈자의 혈장에서 추출하여 모은 다가의 IgG 항체를 함유하는 IVIg는 자가면역 질환을 치료하는 데 사용된다.

[0294] 본 분석 시스템에서, 옅소닌화 세균 또는 바이러스의 모조품인 형광 표지된 항체-코팅 라텍스 비드를 THP-1 세포에 공급하여 작제물 5* 및 IVIg의 존재 및 부재 시에 식균 작용되도록 하였다. 배양 기간의 종료 시점에, 임의의 외부 형광발광을 트리판 블루(trypan blue)로 종결시키고 세포내 형광 발광의 양을 유동 세포 분석법으로 정량하였다. 모든 그룹을 (THP-1 세포 및 라텍스 비드만 처리한) 비치료 대조로 정규화하였다. 결과는 2개의 별개의 실험을 나타낸다.

[0295] 도 17에 도시된 바와 같이, THP-1 단핵구 세포로 옅소닌화된 비드의 식균 작용은 IVIg 및 작제물 5*의 처리에 의해 억제되지만, 작제물 5*에 대한 IC50 값은 IVIg보다 대략 100배 낮다. 이는 본 개시의 Fc 작제물, 예컨대 작제물 5*는 자가면역 적응증뿐 아니라 IVIg를 사용하여 치료 가능한 다른 적응증을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0296] **실시예 11 - Fc γ RIIb에 결합하는 Fc 작제물의 강화**

[0297] S267E/L328F 돌연변이는 Fc γ RIIb 수용체에 대한 IgG1 결합을 유의미하게 그리고 특이적으로 증가시킴을 이전에 보였다(Chu et al. Molecular Immunology 45 2008) S267E/L328F 돌연변이를 작제물 5(SIF) 백본으로 혼입하였다. 본 작제물 5-Fc γ RIIb+ 돌연변이는 잘 발현되고 조립된다(도 18 참조)(SIF: 작제물 5; Fc γ RIIb+: 작제물 5-Fc γ RIIb+ 돌연변이). 도 18은 작제물 5(SIF) 및 작제물 5-Fc γ RIIb+ 돌연변이의 일과성 발현으로 수득한 정화 배지에 대한 비환원 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 결과의 이미지이다. 작제물 5-Fc γ RIIb의 장쇄 및 측쇄를 인코딩하는 플라스미드를 1/1(w/w) 또는 2/1 비로 HEK293 세포에 형질주입하였다.

[0298] 억제성 Fc γ RIIb 수용체에 대한 작제물 5-Fc γ RIIb+ 돌연변이의 결합을 작제물 5(SIF3) 대조와 비교할 때 크게 강화하였다(결합 시 300배 초과 증가). 반대로, 활성화 Fc γ RIIa에의 결합은 비교적 영향받지 않는 반면, Fc γ RIIIa에의 결합은 감소한다(도 19 참조).

[0299] 도 19는 IgG1 대조의 Fc 감마 수용체, 작제물 5 및 작제물 5-Fc γ RIIb+ 돌연변이에 대한 결합을 비교하는 실험의 결과를 요약하는 그래프이다. 상대적인 결합을 세포 기반, 경쟁 시간차 형광 공명 에너지 전이 분석법(competitive Time Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer assays)(CisBio Bioassays, Bedford, MA)을 사용하여 측정하였다. 결과는 EC50 값으로 나타내고, 이는 특정 세포 표면 Fc 감마 수용체에 결합된 형광 표지된 항체를 대체하는 데 필요한 발단자(proband)의 농도를 표시한다. 숫자가 높을수록 결합 또는 친화도가 더 낮다.

[0300] **실시예 12 - 단핵구 유래 수지상 세포(moDC) 활성화의 억제**

[0301] 작제물 5-Fc γ RIIb+ 돌연변이 단핵구 유래 수지상 세포(moDC)의 활성을 매우 강력하게 한다. 전문적인 항원 제시 세포의 가장 중요한 집단인 수지상 세포(DC)는 항원 물질을 처리하고 T-세포 반응을 개시할 목적으로 세포 표면 상에 항원 물질을 제시한다. Fc γ R은 moDC 기능을 조절하는 데 중요한 역할을 할 수 있다. 활성화 Fc γ R의

면역 복합체 결합은 미성숙 인간 moDC의 성숙 및 활성화를 촉발시킬 수 있다. 반대로, 억제성 Fc γ RIIb의 결합은 성숙 및 활성화를 억제할 수 있다(Boruchov AM et al. J Clin Invest. 2005 115(10)). Fc 작제물은 moDC의 성숙 및 활성화를 억제할 수 있음을 이전에 보인 바 있다(Ortiz et al Sci Transl Med 2016 및 도 3 참조). 반면에, Fc γ RIIb+ 돌연변이를 갖는 Fc 작제물(예컨대, 작제물 5/SIF3)은 플레이트 고정 IgG1과 같은 면역 복합체 대용물질(immune complex surrogate)에 노출에 대한 반응으로 moDC 활성화를 유의미하게 강화시킬 수 있다(도 20). 작제물 5-Fc γ RIIb+단독으로 배양하면 moDC 활성화를 유도하지 않는다(도 21).

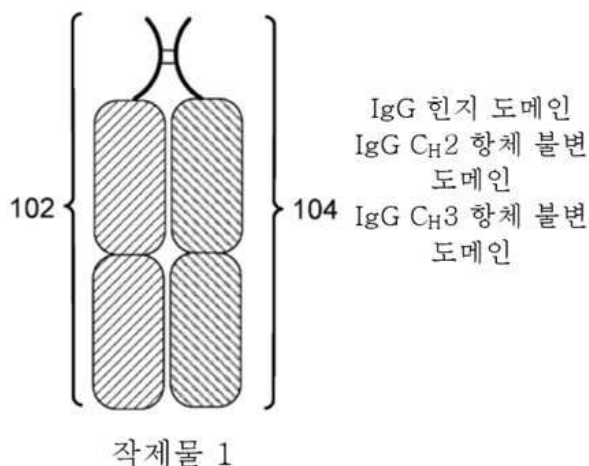
[0302] 미성숙 인간 moDC를 100 ng/mL GM-CSF 및 50 ng/mL IL-4의 존재하에 음성 선택 CD14+ 단핵구에서부터 생성하였다. 수거된 DC를 37° C에서 20분간 배지에서 PBS, 항-CD32a 항체 IV.3, 작제물 5 (SIF3), 또는 작제물 5-Fc γ RIIb+ 중 하나와 배양하였다. 차단 후에, 세포 현탁액을 IgG1 코팅 플레이트로 옮기고 추가 GM-CSF 및 IL-4 보충 배지를 첨가하였다. 48 시간 배양 후에, 얼음처럼 차가운(ice cold) PBS로 플레이트를 2회 세척하여 가볍게 착생한 세포를 수거하였다. 수거된 세포를 항-HLA-DR FITC 및 항-CD86-PE Cy7 Ab로 염색하였다. 세포를 FACSCanto(BD) 및 FlowJo Software(TreeStar)로 분석하였다.

[0303] 도 20: 작제물 5는 플레이트 고정 IgG에 의해 moDC 활성화를 억제하는 반면, 작제물 5-Fc γ RIIb+는 활성화를 강화한다. 표본 히스토그램은 음성 대조(UT)로서 미처리 플레이트상에서 배양되거나 항체 차단 활성화 Fc γ RIIa(IV.3) 또는 작제물 5 또는 작제물 5-Fc γ RIIb+의 증가한 농도로 20분간 전처리한 moDC상의 CD86 표면 발현을 나타낸다. 이어서 처리된 세포를 고정 IgG1(PB IgG)을 함유하는 플레이트로 옮겼다. 종양 괴사 인자 알파(TNF α) 처리를 양성 대조로 사용하였다. CD86의 표면 발현을 유동 세포 분석법으로 평가하였다. CD86 발현의 히스토그램을 대조로서 미자극 세포를 사용하여 게이팅하였다. 치료 질병에 대한 CD86에 양성인 세포의 백분율을 y-축에 나타내었다.

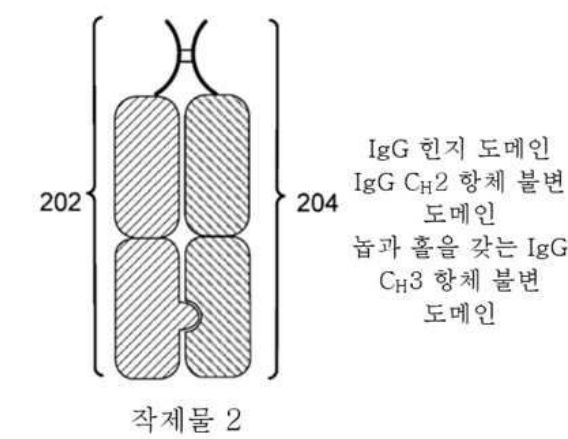
[0304] 도 21: 작제물 5-Fc γ RIIb+는 moDC 활성화를 그것만으로 유도하지는 않지만 플레이트 고정 IgG에 의해 활성화를 강화시킨다. 표본 히스토그램은 음성 대조(UT)로서 미처리 플레이트상에서 배양되거나 작제물 5-Fc γ RIIb+로 20분간 전처리하고 이어서 미처리 플레이트(오직 Fc γ RIIb+)로 옮긴 moDC상의 CD86 표면 발현을 나타낸다. PBS(PB IgG), 활성화 Fc γ RIIa(IV.3)를 차단하는 항체, 또는 작제물 5-Fc γ RIIb+(Fc γ RIIb+)로 전처리한 MoDC를 고정 IgG1을 함유하는 플레이트에 옮겼다. CD86의 표면 발현을 유동 세포 분석법으로 평가하였다. CD86 발현의 히스토그램을 대조로서 미자극 세포를 사용하여 게이팅하였다. 치료 질병에 대한 CD86에 양성인 세포의 백분율을 y-축에 나타내었다.

도면

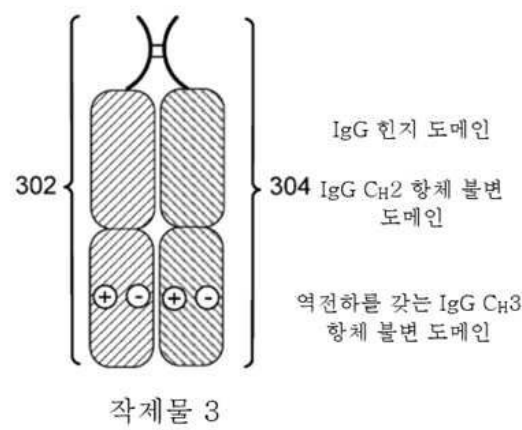
도면1



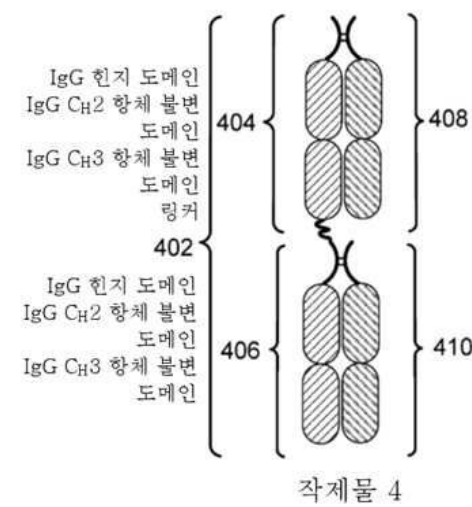
도면2



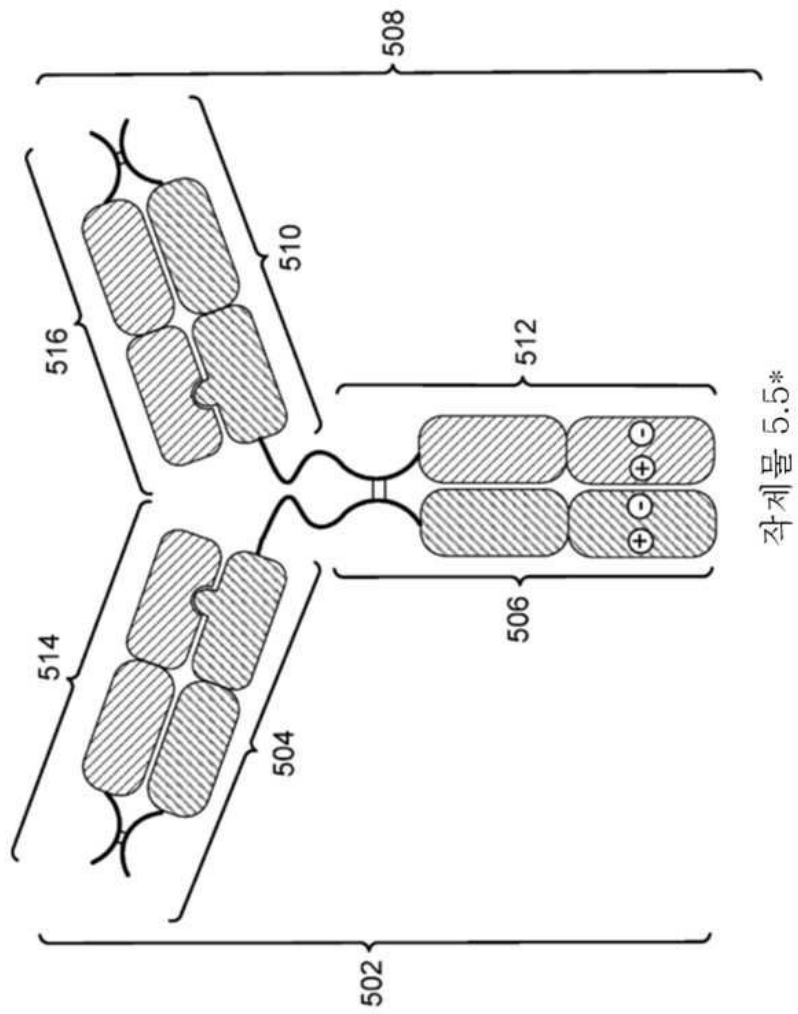
도면3



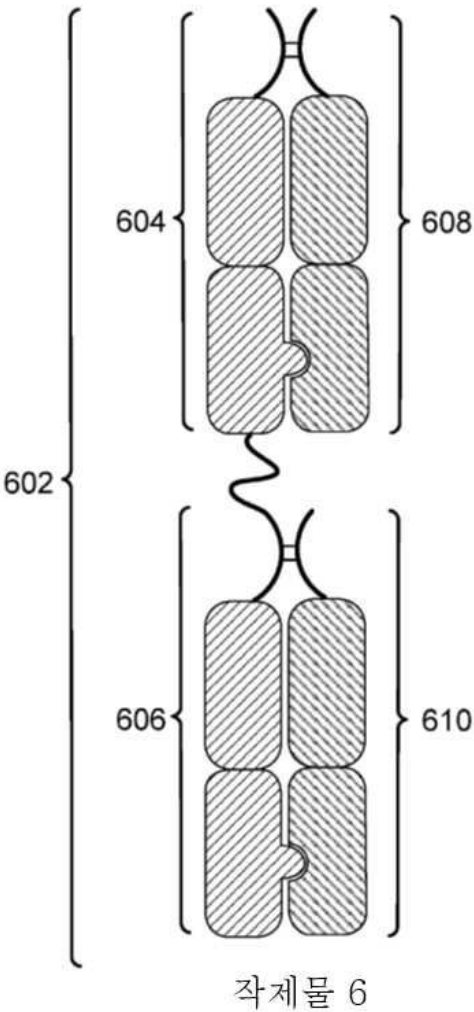
도면4



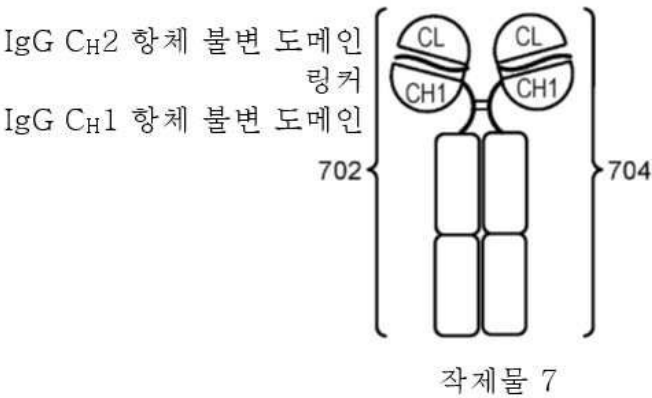
도면5



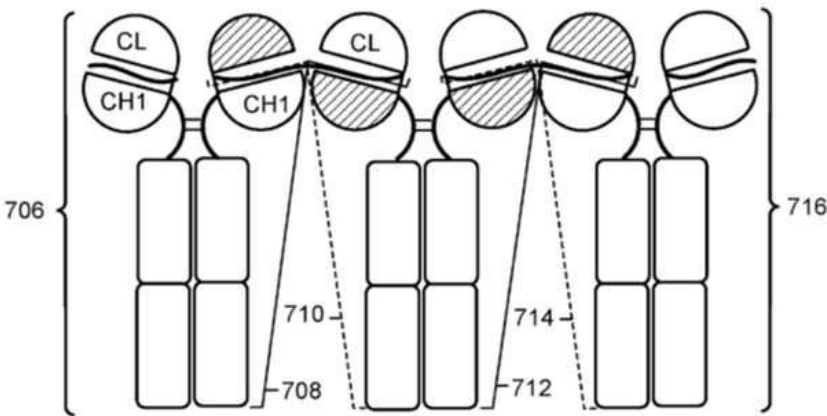
도면6



도면7a

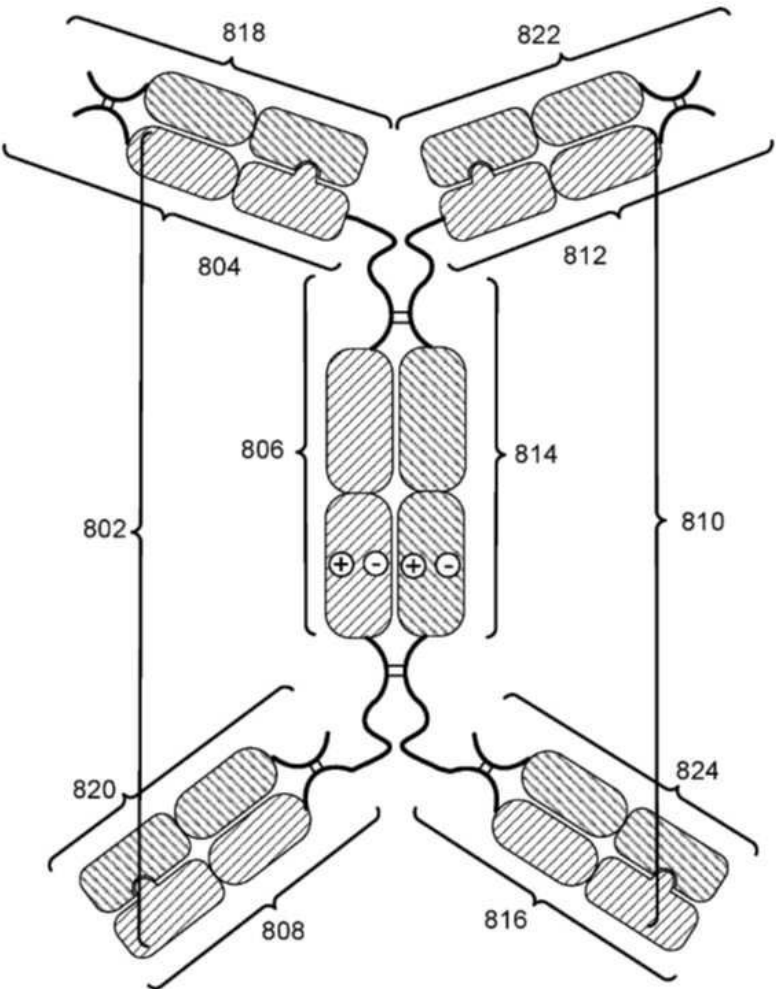


도면7b

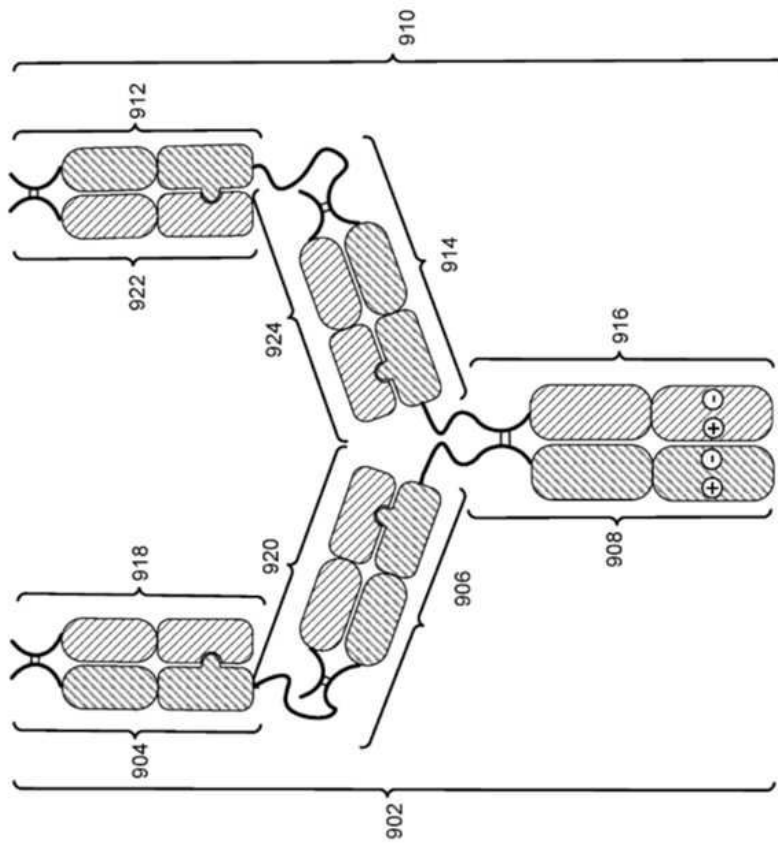


작제물 8(작제물 7의 다량체)

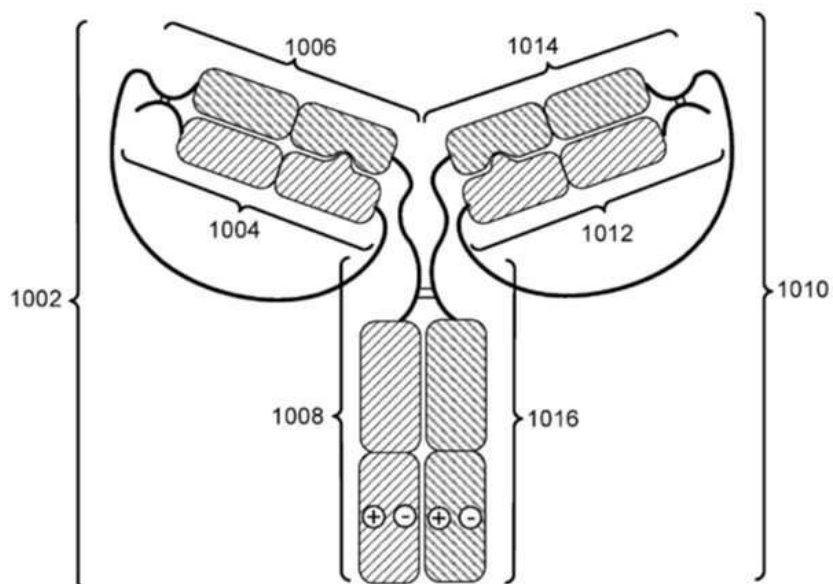
도면8



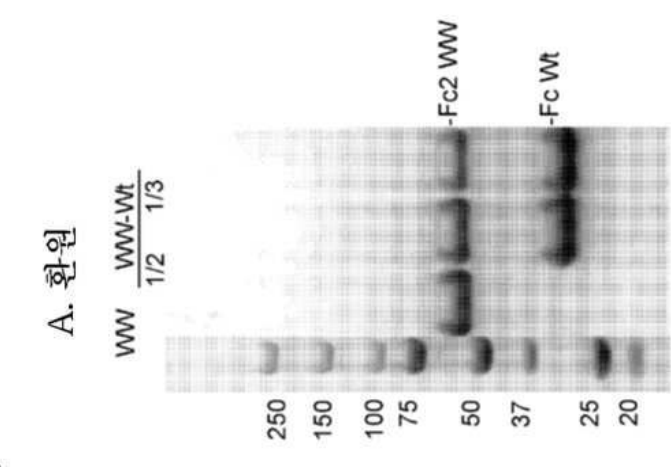
도면9



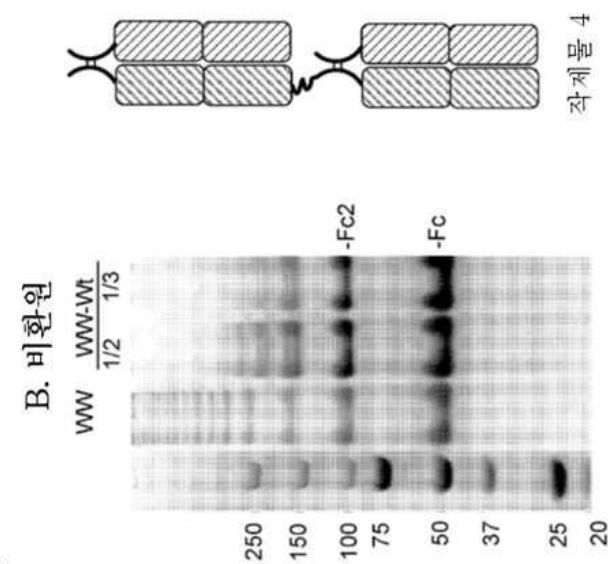
도면 10



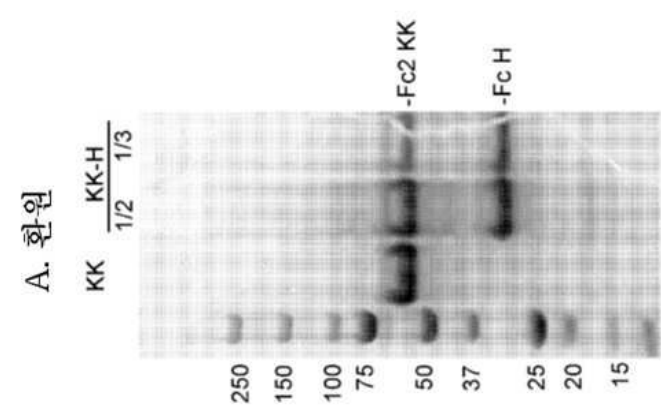
도면11a



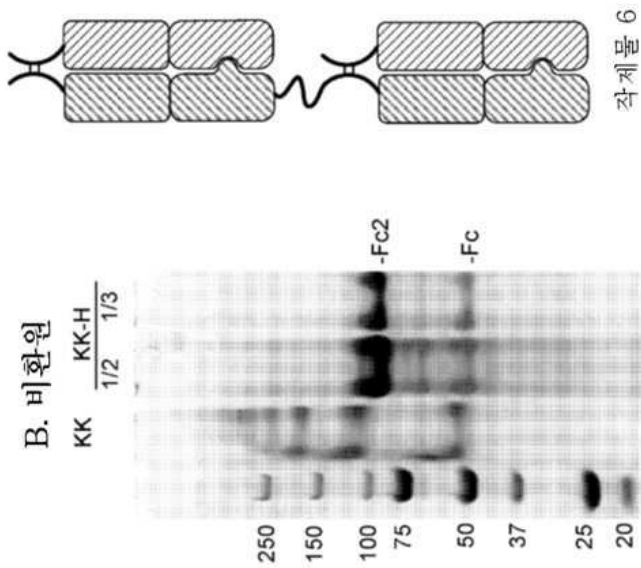
도면11b



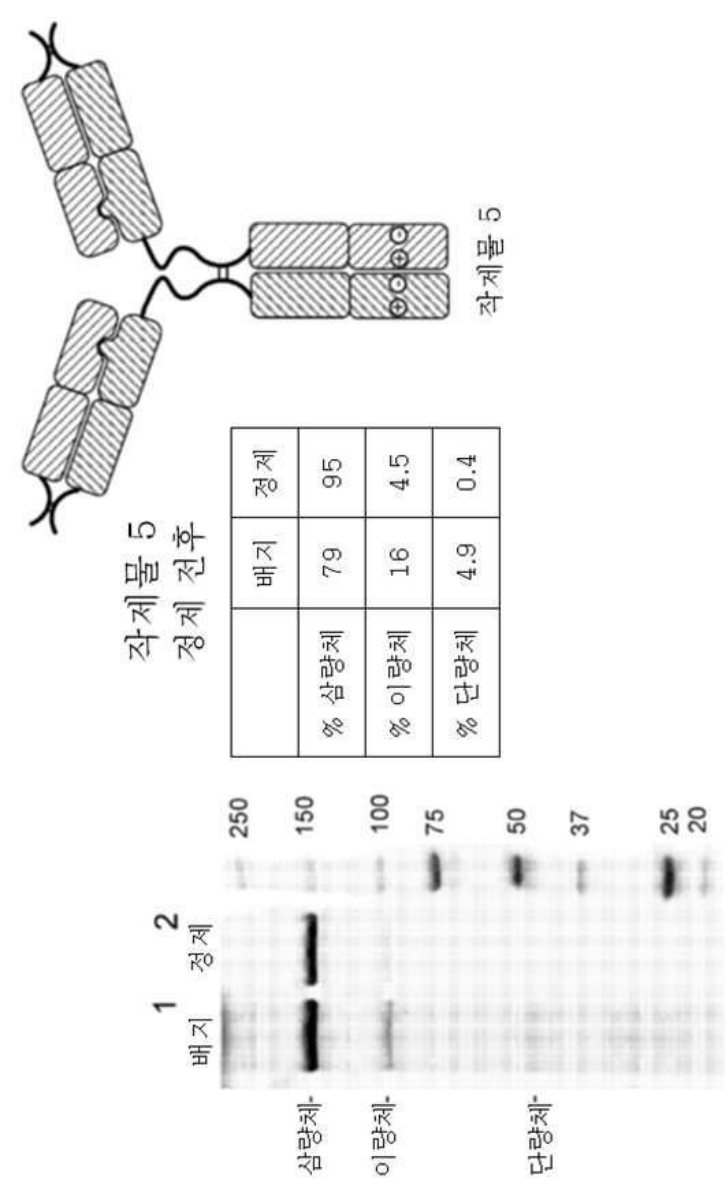
도면12a



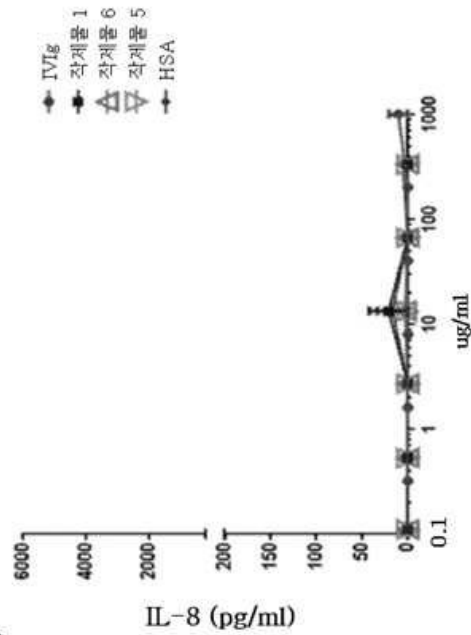
도면12b



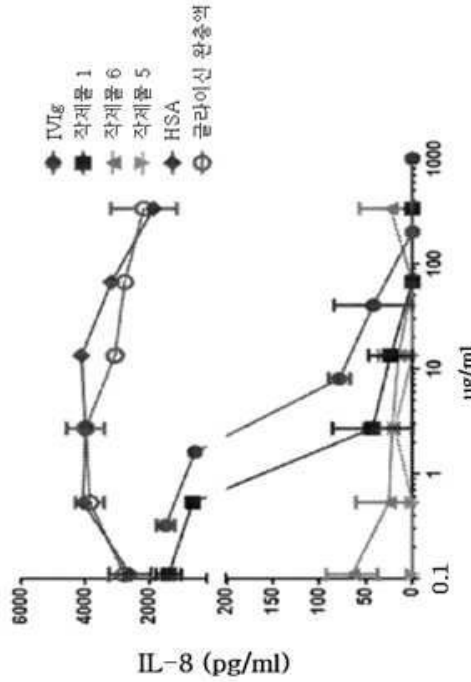
도면13



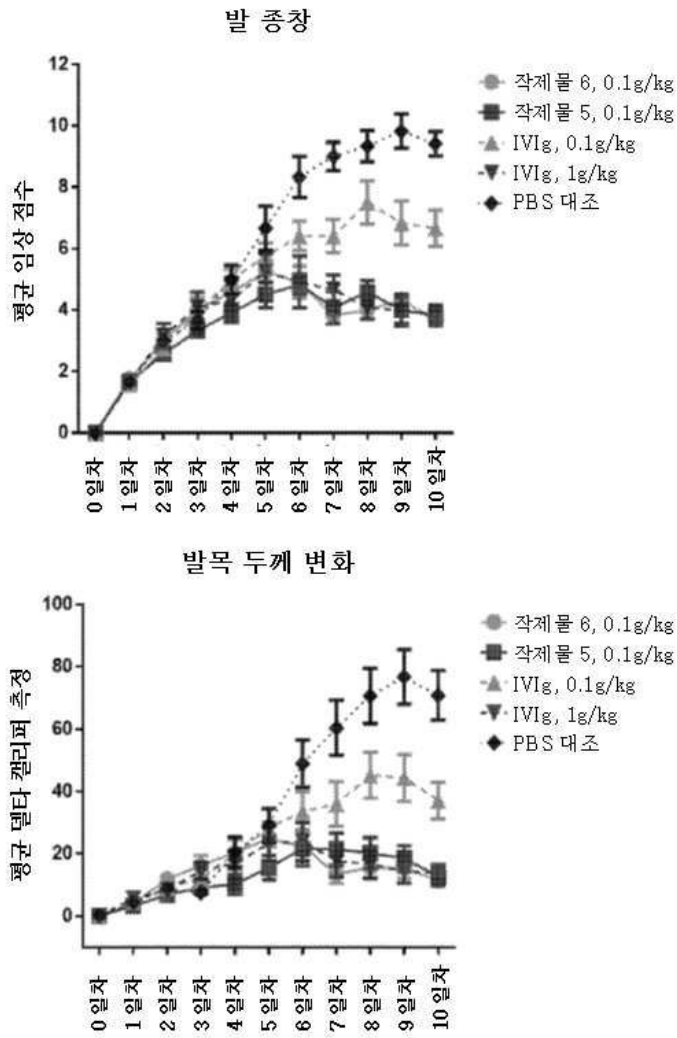
도면14a



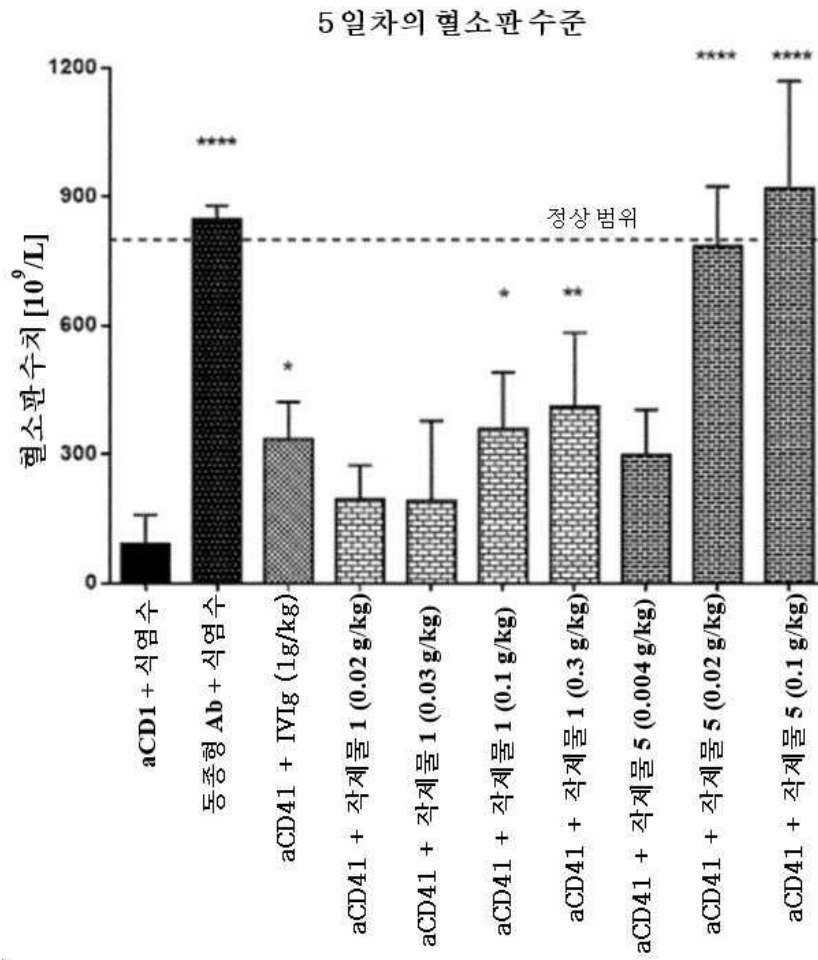
도면14b



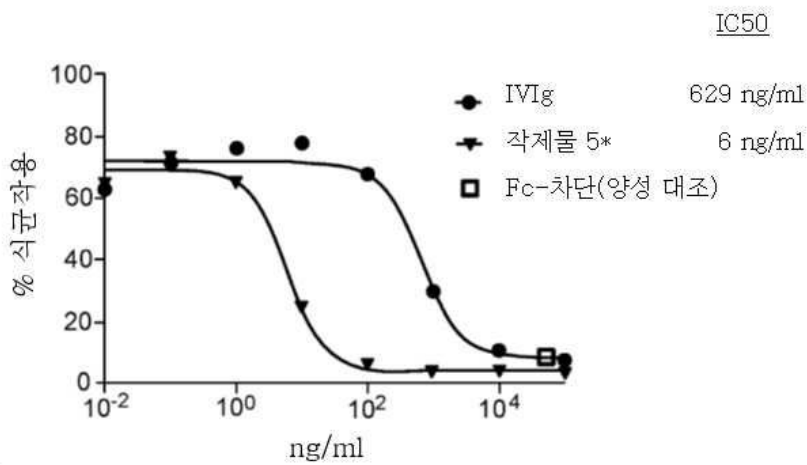
도면15



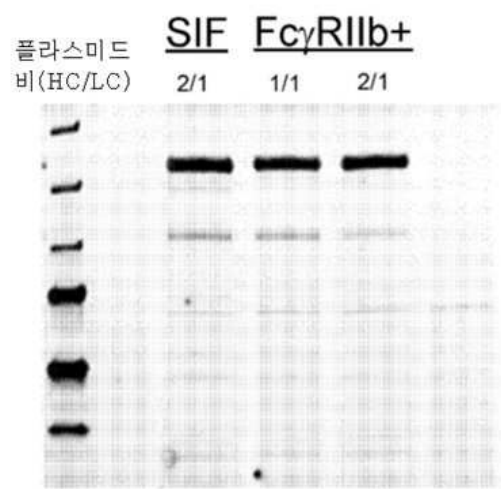
도면16



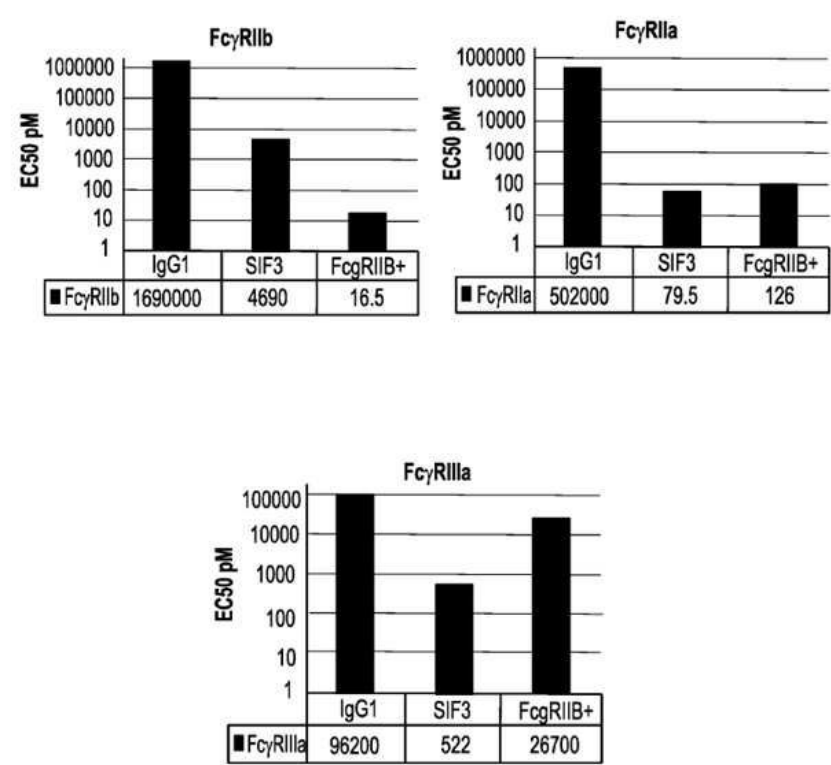
도면17



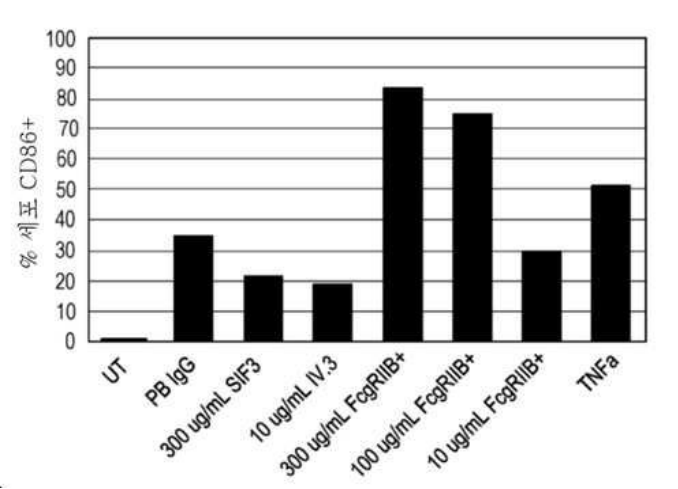
도면18



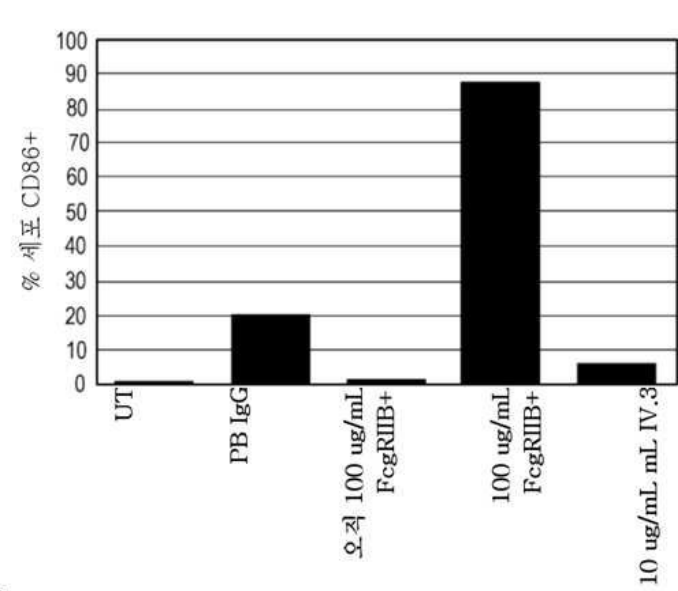
도면19



도면20



도면21



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS RELATED TO ENGINEERED FC CONSTRUCTS

<130> 14131-0148W01

<150> US 62/340,322

<151> 2016-05-23

<150> US 62/443,451

<151> 2017-01-06

<160> 57

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide
 <400> 1
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 2
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide
 <400> 2
 Gly Gly Ser Gly
 1
 <210> 3
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide
 <400> 3
 Ser Gly Gly Gly
 1
 <210> 4
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide
 <400> 4
 Gly Ser Gly Ser

1

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 5

Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 6

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 7

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 8

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

1 5 10

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 9

Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 10

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 11

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

1 5 10

<210> 12

<211

> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 12

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 13

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 14

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 15

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

1 5 10

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 16

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 17

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

1 5 10 15

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 18

Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly

1 5 10

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 19

Ser Ala Cys Tyr Cys Glu Leu Ser

1 5

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 20

Arg Ser Ile Ala Thr

1 5

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 21

Arg Pro Ala Cys Lys Ile Pro Asn Asp Leu Lys Gln Lys Val Met Asn

1 5 10 15

His

<210> 22

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 22

Gly Gly Ser Ala Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser

1 5 10 15

Gly Ala Ser Gly Thr Gly Thr Ala Gly Gly Thr Gly Ser Gly Ser Gly

20 25 30

Thr Gly Ser Gly

35

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 23

Ala Ala Ala Asn Ser Ser Ile Asp Leu Ile Ser Val Pro Val Asp Ser

1 5 10 15

Arg

<210> 24

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 24

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser

20 25 30

Gly Gly Gly Ser

35

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 25

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

1 5 10

<210> 26

<211> 20

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 26

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

1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly

20

<210> 27

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 27

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

1 5 10 15

Gly Ser

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 28

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85

90

95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100

105

110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165

170

175

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

180

185

190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195

200

205

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

210

215

220

Pro Gly Lys

225

<210> 31

<211> 681

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 31

gacaagaccc acacctgtcc gccttgccct gccctgagc tgctgggagg cccagcgtg 60

ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc cgaagtgacc 120

tgcgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac cctgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180

ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtacaa cagcacctac 240

cggtgtgtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agaatacaag 300

tgcaaagtct ccaacaaggc cctgcctgcc cccatcgaga aaaccatcag caaggccaag 360

ggccagcccc gcgagcccca ggtgtacaca ctgccccctt gccgggacga gctgaccaag 420

aaccaggtgt ccctgtggtg cctggtgaaa ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggaa 480

tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggacagc 540

gacggctcat tcttctgtga cagcaagctg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc 600

aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagtcc 660

ctgagcctga gccccggcaa g 681

<210> 32

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

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

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

Pro Gly Lys

225

<210> 33

<211> 681

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 33

gacaagaccc acacctgtcc gccttgccct gccctgagc tgctgggagg cccagcgtg	60
ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc cgaagtgacc	120
tgcgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac cctgaagtga agttcaattg gtacgtggac	180
ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtacaa cagcacctac	240
cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agaatacaag	300
tgcaaagtct ccaacaagc cctgcctgcc cccatcgaga aaaccatcag caaggccaag	360
ggccagcccc gcgagcccca agtgtgtaca ctgccccca gccgggacga gctgaccaag	420
aaccaggtgt ccctgagctg cgccgtgaaa ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggaa	480
tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggacagc	540
gacggctcat tcttctggt tagcaagctg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc	600
aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagtcc	660

ctgagcctga gccccggcaa g

681

<210> 34

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175

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

180	185	190	
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
195	200	205	
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
210	215	220	
Pro Gly Lys			
225			
<210> 35			
<211> 681			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic			
polynucleotide			
<400> 35			
gacaagaccc acacctgtcc gccttgccct gcccctgagc tgctgggagg cccagcgtg			60
ttctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc cgaagtgacc			120
tgcgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac cctgaagtga agttcaattg gtacgtggac			180
ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtacaa cagcacctac			240
cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agaatacaag			300
tgcaaagtct ccaacaaggc cctgcctgcc cccatcgaga aaaccatcag caaggccaag			360
ggccagcccc gcgagcccca ggtgtacaca ctgccccca gccgggacga gctgaccaag			420
aaccaggtgt cctgacctg cctggtgaaa ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggaa			480
tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctgaaaagc			540
gacgggtcat tcttctgta cagcgacctg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc			600
aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtec			660
ctgagcctga gccccggcaa g			681
<210> 36			
<211> 227			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic			
polypeptide			

<400> 36

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175

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

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gly Lys

225

<210> 37

<211> 1398

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 37

gacaagacc acacctgtcc cccctgccct gccctgagc tgctgggagg cccagcgtg	60
ttctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc cgaagtgacc	120
tgctgggtgg tggacgtgtc ccacaggac cctgaagtga agttcaattg gtacgtggac	180
ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag ccagagagg aacagtacaa cagcacctac	240
cgggtgggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tcaacggcaa agagtacaag	300
tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgcctgcc cccatcgaga aaaccatcag caaggccaag	360
ggccagcccc gcgagcccca ggtctacaca ctgccccca gccgggacga gctgaccaag	420
aaccaggtct cctgacctg cctggtgaaa ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggaa	480
tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggacagc	540
gacggctcat tcttctgta cagcaagctg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc	600
aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc	660
ctgagcctga gccccggcaa aggcggggga tctgggggag gaagcggagg cggcagcgat	720
aagaccata cctgcccctc ctgtcccgt cccgaactgc tggggggacc ctccgtgttt	780
ctgtttccac ctaagcctaa ggatacgtc atgatctcca gaaccctga agtcacatgt	840
gtggtggtcg atgtgtctca tgaagatccc gaagtcaagt ttaactgta tgtggatggg	900
gtcgaggtcc acaatgcaa aacaaagcct cgggaagaac agtataactc cacctacaga	960
gtcgtcagcg tgctgacagt ccttcacag gattggctga atgggaaaga gtacaaatgt	1020
aaagtgtcta acaaagctct gcccgctcct atcgaaaaga ccatctccaa agccaaaggg	1080
cagcccagag aacctcaggt gtacacctg ccacctcca gagatgagct gacaaaaat	1140
caggtgtcac tgacatgtct ggtgaaaggg ttttatccct ccgacattgc tgtggaatgg	1200
gaatccaatg ggcagcctga aaacaattat aagacaacac ctcccgctgt ggactccgat	1260
ggctcatttt ttctgtactc taaactgaca gtggataagt ccagatggca gcagggaaat	1320
gtgttttctt gctctgtgat gcatgaagct ctgcataatc actatacaca gaaaagcctg	1380
tcctgtccc ccggcaag	1398

<210> 38

<211> 466

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175

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

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp

 225 230 235 240
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 245 250 255
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 275 280 285
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

 290 295 300
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 340 345 350
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

 355 360 365
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

 420 425 430
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445

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

450

455

460

Gly Lys

465

<210> 39

<211> 1422

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 39

gacaagaccc acacctgtcc cccttgccca gcccctgagc tgctgggagg cccagcgtg 60

ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc cgaagtgacc 120

tgctgtgttg tggacgtgtc ccacgaggac cctgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180

ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtacaa cagcacctac 240

cgggtgtgtg ccgtgtgtac cgtgtgtcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 300

tgcaaggtgt ccaacaagcc cctgctgtcc cccatcgaga aaaccatcag caaggccaag 360

ggccagcccc gcgagcccca ggtgtacacc ctgccccctt gcagagatga gctgaccaag 420

aaccaggtgt cctgtgtgtg cctggtcaag ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggaa 480

tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggacagc 540

gacggctcat tcttctgtga cagcaagctg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc 600

aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 660

ctgagcctga gccccggcaa gtctggggga ggatcagggg gtggaagtgg cgggtgatct 720

ggtgtgtgaa gcggaggcgg cgataagaca cacacatgcc cccctgtcc agtccccgaa 780

ctgctggggg gaccctccgt gtttctgttt ccacctaagc ctaaggatac gctcatgata 840

tccagaaccc ctgaagtcac atgtgtgtgt gtcgatgtgt ctcatgaaga tcccgaagtc 900

aagtttaatt ggtatgtcga tggggtcgag gtgcacaatg ccaaacaaca acctcgggaa 960

gaacagtata atccacata cagagtgtgt tctgtcctca cagtccctga tcaggattgg 1020

ctcaatggga aagagtacaa atgtaaagtc tctaacaagg ctctccccgc tccgatcgaa 1080

aagaccatct ccaaagccaa agggcagccc agagaacctc aggtctacac actgcctccc 1140

agccgggacg agctgacaaa aaatcaagtg tctctgacct gcctcgtgaa gggtttttat 1200

ccctccgaca ttgccgtcga gtgggagtcc aatggacagc cggaaaacaa ttataagacc 1260

acgcctccag tgctgaagtc cgacggcagc ttctttctgt actccgacct gacagtggat 1320

aagtccagat ggcagcaagg gaatgtgttc tcctgttccg tgatgcatga agccctccat 1380

aatcactata cccagaaaag cctgtccctg tcccctggca ag 1422

<210> 40

<211> 474

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165	170	175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
180	185	190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
195	200	205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
210	215	220
Pro Gly Lys Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser		
225	230	235
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
245	250	255
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
260	265	270
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
275	280	285
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
290	295	300
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
305	310	315
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
325	330	335
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
340	345	350
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
355	360	365
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
370	375	380
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
385	390	395
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
405	410	415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 420 425 430
 Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 435 440 445
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 450 455 460
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 41

<211> 1422

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 41

gacaagaccc acacctgtcc ccttgcctt gccctgagc tgctgggagg cccagcgtg	60
ttctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc cgaagtgacc	120
tgcgtggtgg tggacgtgtc ccacaggac cctgaagtga agttcaattg gtacgtggac	180
ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag ccagagagg aacagtaca cagcacctac	240
cgggtggtgt ccgtgtgac cgtgtgtcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag	300
tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgcctgcc cccatcgaga aaaccatcag caaggccaag	360
ggccagcccc gcgagcccca ggtgtacacc ctgccccctt gcagagatga actgaccaag	420
aaccaggtgt cctgtggtg cctggtcaag ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggaa	480
tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggacagc	540
gacggctcat tcttctgtg cagcaagctg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc	600
aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagtcc	660
ctgagcctga gccccggcaa gtctggggga ggatcagggg gtggaagtgg cgggtgatct	720
ggtggtggaa gcggaggcgg cgataagaca cacacatgcc cccctgtcc agctcccgaa	780
ctgctggggg gaccctccgt gtttctgttt ccacctaagc ctaaggatac gctcatgatc	840
tccagaacct ctgaagtcac atgtgtggtg gtcgatgtgt ctcatgaaga tcccgaagtc	900
aagtttaact ggtatgtgga tggggtcgag gtccacaatg ccaaacaacaa gcctcgggaa	960
gaacagtata actccaccta cagagtcgtc agcgtgtgta cagtcctgca tcaagattgg	1020

ctcaatggga aagagtataa gtgtaaagtc tcgaacaaag cctccccgc tcctatcgaa 1080
aagaccatct ccaaagccaa agggcagccc agagaacctc aggtctacac actgcctcca 1140

tgctgggacg agctgacaaa aaatcagggtg tcactgtggt gtctggtgaa ggggttttac 1200
ccttccgaca ttgctgtgga atgggaatcc aatgggcagc ctgaaaacaa ttataagaca 1260
acacctcccg tgctggactc cgatggctca ttttttctgt actctaaact gacagtggat 1320
aagtccagat ggcagcaggg aaatgtgttt tctgtctctg tgatgcatga agctctgcat 1380
aatcactata cacagaaaag cctgtccctg tcccctggca ag 1422

<210> 42

<211> 474

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 42

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130	135	140	
Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
145	150	155	160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
	165	170	175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
	180	185	190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
	195	200	205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
	210	215	220
Pro Gly Lys Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser			
225	230	235	240
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
	245	250	255
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
	260	265	270
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
	275	280	285
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
	290	295	300
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
305	310	315	320
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
	325	330	335
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
	340	345	350
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
	355	360	365
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu			
	370	375	380

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 385 390 395 400
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 405 410 415
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 420 425 430
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465 470

<210> 43

<211> 1365

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide

<400> 43

aggacagtgg ccgtcccgag cgtgttcac ttccaccca gcgacgagca gctgaagtec 60

ggcacagcca gcgtgggtctg cctgtgaac aacttctacc cccgcgaggc caaggtgcag 120

tggaaggtgg acaacgccct gcagagcggc aacagccagg aaagcgtcac cgagcaggac 180

agcaaggact ccacctacag cctgtctagc accctgaccc tgagcaaggc cgactacgag 240

aagcacaagg tgtacgcctg cgaagtgacc caccagggcc tgtccagccc cgtgaccaag 300

agcttcaaca gaggcgagtg cggcggctct ggccgaggat ccgggggagg atcaggcggc 360

ggaagcggag gcagcgctag cacaaagggc cctccgtgt tccccctggc ccccagcagc 420

aagagcatat ctggcggaac agccgccctg ggctgcctgg tgaaagacta cttccccgag 480

cccgtgaccg tgtcctggaa ctctggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttccagcc 540

gtgctgcaga gcagcggcct gtactccctg agcagcgtgg tgacagtgcc tagcagcagc 600

ctgggacccc agacctatat ctgcaactg aaccacaagc ccagcaacac caaagtggac 660

aagcgggtgg aaccaagag ctgcgacaag acccacacgt gtccccctg cccagccct 720

gaactgctgg gcggacctag cgtgttctg tccccccaa agcccaagga caccctgatg 780

atcagccgga cccccgaagt gacctgcgtg gtggtggacg tgtccacga ggacctgaa 840
gtgaagtcca attggtacgt ggacggcgtg gaagtgcaca atgccaagac caagcccaga 900
gaggaacagt acaacagcac ctaccgggtg gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggac 960

tggctgaacg gcaaagagta caagtgaag gtctccaaca aggcctgcc tgccccatc 1020
gagaaaacca tcagcaagc caagggccag ccccgcgagc cccaggtgta cacactgccc 1080
cccagccggg acgagctgac caagaaccag gtgtccctga cctgtctggt gaaaggcttc 1140
taccctccg atatcgccgt ggaatgggag agcaacggcc agcccagaa caactacaag 1200
accaccccc ctgtgctgga ctccgacggc tcattcttcc tgtacagaa gctgaccgtg 1260
gacaagagcc ggtggcagca gggcaacgtg ttcagctgct ccgtgatgca cgaggccctg 1320
cacaaccact acaccagaa gtcctgagc ctgagccccg gcaaa 1365

<210> 44

<211> 455

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 44

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Ser Gly Gly

100 105 110

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

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

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

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

355 360 365
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430

 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 45
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 45
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

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

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

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

210 215 220
 Pro Gly Lys
 225
 <210> 46
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 46
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

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

 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Lys Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

 Pro Gly Lys Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 245 250 255
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 260 265 270
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 275 280 285

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

290 295 300
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
305 310 315 320
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
325 330 335
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
340 345 350

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
355 360 365
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
370 375 380
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
385 390 395 400
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe
420 425 430
Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
435 440 445
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
450 455 460
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 47

<211> 681

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 47

gacaagaccc acacctgtcc gccttgccct gccctgagc tgctgggagg cccagcgtg 60

ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc cgaagtgacc 120

tgcgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac cctgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180
ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtacaa cagcacctac 240
cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agaatacaag 300
tgcaaagtct ccaacaaggc cctgcctgcc cccatcgaga aaaccatcag caaggccaag 360

ggccagcccc gcgagcccca agtgtgtaca ctgcccccca gccgggacga gctgaccaag 420
aaccaggtgt cctgagctg cgccgtggac ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggaa 480
tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggacagc 540
gacggctcat tcttctggt tagcaagctg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc 600
aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 660
ctgagcctga gccccggcta g 681

<210> 48

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 48

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

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

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

Pro Gly

225

<210> 49

<211> 1422

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 49

gacaagacc acacctgtcc ccttgccca gccctgagc tgctgggagg cccagcgtg 60

ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc cgaagtgacc 120

tgcgtggtgg tggacgtgtc ccacaggac cctgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180

ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtacaa cagcacctac 240

cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 300

tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgcctgcc cccatcgaga aaaccatcag caaggccaag 360

ggccagcccc gcgagcccca ggtgtacacc ctgccccctt gcagagataa gctgaccaag 420

aaccaggtgt cctgtggtg cctggtcaag ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggaa 480

tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggacagc 540
gacggctcat tcttcctgta cagcaagctg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc 600
aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 660
ctgagcctga gccccggcaa gggaggggga ggaggagggg gtggaggtgg cggtagggc 720
ggtggtggag gcggaggcgg cgataagaca cacacatgcc cccctgtcc agtccccgaa 780
ctgctggggg gaccctccgt gtttctgttt ccacctaagc ctaaggatac gctcatgac 840
tccagaacct ctgaagtcac atgtgtggtg gtcgatgtgt ctcatgaaga tcccgaagtc 900

aagtttaatt ggtatgtcga tggggtcgag gtgcacaatg caaaacaaa acctcgggaa 960
gaacagtata actccacata cagagtgggtg tctgtcctca cagtccctgca tcaggattgg 1020
ctcaatggga aagagtacaa atgtaaagtc tctaacaagg ctctccccgc tccgatcgaa 1080
aagaccatct ccaaagccaa agggcagccc agagaacctc aggtctacac actgcctccc 1140
agccgggacg agctgacaaa aaatcaagtg tctctgacct gcctcgtgaa gggcttttat 1200
ccctccgaca ttgccgtcga gtgggagtc aatggacagc cggaaaacaa ttataagacc 1260
acgctccag tgcigaagtc cgacggcagc ttctttctgt actccgacct gacagtggat 1320

aagtccagat ggcagcaagg gaatgtgttc tctgttccg tgatgcatga agccctccat 1380
aatcactata cccagaaaag cctgtccctg tccctggct ag 1422

<210> 50

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 50

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

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

65	70	75	80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
	85	90	95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile			
	100	105	110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
	115	120	125
Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Lys Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser			
	130	135	140
Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
145	150	155	160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
	165	170	175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
	180	185	190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
	195	200	205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
	210	215	220
Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly			
225	230	235	240
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
	245	250	255
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
	260	265	270
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
	275	280	285
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
	290	295	300
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
305	310	315	320

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 325 330 335
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 340 345 350

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 355 360 365
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 370 375 380
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 385 390 395 400
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 420 425 430
 Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 435 440 445
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 465 470

<210> 51

<211> 4

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 51

Gly Gly Gly Gly

1

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 52

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 53

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 53

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 54

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 54

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

<210> 55

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 55

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly

20

<210> 56

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

6xHis tag

<400> 56

His His His His His His

1 5

<210> 57

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 57

Gly Gly Gly Ser

1