



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년06월03일
 (11) 등록번호 10-0960560
 (24) 등록일자 2010년05월24일

(51) Int. Cl.
C07K 16/18 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2005-7005356
 (22) 출원일자(국제출원일자) 2003년09월26일
 심사청구일자 2006년04월10일
 (85) 번역문제출일자 2005년03월28일
 (65) 공개번호 10-2005-0071523
 (43) 공개일자 2005년07월07일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2003/030249
 (87) 국제공개번호 WO 2004/029207
 국제공개일자 2004년04월08일
 (30) 우선권주장
 60/414,433 2002년09월27일 미국(US)
 (뒷면에 계속)
 (56) 선행기술조사문헌
 JBC, Vol. 276(9), pp. 6591-6604.*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
젠코어 인코포레이티드
 미국 91016 캘리포니아주 몬로비아 웨스트 레몬
 애비뉴 111
 (72) 발명자
라자르 그레고리 알란
 미국 91202 캘리포니아주 글렌데일 #114 더블유
 드라이덴스트리트 268
치리노 아더 제이.
 미국 91106 캘리포니아주 카마틸로 푸에블로 비스
 타 6816
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 29 항

심사관 : 김지윤

(54) 최적화된 Fc 변이체 및 그의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 최적화된 Fc 변이체, 그의 제조 방법, 및 최적화된 Fc 변이체를 포함하는 항체 및 Fc 융합체에 관한 것이다.

(72) 발명자

당 웨이

미국 91106 캘리포니아주 파사데나 아파트먼트 312
블랑쉬스트리트 1111

데스자르라이스 존 루돌프

미국 91104 캘리포니아주 파사데나 이 캐리 스트리트
2096

도베르스타인 스테펜 콜

미국 91106 캘리포니아주 파사데나 #202 에스 레이
크 애비뉴 700

하이스 로버트 제이.

미국 91103 캘리포니아주 파사데나 아로요 테라스
190

카르키 셰어 바하두르

미국 91101 캘리포니아주 파사데나 노스 엘 몰리노
애비뉴 300

바파 오미드

미국 91016 캘리포니아주 몬로비아 오션 뷰 애비뉴
724

(30) 우선권주장

60/442,301 2003년01월23일 미국(US)

60/467,606 2003년05월02일 미국(US)

60/477,839 2003년06월12일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

모체(parent) Fc 폴리펩타이드의 Fc 부위(region) 내에 적어도 하나의 아미노산 변형(modification)을 포함하는 Fc 변이체(variant) 부분을 포함하는 항체로서,

상기 Fc 변이체 부분은 239D, 239E, 239F, 239H, 239N, 239Q, 239T, 및 239Y로 구성되는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 치환(substitution)을 포함하고,

상기 Fc 변이체는 상기 모체 Fc 폴리펩타이드에 비하여 Fc γ R에 대한 결합성을 변경시키는 것인 항체.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

청구항 4은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제1항에 있어서,

상기 Fc 변이체가, 234, 235, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 332, 333 및 334로 이루어지는 군으로부터 선택되는 인간 서열의 위치에 해당하는 위치에 적어도 하나의 추가적인 치환을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 5

청구항 5은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제1항에 있어서,

상기 Fc 변이체가 332번 위치에 추가적인 치환을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 6

삭제

청구항 7

청구항 7은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제1항에 있어서,

상기 Fc 변이체가 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241L, 241Y, 241E, 241R, 243W, 243L, 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247V, 247G, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 266I, 266A, 266T, 266M, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 313F, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 327N, 327L, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 332D, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y, 및 332A로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 추가적인 치환을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 8

청구항 8은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제1항에 있어서,

상기 Fc 변이체가 239E/332E, 239Q/332E, 239E, 239E/265G, 239E/265N, 239E/265Q, 239D/332D, 239D/332E,

239D/332N, 239D/332Q, 239E/332D, 239E/332N, 239E/332Q, 239N/332D, 239N/332E, 239N/332N, 239N/332Q, 239Q/332D, 239Q/332N, 239Q/332Q, 239E/264I/332E, 239Q/264I/332E, 239E/264I/330Y/332E, 239E/264I/298A/330Y/332E, 239D/297D/332E, 239E/297D/332E, 239D/265V/297D/332E, 239D/265I/297D/332E, 239D/265L/297D/332E, 239D/265F/297D/332E, 239D/265Y/297D/332E, 239D/265H/297D/332E, 239D/265T/297D/332E, 239D/330Y/332E, 239N/330Y/332E, 239D/330L/332E, 239N/330L/332E, 239D/298A/332E, 239N/298A/332E, 239D/264I/332E, 239D/264I/298A/332E, 및 239D/264I/330L/332E로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 9

청구항 9은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제7항에 있어서,

상기 Fc 변이체 부분이 256, 270, 290, 298, 312, 322, 326, 329, 331, 333, 334, 및 339로 이루어지는 군으로부터 선택되는 인간 서열의 위치에 해당하는 위치에 적어도 하나의 치환을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 Fc γ R이 Fc γ RIIIa인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 Fc γ RIIIa가 Fc γ RIIIa의 V158 또는 F158 알로타입(allotype)인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 Fc 변이체가 239D, 239E, 239N, 239Q, 또는 239T 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 16

청구항 16은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제15항에 있어서,

상기 Fc 변이체가 264I, 243L/264I, 328M, 332E, 328M/332E, 264I/332E, 298A/332E, 330Y, 332D, 328I/332E, 328Q/332E, 264T, 240I, 266I, 332N, 332Q, 330Y/332E, 264I/330Y/332E, 330L/332E, 264I/330L/332E, 234E, 234Y, 234I, 235D, 235S, 235Y, 235I, 240M, 264Y, 330I, 325T, 328D/332E, 328V/332E, 328T/332E, 328I/332E 및 264I/298A/332E로 이루어지는 군으로부터 선택되는 추가적인 치환을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 17

청구항 17은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제15항에 있어서,

상기 Fc 변이체가 256, 270, 290, 298, 312, 322, 326, 329, 331, 333, 334, 및 339로 이루어지는 군으로부터 선택되는 위치에 적어도 하나의 치환을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 18

제1항에 있어서,

상기 모체 Fc 폴리펩타이드가 실질적으로 인간의 폴리펩타이드, 실질적으로 마우스(mouse)의 폴리펩타이드, 실질적으로 래트(rat)의 폴리펩타이드, 또는 실질적으로 원숭이(monkey)의 폴리펩타이드인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 19

제1항에 있어서,

하나 이상의 Fc 리간드(ligand)에 대한 결합(binding)이 변경되지 않는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 Fc 리간드가 C1q, FcRn, 단백질 A, 및 단백질 G로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 21

제1항에 있어서,

상보체 의존성 세포독성(complement dependent cytotoxicity; CDC)이 영향을 받지 않는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 22

제1항에 있어서,

하나 이상의 Fc 리간드에 대한 결합이 변경되는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

청구항 29은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제1항에 있어서,

상기 Fc 변이체가 256, 270, 290, 298, 312, 322, 326, 329, 331, 333, 334, 및 339로 이루어지는 군으로부터 선택되는 위치에 하나 이상의 추가적인 치환을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 30

제1항에 있어서,

상기 Fc 변이체가 상기 모체 Fc 폴리펩타이드에 비하여 감소된 친화성을 가지는 적어도 하나의 Fc γ R에 결합하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 31

제30항에 있어서,

상기 Fc γ R이 Fc γ RIIIa인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 32

제31항에 있어서,

상기 Fc 변이체가 239N, 239Q, 239F, 239H, 또는 239Y 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 33

청구항 33은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제31항에 있어서,

상기 Fc 변이체가 240T, 264L, 241W, 241L, 243W, 243L, 241L/243L/262I/264I, 241W/243W, 241W/243W/262A/264A, 241L/262I, 243L/262I/264W, 241Y/243Y/262T/264T, 241E/243R/262E/264R, 241E/243Q/262T/264E, 241R/243Q/262T/264R, 241E/243Y/262T/264R, 328M, 328E, 328F, 244H, 245A, 247V, 313F, 244H/245A/247V, 247G, 241E/243R/262E/264R/332E, 241E/243Y/262T/264R/332E, 265G, 265N, 265Q, 296E, 296Q, 299I, 327N, 267Q/327S, 267L/327S, 327L, 329F, 330L, 297S, 297D, 297S/332E, 332N, 332Q, 264F, 263I, 299A, 299S, 299V, 325Q, 325L, 325I, 296D, 296N, 234D, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234V, 234F, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235V, 235F, 240A, 263T, 263M, 264M, 266A, 266T, 266M, 269H, 269Y, 269F, 269R, 296S, 296T, 296L, 296I, 298H, 299H, 330V, 330F, 330R, 330H, 325D, 325E, 325A, 325V, 325H, 328E/332E, 328N/332E, 328Q/332E, 328H/332E, 328H, 241E, 241R, 243Y, 243R, 243Q, 262I, 262A, 262T, 262E, 263A, 264I, 264W, 264T, 264R, 264E, 299L, 299F, 299E, 328N, 328Q, 328A, 332T, 332H, 332Y, 및 332A로 이루어지는 군으로부터 선택되는 추가적인 치환을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 34

삭제

청구항 35

제1항에 있어서,

상기 Fc 변이체가 모체 Fc 폴리펩타이드에 비해 항체 의존성 세포-매개 세포독성(ACDD: antibody dependent cell-mediated cytotoxicity)을 조절하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 36

제35항에 있어서,

상기 Fc 변이체가 상기 모체 Fc 폴리펩타이드에 비하여 ADCC를 개선시키는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 37

제36항에 있어서,

상기 ADCC 개선이 상기 모체 Fc 폴리펩타이드에 비하여 대략 5배 이상인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 38

제37항에 있어서,

상기 ADCC 개선이 상기 모체 Fc 폴리펩타이드에 비하여 대략 5배 내지 50배 이상인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 39

삭제

청구항 40

청구항 40은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제37항에 있어서,

상기 Fc 변이체가 234E, 234Y, 234I, 240I, 240M, 243L, 264I, 264T, 264Y, 266I, 328M, 328I, 328Q, 328D, 328V, 328T, 332D, 332E, 332N, 332Q, 및 325T로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 추가적인 치환을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 41

청구항 41은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제37항에 있어서,

상기 Fc 변이체가 264I, 243L/264I, 328M, 332E, 328M/332E, 264I/332E, 298A/332E, 332D, 328I/332E, 328Q/332E, 264T, 240I, 266I, 332N, 332Q, 330Y/332E, 264I/330Y/332E, 330L/332E, 264I/330L/332E, 234E, 234Y, 234I, 240M, 264Y, 325T, 328D/332E, 328V/332E, 328T/332E, 328I/332E, 및 264I/298A/332E로 이루어지는 군으로부터 선택되는 추가적인 치환을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

제1항에 있어서,

상기 Fc 변이체가 상기 모체 Fc 폴리펩타이드에 비하여 ADCC를 감소시키는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 45

제44항에 있어서,

상기 Fc 변이체가 239E, 239N, 239Q, 239F, 239H, 또는 239Y 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 46

청구항 46은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제44항에 있어서,

상기 Fc 변이체가 264L, 241W, 241L, 243W, 243L, 241L/243L/262I/264I, 241W/243W, 241W/243W/262A/264A,

241L/262I, 243L/262I/264W, 241Y/243Y/262T/264T, 241E/243R/262E/264R, 241E/243Q/262T/264E, 241R/243Q/262T/264R, 241E/243Y/262T/264R, 328M, 328E, 328F, 244H, 245A, 247V, 313F, 244H/245A/247V, 247G, 241E/243R/262E/264R/332E, 241E/243Y/262T/264R/332E, 265G, 265N, 265Q, 299I, 327N, 267Q/327S, 267L/327S, 327L, 297S/332E, 332N, 332Q, 264F, 263I, 299A, 299S, 299V, 325Q, 325L, 325I, 296D, 296N, 234D, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234V, 234F, 240A, 263T, 263M, 264M, 266A, 266T, 266M, 299H, 325D, 325E, 325A, 325V, 325H, 328E/332E, 328N/332E, 328Q/332E, 328H/332E, 328A, 332T, 332H, 332Y, 및 332A로 이루어지는 군으로부터 선택되는 추가적인 치환을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 47

제1항에 있어서,

상기 항체가, 모체 Fc 폴리펩타이드의 Fc 부위 내에 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하는 모체 Fc 폴리펩타이드의 아글라이코실화된(aglycosylated) Fc 변이체를 포함하고,

상기 아글라이코실화된 Fc 변이체가 상기 모체 Fc 폴리펩타이드의 아글라이코실화된 형태에 비하여 Fc 리간드에 대해 개선된 안정성, 용해성, 또는 결합 친화성을 가지는 항체.

청구항 48

제47항에 있어서,

상기 아글라이코실화된 Fc 변이체가 상기 모체 Fc 폴리펩타이드의 아글라이코실화된 형태에 비하여 Fc 리간드에 대해 개선된 결합 친화성을 가지는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 49

제48항에 있어서,

상기 Fc 리간드가 Fc γ R인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 50

제49항에 있어서,

상기 Fc γ R이 Fc γ RIIIa인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 51

제48항에 있어서,

상기 개선된 결합 친화성이 상기 모체 Fc 폴리펩타이드의 글라이코실화된(glycosylated) 형태의 0.4배 이내인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 52

삭제

청구항 53

제47항에 있어서,

상기 Fc 변이체가 239D 또는 239E 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 54

청구항 54은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제47항에 있어서,

상기 Fc 변이체가 239D/297D/332E, 239E/297D/332E, 239D/265Y/297D/332E, 239D/265H/297D/332E, 239D/332E 및 239E/332E로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 55

청구항 55은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제53항에 있어서,

상기 아글라이코실화된 Fc 변이체 부분이 256, 270, 290, 298, 312, 322, 326, 329, 331, 333, 334, 및 339로 이루어지는 군으로부터 선택되는 인간 서열의 위치에 해당하는 위치에 적어도 하나의 추가적인 치환을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 56

제1항에 있어서,

상기 항체가 상기 Fc 변이체를 포함하는 Fc 융합체(fusion)를 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 57

제1항 또는 제56항에 있어서,

상기 항체가 조작된 글라이코 형태(engineered glycoform)를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 58

제57항에 있어서,

상기 조작된 글라이코 형태가 작동체 기능을 개선시키는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 59

제1항에 따르는 항체 및 약학적으로 허용 가능한 캐리어(carrier)를 포함하는, 항체 관련 질환 치료를 위한 약학적 조성물(pharmaceutical composition).

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

제1항에 있어서,

상기 Fc 변이체는, 인간 서열의 위치에 해당하는 위치에, 239D, 239E, 239Q, 및 239T로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 치환을 포함하며, 상기 항체 또는 Fc 융합체는 CD19, CD20, CD22, CD33, CD52, Her2/neu, EGFR, EpCAM, MUC1, GD3, CEA, CA 125, HLA-DR, TNF알파, 및 VEGF로 이루어지는 군으로부터 선택되는 표적 항원에 대하여 특이성을 가지는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

청구항 67은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제63항에 있어서,

상기 Fc 변이체가 치환 298A를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 68

청구항 68은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제4항에 있어서,

상기 적어도 하나의 추가적인 치환이 264 위치에서의 치환이되, 상기 서열이 실질적으로 인간 서열인 경우, 상기 치환은 V264A가 아닌 것을 특징으로 하는 항체.

명세서

기술분야

[0001] 본 출원은, 35 U.S.C. § 199(e) 하에, 2003년 6월 12일자로 출원된 USSN 60/477,839; 2003년 5월 2일자로 출원된 USSN 60/467,606; 2002년 9월 27일자로 출원된 USSN 60/414,433; 및 2003년 1월 23일자로 출원된 USSN 60/442,301의 권리를 주장하며, 이들 특허 모두 본원에 참고로서 인용된다.

[0002] 본 발명은, 신규한 최적화된 Fc 변이체(variant), 그를 제조하기 위한 조작 방법(engineering method), 및 그의 용도, 특히 치료 목적에 있어서의 그의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 항체(antibody)는 특이적 항원에 결합하는 면역학적 단백질(immunological protein)이다. 인간 및 마우스를 포함하는 대부분의 포유류에 있어서, 항체는 짝지어진(paired) 중쇄 폴리펩타이드(heavy polypeptide chain) 및 경쇄 폴리펩타이드(light polypeptide chain)로 구성된다. 각각의 사슬은 개별적인 면역글로불린(immunoglobulin; Ig) 도메인으로 이루어지며, 따라서 포괄적 의미의 면역글로불린이란 용어가 그러한 단백질들에 대하여 사용된다. 각각의 사슬은, 가변 부위(variable region) 및 불변 부위(constant region)라 일컬어지는 2개의 개별적인 부위로 이루어진다. 경쇄 및 중쇄 가변 부위는 항체들 사이에서 중요한 서열 다양성(sequence diversity)을 나타내며, 표적 항원(target antigen)에 대한 결합을 담당한다. 불변 부위는 보다 작은 서열 다양성을 나타내며, 중요한 생화학적 작용을 유발하는 다양한 천연 단백질에 대한 결합을 담당한다. 인간의 경우에는, IgA(서브클래스 IgA1 및 IgA2 포함), IgD, IgE, IgG(서브클래스 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4 포함), 및 IgM를 포함하는 상이한 5개 클래스의 항체가 존재한다. 불변 부위에는 미세한 차이는 존재할 수는 있으나, 이들 항체 클래스들 사이의 구별되는 특징은 그들의 불변 부위에 있다. 도 1은 IgG1 항체를 도시한 것으로서, 본원에서 면역글로불린의 일반적인 구조적 특징을 묘사하는 일례로서 사용된다. IgG 항체는, 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄로 구성되는 테트라머 단백질(tetrameric protein)이다. 상기 IgG 중쇄는, V_H-C_H1-C_V2-C_H3의 순서로 N-말단으로부터 C-말단으로 연결된 4개의 면역글로불린 도메인으로 구성되며, 여기서 V_H, C_H1, C_V2, 및 C_H3은 각각 중쇄 가변 도메인, 불변 감마 1 도메인, 불변 감마 2 도메인, 및 불변 감마 3 도메인을 일컫는다. 상기 IgG 경쇄는, V_L-C_L의 순서로 N-말단으로부터 C-말단으로 연결된 2개의 면역글로불린 도메인으로 구성되며, 여기서 V_L 및 C_L은 각각 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인이라 일컫는다.

[0004] 항체의 가변 부위는 분자의 항원 결합 결정인자(antigen binding determinant)를 함유하며, 따라서 그의 표적 항원에 대한 항체의 특이성(specificity)을 결정한다. 상기 가변 부위는, 동일한 클래스 내의 기타 항체들과 서열에 있어 뚜렷이 상위하기 때문에 가변 부위라 일컬어진다. 대부분의 서열 가변성(sequence variability)은 상보성 결정 부위(complementarity determining region; CDR) 내에서 발생한다. 총 6개의 CDR이 존재하며, 중쇄 및 경쇄 내에 각각 3개씩 존재하며, V_H CDR1, V_H CDR2, V_H CDR3, V_L CDR1, V_L CDR2, 및 V_L CDR3이라 지칭되어 있다. 상기 CDR 외부의 가변 부위는 골격(framework; FR) 부위라 일컬어진다. FR 부위는 CDR만큼 다양하지는

않으나, 상이한 항체들 사이에서는 FR 부위 내에도 서열 가변성이 존재한다. 전반적으로, 이러한 항체의 특징적인 구조는, 항원의 광범위한 배열(array)에 대한 특이성을 획득하기 위하여 실질적인 항원 결합 다양성(antigen binding diversity)(CDR)이 면역계(immune system)에 의하여 탐사될 수 있는, 안정된 스캐폴드(scaffold)(FR 부위)를 제공한다. 다수의 고해상도 구조(high-resolution structure)가, 상이한 유기체(organism) 유래의 다양한 가변 부위 단편(fragment)에 대하여 활용 가능하며, 이들의 일부는 항원과 결합되지 않은 상태이고, 일부는 항원과 복합체(complex)를 형성하고 있는 상태이다. 항체 가변 부위의 서열 및 구조적 특징은 잘 특정화되어 있으며 (Morea *et al.*, 1997, *Biophys Chem* 68: 9-16; Morea *et al.*, 2000, *Methods* 20: 267-279), 항체의 보존된 특징(conserved feature)은 다양한 항체 조작 기법(antibody engineering technique)의 개발을 가능하게 해왔다 (Maynard *et al.*, 2000, *Annu Rev Biomed Eng* 2: 339-376). 예컨대, 하나의 항체, 예를 들어 쥐(murine) 항체로부터 유래된 CDR을, 또 다른 하나의 항체, 예를 들어 인간 항체의 골격 부위로 이식(graft)할 수 있다. 그러한 과정은, 당 기술 분야에서 "인간화(humanization)"라 일컬어지며, 이는 비인간(nonhuman) 항체로부터의 면역원성이 작은 항체 치료제의 생산을 가능하게 한다. 가변 부위를 포함하는 단편은, 예를 들어, V_H - $C\gamma 1$ 및 V_H - C_L 을 포함하는 항원 결합 단편(antigen binding fragment; Fab), V_H 및 V_L 을 포함하는 가변 단편(Fv), 동일한 사슬 내에 함께 연결된 V_H 및 V_L 을 포함하는 단일 사슬 가변 단편(single chain variable fragment; scFv), 및 다양한 기타 가변 부위 단편 항체의 기타 부위의 부재 하에 존재할 수 있다 (Little *et al.*, 2000, *Immunol Today* 21: 364-370).

[0005]

항체의 Fc 부위는, 작동체 기능(effector function)이라 일컬어지는 일련의 중요한 기능적 성능을 부여하는 다수의 Fc 수용체 및 리간드와 상호 작용한다. IgG의 경우, 상기 Fc 부위는, 도 1에 도시된 바와 같이, Ig 도메인 $C\gamma 2$ 및 $C\gamma 3$ 및 $C\gamma 2$ 내로 인도되는 N-말단 힌지(hinge)를 포함한다. IgG 클래스에 대한 Fc 수용체의 중요한 한 부류로는 Fc 감마 수용체($Fc\gamma R$)가 있다. 이들 수용체는 면역계의 세포 아암(cellular arm)과 항체 사이의 커뮤니케이션(communication)을 매개한다 (Raghavan *et al.*, 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 181-220; Ravetch *et al.*, 2001, *Annu Rev Immunol* 19: 275-290). 인간에 있어서, 이러한 부류의 단백질은, 이성형(isoform) $Fc\gamma RIa$, $Fc\gamma RIb$, 및 $Fc\gamma RIc$ 를 포함하는 $Fc\gamma RI$ (CD64); 이성형 $Fc\gamma RIIa$ (알로타입(allotype) H131 및 R131 포함), $Fc\gamma RIIb$ ($Fc\gamma RIIb-1$ 및 $Fc\gamma RIIb-2$ 포함), 및 $Fc\gamma RIIc$ 를 포함하는 $Fc\gamma RII$ (CD32); 및 이성형 $Fc\gamma RIIIa$ (알로타입 V158 및 F158 포함) 및 $Fc\gamma RIIIb$ (알로타입 $Fc\gamma RIIIb-NA1$ 및 $FeyRIIIb-NA2$)를 포함하는 $Fc\gamma RIII$ (CD16)을 포함한다 (Jefferis *et al.*, 2002, *Immunol Lett* 82: 57-65). 통상적으로, 이들 수용체는 Fc에 대한 결합을 매개하는 세포의 도메인(extracellular domain), 막에 걸쳐 있는 부위(membrane spanning region), 및 세포 내에서 일부 신호화(signaling) 현상을 매개할 수 있는 세포내 도메인(intracellular domain)을 갖는다. 이들 수용체는, 단핵구(monocyte), 대식 세포(macrophage), 호중구(neutrophil), 수지상 세포(dendritic cell), 호산구(eosinophil), 비만 세포(mast cell), 혈소판(platelet), B 세포, 거대 과립 림프구(large granular lymphocyte), 랑게르한스 세포(Langerhans' cell), 천연 킬러(natural killer; NK) 세포, 및 $\gamma\gamma$ T 세포를 포함하는 다양한 면역 세포 내에서 발견된다. Fc/ $Fc\gamma R$ 복합체의 형성은, 결합된 항원의 부위에 대하여 이들 작동체 세포(effector cell)를 상보하며, 이는 통상적으로, 염증 매개인자(mediator)의 방출, B 세포 활성화(activation), 세포내 이입(endocytosis), 포식 작용(phagocytosis), 및 세포독성 공격(cytotoxic attack)과 같은 세포 내에서의 신호화 현상 및 후속하는 중요한 면역 반응을 야기한다. 세포독성 및 포식 작용성 작동체 기능(effector function)을 매개하는 능력은, 항체가 표적화된 세포를 파괴하는 것에 의한 잠재된 메커니즘(mechanism)이다. $Fc\gamma R$ 을 발현시키는 비특이적인 세포독성 세포가 표적 세포 상에 결합된 항체를 인식하고, 그리하여 상기 표적 세포의 용해(lysis)를 야기하는 세포-매개의 반응을, 항체 의존성 세포-매개의 세포독성(antibody dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCC)이라 일컫는다 (Raghavan *et al.*, 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 181-220; Ghetie *et al.*, 2000, *Annu Rev Immunol* 18: 739-766; Ravetch *et al.*, 2001, *Annu Rev Immunol* 19: 275-290). $Fc\gamma R$ 을 발현시키는 비특이적인 세포독성 세포가 표적 세포 상에 결합된 항체를 인식하고, 그리하여 상기 표적 세포의 포식 작용을 야기하는 세포-매개의 반응을, 항체 의존성 세포-매개의 포식 작용(antibody dependent cell-mediated phagocytosis; ADCP)이라 일컫는다. $Fc\gamma RIIa$ (pdb 기탁 코드(accession code) 1H9V) (Sondermann *et al.*, 2001, *J Mol Biol* 309: 737-749) (pdb 기탁 코드 1FCG) (Maxwell *et al.*, 1999, *Nat Struct Biol* 6: 437-442), $Fc\gamma RIIb$ (pdb 기탁 코드 2FCB) (Sondermann *et al.*, 1999, *Embo J* 18: 1095-1103); 및 $Fc\gamma RIIIb$ (pdb 기탁 코드 1E4J) (Sondermann *et al.*, 2000, *Nature* 406: 267-273)를 포함하는 다양한 인간 $Fc\gamma R$ 의 세포의 도메인의 구조가 밝혀졌다. 모든 $Fc\gamma R$ 은, 도 2에 도시된 바와 같이, $C\gamma 2$ 도메인의 N-말단 및 선행하는 힌지에서 Fc 상의 동일한 부위에 결합한다. 이러한 상호 작용은 구조적으로 잘 특정화되어 있으며 (Sondermann *et al.*, 2001, *J Mol Biol* 309: 737-749), 인간 $Fc\gamma RIIb$ 의 세포의 도메인에 결합된 인간 Fc의 여러 구조 (pdb 기탁 코드 1E4K)

(Sondermann *et al.*, 2000, *Nature* 406: 267-273), (pdb 기탁 코드 1IIS 및 1IIX)(Radaev *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 16469-16477)가 밝혀졌을 뿐 아니라, 인간 IgE/Fc ϵ RI α 복합체의 구조가 확인되었다 (pdb 기탁 코드 1F6A) (Garman *et al.*, 2000, *Nature* 406: 259-266).

[0006]

상이한 서브클래스의 IgG가 Fc γ R에 대하여 친화성(affinity)을 가지며, IgG1 및 IgG3은 통상적으로 IgG2 및 IgG4보다는 수용체에 실질적으로 더 잘 결합한다 (Jefferis *et al.*, 2002, *Immunol Lett* 82: 57-65). 모든 Fc γ R은, 상이한 친화성을 가지고 IgG Fc 상의 동일한 부위에 결합한다. 친화성이 높은 바인더(binder) Fc γ RI은 IgG1에 대하여 10^{-8} M⁻¹의 Kd 값을 가지는 반면, 친화성이 낮은 수용체 Fc γ RII 및 Fc γ RIII은 일반적으로 각각 10^{-6} 및 10^{-5} 의 값으로 결합한다. Fc γ RIIIa 및 Fc γ RIIIb의 세포외 도메인은 동일하게 96%이나, Fc γ RIIIb는 세포내 신호화 도메인을 함유하지 않는다. 나아가, Fc γ RI, Fc γ RIIa/c, 및 Fc γ RIIIa는, 면역수용체 타이로신계 활성화 모티프(immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITAM)를 가지는 세포내 도메인을 가지는 것을 특징으로 하는 면역 복합체에 의하여 시발되는 활성화에 대한 포지티브 조절인자(positive regulator)인 반면, Fc γ RIIb는 면역수용체 타이로신계 저해 모티프(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif; ITIM)를 가지며, 따라서 저해성(inhibitory)이다. 따라서, 전자는 활성화 수용체(activation receptor)라 일컬어지며, Fc γ RIIb는 저해성 수용체라 일컬어진다. 상기 수용체들 또한 발현 패턴 및 상이한 면역 세포 수준에 있어 상이하다. 또 다른 하나의 복잡한 수준은, 인간 프로테오(protome) 내에 다수의 Fc γ R 다형(polymorphism)의 존재한다는 점이다. 임상학적으로 유의성을 가지는, 특정한 관련 다형은 V158/F158 Fc γ RIIIa이다. 인간 IgG1은, F158 알로타입보다는 V158 알로타입에 대하여 보다 큰 친화성을 가지고 결합한다. 친화성에 있어서의 이러한 차이 및 ADCC 및/또는 ADCP에 대한 그의 작용은, 항-CD20 항체 리툭시맵(rituximab)(Rituxan^(R), IDEC Pharmaceuticals Corporation의 등록 상표)의 효능에 대한 중요한 결정인자인 것으로 밝혀져 있다. V158 알로타입을 가지는 환자는 리툭시맵 치료에 대하여 호의적으로 반응하나, 낮은 친화성 F158 알로타입을 가지는 환자는 이에 대해 약하게 반응한다 (Cartron *et al.*, 2002, *Blood* 99: 754-758). 대략 10% 내지 20%의 인간이 V158/V158 동종 접합성(homozygous)이고, 45%의 인간은 V158/F158 이종 접합성(heterozygous)이며, 35% 내지 45%의 인간은 F158/F158 동종 접합성이다 (Lehrnbecher *et al.*, 1999, *Blood* 94: 4220-4232; Cartron *et al.*, 2002, *Blood* 99: 754-758). 그러므로, 80% 내지 90%의 인간이 리툭시맵에 대한 약한 반응자이며, 즉 이들은 F158 Fc γ RIIIa의 적어도 하나의 대립 형질을 갖는다.

[0007]

도 1에 도시한 바와 같이, Fc 상의 중첩되는 개별적인 부위는, 상보(complement) 단백질 C1q에 대한 경계면(interface)으로서 제공된다. Fc/Fc γ R 결합이 ADCC을 매개하는 방식과 동일한 방식으로, Fc/C1q 결합 역시 상보체 의존성 세포독성(complement dependent cytotoxicity; CDC)을 매개한다. C1q는 세린 프로테아제(protease) C1r 및 C1s와 함께 복합체를 형성하여, C1 복합체를 형성한다. C1q는 6개의 항체와 결합할 수 있으나, 상기 상보체 캐스케이드(cascade)를 활성화하는 데에는 IgG에 대해서는 2개의 결합도 충분하다. Fc γ R의 Fc의 상호 작용과 유사하게, 상이한 서브클래스의 IgG들은 C1q에 대하여 상이한 친화성을 가지며, IgG1 및 IgG3은 통상적으로, IgG2 및 IgG4에 비하여 Fc γ R에 실질적으로 더 잘 결합한다 (Jefferis *et al.*, 2002, *Immunol Lett* 82: 57-65). 현재, Fc/C1q 복합체에 대한 구조는 밝혀져 있지 않으나, 돌연변이 유발(mutagenesis) 연구를 통해, 잔기 D270, K322, K326, P329, 및 P331, 및 E333을 포함하는 부위에 대하여 C1q에 대한 인간 IgG 상의 결합 부위가 맵핑되었다 (Idusogie *et al.*, 2000, *J Immunol* 164: 4178-4184; Idusogie *et al.*, 2001, *J Immunol* 166: 2571-2575).

[0008]

도 1에 도시된 바와 같이, C γ 2 및 C γ 3 도메인 사이의 Fc 상의 부위는 신생(neonatal) 수용체 FcRn과의 상호 작용을 매개하며, 그의 결합은 엔도솜(endosome)으로부터 혈류(bloodstream)로 세포내 이입된 항체를 재순환시킨다 (Raghavan *et al.*, 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 181-220; Ghetie *et al.*, 2000, *Annu Rev Immunol* 18: 739-766). 이 과정은, 전체 길이 분자의 거대한 크기에 기인하여, 신장 여과(kidney filtration)의 저지와 연관되어, 1주 내지 3주 범위의 유리한 항체 혈청 반감기(antibody serum half-life)를 갖는다. 또한, FcRn에 대한 Fc의 결합은 항체 운반에 있어서도 중요한 역할을 담당한다. 나아가, Fc 상의 FcRn에 대한 결합 부위는 박테리아 단백질 A 및 G가 결합하는 부위이다. 통상적으로, 이들 단백질에 의한 단단한 결합은, 단백질 정제 시, 단백질 A 또는 단백질 G 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)를 이용함으로써 항체를 정제하는 수단으로써 개발된다. 그러므로, Fc에 대한 이 부위의 충실성(fidelity)은 항체 및 그들 정제물의 임상적 특성에 있어 중요하다. 래트 Fc/FcRn 복합체의 이용 가능한 구조 (Martin *et al.*, 2001, *Mol Cell* 7: 867-877), 및 Fc와 단백질 A 및 G의 복합체의 이용 가능한 구조 (Deisenhofer, 1981, *Biochemistry* 20: 2361-2370; Sauer-Eriksson *et al.*, 1995, *Structure* 3: 265-278; Tashiro *et al.*, 1995, *Curr Opin Struct Biol* 5: 471-

481)는, Fc와 이들 단백질의 상호 작용에 대한 정보를 제공한다.

[0009] 상기 Fc 부위의 중요한 특징은, 도 1에 도시된 바와 같이, N297에서 발생하는 보존된 N-결합 글라이코실화(glycosylation)이다. 종종 올리고당(oligosaccharide)이라 불리는, 이러한 탄수화물(carbohydrate)은 항체에 대하여 결정적인 구조적 및 기능적 역할을 담당하며, 이는 항체가 포유류 발현 시스템을 이용해 생산되어야 하는 주요한 이유 중 하나이다. 특정 이론으로 제한하고자 하는 바는 아니나, 상기 탄수화물의 구조적 목적은, Fc의 안정화 또는 가용화(solubiliz), C γ 3 및 C γ 2 도메인 사이의 특이성 또는 가요성(flexibility) 수준의 측정, 중심 축에 걸친 2개의 C γ 2 도메인의 상호 응집 저해, 또는 이러한 작용들의 조합된 작용을 수행하는 것일 수 있을 것으로 여겨진다. Fc γ R 및 C1q에 대한 유효한 Fc 결합에는, N297 탄수화물 조성에 있어서의 변화 및 변경이 요구되나, 그의 제거(elimination)는 이들 단백질에 대한 결합에 영향을 준다 (Umana *et al.*, 1999, *Nat Biotechnol* 17: 176-180; Davies *et al.*, 2001, *Biotechnol Bioeng* 74: 288-294; Mimura *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 45539-45547.; Radaev *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 16478-16483; Shields *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 6591-6604; Shields *et al.*, 2002, *J Biol Chem* 277: 26733-26740; Simmons *et al.*, 2002, *J Immunol Methods* 263: 133-147). 또한, 상기 탄수화물은 Fc γ R과의 임의의 특이적인 접촉이 있는 경우에는 거의 만들어지지 않으며 (Radaev *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 16469-16477), 이는 Fc/Fc γ R 결합을 매개하는 데에 있어서의 N297 탄수화물의 기능적 역할이 Fc 형태(conformation)를 결정하는 데에 있어서 그들이 담당하는 구조적 역할을 통해 이루어짐을 시사한다. 이는 4개의 상이한 Fc 글라이코 형태(glycoform)의 결정 구조의 수집에 의하여 지지되며, 올리고당의 조성은 C γ 2의 형태에 영향을 주며, 결과적으로 Fc/Fc γ R 경계면에 영향을 주는 것으로 확인된 바 있다 (Krapp *et al.*, 2003, *J Mol Biol* 325: 979-989).

[0010] 이상에서 언급된 항체들의 특징, 즉 표적에 대한 특이성, 면역 작동체 메커니즘(immune effector mechanism)을 매개하는 능력, 및 혈청 내에서의 긴 반감기를 통해 강력한 항체 치료제가 만들어진다. 단일 클론성 항체는, 암, 염증, 및 심장 혈관 질환(cardiovascular disease)을 포함하는 다양한 증상(condition)의 치료를 위한 목적으로 사용된다. 시중에는 10종 이상의 항체 제품이 유통되고 있으며, 수백 종의 제품이 개발 단계에 있다. 항체 이외에도, 연구 및 치료 용도에 있어 확장된 역할을 가지는 것으로 확인된 항체형 단백질로는 Fc 융합체(fusion)가 있다 (Chamow *et al.*, 1996, *Trends Biotechnol* 14: 52-60; Ashkenazi *et al.*, 1997, *Curr Opin Immunol* 9: 195-200). Fc 융합체는 하나 이상의 폴리펩타이드가 Fc에 유효하게 결합된 단백질이다. Fc 융합체는 항체의 Fc 부위, 및 따라서 그의 유리한 작동체 기능 및 약물 동력학(pharmacokinetic) 기능을, 수용체, 리간드, 또는 몇몇 기타 단백질 또는 단백질 도메인의 표적-결합 부위와 조합시킨다. 후자의 역할은 표적 인식을 매개하는 것이며, 따라서 기능적으로 상기 항체 가변 부위와 유사하다. 항체와 Fc 융합체는 구조적으로 및 기능적으로 중첩되기 때문에, 본 발명에 있어서, 항체에 대한 논의는 Fc 융합체로 직접 확장된다.

[0011] 그러한 광범위한 적용성에도 불구하고, 항체들은 임상 용도로 최적화되어 있지 않다. 항체들에 있어서의 2가지 중요한 결점은, 항암 효능이 최적 이하의 수준이라는 점과, 지나친 생산 요건이다. 본 발명은 이러한 결함들을 해소한다.

[0012] 항체가 종양 세포를 파괴하는 가능한 메커니즘은 다수 존재하며, 그러한 메커니즘은, 요구되는 성장 경로(growth pathway)의 차단에 의한 항-증식(anti-proliferation), 에이포프토시스(apoptosis)를 야기하는 세포내 신호화, 수용체의 증진된 하향 조절(downregulation) 및/또는 전복(turnover), CDC, ADCC, ADCP, 및 적응성 면역 반응의 촉진을 포함한다 (Cragg *et al.*, 1999, *Curr Opin Immunol* 11: 541-547; Glennie *et al.*, 2000, *Immunol Today* 21: 403-410). 항-종양 효능은 이들 메커니즘의 조합에 기인할 수 있으며, 임상 요법에 있어서의 그들의 관련 중요성은 암 의존성인 것으로 여겨진다. 이러한 항-종양 치료 무기의 축적에도 불구하고, 항암제로서의 항체의 효능은 만족스럽지 못하며, 그들의 비용 또한 매우 높다는 점에서 바람직하지 못하다. 환자의 종양 반응 데이터에 따르면, 단일 클론성 항체는 정규의 단일-제제 세포독성 화학치료제 전반에 걸쳐 치료 성과에 있어 작은 개선만을 제공한다. 예를 들어, 모든 퇴보성 저급 비-호드그킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma) 환자의 단지 절반만이 항-CD20 항체 리툽시맵에 대하여 반응한다 (McLaughlin *et al.*, 1998, *J Clin Oncol* 16: 2825-2833). 166명의 임상 환자들 중, 6%는 완전한 반응을 나타내었고, 42%는 부분적인 반응을 나타내었으며, 대략 12개월의 기간 동안 중간 정도의 반응 나타내었다. 트라스투주맵(Trastuzumab)(Herceptin^(R), Genentech의 등록 상표)은, 전이성(metastatic) 유방암의 치료를 위한 항-HER2/neu 항체이나, 효능이 낮다. 222명의 환자에 대하여 트라스투주맵을 이용해 테스트 한 경우, 전반적인 반응률은 단지 15%이었으며, 8%는 완전 반응을 나타내었고, 26%는 부분적인 반응을 나타내었으며, 9개월 내지 13개월의 생존 기간 동안 중간 정도의 반응을 나타내었다 (Cobleigh *et al.*, 1999, *J Clin Oncol* 17: 2639-2648). 현재, 항암 요법의 경우, 사망률에 있어서는 임의의 작은 개선에 대해 성공적인 것으로 확인되어 있다. 그러므로, 표적화된 암 세포를 파괴하는 항체의 역량을

증진시키는 것이 중요한 관건이다.

- [0013] 항체의 항-종양 효능을 증진시키기 위한 유망한 수단은 ADCC, ADCP, 및 CDC와 같은 세포독성 작동체 기능을 매개하는 그들의 능력을 증진시키는 것이다. 항체의 항암 활성(activity)에 대한 Fc γ R-매개의 작동체 기능의 중요성은 마우스에서 입증된 바 있으며 (Clynes *et al.*, 1998, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 652-656; Clynes *et al.*, 2000, *Nat Med* 6: 443-446), Fc 및 특정 Fc γ R 사이의 상호 작용의 친화성은, 세포-기존 분석평가 (cell-based assay) 시 표적화된 세포독성과 상관성이 있는 것으로 확인되었다 (Shields *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 6591-6604; Presta *et al.*, 2002, *Biochem Soc Trans* 30: 487-490; Shields *et al.*, 2002, *J Biol Chem* 277: 26733-26740). 부가적으로, 인간에 있어서의 임상적 효능 및 Fc γ RIIIa 친화성이 높은 다형(V158) 또는 친화성이 낮은 다형(F158)의 알로타입 사이에는 상관성이 있는 것이 관찰된 바 있다 (Cartron *et al.*, 2002, *Blood* 99: 754-758). 이러한 데이터를 종합해 볼 때, 특정 Fc γ R에 대한 결합에 대하여 최적화된 Fc 부위를 가지는 항체는 작동체 기능을 보다 잘 매개할 수 있으며, 따라서 환자 내에서 암 세포를 보다 효율적으로 파괴할 수 있다. 수용체의 활성화 및 저해 사이의 균형은 중요한 인자이며, 최적의 작동체 기능은, 활성화 수용체, 예를 들어 Fc γ RI, Fc γ RIIa/c, 및 Fc γ RIIIa에 대한 증진된 친화성을 가지나, 저해성 수용체 Fc γ RIIb에 대해서는 감소된 친화성을 가지는 Fc를 유도한다. 나아가, Fc γ R은 항원 제시 세포에 의한 항원 섭취(uptake) 및 처리를 매개할 수 있으므로, 증진된 Fc/Fc γ R 친화성은 또한 적응성 면역 반응(adaptive immune response)을 유도하는 항체 치료제의 역량을 개선시킬 수 있다.
- [0014] 통상적으로 알라닌에 대한 치환(알라닌 스캐닝이라고 일컬어짐)이 수반되거나, 서열 상동 치환(sequence homology substitution)이 수반되는, Fc 대한 돌연변이 유발 연구가 다양한 목적으로 실시되었다 (Duncan *et al.*, 1988, *Nature* 332: 563-564; Lund *et al.*, 1991, *J Immunol* 147: 2657-2662; Lund *et al.*, 1992, *Mol Immunol* 29: 53-59; Jefferis *et al.*, 1995, *Immunol Lett* 44: 111-117; Lund *et al.*, 1995, *Faseb J* 9: 115-119; Jefferis *et al.*, 1996, *Immunol Lett* 54: 101-104; Lund *et al.*, 1996, *J Immunol* 157: 4963-4969; Armour *et al.*, 1999, *Eur J Immunol* 29: 2613-2624; Shields *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 6591-6604; Jefferis *et al.*, 2002, *Immunol Lett* 82: 57-65) (US 5,624,821; US 5,885,573; PCT WO 00/42072; PCT WO 99/58572). 상기 대부분의 치환은 Fc γ R와의 결합을 감소시키거나 제거한다. 그러나, 보다 높은 Fc γ R 친화성을 가지는 Fc 변이체를 획득하는 경우에는 성공적인 경우도 있었다 (이에 대해서는 예를 들어, US 5,624,821, 및 PCT WO 00/42072 참조). 예를 들어, Winter와 그의 동료들은 마우스 IgG2b 항체의 235번 위치에 인간 아미노산을 치환시킴으로써(글루타르산 → 류신 돌연변이), 인간 Fc γ RI에 대한 마우스 항체의 결합을 100배까지 증가시켰다 (Duncan *et al.*, 1988, *Nature* 332: 563-564) (US 5,624,821). Shields 등은 알라닌 스캐닝 돌연변이 유발(alanine scanning mutagenesis)을 이용하여, Fc γ R 결합에 중요한 Fc 잔기를 맵핑한 후, 비알라닌 돌연변이를 가지는 선별된 잔기를 치환하였다 (Shields *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 6591-6604; Presta *et al.*, 2002, *Biochem Soc Trans* 30: 487-490) (PCT WO 00/42072). S298A, E333A, 및 K334A를 포함하여, 본 연구에 개시된 여러 돌연변이는 활성화 수용체 Fc γ RIIIa에 대하여 증진된 결합을 나타내었으며, 저해성 수용체 Fc γ RIIb에 대해서는 감소된 결합을 나타내었다. 이들 돌연변이를 조합함으로써, 결합에 대하여 추가적인 개선을 나타내는 2중 및 3중 돌연변이 변이체를 획득하였다. 본 연구에 제시된 최상의 변이체는, F158 Fc γ RIIIa에 대해서는 대략 1.7배의 증가된 결합을 나타내며, Fc γ RIIb에 대해서는 5배의 증가된 결합을 나타내며, ADCC에 있어서는 2.1배의 향상을 나타내는 S298A/E333A/K334A 3중 돌연변이체(mutant)이다.
- [0015] 또한, Fc γ R에 대한 Fc의 증진된 친화성은, 조작된 또는 변이체 세포주 내에서 항체의 발현에 의하여 생성되는 조작된 글라이코 형태를 이용해서도 달성된 바 있다 (Umaña *et al.*, 1999, *Nat Biotechnol* 17: 176-180; Davies *et al.*, 2001, *Biotechnol Bioeng* 74: 288-294; Shields *et al.*, 2002, *J Biol Chem* 277: 26733-26740; Shinkawa *et al.*, 2003, *J Biol Chem* 278: 3466-3473). 이러한 접근법은 Fc γ RIIIa를 결합시키며, ADCC를 매개하는 항체의 역량을 실질적으로 증진시켰다. 대량 생산 조건 하에는 발현 균주(strain)의 성장 효율과 같은 실제적인 제한 사항이 존재하기는 하나, Fc/Fc γ R 친화성 및 작동체 기능을 증진시키는 이러한 접근법은 유망한 것이다. 실제로, 이상의 대안적인 글라이코 형태 기술과 본 발명의 Fc 변이체를 결합시키면, 최적의 작동체 기능에 대하여 부가적인 또는 상승적인 효과를 제공할 수 있다.
- [0016] 보다 큰 작동체 기능에 대한 요구가 있기는 하나, 몇몇 항체 치료제의 경우에는, 감소된 또는 제거된 작동체 기능이 바람직할 수 있다. 이는, 표적 항원을 가지는 세포를 블로킹하거나 길항 작용하나, 죽이지는 않는 치료학적 항체의 경우에 흔하다. 이러한 경우, 표적 세포의 고갈은 바람직하지 않으며, 부작용으로서 간주될 수 있다. 예를 들어, T 세포 상의 CD4 수용체를 블로킹하는 항-CD4 항체의 능력은, 그들을 유효한 항-염증성으로 만들며, Fc γ R 수용체를 상보하는 그들의 능력은 또한 표적 세포에 대한 면역 공격을 유도함으로써, T 세포 고

갈을 야기할 것이다 (Reddy *et al.*, 2000, *J Immunol* 164: 1925-1933). 작동체 기능은 또한, 방사능 접합체 (radioconjugate)라고 일컬어지는, 방사능 표지된(radiolabeled) 항체 및 면역 독소(immunotoxin)라고 일컬어지는 독소에 접합된 항체에 대한 문제이다. 이들 약물(drug)은 암 세포를 파괴하는 데 사용될 수 있으나,

[0017] Fc과 Fc γ R의 상호 작용을 통한 면역 세포의 상보는 치명적인 유료 하중(방사능 또는 독소)에 근접하게 건강한 면역 세포를 야기하며, 이는 표적화된 암 세포와 함께 정상 림프 조직(lymphoid tissue)의 고갈을 초래한다 (Hutchins *et al.*, 1995, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11980-11984; White *et al.*, 2001, *Annu Rev Med* 52: 125-145). 이 문제는 상보체 또는 작동체 세포, 예를 들어 IgG2 및 IgG4를 불충분하게 상보하는 IgG 아이소타입(isotype)을 이용함으로써 잠재적으로 위회할 수 있다. 대안적인 해결책은, 결합을 감소시키거나 제거하는 Fc 변이체를 개발하는 것이다 (Alegre *et al.*, 1994, *Transplantation* 57: 1537-1543; Hutchins *et al.*, 1995, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11980-11984; Armour *et al.*, 1999, *Eur J Immunol* 29: 2613-2624; Reddy *et al.*, 2000, *J Immunol* 164: 1925-1933; Xu *et al.*, 2000, *Cell Immunol* 200: 16-26; Shields *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 6591-6604) (US 6,194,551; US 5,885,573; PCT WO 99/58572). 작동체 기능의 감소 또는 제거에 대한 결정적인 사항은, 기타 중요한 항체 특성들은 교란시키지 않는 것이다. Fc 변이체는 Fc γ R 및/또는 C1q에 대한 결합을 제거하며, 항체의 안정성, 용해성, 및 구조적 무결성(integrity), 그리고 FcRn 및 단백질 A 및 G와 같은 기타 중요한 Fc 리간드와 상호 작용하는 능력을 유지하도록 조작되어야 한다.

[0018] 본 발명은, 항체들의 또 다른 하나의 주된 단점, 즉 그들의 지나친 생산 요건 (Garber, 2001, *Nat Biotechnol* 19: 184-185; Dove, 2002, *Nat Biotechnol* 20: 777-779)에 관한 단점을 해소한다. 항체들은 포유류 세포 내에서 발현되어야 하며, 현재 시판되고 있는 항체들은, 수요가 높은 생치료제(biotherapeutics)와 함께, 이용 가능한 모든 제조 역량을 본질적으로 소비한다. 대부분이 항체에 해당하는, 개발 중에 있는 수백 종의 생물학적 제제(biologics)에 있어서, 보다 유효하고 저렴한 제조 방법에 대한 요구가 절박한 실정이다. 불충분한 항체 제조 역량의 다운스트림 효과(downstream effect)는 3가지가 있다. 첫째, 이는 생산자에 대한 상품 비용, 환자에게 전가되는 비용을 현저히 증가시킨다. 둘째, 이는 허가된 항체 제품의 산업적 생산을 방해하며, 이는 환자에 대해 수요가 높은 치료제의 이용 가능성을 제한한다. 끝으로, 임상 실험에 있어 아직 유용하지 않은 단백질이 대량으로 요구되기 때문에, 불충분한 공급으로 인해, 시장에 대한 증대되는 항체의 보급 발전이 방해된다.

[0019] 이러한 문제를 해소하고자 하는 시도에서, 대안적인 제조 방법들이 탐구되어 왔다. 트랜스제닉(transgenic) 식물 및 동물들이, 잠재적으로 보다 저렴하고 보다 높은 역량의 생산 시스템으로서 연구되고 있다 (Chadd *et al.*, 2001, *Curr Opin Biotechnol* 12: 188-194). 그러나, 그러한 발현 시스템은, 인간 당단백질(glycoprotein)과 현저히 상이한 글라이코실화 패턴을 야기할 수 있다. 상술한 바와 같이, 탄수화물 구조는 Fc γ R 및 상보체 결합에 대해 현저한 영향을 준다는 점에서, 그러한 글라이코실화 패턴은 작동체 기능의 감소 또는 심지어는 결핍을 초래할 수 있다. 비인간 글라이코 형태와 관련된 잠재적인 큰 문제는 면역원성(immunogenicity)으로서, 탄수화물은 면역계에 대한 항원성(antigenicity)의 주요 공급원이며, 비인간 글라이코 형태의 존재는, 치료제를 중화(neutralize)시키거나, 반대의 면역 반응을 더욱 심하게 초래하는 항체를 유도하는 중요한 기회를 만든다. 그러므로, 트랜스제닉 식물 및 동물에 의하여 생산된 항체의 효능 및 안전성은 불완전한 상태로 남아있다. 박테리아 발현은, 항체 생산 문제에 관한 또 다른 하나의 흥미로운 해법이다. 박테리아 내에서의 발현, 예를 들어 *E coli* 내에서의 발현은, 단백질 생산에 있어 비용 효율적인 고부가치의 방법이다. 항체와 같은 복합체 단백질의 경우, 박테리아 내에서 발현되는 단백질은 글라이코실화되지 않기 때문에, 이들 복합체 분자의 폴딩(folding) 및 어셈블리(assembly), 적당한 다이설파이드 형성(disulfide formation), 및 글라이코실화 부재 하에서의 용해성, 안정성, 및 기능성을 포함하는 박테리아 발현에 대한 많은 장애가 존재한다. 항체를 결합시키는 전체 길이의 비글라이코실화된(unglycosylated) 항체가 *E. coli* 내에서 성공적으로 발현된 바 있으며 (Simmons *et al.*, 2002, *J Immunol Methods* 263: 133-147), 그러므로 박테리아 내에서 발현된 항체의 폴딩, 어셈블리, 및 적당한 다이설파이드 형성은, 진핵생물의 샤페론 기구(eukaryotic chaperone machinery)의 부재 하에서도 가능하다. 그러나, 박테리아 내에서 발현된 항체의 치료제로서의 궁극적인 효능은, 글라이코실화의 결여에 의하여 저해되는 상태로 남아있으며, 이는 작동체 기능의 결핍을 초래하고, 불충분한 안정성 및 용해성을 초래할 수 있다. 이는 아마도 임상 용도에 요구되는 장기간 동안의 고농도 형성에 대해 더욱 문제가 될 것이다.

[0020] 작동체 기능을 매개하는 유리한 해법의 특성 및 역량을 가지는 아글라이코실화된(aglycosylated) Fc는, 상술한 대안적인 제조 방법들에 대해서도 유의하게 가능할 것이다. 아글라이코실화된 Fc의 구조적 및 기능적 단점을 극복함으로써, 항체는, 면역원성의 감소 위험성, 및 암과 같이 세포독성이 요구되는 임상 적용을 위한 작동체 기능을 가지는 박테리아 및 트랜스제닉 식물 및 동물 내에서 생산될 수 있다. 본 발명은, 작동체 기능을 가지

는 안정된 가용성 Fc 변이체를 개발하기 위한 단백질 조작 방법의 활용에 대하여 개시한다. 현재, 그러한 Fc 변이체는 당 기술 분야에 존재하지 않는다.

[0021] 요컨대, 증진된 치료학적 특성을 가지는 항체가 요구되고 있다. 최적화된 또는 증진된 Fc 변이체의 조작은 이러한 요구를 충족시키는 유리한 접근법이다. 그럼에도, 원하는 특성들을 가지는 Fc 변이체에 관한 실질적인 장애 사항은, 어떠한 아미노산 변형(modification)이, 막대한 가능성 중에서, 항체에 대한 비효과적인 생산 및 스크리닝(screening) 방법과 관련된 원하는 목적을 달성할지를 예측하는 데 있어서의 어려움이다. 실제로, 종래 기술의 불완전한 성공의 주요 원인 중 하나는, Fc 조작에 대한 접근법이 단연, 알라닌 스캔(alanine scan), 또는 상이한 발현 균주를 이용하는 글라이코 형태의 생산과 같은 히트-오어-미스 방법(hit-or-miss method)을 수반해 왔다는 점이다. 이러한 연구에 있어서, 만들어진 Fc 변형은 유리한 특성들을 가지는 변이체를 얻고자하는 희망에 있어서 완전히 또는 부분적으로 무작위적인 것이다. 본 발명은, 보다 정교하고 유효한 기법을 기준으로 하는 다양한 조작 방법을 제공하며, 이는 원하는 특성들에 대하여 최적화된 Fc 변이체를 개발하는 데 있어 이상과 같은 장애를 극복하는 데에 사용될 수 있다. 상술한 조작 방법들은, Fc 변형을 가이드하는 설계 전략, 유리한 Fc 변이체를 설계하는 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 방법(computational screening method), 실험적 조사를 위하여 유리한 변이체를 측정하는 라이브러리 제작(library generation) 접근법, 및 유리한 특성들을 가지는 Fc 변이체를 측정하기 위한 일련의 실험적 생산 및 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 상세한 설명

[0022] **발명의 개요**

[0023] 본 발명은 다양한 치료학적 관련 특성들에 대하여 최적화된 Fc 변이체(variant)를 제공한다.

[0024] 본 발명의 목적은, 최적화된 Fc 변이체를 생성시킬 수 있는 아미노산의 변형 위치(position)를 제공하는 것이다. 상기 Fc 위치는 240, 244, 245, 247, 262, 263, 266, 299, 313, 325, 328, 및 332를 포함하며, 상기 Fc 부위 내의 잔기들의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스(index)에 따라 지정된다. 본 발명은, 최적화된 Fc 변이체를 제작하기 위하여, 신규한 Fc 위치 중 임의의 위치에서의 임의의 아미노산의 변형을 설명한다.

[0025] 본 발명의 다른 목적은, 컴퓨터 조작을 통해 스크리닝된 Fc 변이체를 제공하는 것이다. 컴퓨터 조작을 통해 스크리닝된 Fc 변이체는, 원하는 특성에 대하여 최적화되는 측면에서, 무작위적인 경우보다 유의하게 큰 잠재능(potential)을 가지는 것으로서, 본원에 개시된 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 산출(computational screening calculation)에 의하여 예측된다. 이러한 방식으로, 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝은 실험적 스크리닝을 위한 예비 절차 또는 대응 절차로서 제공되며, 그러므로, 상기 컴퓨터 조작을 통해 스크리닝된 Fc 변이체는 신규한 것으로 간주된다.

[0026] 본 발명의 또 다른 목적은, 본원에 개시된 실험 방법들 중 하나를 이용하여 특정화되는 Fc 변이체를 제공하는 것이다. 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는, 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330, 및 332로 이루어지는 군으로부터 선택되는 위치에 적어도 하나의 아미노산 치환(substitution)을 포함하며, 상기 Fc 부위 내의 잔기들의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 지정된다. 바람직한 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 치환을 포함한다: L234D, L234E, L234N, L234Q, L234T, L234H, L234Y, L234I, L234V, L234F, L235D, L235S, L235N, L235Q, L235T, L235H, L235Y, L235I, L235V, L235F, S239D, S239E, S239N, S239Q, S239F, S239T, S239H, S239Y, V240I, V240A, V240T, V240M, F241W, F241L, F241Y, F241E, F241R, F243W, F243L, F243Y, F243R, F243Q, P244H, P245A, P247V, P247G, V262I, V262A, V262T, V262E, V263I, V263A, V263T, V263M, V264L, V264I, V264W, V264T, V264R, V264F, V264M, V264Y, V264E, D265G, D265N, D265Q, D265Y, D265F, D265V, D265I, D265L, D265H, D265T, V266I, V266A, V266T, V266M, S267Q, S267L, E269H, E269Y, E269F, E269R, Y296E, Y296Q, Y296D, Y296N, Y296S, Y296T, Y296L, Y296I, Y296H, N297S, N297D, N297E, A298H, T299I, T299L, T299A, T299S, T299V, T299H, T299F, T299E, W313F, N325Q, N325L, N325I, N325D, N325E, N325A, N325T, N325V, N325H, A327N, A327L, L328M, L328D, L328E, L328N, L328Q, L328F, L328I, L328V, L328T, L328H, L328A, P329F, A330L, A330Y, A330V, A330I, A330F, A330R, A330H, I332D, I332E, I332N, I332Q, I332T, I332H, I332Y, 및 I332A. 여기서, 상기 Fc 부위 내의 잔기들의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 지정된다. 대부분의 바람직한 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택된다: V264L, V264I, F241W, F241L, F243W, F243L, F241L/F243L/V262I/V264I, F241W/F243W, F241W/F243W/V262A/V264A, F241L/V262I, F243L/V264I, F243L/V262I/V264W, F241Y/F243Y/V262T/V264T, F241E/F243R/V262E/V264R, F241E/F243Q/V262T/V264E,

F241R/F243Q/V262T/V264R, F241E/F243Y/V262T/V264R, L328M, L328E, L328F, I332E, L328M/I332E, P244H, P245A, P247V, W313F, P244H/P245A/P247V, P247G, V264I/I332E, F241E/F243R/V262E/V264R/I332E, F241E/F243Q/V262T/V264E/I332E, F241R/F243Q/V262T/V264R/I332E, F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E, S298A/I332E, S239E/I332E, S239Q/I332E, S239E, D265G, D265N, S239E/D265G, S239E/D265N, S239E/D265Q, Y296E, Y296Q, T299I, A327N, S267Q/A327S, S267L/A327S, A327L, P329F, A330L, A330Y, I332D, N297S, N297D, N297S/I332E, N297D/I332E, N297E/I332E, D265Y/N297D/I332E, D265Y/N297D/T299L/I332E, D265F/N297E/I332E, L328I/I332E, L328Q/I332E, I332N, I332Q, V264T, V264F, V240I, V263I, V266I, T299A, T299S, T299V, N325Q, N325L, N325I, S239D, S239N, S239F, S239D/I332D, S239D/I332E, S239D/I332N, S239D/I332Q, S239E/I332D, S239E/I332N, S239E/I332Q, S239N/I332D, S239N/I332E, S239N/I332N, S239N/I332Q, S239Q/I332D, S239Q/I332N, S239Q/I332Q, Y296D, Y296N, F241Y/F243Y/V262T/V264T/N297D/I332E, A330Y/I332E, V264I/A330Y/I332E, A330L/I332E, V264I/A330L/I332E, L234D, L234E, L234N, L234Q, L234T, L234H, L234Y, L234I, L234V, L234F, L235D, L235S, L235N, L235Q, L235T, L235H, L235Y, L235I, L235V, L235F, S239T, S239H, S239Y, V240A, V240T, V240M, V263A, V263T, V263M, V264M, V264Y, V266A, V266T, V266M, E269H, E269Y, E269F, E269R, Y296S, Y296T, Y296L, Y296I, A298H, T299H, A330V, A330I, A330F, A330R, A330H, N325D, N325E, N325A, N325T, N325V, N325H, L328D/I332E, L328E/I332E, L328N/I332E, L328Q/I332E, L328V/I332E, L328T/I332E, L328H/I332E, L328I/I332E, L328A, I332T, I332H, I332Y, I332A, S239E/V264I/I332E, S239Q/V264I/I332E, S239E/V264I/A330Y/I332E, S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E, S239D/N297D/I332E, S239E/N297D/I332E, S239D/D265V/N297D/I332E, S239D/D265I/N297D/I332E, S239D/D265L/N297D/I332E, S239D/D265F/N297D/I332E, S239D/D265Y/N297D/I332E, S239D/D265H/N297D/I332E, S239D/D265T/N297D/I332E, V264E/N297D/I332E, Y296D/N297D/I332E, Y296E/N297D/I332E, Y296N/N297D/I332E, Y296Q/N297D/I332E, Y296H/N297D/I332E, Y296T/N297D/I332E, N297D/T299V/I332E, N297D/T299I/I332E, N297D/T299L/I332E, N297D/T299F/I332E, N297D/T299H/I332E, N297D/T299I/I332E, N297D/A330y/I332E, N297D/S298A/A330Y/I332E, S239D/A330Y/I332E, S239N/A330Y/I332E, S239D/A330L/I332E, S239N/A330L/I332E, V264I/S298A/I332E, S239D/S298A/I332E, S239N/S298A/I332E, S239D/V264I/I332E, S239D/V264I/S298A/I332E, 및 S239D/V264I/A330L/I332E. 여기서, 상기 Fc 부위 내의 잔기들의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 지정된다.

[0027] 본 발명의 또 다른 목적은, 하나 이상의 Fc γ R에 대하여 보다 큰 친화성을 가지고 결합하는 Fc 변이체를 제공하는 것이다. 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는 Fc γ R에 대하여, 모체 Fc 폴리펩타이드의 친화성보다 1배 이상 큰 친화성을 갖는다. 다른 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는 Fc γ R에 대하여, 모체 Fc 폴리펩타이드의 친화성보다 5배 이상 큰 친화성을 갖는다. 또 다른 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는 Fc γ R에 대하여, 모체 Fc 폴리펩타이드의 친화성보다 300배 이상 큰 친화성을 갖는다. 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는, 234, 235, 239, 240, 243, 264, 266, 328, 330, 332, 및 325로 이루어지는 군으로부터 선택되는 위치에 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 상기 Fc 부위 내의 잔기들의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 지정된다. 바람직한 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다: L234E, L234Y, L234I, L235D, L235S, L235Y, L235I, S239D, S239E, S239N, S239Q, S239T, V240I, V240M, F243L, V264I, V264T, V264Y, V266I, L328M, L328I, L328Q, L328D, L328V, L328T, A330Y, A330L, A330I, I332D, I332E, I332N, I332Q, 및 N325T. 여기서, 상기 Fc 부위 내의 잔기들의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 지정된다. 대부분의 바람직한 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택된다: V264I, F243L/V264I, L328M, I332E, L328M/I332E, V264I/I332E, S298A/I332E, S239E/I332E, S239Q/I332E, S239E, A330Y, I332D, L328I/I332E, L328Q/I332E, V264T, V240I, V266I, S239D, S239D/I332D, S239D/I332E, S239D/I332N, S239D/I332Q, S239E/I332D, S239E/I332N, S239E/I332Q, S239N/I332D, S239N/I332E, S239Q/I332D, A330Y/I332E, V264I/A330Y/I332E, A330L/I332E, V264I/A330L/I332E, L234E, L234Y, L234I, L235D, L235S, L235Y, L235I, S239T, V240M, V264Y, A330I, N325T, L328D/I332E, L328V/I332E, L328T/I332E, L328I/I332E, S239E/V264I/I332E, S239Q/V264I/I332E, S239E/V264I/A330Y/I332E, S239D/A330Y/I332E, S239N/A330Y/I332E, S239D/A330L/I332E, S239N/A330L/I332E, V264I/S298A/I332E, S239D/S298A/I332E, S239N/S298A/I332E, S239D/S298A/I332E, S239D/V264I/I332E, S239D/V264I/S298A/I332E, S239/V264I/A330L/I332E, V264I/S298A/I332E, S239D/S298A/I332E, S239N/S298A/I332E, S239D/V264I/I332E, S239D/V264I/S298A/I332E, 및 S239D/V264I/A330L/I332E. 여기서, 상기 Fc 부위 내의 잔기들의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 지정된다.

[0028] 본 발명의 또 다른 목적은, 1:1 이상의 Fc γ RIIIa-배수(fold):Fc γ RIIb-배수 비(ratio)를 가지는 Fc 변이체를

제공하는 것이다. 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는 대략 11:1 이상의 Fc γ RIIIa-배수:Fc γ RIIb-배수 비를 갖는다. 바람직한 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는 대략 11:1 내지 대략 86:1의 Fc γ RIIIa-배수:Fc γ RIIb-배수 비를 갖는다. 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는, 234, 235, 239, 240, 264, 296, 330, 및 332로 이루어지는 군으로부터 선택되는 위치에 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 상기 Fc 부위 내의 잔기들의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 지정된다. 바람직한 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는, L234Y, L234I, L235I, S239D, S239E, S239N, S239Q, V240A, V240M, V264I, V264Y, Y296Q, A330L, A330Y, A330I, I332D, 및 I332E로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서, 상기 Fc 부위 내의 잔기들의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 지정된다. 대부분의 바람직한 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는, I332E, V264I/I332E, S239E/I332E, S239Q/I332E, Y296Q, A330L, A330Y, I332D, S239D, S239D/I332E, A330Y/I332E, V264I/A330Y/I332E, A330L/I332E, V264I/A330L/I332E, L234Y, L234I, L235I, V240A, V240M, V264Y, A330I, S239D/A330L/I332E, S239D/S298A/I332E, S239N/S298A/I332E, S239D/V264I/I332E, S239D/V264I/S298A/I332E, 및 S239D/V264I/A330L/I332E로 이루어지는 군으로부터 선택되며, 여기서, 상기 Fc 부위 내의 잔기들의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 지정된다.

[0029] 본 발명의 또 다른 목적은, 작동체 세포의 존재 하에서 보다 유효하게 작동체 기능(effector function)을 조절하는 Fc 변이체를 제공하는 것이다. 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는 ADCC를 모체(parent) Fc 폴리펩타이드에 의하여 매개되는 것보다 크게 조절한다. 바람직한 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는 ADCC를 모체 Fc 폴리펩타이드에 의하여 매개되는 것보다 5배 이상 크게 조절한다. 대부분의 바람직한 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는 ADCC를 모체 Fc 폴리펩타이드에 의하여 매개되는 것보다 5배 내지 50배 이상 크게 조절한다. 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는, 234, 235, 239, 240, 243, 264, 266, 328, 330, 332, 및 325로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서, 상기 Fc 부위 내의 잔기들의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 지정된다. 바람직한 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는 L234E, L234Y, L234I, L235D, L235S, L235Y, L235I, S239D, S239E, S239N, S239Q, S239T, V240I, V240M, F243L, V264I, V264T, V264Y, V266I, L328M, L328I, L328Q, L328D, L328V, L328T, A330Y, A330L, A330I, I332D, I332E, I332N, I332Q, 및 N325T로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서, 상기 Fc 부위 내의 잔기들의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 지정된다. 대부분의 바람직한 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택된다: V264I, F243L/V264I, L328M, I332E, L328M/I332E, V264I/I332E, S298A/I332E, S239E/I332E, S239Q/I332E, S239E, A330Y, I332D, L328I/I332E, L328Q/I332E, V264T, V240I, V266I, S239D, S239D/I332D, S239D/I332E, S239D/I332N, S239D/I332Q, S239E/I332D, S239E/I332N, S239E/I332Q, S239N/I332D, S239N/I332E, S239Q/I332D, A330Y/I332E, V264I/A330Y/I332E, A330L/I332E, V264I/A330L/I332E, L234E, L234Y, L234I, L235D, L235S, L235Y, L235I, S239T, V240M, V264Y, A330I, N325T, L328D/I332E, L328V/I332E, L328T/I332E, L328I/I332E, S239E/V264I/I332E, S239Q/V264I/I332E, S239E/V264I/A330Y/I332E, S239D/A330Y/I332E, S239N/A330Y/I332E, S239D/A330L/I332E, S239N/A330L/I332E, V264I/S298A/I332E, S239D/S298A/I332E, S239N/S298A/I332E, S239D/V264I/I332E, S239D/V264I/S298A/I332E, 및 S239D/V264I/A330L/I332E. 여기서, 상기 Fc 부위 내의 잔기들의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 지정된다.

[0030] 본 발명의 또 다른 목적은, 하나 이상의 Fc γ R에 대하여 보다 약한 친화성을 가지고 결합하는 Fc 변이체를 제공하는 것이다. 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는, 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 265, 264, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330, 및, 332로 이루어지는 군으로부터 선택되는 위치에 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 상기 Fc 부위 내의 잔기들의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 지정된다. 바람직한 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 위치에 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다: L234D, L234N, L234Q, L234T, L234H, L234V, L234F, L235N, L235Q, L235T, L235H, L235V, L235F, S239E, S239N, S239Q, S239F, S239H, S239Y, Y240A, Y240T, F241W, F241L, F241Y, F241E, F241R, F243W, F243L, F243Y, F243R, F243Q, P244H, P245A, P247V, P247G, V262I, V262A, V262T, V262E, V263I, V263A, V263T, V263M, V264L, V264I, V264W, V264T, V264R, V264F, V264M, V264E, D265G, D265N, D265Q, D265Y, D265F, D265V, D265I, D265L, D265H, D265T, V266A, V266T, V266M, S267Q, S267L, E269H, E269Y, E269F, E269R, Y296E, Y296Q, Y296D, Y296N, Y296S, Y296T, Y296L, Y296I, Y296H, N297S, N297D, N297E, A298H, T299I, T299L, T299A, T299S, T299V, T299H, T299F, T299E, W313F, N325Q, N325L, N325I, N325D, N325E, N325A, N325V, N325H, A327N, A327L, L328M, 328E, L328N, L328Q, L328F, L328H, L328A, P329F, A330L, A330V, A330F, A330R, A330H, I332N, I332Q, I332T, I332H, I332Y, 및 I332A. 여기서 상기 Fc 부위 내의 잔기들의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에

따라 지정된다. 바람직한 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택된다: V264L, F241W, F241L, F243W, F243L, F241L/F243L/V262I/V264I, F241W/F243W, F241W/F243W/V262A/V264A, F241L/V262I, F243L/V262I/V264W, F241Y/F243Y/V262T/V264T, F241E/F243R/V262E/V264R, F241E/F243Q/V262T/V264E, F241R/F243Q/V262T/V264R, F241E/F243Y/V262T/V264R, L328M, L328E, L328F, P244H, P245A, P247V, W313F, P244H/P245A/P247V, P247G, F241E/F243R/V262E/V264R/I332E, F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E, D265G, D265N, S239E/D265G, S239E/D265N, S239E/D265Q, Y296E, Y296Q, T299I, A327N, S267Q/A327S, S267L/A327S, A327L, P329F, A330L, N297S, N297D, N297S/I332E, I332N, I332Q, V264F, V263I, T299A, T299S, T299V, N325Q, N325L, N325I, S239N, S239F, S239N/I332N, S239N/I332Q, S239Q/I332N, S239Q/I332Q, Y296D, Y296N, L234D, L234N, L234Q, L234T, L234H, L234V, L234F, L235N, L235Q, L235T, L235H, L235V, L235F, S239H, S239Y, V240A, V263T, V263M, V264M, V266A, V266T, V266M, E269H, E269Y, E269F, E269R, Y296S, Y296T, Y296L, Y296I, A298H, T299H, A330V, A330F, A330R, A330H, N325D, N325E, N325A, N325V, N325H, L328E/I332E, L328N/I332E, L328Q/I332E, L328H/I332E, L328A, I332T, I332H, I332Y, 및 I332A. 여기서, 상기 Fc 부위 내의 잔기들의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 지정된다.

[0031]

본 발명의 또 다른 목적은, 작동체 세포의 존재 하에 ADCC를 보다 덜 유효하게 매개하는 Fc 변이체를 제공하는 것이다. 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는, 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330, 및 332로 이루어지는 군으로부터 선택되는 위치에 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서, 상기 Fc 부위 내의 잔기들의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 지정된다. 바람직한 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 위치에 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다: L234D, L234N, L234Q, L234T, L234H, L234V, L234F, L235N, L235Q, L235T, L235H, L235V, L235F, S239E, S239N, S239Q, S239F, S239H, S239Y, V240A, V240T, F241W, F241L, F241Y, F241E, F241R, F243W, F243L, F243Y, F243R, F243Q, P244H, P245A, P247V, P247G, V262I, V262A, V262T, V262E, V263I, V263A, V263T, V263M, V264L, V264I, V264W, V264T, V264R, V264F, V264M, V264E, D265G, D265N, D265Q, D265Y, D265F, D265V, D265I, D265L, D265H, D265T, V266A, V266T, V266M, S267Q, S267L, E269H, E269Y, E269F, E269R, Y296E, Y296Q, Y296D, Y296N, Y296S, Y296T, Y296L, Y296I, Y296H, N297S, N297D, N297E, A298H, T299I, T299L, T299A, T299S, T299V, T299H, T299F, T299E, W313F, N325Q, N325L, N325I, N325D, N325E, N325A, N325V, N325H, A327N, A327L, L328M, L328E, L328N, L328Q, L328F, L328H, L328A, P329F, A330L, A330V, A330F, A330R, A330H, I332N, I332Q, I332T, I332H, I332Y, 및 I332A. 여기서, 상기 Fc 부위 내의 잔기들의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 지정된다. 대부분의 바람직한 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택된다: V264L, F241W, F241L, F243W, F243L, F241L/F243L/V262I/V264I, F241W/F243W, F241W/F243W/V262A/V264A, F241L/V262I, F243L/V262I/V264W, F241Y/F243Y/V262T/V264T, F241E/F243R/V262E/V264R, F241E/F243Q/V262T/V264E, F241R/F243Q/V262T/V264R, F241E/F243Y/V262T/V264R, L328M, L328E, L328F, P244H, P245A, P247V, W313F, P244H/P245A/P247V, P247G, F241E/F243R/V262E/V264R/I332E, F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E, D265G, D265N, S239E/D265G, S239E/D265N, S239E/D265Q, Y296E, Y296Q, T299I, A327N, S267Q/A327S, S267L/A327S, A327L, P329F, A330L, N297S, N297D, N297S/I332E, I332N, I332Q, V264F, V263I, T299A, T299S, T299V, N325Q, N325L, N325I, S239N, S239F, S239N/I332N, S239N/I332Q, S239Q/I332N, S239Q/I332Q, Y296D, Y296N, L234D, L234N, L234Q, L234T, L234H, L234V, L234F, L235N, L235Q, L235T, L235H, L235V, L235F, S239H, S239Y, V240A, V263T, V263M, V264M, V266A, V266T, V266M, E269H, E269Y, E269F, E269R, Y296S, Y296T, Y296L, Y296I, A298H, T299H, A330V, A330F, A330R, A330H, N325D, N325E, N325A, N325V, N325H, L328E/I332E, L328N/I332E, L328Q/I332E, L328H/I332E, L328A, I332T, I332H, I332Y, 및 I332A. 여기서, 상기 Fc 부위 내의 잔기들의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 지정된다.

[0032]

본 발명의 또 다른 목적은, 모체 Fc 폴리펩타이드의 아글라이코실화된 형태와 비교하여, 개선된 기능 및/또는 용해(solusion) 특성들을 가지는 Fc 변이체를 제공하는 것이다. 본원에서 개선된 기능성은, 이들로 제한되지는 않으나, Fc 리간드에 대한 결합 친화성을 포함한다. 본원에 있어서, 개선된 용해 특성은, 이들로 제한되지는 않으나, 안정성 및 용해성을 포함한다. 일면에 있어서, 상기 아글라이코실화된 Fc 변이체는, 글라이코실화된 모체 Fc 폴리펩타이드에 필적하거나 이보다 우수한 친화성을 가지고 Fc γ R에 결합한다. 대안적인 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는, 글라이코실화된 모체 Fc 폴리펩타이드 형태의 0.4배 이내의 친화성을 가지고 Fc γ R에 결합한다. 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는 239, 241, 243, 262, 264, 265, 296, 297, 330, 및 332로 이루어지

는 군으로부터 선택되는 위치에 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서, 상기 Fc 부위 내의 잔기들의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 지정된다. 바람직한 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는 S239D, S239E, F241Y, F243Y, V262T, V264T, V264E, D265Y, D265H, Y296N, N297D, A330Y, 및 I332E로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 치환을 포함하며, 여기서, 상기 Fc 부위 내의 잔기들의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 지정된다. 대부분의 바람직한 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는 N297D/I332E, F241Y/F243Y/V262T/V264T/N297D/I332E, S239D/N297D/I332E, S239E/N297D/I332E, S239D/D265Y/N297D/I332E, S239D/D265H/N297D/I332E, V264E/N297D/I332E, Y296N/N297D/I332E, 및 N297D/A330Y/I332E로 이루어지는 군으로부터 선택되며, 여기서, 상기 Fc 부위 내의 잔기들의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 지정된다.

[0033] 본 발명은 또한, 최적화된 Fc 변이체의 조작 방법을 제공한다. 본 발명의 목적은, Fc 최적화(optimization)를 유도하는 데 사용될 수 있는 설계 전략을 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은, Fc 변이체를 설계하는 데 사용될 수 있는, 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은, 실험적 테스트를 위한 라이브러리를 제작하는 방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은, 최적화된 Fc 변이체를 획득하기 위한 실험적 제조 및 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0034] 본 발명은 본원에 개시된 Fc 변이체를 코딩하는 분리된 핵산(isolated nucleic acid)을 제공한다. 본 발명은, 선택적으로, 제어 서열(control sequence)에 유효하게(operably) 결합된 상기 핵산들을 포함하는 벡터(vector)를 제공한다. 본 발명은, 상기 벡터를 함유하는 숙주 세포(host cell), 및 상기 Fc 변이체의 제조 방법 및 선택적인 회수 방법을 제공한다.

[0035] 본 발명은, 본원에 개시된 Fc 변이체를 포함하는 신규한 항체 및 Fc 융합체를 제공한다. 상기 신규한 항체 및 Fc 융합체는 치료제로서 사용될 수 있다.

[0036] 본 발명은 본원에 개시된 Fc 변이체를 포함하는 항체 및 Fc 융합체, 및 생리학적으로 또는 약학적 허용 가능한 캐리어(carrier) 또는 희석제(diluent)를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0037] 본 발명은, 본원에 개시된 Fc 변이체를 포함하는 항체 및 Fc 융합체에 대한 치료 및 진단 용도도 포함한다.

[0038] **발명의 상세한 설명**

[0039] 본 발명에 대한 보다 완벽한 이해를 위하여, 이하에서 여러 용어가 정의된다. 그러한 정의는 문법적인 등가의 용어를 포괄한다.

[0040] 본원에 사용된 바와 같이, "ADCC" 또는 "항체 의존성 세포-매개의 세포독성(antibody dependent cell-mediated cytotoxicity)"이란, Fc γ R을 발현시키는 비특이적인 세포독성 세포가 표적 세포 상에 결합된 항체를 인식하고, 이어서 상기 표적 세포의 용해를 야기하는 세포-매개의 반응을 의미한다.

[0041] 본원에 사용된 바와 같이, "ADCP" 또는 "항체 의존성 세포-매개의 포식 작용(antibody dependent cell-mediated phagocytosis)"이란, Fc γ R을 발현시키는 비특이적인 세포독성 세포가 표적 세포 상에 결합된 항체를 인식하고, 이어서 상기 표적 세포의 포식 작용을 야기하는 세포-매개의 반응을 의미한다.

[0042] 본원에 사용된 바와 같이, "아미노산 변형(amino acid modification)"이란, 폴리펩타이드 서열 내에서의 아미노산 치환(substitution), 삽입(insertion), 및/또는 결실(deletion)을 의미한다. 본원에 있어서, 바람직한 아미노산 변형은 치환이다.

[0043] 본원에 사용된 바와 같이, "항체(antibody)"란, 인식된 면역글로불린 유전자의 전체 또는 일부에 의하여 실질적으로 코딩되는 하나 이상의 폴리펩타이드로 구성되는 단백질을 의미한다. 인식된 면역글로불린 유전자는, 예를 들어 인간에 있어서는, 카파(kappa)(κ), 람다(lambda)(λ), 및 무수의 가변 부위 유전자를 함께 포함하는 중쇄 유전자 자리(genetic locus), 그리고 각각 IgM, IgD, IgG, IgE, 및 IgA 아이소타입을 코딩하는, 불변 부위 유전자 뮤(mu)(μ), 델타(delta)(δ), 감마(γ), 시그마(sigma)(σ), 및 알파(α)를 포함한다. 본원에 있어서, 항체는 전체 길이의 항체 및 항체 단편을 포함하는 것을 의미하며, 이하에 보다 상세히 설명한 바와 같이, 임의의 유기체 유래의 천연 항체, 조작된 항체, 또는 실험적, 치료학적, 또는 기타 목적을 위하여 재조합 방식으로 제작된 항체를 일컫을 수 있다. 그러므로, "항체"는 다중 클론성(polyclonal) 및 단일 클론성(monoclonal) 항체(mAb) 모두를 포함한다. 단일 클론성 항체 및 다중 클론성 항체의 제조 및 정제 방법은 당 기술 분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988)에 개시되어 있다. 본원에 개략적으로 설명된 바와 같이, "항체"는 보다 구체적으로

본원에 개시된 Fc 변이체를 포함하며, "전체 길이의" 항체는 본원에 개시된 Fc 변이체 단편 및 본원에 개시된 Fc 변이체 융합체를 포함한다.

[0044] 몇몇 일면에 있어서, 항체는 중화성(neutralizing) 또는 저해성, 또는 자극성(stimulatory)일 수 있으며, 바람직한 일면에 있어서, 본원에 개시된 바와 같이, 자극 활성은, 모체 항체(예를 들어, 본원에서 컴퓨터 조작을 통한 분석에 대하여, 천연적으로 발생하지 않은 변이체가 출발점으로서 사용되는 경우) 또는 원형 야생형 항체에 비교하여, 수용체에 대한 변이체 항체의 불친화성(inaffinity)의 증가에 의하여 측정된다. 따라서, "중화(neutralization)", "중화하다(neutralize)", "중화하는(neutralizing)" 및 그의 어미 변환어는, 몇몇 경우, 항원에 대한 결합(예를 들어, 경쟁적인 결합) 및 결합의 생물학적 효과의 회피 또는 감소, 또는 결합의 생물학적 효과의 감소를 초래하는 결합에 의하여, 항체의 생물학적 효과를 저해하거나 감소시키는 것을 의미한다.

[0045] "항체(antibody)"란 용어는, 당 기술 분야에 공지된 바와 같이, 항체 단편, 예를 들어 Fab, Fab', F(ab')₂, Fcs, 또는 항체의 기타 항원-결합 하위-서열(subsequence), 예를 들어 단일 사슬 항체(예를 들어, Fv), 키메라 항체(chimeric antibody) 등, 또는 전체 항체의 변형에 의하여 제조된 것들 또는 재조합(recombinant) DNA 기술을 이용하여 새로이 합성된 것들을 포함한다. 본원에 개시된 Fc 변이체가 특히 바람직하다. "항체"란 용어는 또한, 작용제(agonist) 또는 길항제(antagonist) 항체일 수 있는 다중 클론성 항체 및 단일 클론성 항체(mAb)를 포함한다.

[0046] 본 발명의 항체는, 본원에 개략적으로 설명한 바와 같이, Fc 수용체에 특이적으로 결합한다. 본원에 있어서, "특이적으로 결합한다(specifically bind)"라는 것은, LC 항체가 적어도 10^{-4} - 10^{-6} M⁻¹ 범위, 바람직하게는 10^7 - 10^9 M⁻¹ 범위 내의 결합 상수를 갖는 것을 의미한다. 바람직한 일면에 있어서, 본 발명의 항체는 인간화된다. 현재의 단일 클론성 항체 기술을 이용하면, 동정될 수 있는 실질적으로 임의의 표적 항원에 대하여 인간화된 항체를 제조할 수 있다 [Stein, Trends Biotechnol. 15: 88-90 (1997)]. 인간화된 형태의 비인간(예를 들어, 쥐과) 항체로는, 비인간 면역글로불린으로부터 유래되는 최소 서열(minimal sequence)을 함유하는, 면역글로불린, 면역글로불린 사슬 또는 그의 단편(예를 들어, Fv, Fc, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 기타 항원-결합 하위-서열)의 키메라 분자가 있다. 인간화된 항체는, 원하는 특이성, 친화성 및 역량을 가지는 마우스, 래트 또는 토끼와 같은 비인간 종(공여(donor) 항체)의 CDR 유래의 잔기에 의하여 대체된, 잔기들이 수령체의 상보성 결정 부위(complementary determining region; CDR)를 형성하는 인간 면역글로불린(수령(recipient) 항체)을 포함한다. 몇몇 일면에 있어서, 인간 면역글로불린의 Fv 골격 잔기는, 상응하는 비인간 잔기에 의하여 대체된다. 인간화된 항체는 또한, 수령 항체 및 입수된 CDR 또는 골격 서열 중 어느 것에서도 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 상기 인간화된 항체는 적어도 하나의, 통상적으로 2개의 가변 도메인의 실질적인 전체를 포함할 것이고, 여기서 전체 또는 실질적인 전체의 CDR 부위는 비인간 면역글로불린의 것들에 해당하며, 전체 또는 실질적인 전체의 FR 부위는 인간 면역글로불린 공통 서열(consensus sequence)의 것들이다. 상기 인간화된 항체는 최적으로, 면역글로불린 불변 부위(Fc)의 적어도 일부, 통상적으로 인간 면역글로불린의 적어도 일부를 포함할 것이다 [Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-329 (1988); 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992)]. 비인간 항체를 인간화하는 방법은 당 기술 분야에 공지되어 있다. 일반적으로, 인간화된 항체는, 비인간 공급원으로부터 유래되는 그 내부로 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이들 비인간 아미노산 잔기는 종종 유입 잔기(import residue)라고도 일컬어지며, 이는 통상적으로 도입 가변 도메인로부터 취해진다. 인간화는 본질적으로 Winter와 그의 동료들에 의하여 제시된 방법에 따라, 인간 항체의 해당 서열을 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 치환함으로써, 실시될 수 있다 [Jones *et al.*, supra; Riechmann *et al.*, supra; 및 Verhoeyen *et al.*, Science, 239: 1534-1536 (1988)]. 또한, 인간화된 쥐과 단일 클론성 항체의 부가적인 예들이 당 기술 분야에 알려져 있으며, 예를 들어, 항체 결합 인간 단백질 C [O'Connor *et al.*, Protein Eng. 11: 321-8 (1998)], 인터류킨(interleukin) 2 수용체 [Queen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A. 86: 10029-33 (1989)], 및 인간 상피 성장 인자 수용체 2(human epidermal growth factor receptor 2) [Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89: 4285-9 (1992)]가 있다. 따라서, 그러한 인간화된 항체는, 온전한 인간 가변 도메인보다 실질적으로 작은 부분이 비인간 종으로부터 유래되는 해당 서열에 의하여 치환된 키메라 항체 (U.S. Patent No.4,816,567)이다. 실제로, 인간화된 항체는 통상적으로, 몇몇 CDR 잔기 및 가능한 몇몇 FR 잔기가 설치류 항체 내의 유사 부위로부터 유래되는 잔기에 의하여 치환된 인간 항체이다.

[0047] 바람직한 일면에 있어서, 본 발명의 항체는 인간 서열을 기본으로 하며, 따라서 인간 서열이, 기타 서열, 예를 들어 래트, 마우스 및 원숭이 서열에 대하여 "기본(base)" 서열로서 사용된다. 1차 서열 또는 구조에 대한 상

동성(homology)을 측정하기 위하여, 전구체(precursor) 또는 모체 Fc의 아미노산 서열을, 본원에 개략적으로 설명된 인간 Fc 서열과 직접적으로 비교한다. 서열을 정렬(aligning)한 후, 정렬을 유지하기 위하여(즉, 독단적인 결실 및 삽입을 통해 보존된 잔기의 제거 회피), 필요한 삽입 및 결실을 유도하는, 본원에 개시된 하나 이상의 상동성 정렬 프로그램(homology alignment program)(예를 들어, 종 사이에서 보존된 잔기를 이용하여)을 이용하여, 인간 Fc의 1차 서열 내의 특정 아미노산과 등가의 잔기가 규정된다. 보존된 잔기의 정렬은 그러한 잔기의 100%를 보존하는 것이 바람직하다. 그러나, 75% 이상 50% 이하의 보존된 잔기의 정렬 또한, 등가의 잔기를 규정하는 데에 적합하다(종종, "해당 잔기(corresponding residue)"라고도 일컬어짐).

[0048] 등가의 잔기는 또한, Fc 단편에 대한 3차 구조의 수준에서 상동성을 측정함으로써 규정되며, 이러한 3차 구조는 x-선 결정학(crystallography)에 의하여 측정된다. 등가의 잔기는 모체 또는 전구체의 특정 아미노산 잔기의 2개의 또는 그 이상의 주된 사슬 원자의 원자 배위체(atomic coordinate)(N에 대한 N, CA에 대한 CA, C에 대한 C, 및 O에 대한 O)가, 정렬 후, 0.13 nm 및 바람직하게는 0.1 nm 이내인 것들로서 규정된다. 정렬은 최상의 모델이 배향되고 배치되어, Fc 변이체 단편의 수소 이외의 단백질 원자의 원자 배위체의 최대 중첩이 발생한 후에 달성된다.

[0049] 보다 구체적으로, "항체"란 용어의 정의에는 아글라이코실화된 항체가 포함된다. 본원에 사용된 바와 같이, "아글라이코실화된 항체(aglycosylated antibody)"란, Fc 부위의 297번 위치에 부착된 탄수화물이 결여된 항체를 의미하며, 여기서 Fc 부위 내의 잔기들의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 지정된다. 상기 아글라이코실화된 항체는 테글라이코실화된 항체, 즉 Fc 탄수화물이 예를 들어 화학적으로 또는 효소적으로 제거된 항체일 수 있다. 대안적으로, 상기 아글라이코실화된 항체는 비글라이코실화된(nonglycosylated) 또는 글라이코실화되지 않은(unglycosylated) 항체, 즉 Fc 탄수화물의 부재 하에, 예를 들어 글라이코실화 패턴을 코딩하는 하나 이상의 잔기의 돌연변이에 의하여, 또는 단백질에 대하여 탄수화물을 부착시키지 않는 유기체, 예를 들어 박테리아 내에서의 발현에 의하여 발현된 항체일 수 있다.

[0050] 보다 구체적으로, "항체(antibody)"의 정의에는, Fc 변이체 부분을 함유하는 전체 길이의 항체가 포함된다. 본원에 있어서, "전체 길이의 항체(full length antibody)"란, 가변 및 불변 부위를 포함하여, 한 항체의 천연적인 생물학적 형태를 구성하는 구조체를 의미한다. 예를 들어, 인간 및 마우스를 포함하는 대부분의 포유류에 있어서, IgG 클래스의 전체 길이의 항체는 테트라머(tetramer)로서, 2개의 동일한 쌍의 2개의 면역글로불린 사슬로 구성되며, 각각의 쌍은 하나의 경쇄 및 하나의 중쇄를 갖는다. 이때, 각각의 경쇄는 면역글로불린 도메인 V_L 및 C_L을 포함하고, 각각의 중쇄는 면역글로불린 도메인 V_H, C_γ1, C_γ2, 및 C_γ3을 포함한다. 몇몇 포유류에 있어서, 예를 들어 낙타 및 라마의 경우에는, IgG 항체가 단지 2개의 중쇄만으로 구성될 수 있으며, 여기서 각각의 중쇄는 Fc 부위에 부착된 가변 도메인을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "IgG"란, 인식된 면역글로불린 감마 유전자에 의하여 실질적으로 코딩되는 클래스의 항체에 속하는 폴리펩타이드를 의미한다. 인간에 있어서, 이러한 클래스는 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4를 포함한다. 마우스에 있어서, 상기 클래스는 IgG1, IgG2a, IgG2b, 및 IgG3을 포함한다.

[0051] 본원에 사용된 바와 같이, "아미노산(amino acid)" 및 "아미노산 신원(amino acid identity)"란, 특이적인, 규정된 위치에 존재할 수 있는, 20개의 천연 발생 아미노산 또는 임의의 비천연 유사체(analogue) 중 하나를 의미한다. 본원에 있어서, "단백질(protein)"이란, 단백질, 폴리펩타이드, 올리고펩타이드, 및 펩타이드를 포함하는, 적어도 2개의 공유 결합된 아미노산을 의미한다. 상기 단백질은, 특히 LC 펩타이드가 환자에게 투여되는 경우, 천연 발생 아미노산 및 펩타이드 결합(bond), 또는 합성 펩타이드 모방체 구조(peptidomimetic structure), 즉 "유사체(analog)", 예를 들어 펩토이드(peptoid) (Simon *et al.*, *PNAS USA* 89(20): 9367 (1992))로 이루어질 수 있다. 그러므로, "아미노산" 또는 "펩타이드 잔기"란, 본원에 사용된 바와 같이, 천연 발생 아미노산 및 합성 아미노산 모두를 의미한다. 예를 들어, 호모페닐알라닌(homophenylalanine), 사이트룰린(citrulline), 및 노레류신(noreleucine)이 본 발명에 사용될 수 있는 아미노산으로서 고려된다. "아미노산"은 또한, 이미노산(imino acid) 잔기, 예를 들어 프롤린 및 하이드록시프롤린을 포함한다. 측쇄(side chain)는 (R) 또는 (S) 배위(configuration) 중 하나일 수 있다. 바람직한 일면에 있어서, 아미노산들은 (S)-배위 또는 L-배위 중 하나의 배위를 갖는다. 천연적으로 발생하지 않은 측쇄가 사용되는 경우, 예를 들어, 생체내 분해(degradation)를 방지 또는 지연시키기 위하여 비아미노산 치환체가 사용될 수 있다.

[0052] 본원에 있어서, "컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 방법(computational screening method)"이란, 컴퓨터를 이용해 단백질 내에 하나 이상의 돌연변이를 설계하는 임의의 방법을 의미하며, 상기 단백질의 나머지 부분 및/또는 다른 부분과의 잠재적인 아미노산 측쇄 치환의 상호 작용 에너지를 계산하는 단계를 포함한다. 당업자라면, 예나

지 산출(energy calculation)이라 일컬어지는 에너지 평가 과정이, 하나 이상의 아미노산 변형을 계산하는 몇몇 방법을 일컫는 것임을 이해할 것이다. 상기 방법은 물리적 또는 화학적 에너지 텀(term)을 수반할 수 있으며, 지식(knowledge)-기준 에너지, 통계(statistical)-기준 에너지, 서열-기준 에너지 텀 등을 수반할 수 있다. 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 방법을 구성하는 산출 과정은, 본원에 있어서, "컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 산출 (computational screening calculation)"을 일컫는다.

[0053] 본원에 사용된 바와 같이, "작동체 기능(effector function)"이란, 항체 Fc 부위와 Fc 수용체 또는 리간드의 상호 작용에 기인하는 생화학적 현상을 의미한다. 작동체 기능은, 이들로 제한되지는 않으나, ADCC, ADCP, 및 CDC를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "작동체 세포(effector cell)"란, 하나 이상의 Fc 수용체를 발현시키고, 하나 이상의 작동체 기능을 매개하는 면역계의 세포를 의미한다. 작동체 세포는, 이들로 제한되지는 않으나, 단핵구, 대식 세포, 호중구, 수지상 세포, 호산구, 비만 세포, 혈소판, B 세포, 거대 과립 림프구, 랑게르한스 세포, 천연 킬러(NK) 세포, 및 $\gamma\gamma$ T 세포를 포함하며, 이들로 제한되지는 않으나, 인간, 마우스, 래트, 토끼, 및 원숭이를 포함하는 임의의 유기체로부터 유래될 수 있다. 본원에 있어서, "라이브러리(library)"란, 이들로 제한되지는 않으나, 핵산 또는 아미노산 서열의 리스트, 가변 위치에 대한 핵산 또는 아미노산 치환의 리스트, 라이브러리 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 물리적 라이브러리, 또는 정제된 형태 또는 정제되지 않은 형태의 Fc 변이체 단백질을 포함하는 물리적 라이브러리를 포함하는 임의의 형태의 Fc 변이체의 세트를 의미한다.

[0054] 본원에 사용된 바와 같이, "Fc", "Fc 부위", "Fc 폴리펩타이드" 등은, 제1 불변 부위 면역글로불린 도메인을 제외한 항체의 불변 부위를 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 본원에 정의된 항체를 의미한다. 그러므로, Fc는, IgA, IgD, 및 IgG의 최종 2개의 불변 부위 면역글로불린 도메인, 및 IgE 및 IgM의 최종 3개의 불변 부위 면역글로불린 도메인, 및 이들 도메인의 가요성 힌지 N-말단을 일컫는다. IgA 및 IgM의 경우, Fc는 J 사슬을 포함할 수 있다. IgG의 경우에는, 도 1에 예시된 바와 같이, Fc는 면역글로불린 도메인 C γ 2 및 C γ 3(C γ 2 및 C γ 3) 및 C γ 1(C γ 1)과 C γ 2(C γ 2) 사이의 힌지를 포함한다. 상기 Fc 부위의 경계는 가변적일 수 있으나, 인간 IgG 중쇄 Fc 부위는 통상적으로, 그의 카르복시-말단에 잔기 C226 또는 P230을 포함하는 것으로 정의되며, 여기서 Fc 부위 내의 잔기들의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 지정된다. Fc는 분리 시의 상기 부위, 또는 항체, 항체 단편, 또는 Fc 융합체 하의 상기 부위를 일컫을 수 있다. Fc는 Fc를 포함하는 항체, Fc 융합체, 또는 단백질 또는 단백질 도메인일 수 있다. 특히 Fc의 천연적으로 발생하지 않은 변이체인 Fc 변이체가 바람직하다.

[0055] 본원에 사용된 바와 같이, "Fc 융합체(Fc fusion)"란, 하나 이상의 폴리펩타이드가 Fc에 유효하게 결합된 단백질을 의미한다. 본원에 있어서, Fc 융합체는, 종래 기술에 사용되는 바와 같이, "면역 부착소 (immunoadhesin)", "Ig 융합체(fusion)", "Ig 키메라(chimera)", 및 "수용체 글로불린(receptor globulin)"(중종 대시(dash)로 표시됨)과 같은 뜻을 의미한다 (Chamow *et al.*, 1996, *Trends Biotechnol* 14: 52-60; Ashkenazi *et al.*, 1997, *Curr Opin Immunol* 9: 195-200). Fc 융합체는 융합 파트너를 가지는 면역글로불린의 Fc 부위와 조합하며, 상기 융합 파트너는 일반적으로 이들로 제한되지는 않으나, 수용체, 부착 분자(adhesion molecule), 리간드, 효소 일부 기타 단백질 또는 단백질 도메인의 표적-결합 부위를 포함하는 임의의 단백질이다. Fc 융합체의 비-Fc 부분의 역할은 표적 결합을 매개하는 것이며, 그러므로, 이는 항체의 가변 부위와 기능적으로 유사하다.

[0056] 본원에 사용된 바와 같이, "Fc 감마 수용체(gamma receptor)" 또는 "Fc γ R"란, IgG 항체 Fc 부위에 결합하며, 상기 Fc γ R 유전자에 의하여 실질적으로 코딩되는 부류의 단백질의 임의의 일원을 일컫는다. 인간에 있어서, 이러한 부류는, 이들로 제한되지는 않으나, 이성형 Fc γ RIa, Fc γ RIb, 및 Fc γ RIc를 포함하는 Fc γ RI (CD64); 이성형 Fc γ RIIa (알로타입 H131 및 R131 포함), Fc γ RIIb (Fc γ RIIb-1 및 Fc γ RIIb-2 포함), 및 Fc γ RIIc를 포함하는 Fc γ RII (CD32); 및 이성형 Fc γ RIIIa (알로타입 V158 및 F158 포함) 및 Fc γ RIIIb (알로타입 Fc γ RIIIb-NA1 및 Fc γ RIIIb-NA2 포함)를 포함하는 Fc γ RIII (CD16)를 포함하며 (Jefferis *et al.*, 2002, *Immunol Lett* 82: 57-65), 임의의 발견되지 않은 인간 Fc γ R 또는 Fc γ R 이성형 또는 알로타입을 포함한다. Fc γ R은, 이들로 제한되지는 않으나, 인간, 마우스, 래트, 토끼, 및 원숭이를 포함하는 임의의 유기체로부터 유래될 수 있다. 마우스 Fc γ R은, 이들로 제한되지는 않으나, Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), Fc γ RIII (CD16), 및 Fc γ RIII-2 (CD16-2), 그리고 임의의 발견되지 않은 마우스 Fc γ R 또는 Fc γ R 이성형 또는 알로타입을 포함한다.

[0057] 본원에 사용된 바와 같이, "Fc 리간드(ligand)"란, 항체의 Fc 부위에 결합하여, Fc-리간드 복합체를 형성하는, 임의의 유기체 유래의 분자, 바람직하게는 폴리펩타이드를 의미한다. Fc 리간드는, 이들로 제한되지는 않으나, Fc γ R, Fc γ R, Fc γ R, FcRn, C1q, C3, 만난 결합 렉틴(mannan binding lectin), 만노오스(mannose) 수용체, 스

타필로코쿠스(staphylococcal) 단백질 A, 스트렙토코쿠스(streptococcal) 단백질 G, 및 바이러스 Fc γ R을 포함한다. Fc 리간드는 Fc를 결합시키는 발견되지 않은 분자를 포함할 수 있다.

[0058] 본원에 사용된 바와 같이, "IgG"란, 인식된 면역글로불린 감마 유전자에 의하여 실질적으로 코딩되는 클래스의 항체에 속하는 폴리펩타이드를 의미한다. 인간에 있어서, 이러한 클래스는 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4를 포함한다. 마우스에 있어서, 상기 클래스는 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3을 포함한다. 본원에 있어서, "면역글로불린 (immunoglobulin; Ig)"이란, 면역글로불린 유전자에 의하여 실질적으로 코딩되는 하나 이상의 폴리펩타이드로 이루어지는 단백질을 의미한다. 면역글로불린은, 이들로 제한되지는 않으나, 항체를 포함한다. 면역글로불린은, 이들로 제한되지는 않으나, 전체 길이의 항체, 항체 단편, 및 개개의 면역글로불린 도메인을 포함하는 다수의 구조적 형태를 가질 수 있다. 본원에 있어서, "면역글로불린(Ig) 도메인(immunoglobulin domain)"이란, 단백질 구조 분야의 당업자에 의하여 확인되는 바 개별적인 구조적 실체로서 존재하는 면역글로불린의 부위를 의미한다. Ig 도메인은 통상적으로, 특징적인 β -샌드위치 폴딩 토폴로지(sandwich folding topology)를 갖는다. IgG 클래스 항체 내의 공지된 Ig 도메인으로는, V_H, C γ 1, C γ 2, C γ 3, V_L, 및 C_L이 있다.

[0059] 본원에 사용된 바와 같이, "모체 폴리펩타이드(parent polypeptide)" 또는 "전구체 폴리펩타이드(precursor polypeptide)"(Fc 모체 또는 전구체 포함)란, 변형되어, 변이체를 야기하는 폴리펩타이드를 의미한다. 상기 모체 폴리펩타이드는 천연 발생 폴리펩타이드일 수도 있고, 천연 발생 폴리펩타이드의 변이체 또는 조각된 형태일 수도 있다. 모체 폴리펩타이드는, 폴리펩타이드 자체, 상기 모체 폴리펩타이드를 포함하는 조성물, 또는 그를 코딩하는 아미노산 서열을 일컬을 수 있다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같이, "모체 Fc 폴리펩타이드"란, 변형되어, 변이체를 야기하는 변형되지 않은 Fc 폴리펩타이드를 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, "모체 항체"란, 변형되어, 변이체를 야기하는 변형되지 않은 항체를 의미한다.

[0060] 이상에서 개략적으로 설명한 바와 같이, Fc 분자의 특정 위치는 변경될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "위치(position)"란, 단백질 서열 내의 장소(location)를 의미한다. 위치의 번호는 순차적으로 지정될 수도 있고, 정립된 포맷, 예를 들어 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 지정될 수도 있다. 예를 들어, 297번 위치는 상기 인간 항체 IgG1 내의 위치이다. 해당 위치는 이상에서 개략적으로 설명한 바와 같이, 일반적으로 기타 모체 서열과의 정렬을 통해 측정한다.

[0061] 본원에 사용된 바와 같이, "잔기(residue)"란, 단백질 및 그의 관련 아미노산 신원 내의 위치를 의미한다. 예를 들어, Daragine 297(N297이라 일컬어지기도 함)은 상기 인간 항체 IgG1 내의 잔기이다.

[0062] 본원에 사용된 바와 같이, "표적 항원(target antigen)"이란, 주어진 항체의 가변 부위에 의하여 특이적으로 결합되는 분자를 의미한다. 표적 항원은 단백질, 탄수화물, 지질(lipid), 또는 기타 화학적 화합물일 수 있다.

[0063] 본원에 사용된 바와 같이, "표적 세포(target cell)"란, 표적 항원을 발현시키는 세포를 의미한다.

[0064] 본원에 사용된 바와 같이, "가변 부위(variable region)"란, 각각 카파, 람다, 및 중쇄 면역글로불린 유전자 자리를 구성하는 V_K, V_L, 및/또는 V_H 유전자 중 임의의 하나에 의하여 실질적으로 코딩되는 하나 이상의 Ig 도메인을 포함하는 면역글로불린의 부위를 의미한다.

[0065] 본원에 사용된 바와 같이, "변이체 폴리펩타이드(variant polypeptide)"란, 적어도 하나의 아미노산의 변형에 의하여 모체 폴리펩타이드의 서열과 상이해진 폴리펩타이드 서열을 의미한다. 변이체 폴리펩타이드는, 폴리펩타이드 자체, 상기 폴리펩타이드를 포함하는 조성물, 또는 그를 코딩하는 아미노산 서열을 일컬을 수 있다. 바람직하게는, 상기 변이체 폴리펩타이드는, 모체 폴리펩타이드에 비하여 적어도 하나의 아미노산 변형을 가지며, 예를 들어 모체 폴리펩타이드에 비하여 약 1개 내지 약 10개의 아미노산 변형, 바람직하게는 약 1개 내지 약 5개의 아미노산 변형을 갖는다. 본원에 있어서, 변이체 폴리펩타이드 서열은, 모체 폴리펩타이드에 대하여 적어도 약 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 적어도 약 90%의 상동성, 보다 바람직하게는 적어도 약 95%의 상동성을 가지는 것이 바람직할 것이다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같이, "Fc 변이체(variant)"란, 적어도 하나의 아미노산 변형에 의하여 모체 Fc 서열과 상이해진 Fc 서열을 의미한다. Fc 변이체는 단지 Fc 부위만을 포함할 수도 있고, Fc에 의하여 실질적으로 코딩되는 항체, Fc 융합체, 또는 기타 폴리펩타이드 하에 존재할 수도 있다. Fc 변이체는 Fc 폴리펩타이드 자체, Fc 변이체 폴리펩타이드를 포함하는 조성물, 또는 그를 코딩하는 아미노산 서열을 일컬을 수 있다.

[0066] 본 발명에서 논의된 모든 위치에 대하여, 면역글로불린 중쇄의 번호는 EU 인덱스에 따라 지정된다 (Kabat *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health

Service, National Institutes of Health, Bethesda). "Kabat에서와 같은 EU 인텍스"란, 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 번호 지정을 일컫는다.

[0067] 본 발명의 Fc 변이체는 다양한 특성들에 대하여 최적화될 수 있다. 최적화될 수 있는 특성들은, 이들로 제한되지는 않으나, Fc γ R에 대한 증진된 또는 감소된 친화성을 포함한다. 바람직한 일면에 있어서, 본 발명의 Fc 변이체는 인간의 활성화하는(activating) Fc γ R, 바람직하게는 Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIa, 및 Fc γ RIIIb, 가장 바람직하게는 Fc γ RIIIa에 대하여 증진된 친화성을 갖도록 최적화된다. 대안적으로 바람직한 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는 인간의 저해성 수용체 Fc γ RIIb에 대하여 감소된 친화성을 갖도록 최적화된다. 이들 바람직한 일면들은, 인간에 있어서 증진된 치료학적 특성들, 예를 들어 증진된 작동체 기능 및 보다 큰 항암 효능을 가지는 항체 및 Fc 융합체를 제공하기 위하여 고려된다. 대안적인 일면에 있어서, 본 발명의 Fc 변이체는, 이들로 제한되지는 않으나 Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIa, 및 Fc γ RIIIb를 포함하는 인간 Fc γ R에 대하여 감소된 또는 변경된 친화성을 가지도록 최적화된다. 이들 일면은, 인간에 있어서 증진된 치료학적 특성들, 예를 들어 감소된 작동체 기능 및 감소된 독성을 가지는 항체 및 Fc 융합체를 제공하기 위하여 고려된다. 바람직한 일면에 있어서 인간 Fc γ R에 대한 Fc 결합의 최적화가 포함되나, 대안적인 일면에 있어서, 본 발명의 Fc 변이체는, 이들로 제한되지는 않으나, 마우스, 래트, 토끼, 및 원숭이를 포함하는 비인간 유기체로부터 유래되는 Fc γ R에 대하여 증진된 또는 감소된 친화성을 갖는다. 비인간 Fc γ R에 대한 결합에 대하여 최적화된 Fc 변이체는 실험 용도로 사용될 수 있다. 예를 들어, 마우스 모델은 다양한 질환에 대하여 이용 가능하며, 주어진 약물 후보 물질(candidate)에 대한 효능, 독성, 및 약물 동력학과 같은 특성들의 테스트를 가능하게 한다. 당 기술 분야에 공지된 바와 같이, 암 세포는 인간 암을 모방하는 마우스 내로 이식(graft) 또는 주입(inject)될 수 있으며, 이러한 과정을 이종 이식(xenografting)이라 한다. 하나 이상의 마우스 Fc γ R에 대하여 최적화된 Fc 변이체를 포함하는 항체 또는 Fc 융합체의 테스트는, 항체 또는 Fc 융합체의 효능, 그의 작용 메커니즘 등에 대하여 유용한 정보를 제공할 수 있다. 또한, 본 발명의 Fc 변이체는 아글라이코실화된 형태에서의 증진된 기능성 및/또는 용해 특성에 대하여 최적화될 수 있다. 바람직한 일면에 있어서, 아글라이코실화된 본 발명의 Fc 변이체는 모체 Fc 폴리펩타이드의 아글라이코실화된 형태보다 큰 친화성을 가지고 Fc 리간드를 결합시킨다. 상기 Fc 리간드는, 이들로 제한되지는 않으나, Fc γ R, Clq, FcRn, 및 단백질 A 및 G를 포함하며, 이들로 제한되지는 않으나, 인간, 마우스, 래트, 토끼, 또는 원숭이, 바람직하게는 인간을 포함하는 임의의 공급원으로부터 유래될 수 있다. 대안적으로 바람직한 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는 아글라이코실화된 형태의 모체 Fc 폴리펩타이드보다 안정된 및/또는 큰 가용성을 가지도록 최적화된다. 이상에서 제시된 최적화된 특성들 중 임의의 특성을 나타내도록 조작되거나 예측된 Fc 변이체는 본원에서 "최적화된 Fc 변이체"라 일컬어진다.

[0068] 본 발명의 Fc 변이체는, 광범위한 공급원으로부터 유래되는 모체 Fc 폴리펩타이드로부터 유래될 수 있다. 상기 모체 Fc 폴리펩타이드는, 이들로 제한되지는 않으나, 인간, 마우스, 래트, 토끼, 낙타, 라마, 드로메데리(dromedary), 및 원숭이를 포함하는 임의의 유기체, 바람직하게는 포유류, 가장 바람직하게는 인간 및 마우스 유래의 하나 이상의 Fc 유전자에 의하여 실질적으로 코딩될 수 있다. 바람직한 일면에 있어서, 상기 모체 Fc 폴리펩타이드는 모체 항체라고 불리는 항체를 구성한다. 상기 모체 항체는, 예를 들어, 트랜스제닉 마우스(Bruggemann *et al.*, 1997, *Curr Opin Biotechnol* 8: 455-458) 또는 선별 방법과 결합된 인간 항체 라이브러리(Griffiths *et al.*, 1998, *Curr Opin Biotechnol* 9: 102-108)를 이용하여 얻어진 완전히 인간 유래의 것일 수 있다. 상기 모체 항체가 천연 발생의 것일 필요는 없다. 예를 들어, 상기 모체 항체는, 이들로 제한되지는 않으나, 키메라 항체 및 인간화된 항체를 포함하는 조작된 항체일 수 있다 (Clark, 2000, *Immunol Today* 21: 397-402). 상기 모체 항체는 하나 이상의 천연 항체 유전자에 의하여 실질적으로 코딩되는 항체의 조작된 변이체일 수 있다. 일면에 있어서, 상기 모체 항체는, 당 기술 분야에 공지된 바와 같이, 친화성에 대하여 완성된다. 대안적으로, 상기 항체는 예를 들어 2003년 3월 3일자로 출원된 USSN 10/339788에 개시된 바와 같은 몇몇 다른 방식으로 변형된다.

[0069] 본 발명의 Fc 변이체는, 임의의 항체 클래스의 면역글로불린 유전자에 의하여 실질적으로 코딩될 수 있다. 바람직한 일면에 있어서, 본 발명의 Fc 변이체는, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4를 포함하는 IgG 클래스의 항체에 속하는 서열을 포함하는 항체 또는 Fc 융합체에 이용될 수 있다. 대안적인 일면에 있어서, 본 발명의 Fc 변이체는, IgA (서브클래스 IgA1 및 IgA2 포함), IgD, IgE, IgG, 또는 IgM 클래스의 항체에 속하는 서열을 포함하는 항체 또는 Fc 융합체에 이용될 수 있다. 본 발명의 Fc 변이체는 하나 이상의 단백질 사슬을 포함할 수 있다. 즉, 본 발명은, 항체 또는 Fc 융합체, 즉 모노머(monomer), 또는 호모올리고머 또는 헤테로올리고머를 포함하는 올리고머에 이용될 수 있다.

[0070] 본 발명의 Fc 변이체는, 이들로 제한되지는 않으나, 작동체 기능을 변경시키는 변형을 포함하는 기타 Fc 변형과 조합될 수 있다. 그러한 조합은 항체 또는 Fc 융합체에 있어서 부가적인, 상승적인, 또는 신규한 특성을 제공한다. 일면에 있어서, 본 발명의 Fc 변이체는 기타 기지의 Fc 변이체와 함께 조합될 수 있다 (Duncan *et al.*, 1988, *Nature* 332: 563-564; Lund *et al.*, 1991, *J Immunol* 147: 2657-2662; Lund *et al.*, 1992, *Mol Immunol* 29: 53-59; Alegre *et al.*, 1994, *Transplantation* 57: 1537-1543; Hutchins *et al.*, 1995, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11980-11984; Jefferis *et al.*, 1995, *Immunol Lett* 44: 111-117; Lund *et al.*, 1995, *Faseb J* 9: 115-119; Jefferis *et al.*, 1996, *Immunol Lett* 54: 101-104; Lund *et al.*, 1996, *J Immunol* 157 : 4963-4969; Armour *et al.*, 1999, *Eur J Immunol* 29: 2613-2624; Idusogie *et al.*, 2000, *J Immunol* 164: 4178-4184; Reddy *et al.*, 2000, *J Immunol* 164 : 1925-1933; Xu *et al.*, 2000, *Cell Immunol* 200: 16-26; Idusogie *et al.*, 2001, *J Immunol* 166: 2571-2575; Shields *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 6591-6604; Jefferis *et al.*, 2002, *Immunol Lett* 82: 57-65; Presta *et al.*, 2002, *Biochem Soc Trans* 30: 487-490) (US 5,624,821; US 5,885,573; US 6,194,551; PCT WO 00/42072; PCT WO 99/58572). 대안적인 일면에 있어서, 본 발명의 Fc 변이체는 하나 이상의 조작된 글라이코 형태를 포함하는 항체 또는 Fc 융합체 내로 도입된다. 본원에 사용된 바와 같이, "조작된 글라이코 형태(engineered glycoform)"란, Fc 폴리펩타이드에 공유 결합된 탄수화물 조성물을 의미하며, 여기서 상기 탄수화물 조성물은 모체 Fc 폴리펩타이드와 화학적으로 상이하다. 조작된 글라이코 형태는, 이들로 제한되지는 않으나, 작동체 기능의 증진 또는 감소를 포함하는 다양한 목적에 유용할 수 있다. 조작된 글라이코 형태는, 임의의 방법, 예를 들어 조작된 또는 변이체 발현 균주를 이용함으로써, 하나 이상의 효소, 예를 들어 β 4-N-아세틸글루코사미닐 트랜스퍼라아제 III(β 4-N-acetylglucosaminyl transferase III; GnT111)와 공-발현시킴으로써, 다양한 유기체, 또는 다양한 유기체 유래의 세포주 내에서 Fc 폴리펩타이드를 발현시킴으로써, 또는 Fc 폴리펩타이드가 발현된 후 탄수화물(들)을 변형시킴으로써, 제작될 수 있다. 조작된 글라이코 형태의 제작 방법은 당 기술 분야에 공지되어 있으며, 이들로 제한되지는 않으나, (Umaña *et al.*, 1999, *Nat Biotechnol* 17: 176-180; Davies *et al.*, 2001, *Biotechnol Bioeng* 74: 288-294; Shields *et al.*, 2002, *J Biol Chem* 277: 26733-26740; Shinkawa *et al.*, 2003, *J Biol Chem* 278: 3466-3473) US 6,602,684; USSN 10/277,370; USSN 10/113,929; PCT WO 00/61739 A1; PCT WO 01/29246 A1; PCT WO 02/31140 A1; PCT WO 02/30954 A1; 포텔리젠트 기술(Potelligent technology) (Biowa, Inc., Princeton, N.J.); GlycoMabT™ 글라이코실화 조작 기술(glycosylation engineering technology)(GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland))이 포함된다. 조작된 글라이코 형태는 통상적으로, 상이한 탄수화물 또는 올리고당을 일컫는다. 그러므로, Fc 폴리펩타이드, 예를 들어 항체 또는 Fc 융합체는, 조작된 글라이코 형태를 포함할 수 있다. 대안적으로, 조작된 글라이코 형태는, 상이한 탄수화물 또는 올리고당을 포함하는 Fc 폴리펩타이드를 일컫을 수 있다. 그러므로, 본 발명의 Fc 변이체와 기타 Fc 변형의 조합, 그리고 발견되지 않은 Fc 변형의 조합은, 최적화된 특성을 가지는 신규한 항체 또는 Fc 융합체에 대하여 고려된다.

[0071] 본 발명의 Fc 변이체는 항체에 있어서의 용도를 갖는다. 본원에 사용된 바와 같이, "본 발명의 항체"란, 본 발명의 Fc 변이체를 포함하는 항체를 의미한다. 본 발명은, 실제로 Fc를 포함하는 임의의 단백질에 있어서의 용도를 가지며, 그러므로, 본 발명의 Fc 변이체의 적용은 항체로 제한되지 않는다. 본 발명의 Fc 변이체는 Fc 융합체에 있어서의 용도를 가질 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "본 발명의 Fc 융합체"란, 본 발명의 Fc 변이체를 포함하는 Fc 융합체를 일컫는다. Fc 융합체는, 사이토카인(cytokine), 가용성 수용체 도메인, 부착 분자, 리간드, 효소, 펩타이드, 또는 기타 단백질 또는 단백질 도메인에 유효하게 결합된 본 발명의 Fc 변이체를 포함할 수 있으며, 이들로 제한되지는 않으나, US 5,843,725; US 6,018,026; US 6,291,212; US 6,291,646; US 6,300,099; US 6,323,323; PCT WO 00/24782; 및 (Chamow *et al.*, 1996, *Trends Biotechnol* 14: 52-60; Ashkenazi *et al.*, 1997, *Curr Opin Immunol* 9: 195-200)에 개시된 Fc 융합체를 포함한다.

[0072] 실질적으로 임의의 항원이 본 발명의 항체 및 융합체에 의하여 표적화될 수 있으며, 이들로 제한되지는 않으나, 다음과 같은 리스트의 단백질, 서브유닛(subunit), 도메인, 모티브, 및 에피토프를 포함한다: CD2; CD3, CD3E, CD4, CD11, CD11a, CD14, CD16, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD28, CD29, CD30, CD32, CD33 (p67 단백질), CD38, CD40, CD40L, CD52, CD54, CD56, CD80, CD147, GD3, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, 인터페론 알파(interferon alpha), 인터페론 베타, 인터페론 감마; TNF-알파, TNF 베타2, TNFc, TNF 알파베타, TNF-RI, TNF-RII, FasL, CD27L, CD30L, 4-1BBL, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, LIGHT, VEGI, OX40L, TRAIL 수용체-1, A1 아데노신 수용체, 림포톡신 베타 수용체 (Lymphotoxin Beta Receptor), TACI, BAFF-R, EPO; LFA-3, ICAM-1, ICAM-3, EpCAM, 인테그린(integrin) 베타 1, 인테그린 베타2, 인테그린 알파4/베타7, 인테그린 알파2, 인테그린 알파3, 인테그린 알파4, 인테그린 알파5, 인테그린 알파6, 인테그린 알파v, 알파V베타3 인테그린, FGFR-3, 케라노사이트 성장 인자(Keratinocyte Growth

Factor), VLA-1, VLA-4, L-셀렉틴(selectin), 항-Id, E-셀렉틴, HLA, HLA-DR, CTLA-4, T 세포 수용체, B7-1, B7-2, VNR 인테그린, TGF 베타1, TGF 베타2, 에오타신(eotaxin) 1, BlyS (B-lymphocyte Stimulator), 상보체 C5, IgE, 인자 VII, CD64, CBL, NCA 90, EGFR (ErbB-1), Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), 조직 인자(Tissue factor), VEGF, VEGFR, 엔도텔린(endothelin) 수용체, VLA-4, 헵텐(Hapten) NP-cap 또는 NIP-cap, T 세포 수용체 알파/베타, E-셀렉틴, 다이곡신(digoxin), 태반의 알칼리성 포스파타아제(placental alkaline phosphatase; PLAP) 및 고환의(testicular) PLAP형 알칼리성 포스파타아제, 트랜스페린(transferrin) 수용체, 발암성 배아 항원(Carcinoembryonic antigen; CEA), CEACAM5, HMFG PEM, 무친(mucin) MUC1, MUC18, 헤파라나아제(Heparanase) I, 인간 강심제(cardiac myosin), 종양-관련 당단백질-72 (TAG-72), 종양-관련 항원 CA 125, 전립선 특이성 막 항원 (Prostate specific membrane antigen; PSMA), 고분자량 흑색종-관련 항원 (High molecular weight melanoma-associated antigen; HMW-MAA), 카르시노마-관련 항원, Gco단백질 I1b/I11a(GPIIb/IIIa), 루이스 Y 관련 탄수화물(Lewis Y related carbohydrate)을 발현시키는 종양-관련 항원, 인간 사이토메갈로 바이러스 (human cytomegalovirus; HCMV) gH 외피(envelope) 당단백질, HIV gp120, HCMV, 호흡기 신시털 바이러스(respiratory syncytial virus) RSV F, RSV FGP, VNR 인테그린, IL-8, 사이토케라틴 종양-관련 항원, Hep B gp120, CMV, gpIIbIIIa, HIV IIIB gp120 V3 루프, 호흡기 신시이셜 바이러스 (respiratory syncytial virus; RSV) Fgp, 헤르페스 심플렉스 바이러스 (HSV), gD 당단백질, HSV gB 당단백질, HCMV gB 외피 당단백질, 및 *클로스트리듐 페르그린젠스(Clostridium perfringens)* 독소.

[0073] 당업자라면, 이상에 개시한 표적 리스트가, 특이적인 단백질 및 생분자(biomolecule)뿐 아니라, 그들을 포함하는 생화학적 경로 또는 경로들을 일컬음을 이해할 것이다. 예를 들어, 표적 항원으로서 CTLA-4의 언급은, CTLA-4, B7-1, B7-2, CD28, 및 기타 발견되지 않은 리간드 또는 수용체를 포함하는 T 세포 공-자극성 경로를 구성하는 리간드 및 수용체도 표적임을 의미한다. 그러므로, 본원에 사용된 바와 같이, 표적은 특이적인 생분자, 그리고 상기 표적이 속하는 생화학적 경로의 일원 및 상기 표적과 상호 작용하는 단백질 세트를 일컫는다. 당업자라면, 이상에 개시한 표적 항원, 그들에 결합하는 리간드 또는 수용체, 또는 그들의 해당 생화학적 경로의 기타 일원들 중 하나가, 본 발명의 Fc 변이체에 유효하게 결합되어, Fc 기능을 야기할 수 있음을 이해할 것이다. 그러므로, 예를 들어, EGFR를 표적화하는 Fc 변이체는 EGF, TGF α, 또는 EGFR을 결합시킬 수 있는 발견된 또는 발견되지 않은 기타 리간드를 유효하게 결합시킴으로써 제작될 수 있다. 따라서, 본 발명의 Fc 변이체는, EGF, TGF α, 또는 EGFR을 결합시킬 수 있는 발견된 또는 발견되지 않은 기타 리간드를 제작하기 위하여 EGFR에 유효하게 결합될 수 있다. 그러므로, 이들로 제한되는 것은 아니나, 이상에 개시한 표적 및 그들의 해당 생화학적 경로를 구성하는 단백질을 포함하는, 리간드, 수용체, 또는 기타 단백질 또는 단백질 도메인이 Fc 융합체를 개발하기 위하여 본 발명의 Fc 변이체에 유효하게 결합될 수 있다.

[0074] 임상 실험 또는 개발 용도로서 허가된 다수의 항체 및 Fc 융합체가 본 발명의 Fc 변이체로부터 유용성을 찾을 수 있다. 본원에 있어서, 이러한 항체 및 Fc 융합체를 "임상적 제품(clinical product) 및 후보 물질(candidate)"이라 일컫는다. 그러므로, 바람직한 일면에 있어서, 본 발명의 Fc 변이체는 임상적 제품 및 후보 물질의 측면에서 사용될 수 있다. 예를 들어, CD20을 표적화하는 다수의 항체들이 본 발명의 Fc 변이체로부터 유용성을 찾을 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 Fc 변이체는 리툽시맵(Rituxan^(R), IDEC/Genetech/Roche) (예를 들어, US 5,736,137 참조), 호드그킨의 림프종(Hodgkin's lymphoma)을 표적화하는 것으로 허가된 키메라 항-CD20 항체; HuMax-CD20, 현재 Genmab에 의하여 개발되고 있는 중인 항-CD20, US 5,500,362에 개시된 항-CD20 항체, AME-133 (Applied Molecular Evolution), hA20 (Immunomedics, Inc.), 및 HumaLYM (Intracel)과 실질적으로 유사한 항체에 사용될 수 있다. EGFR (ErbB-1), Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4)를 포함하는 상피 성장 인자 수용체(epidermal growth factor receptor) 부류의 일원들을 표적화하는 다수의 항체가 본 발명의 Fc 변이체로부터 이익을 취할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 Fc 변이체는 다음과 실질적으로 유사한 항체에 사용될 수 있다: 트라스투주맵(Herceptin^(R); Genentech) (예를 들어, US 5,677,171 참조), 유방암의 치료에 대하여 허가된 인간화된 항-Her2/neu 항체; 현재 Genentech에 의하여 개발 중에 있는 페르투주맵(pertuzumab) (rhuMab-2C4, OmnitargTM); US 4,753,894에 개시되어 있는 항-Her2 항체; 세투시맵(cetuximab)(Erbbitux^(R), Imclone) (US 4,943,533; PCT WO 96/40210); 다양한 암에 대한 임상 실험에 사용되는 키메라 항-EGFR 항체; 현재 Abgenix/Immunex/Amgen에 의하여 개발 중에 있는 ABX-EGF (US 6,235,883); 현재 Genmab에 의하여 개발 중에 있는 HuMax-EGFr (USSN 10/172,317); 425, EMD55900, EMD62000, 및 EMD72000 (MerckKGaA) (US 5,558,864; Murthy *et al.*, 1987, *Arch Biochem Biophys.* 252 (2): 549-60; Rodeck *et al.*, 1987, *J Cell Biochem.* 35 (4): 315-20; Kettleborough *et al.*, 1991, *Protein Eng.* 4 (7): 773-83); ICR62 (Institute of Cancer Research) (PCT WO 95/20045; Modjtahedi *et al.*, 1993, *Br J Cancer.* 1993, 67 (2):

247-53; Modjtahedi *et al.*, 1996, *Br J Cancer*, 73 (2): 228-35; Modjtahedi *et al.*, 2003, *Int J Cancer*, 105 (2): 273-80); TheraCIM hR3 (YM Biosciences, Canada and Centro de Immunologia Molecular, Cuba (US 5,891,996; US 6,506,883; Mateo *et al.*, 1997, *Immunotechnology*, 3 (1): 71-81); mAb-806 (Ludwig Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering) (Jungbluth *et al.*, 2003, *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 100 (2): 639-44); KSB-102 (KS Biomedix); MR1-1 (IVAX, National Cancer Institute)(PCT WO 0162931A2); 및 SC100(Scancell) (PCT WO 01/88138). 또 다른 하나의 바람직한 일면에 있어서, 본 발명의 Fc 변이체는, 현재 B-세포 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia)의 치료용으로 허가되어 있는 인간화된 단일 클론성 항체인 알렘투주맵(Campath^(R), Millenium)에 사용될 수 있다. 본 발명의 Fc 변이체는 이들로 제한되지는 않으나, 다음을 포함하는 기타 임상적 제품 및 후보 물질과 실질적으로 유사한 항체에 사용될 수 있다: 뮤로몬넵(muromonab)-CD3 (Orthoclone OKT32^(R)), Ortho Biotech/Johnson & Johnson에 의하여 개발된, 항-CD3 항체, 이브리투모맵 타이옥세탄(ibrutumomab tiuxetan)(Zevalin^(R)), IDEC/Schering AG에 의하여 개발된, 항-CD20 항체, 겐투주맵 오조자마이신(gemtuzumab ozogamicin)(Mylotarg^(R)), Celltech/Wyeth에 의하여 개발된, 항-CD33 (p67 단백질) 항체, 알레파셉트(alefacept)(Amevive^(R)), Biogen에 의하여 개발된, 항-LFA-3 Fc 융합체, Centocor/Lilly에 의하여 개발된, 아브식사이맵(abciximab)(ReoPro^(R)), Novartis에 의하여 개발된, 바실릭사이맵(basiliximab)(Simulect^(R)), MedImmune에 의하여 개발된, 팔리바이주맵(palivizumab)(Synagis^(R)), 인글릭사이맵(Remicade^(R)), Centocor에 의하여 개발된, 항-TNF 알파 항체, 아달리뮤맵(Humira^(R)), Abbott에 의하여 개발된, 항-TNF 알파 항체, Humicade^(R), Celltech에 의하여 개발된, TNF 알파 항체, 에타네르셉트(Enbrel^(R)), Immunex/Amgen에 의하여 개발된 항-TNF 알파 Fc 융합체, ABX-CBL, Abgenix에 의하여 개발된, 항-CD147 항체, ABX-IL8, Abgenix에 의하여 개발 중에 있는 항-IL8 항체, ABX-MA1, Abgenix에 의하여 개발 중에 있는 항-MUC18 항체, 펨투모맵(Pemtumomab)(R1549, ⁹⁰Y-mu-HMFG1), Antisoma에 의하여 개발 중에 있는 항-MUC1, Therex(R1550), Antisoma에 의하여 개발 중에 있는 항-MUC1 항체, Antisoma에 의하여 개발 중에 있는 안지오맵(AngioMab), Antisoma에 의하여 개발 중에 있는 HuBC-1, Antisoma에 의하여 개발 중에 있는 티오플라틴(Thioplatin)(AS1407), Antegren^(R)(나탈리주맵), Biogen에 의하여 개발 중에 있는 항-알파-4-베타-1 (VLA-4) 및 알파-4-베타-7 항체, VLA-1 mAb, Biogen에 의하여 개발 중에 있는 항-VLA-1 인테그린 항체, LTBR mAb, Biogen에 의하여 개발 중에 있는 항-림프독신 베타 수용체 (anti-lymphotoxin beta receptor; LTBR) 항체, CAT-152, Cambridge Antibody Technology에 의하여 개발 중에 있는 항-TGF β2 항체, J695, Cambridge Antibody Technology 및 Abbott에 의하여 개발 중에 있는 항-IL-12 항체, CAT-192, Cambridge Antibody Technology 및 Genzyme에 의하여 개발 중에 있는 항-TGF β1 항체, CAT-213, Cambridge Antibody Technology에 의하여 개발 중에 있는 항-에오타신 1 항체, Lymphostat-BT, Cambridge Antibody Technology 및 Human Genome Sciences Inc.에 의하여 개발 중에 있는 항-Blys 항체, TRAIL-R1mAb, Cambridge Antibody Technology 및 Human Genome Sciences Inc.에 의하여 개발 중에 있는 항-TRAIL-R1 항체, AvastinTM (bevacizumab, rhuMAB-VEGF), Genentech에 의하여 개발 중에 있는 항-VEGF 항체, Genentech에 의하여 개발 중에 있는 항-HER 수용체 부류의 항체, 항-조직 인자 (Anti-Tissue Factor; ATF), Genentech에 의하여 개발 중에 있는 항-조직 인자 항체, XolairTM (Omalizumab), Genentech에 의하여 개발 중에 있는 항-IgE 항체, RaptivaTM (Efalizumab), Genentech 및 Xoma에 의하여 개발 중에 있는 항-CD11a 항체, Genentech 및 Millenium Pharmaceuticals에 의하여 개발 중에 있는 MLN-02 항체 (이전에는 LDP-02이란 불림), HuMax CD4, Genmab에 의하여 개발 중에 있는 항-CD4 항체, HuMax-IL15, Genmab 및 Amgen에 의하여 개발 중에 있는 항-IL15 항체, Genmab 및 Medarex에 의하여 개발 중에 있는 HuMax-Inflam, HuMax-Cancer, Genmab 및 Medarex 및 Oxford GcoSciences에 의하여 개발 중에 있는 항-헤파라나아제 I 항체, Genmab 및 Amgen에 의하여 개발 중에 있는 Genmab and Amgen에 의하여 개발 중에 있는 HuMax-Lymphoma, Genmab에 의하여 개발 중에 있는 HuMax-TAC, DEC Pharmaceuticals에 의하여 개발 중에 있는 항-CD40L 항체, IDEC-131, IDEC Pharmaceuticals에 의하여 개발 중에 있는 항-CD4 항체, IDEC-151(Clenoliximab), IDEC Pharmaceuticals에 의하여 개발 중에 있는 항-CD80 항체, IDEC-114, IDEC Pharmaceuticals에 의하여 개발 중에 있는 항-CD23, IDEC-152, IDEC Pharmaceuticals에 의하여 개발 중에 있는 항-매크로파지 이동 인자 (macrophage migration factor; MIF) 항체, Imclone에 의하여 개발 중에 있는 항-이디오타입(idiotypic) 항체, BEC2, Imclone에 의하여 개발 중에 있는 항-KDR 항체, IMC-1C11, Imclone에 의하여 개발 중에 있는 항-flk-1 항체, DC101, Imclone에 의하여 개발 중에 있는 항-VE 카드헤린(cadherin) 항체, Immunomedics에 의하여 개발 중에 있는 항-암배아 항체(anti-carcinoembryonic antibody; CEA), CEA-CideTM (Iabetezumab), Immunomedics

에 의하여 개발 중에 있는 항-CD22 항체, LymphoCide™ (Epratuzumab), Immunomedics에 의하여 개발 중에 있는 AFP-Cide, Immunomedics에 의하여 개발 중에 있는 MyelomaCide, Immunomedics에 의하여 개발 중에 있는 LkoCide, Immunomedics에 의하여 개발 중에 있는 ProstaCide, Medarex에 의하여 개발 중에 있는 항-CTLA4 항체, MDX-010, Medarex에 의하여 개발 중에 있는 항-CD30 항체, MDX-060, Medarex에 의하여 개발 중에 있는 MDX-070, Medarex에 의하여 개발 중에 있는 MDX-018, Medarex 및 Immuno-Designed Molecules에 의하여 개발 중에 있는 항-Her2 항체, Osidem™ (IDM-1), Medarex 및 Genmab에 의하여 개발 중에 있는 항-CD4 항체, HuMax™-CD4, Medarex 및 Genmab에 의하여 개발 중에 있는 항-IL15 항체, HuMax-IL15, Medarex 및 Centocor/J&J에 의하여 개발 중에 있는 항-TNF α 항체, CNTO 148, Centocor/J&J에 의하여 개발 중에 있는 항-사이토카인 항체, CNTO1275, MorphoSys에 의하여 개발 중에 있는 항-세포내 부착 분자(intercellular adhesion molecule)-1(ICAM-1)(CD54) 항체, MOR101 및 MOR102, MorphoSys에 의하여 개발 중에 있는 항-섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor)-3(FGFR-3), MOR201, Protein Design Labs에 의하여 개발 중에 있는 항-CD3 항체, Nuvion^(R) (visilizumab), Protein Design Labs에 의하여 개발 중에 있는 항-감마 인터페론 항체, HuZAF™, Protein Design Labs에 의하여 개발 중에 있는 항-α5β1-인테그린, Protein Design Labs에 의하여 개발 중에 있는 항-IL-12, ING-1, Xoma에 의하여 개발 중에 있는 항-Ep-CAM 항체, 및 MLN01, Xoma에 의하여 개발 중에 있는 항-Beta 2 인테그린 항체.

[0075] 이상에 개시한 항체 및 Fc 융합체 임상적 제품 및 후보 물질에 대한 상기 변이체의 적용이, 그들의 정밀한 조성
에 제약되는 것을 의미하지는 않는다. 본 발명의 Fc 변이체는 이상에 개시한 임상적 제품 및 후보 물질, 또는
그들과 실질적으로 유사한 항체 및 Fc 융합체 내로 도입될 수 있다. 본 발명의 Fc 변이체는, 기타 다양한 방식
으로 인간화된, 친화성 발달된, 조작된, 또는 변형된, 이상에 개시한 임상적 후보 물질 및 산물의 개조된 형태
로도 도입될 수 있다. 나아가, 이상에 개시한 임상적 제품 및 후보 물질의 전체 폴리펩타이드가, 본 발명의 Fc
변이체를 혼입한 새로운 항체 또는 Fc 융합체를 제작하는 데 사용될 필요는 없다. 예를 들어, 임상적 제품 또
는 후보 물질 항체의 단지 가변 부위, 실질적으로 유사한 가변 부위, 또는 상기 가변 부위의 인간화된, 친화성
발달된, 조작된, 또는 변형된 개조형이 사용될 수 있다. 또 다른 일면에 있어서, 본 발명의 Fc 변이체는, 이상
에 개시한 임상적 제품 및 후보 물질과 동일한 에피토프, 항원, 리간드, 또는 수용체에 결합하는 항체 또는 Fc
융합체에 있어서의 용도를 가질 수 있다.

[0076] 본 발명의 Fc 변이체는 광범위한 항체 및 Fc 융합체 산물에 있어서의 용도를 가질 수 있다. 일면에 있어서, 본
발명의 항체 또는 Fc 융합체는 치료용, 진단용, 또는 연구용 시약(reagent), 바람직하게는 치료용 시약이다.
대안적으로, 본 발명의 항체 및 Fc 융합체는 농업적 용도 및 산업적 용도로 사용될 수 있다. 대안적인 일면에
있어서, 본 발명의 Fc 변이체는 실험적으로 스크리닝될 수 있는 라이브러리를 구성한다. 이 라이브러리는 핵산
또는 아미노산 서열의 리스트일 수도 있고, 상기 라이브러리를 코딩하는 핵산 또는 폴리펩타이드의 물리적 조성
물일 수도 있다. 상기 Fc 변이체는 단일 클론성 또는 다중 클론성인 항체 조성물에 있어서의 용도를 가질 수
있다. 바람직한 일면에 있어서, 본 발명의 항체 및 Fc 융합체는 표적 항원, 예를 들어, 암 세포를 함유하는 표
적 세포를 죽이는 데에 사용된다. 대안적인 일면에 있어서, 본 발명의 항체 및 Fc 융합체는, 예를 들어 사이토
카인 또는 사이토카인 수용체에 대하여 길항 작용하기 위하여, 표적 항원을 블로킹하거나, 길항 작용하거나, 또
는 방해하는 데 사용된다. 대안적으로 바람직한 일면에 있어서, 본 발명의 항체 및 Fc 융합체는, 표적 항원을
블로킹하거나, 길항 작용하거나, 또는 방해하는 데 및 상기 표적 항원을 함유하는 표적 세포를 죽이는 데 사용
된다.

[0077] 본 발명의 Fc 변이체는 다양한 치료 목적으로 사용될 수 있다. 바람직한 일면에 있어서, Fc 변이체 단백질은,
항체-관련 질환을 치료하기 위하여 환자에게 투여된다. 본 발명의 목적에 있어서, "환자(patient)"는 인간 및
기타 동물을 포함하며, 바람직하게는 포유류, 가장 바람직하게는 인간을 포함한다. 그러므로, 본 발명의 항체
및 Fc 융합체는 인간 요법 및 수의학적(veterinary) 용도를 갖는다. 바람직한 일면에 있어서, 상기 환자는 포
유류이다. 가장 바람직한 일면에 있어서, 상기 환자는 인간이다. 본원에 있어서, "치료(treatment)"란
용어는, 질병 또는 질환의 치료학적 처치(therapeutic treatment)뿐 아니라, 예방학적 처치(prophylactic
treatment), 또는 억제 조치(suppressive measure)를 의미한다. 그러므로, 예를 들어, 질병이 발생하기 전에
항체 또는 Fc 융합체를 성공적으로 투여하면, 그러한 질환을 치료할 수 있다. 또 다른 하나의 일례로서, 질병
의 임상적 징후(clinical manifestation) 이후, 상기 질병의 증후(symptom)를 퇴치하기 위하여, 최적화된 항체
또는 Fc 융합체를 성공적으로 투여하는 것은, 상기 질병을 치료하는 과정에 포함된다. "치료(treatment)"는 또
한, 질병이 발현된 후, 상기 질병을 박멸하기 위하여, 최적화된 항체 또는 Fc 융합체를 투여하는 것을
포괄한다. 임상적 증후가 발병한 후 및 임상적 증후가 발달한 이후, 제제를 성공적으로 투여하는 것은, 임상적

증후의 가능한 경감 및 질병의 개선과 함께, 상기 질병을 치료하는 과정을 포함한다. "치료를 필요로 하는(need of treatment)" 개체란, 이미 질병 또는 질환을 가지는 포유류뿐 아니라, 질병 또는 질환이 예방된 바 있는 포유류를 포함하여, 질병 또는 질환을 갖기 쉬운 포유류를 포함한다. 본원에 있어서, "항체 관련 질환(antibody related disorder)" 또는 "항체 반응성 질환(antibody responsive disorder)" 또는 "증상(condition)" 또는 "질환(disease)"은, 본 발명의 항체 또는 Fc 융합체를 포함하는 약학적 조성물을 투여함으로써 개선될 수 있는 질환을 의미한다. 항체 관련 질환은, 이들로 제한되지는 않으나, 자가면역 질환(to autoimmune disease), 면역학적 질환(immunological disease), 감염성 질환(infectious disease), 염증성 질환(inflammatory disease), 신경학적 질환(neurological disease), 및 암을 포함하는 종양학적(oncological) 및 신생(neoplastic) 질환을 포함한다. 본원에 있어서, "암(cancer)" 및 "암성(cancerous)"이란, 통상적으로 비관련 세포의 성장을 특징으로 하는 포유류 내에서의 생리학적 증상(physiological condition)을 일컫거나 설명한다. 암의 예로는, 이들로 제한되지는 않으나, 카르시노마, 림프종, 모세포종(blastoma), 사르코마(sarcoma) (림포사르코마 포함), 신경 내분비 종양(neuroendocrine tumor), 메소텔라이오마(mesothelioma), 쉬와노마(schwannoma), 수막종(meningioma), 아데노카르시노마(adenocarcinoma), 흑색종, 및 백혈병 또는 림프 악성 종양(malignancy)이 포함된다. 그러한 암의 보다 구체적인 예로는 다음과 같은 것들이 있다: 편평 세포 암(squamous cell cancer) (예를 들어, 상피 편평 세포 암), 소세포 폐암, 비-소세포 폐암을 포함하는 폐암, 폐의 아데노카르시노마 및 폐의 편평 카르시노마, 복막(peritoneum)의 암, 간세포 암(hepatocellular cancer), 위암(gastric cancer 또는 stomach cancer), 예를 들어 위장암(gastrointestinal cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 아교모세포종(glioblastoma), 자궁 경부 암(cervical cancer), 난소암(ovarian cancer), 간암(liver cancer), 방광암(bladder cancer), hepatoma, 유방암, 결장암(colon cancer), 직장암(rectal cancer), 대장결장암(colorectal cancer), 자궁 내막(endometrial) 또는 자궁(uterine) 카르시노마, 침선(salivary gland) 카르시노마, 신장암(kidney cancer) 또는 신암(renal cancer), 전립선 암, 음문암(vulval cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 간장 카르시노마(hepatic carcinoma), 항문(anal) 카르시노마, 음경(penile) 카르시노마, 고환 암(testicular cancer), 식도암(esophageal cancer), 담관(biliary tract) 종양, 그리고 두부 및 목부(neck) 암. 나아가, 본 발명의 Fc 변이체는, 이들로 제한되지는 않으나, 다음과 같은 증상의 치료에 사용될 수 있다: 충혈성 심장 부전(congestive heart failure; CHF), 맥관염(vasculitis), 로세시아(rosecea), 좌창(acne), 습진(eczema), 심근염(myocarditis) 및 기타 심근(myocardium) 증상, 전신 낭창성 홍반증(systemic lupus erythematosus), 당뇨병(diabetes), 척추병증(spondylopathy), 활액성 섬유아세포증(synovial fibroblast), 및 골수 기질(bone marrow stroma); 골 손실(bone loss); 파제트병(Paget's disease), 파골세포증(osteoclastoma); 다발성 골수종(multiple myeloma); 유방암; 불사용 골 감소증(disuse osteopenia); 영양 실조(malnutrition), 치주 질환(periodontal disease), 가우셔병(Gaucher's disease), 랑게르한스 세포 조직구증(Langerhans' cell histiocytosis), 척수 손상(spinal cord injury), 급성 패혈성 관절염(acute septic arthritis), 골연화증(osteomalacia), 쿠싱 증후군(Cushing's syndrome), 단일골 섬유질 이형성증(monoostotic fibrous dysplasia), 다골 섬유질 이형성증(polyostotic fibrous dysplasia), 치주 재건(periodontal reconstruction), 및 골절(bone fracture); 유육종증(sarcoidosis); 다발성 골수종(multiple myeloma); 골수염성 골 암(osteolytic bone cancer), 유방암, 폐암, 신장암 및 신암; 골 전이(bone metastasis), 골 통증 관리(bone pain management), 및 체액성 악성 고칼슘증(humoral malignant hypercalcemia), 교착성 척추염증(ankylosing spondylitis) 및 기타 척추 관절 병증(spondyloarthropathy); 이식 거부반응(transplantation rejection), 바이러스 감염, 혈액 신생종(hematologic neoplasia) 및 신생종형 증상(neoplastic-like condition), 예를 들어, 호드그킨 림프종; 비-호드그킨 림프종(부르키트 림프종(Burkitt's lymphoma), 작은 림프구성 림프종/만성 림프구성 백혈병, 사상균병 균상종(mycosis fungoid), 맨틀 세포 림프종(mantle cell lymphoma), 여포성 림프종(follicular lymphoma), 발산성 거대 B-세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma), 연변 림프종(marginal zone lymphoma), 모발 세포 백혈병(hairy cell leukemia) 및 림프 형질 세포성 백혈병(lymphoplasmacytic leukemia), 림프구 전구체 세포 종양, 예를 들어 B-세포 급성 림프 모세포성(lymphoblastic) 백혈병/림프종, 및 T-세포 급성 림프 모세포성 백혈병/림프종, 흉선종(thymoma), 성숙된 T 및 NK 세포 종양, 예를 들어 주변 T-세포 백혈병, 성체(adult) T-세포 백혈병/T-세포 림프종 및 거대 과립구 림프구성 백혈병(large granular lymphocytic leukemia), 랑게르한스 세포 혈구증(histocytosis), 골수 신생종(myeloid neoplasia), 예를 들어, 급성 골수 백혈병(acute myelogenous leukemia), 예를 들어, 화농증(maturation)을 동반하는 AML, 분화(differentiation)를 동반하지 않는 AML, 급성 전구 골수구성 백혈병(acute promyelocytic leukemia), 급성 골수 단구성 백혈병(acute myelomonocytic leukemia), 및 급성 단구성 백혈병(acute monocytic leukemia), 골수 이형성 증후군(myelodysplastic syndrome), 및 만성 골수 증식성 질환(clonic myeloproliferative disorder), 예를 들어, 만성 골수 백혈병, 중추 신경계(central nervous system)

에 있어서의 종양, 예를 들어, 뇌종양 (신경아교종, 신경모세포종, 성형 세포종(astrocytoma), 속질 모세포종 (medulloblastoma), 뇌실막 세포종(ependymoma), 및 망막 모세포종(retinoblastoma)), 고형 종양(비강 인두 암 (nasopharyngeal cancer), 기저 세포 카르시노마(basal cell carcinoma), 췌장암, 담관(bile duct) 암, 카포스 사르코마(Kapos's sarcoma), 고환 암, 자궁, 자궁 경부 또는 자궁 경관(cervical) 암, 난소암, 1차 간암 또는 자궁 내막 암, 및 혈관계의 암(안지오사르코마(angiosarcoma) 및 혈관 주위 세포종(hemangiopericytoma)), 골다공증(osteoporosis), 간염(hepatitis), HIV, AIDS, 척수 속질염(spondyloarthritis), 류머티스성 관절염 (rheumatoid arthritis), 염증성 장 질환(inflammatory bowel diseases; IBD), 패혈증(sepsis) 및 패혈성 쇼크(septic shock), 크론병(Crohn's disease), 건선(psoriasis), 쉐러아테르마 (schleraderma), 이식에 거부에 대한 숙주 질환 (graft versus host disease; GVHD), 동종 이형 섬 이식 거부반응(allogenic islet graft rejection), 혈액 악성 종양(hematologic malignancy), 예를 들어 다발성 골수종(MM), 골수 이형성 증후군 (MDS) 및 급성 골수 백혈병(AML), 종양 관련 염증, 주변 신경 손상(peripheral nerve injury) 또는 탈수초성 질환(demyelinating disease).

[0078] 일면에 있어서, 본 발명의 항체 또는 Fc 융합체는 부적합한 단백질 발현을 수반하는 질병을 가지는 환자에게 투여된다. 본 발명의 범위 내에서, 이는, 존재하는 단백질의 양에 있어서의 변화, 돌연변이체 단백질의 존재, 또는 이들 둘 모두에 기인하는 이상(aberrant) 단백질을 특징으로 하는 질병 및 질환을 포함하는 것을 의미한다. 이러한 과다는, 이들로 제한되지는 않으나, 분자적 수준에 있어서의 과다 발현, 작용 부위에 있어서의 연장된 또는 축적된 출현, 또는 정상 수준에 비하여 증가된 단백질 활성을 포함하는 임의의 원인에 기인할 수 있다. 이러한 정의 하에, 단백질 감소를 특징으로 하는 질병 및 질환이 포함된다. 그러한 단백질 감소는, 이들로 제한되지는 않으나, 분자적 수준에 있어서의 감소된 발현, 작용 부위에 있어서의 단축된 또는 감소된 출현, 단백질의 돌연변이 형태, 또는 정상 수준에 비하여 감소된 단백질 활성을 포함하는 임의의 원인에 기인할 수 있다. 그러한 단백질 과다 또는 감소는 정상 발현, 출현, 또는 단백질 활성을 기준으로 하여 측정될 수 있으며, 그러한 측정은 본 발명의 항체 및 Fc 융합체의 개발 및/또는 임상적 테스트에 있어 중요한 역할을 담당할 수 있다.

[0079] 일면에 있어서, 본 발명의 항체 또는 Fc 융합체는 환자에게 투여되는 단독의 치료학적 활성 제제이다. 대안적으로, 본 발명의 항체 또는 Fc 융합체는 하나 이상의 기타 치료제와 함께 투여되며, 그러한 제제로는, 이들로 제한되지는 않으나, 세포독성 제제, 화학치료제, 사이토카인, 성장 저해성 제제, 항-체액성 제제, 카이나아제 저해제, 항-안지오젠성 제제, 심장 보호제(cardioprotectant), 또는 기타 치료제들이 포함된다. 이러한 분자들은 의도하는 목적에 유효한 양으로 조합물 내에 안정되게 존재한다. 숙련된 의사(skilled medical practitioner)라면, 본원에 유용한 기타 치료제의 적합한 용량을 경험에 입각하여 결정할 수 있을 것이다. 본 발명의 항체 및 Fc 융합체는 1종 이상의 기타 치료학적 레지멘(regimen)과 동시에 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체 또는 Fc 융합체는 화학 요법, 방사선 요법(radiation therapy), 또는 화학 요법 및 방사선 요법과 병행하여, 환자에게 투여될 수 있다. 일면에 있어서, 본 발명의 항체 또는 Fc 융합체는, 본 발명의 Fc 변이체를 포함할 수도 있고 포함하지 않을 수도 있는, 1종 이상의 항체 또는 Fc 융합체와 함께 투여될 수 있다. 일면에 있어서, 본 발명의 항체 및 Fc 융합체는 화학치료제와 함께 투여될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "화학치료제(chemotherapeutic agent)"란, 암의 치료에 유용한 화학적 화합물을 의미한다. 화학치료제의 예는, 이들로 제한되지는 않으나, 다음을 포함한다: 알킬화 제제(alkylating agent), 예를 들어 티오테파(thiotepa) 및 사이클로스포스파미드(cyclophosphamide; CYTOXANTM); 알킬 술포네이트(alkyl sulfonates), 예를 들어 부술포판(busulfan), 임프로술포판(improsulfan) 및 파이포술포판(piposulfan); 아자이라이딘(aziridine), 예를 들어 벤조도파(benzodopa), 카르보큐온(carboquone), 메투레도파(meturedopa), 및 우레도파(uredopa); 에틸렌아민 및 메틸아멜라민(methylamelamine), 예를 들어 알트레타민(altretamine), 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드(triethylenephosphoramidate), 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸롤로멜라민(trimethylolomelamine); 나이트로젠 머스타드(nitrogen mustard), 예를 들어, 클로르암부실(chlorambucil), 클로르나파진(chloronaphazine), 콜로포스파미드(cholophosphamide), 에스트라무스틴(estramustine), 이포스파미드(ifosfamide), 메클로르에타민(mechlorethamine), 메클로르에타민 옥사이드 하이드로클로라이드(mechlorethamine oxide hydrochloride), 멜팔란(melphalan), 노브엠비친(novembichin), 펜에스테린(phenesterine), 프레드니무스틴(prednimustine), 트로포스파미드(trofosfamide), 우라실 머스타드(uracil mustard); 나이트로수레아스(nitrosureas), 예를 들어 카르무스틴(carmustine), 클로로조토신(chlorozotocin), 포테무스틴(fotemustine), 로무스틴(lomustine), 니무스틴(nimustine), 라니무스틴(ranimustine); 항생제(antibiotics), 예를 들어 아클라사이노마이신(aclacinomycin), 아크타이노마이신(actinomycin), 오프라마이신(authramycin), 아자세린, 블레오마이신(bleomycin), 카크타이노마이신(cactinomycin), 칼리케아마이신(calicheamicin), 카라바이신(carabycin), 카마이노마이신(caminomycin), 카르자이노필린(carzinophilin), 크

로모마이신(chromomycin), 타크타이노마이신(dactinomycin), 다우노루바이신(daunorubicin), 테토루바이신(detorubicin), 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루바이신(doxorubicin), 에피루바이신(epirubicin), 에소루바이신(esorubicin), 아이다루바이신(idarubicin), 마르셀로마이신(marcellomycin), 마이토마이신(mitomycin), 마이코페놀산(mycophenolic acid), 노갈라마이신(nogalamycin), 올라이보마이신(olivomycin), 페플로마이신(peplomycin), 포트파이로마이신(potfiromycin), 퓨로마이신(puromycin), 큐엘라마이신(quelamycin), 로도루바이신(rodorubicin), 스트렙토나이그린(streptonigrin), 스트렙토조신(streptozocin), 투베르사이드(tubercidin), 우베나이멕스(ubenimex), 자이노스타틴(zinostatin), 조루바이신(zorubicin); 항-대사산물(anti-metabolite), 예를 들어 메토틱세이트(methotrexate) 및 5-플루오로우라실(5-fluorouracil; 5-FU); 폴산(folic acid) 유사체, 예를 들어 데노프테린(denopterin), 메토틱세이트(methotrexate), 프테로프테린(pteropterin), 트리메트렉세이트(trimetrexate); 퓨린(purine) 유사체, 예를 들어 플루다라빈(fludarabine), 6-메르캅토피리딘(6-mercaptopyrimidine), 티아미프린(thiamiprine), 티오구아닌(thioguanine); 피리미딘(pyrimidine) 유사체, 예를 들어 안사이타빈(ancitabine), 아자사이타딘(azacitidine), 6-아자우라딘(6-azauridine), 카르모푸르(carmofur), 사이타라빈(cytarabine), 디데옥시우리딘(dideoxyuridine), 독시플루리딘(doxifluridine), 에노사이타빈(enocitabine), 플록스우리딘(floxuridine), 5-FU; 및 로젠즈(rogens), 예를 들어 아스칼루스테론(ascalusterone), 드로모스타놀론 프로피오네이트(dromostanolone propionate), 에피티오스타놀(epitiostanol), 메피티오스탄(mepitiostane), 테스트락톤(testolactone); 항-아드레날(anti-adrenals), 예를 들어 아미노글루테티미드(aminoglutethimide), 마이토탄(mitotane), 트리로스탄(trilostane); 폴산 보충제(folic acid replenisher), 예를 들어 프롤린산(frolinic acid); 아세그라톤(aceglatone); 알도포스파미드 글라코사이드(aldophosphamide glycoside); 아미노레블린산(aminolevulinic acid); 암사크린(amsacrine); 베스트라부실(bestrabucil); 비스안트렌(bisantrene); 에타트락세이트(edatraxate); 데포파민(defofamine); 데메콜신(demecolcine); 디아자이퀴온(diaziquone); 엘포르마이틴(elformithine); 엘립티늄 아세테이트(elliptinium acetate); 에토글루사이드(etoglucid); 갈륨 나이트레이트(gallium nitrate); 하이드록시우레아; 렌타이난(lentinan); 로나이다민(lonidamine); 마이토구아존(mitoguanzone); 마이톡산트론(mitoxantrone); 모피이다몰(mopidamol); 나이트라크린(nitracrine); 펜토스타틴(pentostatin); 페나메트(phenamet); 파이루루바이신(pirarubicin); 포도과일린산(podophyllinic acid); 2-에틸하이드라자이드; 프로카르바진(procarbazine); PSK^(R); 라족산(razoxane); 사이조퓨란(sizofuran); 스피로게르마늄(spirogermanium); 테누아존산(tenuazonic acid); 트리아자이퀴온(triaziquone); 2,2',2"-트라클로로트리에틸아민; 우레탄(urethan); 바인데신(vindesine); 다카르바진(dacarbazine); 만노무스틴(mannomustine); 마이토브로나이트롤(mitobronitol); 마이토락톨(mitolactol); 피포브로만(pipobroman); 가사이토신(gacytosine); 아라비노사이드(arabinoside) ("Ara-C"); 사이클로포스파이드(cyclophosphamide); 티오테파; 탁산(taxane), 예를 들어 파클리탁셀(paclitaxel)(TAXOL^(R), Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) 및 도세탁셀(docetaxel)(TAXOTERE^(R), Rhne-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로르암부실(chlorambucil); 겐시타빈(gemcitabine); 6-티오구아닌; 메르캅토피리딘(mercaptopyrimidine); 메토틱세이트; 플라티늄 유사체, 예를 들어 시스플라틴(cisplatin) 및 카르보플라틴(carboplatin); 빈블라스틴(vinblastine); 플라티늄; 에토포사이드(etoposide)(VP-16); 이포스파미드(ifosfamide); 마이토마이신 C; 마이톡산트론(mitoxantrone); 빈트라이스틴(vincristine); 비노렐빈(vinorelbine); 나벨빈(navelbine); 노반트론(novantrone); 테나이포사이드(teniposide); 다우노마이신(daunomycin); 아미노프테린(aminopterin); 젤로다(xeloda); 이반드론레이트(ibandronate); CPT-11; 토포아이소머라아제(topoisomerase) 저해제 RFS 2000; 디플루오르메틸오르니틴(difluoromethylornithine ;DMFO); 레티산(retinoic acid); 에스페라마이신(esperamicin); 카페시타빈(capecitabine); 타이미딜레이트 신테아제 저해제(thymidylate synthase inhibitor)(예를 들어, Tomudex); 콕스-2 저해제(cox-2 inhibitor), 예를 들어 셀라이콕사이드(celicoxib)(CELEBREX^(R)) 또는 MK-0966(VIOXX^(R)); 및 약학적으로 허용 가능한 이들의 염, 산, 또는 유도체. 또한 이러한 정의 하에, 중앙에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 저해하는 작용을 하는 항-호르몬성 제제, 예를 들어 항-에스트로겐(anti-estrogen), 예를 들어 탐옥시펜(tamoxifen), 랄록시펜(raloxifene), 아로마타아제 저해 4(5)-이미다졸(aromatase inhibiting 4(5)-imidazole), 4-하이드록시탐옥시펜, 트리옥시펜(trioxifene), 케옥시펜(keoxifene), LY 117018, 오나프리스톤(onapristone), 및 토레미펜(toremifene)(Fareston); 및 항-안드로젠(anti-androgen), 예를 들어 플루타마이드(flutamide), 나일루타마이드(nilutamide), 바이칼루타마이드(bicalutamide), 류프롤라이드(leuprolide), 및 고세렐린(goserelin); 및 약학적으로 허용 가능한 이들의 염, 산, 또는 유도체가 포함된다.

[0080] 화학치료학적 또는 기타 세포독성 제제가 프로드러그로서 투여될 수 있다. "프로드러그(prodrug)"란, 본원에

사용된 바와 같이, 모체 약물에 비하여 종양 세포에 대한 세포독성이 작은 약학적 활성 물질 및 보다 활성이 큰 모체 형태로 효소적으로 활성화되거나 전환될 수 있는, 전구체 또는 유도체 형태를 의미한다. 이에 대해서는 예를 들어 다음 문헌을 참조한다: Wilman, 1986, Biochemical Society Transactions, 615th Meeting Belfast, 14: 375-382; and Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt *et al.*, (ed.): 247-267, Humana Press, 1985. 본 발명에 사용될 수 있는 프로드러그는, 이들로 제한되지는 않으나, 보다 큰 활성의 세포독성이 없는 약물로 전환될 수 있는, 포스페이트-함유 프로드러그, 티오포스페이트-함유 프로드러그, 설페이트-함유 프로드러그, 펩타이드-함유 프로드러그, D-아미노산-변형된 프로드러그, 글라이코실화된 프로드러그, 베타-락탐-함유 프로드러그, 선택적으로 치환된 펜옥시아세트아미드-함유 프로드러그 또는 선택적으로 치환된 페닐아세트아미드-함유 프로드러그, 5-플루오로사이토신(5-fluorocytosine) 및 기타 5-플루오로우리딘(5-fluorouridine) 프로드러그를 포함한다. 본 발명의 항체 또는 Fc 융합체와 함께 사용될 수 있는 프로드러그 형태로 유도체화될 수 있는 세포독성 약물의 예로는, 이들로 제한되지는 않으나, 이상에 개시한 임의의 화학치료제들이 포함된다.

[0081] 본 발명의 항체 및 Fc 융합체는 기타 치료학적 레지멘과 함께 조합될 수 있다. 예를 들어, 일면에 있어서, 본 발명의 항체 또는 Fc 융합체를 이용해 치료될 환자에게는 또한 방사선 요법을 수여할 수 있다. 방사선 요법은 당업자에게 알려져 있고, 당 기술 분야에서 통상적으로 활용되는 프로토콜에 따라 투여될 수 있다. 그러한 방사선 요법은, 이들로 제한되지는 않으나, 세슘(cesium), 이리듐(iridium), 요오드(iodine), 또는 코발트 방사선 요법을 포함한다. 상기 방사선 요법은 전신 조사(irradiation)에 의하여 실시될 수도 있고, 폐, 방광, 또는 전립선과 같은 신체 내부의 또는 상의 특정 부위 또는 조직에 국부적으로 적용될 수도 있다. 통상적으로, 방사선 요법은 약 1주 내지 2주의 기간에 걸쳐 간헐적으로 투여될 수 있다. 그러나, 상기 방사선 요법은, 이보다 장기간에 걸쳐 투여될 수 있다. 예를 들어, 방사선 요법은 약 6주 약 7주 동안 두부 또는 목부 암을 가지는 환자에게 투여될 수 있다. 선택적으로, 상기 방사선 요법은, 단일 용량(single dose) 또는 다수회 용량(multiple doses), 또는 순차적인 용량(sequential doses)으로서 투여될 수 있다. 숙련된 의사는 본원에 유용한 방사선 요법의 적합한 용량을 경험에 입각하여 결정할 수 있을 것이다. 본 발명의 또 다른 일면에 따르면, 본 발명의 항체 또는 Fc 융합체 및 1종 이상의 기타 항암 요법이 체외(ex vivo) 암 세포를 치료하는 데 이용된다. 그러한 체외 치료는 골수 이식(bone marrow transplantation) 및 특히 자가조직(autologous) 골수 이식에 유용할 수 있을 것으로 여겨진다. 예를 들어, 이상에서 설명한 바와 같은, 항체 또는 Fc 융합체 및 1종 이상의 기타 항암 요법을 이용해 암 세포를 가지는 세포 또는 조직(들)의 치료는, 수령 환자 내에 이식하기 이전에 암 세포를 고갈시키거나 또는 실질적으로 고갈시키는 데에 사용될 수 있다. 물론, 본 발명의 항체 및 Fc 융합체는 외과적 수술과 같은 또 다른 치료학적 기법과 조합하여 이용될 수 있을 것으로 여겨진다.

[0082] 대안적인 일면에 있어서, 본 발명의 항체 및 Fc 융합체는 사이토카인과 함께 투여된다. "사이토카인(cytokine)"이란, 본원에 사용된 바와 같이, 세포내 매개인자로서 또 다른 하나의 세포에 대하여 작용하는 하나의 세포군에 의하여 방출되는 단백질에 대한 일반적인 용어이다. 그러한 사이토카인의 예로는, 림포카인(lymphokine), 모노카인(monokine), 및 통상적인 폴리펩타이드 호르몬이 있다. 그러한 사이토카인으로는 다음과 같은 것들이 있다: 성장 호르몬, 예를 들어 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬, 및 소의 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone); 타이록신(thyroxine); 인슐린(insulin); 프로인슐린(proinsulin); 렐락신(relaxin); 프로렐락신(prorelaxin); 당단백질 호르몬, 예를 들어 여포 자극 호르몬(follicle stimulating hormone; FSH), 갑상선 자극 호르몬(thyroid stimulating hormone; TSH), 및 황체 형성 호르몬(luteinizing hormone; LH); 간장 성장 인자(hepatic growth factor); 섬유아세포(fibroblast) 성장 인자; 프로락틴(prolactin); 플라센타 락토젠(placenta lactogen); 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor)-알파 및-베타; 뮐러라인-저해 물질(mullerian-inhibiting substance); 마우스 생식선 자극 호르몬(gonadotropin)-관련 펩타이드; 인히빈(inhibin); 액티빈(activin); 혈관 내피 성장인자(vascular endothelial growth factor); 인테그린; 트롬보포이에틴(thrombopoietin; TPO); 신경 성장 인자, 예를 들어 NGF-베타; 혈소판-성장 인자; 형질전환(transforming growth factor; TGF), 예를 들어 TGF-알파 및 TGF-베타; 인슐린형 성장인자 I 및 II; 에리트로포이에틴(erythropoietin; EPO); 골 유도 인자(osteoinductive factor); 인터페론, 예를 들어 인터페론-알파, 인터페론-베타, 및 인터페론-감마; 콜로니 자극 인자(colony stimulating factor; CSF), 예를 들어 대식 세포-CSF (M-CSF); 과립구(granulocyte)-대식 세포-CSF (GM-CSF); 및 과립구-CSF (G-CSF); 인터류킨(IL), 예를 들어 IL-1, IL-1알파, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, 종양 괴사 인자, 예를 들어 TNF-알파 또는 TNF-베타; 및 LIF 및 키트 리간드(kit ligand; KL)를 포함하는 기타 폴리펩타이드 인자. 본원에 사용된 바와 같이, 사이토카인이란 용어는, 상기 천연 서열 사이토카인의 생물학적 활성 증가제 및 천연 공급원 또는 재조합 세포 배양물 유래의 단백질을 포함한다.

[0083] 다양한 기타 치료제가 본 발명의 항체 및 Fc 융합체와 함께 사용될 수 있다. 일면에 있어서, 상기 항체 또는 Fc 융합체는 항-안지오젠성 제제와 함께 투여된다. "항-안지오젠성 제제(anti-angiogenic agent)"란, 본원에 사용된 바와 같이, 혈관(blood vessel)의 발생을 어느 정도 블로킹 또는 방해하는 화합물을 의미한다. 상기 항-안지오젠성 인자는, 예를 들어, 혈관형성(angiogenesis)을 촉진하는 데 관여하는 성장 인자 또는 성장 인자 수용체에 결합하는 작은 분자 또는 단백질, 예를 들어 항체, Fc 융합체, 또는 사이토카인일 수 있다. 본원에 있어서, 바람직한 항-안지오젠성 인자는 혈관 내피 성장 인자(Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF)에 결합하는 항체이다. 대안적인 일면에 있어서, 상기 항체 또는 Fc 융합체는 적응성 면역 반응을 유도하거나 증진시키는 치료제, 예를 들어 CTLA-4를 표적화하는 항체와 함께 투여된다. 대안적인 일면에 있어서, 상기 항체 또는 Fc 융합체는 타이로신 카이나아제 저해제와 함께 투여된다. "타이로신 카이나아제 저해제(tyrosine kinase inhibitor)"란, 본원에 사용된 바와 같이, 타이로신 카이나아제의 타이로신 카이나아제 활성을 어느 수준으로 저해하는 분자를 의미한다. 그러한 타이로신 카이나아제 저해제의 예로는, 이들로 제한되지는 않으나, 다음과 같은 것들이 포함된다: 퀴나졸린(quinazoline), 예를 들어 PD 153035, 4-(3-클로로아닐리노)퀴나졸린; 피리도피리미딘(pyridopyrimidine); 피리미도피리미딘(pyrimidopyrimidine); 피롤로피리미딘(pyrralopyrimidine), 예를 들어 CGP 59326, CGP 60261 및 CGP 62706; 피라졸로피리미딘(pyrazolopyrimidine), 4-(페닐아미노)-7H-피롤로(2,3-d)피리미딘; 쿠르쿠민(curcumin) (디페룰로일 메탄(diferuloyl methane), 4,5-비스(4-플루오로아닐리노)프탈이미드); 나이트로티오펜 모이어티(nitrothiophene moiety)를 함유하는 타이르포호스틴(tyrphostine); PD-0183805 (Warner-Lambert); 안티센스(antisense) 분자 (예를 들어, ErbB-코딩 핵산에 결합하는 것들); 퀴녹살린(quinoxaline) (US 5,804,396); 트립호스틴(trypostin) (US 5,804,396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering A G); pan-ErbB 저해제, 예를 들어 C1-1033 (Pfizer); 아피니탁(Affinitac) (ISIS 3521; Isis/Lilly); 임마티닙 메실레이트(Imatinib mesylate) (STI571, Gleevec^(R); Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016(Glaxo Smith Kline); C1-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); 세막시닙(Semaxinib) (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering A G); INC-1C11 (Imclone); 또는 하기의 공보 중 하나에 개시된 것들: US 5,804,396; PCT WO 99/09016 (American Cyanimid); PCT WO 98/43960 (American Cyanamid); PCT WO 97/38983 (Warner-Lambert); PCT WO 99/06378 (Warner-Lambert); PCT WO 99/06396 (Warner-Lambert); PCT WO 96/30347 (Pfizer, Inc); PCT WO 96/33978 (AstraZeneca); PCT W096/3397 (AstraZeneca); PCT WO 96/33980 (AstraZeneca), 제피티닙(gefitinib) (TRESSATM, ZD1839, AstraZeneca), 및 OSI-774(TarcevaTM, OSI Pharmaceuticals/Genentech).

[0084] 대안적인 일면에 있어서, 본 발명의 항체 또는 Fc 융합체는 또 다른 하나의 치료학적 화합물에 접합되거나 유효하게 결합된다. 상기 치료학적 화합물은 세포독성 제제, 화학치료제, 독소, 방사성 동위원소(radioisotope), 사이토카인, 또는 기타 치료학적으로 활성인 제제일 수 있다. 항체 또는 Fc 융합체 및 세포독성 제제의 접합체(conjugate)는, 다양한 이중 작용성 단백질 커플링 제제(bifunctional protein coupling agent), 예를 들어 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올)프로피오네이트(SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카르복실레이트, 이미노티올란(iminothiolane; IT), 이미도에스테르의 이중 작용성 유도체 (예를 들어, 디메틸 아디프 이미데이트 HCL), 활성 에스테르 (예를 들어, 디숙신이미딜 수베레이트(disuccinimidyl suberate)), 알데하이드 (예를 들어, 글루타르알데하이드(glutarealdehyde)), 비스-아자이드 화합물 (예를 들어, 비스(p-아자이드벤조일)핵산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어, 비스(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어, 툴리엔 2,6-다이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예를 들어, 1,5-디플루오로-2,4-디나이트로벤젠)을 이용하여 만들 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소(ricin immunotoxin)는, Vitetta *et al.*, 1971, *Science* 238: 1098에 설명된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민 펜타아세트산(MX-DTPA)은 항체에 대한 방사능 뉴클레오타이드(radionucleotide)의 접합을 위한 예시적인 킬레이팅화 제제(chelating)이다. 이에 대해서는 PCT WO 94/11026을 참조한다. 링커(linker)는 세포 내에서 세포독성 약물의 방출을 촉진하는 절단 가능한 링커일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정성(acid-labile) 링커, 펩티다아제(peptidase)-감수성(sensitive) 링커, 디메틸 링커 또는 다이설파이드-함유 링커 (Chari *et al.*, 1992, *Cancer Research* 52: 127-131)가 사용될 수 있다. 대안적으로, 상기 항체 또는 Fc 융합체는 예를 들어 제조법 기법 또는 펩타이드 합성에 의하여 치료제에 유효하게 결합된다.

[0085] 본 발명의 항체 및 Fc 융합체에 대한 접합에 유용할 수 있는 화학치료제는 이상에서 제시하였다. 대안적인 일면에 있어서, 상기 항체 또는 Fc 융합체는, 이들로 제한되지는 않으나, 그의 단편 및/또는 변이체를 포함하는, 박테리아, 진균류, 식물 또는 동물 기원의 작은 분자 독소 및 효소적으로 활성인 독소를 포함하는 독소에 접합되거나 유효하게 결합된다. 작은 분자 독소는, 이들로 제한되지는 않으나, 칼리케마이신(calicheamicin), 메이

탄신(maytansine) (US 5,208,020), 트리코텐(trichothene), 및 CC1065를 포함한다. 본 발명의 일면에 있어서, 상기 항체 또는 Fc 융합체는 하나 이상의 메이탄신 분자 (예를 들어, 약 1개 약 10개 메이탄신 분자/항체 분자)에 접합된다. 메이탄신은, 예를 들어 May-SH3으로 환원되거나, 변형된 항체 또는 Fc 융합체와 반응할 수 있는 May-SS-Me로 전환되어 (Chari *et al.*, 1992, *Cancer Research* 52: 127-131), 메이탄시노이드-항체 또는 메이탄시노이드-Fc 융합체 접합체를 생성할 수 있다. 또 다른 하나의 관심 접합체는, 하나 이상의 칼리케마이신 분자에 접합된 항체 또는 Fc 융합체를 포함한다. 상기 칼리케마이신 부류의 항생제는 피코몰(picomolar) 이하의 농도에서 2중 가닥 DNA의 파괴를 야기할 수 있다. 사용 가능한 칼리케마이신의 구조적 유사체는, 이들로 제한되지는 않으나, γ_1^1 , α_2^1 , α_3 , N-아세틸- γ_1^1 , PSAG, 및 Θ_1^1 을 포함한다 (Hinman *et al.*, 1993, *Cancer Research* 53: 3336-3342; Lode *et al.*, 1998, *Cancer Research* 58: 2925-2928) (US 5,714,586; US 5,712,374; US 5,264,586; US 5,773,001). 돌라스타틴(dolastatin) 10 유사체, 예를 들어 아우리스타틴(auristatin) E(AE) 및 모노메틸아우리스타틴(monomethylauristatin E; MMAE)이 본 발명의 Fc 변이체에 대한 접합체로서 사용될 수 있다 (Doronina *et al.*, 2003, *Nat Biotechnol* 21 (7): 778-84; Francisco *et al.*, 2003 *Blood* 102 (4): 1458-65). 유용한 효소적 활성 독소는, 이들로 제한되지는 않으나, 디프테리아(diphtheria) A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 엑소톡시(exotoxin) A 사슬 (*Pseudomonas aeruginosa* 유래), 리신 A 사슬, 아브린(abrin) A 사슬, 모덱신(modeccin) A 사슬, 알파-사르신(sarcin), 알류라이트 포르디 단백질(Aleurites fordii protein), 디안틴(dianthin) 단백질, 파이톨라카 아메리카나 단백질(Phytolaca americana protein) (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모로디카 차란티아(momordica charantia) 저해제, 쿠르신(curcin), 크로틴(crotin), 사파오나리아 오피시날리스(sapaonarria officinalis) 저해제, 젤로닌(gelonin), 마이토젤린(mitogellin), 레스 트릭토신(restrictocin), 페노마이신(phenomycin), 에노마이신(enomycin), 및 트리코테센(tricothecene)을 포함한다. 이에 대해서는, 예를 들어, PCT WO 93/21232를 참조한다. 본 발명은, 본 발명의 항체 또는 Fc 융합체, 및 뉴클레오타이드 분해 활성(nucleolytic activity)을 가지는 화합물, 예를 들어 리보뉴클레아제(ribonuclease) 또는 DNA 엔도뉴클레아제(endonuclease), 예를 들어 데옥시리보뉴클레아제(deoxyribonuclease; DNase) 사이에 형성된 접합체 또는 융합체를 추가로 포함한다.

[0086] 대안적인 일면에 있어서, 본 발명의 항체 또는 Fc 융합체는, 방사성 접합체를 형성하는 방사성 동위원소에 접합되거나 유효하게 결합될 수 있다. 다양한 방사능 활성(radioactive) 동위원소가, 방사성 접합체 항체 및 Fc 융합체의 제조에 이용 가능하다. 그러한 방사능 활성 동위원소의 예로는, 이들로 제한되지는 않으나, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , 및 Lu의 방사능 활성 동위원소가 포함된다.

[0087] 또 다른 일면에 있어서, 본 발명의 항체 또는 Fc 융합체는, 종양의 사전-표적화에 이용하기 위하여, "수용체(receptor)" (예를 들어, 스트렙트아비딘(streptavidin))에 접합될 수 있으며, 이때, 항체-수용체 또는 Fc 융합체-수용체 접합체를 환자에게 투여한 후, 제거용 제제(clearing agent)를 이용하여 결합되지 않은 접합체를 순환계로부터 제거한 뒤, 세포독성 제제(예를 들어, 방사성 뉴클레오타이드)에 접합된 "리간드"(예를 들어, 아비딘)를 투여한다. 대안적인 일면에 있어서, 상기 항체 또는 Fc 융합체는, 항체 의존성 효소-매개의 프로드러그 요법(Antibody Dependent Enzyme Mediated Prodrug Therapy; ADEPT)을 이용하기 위하여 효소에 접합되거나 유효하게 결합된다. ADEPT는 상기 항체 또는 Fc 융합체는, 프로드러그를 전환시키는 프로드러그-활성화 효소(예를 들어, 펩티딜 화학치료제, 참조: PCT WO 81/01145)에 접합시키거나 유효하게 결합시킴으로서 사용될 수 있다. 이에 대해서는, 예를 들어, PCT WO88/07378 및 US 4,975,278을 참조한다. ADEPT에 유용한 면역접합체의 효소 성분은, 활성, 세포독성이 보다 큰 형태로 전환시키는 방식으로 프로드러그에 대하여 작용할 수 있는 임의의 효소를 포함한다. 본 발명의 방법에 유용한 효소는, 이들로 제한되지는 않으나, 다음과 같은 것들을 포함한다: 알칼리성 포스파타아제: 포스페이트-함유 프로드러그를 유리된 약물로 전환시키는 데 유용함; 아릴설페이타아제(arylsulfatase): 설페이트-함유 프로드러그를 유리된 약물로 전환시키는 데 유용함; 사이토신 데아미나아제(cytosine deaminase): 비독성 5-플루오로사이토신(flurouracil)을 항암 약물인 5-플루오로우라실(flurouracil)로 전환시키는 데 유용함; 프로테아제, 예를 들어 세라티아 프로테아제(serratia protease), 테르몰라이신(thermolysin), 서브틸리신(subtilisin), 카르복시펩티다아제, 및 카텡신(cathepsin) (예를 들어, 카텡신 B 및 L): 펩티드-함유 프로드러그를 유리된 약물로 전환시키는 데 유용함; D-알라닐카르복시펩티다아제: D-아미노산 치환체를 함유하는 프로드러그를 전환시키는 데 유용함; 탄수화물-절단 효소, 예를 들어 베타-갈락토시다아제(beta-galactosidase) 및 뉴라미미다아제(neuramidase): 글라이코실화 프로드러그를 유리된 약물로 전환시키는 데 유용함; 베타-락탐아아제: 알파-락탐으로써 유도체화된 약물을 유리된 약물로 전환시키는 데 유용함; 및 페니실린 아미다아제(penicillin amidase), 예를 들어 페니실린 V 아미다아제 또는 페니실린 G 아미다아제: 각각 펜옥시아세틸기 또는 페닐아세틸기로써 그들의 아민 나이트로겐에 대하여 유도체화된 약물을

유리된 약물로 전환시키는 데 유용함. 대안적으로, 당 기술 분야에 "압자임(abzyme)"이라고도 알려진 효소적 활성을 가지는 항체 또한, 본 발명의 프로드러그를 유리된 활성 약물로 전환시키는 데에 사용될 수 있다 (참조: Massey, 1987, *Nature* 328: 457-458). 항체-압자임 및 Fc 융합체-압자임 접합체는 종양 세포군으로 상기 압자임을 전달하기 위하여 제조될 수 있다. 본 발명의 항체 및 Fc 융합체의 기타 변형된 형태도 본원에 포함된다. 예를 들어, 상기 항체 또는 Fc 융합체는, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 또는 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리프로필렌 글리콜의 코폴리머와 같은, 다양한 비단백질성 폴리머 중 하나에 결합될 수 있다.

[0088]

본 발명의 항체 또는 Fc 융합체 및 1종 이상의 치료학적 활성 제제가 제형화된 약학적 조성물도 본 발명에 포함된다. 본 발명의 항체 및 Fc 융합체의 포물레이션(Formulation)은, 동결 건조된 포물레이션 또는 수용액의 형태로, 원하는 순도를 가지는 항체 또는 Fc 융합체를 선택적인 약학적으로 허용 가능한 캐리어, 부형제(excipient) 또는 안정화제(stabilizer)와 혼합함으로써 보관용으로 제조된다 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed., 1980). 허용 가능한 캐리어, 부형제, 또는 안정화제는, 사용되는 용량 및 농도에서 수령체에 대하여 비독성인 것으로서, 다음과 같은 것들을 포함한다: 버퍼, 예를 들어 포스페이트, 시트레이트, 아세테이트, 및 기타 유기산; 항산화제(antioxidant), 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 방부제(preservative) (예를 들어, 아스코타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드(asoctadecyldimethylbenzyl ammonium chloride); 헥사메티오늄 클로라이드(hexamethonium chloride); 벤잘코늄 클로라이드(benzalkonium chloride), 벤제티오늄 클로라이드(benzethonium chloride); 페놀, 부틸 오르벤질 알코올 (butyl orbenzyl alcohol); 알킬 파라벤, 예를 들어 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜(catechol); 레조르시놀(resorcinol); 사이클로헥산올(cyclohexanol); 3-펜탄올(pentanol); 및 m-크로솔(cresol); 저분자량(약 10개 잔기 미만) 폴리펩타이드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 폴리머(hydrophilic polymer), 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글라이신(glycine), 글루타민(glutamin), 아스파라긴(asparagine), 히스티딘(histidine), 아르기닌(arginine), 또는 라이신(lysine); 당당류(monosaccharide), 이당류(disaccharide), 및 만노오스, 또는 텍스트린을 포함하는 기타 탄수화물; 킬레이팅화 제제, 예를 들어 EDTA; 당(sugar), 예를 들어 수크로오스(sucrose), 만니톨(mannitol), 트레할로오스(trehalose) 또는 소르비톨(sorbitol); 감미제(sweetener) 및 기타 향미제(flavoring agent); 충전제(filler), 예를 들어 미세결정질 셀룰로오스(microcrystalline cellulose), 락토오스, 옥수수 전분 및 기타 전분; 결합 제제; 첨가제; 착색제(coloring agent); 염-형성 반대이온(salt-forming counterion), 예를 들어 소듐; 금속 착물 (예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 비이온성 계면활성제(non-ionic surfactant), 예를 들어 TWEEN, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG). 바람직한 일면에 있어서, 본 발명의 항체 또는 Fc 융합체를 포함하는 약학적 조성물은 수용성 형태로서, 약학적으로 허용 가능한 염으로서 존재하며, 이는 산 및 염기 부가 염 모두를 포함하는 것을 의미한다. "약학적으로 허용 가능한 산 부가 염(pharmaceutically acceptable acid addition salt)"이란, 유리된 염기의 생물학적 유효성을 유지하며, 생물학적으로나 기타 측면에서 바람직한 염을 일컬으며, 이들은 염산, 황산, 질산, 인산 등과 같은 무기산, 및 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 피루브산, 옥살산, 말레산, 말론산, 숙신산, 푸마르산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 신남산, 만델산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 살리실산 등과 같은 유기산과 함께 형성된다. "약학적으로 허용 가능한 염기 부가 염(pharmaceutically acceptable base addition salt)"은, 소듐, 포타슘, 리튬, 암모늄, 칼슘, 마그네슘, 철, 아연, 구리, 망간, 알루미늄 염 등과 같은 무기 염기로부터 유도되는 것들을 포함한다. 특히 바람직한 것은 암모늄, 포타슘, 소듐, 칼슘, 및 마그네슘 염이다. 약학적으로 허용 가능한 비-독성 유기 염기로부터 유래되는 염은, 1차, 2차, 및 3차 아민, 천연 발생의 치환된 아민을 포함하는 치환된 아민, 환형 아민, 및 염기성 이온 교환 수지, 예를 들어 이소프로필아민, 트리메틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 트리프로필아민, 및 에탄올아민의 염을 포함한다. 생체내 투여에 사용되는 포물레이션(formulation)은 살균되는 것이 바람직하다. 이는 살균 여과 막 또는 기타 방법을 통한 여과에 의하여 용이하게 수행될 수 있다.

[0089]

본원에 개시된 항체 및 Fc 융합체는 면역리포솜(immunoliposome)으로서 제형화될 수 있다. 리포솜은 포유류에 대한 치료제의 전달에 유용한 다양한 유형의 지질, 인지질, 및/또는 계면활성제를 포함하는 작은 소포(vesicle)이다. 상기 항체 또는 Fc 융합체를 함유하는 리포솜은, Epstein *et al.*, 1985, *Proc Natl Acad Sci USA*, 82:3688; Hwang *et al.*, 1980, *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:4030; US 4,485,045; US 4,544,545; 및 PCT WO 97/38731에 개시된 것들과 같은 당 기술 분야에 공지된 방법에 의해 제조된다. 증진된 순환 시간(circulation time)을 가지는 리포솜은 US 5,013,556에 개시되어 있다. 리포솜의 성분은 일반적으로 생물학적 막의 지질 배열에 유사한 이중층 형태로 배열된다. 특히 유용한 리포솜은, 포스파티딜콜린, 콜레스테롤, 및 PEG-유도체화된 포스파티딜에탄올아민(PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 이용해 역상 증발(reverse phase evaporation) 방법을

통해 제조할 수 있다. 리포솜은, 원하는 직경을 가지는 리포솜을 수득하기 위하여, 소정의 구경의 필터를 통해 압출된다. 화학치료제 또는 기타 치료학적 활성 제제가 선택적으로 리포솜 내에 함유된다 (Gabizon *et al.*, 1989, *J National Cancer Inst* 81:1484).

[0090] 항체, Fc 융합체, 및 기타 치료학적 활성 제제는 또한, 이들로 제한되지는 않으나, 코아세르베이션 기법 (coacervation technique), 계면 중합(interfacial polymerization) (예를 들어, 하이드록시메틸셀룰로오스 또는 젤라틴-마이크로캡슐(gelatin-microcapsule), 또는 폴리-(메틸메타크릴레이트)마이크로캡슐 이용), 콜로이드 약물 전달 시스템(colloidal drug delivery system) (예를 들어, 리포솜(liposome), 알부민 마이크로스피어(albumin microspheres), 마이크로에멀전(microemulsion), 나노 입자(nano-particle) 및 나노 캡슐(nanocapsules), 및 매크로에멀전(macroemulsion)을 포함하는 방법에 의하여, 마이크로캡슐 내에 포획(entrapped)될 수 있다. 그러한 기법들은 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed., 1980에 개시되어 있다. 지속-방출형 제제(sustained-release preparation)가 제조될 수 있다. 지속-방출형 제제의 적합한 예는, 성형된 입자(shaped article), 예를 들어 필름(film), 또는 마이크로캡슐 형태의 고형 소수성(hydrophobic) 폴리머의 반투과성 매트릭스(semipermeable matrix)를 포함한다. 지속-방출형 매트릭스의 예로는, 다음과 같은 것들이 포함된다: 폴리에스테르, 하이드로겔(hydrogel) (예를 들어, 폴리(2-하이드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리(비닐알코올)), 폴리락타이드(poly lactide) (US 3,773,919), L-글루타르산 및 감마 에틸-L-글루타메이트의 코폴리머, 비분해성(non-degradable) 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성(degradable) 락트산-글리콜산 코폴리머, 예를 들어 LUPRON DEPOT™ (락트산-글리콜 코폴리머 및 류프롤라이드 아세테이트로 구성되는 주사 가능한 마이크로스피어), 폴리-D-(-)-3-하이드록시부티르산, 및 폴리-DL-락타이드-코-글리콜라이드(PLG)의 매트릭스 내로 혼입된 원하는 생활성 분자로 구성되는 마이크로스피어계 전달 시스템인 ProLease^(R) (Alkermes로부터 상업적으로 입수 가능함).

[0091] 상기 포물레이션 내에서, 치료학적으로 활성인 본 발명의 항체 또는 Fc 융합체의 농도는 약 0.1 중량% 내지 100 중량%의 범위에서 가변적일 수 있다. 바람직한 일면에 있어서, 상기 항체 또는 Fc 융합체의 농도는 0.003몰 내지 1.0몰 범위 내이다. 환자를 치료하기 위하여, 본 발명의 항체 또는 Fc 융합체의 치료학적 유효 용량이 투여될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "치료학적 유효 용량(therapeutically effective dose)"이란, 투여되어 효과를 일으키는 용량을 의미한다. 정확한 용량은 치료 목적에 따라 결정될 것이며, 당업자는 공지된 방법을 이용하여 그 용량을 결정할 수 있을 것이다. 투여량(dosage)은 단위 체중(kg)에 대하여 0.01 내지 100 mg/kg 이상, 예를 들어 0.1, 1, 10, 또는 50 mg/kg 범위일 수 있으며, 1 내지 10mg/kg 범위가 바람직하다. 당 기술 분야에 공지된 바와 같이, 항체 또는 Fc 융합체 분해, 전신 전달 대 국소 전달, 및 새로운 프로테아제 합성 속도, 그리고 연령, 체중, 전반적인 건강 상태, 성별, 식이, 투여 시간, 약물 상호 작용, 및 증상의 경중에 따른 조정(adjustment)이 필요할 수 있으며, 당업자라면 일상적인 실험을 통해 이를 결정할 수 있을 것이다.

[0092] 바람직하게는 살균된 수용액(sterile aqueous solution) 형태의, 본 발명의 항체 또는 Fc 융합체를 포함하는 약학적 조성물의 투여는, 이들로 제한되지는 않으나, 다음과 같은 다양한 경로를 통해 이루어질 수 있다: 경구(orally), 피하(subcutaneously), 정맥내(intravenously), 비내(intranasally), 이내(intraotically), 경피(transdermally), 국소(topically) (예를 들어, 젤, 고약(salve), 로션(lotion), 크림(cream) 등), 복막내(intraperitoneally), 근육내(intramuscularly), 폐내(intrapulmonary) (예를 들어, AERx^(R) 흡입 가능한 기술(inhalable technology): Aradigm으로부터 상업적으로 입수 가능함, 또는 증진 폐 전달 시스템(enhance pulmonary delivery system): Inhale Therapeutics로부터 상업적으로 입수 가능함), 경(vaginally), 비경구(parenterally), 직장(rectally), 또는 안내(intraocularly) 경로. 일부의 경우, 예를 들어 상처 또는 염증 등을 치료하는 경우, 상기 항체 또는 Fc 융합체는 용액 또는 스프레이(spray)로서 직접 적용될 수 있다. 따라서, 당 기술 분야에 공지된 바와 같이, 상기 약학적 조성물은 투여 방식에 따라 제형화될 수 있다.

[0093] **조작 방법(Engineering Method)**

[0094] 본 발명은 Fc 변이체를 제조하는 데 사용될 수 있는 조작 방법을 제공한다. 종래 기술에 있어 Fc 조작을 어렵게 해왔던 주된 장애는, 부분적으로는 조작 전략 및 방법의 비능률에 기인하며, 항체 생산 및 스크리닝의 낮은 처리 수준에 기인하여, 변형에 있어 단지 무작위적 시도만이 가능하였다는 점이다. 본 발명은 이러한 단점들을 극복하는 조작 방법을 제시한다. 다양한 설계 전략, 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 방법, 라이브러리 제작 방법, 및 실험적 생산 및 스크리닝 방법이 고려된다. 이들 전략, 접근법, 기법, 및 방법은, 최적화된 Fc 변이체를 조작하기 위하여, 개별적으로 또는 조합적으로 적용될 수 있다.

[0095] **설계 전략**

[0096] 원하는 특성에 대하여 최적화된 Fc 변이체를 조작하는 가장 효과적인 접근법은, 그 목적에 따라 조작 과정을 지정하는 것이다. 따라서, 본 발명은 최적화된 Fc 변이체를 조작하는 데 사용될 수 있는 설계 전략을 교시한다. 설계 전략의 사용은 Fc 조작을 가이드하는 것을 의미하며, 그것을 조작하는 데 사용된 설계 전략을 기준으로 하는 몇몇 최적화된 특성에 대하여 Fc 변이체를 제한하는 것을 의미하지는 않는다. 먼저, 이는 상충적인(counterintuitive) 것으로 보일 수 있으나, 그의 유효성은 단백질 및 단백질-단백질 복합체의 구조, 안정성, 용해성, 및 기능을 측정하는 미소한 상호 작용의 막대한 복잡성으로부터 유래한다. 어떠한 단백질 위치, 잔기, 상호 작용 등이 설계 목적에 있어 중요한 것인지를 예측하기 위하여 노력할 수는 있으나, 종종 결정적인 것은 예측이 불가능하다. 단백질 구조, 안정성, 용해성, 및 기능에 대한 효과는, 유망하거나 유망하지 않거나에 관계없이, 흔히 예측하기가 어렵다. 또한, 단백질에 대하여 불리한 또는 유해한 무수한 아미노산 변형이 존재한다. 그러므로, 종종 최상의 접근법은, 일반적으로 설계에 집중되나, 유해한 효과를 야기하지 않는 단백질 변이체의 제작으로부터 유래한다. 이러한 방식으로, 설계 전략의 주요 목표는 질적 다양성의 야기일 수 있다. 극히 단순한 수준에서, 이는 사용자의 기호에 있어 승산의 누적을 생각하는 것일 수 있다. 일례로서, 탄수화물 및 도메인-도메인 각도가 어떠한 방식으로 Fc의 특성들을 좌우하는지는 잘 이해되지 않았음에도 불구하고, 이하에서 설명하는 바와 같이, Fc 탄수화물 또는 특정 도메인-도메인 각도의 동요는 최적화된 Fc 변이체를 제작하는 유효한 설계 전략이다. 즉, 질적 다양성에 의하여 스크리닝되는 불리한 아미노산 변형의 수를 감소시킴으로써, 이들 설계 전략이 실용 단계에 접어들게 되었다. 그러므로, 본 발명에 있어서의 설계 전략의 참된 가치는 유용한 Fc 변이체를 제작하고자 하는 조작을 가이드하는 능력에 있다. 얻어진 변이체 중 임의의 하나의 특이적인 가치는 실험 후 측정된다.

[0097] Fc 변이체를 조작하는 설계 전략은, Fc와 일부 Fc 리간드의 상호 작용이 Fc 및 Fc 리간드 사이의 경계면에서 아미노산 변형을 조작함으로써 변경되는 방식으로 제공된다. 본원에 있어서, Fc 리간드는, 이들로 제한되지는 않으나, Fc γ R, C1q, FcRn, 단백질 A 또는 G 등을 포함할 수 있다. 결합 경계면에 영향을 주는 Fc 위치에서의 활발한 알맞은 치환을 통하여, 변이체들은 새로운 경계면 배위를 샘플링하게 조작될 수 있으며, 그러한 새로운 경계면 형태에 있어, 일부는 상기 Fc 리간드에 대한 결합을 개선시킬 수 있고, 일부는 Fc 리간드 결합을 감소시킬 수 있으며, 일부는 기타 유리한 특성을 가질 수 있다. 그러한 새로운 경계면 형태는, 상기 경계면을 형성하는 Fc 리간드 잔기와의 직접적인 상호 작용을 야기할 수도 있고, 측쇄 또는 골격 형태의 동요와 같은, 상기 아미노산 변형에 의하여 유발되는 간접적인 효과를 야기할 수도 있다. 가변 위치는 경계면의 형태를 결정함에 있어 중요한 역할을 담당하는 것으로 여겨지는 임의의 위치로서 선택될 수 있다. 예를 들어, 가변 위치는, 예를 들어 Fc 리간드와 직접 접촉하는 임의의 잔기의 5 옹스트롬(Å), 바람직하게는 1 내지 10 Å 길이 이내의 잔기의 세트로서 선택될 수 있다.

[0098] Fc 변이체를 제작하는 부가적인 설계 전략은, N297의 Fc 탄수화물의 형태가 최적화되는 방식으로 제공된다. 본원에 사용된 바와 같이, 최적화는 원하는 특성, 예를 들어 Fc γ R에 대하여 증가된 또는 감소된 친화성을 야기하는 N297 탄수화물에 있어서의 형태적 및 조성적 변화를 포함하는 것을 의미한다. 이러한 전략은 탄수화물 구조 및 형태가 Fc/Fc γ R 및 Fc/C1q 결합에 유의하게 영향을 준다는 연구 결과에 의하여 지지된다 (Umana *et al.*, 1999, *Nat Biotechnol* 17: 176-180; Davies *et al.*, 2001, *Biotechnol Bioeng* 74: 288-294; Mimura *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 45539-45547; Radaev *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 16478-16483; Shields *et al.*, 2002, *J Biol Chem* 277: 26733-26740; Shinkawa *et al.*, 2003, *J Biol Chem* 278: 3466-3473). 그러나, 상기 탄수화물은 Fc γ R과 특이적으로 접촉하지 않는다. 탄수화물과 상호 작용하는 위치에서의 활발한 알맞은 치환을 통하여, 변이체의 질적 다양성은 새로운 탄수화물 배위를 샘플링하도록 조작될 수 있다. 이들 중 일부는 하나 이상의 Fc 리간드에 대한 결합을 개선시킬 수 있으며, 일부는 그러한 결합을 감소시킬 수 있다. Fc/탄수화물 경계면에 근접한 대부분의 돌연변이는 탄수화물 배위를 변경시키는 것으로 여겨지는 반면, 일부 돌연변이는 글라이코실화 조성을 변경시키는 것으로 확인된 바 있다 (Lund *et al.*, 1996, *J Immunol* 157: 4963-4969; Jefferis *et al.*, 2002, *Immunol Lett* 82: 57-65).

[0099] Fc 변이체를 제작하는 또 다른 하나의 설계 전략은 C γ 2 및 C γ 3 도메인 사이의 각도가 최적화되는 방식으로 제공된다. 본원에 사용된 바와 같이, 최적화는 원하는 특성, 예를 들어 Fc γ R에 대하여 증가된 또는 감소된 친화성을 야기하는 C γ 2-C γ 3 도메인 각도에 있어서의 형태적 변화를 설명하는 것을 의미한다. 이 각도는 Fc/Fc γ R 친화성에 대한 중요한 결정인자이며 (Radaev *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 16478-16483), Fc/Fc γ R 경계면으로부터 원거리에 위치하는 다수의 돌연변이는 이를 조절함으로써 잠재적으로 결합에 영향을 준다 (Shields *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 6591-6604). C γ 2-C γ 3 각도 및 서로에 대한 도메인의 가요성(flexibility)을

결정하는 데 있어 중요한 역할을 담당하는 것으로 여겨지는 위치에서의 활발한 알맞은 치환을 통하여, 변이체의 질적 다양성이 새로운 각도 및 가요성 수준을 샘플링하도록 설계될 수 있으며, 일부는 원하는 Fc 특성에 대하여 최적화될 수 있다.

[0100] Fc 변이체를 제작하는 또 다른 하나의 설계 전략은, Fc를 글라이코실화에 대한 구조적 및 기능적 의존성을 제거하도록 조작하는 방식으로 제공된다. 이러한 설계 전략은, N297 탄수화물의 부재 하에, Fc 구조, 안정성, 용해성, 및/또는 Fc 기능(예를 들어, Fc for 하나 이상의 Fc 리간드에 대한 Fc의 친화성)의 최적화를 포함한다. 하나의 접근법에 있어서, 글라이코실화의 부재 하에 용매(solvent)에 노출되는 위치는, 그들이 안정되고, Fc 구조와 구조적으로 일치하며, 응집하는 경향을 갖지 않도록 조작된다. C γ 2는 단지 항체 내의 짝지어지 않은 Ig 도메인이다 (도 1 참조). 그러므로, 상기 N297 탄수화물은, Fc의 안정성 및 구조적 무결성을 유지시키는 동시에, C γ 2 도메인을 중심축에 걸쳐 응집되지 않도록 하면서, 정상적으로 또 다른 Ig 도메인과의 단백질-단백질 상호작용에 대한 경계면이 되는 노출된 소수성 패치를 은폐시킨다. 아글라이코실화된 Fc를 최적화하는 접근법은, 이들로 제한되지는 않으나, C γ 2-C γ 2 다이머(dimer) 축을 향해 안쪽으로 향하는 극성 및/또는 전하는 띠는 잔기의 혼입에 의한, 아글라이코실화된 Fc 안정성 및/또는 용해성을 증진시키는 아미노산 변형의 설계, 및 기타 Fc 리간드로써 아글라이코실화된 Fc/Fc γ R 경계면 또는 아글라이코실화된 Fc의 경계면을 직접적으로 증진시키는 아미노산 변형의 설계를 포함한다.

[0101] Fc 변이체를 제작하는 부가적인 설계 전략은 C γ 2 도메인의 배위가 최적화되는 방식으로 제공된다. 본원에 사용된 바와 같이, 최적화는, 원하는 특성, 예를 들어 Fc γ R에 대하여 증가된 또는 감소된 친화성을 야기하는 C γ 2 도메인 내에서의 형태적 변화를 의미한다. C γ 2 형태에 영향을 주는 위치에서의 활발한 알맞은 치환을 통하여, 변이체의 질적 다양성은 새로운 C γ 2 배위를 샘플링하도록 조작될 수 있으며, 일부는 설계 목표를 달성할 수 있다. 그러한 새로운 C γ 2 형태는 예를 들어, 상기 변이체에 의하여 샘플링되는 대안적인 골격 형태의 결과일 수 있다. 가변 위치는 CD2 구조, 안정성, 용해성, 가요성, 기능 등을 결정하는 데 있어 중요한 역할을 담당하는 것으로 여겨지는 임의의 위치로서 선택될 수 있다. 예를 들어, C γ 2 소수성 코어 잔기, 즉 용매로부터 부분적으로 또는 완전히 격리된 C γ 2 잔기가 조작될 수 있다. 대안적으로, 비코어(noncore) 잔기가 고려될 수 있으며, 그러한 잔기는 골격 구조, 안정성, 또는 가요성을 결정하는 데 중요한 것으로 여겨진다.

[0102] Fc 변이체를 제작하는 부가적인 제작 설계 전략은, Fc 및 Fc 리간드 사이의 정전기적(electrostatic) 상호작용을 조절하는 Fc γ R, 상보체, 또는 몇몇 기타 Fc 리간드에 대한 결합이 변형에 의하여 변경되는 방식으로 제공된다. 그러한 변형은 Fc의 전체적인 정전기적 특성을 최적화하는 것으로 간주될 수 있으며, 중성 아미노산을 전하를 띠는 아미노산으로 대체하는 단계, 전하를 띠는 아미노산을 중성 아미노산으로 대체하는 단계, 또는 전하를 띠는 아미노산을 반대 전하를 띠는 아미노산으로 대체(즉, 전하 반전)하는 단계를 포함한다. 그러한 변형은 Fc 및 하나 이상의 Fc 리간드, 예를 들어 Fc γ R 사이의 결합 친화성을 변화시키는 데 사용될 수 있다. 바람직한 일면에 있어서, 정전기적 치환이 결합에 영향을 줄 수 있는 위치는, 정전기 전위(potential)를 계산하는 다양한 공지된 방법 중 하나를 이용하여 선택한다. 가장 간단한 일면에 있어서, 쿨롱의 법칙(Coulomb's law)을 이용해, 단백질 내의 위치에 대한 함수로서 정전기 전위를 산출한다. 다른 일면에 있어서는, 이온 강도 효과를 설명하는 Debye-Huckel 스케일링이 포함된다. 보다 구체적인 일면에 있어서는, 예를 들어 Poisson-Boltzmann 산출이 포함된다. 그러한 정전기적 산출은 위치에 초점을 두며, 특이적인 아미노산 변형에 대하여 설계 목표의 달성을 시사한다. 몇몇 경우, 이들 치환은 상이한 Fc 리간드에 대한 결합에 가변적으로 영향을 줄 것으로 여겨지며, 예를 들어 활성화하는 Fc γ R에 대한 결합은 증진시키는 한편, 저해성 Fc γ R에 대한 결합 친화성은 감소시킬 것으로 여겨진다.

[0103] **컴퓨터 조작을 통한 스크리닝**

[0104] 유용한 Fc 변이체를 얻는 데 있어서의 주된 장애 요인은, 어떠한 아미노산 변형이, 막대한 가능성 중에서, 원하는 목표를 달성할 지를 예측하기가 어렵다는 점이다. 실제로, 임상적으로 중요한 가치를 가지는 Fc 변이체를 제조하는 데 있어서 Fc를 조작하고자 한 시도가 실패해온 주된 원인 중 하나는, Fc 조작에 대한 접근법들이 히트-또는-미스 접근법(hit-or-miss approach)을 수반한다는 것이다. 본 발명은, Fc 변이체의 정량적 및 시스템적 조작을 가능하게 하는 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 방법을 제공한다. 상기 방법은 통상적으로, 자동 수준의 스코어링(scoring) 기능, 측쇄 로타머(rotamer) 샘플링, 단백질 서열, 구조, 및 기능 사이의 관계를 정확하게 포착하는 진보된 최적화 방법을 이용한다. 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝은, 결과로서 얻어지는 막대한 다양성을 필터링함으로써, 표적 위치에서의 전체 서열 스페이스의 가능성 탐구를 가능하게 한다. 컴퓨터 조작을 통해 스크리닝된 변이체 라이브러리는 안정되고, 적당하게 폴딩된, 기능적 서열에 대하여 중요한 가치가 있으며, 이는 원하는 목표에 대하여 Fc의 최적화를 활성화한다. 단백질 구조, 안정성, 용해성, 및 기능에 대한 중첩된

서열 제한으로 인하여, 라이브러리 내의 다수의 후보 물질들이 "낭비되는(wasted)" 서열 스페이스를 점유한다. 예를 들어, 대부분의 서열 스페이스는 폴딩되지 않은(unfolded), 잘못 폴딩된(misfolded), 불완전하게 폴딩된, 부분적으로 폴딩된, 또는 응집된(agggregated) 단백질을 코딩한다. Ig 도메인은 작은 베타 시트 구조(beta sheet structure)이기 때문에, 이는 특히 Fc 조각과 관련이 있으며, 그러한 조각은 요구가 극히 지나친 것으로 입증된 바 있다 (Quinn *et al.*, 1994, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8747-8751; Richardson *et al.*, 2002, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2754-2759). 심지어, 베타 시트의 표면에 대한 표면적으로 유해한 치환은 심각한 패키징(packaging) 충돌을 초래할 수 있으며, 이는 폴딩 평형을 현저히 붕괴시킬 수 있다 (Smith *et al.*, 1995, *Science* 270: 980-982). 부수적으로, 알려진 최악의 베타 시트 형성체(former) 중 하나이다 (Minor *et al.*, 1994, *Nature* 371: 264-267). 베타 시트의 안정성 및 특이성에 대한 결정인자는 극히 다수의 미소한 상호 작용들 사이에 있어서의 정밀한 균형이다. 컴퓨터 조각을 통한 스크리닝은, 주로 생산적인 서열 스페이스로 구성되는 라이브러리의 제작을 가능하게 하며, 그리하여 설계 목표에 대하여 최적화된 단백질을 동정하는 기회를 증대시킨다. 실제로, 컴퓨터 조각을 통한 스크리닝은 증가된 히트-속도(hit-rate)를 산출함으로써, 실험적으로 스크리닝되는 변이체의 개수를 감소시킨다. Fc 조각에 있어서의 부가적인 장애는, 상관된 또는 관련된 돌연변이의 활성 설계에 대한 요구이다. 예를 들어, 이렇게 하여 관찰된 최대 Fc/FcγR 친화성 증진은, 알려진 스캔에서 개별적으로 얻어진 3개의 보다 양호한 바인더를 조합함으로써 수득된 S298A/E333A/K334A이다 (Shields *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 6591-6604). 컴퓨터 조각을 통한 스크리닝은 3회의 개별적인 실험 대신에 1회의 실험에서 3배의 변이체를 제조할 수 있으며, 나아가 단지 알려진 대신 그들 위치에서 20개의 모든 아미노산의 기능성을 테스트할 수 있다. 컴퓨터 조각을 통한 스크리닝은 실험적으로 취급이 용이한 크기와 관련된 문제를 감소시킴으로써 그러한 복잡성을 처리한다.

[0105] 광범위하여 검토된, 컴퓨터 조각을 통한 스크리닝은, 다음과 같은 4개의 단계를 수반한다: 1) 단백질 주형(template) 구조 또는 구조들의 선택 및 준비 단계; 2) 가변 위치의 선택, 그 위치에서 고려되는 아미노산의 선택, 및/또는 고려되는 아미노산을 모델링하는 로타머의 선택 단계; 3) 에너지 계산 단계; 및 4) 조합 최적화. 보다 상세히 설명하면, 컴퓨터 조각을 통한 스크리닝 과정은 다음과 같이 설명될 수 있다. 단백질의 3차원 구조가 출발점으로서 사용된다. 최적화된 위치가 동정되며, 이는 전체 단백질 서열 또는 그의 서브세트(들)일 수 있다. 바람직한 일면에 있어서, 각각의 고려되는 아미노산은, 로타머라 불리는 불연속적인 허가된 형태에 의하여 제시될 수 있다. 상호 작용 에너지가 각각의 고려되는 아미노산 및 각각의 기타 고려되는 아미노산 및 단백질 골격 및 가변 잔기를 포함하는 나머지 단백질 사이에서 산출된다. 바람직한 일면에 있어서, 상호 작용 에너지는 각각의 고려되는 아미노산 측쇄 로타머 및 각각의 기타 고려되는 아미노산 측쇄 로타머 및 단백질 골격 및 가변 잔기를 포함하는 나머지 단백질 사이에서 산출된다. 이어서, 하나 또는 그 이상의 조합적 검색 알고리즘(combinatorial search algorithm)을 이용해 최저 에너지 서열 및/또는 낮은 에너지 서열이 동정된다.

[0106] 바람직한 일면에 있어서, 사용되는 컴퓨터 조각을 통한 스크리닝 방법은 US 6,188,965; US 6,269,312; US 6,403,312; USSN 09/782,004; USSN 09/927,790; USSN 10/218,102; PCT WO 98/07254; PCT WO 01/40091; 및 PCT WO 02/25588에 개시된 바와 같은, Protein Design Automation^(R) (PDA^(R)) 기술과 실질적으로 유사하다. 또 다른 하나의 바람직한 일면에 있어서, 컴퓨터 조각을 통한 스크리닝 방법은 (Raha *et al.*, 2000, *Protein Sci* 9: 1106-1119), USSN 09/877,695, 및 USSN 10/071,859에 개시된 바와 같은, Sequence Prediction AlgorithmTM (SPATTM) 기술과 실질적으로 유사하다. 또 다른 하나의 바람직한 일면에 있어서, "ANTIBODY OPTIMIZATION"라는 표제 하에 2003년 3월 3일자로 출원 USSN 10/339788에 개시된 컴퓨터 조각을 통한 스크리닝 방법이 사용된다. 다른 일면에 있어서는, PDA^(R) 기술 및 SPATTM 기술을 조합한 방법, 그리고 기타 설계 기구와 조합된 이들 컴퓨터 조각 방법의 조합 방법을 포함하는, 상이한 컴퓨터 조각을 통한 스크리닝 방법들의 조합된 방법이 사용된다. 유사하게, 이들 컴퓨터 조각 방법은 동시에 또는 순차적으로, 임의의 순서로 사용될 수 있다.

[0107] 주형 구조는 상기 컴퓨터 조각을 통한 스크리닝 산출에 대한 입력정보(input)로서 사용된다. 본원에 있어서, "주형 구조(template structure)"란, 최적화된 단백질의 일부 또는 전체의 구조적 배위체를 의미한다. 상기 주형 구조는 3차원 구조(즉, 단백질 원자 세트에 대한 3차원 배위체)가 알려져 있는 임의의 단백질일 수 있으며, 계산, 평가, 모델링, 제조, 또는 측정될 수 있다. 단백질의 3차원 구조는, 이들로 제한되지는 않으나, X-선 결정학적 기법, 핵 자기 공명(nuclear magnetic resonance; NMR) 기법, 새로운 모델링, 및 상동성 모델링을 포함하는 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 최적화가, 실험적으로 해석되지 않은 구조의 단백질에 대하여 요구되는 경우, 컴퓨터 조각을 통한 스크리닝 산출에 대한 주형으로서 제공될 수 있는 적합한 구조적 모델이 제작될 수 있다. 단백질의 상동성 모델을 제작하는 방법은 당 기술 분야에 알려져 있으며, 이들 방법이 본 발명

에 사용된다. 이에 대해서는 예를 들어, 하기의 문헌들을 참조한다: Luo, *et al.*, 2002, *Protein Sci* 11: 1218-1226; Lehmann & Wyss, 2001, *Curr Opin Biotechnol* 12 (4): 371-5; Lehmann *et al.*, 2000, *Biochim Biophys Acta* 1543 (2): 408-415; Rath & Davidson, 2000, *Protein Sci*, 9 (12): 2457-69; Lehmann *et al.*, 2000, *Protein Eng* 13(1): 49-57; Desjarlais & Berg, 1993, *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (6): 2256-60; Desjarlais & Berg, 1992, *Proteins* 12 (2): 101-4; Henikoff & Henikoff, 2000, *Adv Protein Chem* 54: 73-97; Henikoff & Henikoff, 1994, *J Mol Biol* 243 (4): 574-8; Morea *et al.*, 2000, *Methods* 20: 267-269. 단백질/단백질 복합체는 또한, 도킹(docking) 방법을 이용하여 수득할 수 있다. 주형 구조로서 제공될 수 있는 적합한 단백질 구조는, 이들로 제한되지는 않으나, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB, formerly the Brookhaven National Lab)에 의하여 편집 및 제공되는 Protein Data Base에 게시된 모든 것들을 포함한다.

[0108] 상기 주형 구조는 천연 발생되거나 조작된 단백질일 수 있다. 상기 주형 구조는 임의의 유기체, 바람직하게는 인간, 마우스, 래트, 토끼, 및 원숭이 유래의 단백질에 의하여 실질적으로 코딩되는 단백질의 것일 수 있다. 상기 주형 구조는 임의의 다수의 단백질 구조적 형태를 포함할 수 있다. 바람직한 일면에 있어서, 상기 주형 구조는 Fc 부위 또는 Fc의 도메인 또는 단편을 포함한다. 대안적으로 바람직한 일면에 있어서, 상기 주형 구조는 Fc 또는 하나 이상의 Fc 리간드에 결합된 Fc의 도메인 또는 단편을 포함하며, Fc/Fc γ R 복합체가 바람직하다. 상기 주형 구조 내의 Fc는, 글라이코실화될 수도 있고 글라이코실화되지 않을 수도 있다. 상기 주형 구조는 하나 이상의 단백질 사슬을 포함할 수 있다. 상기 주형 구조는, 이들로 제한되지는 않으나, 작은 분자, 기질(substrate), 보조-인자(cofactor), 금속, 분 분자, 보조기(prosthetic group), 폴리머, 및 탄수화물을 포함하는, 비단백질 성분을 추가적으로 함유할 수 있다. 바람직한 일면에 있어서, 상기 주형 구조는 복수의 또는 세트의 주형 단백질, 예를 들어 NMR로부터 얻어지는 구조체의 앙상블(ensemble)이다. 대안적으로, 세트의 주형 구조는 관련 단백질 또는 구조의 세트로부터 제작되거나, 인위적으로 창안된 앙상블로부터 제작된다. 상기 주형 구조의 조성 및 원료는 조작 목표에 따라 결정된다. 예를 들어, 인간 Fc/Fc γ R 친화성을 증진하는 경우에는, 인간 Fc/Fc γ R 복합체 구조 또는 그의 유도체가 주형 구조로서 사용될 수 있다. 대안적으로, 복합체를 형성하지 않은 Fc 구조가 주형 구조로서 사용될 수도 있다. 목표가 마우스 Fc γ R에 대한 인간 Fc의 친화성을 증진시키는 것인 경우, 상기 주형 구조는 마우스 Fc γ R에 결합된 인간 Fc의 구조 또는 모델일 수 있다.

[0109] 상기 주형 구조는 설계 산출 이전에 변형되거나 변경될 수 있다. 주형 구조를 제조하는 다양한 방법은, US 6,188,965; US 6,269,312; US 6,403,312; USSN 09/782,004; USSN 09/927,790; USSN 09/877,695; USSN 10/071,859, USSN 10/218,102; PCT WO 98/07254; PCT WO 01/40091; 및 PCT WO 02/25588에 개시되어 있다. 예를 들어, 바람직한 일면에 있어서, 상기 구조 내에 포함되어 있지 않은 경우, 명료한 수소가 첨가될 수 있다. 대안적인 일면에 있어서, 반데르 발스 충돌(van der Waals clash), 불리한 결합 각도, 및 불리한 결합 길이에 기인하는 응력을 포함하는, 응력을 완화시키기 위하여, 상기 구조의 에너지 최소화(minimization)가 가동된다. 대안적으로, 상기 주형 구조는 유도된 또는 무작위적 동요를 포함하는 수동식 방법과 같은 기타 방법을 이용하여 변경된다. 또한, 에너지 산출 및 조합적 최적화 단계를 포함하는 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝의 이후 단계 동안에 상기 주형 구조를 변형시킬 수도 있다. 대안적인 일면에 있어서, 상기 주형 구조는 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 산출 과정 이전 또는 동안에 변형되지 않는다.

[0110] 일단 주형 구조가 얻어지면, 가변 위치가 선택된다. 본원에 있어서, "가변 위치(variable position)"란, 아미노산 신원이 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 산출에서 변경되도록 허가되는 위치를 의미한다. 당 기술 분야에 공지된 바와 같이, 아미노산 변형을 특정 가변 위치에서만 고려되도록 하면, 산출의 복잡성이 감소되며, 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝이 설계 목표에 직접 맞춤 제작되도록 한다. 하나 또는 그 이상의 잔기가 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 산출에 있어 가변 위치일 수 있다. 가변 위치로서 선택되는 위치는, 최적화된 단백질 특성, 예를 들어 Fc γ R에 대한 Fc 친화성, Fc 안정성, Fc 용해성 등에 기여하거나, 기여하는 것으로 가정된 것일 수 있다. 가변 위치의 잔기는 특이적인 단백질 특성에 대하여 유리하게 또는 불리하게 기여할 수 있다. 예를 들어, Fc/Fc γ R 경계면의 잔기는 결합을 매개하는 데에 관여할 수 있으며, 그러므로, 이 위치는 Fc/Fc γ R 친화성 개선을 목적으로 하는 설계 산출에 있어 가변적일 수 있다. 또 다른 하나의 일례로서, 노출된 수소성 측쇄를 가지는 잔기는 불리한 응집을 유발하는 데 관여할 수 있으며, 그러므로, 이 위치는 용해성 개선을 목적으로 하는 설계 산출에 있어 가변적일 수 있다. 가변 위치는 특정한 단백질 특성에 대한 결정인자인 상호 작용에 직접적으로 관여하는 위치일 수 있다. 예를 들어, Fc의 Fc γ R 결합 부위는 그러한 특정 Fc γ R에 접촉하는 모든 잔기를 포함하는 것으로 규정될 수 있다. 본원에 있어서, "접촉(contact)"이란, Fc 잔기의 적어도 하나의 원자와, 결합된 Fc γ R의 적어도 하나의 원자 사이의 몇몇 화학적 상호 작용을 의미하며, 이러한 화학적 상호 작용은, 이들로 제한되지는 않으나, 반 데르 발스 상호 작용, 수소 결합 상호 작용, 정전기적 상호 작용, 및 소수성 상호 작용

용을 포함한다. 대안적인 일면에 있어서, 가변 위치는 단백질 특성에 간접적으로 관여하는 그러한 위치를 포함할 수 있으며, 즉 그러한 위치는 Fc 특성에 기여하는 것으로 알려져 있거나, Fc 특성에 기여하는 것으로 가정된 잔기에 가장 근접할 수 있다. 예를 들어, Fc의 Fc γ R 결합 부위는, 예를 들어 반 데르 발스 하에 Fc γ R과 접촉하는 4-10 Å의 임의의 Fc 잔기와 같이, 특정 거리 이내의 모든 Fc 잔기를 포함하는 것으로 정의될 수 있다. 그러므로, 이 경우 가변 위치는 Fc γ R과 직접 접촉하는 잔기뿐 아니라, Fc γ R과 접하는 잔기에 접하며, 그리하여 간접적으로 결합에 영향을 주는 것들도 선택될 수 있다. 선택되는 특정 위치는 이용될 설계 전략에 따라 좌우된다.

[0111] 가변적이지 않은 주형 구조 내의 하나 또는 그 이상의 위치가 플로트될 수 있다. 본원에 있어서, "플로트되는 위치(floated position)"란, 아미노산 신원이 아닌 아미노산 형태가 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 산출에 있어서 가변하도록 허가된 위치를 의미한다. 일면에 있어서, 상기 플로트되는 위치는 모체 아미노산 신원을 가질 수 있다. 예를 들어, 플로트되는 위치는 작은 거리 이내의, 예를 들어 5 Å의 가변 위치 잔기일 수 있는 위치일 수 있다. 대안적인 일면에 있어서, 플로트되는 위치는 모체와 다른 아미노산 신원을 가질 수 있다. 목표가 특이적인 돌연변이의 활력적인 또는 구조적 출력을 평가하는 것인 경우, 그러한 예도 본 발명에 이용될 수 있다.

[0112] 가변적이지 않거나 또는 플로트되지 않는 위치는 고정될 수 있다. 본원에 있어서, "고정된 위치(fixed position)"란, 아미노산 신원 및 형태가 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 산출에 있어 일정하게 유지되는 위치를 의미한다. 고정될 수 있는 위치는, 최적화될 특성에 관여하는 것으로 알려져 있지 않거나, 그러할 것으로 가정되지 않은 잔기를 포함한다. 이 경우에는, 이들 위치를 변화시킴으로써 획득되는 것이 거의 또는 전혀 없을 것으로 가정된다. 고정되는 위치는 또한, 해당 잔기가 적당한 폴딩, 구조, 안정성, 용해성, 및/또는 생물학적 기능을 유지하는 데 있어 중요한 것으로 알려져 있거나, 그러할 것으로 가정된 위치를 포함한다. 예를 들어, 위치는, 각각 Fc 리간드에 대한 결합 및 적당한 글라이코실화가 교란되지 않도록 하기 위하여, 특정 Fc 리간드와 상호 작용하는 잔기 또는 글라이코실화된 부위를 코딩하는 잔기에 대하여 고정될 수 있다. 유사하게, 안정성이 최적화되는 경우에는, Fc 리간드, 예를 들어 Fc γ R과 직접적으로 또는 간접적으로 상호 작용하는 위치를 고정함으로써, 결합이 교란되지 않도록 하는 것이 유익할 수 있다. 고정된 위치는 또한, 구조적으로 중요한 잔기, 예를 들어 다이설파이드 결합(disulfide bridge)에 관여하는 시스테인, 골격 형태를 결정하는 데 있어 결정적으로 중요한 잔기, 예를 들어 프롤린 또는 글라이신, 결정적인 수소 결합 잔기, 및 유리한 패킹 상호 작용을 형성하는 잔기를 포함할 수 있다.

[0113] 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝에 있어 다음 단계는, 각각의 특정 가변 위치에서 고려될 가능한 아미노산 신원의 세트를 선택하는 것이다. 이러한 세트의 가능한 아미노산은, 본원에 있어서, 가변 위치에서 "고려되는 아미노산(considered amino acid)"을 일컫는다. "아미노산(amino acid)"이란, 본원에 사용된 바와 같이, 20개의 천연 아미노산 및 임의의 비천연 또는 합성 유사체의 세트를 일컫는다. 일면에 있어서, 모든 20개의 천연 아미노산이 고려된다. 대안적으로, 서브세트의 아미노산, 또는 심지어는 단지 하나의 아미노산이 주어진 가변 위치에 고려된다. 당업자라면, 가변 위치에 대하여 단지 몇몇 아미노산 신원만을 고려하는 것이, 검색에 있어서의 조합적 복잡성을 감소시킨다는 점에서, 컴퓨터 조작에 유리함을 이해할 것이다. 나아가, 가변 위치에 대하여 단지 몇몇 아미노산만을 고려하는 것이, 특이적인 설계 전략에 대하여 산출을 맞춤 설계하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 아글라이코실화된 Fc의 용해성을 최적화하기 위해서는, 탄수화물의 부재 하에 용매에 노출되는 비극성 Fc 잔기에 대하여 단지 극성 아미노산만을 고려하는 것이 유리할 수 있다. 천연 아미노산의 합성 아미노산 및 유사체를 포함하는 비천연 아미노산 또한 아미노산으로서 고려된다. 이에 대해서는, 예를 들어 하기 문헌을 참조한다: Chiri *et al.*, 2003, *Science*, 301 (5635): 964-7; 및 Chin *et al.*, 2003, *Chem Biol*. 10 (6): 511-9.

[0114] 각각의 위치에 대하여 고려된 아미노산을 선택하는 데에는, 매우 다양한 방법들이, 단독으로 또는 조합적으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 주어진 가변 위치에 대하여 고려되는 아미노산 세트는 용매에 대한 노출 정도를 기준으로 선정될 수 있다. 소수성 또는 비극성 아미노산은 통상적으로 상기 단백질의 내부 또는 코어에 위치하며, 이러한 위치는 용매에 대한 접근이 불가능하거나 거의 불가능하다. 그러므로, 가변 코어 위치에 대해서는, 단지 또는 주로 비극성 아미노산, 예를 들어 알라닌, 발린, 이소류신, 류신, 페닐알라닌, 타이로신, 트립토판, 및 메티오닌만을 고려하는 것이 유리할 수 있다. 친수성 또는 극성 아미노산은 통상적으로, 단백질의 외부 또는 표면 상에 위치하며, 이러한 위치는 용매의 접근 가능성이 상당히 크다. 그러므로, 가변적인 표면 위치에 대해서는, 단지 또는 주로 극성 아미노산, 예를 들어 알라닌, 세린, 트레오닌, 아스파르트산, 아스파라긴, 글루타민, 글루타르산, 아르기닌, 라이신 및 히스티딘만을 고려하는 것이 유리할 수 있다. 일부의 위치는 부분적으

로는 노출되고 부분적으로는 묻혀 있는 상태로서, 코어 및 표면 잔기 사이의 경계 잔기로서 제공되는 측면에서 단백질 코어 위치인지 표면 위치인지가 명확하지 않은 경우가 있다. 그러므로, 그러한 가변적인 경계 위치에 대해서는, 비극성 아미노산 및 극성 아미노산 모두, 예를 들어 알라닌, 세린, 트레오닌, 아스파르트산, 아스파라긴, 글루타민, 글루타르산, 아르기닌, 라이신 히스티딘, 발린, 이소류신, 류신, 페닐알라닌, 타이로신, 트립토판, 및 메티오닌을 고려하는 것이 유리할 수 있다. 가변 위치에 있어서의 용매에 대한 노출 정도는, 단백질 구조 생물학 전문가에 의하여, 또는 당 기술 분야에 공지되어 있는 다양한 알고리즘을 이용하여, 주형 구조에 대한 주관적인 평가(subjective evaluation) 또는 육안 검사(visual inspection)에 의하여 측정될 수 있다. 가변 위치에 대하여 고려되는 아미노산 타입의 선택은, 컴퓨터 조작 방법, 예를 들어 용매 접근이 가능한 표면적을 산출함으로써, 또는 용매 접근 가능한 표면에 대한 $C\alpha-C\beta$ 벡터의 배향(orientation)을 평가하는 알고리즘을 이용함으로써 전적으로 측정되거나 또는 용이해질 수 있다. 이에 대해서는 하기 문헌을 참조한다: US 6,188,965; US 6,269,312; US 6,403,312; USSN 09/782,004; USSN 09/927,790; USSN 10/218,102; PCT WO 98/07254; PCT WO 01/40091; 및 PCT WO 02/25588. 일면에 있어서, 각각의 가변 위치는 코어, 표면, 또는 경계 위치로서 명확하게 분류되거나, 또는 코어, 표면, 또는 경계와 실질적으로 유사한 부류일 수 있다.

[0115] 대안적인 일면에 있어서, 가변 위치에 대하여 허가된 아미노산 세트의 선택은 가정에 따라 추론(hypothesis-driven)될 수 있다. 어떠한 아미노산 타입이 가변 위치에 대하여 고려되는 지에 대한 가정은 단백질 구조적 생물학자에 의한 주형 구조의 주관적인 평가 또는 육안 검사에 의하여 추론될 수 있다. 예를 들어, 가변 위치에 대하여 수소 결합 상호 작용이 유리할 수 있는 것으로 추측되는 경우에는, 심지어 상기 위치가 코어 상에 존재하는 경우에도, 수소 결합을 형성할 역량이 있는 극성 잔기가 고려될 수 있다. 유사하게, 가변 위치에 대하여 소수성 패킹 상호 작용이 유리할 수 있을 것으로 추측되는 경우에는, 심지어 상기 위치가 표면 상에 존재하는 경우에도, 유리한 패킹 상호 작용을 일으킬 역량이 있는 비극성 잔기가 고려될 수 있다. 가정에 따른 추론 방식의 접근법의 다른 예는, 골격 가요성 또는 단백질 폴드의 허여를 수반할 수 있다. 당 기술 분야에 공지된 바와 같이, 몇몇 잔기, 예를 들어 프롤린, 글라이신, 및 시스테인은 단백질의 구조 및 안정성에 있어 중요한 역할을 담당한다. 글라이신은 다른 모든 아미노산들보다 골격 가요성을 크게 할 수 있으며, 프롤린은 다른 모든 아미노산들보다 골격을 강하게 속박하며, 시스테인은 다이설파이드 결합을 형성할 수 있다. 그러므로, 원하는 설계 목표를 달성하기 위해서는, 하나 이상의 이들 아미노산 타입을 포함하는 것이 유리할 수 있다. 대안적으로, 이들 아미노산 타입 중 하나 이상을 고려되는 아미노산 리스트로부터 배제하는 것이 유리할 수 있다.

[0116] 대안적인 일면에 있어서, 서브세트의 아미노산은 보상 범위(coverage)를 최대화하기 위하여 선택될 수 있다. 이러한 경우, 주형 구조 내의 것들과 유사한 특성을 가지는 부가적인 아미노산이 가변 위치에 대하여 고려될 수 있다. 예를 들어, 주형 구조 내의 가변 위치의 잔기가 거대 소수성 잔기인 경우, 부가적인 거대 소수성 아미노산이 그 위치에 대하여 고려될 수 있다. 대안적으로, 서브세트의 아미노산은 다양성을 최대화하기 위하여 선택될 수 있다. 이러한 경우, 이러한 경우, 주형 구조 내의 것들과 유사한 특성을 가지는 아미노산이 가변 위치에 대하여 고려될 수 있다. 예를 들어, 주형 구조 내의 가변 위치의 잔기가 거대 소수성 잔기인 경우에는, 극성이 작은 아미노산이 고려될 수 있다.

[0117] 당 기술 분야에 공지된 바와 같이, 일부 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 방법에는, 설계 산출 과정 동안 측정된 고려되는 아미노산의 신원만이 요구된다. 즉, 아미노산 측쇄의 형태 또는 가능한 형태에 관한 정보가 전혀 요구되지 않는다. 기타 바람직한 방법에서는, 각각의 아미노산에 대하여 고려되는, 소위 로타머라 불리는 불연속적인 측쇄 형태의 세트가 이용된다. 그러므로, 한 세트의 로타머가 각각의 가변 위치 및 플롯되는 위치에 대하여 고려될 수 있다. 로타머는 공개되어 있는 로타머 라이브러리로부터 입수할 수 있다 (이에 대해서는 예를 들어 하기의 문헌을 참조한다: Lovel *et al.*, 2000, *Proteins: Structure Function and Genetics* 40: 389-408; Dunbrack & Cohen, 1997, *Protein Science* 6: 1661-1681; DeMaeyer *et al.*, 1997, *Folding and Design* 2: 53-66; Tuffery *et al.*, 1991, *J Biomol Struct Dyn* 8: 1267-1289, Ponder & Richards, 1987, *J Mol Biol* 193: 775-791). 당 기술 분야에 공지된 바와 같이, 로타머 라이브러리는 골격-비의존성 또는 골격-의존성일 수 있다. 로타머는 또한, 분자 역학(molecular mechanics) 또는 최초 산출, 및 기타 방법을 이용하여 획득할 수 있다. 바람직한 일면에 있어서는, 가요성 로타머 모델이 사용된다 (이에 대해서는 하기 문헌을 참조한다: Mendes *et al.*, 1999, *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 37: 530-543). 유사하게, 인위적으로 제작된 로타머가 사용될 수 있으며, 각각의 아미노산 및/또는 가변 위치에 대하여 선택된 세트를 증대시킬 수도 있다. 일면에 있어서, 에너지가 낮지 않은 적어도 하나의 형태가 로타머 리스트에 포함된다. 대안적인 일면에 있어서, 주형 구조 내의 가변 위치 잔기의 로타머가 그 가변 위치에 대하여 허가된 로타머 리스트에 포함된다. 대안적인 일면에 있어서는, 단지 가변 위치에 대하여 고려되는 각각의 아미노산의 신원만이 제공되며, 각각의 아미노산에 대한 특이적인 배위에 대한 언급은 설계 산출 과정 동안 사용되지 않는다. 즉, 로타머의 사용은 컴

퓨터 조작을 통한 스크리닝에 있어 필수적인 것이 아니다.

[0118] 실험적 정보는 가변 위치의 선정 및/또는 가변 위치에 대하여 고려되는 아미노산의 선정을 가이드하는 데 사용될 수 있다. 당 기술 분야에 공지된 바와 같이, 돌연변이가 유발 실험은 흔히, 단백질의 구조 및 기능에 있어서의 특정 잔기의 역할, 예를 들어, 어떠한 단백질 잔기가 안정성을 결정하는 데 역할을 담당하는 지, 또는 어떠한 잔기가 단백질-단백질 상호 작용의 경계면을 구성하는 지를 측정하기 위하여 실시된다. 그러한 실험으로부터 얻어지는 데이터는 본 발명에 유용하다. 예를 들어, Fc/Fc γ R 친화성 증진에 대한 가변 위치는, 돌연변이가 결합에 영향을 주는 것으로 확인된 모든 가변 위치를 포함할 수 있다. 유사하게, 그러한 실험으로부터 얻어지는 결과는 가변 위치에 대한 허가된 아미노산 타입의 선정을 가이드하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 특정 타입의 아미노산 치환이 유리할 것으로 확인된 경우, 그러한 아미노산의 유사한 타입의이 고려될 수 있다. 일면에 있어서, 실험적으로 유리할 것으로 확인된 것들과 유사한 특성을 가지는 부가적인 아미노산이 가변 위치에 대하여 고려될 수 있다. 예를 들어, 거대 소수성 잔기에 대한 Fc/Fc γ R 경계면에 있어서의 가변 위치에 대한 실험적 돌연변이가 유리한 것으로 확인된 경우, 사용자는 컴퓨터 조작 스크린 내에서 그 위치에 대하여 부가적인 거대 소수성 아미노산을 포함하는 것을 선택할 수 있다. 당 기술 분야에 공지된 바와 같이, 디스플레이 (display) 및 기타 선택 기술이 상기 선택된 특성에 대하여 유리한 아미노산 치환 리스트를 제작하기 위하여 유작위 돌연변이가 유발과 결합될 수 있다. 그러한 실험적 작업으로부터 얻어지는 리스트는 본 발명에 이용될 수 있다. 예를 들어, 그러한 실험에서 불변하는 것으로 확인된 위치는 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 산출 과정에서 가변 위치로서 배제될 수 있는 반면, 돌연변이가 보다 용이한 것으로 확인되었거나, 또는 돌연변이에 대하여 호의적으로 반응하는 것으로 확인된 위치는 가변 위치로서 선정될 수 있다. 유사하게, 그러한 실험으로부터 얻어진 결과는 가변 위치에 대한 허가된 아미노산 타입의 선정을 가이드하는 데 이용될 수 있다. 예를 들어, 특정 타입의 아미노산이 실험적 선택 과정에서 보다 높은 빈도로 발생하는 경우에는, 그러한 아미노산과 유사한 타입이 고려될 수 있다. 일면에 있어서, 실험적으로 유리할 것으로 확인된 것들과 유사한 특성을 가지는 부가적인 아미노산이 가변 위치에 대하여 고려될 수 있다. Fc/Fc γ R 경계면에 존재하는 가변 위치에 대한 선택된 돌연변이가 전하를 띠지 않는 극성 아미노산인 것으로 확인되는 경우, 사용자는 그 위치에 대하여 부가적인 전하를 띠지 않는 극성 아미노산, 또는 전하를 띠는 극성 아미노산을 포함하는 것을 선택할 수 있다.

[0119] 서열 정보는 또한, 가변 위치의 선정 및/또는 가변 위치에 대하여 고려되는 아미노산의 선정을 가이드하는 데 사용될 수 있다. 당 기술 분야에 공지된 바와 같이, 몇몇 단백질은 공통적인 구조적 스캐폴드를 공유하며, 서열에 있어 상동하다. 이러한 정보는 단백질 부류에 있어서의 특정 위치에 대한 식견을 획득하는 데 사용될 수 있다. 당 기술 분야에 공지된 바와 같이, 서열 정렬은 흔히, 단백질 잔기가 보존되어 있는 지 또는 보존되어 있지 않은지의 여부를 측정하기 위하여 실시된다. 즉, 단백질 서열의 정렬을 비교 및 대조함으로써, 한 위치에 대한 가변 정도를 확인할 수 있으며, 해당 위치에서 천연적으로 발생한 아미노산 타입을 확인할 수 있다. 그러한 분석으로부터 얻어지는 정보는 본 발명에 유용하다. 가변 위치 및 해당 가변 위치에 대한 고려되는 아미노산의 선정하는 데 있어 서열 정도를 사용하면 상당한 이점이 얻어진다. 가변 위치를 선정함에 있어 서열 정보를 이용하는 경우 얻어지는 일차적인 장점은 돌연변이가 경향이 보다 큰 위치 및 보다 작은 위치에 대한 정보를 얻을 수 있다는 것이다. 그러므로, 서열 정보는 질적 다양성, 즉 단백질의 구조, 안정성 등에 대하여 유해하지 않은 돌연변이가 컴퓨터 조작을 통해 샘플링되도록 하는 데에 도움이 될 수 있다. 동일한 장점이 가변 위치에 대하여 고려되는 아미노산을 선택하기 위하여 서열 정보를 이용하는 데에 적용된다. 즉, 단백질 서열 정렬에 있어 발생할 수 있는 아미노산 세트는, 단백질의 구조, 안정성, 용해성, 기능 등과의 양립 가능성에 면에서, 무작위 정렬보다 높은 기회를 가지기 위하여 전개에 의하여 사전-스크리닝될 수 있을 것으로 여겨진다. 그러므로, 보다 높은 질적 다양성이 컴퓨터 조작을 통해 샘플링된다. 가변 위치에 대하여 고려되는 아미노산 타입을 선정함에 있어 서열 정보를 이용하는 경우 얻어지는 두 번째 장점은 특정 정렬이 무작위 서열보다 면역원성이 작을 수 있는 서열을 제시할 수 있다는 점이다. 예를 들어, 주어진 가변 위치에 대하여 고려되는 아미노산이 인간 단백질 서열의 정렬 시 그 위치에서 발생한 아미노산 세트인 경우, 그러한 아미노산은 최적화된 단백질이 인간 치료제로서 사용되는 경우, 면역 반응을 전혀 또는 낮게 야기하는 성질에 대하여 사전-스크리닝될 수 있을 것으로 여겨진다.

[0120] 상기 서열의 공급원은 매우 가변적일 수 있으며, 이들로 제한되지는 않으나, 다음을 포함하는, 공지된 데이터베이스 중 하나를 포함한다: Kabat database (Johnson & Wu, 2001, *Nucleic Acids Res* 29: 205-206; Johnson & Wu, 2000, *Nucleic Acids Res* 28: 214-218), IMGT database (IMGT, the international ImMunoGeneTics informationsystem^(R); Lefranc *et al.*, 1999, *Nucleic Acids Res* 27: 209-212; Ruiz *et al.*, 2000 *Nucleic Acids Re.* 28: 219-221; Lefranc *et al.*, 2001, *Nucleic Acids Res* 29: 207-209; Lefranc *et al.*, 2003,

Nucleic Acids Res 31: 307-310), 및 VBASE, SwissProt, GenBank and Entrez, 및 EMBL Nucleotide Sequence Database. 단백질 서열 정보는, 이들로 제한되지는 않으나, 포유류를 포함하는 임의의 유기체 유래의 천연 발생 단백질의 서열 정렬로부터 입수, 수집, 및/또는 제작될 수 있다. 단백질 서열 정보는, 개인적으로 수집된 데이터베이스로부터 입수될 수 있다. 수많은 서열-기준 정렬 프로그램 및 당 기술 분야에 공지된 방법이 존재하며, 이들 모두, 본 발명에 있어 Fc 및 Fc 리간드를 포함하는 단백질의 서열 정렬을 제작하는 데에 이용될 수 있다.

[0121] 일단 정렬이 완성되면, 서열 정보는 가변 위치의 선정을 가이드하는 데 사용될 수 있다. 그러한 서열 정보는 주어진 위치에 대한 상기 가변성과 관련이 있을 수 있다. 본원에 있어서, 가변성은 가변 위치와 구별되어야 한다. 가변성은, 서열 정렬 내의 주어진 위치가 거기에서 발생하는 아미노산 타입에 대하여 변화(variation)를 나타내는 정도를 일컫는다. 다시 말해, 가변 위치는 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 산출 과정 동안 아미노산 신원을 변화시키기 위하여 사용자에게 의하여 선정된 위치를 일컫는다. 가변성은 바이오인포매틱스(bioinformatics) 분야의 전문가에 의하여 정량적으로 측정될 수 있다. 또한, 확인될 수 있는 가변성을 정략적으로 측정하는 당 기술 분야에 공지된 방법도 본 발명에 이용 가능하다. 가장 바람직한 일면에 있어서, 엔트로피(Entropy) 또는 쉐논 엔트로피(Shannon Entropy) 정보가 측정된다. 가변 위치는 밀접하게 관련된 단백질 서열, 또는 보다 덜 밀접하게 관련된 단백질 서열로부터 입수된 서열 정보를 기준으로 선정될 수 있다.

[0122] 가변 위치를 선정하기 위하여 서열 정보를 사용하는 것 또한 본 발명에 광범위하여 이용된다. 예를 들어, 주형 구조 내의 Fc/Fc γ R 경계면 위치가 트립토판인 경우, 및 트립토판이 한 정렬 내에서 서열의 90% 이상으로 그 위치에서 관찰되는 경우, 그 위치는 고정된 상태로 유지시키는 것이 유리할 수 있다. 반면, 또 다른 하나의 경계면 위치가 보다 큰 가변성 수준을 가지는 것으로 확인되는 경우, 예를 들어 5개의 상이한 아미노산이 각각 대략 20%의 빈도로 그 위치에서 관찰되는 경우, 그 위치가 가변 위치로서 선정될 수 있다. 또 다른 일면에 있어서, 정렬된 단백질 서열에 대한 육안 검사가 단백질 구조에 대한 육안 검사를 대체하거나, 이에 도움을 줄 수 있다. 서열 정보는 또한 가변 위치에 대하여 고려되는 아미노산의 선정을 가이드하는 데에도 사용될 수 있다. 그러한 서열 정보는 아미노산, 아미노산, 또는 아미노산 타입 (예를 들어 극성 또는 비극성, 전하를 띠는 또는 전하를 띠지 않는)이 주어진 위치에서 자연적으로 또는 그 외의 방식으로 발생하는 빈도와 관련될 수 있다. 일면에 있어서, 가변 위치에 대하여 고려되는 아미노산 세트는 정렬 시 그 위치에서 관찰되는 아미노산의 세트를 포함한다. 그러므로, 상기 위치-특이성 정렬 정보는 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 산출 시 가변 위치에 대하여 고려되는 아미노산의 리스트를 제작하는 데에 직접 사용된다. 그러한 전략은 당 기술 분야에 공지되어 있으며, 이에 대해서는 예를 들어 다음과 같은 문헌을 참조한다: Lehmann & Wyss, 2001, *Curr Opin Biotechnol* 12 (4): 371-5; Lehmann *et al.*, 2000, *Biochim Biophys Acta* 1543 (2): 408-415; Rath & Davidson, 2000, *Protein Sci*, 9 (12): 2457-69; Lehmann *et al.*, 2000, *Protein Eng* 13(1): 49-57; Desjarlais & Berg, 1993, *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (6): 2256-60; Desjarlais & Berg, 1992, *Proteins* 12 (2): 101-4; Henikoff & Henikoff, 2000, *Adv Protein Chem* 54: 73-97; Henikoff & Henikoff, 1994, *J Mol Biol* 243 (4): 574-8. 대안적인 일면에 있어서, 가변 위치 또는 가변 위치들에 대하여 고려되는 아미노산 아미노산 세트는 정렬에 있어 가장 높은 빈도로 관찰되는 아미노산 세트를 포함할 수 있다. 그러므로, 특정 표준이 아미노산 또는 아미노산 타입의 빈도가 가변 위치에 대하여 고려되는 아미노산 세트에 있어서의 그의 포함을 보장하는 지의 여부를 측정하는 데에 적용된다. 당 기술 분야에 공지된 바와 같이, 서열 정렬은 정렬 내의 임의의 위치에 대한 서열 다양성, 및 한 위치에 대한 각각의 아미노산의 발생 빈도 및 가능성을 산출하는 통계 방법을 이용하여 분석될 수 있다. 이어서, 그러한 데이터는 어느 아미노산 타입이 고려되어야 하는 지를 결정하는 데 사용될 수 있다. 가장 간단한 일면에 있어서, 이러한 발생 빈도는 한 아미노산이 하나의 정렬 위치에서 관찰되는 회수를 카운트한 뒤, 이를 상기 정렬 내의 서열의 총수로 나눔으로써 산출된다. 다른 일면에 있어서, 카운트 절차에 대한 각각의 서열, 위치 또는 아미노산의 기여 정도는 다양한 가능한 메커니즘에 의하여 측정된다. 바람직한 일면에 있어서, 빈도 전략에 대한 각각의 정렬된 서열의 기여 정도는, 그 정렬 내의 기타 서열과 비교한 그의 다양성에 따라 결정된다. 이를 달성하는 통상적인 전략으로는, Henikoff 및 Henikoff에 의하여 제안된 서열 웨이팅 시스템 (sequence weighting system)이 있다 (Henikoff & Henikoff, 2000, *Adv Protein Chem* 54: 73-97; Henikoff & Henikoff, 1994, *J Mol Biol* 243: 574-8). 바람직한 일면에 있어서, 통계에 대한 각각의 서열의 기여도는 표적 서열, 즉, 사용되는 주형 구조에 대한 유사성의 크기에 따라 좌우되며, 표적 서열에 대한 유사성이 큰 서열일수록 보다 크게 기여한다. 유사성 측정의 예로는, 이들로 제한되지는 않으나, 서열 신원, BLOSUM 유사성 스코어(similarity score), PAM 매트릭스 유사성 스코어, 및 BLAST 스코어가 포함된다. 대안적인 일면에 있어서, 통계에 대한 각각의 서열의 기여도는 그의 알려져 있는 물리적 또는 기능적 특성들에 따라 좌우된다. 그러한 특성으로는, 이들로 제한되지는 않으나, 열 안정성 및 화학적 안정성, 활성에 대한 기여도, 및 용해성이 포함된다.

다. 예를 들어, 아글라이코실화된 Fc를 용해성에 대하여 최적화하는 경우, 가용성이 가장 큰 것으로 알려져 있는 정렬의 서열(이에 대해서는 예를 들어 다음 문헌 참조: Ewert *et al.*, 2003, *J Mol Biol* 325: 531-553)이 산출된 빈도에 대하여 가장 크게 기여할 것이다.

[0123] 가변 위치에 대하여 고려될 서열 정렬 내의 아미노산 세트를 선정하기 위하여 적용되는 표준의 종류에 관계없이, 서열 정보를 이용해 고려되는 아미노산을 선정하는 방식이 본 발명에 이용된다. 예를 들어, 노출된 비극성 표면 잔기의 대체에 의하여 Fc의 용해성을 최적화하기 위하여, 고려되는 아미노산이, 일부 표준을 충족시키며, 단백질 서열의 정렬 내의 그 위치에서 관찰되는 아미노산 세트, 또는 그러한 아미노산의 서브세트로서 선정될 수 있다. 또 다른 하나의 일례로서, 하나 이상의 아미노산이, 보상 범위를 최대화하기 위하여 서열 정렬로부터 유래되는 아미노산 리스트로부터 주관적으로 공제되거나 첨가될 수 있다. 예를 들어, 서열 정렬 내에서 발견되는 것들과 유사한 특성을 가지는 부가적인 아미노산이 가변 위치에 대하여 고려될 수 있다. 예를 들어, Fc γ R을 결합시키는 것으로 알려져 있는 또는 그러한 것으로 가정되는 Fc 위치가 서열 정렬 내에 전하를 띠지 않는 극성 아미노산을 가지는 것으로 관찰되는 경우, 사용자는 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 산출 시 부가적인 전하를 띠지 않는 극성 아미노산 또는, 또는 그 위치에 대하여 전하를 띠는 극성 아미노산을 포함하는 것으로 선택할 수 있다.

[0124] 일면에 있어서, 서열 정렬 정보는, 이하에 설명한 바와 같이, 에너지 산출과 조합된다. 예를 들어, 허위 에너지가, 스코어링 함수(scoring function)를 생성시키기 위하여 서열 정보로부터 유도될 수 있다. 서열-기준 스코어링 함수를 사용하면, 산출의 복잡성을 감소시키는 데 도움이 될 수 있다. 그러나, 당업자라면, 서열 정보는 흔히 실제로 구조적으로 상충될 수 있는 돌연변이들 사이의 그릇된 상관 관계를 나타낼 수 있기 때문에, 서열-기준 스코어링 함수의 단독 사용은 부적합할 수 있음을 이해할 것이다. 그러므로, 바람직한 일면에 있어서, 구조-기준 에너지 산출 방법이 단독으로 또는 서열-기준 스코어링 함수와 함께 사용된다. 즉, 바람직한 일면에 있어서, 서열 정렬 정보는 분석 단계에 단독으로 사용되지 않는다.

[0125] 에너지 산출이란, 아미노산 변형이 스코어링되는 과정을 일컫는다. 상호 작용 에너지는 하나 이상의 스코어링 함수에 의하여 측정된다. 다양한 스코어링 함수가 본 발명에 있어 에너지를 산출하는 데에 이용된다. 스코어링 함수는 임의의 전위의 수를 포함할 수 있으며, 본원에 있어서, 전위란 스코어링 함수의 에너지 텀(term)을 일컬으며, 이들로 제한되지는 않으나, 반 데르 발스 전위, 수소 결합 전위, 원 용매화 전위(atomic solvation potential) 또는 기타 용매화 모델, 2차 구조 성향 전위(secondary structure propensity potential), 정전기적 전위(electrostatic potential), 비틀림 전위(torsional potential), 및 엔트로피 전위가 포함된다. 에너지 텀은 위치, 고려되는 아미노산, 및 기타 고려 사항에 따라 달라지나, 각각의 가변 또는 플롯되는 위치를 스코어링하는 데에는 적어도 하나의 에너지 텀이 사용된다. 일면에 있어서, 하나의 에너지 텀을 이용하는 스코어링 함수가 사용된다. 가장 바람직한 일면에 있어서, 에너지는, 반 데르 발스, 용매화, 정전기적, 및 수소 결합 상호 작용, 및 이들의 조합된 작용을 나타내는 하나 이상의 에너지 텀을 함유하는 스코어링 함수를 이용하여 산출된다. 부가적인 일면에 있어서, 부가적인 에너지 텀은, 이들로 제한되지는 않으나, 엔트로피 텀, 비틀림 에너지, 및 정보-기준 에너지를 포함한다.

[0126] US 6,188,965; US 6,269,312; US 6,403,312; USSN 09/782,004; USSN 09/927,790; USSN 09/877,695; USSN 10/071,859, USSN 10/218,102; PCT WO 98/07254; PCT WO 01/40091; 및 PCT WO 02/25588에는, 다양한 스코어링 함수가 개시되어 있다. 당업자라면, 스코어링 함수가 물리-화학적 에너지 텀으로 제한될 필요가 없음을 인지할 것이다. 예를 들어, 본 발명의 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 방법에는 지식-기준 전위가 사용될 수 있다. 그러한 지식-기준 전위는 단백질 서열 및/또는 구조 통계로부터 유도되며, 이들로 제한되지는 않으나, 서열 정렬로부터 유도되는 트래딩 전위(threading potential), 참조 에너지(reference energy), 허위 에너지, 상동성-기준 에너지, 및 서열 성향을 포함한다. 바람직한 일면에 있어서, 스코어링 함수는, MHC에 대한 펩타이드의 결합에 대하여 데이터로부터 유도되는 함수와 같이, 면역원성에 대한 모델을 포함하도록 변형되며 (Major Htocompatibility Complex), 이는 잠재인 면역원성 서열을 동정하는 데 사용될 수 있다 (이에 대해서는 예를 들어 하기 문헌을 참조한다: USSN 09/903,378; USSN 10/039,170; USSN 60/222,697; USSN 10/339788; PCT WO 01/21823; 및 PCT W002/00165). 일면에 있어서, 서열 정렬 정보는 아미노산 치환을 스코어링하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 단백질 서열의 비교가, 단백질의 공급원이 인간, 원숭이, 마우스 또는 그 외의 것 중 어느 것인지의 여부에 관계없이, 본 발명의 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 방법에 있어서 아미노산 돌연변이를 추측 또는 스코어링하는 데 사용될 수 있다. 일면에 있어서, 당 기술 분야에 공지된 바와 같이, 하나 이상의 스코어링 함수가, 컴퓨터 조작 분석 과정 동안 최적화 또는 "트레이닝(trained)"될 수 있으며, 이후 상기 최적화된 시스템을 이용하여 분석이 재실시될 수 있다. 그러한 변형된 스코어링 함수는, 예를 들어, 실험 데이터를 이용하

여 스코어링 함수를 트레이닝함으로써 얻을 수 있다. 당업자라면, 하나 이상의 에너지 텀으로 구성되는 다수의 역장(force field)이 스코어링 함수로서 제공될 수 있음을 이해할 것이다. 역장은, 이들로 제한되지는 않으나, 최초 또는 양자 역학적 역장(quantum mechanical force field), 반-경험적 역장(semi-empirical force field), 및 분자 역학적 역장(molecular mechanics force field)을 포함한다. 지식을 기준으로 하거나, 통계 방법을 이용하는 스코어링 함수가 본 발명에 사용될 수 있다. 이들 방법은 서열 및 3차원 단백질 구조 사이의 매치(match)를 평가하는 데 사용될 수 있으며, 따라서 단백질 구조에 대한 충실도(fidelity)에 대하여 아미노산 치환을 스코어링하는 데 사용될 수 있다. 일면에 있어서, 분자 역학 산출(molecular dynamics calculation)이 돌연변이 서열 스코어를 개별적으로 산출함으로써 서열을 컴퓨터 조작을 통해 스크리닝하는 데 사용될 수 있다.

[0127] 유효한 에너지 산출을 가능하게 하기 위하여 아미노산을 제시하는 다양한 방법이 존재한다. 바람직한 일면에 있어서, 고려되는 아미노산은 상술한 바와 같이 로타머로서 제시되며, 기타 가변 및 플롯되는 로타머, 고정된 위치의 잔기, 및 골격 구조 및 임의의 비단백질성 원자와 함께, 각각의 가변 위치 및 플롯되는 위치에 대한 각각의 가능한 로타머의 상호 작용 에너지(또는 스코어)가 산출된다. 바람직한 일면에 있어서, 다음과 같은 두 세트의 상호 작용 에너지가, 모든 가변 및 플롯되는 위치 각각에 대한 각각의 측쇄 로타머에 대하여 산출된다: 로타머 및 고정된 원자 사이의 상호 작용 에너지 ("단일(single)" 에너지); 그리고 가변 및 플롯되는 위치의 로타머 및 기타 가변 및 플롯되는 위치 각각에 대한 기타 가능한 로타머 사이의 상호 작용 에너지 ("이중(double)"에너지). 대안적인 일면에 있어서, 단일 및 이중 에너지는 고정된 위치뿐 아니라, 가변 및 플롯되는 위치에 대하여 산출된다. 대안적인 일면에 있어서, 고려되는 아미노산은 로타머로서 제시되지 않는다.

[0128] 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝의 중요한 성분은 유리한 스코어, 즉 에너지가 낮은 하나 이상의 서열을 동정하는 것이다. 막대한 가능성들 중에서 낮은 에너지 서열 세트를 결정하는 것을 사소한 것이나, 이러한 문제를 해결하기 위하여, 조합적 최적화 알고리즘이 활용된다. 조합적 최적화 알고리즘에 대한 요구는 통상적인 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 산출에서 고려되는 가능성 개수의 조사에 의하여 예시된다. 불연속적인 로타머 세트의 성질은, 주어진 설계 문제에 대하여 가능한 로타머 서열의 개수의 간단한 산출을 가능하게 한다. 위치당 n 과 m 의 가능한 로타머 길이의 골격이 가능한 로타머 서열을 가질 것이며, 그 수는 서열 길이에 대한 지수 함수로서 증가할 것이다. 매우 간단한 산출의 경우, 최적의 서열 및/또는 하나 이상의 유리한 서열을 동정하기 위하여 각각의 가능한 서열을 조사할 수 있다. 그러나, 통상적인 설계 문제의 경우, 가능한 서열의 개수(10^{80} 또는 그 이상)는, 각각의 가능한 서열이 처리될 수 없을 정도로 충분히 크다. 그러므로, 최적의 서열 및/또는 하나 이상의 유리한 서열을 동정하기 위하여, 다양한 조합적 최적화 알고리즘이 사용될 수 있다. 조합적 최적화 알고리즘은, 다음과 같은 2개의 클래스로 분류될 수 있다: (1) 그들이 수렴되는 경우, 전체적인 최소 에너지 배위의 복귀를 보장하는 알고리즘; 및 (2) 전체적인 최소 에너지 배위의 복귀를 보장하지는 않으나, 항상 용액을 복귀시키는 알고리즘. 상기 제1 클래스의 알고리즘의 예로는, 이들로 제한되지는 않으나, 다음과 같은 것들이 포함된다: Dead-End Elimination(DEE) 및 Branch & Bound(B & B) (Branch and Terminate 포함) (Gordon & Mayo, 1999, *Structure Fold Des* 7: 1089-98). 상기 제2 클래스의 알고리즘의 예로는, 이들로 제한되지는 않으나, 다음과 같은 것들이 포함된다: Monte Carlo(MC), 자가-일치 평균 필드(self-consistent mean field; SCMF), Boltzmann 샘플링(Metropolis *et al.*, 1953, *J Chem Phys* 21: 1087), 촉진되는 어닐링(simulated annealing) (Kirkpatrick *et al.*, 1983, *Science*, 220: 671-680), 유전학적 알고리즘(genetic algorithm; GA), 및 Fast and Accurate Side-Chain Topology and Energy Refinement (FASTER) (Desmet, *et al.*, 2002, *Proteins*, 48: 31-43). 조합적 최적화 알고리즘은 단독으로도 사용될 수 있고, 또 다른 조합적 최적화 알고리즘과 조합하여 사용될 수도 있다.

[0129] 본 발명의 일면에 있어서, 조합적 최적화 알고리즘을 적용하는 전략은 전체적인 최소 에너지 배위를 발견하는 것이다. 대안적인 일면에 있어서, 상기 전략은 하나 이상의 낮은 에너지 또는 유리한 서열을 발견하는 것이다. 대안적인 일면에 있어서, 상기 전략은 전체적인 최소 에너지 배위를 발견한 뒤, 하나 이상의 낮은 에너지 또는 유리한 서열을 발견하는 것이다. 이에 대해서는 예를 들어, USSN 6,269,312에 개략적으로 설명되어 있다. 바람직한 일면에 있어서, Dead End Elimination (DEE) 단계 및 Monte Carlo 단계가 이용된다. 다른 일면에 있어서, 타부(tabu) 검색 알고리즘이 이용되거나, 기타 검색 방법 중 DEE 및/또는 Monte Carlo와 조합하여 이용된다 (Modern Heuristic Search Methods, edited by V. J. Rayward-Smith *et al.*, 1996, John Wiley & Sons Ltd.; USSN 10/218,102; and PCT WO 02/25588). 또 다른 바람직한 일면에 있어서, 유전학적 알고리즘이 이용되며, 이에 대해서는 예를 들어 USSN 09/877,695 및 USSN 10/071,859를 참조한다. 또 다른 일례로서는, US

6,188,965; US 6,269,312; US 6,403,312; USSN 09/782,004; USSN 09/927,790; USSN 10/218,102; PCT WO 98/07254; PCT WO 01/40091; 및 PCT WO 02/25588에 보다 상세히 설명되어 있는 바와 같이, 전체적인 최적에 도달할 수 있으며, 이후 컴퓨터 조작 프로세싱(processing)이 발생해, 부가적인 최적화된 서열을 제작할 수 있다. 가장 간단한 일면에 있어서, 설계 산출은 조합적이지 않다. 즉, 에너지 산출값은 단일 가변 위치에 대한 개별적인 아미노산 치환을 평가하는 데 사용된다. 기타 산출값의 경우에는, 하나 이상의 가변 위치에 대하여 아미노산을 평가하는 것이 바람직하다. 바람직한 일면에 있어서, 모든 가능한 상호 작용 에너지는 조합적 최적화 이전에 산출된다. 대안적으로 바람직한 일면에 있어서, 에너지는, 필요한 경우, 조합적 최적화 과정 동안에 산출될 수 있다.

[0130] **라이브러리 제작**

[0131] 본 발명은, 최적화된 Fc 변이체들 중 하나에 대하여 실험적으로 스크리닝될 수 있는 라이브러리를 제작하는 방법을 제공한다. "라이브러리(library)"란, 본원에 사용된 바와 같이, 하나 이상의 Fc 변이체의 세트를 의미한다. 라이브러리는 임의의 형태의 변이체 세트를 일컬을 수 있다. 일면에 있어서, 상기 라이브러리는, 핵산 또는 아미노산 서열의 리스트, 또는 가변 위치에 대한 핵산 또는 아미노산 치환의 리스트이다. 예를 들어, 본 발명을 예시하기 위한 하기의 실시예들은, 가변 위치에 대한 아미노산 치환으로서 라이브러리를 제공한다. 일면에 있어서, 라이브러리는 원하는 특성에 대하여 최적화된 Fc 변이체인 적어도 하나의 서열의 리스트이다. 이에 대해서는 예를 들어 하기의 문헌을 참조한다: Filikov *et al.*, 2002, *Protein Sci* 11: 1452-1461 and Luo *et al.*, 2002, *Protein Sci* 11: 1218-1226. 대안적인 일면에 있어서, 라이브러리는 조합적 리스트로서 규정될 수 있으며, 이는 아미노산 치환의 리스트가 각각의 가변 위치에 대하여 제작되었음을 의미하며, 각각의 치환이 모든 기타 가변 위치에 대하여 모든 기타 설계된 치환과 조합되는 의미를 내포한다. 이러한 경우, 모든 가변 위치에 대하여 모든 가능성의 조합을 확장시키면, 거대한 명확하게 규정된 라이브러리가 얻어진다. 라이브러리는, Fc 부위 또는 Fc 부위의 일부 도메인 또는 단편을 포함하는 폴리펩타이드의 물리적 조성물을 일컬을 수 있다. 그러므로, 라이브러리는, 정제된 형태 또는 정제되지 않은 형태의 항체 또는 Fc 융합체의 물리적 조성물을 일컬을 수 있다. 라이브러리는, 상기 라이브러리 서열을 코딩하는 핵산의 물리적 조성물을 일컬을 수 있다. 상기 핵산은 상기 라이브러리 일원을 코딩하는 유전자, 임의의 유효하게 결합된 핵산을 가지는 상기 라이브러리 일원을 코딩하는 유전자, 또는 임의의 기타 유효하게 결합된 조절 서열, 선별 가능한 마커, 융합 구조체, 및/또는 기타 요소(element)와 함께 상기 라이브러리 일원을 코딩하는 발현 벡터일 수 있다. 예를 들어, 상기 라이브러리는, Fc 라이브러리 일원을 코딩하는 포유류의 발현 벡터 세트일 수 있으며, 상기 단백질 산물은 후속하여 발현, 정제, 및 실험적으로 스크리닝될 수 있다. 또 다른 일례로서, 상기 라이브러리는 디스플레이 라이브러리일 수 있다. 그러한 라이브러리는 예를 들어, 파지(phage) 디스플레이, 리보솜(ribosome) 디스플레이, 효모(yeast) 디스플레이, 박테리아 표면 디스플레이 등을 가능하게 하는, 몇몇 융합 파트너에 유효하게 결합된 라이브러리 일원을 코딩하는 발현 벡터의 세트를 포함할 수 있다.

[0132] 상기 라이브러리는 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝으로부터 얻어진 출력 서열 또는 서열들을 이용하여 제작될 수 있다. 이상에서 논의된 바와 같이, 컴퓨터 조작을 통해 제작된 라이브러리는, 무작위적으로 제작된 라이브러리에 비하여, 안정된, 적당하게 폴딩된, 기능적 서열에 대하여 유의하게 강화되어 있다. 결과적으로, 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝은, 설계 목표에 대하여 최적화된 단백질의 동정 기회를 증가시킨다. 몇몇 경우, 라이브러리는 모체 서열을 함유하는 것이 바람직할 수 있으나, 라이브러리 내의 서열 세트는 일반적으로, 항상 그러한 것은 아니지만, 모체 서열과 현저히 상이하다. 당 기술 분야에 공지된 바와 같이, 라이브러리가 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 산출의 출력 결과로부터 유래되는 다양한 방식이 있다. 예를 들어, US 6,403,312; USSN 09/782,004; USSN 09/927,790; USSN 10/218,102; PCT WO 01/40091; 및 PCT WO 02/25588에 개시된 라이브러리 제작 방법이 본 발명에 이용될 수 있다. 일면에 있어서, 전체적인 최적의 서열의 특정 범위의 이내의 서열 스코어링이 라이브러리에 포함될 수 있다. 예를 들어, 상기 최저 에너지 서열의 10 kcal/mol 이내의 모든 서열이 라이브러리로서 사용될 수 있다. 대안적인 일면에 있어서, 하나 이상의 국부적 최소 서열의 특정 범위 이내에서 서열 스코어링이 사용될 수 있다. 바람직한 일면에 있어서, 상기 라이브러리 서열은 필터링된 세트로부터 얻어진다. 그러한 리스트 또는 세트는 당 기술 분야에 공지된 다양한 방법, 예를 들어 Monte Carlo, B & B, 또는 SCMF과 같은 알고리즘을 이용하여 제작될 수 있다. 예를 들어, 필터링된 세트 내의 상위 10^3 또는 상위 10^5 개의 서열이 라이브러리를 포함할 수 있다. 대안적으로, 모든 돌연변이의 조합에 의하여 규정되는 서열의 총수가 라이브러리에 대한 컷오프(cutoff) 표준으로서 사용될 수 있다. 재조합된 서열의 총수에 대한 바람직한 값은 10 내지 10^2 범위이며, 특히 바람직한 값은 100 내지 10^9 범위이다. 대안적으로, 컷오프는, 위치당 소정의 개수의 돌연변이가 도달되는 경우에 강요될 수 있다. 몇 가지 일면에 있어서, 컷오프를 만들지 않는 서열이

라이브러리 내에 포함된다. 이는 몇몇 경우, 예를 들어 라이브러리 제작에 대한 접근법을 평가하는 경우, 대조군 또는 비교군을 제공하는 경우, 또는 부가적인 서열 스페이스를 샘플링하는 경우에 바람직할 수 있다. 예를 들어, 심지어 모체 서열이 컷오프를 만들지 않는 경우일 지라도, 그러한 모체 서열이 라이브러리 내에 포함될 수 있다.

[0133] 클러스터링 알고리즘(Clustering algorithm)은, 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 방법에 의하여 유도된 서열을 대표적인 그룹으로 분류하는 데에 유용할 수 있다. 예를 들어, USSN 10/218,102 및 PCT WO 02/25588에 개시된 클러스터링 방법 및 그의 적용 방법이 본 발명에 이용될 수 있다. 대표적인 그룹은 예를 들어 유사성에 의하여 규정될 수 있다. 유사성의 측정값은, 이들로 제한되지는 않으나, 서열 유사성 및 에너지 유사성을 포함한다. 그러므로, 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝으로부터 얻어지는 출력 서열은 국부적 최소 서열 주변에서 클러스터링될 수 있으며, 본원에 있어서 이는 클러스터링된 서열 세트라 일컬어진다. 예를 들어, 서열 스페이스 내에 근접한 서열의 세트가 기타 세트들로부터 구별될 수 있다. 일면에 있어서, 클러스터링된 세트들의 하나의 서브세트 이내의 보상 범위는, 클러스터링된 서열 세트의 하나 이상을 구성하는 서열의 일부, 대부분 또는 모두를 라이브러리 내에 포함시킴으로써 최대화될 수 있다. 예를 들어, 라이브러리 내에 이들 세트 내의 대다수의 서열을 포함시킴으로써, 1개, 2개, 또는 3개의 최저 에너지 클러스터링된 세트 이내의 보상 범위를 최대화하는 것이 유용할 수 있다. 대안적인 일면에 있어서, 클러스터링된 세트의 서열 전반에 걸친 다양성은 라이브러리 이내에 각각의 클러스터링된 세트 이내의 단지 한 서브세트의 서열만을 포함시킴으로써 샘플링될 수 있다. 예를 들어, 각각의 클러스터링된 세트 유래의 최저 에너지 서열을 라이브러리 내에 포함시킴으로써, 모든 또는 대부분의 클러스터링된 세트가 광범위하게 샘플링될 수 있었다.

[0134] 서열 정보는, 라이브러리 제작으로 위하여, 컴퓨터 조작을 통해 스크리닝 결과를 가이드 또는 필터링하는 데에 사용될 수 있다. 상술한 바와 같이, 단백질 서열의 정렬을 비교 및 대조함으로써, 한 위치에 대한 가변 정도 및 그 위치에서 천연적으로 발생하는 아미노산 타입이 확인될 수 있다. 그러한 분석으로부터 얻어지는 데이터는 본 발명에 유용하다. 서열 정보를 이용하는 경우 얻어지는 장점에 대해서는 이상에 제시되어 있으며, 그러한 장점들이 라이브러리 제작을 가이드하기 위하여 서열 정보를 사용하는 경우에 동등하게 적용된다. 서열 정렬 시 발생하는 아미노산 세트는, 단백질의 구조, 안정성, 용해성, 기능, 및 면역원성과의 양립성 면에서 무작위 정렬보다 높은 기회를 가지기 위하여 전개에 의하여 사전-스크리닝될 수 있을 것으로 여겨진다. 상술한 바와 같은, 서열 공급원의 다양성 및 서열 정렬을 제작하는 방법이, 라이브러리 제작을 가이드하기 위한 서열 정보에도 적용된다. 유사하게, 이상에서 논의된 바와 같이, 한 정렬 내의 특정 잔기의 중요성 및 중량을 측정하는 데에는 다양한 표준이 적용될 수 있다. 이들 방법 또한, 라이브러리 제작을 가이드하기 위한 서열 정보에도 적용된다. 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝의 결과로부터 얻어지는 라이브러리 제작을 가이드하기 위한 서열 정보는 본 발명에 광범위하게 사용된다. 일면에 있어서, 서열 정보 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 출력 결과로부터 얻어지는 서열을 필터링하는 데 사용된다. 즉, 라이브러리를 제작하기 위하여, 일부의 치환이 컴퓨터 조작 출력 결과로부터 공제된다. 예를 들어, 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 산출 또는 산출들의 얻어진 출력 결과는, 라이브러리가, 예를 들어 서열의 정렬 시 그 위치에서 관찰되는, 일부 표준만을 충족시키는 단지 그러한 아미노산, 또는 그러한 아미노산의 서브세트만을 포함하도록 필터링될 수 있다. 대안적인 일면에 있어서, 서열 정보는 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 출력에 서열을 첨가하는 데에 사용된다. 즉, 서열 정보는, 라이브러리를 제작하기 위하여 컴퓨터 조작 출력에 첨가되는 부가적인 아미노산의 선정을 가이드하는 데 사용된다. 예를 들어, 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 산출로부터의 주어진 위치에 대한 아미노산의 출력 세트는, 단백질 서열의 정렬 시 그 위치에서 관찰되는 하나 이상의 아미노산을 포함하도록 증대될 수 있다. 대안적인 일면에 있어서, 서열 정렬 정보를 기준으로 하여, 보상 범위 또는 다양성을 최대화하기 위하여, 하나 이상의 아미노산이 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 서열 출력에 대하여 첨가되거나 공제될 수 있다. 예를 들어, 서열 정렬에 있어서 발견되는 것들과 유사한 특성을 가지는 부가적인 아미노산이 상기 라이브러리에 첨가될 수 있다. 예를 들어, 한 위치가 서열 정렬에 있어서 전하를 띠지 않는 극성 아미노산을 가지는 것으로 관찰되는 경우, 부가적인 전하를 띠지 않는 극성 아미노산이 상기 라이브러리의 그 위치에 첨가될 수 있다.

[0135] 라이브러리는, 후속의 라이브러리를 제작하기 위하여, 추가 프로세싱될 수 있다. 이러한 방식으로, 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 산출로부터의 출력 결과는 1차 라이브러리로 간주될 수 있다. 이러한 1차 라이브러리는, 기타 산출로부터 얻어지는 기타 2차 라이브러리, 또는 후속의 산출, 서열 정보, 또는 기타 분석 방법을 이용하여 프로세싱되는, 또는 후속의 라이브러리를 제작하기 위하여 실험적으로 프로세싱되는 또 다른 라이브러리와 조합될 수 있으며, 이러한 또 다른 라이브러리를 본원에서는 2차 라이브러리라 일컫는다. 본원으로부터 이해되는 바와 같이, 상술한 바와 같이, 라이브러리를 가이드 또는 필터링하기 위한 서열 정보를 이용하는 것은, 그 자체가 1차 라이브러리로부터 2차 라이브러리를 제작하는 한가지 방법이다. 2차 라이브러리의 제작은, 사용자

들로 하여금 한 라이브러리 내의 매개변수(parameter)들을 보다 크게 통제할 수 있도록 한다. 이는 보다 유효한 실험적 스크리닝을 가능하게 하며, 실험 결과로부터의 피드백(feedback)의 보다 용이하게 해석을 가능하게 할 수 있으며, 이는 보다 유효한 설계/실험 사이클을 제공한다.

[0136] 1차 라이브러리로부터 2차 라이브러리를 제작하는 다양한 방법이 존재한다. 예를 들어, USSN 10/218,102 및 PCT WO 02/25588에는, 본 발명에 이용할 수 있는 2차 라이브러리 제작 방법이 개시되어 있다. 통상적으로, 1차 라이브러리가 몇 가지 방식으로 프로세싱되는 몇 가지 선택 단계가 발생한다. 예를 들어, 일면에 있어서, 일부 세트의 1차 서열이 2차 라이브러리를 형성하기 위하여 선정되는 선택 단계가 발생한다. 대안적인 일면에 있어서, 선택 단계는, 또한 일반적으로 선택 단계를 포함하는 컴퓨터 조작 단계이며, 여기서 몇몇 서브세트의 1차 라이브러리가 선정된 뒤, 추가의 컴퓨터 조작 분석 과정에 제시되며, 이는 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 및 다음과 같은 기법을 포함한다: 인 실리코(in silico) 서플링(shuffling) 또는 재조합(recombination) (US 5,830,721; US 5,811,238; US 5,605,793; 및 US 5,837,458), 예를 들어 변형된 뉴클레오타이드를 이용하는 에러-경향의(error-prone) PCR; 다중 카세트(multi-cassettes)의 사용을 포함하는 공지된 돌연변이 유발 기법; 및 DNA 서플링 (Cramer *et al.*, 1998, *Nature* 391: 288-291; Coco *et al.*, 2001, *Nat Biotechnol* 19: 354-9; Coco *et al.*, 2002, *Nat Biotechnol*, 20: 1246-50), 이종(heterogeneous) DNA 샘플 (US 5,939,250); ITCHY (Ostermeier *et al.*, 1999, *Nat Biotechnol* 17: 1205-1209); StEP (Zhao *et al.*, 1998, *Nat Biotechnol* 16: 258-261), GSSM (US 6,171,820 및 US 5,965,408); 생체내 상동 재조합(in vivo homologous recombination), 라이게아제 관련 유전자 어셈블리 (ligase assisted gene assembly), 말단-상보적인 PCR, 사전-융합 (profusion) (Roberts & Szostak, 1997, *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12297-12302); 효모/박테리아 표면 디스플레이(yeast/bacteria surface display) (Lu *et al.*, 1995, *Biotechnology* 13: 366-372); Seed & Aruffo, 1987, *Proc Natl Acad Sci USA* 84 (10): 3365-3369; Boder & Wittrup, 1997, *Nat Biotechnol* 15: 553-557). 대안적인 일면에 있어서, 선택 단계는 실험적 단계, 예를 들어 이하의 임의의 라이브러리 스크리닝 단계로서 발생하며, 여기서 1차 라이브러리의 일부 서브세트는 선정된 뒤, 이하에서 논의된 바와 같은, 유도 전개 (evolution) 방법 중 하나를 이용하여, 실험적으로 재조합되어, 2차 라이브러리를 형성한다. 바람직한 일면에 있어서, 상기 1차 라이브러리는 US 6,403,312에 개략적으로 설명된 바와 같이 제작 및 프로세싱된다.

[0137] 2차 라이브러리 및 후속의 라이브러리의 제작은 본 발명에 광범위하게 이용될 수 있다. 일면에 있어서, 상이한 1차 라이브러리가, 2차 라이브러리 또는 후속의 라이브러리를 제작하기 위하여 제조될 수 있다. 또 다른 일면에 있어서, 2차 라이브러리는, 돌연변이 가능성이 높은 위치 및 고도로 보존된 위치에 대하여 서열 다양성을 샘플링함으로써 제작될 수 있다. 상기 1차 라이브러리는, 주형 단백질 내의 어떠한 아미노산 위치가 고도의 돌연변이 빈도를 가지는 지, 및 어느 위치가 낮은 돌연변이 빈도를 가지는 지를 측정하기 위하여 분석될 수 있다. 예를 들어, 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝에서 높은 돌연변이 다양성 정도를 나타내는 단백질 내의 위치가 후속의 설계 산출 단계에서 고정될 수 있다. 이렇게 하면, 제1 세트와 동일한 크기의 필터링된 세트가 제1 라이브러리 내에 고도로 보존된 위치에서 다양성을 나타낼 것이다. 대안적으로, 상기 2차 라이브러리는, 특정 빈도 이상의 돌연변이 빈도를 갖지 않는 위치를 불변 상태로 유지시키면서, 많은 개수의 돌연변이를 가지는 위치에 대하여 아미노산을 변화시킴으로써 제작될 수 있다.

[0138] 이러한 기제가 1차 라이브러리 및 2차 라이브러리에 대한 후속의 라이브러리의 제작을 강제하는 것을 의미하지 않는다. 1차 라이브러리 및 2차 라이브러리는, 추가로 3차 라이브러리, 4차 라이브러리 등을 제작하기 위하여 프로세싱될 수 있다. 이러한 방식으로, 라이브러리 제작은 반복적인 과정이다. 예를 들어, 3차 라이브러리는 하나 이상의 2차 라이브러리에 적용되는 다양한 부가적인 단계를 이용함으로써 제작될 수 있다. 예를 들어, 추가의 컴퓨터 조작 프로세싱이 이루어질 수 있으며, 2차 라이브러리는 재조합될 수도 있고, 상이한 2차 라이브러리의 서브세트가 조합될 수도 있다. 바람직한 일면에 있어서, 3차 라이브러리는 2차 라이브러리의 조합에 의하여 제작될 수 있다. 예를 들어, 단백질의 상이한 부분을 분석한 1차 및/또는 2차 라이브러리를 조합하여, 단백질의 조합된 부분들을 처리하는 3차 라이브러리를 제작할 수 있다. 대안적인 일면에 있어서, 1차 라이브러리 유래의 변이체는 또 다른 1차 라이브러리 유래의 변이체와 조합되어, 매우 긴 필터링된 세트를 창출하는 경우보다 저렴한 컴퓨터 조작 비용으로, 조합된 3차 라이브러리를 제공할 수 있다. 이러한 조합은, 예를 들어 Fc의 거대 단백질, 특히 거대한 다중 도메인 단백질을 분석하는 데에 적용될 수 있다. 그러므로, 2차 라이브러리 제작에 관한 이상의 설명은 1차 라이브러리에 대한 후속의 임의의 라이브러리를 제작하는 데 적용되며, 여기서 최종 결과는, 설계 목표에 대하여 최적화된 단백질 변이체를 획득하기 위하여 실험적으로 스크리닝될 수 있는 최종 라이브러리이다. 이러한 예들은 본 발명에 대한 임의의 특정 용도 또는 이론으로 2차 라이브러리를 한정하는 의미하는 것은 아니다. 오히려, 이들 예는 2차 라이브러리, 및 후속의 라이브러리, 예를 들어 3차 라이브러리 등의 제작이 라이브러리 제작을 위한 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 방법에 광범위하게 유용함을 예시하는 것

임을 의미한다.

[0139] **실험적 제조 및 스크리닝**

[0140] 본 발명은, Fc 변이체의 라이브러리의 제조 방법 및 스크리닝 방법을 제공한다. 상기 방법들이 본 발명을 임의의 특정 용도 또는 작동 이론으로 한정하는 것을 의미하는 것은 아니다. 오히려, 이상에 제시된 방법들은, 하나 이상의 Fc 변이체 또는 Fc 변이체의 하나 이상의 라이브러리가, 최적화된 Fc 변이체의 획득을 위하여 제조되고, 실험적으로 스크리닝될 수 있음을 일반적으로 예시하는 것이다. Fc 변이체는, 본원에서 정확하게 정의된 바와 같은 Fc 부위, 도메인 또는 그의 단편, 또는 보Fc를 포함하는 보다 큰 폴리펩타이드, 예를 들어 항체 또는 Fc 융합체로서, 임의의 조건 하에서 제조 및 스크리닝될 수 있다. 항체 분자 생물학, 발현, 정제, 및 스크리닝에 대한 일반적인 방법에 대해서는 다음과 같은 문헌에 개시되어 있다: *Antibody Engineering*, edited by Duebel & Kontermann, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001; and Hayhurst & Georgiou, 2001, *Curr Opin Chem Biol* 5: 683-689; Maynard & Georgiou, 2000, *Annu Rev Biomed Eng* 2: 339-76.

[0141] 본 발명의 일면에 있어서, 상기 라이브러리 서열은, 일원 서열을 코딩하는 핵산, 및 원하는 경우, 이어서 숙주 세포 내로 클로닝되어, 발현되고 분석평가되는 핵산을 창출하는 데 사용될 수 있다. 그러므로, 핵산, 및 특히 DNA는, 각각의 일원 단백질 서열을 코딩하도록 만들어질 수 있다. 이는 당 기술 분야에 공지된 절차를 이용하여 실시될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 사용될 수 있는 다양한 방법은 다음과 같은 문헌에 개시되어 있다: *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 3d Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001), 및 *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons). 당업자라면, 수많은 서열을 포함하는 라이브러리에 대하여 정확한 서열을 제작하는 과정이 잠재적으로 고가이며 시간 소모적이라는 점을 잘 알고 있을 것이다. 따라서, 본 발명의 라이브러리를 효과적으로 제작하는 데 사용될 수 있는 다양한 기법이 존재한다. 본 발명에 사용될 수 있는 그러한 방법에 대해서는, US 6,403,312; USSN 09/782,004; USSN 09/927,790; USSN 10/218,102; PCT WO 01/40091; 및 PCT WO 02/25588에 개시되어 있으며, 이를 참조한다. 그러한 방법은, 이들로 제한되지는 않으나, 유전자 어셈블리 방법(gene assembly method), PCR-기준 방법, 및 변형된 PCR 방법, 라이게아제 사슬 반응-기준 방법, 합성 서플링에 사용되는 방법과 같은 풀워드 올리고 방법(pooled oligo method), 에러-경향의 증폭 방법(error-prone amplification method) 및 무작위 돌연변이를 가지는 올리고를 사용하는 방법, 종래의 부위-유도된 돌연변이 유발 방법, 카세트 돌연변이 유발, 및 기타 증폭 및 유전자 합성 방법을 포함한다. 당 기술 분야에 공지된 바와 같이, 본 발명에 있어 라이브러리의 Fc 변이체 일원을 코딩하는 핵산을 제작하기 위하여 사용될 수 있는, 다양한 상업적으로 입수 가능함 키트 및 유전자 어셈블리 방법, 돌연변이 유발 방법, 벡터 서브클로닝(subcloning) 방법 등, 및 그러한 시판 제품 등이 존재한다.

[0142] 본 발명의 Fc 변이체는, 핵산으로써 형질전환시킨 숙주 세포, 바람직하게는 상기 Fc 변이체를 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터를, 해당 단백질의 발현을 유도 또는 유발하기에 적합한 조건 하에서 배양함으로써 제조될 수 있다. 발현에 적합한 조건은 발현 벡터 및 숙주 세포의 선택에 따라 가변적일 것이며, 당업자라면 일상적인 실험을 통해 이를 용이하게 확인할 수 있을 것이다. 매우 다양한 적합한 숙주 세포가 사용될 수 있으며, 이러한 숙주세포로는, 이들로 제한되지는 않으나, 포유류 세포, 박테리아, 곤충 세포, 및 효모가 포함된다. 예를 들어, 본 발명에 사용될 수 있는 다양한 세포주는, American Type Culture Collection으로부터 입수 가능한 ATCCX 세포주 카탈로그에 개시되어 있다.

[0143] 바람직한 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체는, 발현 구조체가 레트로바이러스(virus) 또는 아데노바이러스(adenovirus)와 같은 바이러스를 이용하여 포유류 세포 내로 도입되는 시스템을 포함하는 포유류 발현 시스템 내에서 발현된다. 임의의 포유류 세포가 사용될 수 있으며, 인간, 마우스, 래트, 햄스터, 및 영장류(primate) 세포가 특히 바람직하다. 적합한 세포는 또한 공지된 검색 세포를 포함하며, 이러한 세포로는, 이들로 제한되지는 않으나, Jurkat T 세포, NIH3T3, CHO, COS, 및 293 세포가 포함된다. 대안적으로 바람직한 일면에 있어서, 라이브러리 단백질은 박테리아 세포 내에서 발현된다. 박테리아 발현 시스템은 당 기술 분야에 공지되어 있으며, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis*, *Streptococcus cremoris*, 및 *Streptococcus lividans*가 포함된다. 대안적인 일면에 있어서, Fc 변이체는 곤충 세포 또는 효모 세포 내에서 생산된다. 대안적인 일면에 있어서, Fc 변이체는, 세포 유리된 번역 시스템(cell free translation system)을 이용하여 시험관내 발현된다. 원핵생물(prokaryotic) (예를 들어, *E. coli*) 및 진핵생물 (예를 들어, 맥아(wheat germ), 토끼 망상세포(reticulocyte)) 세포로부터 유래되는 시험관내 번역 시스템이 이용 가능하며, 관심 단백질의 발현 수준 및 기능적 특성을 기준으로 선택될 수 있다. 예를 들어, 당업자라면 이해하는 바와 같이, 시험관내 번역에는, 리보솜 디스플레이와 같은 몇 가지 디스플레이 기술이 요구된다. 또한, 상기 Fc 변이체는 화학적 합성

방법에 의하여 제조될 수 있다.

- [0144] 본 발명의 Fc 변이체를 코딩하는 핵산은, 상기 단백질을 발현시키기 위하여 발현 벡터 내로 도입될 수 있다. 다양한 발현 벡터가 단백질 발현을 위하여 사용될 수 있다. 발현 벡터는, 자가-복제성 염색체의 벡터(self-replicating extra-chromosomal vector) 또는 숙주 게놈(genome) 내로 통합되는 벡터를 포함할 수 있다. 발현 벡터는 숙주 세포 타입과 양립 가능하도록 제작된다. 그러므로, 본 발명에 사용될 수 있는 발현 벡터는, 이들로 제한되지는 않으나, 포유류 세포, 박테리아, 곤충 세포, 효모 및 시험관내 시스템 내에서 단백질 발현을 가능하게 하는 것들을 포함한다. 당 기술 분야에 공지된 바와 같이, Fc 변이체 단백질을 발현시키기 위하여 본 발명에 사용될 수 있는, 다양한 발현 벡터가 상업적으로 또는 기타 방식으로 입수 가능하다.
- [0145] 발현 벡터는 통상적으로, 통제 또는 조절 서열, 선별 가능한 마커, 임의의 융합 파트너, 및/또는 부가적인 요소와 유효하게 결합된 단백질을 포함한다. 본원에 있어서, "유효하게 결합된(operably linked)"이란, 핵산이 또 다른 핵산 서열과 기능적으로 관련되는 것을 의미한다. 일반적으로, 이들 발현 벡터는, 상기 Fc 변이체를 코딩하는 핵산과 유효하게 결합된 전사 조절 핵산(transcriptional regulatory sequence) 및 번역 조절 핵산(translational regulatory sequence)을 포함하며, 통상적으로 상기 단백질을 발현시키는 데 사용되는 숙주 세포에 적합하다. 일반적으로, 상기 전사 및 번역 조절 서열은, 프로모터(promoter) 서열, 리보솜 결합 부위, 전사 개시 서열(transcriptional start sequence) 및 전사 종결 서열(transcriptional stop sequence), 번역 개시 서열 및 번역 종결 서열, 및 인핸서(enhancer) 또는 액티베이터(activator) 서열을 포함한다. 또한, 당 기술 분야에 공지된 바와 같이, 발현 벡터는 통상적으로, 발현 벡터를 함유하는 형질전환된 숙주 세포의 선별을 가능하게 하는, 선별 유전자 또는 마커를 함유한다. 선별 유전자는 당 기술 분야에 공지되어 있으며, 사용되는 숙주 세포에 따라 가변적일 것이다.
- [0146] Fc 변이체는, 발현된 단백질의 표적화, 정제, 스크리닝, 디스플레이 등을 가능하게 하는 융합 파트너(fusion partner)에 유효하게 결합될 수 있다. 융합 파트너는, 링커 서열(linker sequence)을 통해 상기 Fc 변이체 서열에 결합될 수 있다. 상기 링커 서열은 일반적으로, 소수의 아미노산, 통상적으로는 10개 미만의 아미노산을 포함할 것이나, 이보다 긴 링커도 사용될 수 있다. 통상적으로, 링커 서열은 분해에 대하여 가용성 및 내성을 가지는 것으로 선택된다. 당업자라면, 임의의 다양한 서열이 링커로서 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 통상의 링커 서열은, 아미노산 서열 GGGGS를 포함한다. 융합 파트너는, Fc 변이체 단백질 및 임의의 관련 융합 파트너를 원하는 세포 위치 또는 세포의 배지로 안내하는 표적화 또는 신호 서열일 것이다. 당 기술 분야에 공지된 바와 같이, 몇몇 신호화 서열은, 성장 배지, 또는 세포의 내막과 외막 사이에 위치하는 원형질막 주위 공간(periplasmic space)으로 분비될 단백질을 표적화할 수 있다. 융합 파트너는 또한, 정제 및/또는 스크리닝이 가능한 펩타이드 또는 단백질을 코딩하는 서열일 수 있다. 그러한 융합 파트너는, 이들로 제한되지는 않으나, 폴리히스티딘 태그(polyhistidine tag; His-tag) (예를 들어, H₆ 및 H₁₀ 또는 고정된 금속 친화성 크로마토그래피(Immobilized Metal Affinity Chromatography; IMAC) 시스템과 함께 사용되는 그 밖의 태그 (예를 들어, Ni⁺² 친화성 칼럼), GST 융합체, MBP 융합체, 스트렙-태그(Strep-tag), 박테리아 효소 BirA의 BSP 바이오티닐화(biotinylation) 표적 서열, 및 항체에 의하여 표적화되는 에피토프 태그 (예를 들어, c-myc 태그, 플래그-태그(flag-tags) 등)를 포함한다. 당업자라면, 그러한 태그들이 정제 또는 스크리닝, 또는 이들 둘 모두에 유용할 수 있음을 이해할 것이다.
- [0147] 예를 들어, Fc 변이체는, His-태그를 이용하여, 이를 Ni⁺² 친화성 칼럼에 고정시킴으로써 정제될 수 있으며, 정제 후, 동일한 His-태그를 이용해 상기 항체를 Ni⁺² 코팅된 플레이트에 고정시켜, ELISA 또는 기타 결합 분석평가를 실시하는 데 사용될 수 있다 (이하에 설명한 바와 같이). 융합 파트너는 스크린 Fc 변이체에 대한 선별 방법을 가능하게 한다 (이하 참조). 다양한 선별 방법을 가능하게 하는 융합 파트너가 당 기술 분야에 공지되어 있으며, 이들 모두 본 발명에 사용될 수 있다. 예를 들어, Fc 변이체 라이브러리의 일원을 유전자 III 단백질에 융합시킴으로써, 파지 디스플레이를 활용할 수 있다 (Kay *et al.*, Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual, Academic Press, San Diego, CA, 1996; lowman *et al.*, 1991, *Biochemistry* 30: 10832-10838; Smith, 1985, *Science* 228: 1315-1317). 융합 파트너는 Fc 변이체의 표지를 가능하게 한다. 대안적으로, 융합 파트너는 발현 벡터에 대하여 특이적인 서열에 결합할 수 있으며, 이는 상기 융합 파트너 및 관련 Fc 변이체와 그들을 코딩하는 핵산과의 공유 결합 또는 비공유 결합을 가능하게 한다. 예를 들어, USSN 09/642,574; USSN 10/080,376; USSN 09/792,630; USSN 10/023,208; USSN 09/792,626; USSN 10/082,671; USSN 09/953,351; USSN 10/097,100; USSN 60/366,658; PCT WO 00/22906; PCT WO 01/49058; PCT WO 02/04852; PCT WO 02/04853; PCT WO 02/08023; PCT WO 01/28702; 및 PCT WO 02/07466에는, 본 발명에 사용될 수 있는 그러한

융합 파트너 및 기법이 개시되어 있다.

[0148] 외생(exogenous) 핵산을 숙주 세포 내로 도입하는 방법은 당 기술 분야에 공지되어 있으며, 사용되는 숙주 세포에 따라 가변적일 것이다. 그러한 기법은, 이들로 제한되지는 않으나, 텍스트란-매개의 트랜스펙션(dextran-mediated transfection), 칼슘 포스페이트 침전(precipitation), 칼슘 클로라이드 처리, 폴리브렌-매개의 트랜스펙션(polybrene mediated transfection), 원생동물(protooplast) 융합, 전기 천공(electroporation), 바이러스 또는 파지 감염(infection), 폴리뉴클레오타이드(들)의 리포솜 내로의 캡슐화(encapsulation), 및 DNA의 핵 내로의 직접 마이크로인젝션(microinjection)을 포함한다. 포유류 세포의 경우, 트랜스펙션이 일시적인 또는 안정적인 것일 수 있다.

[0149] 바람직한 일면에 있어서, Fc 변이체 단백질은, 발현 후, 정제 또는 분리된다. 단백질은, 당 기술 분야에 공지된 다양한 방식으로 분리 또는 정제될 수 있다. 표준 정제 방법은, 크로마토그래피 기법을 포함하며, 그러한 크로마토그래피 기법으로는 이온 교환(ion exchange), 소수성 상호 작용, 친화성, 사이징(sizing), 또는 젤 여과(gel filtration) 크로마토그래피 기법, 및 대기압 또는 고압 하에 FPLC 및 HPLC과 같은 시스템을 이용하여 실시되는 역상(reversed-phase) 크로마토그래피 기법이 포함된다. 정제 방법은 또한, 전기 영동(electrophoretic) 기법, 면역학적 기법, 침전 기법, 투석 기법, 및 크로마토포커싱(chromatofocusing) 기법을 포함한다. 단백질 농도와 관련해서는, 한외 여과(ultrafiltration) 및 다이아-여과(diafiltration) 기법 또한 유용하다. 당 기술 분야에 공지된 바와 같이, 다양한 천연 단백질이 Fc 및 항체를 결합시키며, 이들 단백질이, 변이체의 정제를 위하여 본 발명에 사용될 수 있다. 예를 들어, 박테리아 단백질 A 및 G는 Fc 부위에 결합한다. 유사하게, 박테리아 단백질 L은, 물론 상기 항체의 표적 항원을 투여함으로써 일부 항체의 Fab 부위에 결합한다. 정제는 흔히 특정 융합 파트너에 의하여 가능해질 수 있다. 예를 들어, Fc 변이체 단백질은, GST 융합이 이용되는 경우에는 글루타티온(glutathione) 수지를 사용함으로써 정제되며, His-태그가 이용되는 경우에는 Ni⁺² 친화성 크로마토그래피를 통해 정제되며, 플래그-태그가 이용되는 경우에는 고정된 항-플래그 항체를 사용하여 정제된다. 적합한 정제 기법에 대한 일반적인 지침에 대해서는 하기 문헌을 참조한다: Protein Purification: Principles and Practice, 3rd Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994. 필요한 정제의 정도는 Fc 변이체의 사용 또는 스크린에 따라 가변적일 것이다. 일부 일면에 있어서, 정제가 필요 없다. 예를 들어, 일면에 있어서, 상기 Fc 변이체가 분리되는 경우, 스크리닝은 배지로부터 직접 실시된다. 당 기술 분야에 공지된 바와 같이, 몇몇 선별 방법은 단백질 정제를 수반하지 않는다. 그러므로, 예를 들어, Fc 변이체의 라이브러리가 파지 디스플레이 라이브러리로 만들어지는 경우, 단백질 정제는 실시되지 않을 수 있다.

[0150] Fc 변이체는, 이들로 제한되지는 않으나, 시험관내 분석평가, 생체내 및 세포-기준 분석평가에 사용되는 방법, 및 선별 기술을 포함하는 다양한 방법을 이용하여 스크리닝될 수 있다. 자동화(automation) 및 고도-처리량(high-throughput) 스크리닝 기술이 상기 스크리닝 절차에 이용될 수 있다. 스크리닝은 융합 파트너 또는 표지의 사용을 활용할 수 있다. 융합 파트너의 사용에 대해서는 이상에서 설명한 바 있다. 본원에 있어서, "표지된(labeled)"이란, 본 발명의 Fc 변이체가, 스크린 시 검출을 가능하도록 부착되는 하나 이상의 원소, 동위원소, 또는 화학적 화합물을 가지는 것을 의미한다. 일반적으로, 표지는 다음과 같은 3개의 클래스로 분류된다: a) 항체에 의하여 인식되는 융합 파트너로선 도입되는 에피토프일 수 있는, 면역 표지(immune label); b) 방사능 활성 또는 무거운 동위원소(heavy isotope)일 수 있는, 동위원소 표지(isotopic label); 및 c) 형광 염료(fluorescent dye) 및 비색계 염료(colorimetric dye)를 포함할 수 있는 작은 분자 표지, 또는 기타 표지 방법을 가능하게 하는 바이오틴과 같은 분자. 표지는 화합물의 임의의 위치로 도입될 수 있으며, 단백질이 발현되는 동안 시험관내 또는 생체내 도입될 수 있다.

[0151] 바람직한 일면에 있어서, Fc의 기능적 및/또는 생물리학적 특성은 시험관내 분석평가 방식으로 스크리닝된다. 시험관내 분석평가는 관심 특성을 스크리닝하기 위한 광범위한 역학 범위를 허락할 수 있다. 스크리닝될 수 있는 Fc 변이체의 특성은, 이들로 제한되지는 않으나, 안정성, 용해성, 및 Fc 리간드, 예를 들어 Fc γ R에 대한 친화성을 포함한다. 복수의 특성들이 동시에 또는 개별적으로 스크리닝될 수 있다. 단백질은 분석평가 요건에 따라 정제될 수도 있고 정제되지 않을 수도 있다. 일면에 있어서, 상기 스크린은, 상기 Fc 변이체를 결합시키는 것으로 알려져 있거나 그러할 것으로 여겨지는 단백질 또는 비단백질 분자에 대한 Fc 변이체의 결합에 대한 정성적 또는 정량적 결합 분석평가이다. 바람직한 일면에 있어서, 상기 스크린은, 항체의 표적 항원 또는 Fc 융합체의 표적 항원에 대한 결합을 측정하기 위한 결합 분석평가이다. 대안적으로 바람직한 일면에 있어서, 상기 스크린은, 이들로 제한되지는 않으나, Fc γ R 부류, 신생 수용체 FcRn, 상보체 단백질 C1q, 및 박테리아 단백질 A 및 G를 포함하는 Fc 리간드에 대한 Fc 변이체의 결합에 대한 분석평가이다. 상기 Fc 리간드들은 임의의 유기체로부터 유래될 수 있으며, 인간, 마우스, 래트, 토끼, 및 원숭이가 바람직하다. 결합 분석평가는 다양한

당 기술 분야에 공지된 방법을 이용하여 실시될 수 있으며, 이러한 방법으로는, 이들로 제한되지는 않으나, 다음과 같은 것들이 포함된다: FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 및 BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer)-기준 분석평가, AlphaScreen™ (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay), 섬광 근접 분석평가(Scintillation Proximity Assay), ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; 효소-결합된 면역 흡착 분석평가), SPR (Surface Plasmon Resonance, BIACORE^(R)으로도 알려져 있음), 등온 적정 열량측정법(isothermal titration calorimetry), 차별 주사 열량측정법(differential scanning calorimetry), 젤 전기영도, 및 젤 여과를 포함하는 크로마토그래피. 이상에 제시한 방법 및 그 밖의 방법들이 Fc 변이체의 몇몇 용합 파트너 또는 표지에 유용할 수 있다. 분석평가에는, 이들로 제한되지는 않으나, 크로모젠(chromogenic), 형광, 발광, 및 동위원소 표지를 포함하는 다양한 검출 방법이 활용될 수 있다.

[0152] Fc 변이체 단백질의 생물리학적 특성, 예를 들어 안정성 및 용해성은 다양한 당 기술 분야에 공지된 방법을 이용하여 스크리닝될 수 있다. 단백질 안정성은, 폴딩된 상태 및 폴딩되지 않은 상태 사이의 열역학적 평형(thermodynamic equilibrium)을 측정함으로써 측정될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 Fc 변이체 단백질은 화학적 변성제(denaturant), 열, 또는 pH를 이용하여 폴딩 해제될 수 있으며, 이러한 변환은, 이들로 제한되지는 않으나, 환형 2색성 분광법(circular dichroism spectroscopy), 형광 분광법, 흡광도(absorbance) 분광법, NMR 분광법, 열량측정법, 및 단백질 용해(proteolysis)를 포함하는 방법을 이용하여 모니터링될 수 있다. 당업자라면, 폴딩 및 폴딩 해제 변환의 동력학적 매개변수(kinetic parameter) 역시 이상에 개시한 방법 및 기타 방법에 의하여 모니터링될 수 있음을 이해할 것이다. Fc 변이체 단백질의 용해성 및 전체적인 구조적 무결성은, 당 기술 분야에 공지된 광범위한 방법을 이용하여 정량적으로 또는 정성적으로 측정될 수 있다. Fc 변이체 단백질의 생물리학적 특성을 특정화하기 위하여 본 발명에 사용될 수 있는 방법으로는 다음과 같은 기법들이 포함된다: 젤 전기 영동, 크로마토그래피, 예를 들어 크기 배제(size exclusion chromatography) 크로마토그래피 및 역상 고성능 액체 크로마토그래피(reversed-phase high performance liquid chromatography), 질량 분광측정법(mass spectrometry), 자외선 흡광도 분광법, 형광 분광법, 환형 2색성 분광법, 등온 적정 열량측정법, 시차 주사 열량측정법, 분석용 초원심분리(analytical ultra-centrifugation), 동력적 광 산란(dynamic light scattering), 단백질 용해, 및 가교 결합(cross-linking), 탁도 측정(turbidity measurement), 여과 지연 분석평가(filter retardation assay), 면역학적 분석평가, 형광 염료 결합 분석평가(fluorescent dye binding assay), 단백질-염색 분석평가, 현미경 검사(microscopy), 및 ELISA 또는 기타 결합 분석평가를 통한 응집체 검사. X-선 결정학적 기법 및 NMR 분광법을 활용하는 구조적 분석 방법도 사용될 수 있다. 일면에 있어서, 안정성 및/또는 용해성은, 소정의 기간 이후, 단백질 용해의 양을 측정함으로써 측정될 수 있다. 이러한 분석평가에서, 상기 단백질은 몇몇 과도한 조건, 예를 들어 승온, 낮은 pH, 또는 변성제의 존재 하에 노출될 수도 있고, 그렇지 않을 수도 있다. 통상적으로, 안정된, 가용성, 및/또는 잘-폴딩된/구조화된 단백질이 요구되며, 이상에 개시한 기능적 및 결합 분석평가 또한, 그러한 측정을 실시하는 방식을 제공한다. 예를 들어, Fc 변이체를 포함하는 용액은, 표적 항원을 결합시키는 그의 능력에 대하여 평가될 수 있으며, 이어서 소정의 기간 동안 승온에 노출된 후, 다시 항원 결합에 대하여 평가될 수 있다. 폴딩되지 않은 및 응집된 단백질은 결합 항원일 수 있을 것으로 기대되지 않기 때문에, 잔류하는 활성의 양은 Fc 변이체의 안정성 및 용해성의 측정값을 제공한다.

[0153] 바람직한 일면에 있어서, 상기 라이브러리는, 하나 이상의 세포-기준 또는 생체내 분석평가를 이용하여 스크리닝된다. 그러한 분석평가의 경우, 정제된 또는 정제되지 않은 Fc 변이체 단백질은, 통상적으로 세포가 라이브러리에 속하는 개개의 변이체 또는 변이체들의 풀(pool)에 노출되도록 외부로부터 첨가된다. 이들 분석평가는 통상적으로, 항상 그러한 것은 아니나, 상기 Fc 변이체를 포함하는 항체 또는 Fc 융합체의 기능, 즉, 표적 항원에 결합하여, 일부 생화학적 작용, 예를 들어, 작동체 기능, 리간드/수용체 결합 저해, 에이포토포시스 등을 매개하는 항체 또는 Fc 융합체의 능력을 기준으로 한다. 그러한 분석평가에는, 흔히 항체 또는 Fc 융합체에 대한 세포의 반응, 예를 들어 세포의 생존, 세포의 사망, 세포 형태의 변화, 또는 천연 유전자 또는 리포터(reporter) 유전자의 세포 발현과 같은 전사 활성화를 모니터링하는 단계가 수반된다. 예를 들어, 그러한 분석평가는, ADCC, ADCP, 또는 CDC를 유도하는 Fc 변이체의 능력을 측정할 수 있다. 일부 분석평가의 경우, 표적 세포 이외의 부가적인 세포 또는 성분, 예를 들어, 혈청 상보체, 또는 작동체 세포, 예를 들어 주변 혈액 단핵구(peripheral blood monocyte; PBMC), NK 세포, 대식 세포 등이 첨가될 필요가 있을 수 있다. 그러한 부가적인 세포는 임의의 유기체로부터 유래될 수 있으며, 인간, 마우스, 래트, 토끼, 및 원숭이가 바람직하다. 항체 및 Fc 융합체는, 항체의 표적 항원을 발현시키는 특정 세포주의 에이포토포시스를 야기할 수 있으며, 분석평가를 위해 첨가된 면역 세포에 의한 표적 세포에 대한 공격을 매개할 수 있다. 세포 사망 또는 생존을 모니터링하는 방법은 당 기술 분야에 공지되어 있으며, 염료, 면역화학적 제제, 세포화학적 제제(cytochemical reagent), 및 방사능 활성 제제의 사용을 포함한다. 예를 들어, 카스파스 염색 분석평가(caspase staining

assay)는, 에이포프토시스의 측정을 가능하게 할 수 있으며, 방사능 활성 기질 또는 형광 염료, 예를 들어 알라 마르 블루(alar blue)의 흡수 또는 방출은 세포 성장 또는 활성화의 모니터링을 가능하게 할 수 있다. 바람 직한 일면에 있어서, DELFIA^(R) EuTDA-기준 세포독성 분석평가(Perkin Elmer, MA)가 사용된다. 대안적으로, 사망하거나 손상된 표적 세포는, 1종 이상의 천연 세포내 단백질, 예를 들어 락테이트 데하이드로게나아제의 방출을 측정함으로써 모니터링될 수 있다. 전사 활성화 또한, 세포-기준 분석평가에 있어 기능을 분석평가하는 방법으로서 제공될 수 있다. 이러한 경우, 반응은, 상향 조절(upregulated)될 수 있는 천연 유전자 또는 단백질에 대하여 분석평가함으로써 모니터링될 수 있다. 예를 들어, 특정 인터류킨의 방출이 측정될 수 있으며, 대안적으로 리포터 구조체를 통해 해독될 수 있다. 세포-기준 분석평가는 또한, Fc 변이체의 존재에 대한 반응으로서 세포의 형태학적 변화를 측정하는 단계를 수반할 수 있다. 그러한 분석평가를 위한 세포 타입으로는 원핵생물 또는 진핵생물의 세포가 있을 수 있으며, 당 기술 분야에 공지된 다양한 세포주가 활용될 수 있다.

[0154] 대안적으로, 세포-기준 스크린은 Fc 변이체를 코딩하는 핵산으로써 형질전환된 또는 트랜스펙션된 세포를 이용하여 실시된다. 즉, Fc 변이체 단백질은 상기 세포에 외부 첨가되지 않는다. 예를 들어, 일면에 있어서, 상기 세포-기준 스크린은 세포 표면 디스플레이를 활용한다. 융합 파트너는 Fc 변이체를 세포 표면 상에 디스플레이할 수 있는 것들이 활용될 수 있다 (Wittrup, 2001, *Curr Opin Biotechnol*, 12: 395-399). 본 발명에 사용될 수 있는 세포 표면 디스플레이 방법은, 이들로 제한되지는 않으나, 다음과 같은 방법을 포함한다: 박테리아에 대한 디스플레이 (Georgiou *et al.*, 1997, *Nat Biotechnol* 15: 29-34; Georgiou *et al.*, 1993, *Trends Biotechnol* 11: 6-10; Lee *et al.*, 2000, *Nat Biotechnol* 18: 645-648; Jun *et al.*, 1998, *Nat Biotechnol* 16: 576-80), 효모에 대한 디스플레이 (Boder & Wittrup, 2000, *Methods Enzymol* 328: 430-44; Boder & Wittrup, 1997, *Nat Biotechnol* 15: 553-557), 및 포유류 세포에 대한 디스플레이 (Whitehorn *et al.*, 1995, *Biolotechnology* 13: 1215-1219). 대안적인 일면에 있어서, Fc 변이체 단백질은 세포 표면 상에 디스플레이되지 않으며, 오히려 세포내 또는 몇몇 기타 세포 구획(compartment)내 스크리닝된다. 예를 들어, 원형질막 주위에서의 발현 및 세포계측 스크리닝 (Chen *et al.*, 2001, *Nat Biotechnol* 19: 537-542), 단백질 단편 상보 분석평가(protein fragment complementation assay) (Johnsson & Varshavsky, 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10340-10344.; Pelletier *et al.*, 1998, *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12141-12146), 및 효모 2개의 혼성 스크린(yeast two hybrid screen) (Fields & Song, 1989, *Nature* 340: 245-246)이 본 발명에 사용될 수 있다. 대안적으로, Fc 변이체를 포함하는 폴리펩타이드, 예를 들어 항체 또는 Fc 융합체는 세포에 대하여 선별 가능한 성장 이점을 부여하며, 이러한 특성은 Fc 변이체에 대한 스크리닝 또는 선별에 사용될 수 있다.

[0155] 당 기술 분야에 공지된 바와 같이, 한 서브세트의 스크리닝 방법은 라이브러리의 유용한 일원에 대하여 선택된 것들이다. 상기 방법들은 본원에 있어서 "선별 방법(selection method)"이라 일컬어지며, 이들 방법은 본 발명에 있어 Fc 변이체 라이브러리를 스크리닝하는 데에 사용될 수 있다. 라이브러리가 선별 방법에 의하여 스크리닝되는 경우, 유용한 라이브러리의 일원, 몇몇 선택 표준을 충족시키는 라이브러리의 일원들만이 증식, 분리, 및/또는 관찰된다. 이해할 수 있는 바와 같이, 단지 가장 적합한 변이체만이 관찰되기 때문에, 그러한 방법은, 라이브러리 일원의 적합성을 개별적으로 분석평가하는 방법에 의하여 스크리닝 가능한 것들보다 긴 라이브러리의 스크리닝을 가능하게 한다. 선별은, 그의 유전자형(genotype)을 가지는 Fc 변이체의 표현형(phenotype), 즉 Fc 변이체의 기능을 그를 코딩하는 핵산과 공유 결합 또는 비공유 결합시키는 임의의 방법, 기법, 또는 융합 파트너에 의하여 실시된다. 예를 들어, 선별 방법으로서 파지 디스플레이를 이용하면, 라이브러리 일원의 유전자 III 단백질에 대한 융합이 가능하다. 이러한 방식으로, 몇몇 표준, 예를 들어 Fc γ R에 대한 결합 친화성을 충족시키는 변이체 단백질의 선별 또는 분리는 또한, 그를 코딩하는 핵산에 대한 선별 또는 분리이다. 일단 분리된 후, Fc 변이체를 코딩하는 유전자 또는 유전자들은 이어서 증폭될 수 있다. 이러한 분리 및 증폭 과정은, 패닝(panning)이라고도 일컬어지며, 반복될 수 있으며, 이는 라이브러리 내의 유리한 Fc 변이체를 강화한다. 부착된 핵산의 핵산 서열결정(sequencing)은 궁극적으로 유전자 동정(identification)을 가능하게 한다.

[0156] 다양한 선별 방법이 당 기술 분야에 공지되어 있으며, 본 발명에 있어 Fc 변이체 라이브러리를 스크리닝하는 데 사용될 수 있다. 그러한 선별 방법은, 이들로 제한되지는 않으나, 다음과 같은 기법을 포함한다: 파지 디스플레이 (Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual, Kay *et al.*, 1996, Academic Press, San Diego, CA, 1996; Lowman *et al.*, 1991, *Biochemistry* 30: 10832-10838; Smith, 1985, *Science* 228: 1315-1317) 및 그의 유도 방법, 예를 들어 선택적 파지 감염(selective phage infection) (Malmberg *et al.*, 1997, *J Mol Biol* 273: 544-551), 선택적 감염성 파지(selectively infective phage) (Kreber *et al.*, 1997, *J Mol Biol* 268: 619-630), 및 지발성 감염성 패닝(delayed infectivity panning) (Benhar *et al.*, 2000, *J Mol Biol* 301: 893-904), 세포 표면 디스플레이 (Wittrup, 2001, *Curr Opin Biotechnol*, 12: 395-399), 예를

들어 박테리아에 대한 디스플레이 (Georgiou *et al.*, 1997, *Nat Biotechnol* 15: 29-34; Georgiou *et al.*, 1993, *Trends Biotechnol* 11: 6-10; Lee *et al.*, 2000, *Nat Biotechnol* 18: 645-648; Jun *et al.*, 1998, *Nat Biotechnol* 16: 576-80), 효모 (Boder & Wittrup, 2000, *Methods Enzymol* 328: 430-44; Boder & Wittrup, 1997, *Nat Biotechnol* 15: 553-557), 및 포유류 세포 (Whitehorn *et al.*, 1995, *Bioltechnology* 13: 1215-1219), 그리고 시험관내 디스플레이 기술 (Amstutz *et al.*, 2001, *Curr Opin Biotechnol* 12: 400-405), 예를 들어 폴리솜 디스플레이(polysome display) (Mattheakis *et al.*, 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9022-9026), 리보솜 디스플레이 (Hanes *et al.*, 1997, *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4937-4942), mRNA 디스플레이 (Roberts & Szostak, 1997, *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12297-12302; Nemoto *et al.*, 1997, *FEBS Lett* 414: 405-408), 및 리보솜-불활성화 디스플레이 시스템(ribosome-inactivation display system) (Zhou *et al.*, 2002, *J Am Chem Soc* 124, 538-543).

[0157]

디스플레이에 의존하지 않는 방법을 포함하는 그 밖의 선별 방법도 본 발명에 사용될 수 있으며, 생체내 방법으로는, 이들로 제한되지는 않으나, 다음과 같은 기법들이 포함된다: 원형질막 주위에서의 발현(periplasmic expression) 및 세포 계측 스크리닝(cytometric screening) (Chen *et al.*, 2001, *Nat Biotechnol* 19: 537-542), 단백질 단편 상보 분석평가 (Johnsson & Varshavsky, 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10340-10344; Pelletier *et al.*, 1998, *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12141-12146), 및 선별 방식에 사용되는 (Visintin *et al.*, 1999, *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11723-11728) 효모 2개의 혼성 스크린 (Fields & Song, 1989, *Nature* 340: 245-246). 대안적인 일면에 있어서, 선별은 발현 벡터 상의 특이적인 서열에 결합하는 융합 파트너에 의하여 이루어진다, 이는 융합 파트너 및 관련 Fc 변이체 라이브러리 일원과 그들을 코딩하는 핵산을 공유 결합 또는 비공유 결합시킨다. 예를 들어, USSN 09/642,574; USSN 10/080,376; USSN 09/792,630; USSN 10/023,208; USSN 09/792,626; USSN 10/082,671; USSN 09/953,351; USSN 10/097,100; USSN 60/366,658; PCT WO 00/22906; PCT WO 01/49058; PCT WO 02/04852; PCT WO 02/04853; PCT WO 02/08023; PCT WO 01/28702; 및 PCT WO 02/07466에는, 그러한 융합 파트너 및 기법이 개시되어 있으며, 이들은 본 발명에 사용될 수 있다. 대안적인 일면에 있어서, 생체내 선별은 상기 Fc 변이체를 포함하는 폴리펩타이드, 예를 들어 항체 또는 Fc 융합체의 발현이, 세포에 대하여 일부의 성장, 증식, 또는 생존을 부여하는 경우에 발생할 수 있다. "유도 전개(directed evolution)" 방법이라 일컬어지는, 한 서브세트의 선별 방법은 선별 과정 동안 유용한 서열을 메이팅(mating) 또는 브리딩하는 단계를 포함하는 방법으로서, 이는 종종 새로운 돌연변이의 도입과 병행된다. 당업자라면, 유도 전개 방법이, 라이브러리 내의 가장 유리한 서열의 동정을 용이하게 할 수 있으며, 스크리닝되는 서열의 다양성을 증대시킬 수 있음을 이해할 것이다. 본 발명에 있어 Fc 변이체 라이브러리의 스크리닝에 사용될 수 있는 다양한 유도 전개 방법이 당 기술 분야에 공지되어 있으며, 그러한 방법으로는, 이들로 제한되지는 않으나, 다음과 같은 기법들이 포함된다: DNA 셔플링 (PCT WO 00/42561 A3; PCT WO 01/70947 A3), 엑손 셔플링(exon shuffling) (US 6,365,377; Kolkman & Stemmer, 2001, *Nat Biotechnol* 19: 423-428), 패밀리 셔플링(family shuffling) (Cramer *et al.*, 1998, *Nature* 391: 288-291; US 6,376,246), RACHITT™ (Coco *et al.*, 2001, *Nat Biotechnol* 19: 354-359; PCT WO 02/06469), 시험관내 제조합의 무작위 개시(random priming) 및 STEP (Zhao *et al.*, 1998, *Nat Biotechnol* 16: 258-261; Shao *et al.*, 1998, *Nucleic Acids Res* 26: 681-683), 엑소뉴클레아제-매개된 유전자 어셈블리(exonuclease mediated gene assembly) (US 6,352,842; US 6,361,974), Gene Site Saturation Mutagenesis™ (US 6,358,709), Gene Reassembly™ (US 6,358,709), SCRATCHY (Lutz *et al.*, 2001, *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11248-11253), DNA 분획 방법(DNA fragmentation method) (Kikuchi *et al.*, *Gene* 236: 159-167), 단일-가닥 DNA 셔플링 (Kikuchi *et al.*, 2000, *Gene* 243: 133-137), 및 AMESystem™ 유도 전개 단백질 조작 기술 (Applied Molecular Evolution) (US 5,824,514; US 5,817,483; US 5,814,476; US 5,763,192; US 5,723,323).

[0158]

본 발명의 Fc 변이체를 포함하는 항체 및 Fc 융합체의 생물학적 특성은 세포, 조직, 및 전체 유기체 실험에서 특정화될 수 있다. 당 기술 분야에 알려져 있는 바와 같이, 약물은 흔히, 질병 또는 질병 모델에 대한 치료를 위한 약물의 효능을 측정하기 위하여, 또는 약물의 약물 동역학, 독성, 및 기타 특성들을 측정하기 위하여, 이들로 제한되지는 않으나, 마우스, 래트, 토끼, 개, 고양이, 돼지, 및 원숭이를 포함하는 동물 내에서 테스트된다. 상기 동물들은 질병 모델이라 일컬어 수 있다. 치료제는 흔히, 이들로 제한되지는 않으나, 누드 마우스(nude mouse), SCID 마우스, 이종 이식 마우스(xenograft mouse), 및 트랜스제닉 마우스(넉-인(knockin) 및 넉-아웃(knockout) 포함)를 포함하는 마우스에게서 테스트된다. 예를 들어, 항암 치료를 목적으로 하는 본 발명의 항체 또는 Fc 융합체는 마우스 암 모델, 예를 들어 이종 이식 마우스 내에서 테스트될 수 있다. 이러한 방법에서, 종양 또는 종양 세포주를 마우스 내로 이식 또는 주사한 뒤, 상기 마우스에게 치료제를 처리하여, 암의 성장을 감소 또는 저해하는 상기 항체 또는 Fc 융합체의 능력을 측정한다. 그러한 실험은, 치료제로서 사용될

항체 또는 Fc 융합체의 잠재능 측정에 대한 유의한 데이터를 제공할 수 있다. 임의의 유기체, 바람직하게는 포유류가 테스트용으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간에 대한 유전적 유사성으로 인하여, 원숭이가 적합한 치료학적 모델일 수 있으며, 따라서, 이러한 원숭이가 본 발명의 항체 및 Fc 융합체의 효능, 독성, 약물 동역학, 또는 기타 특성을 테스트하는 데 사용될 수 있다. 인간에 대한 본 발명의 항체 및 Fc 융합체의 테스트는 궁극적으로 약물로서의 승인에 요구되며, 따라서 물론 이들 실험도 고려된다. 그러므로, 본 발명의 항체 및 Fc 융합체는, 그들의 치료학적 효능, 독성, 약물 동역학, 및/또는 기타 임상적 특성을 측정하기 위하여 인간에 대하여 테스트될 수 있다.

실시예

- [0190] 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위하여 제공된다. 이들 실시예는 본 발명을 임의의 특정한 작동 용도 또는 이론으로 제한하는 것을 의미하지는 않는다.
- [0191] 본 발명에서 언급되는 모든 위치에 대해서는, Kabat(Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda)에서와 같이 EU 인덱스에 따라 번호가 지정된다. 항체 분야의 전문가, 이 조약이 면역글로불린 서열의 특정 부위에 있어서의 비연속적인 번호 지정, 면역글로불린 패밀리 내의 보존된 위치에 대한 표준화된 참조를 제공하는 것으로 이루어짐을 이해할 것이다. 따라서, 상기 EU 인덱스에 의하여 규정된 바와 같이 임의의 주어진 면역글로불린의 위치가, 그의 연속적인 서열에 필수적으로 대응하지는 않을 것이다. 도 3은, 이러한 원리를 보다 명확하게 예시하기 위한, 항체 알렘투주맵에 대한 연속적인 번호 지정 및 EU 인덱스 번호 지적 도해를 나타낸다. 또한, 이들로 제한되지는 않으나, Kabat 270, 272, 312, 315, 356, 및 358을 포함하는 다수의 Fc 위치에서 다형이 관찰됨을 유의해야 하며, 따라서 과학 문헌에 제시된 서열 및 이상에 제시된 서열들 사이에는 근소한 차이가 존재할 수 있다.

실시예 1

컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 및 Fc 라이브러리의 설계

- [0192]
- [0193]
- [0194] 최적화된 Fc 변이체를 설계하기 위하여 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 산출을 실시하였다. Fc 변이체를 여러 컴퓨터 조작/실험 사이클을 통해 컴퓨터 조작 스크리닝하고, 제작하여, 실험적으로 조사하였다. 각각의 성공적인 사이클을 위하여, 실험 데이터는 컴퓨터 조작 스크리닝 산출 및 라이브러리 설계의 다음 세트로 피드백 제공되었다. 모든 컴퓨터 조작 스크리닝 산출 및 라이브러리 설계는 실시예 1에서 제시된다. 각 세트의 산출에 대하여, 결과를 제시하고 관련된 정보 및 매개 변수를 제공하는 표가 제공된다
- [0195] Fc γ R의 세포 외 도메인에 결합된 Fc의 여러 상이한 구조들이 컴퓨터 조작 스크리닝 산출을 위한 주형 구조로서 제공된다. 공개적으로 입수 가능한 Fc/Fc γ R 복합체 구조는, pdb 기탁 코드 1E4K (Sondermann *et al.*, 2000, *Nature* 406: 267- 273.), 및 pdb 기탁 코드 1IIS 및 1IIX (Radaev *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 16469-16477)를 포함한다. Fc γ RIIIb 및 Fc γ RIIIa의 세포 외 부위는 96% 동일하므로, Fc/Fc γ RIIIb 구조의 이용은 본질적으로 Fc γ RIIIa의 이용과 동일하다. 그럼에도 불구하고, 일부 계산의 경우, 보다 정확한 Fc/Fc γ RIIIa 주형 구조는 1IIS 및 1E4K 구조 내에 D129G 돌연변이를 모델링함으로써 제작되었다 (D129G 1IIS 및 D129G 1E4K 주형 구조라고 일컬어짐). 부가적으로, 인간 Fc γ RIIIb, 인간 F158Fc γ RIIIa, 및 마우스 Fc γ RIII의 세포외 도메인에 결합된 인간 Fc에 대한 구조는 표준 방법, 이용 가능한 Fc γ R 서열 정보, 상술한 Fc/Fc γ R 구조, 및 비결합 복합체에 대한 구조적 정보(pdb 기탁 코드 1 H9V) (Sondermann *et al.*, 2001, *J Mol Biol* 309:737-749) (pdb 어세션 코드 1 FCG) (Maxwell *et al.*, 1999, *Nat Struct Biol* 6:437-442), Fc γ RIIIb (pdb 어세션 코드 2FCB) (Sondermann *et al.*, 1999, *Embo J* 18: 1095-1103), 및 Fc γ RIIIb (pdb 어세션 코드 1E4J) (Sondermann *et al.*, 2000, *Nature* 406: 267-273.)를 이용하여 모델링 되었다.
- [0196] 이들 위치에 대하여 고려되는 가변 위치 및 아미노산은 Fc/Fc γ R 및 Fc γ R 구조의 육안 조사 및 용매 접근성 (solvent accessibility) 정보 및 서열 정보를 이용함으로써 선별되었다. Fc 및 Fc γ R의 서열 정보는 특히 가변 위치를 결정하는 데 유용하며, 이는 활성화 및 저해성 수용체 사이에 현저한 친화성을 제공할 수 있다. 실질적으로, 모든 C γ 2 위치가 컴퓨터 조작을 통해 스크리닝되었다. Fc 구조는 2개의 중쇄(1IIS, 1IIX, 및 1E4K 구조 내의 표지된 사슬 A 및 B)의 호모다이머(homodimer)로서, 이들 각각은 힌지 및 C γ 2-C γ 3 도메인을 포함한다 (도 2에 도시됨). Fc γ R (1IIS, 1IIX, 및 1E4K 구조 내의 표지된 사슬 C)은 Fc 호모다이머에 비대칭적으로 결합하기 때문에, 각각의 사슬은 설계 산출에서 종종 개별적으로 고려된다. 일부 산출의 경우, 가변 위치 잔기에 근접한 Fc 및/또는 Fc γ R 잔기가 플롯되었다. 즉, 아미노산 신원이 아닌, 아미노산 형태에 대하여, 단백질

질 설계 산출 시 가변이 허락되며, 이는 형태적 조정을 허락한다. 이들은 관련된 각 세트의 산출에 표 하부에 표시된다. 달리 지정하지 않으면, 통상적으로 고려된 아미노산은 코어(Core), 코어 XM, 표면, 경계, 경계 XM, 또는 모든 20개 아미노산 분류 중에 속한다. 이들 분류는 다음과 같이 정의된다: 코어 = 알라닌, 발린, 이소류신, 류신, 페닐알라닌, 타이로신, 트립토판, 및 메티오닌; 코어 XM = 알라닌, 발린, 이소류신, 류신, 페닐알라닌, 타이로신, 및 트립토판; 표면 = 알라닌, 세린, 트레오닌, 아스파르트산, 아스파라긴, 글루타민, 글루탐산, 아르기닌, 라이신 및 히스티딘; 경계 = 알라닌, 세린, 트레오닌, 아스파르트산, 아스파라긴, 글루타민, 글루탐산, 아르기닌, 라이신, 히스티딘, 발린, 이소류신, 류신, 페닐알라닌, 타이로신, 트립토판, 및 메티오닌; 경계 XM = 경계 = 알라닌, 세린, 트레오닌, 아스파르트산, 아스파라긴, 글루타민, 글루탐산, 아르기닌, 라이신, 히스티딘, 발린, 이소류신, 류신, 페닐알라닌, 타이로신, 및 트립토판; 20개 모두 = 20개의 모든 천연 아미노산.

[0197] 대부분의 산출은 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 방법의 2가지 일반적인 타입 중에 하나를 따른다. 한 방법에 있어, 가변 위치에 대한 아미노산의 형태는 Dunbrack 및 Cohen(Dunbrack *et al.*, 1997, *Protein Sci* 6:1661-1681)의 로타머(rotamer) 라이브러리로부터 유래되는 골격(backbone)-비의존성 측쇄 사슬 로타머의 세트로서 제시되었다. 선택된 가변 위치에 대하여 고려되는 아미노산의 모든 가능한 조합의 에너지는 반 데르 발스(van der Waals), 용매화(solvation), 정전기적 결합(electrostatic bond), 및 수소 결합(hydrogen bond) 상호 작용 및 Dead End Elimination(DEE) 알고리즘을 이용하여 측정된 최적의 바닥 상태(ground state) 서열을 기술하는 힘을 함유하는 역장(force field)을 이용하여 측정되었다. 당업자라면, 예측되는 최하의 에너지 서열이, 단백질에 있어 미소한 형태적 차이가 안정성에 있어 현저한 차이를 초래한다는 사실과 관련하여, 스코어링(scoring) 함수에 있어 초기 오류로 인하여, 실제 최저 에너지 서열일 필요가 없음을 이해할 것이다. 그러나, 예측되는 바닥 상태 서열이 실제 바닥 상태에 가까운 것으로 여겨진다. 그러므로, 부가되는 유리한 다양성은 예측된 바닥 상태 주변의 서열 스페이스 및 에너지에 가까운 서열의 에너지를 측정함으로써 조사될 수 있다. 이를 달성하기 위하여, 그리고 라이브러리에 대한 다양한 서열을 제조하기 위하여, 몬테 카를로(Monte Carlo (MC)) 알고리즘을 이용해 예측된 바닥 상태 주변의 1000개의 유사한 서열의 에너지를 측정하였다. 가변 위치에 아미노산을 함유하는 상기 1000개의 서열 세트 외의 서열 개수는 치환을 위한 점유(occupancy)라 일컬어지며, 이 값은 치환이 얼마나 유망한지를 반영할 수 있다. 이러한 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 방법은 US 6,188,965; US 6,269,312; US 6,403,312; USSN 09/782,004; USSN 09/927,790; USSN 10/218,102; PCT WO 98/07254; PCT WO 01/40091; 및 PCT WO 02/25588에서 개시된 바와 같이, 단백질 설계 자동화^(R)(Protein Design Automation^(R); PDA^(R)) 기술과 실질적으로 유사하며, 용이한 기재를 위하여, 실시예 전반에 걸쳐 PDA^(R) 기술이라 기재된다. 이들 산출의 결과를 나타내는 표에는, 설계된 사슬에 각각의 가변 위치(컬럼 1), 각각의 가변 위치에 대해 고려되는 아미노산(컬럼 2), 각각의 가변 위치에 대한 야생형 Fc 아미노산 신원(컬럼 3), DEE 바닥 상태 서열 내에 각각의 가변 위치에 대한 아미노산 신원(컬럼 4), 및 몬테 카를로 출력(Monte Carlo output)에서 관찰된 아미노산의 세트, 및 유사한 점유(컬럼 5)가 제시된다.

[0198] 기타 산출의 경우, 낮은 에너지 서열에 대한 스크리닝에는 유전적 알고리즘(GA)이 이용되었으며, 이때 에너지는 샘플링될 그들 서열에 대하여 각각의 "진개(evolution)" 라운드 동안 측정된다. 가변 및 플로트되는 위치에 대한 아미노산의 형태는 가요성 로타머(flexible rotamer) 모델을 이용한 골격-비의존성 로타머(rotamer) 라이브러리로부터 유래되는 측쇄 로타머의 세트로서 제시되었다 (Mendes *et al.*, 1999, *Proteins* 37: 530-543). 에너지는 반 데르 발스(van der Waals), 용매화, 정전기적 결합 상호 작용 및 수소 결합 상호 작용을 기재하는 힘을 함유하는 역장(force field)을 이용하여 측정되었다. 상기 산출을 통해, 에너지가 낮은 것이라 예측되는 300개 서열의 리스트가 제작되었다. 상기 결과 및 라이브러리 제작의 분석을 용이하게 하기 위하여, 상기 300개 출력 서열을, 유사값 스코어를 기준으로 하여 관련 그룹에 대하여 서열을 지정하는, 최접 이웃 단일 결합 계층 클러스터링 알고리즘(nearest neighbor single linkage hierarchical clustering algorithm)을 이용하여 10개의 유사한 서열 내로 컴퓨터 조작을 통해 클러스터링되었다(Diamond, 1995, *Acta Cryst* D51: 127-135). 즉, 그룹 내에 모든 서열은 동일한 그룹 내에 모든 기타 서열과 가장 유사하며 기타 그룹 내에 서열에 대해서는 덜 유사하다. 이들 10개의 클러스터의 각각으로부터 최저 에너지 서열이 각 그룹의 대표값으로서 이용되며, 결과로서 제시된다. 이러한 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 방법은 (Raha *et al.*, 2000, *Protein Sci* 9: 1106-1119); USSN 09/877,695; 및 USSN 10/071,859에 개시된 바와 같은 서열 예측 알고리즘(Sequence Prediction AlgorithmTM (SPATM))과 실질적으로 유사하며, 용이한 기재를 위하여 실시예 전반에 걸쳐 SPATM 기술로서 기재한다.

[0199] 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝은, Fc γR와 결합을 매개하거나 잠재적으로 매개하는 가변 위치에 대한 그룹 내

Fc/FcEIR 경계면에서의 활발한 유리한 상호 작용을 설계하기 위하여 적용되었다. 결합 경계면은 2개의 상이한 사슬 상에 많은 수의 Fc 잔기를 포함하며, Fc γR은 Fc에 비대칭적으로 결합하기 때문에, 잔기들은 상호 작용하는 가변 위치의 상이한 세트르 분류되며, 개별적인 세트의 산출에서 설계되었다. 대부분의 경우에 있어서, 이들 세트가 연관된 것으로 여겨지는 잔기의 그룹으로서 선정되었다. 즉, 하나 이상 잔기의 에너지는 하나 이상의 기타 잔기의 신원에 의존한다. 다양한 주형 구조가 이용되었으며, 대부분의 경우에 있어, 산출은 두 사슬 상의 치환을 탐사하였다. 많은 가변 위치 세트에 대하여, 산출은 개시된 PDA^(R) 및 SPATM 기술 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 방법을 이용하여 실시되었다. 이들 산출의 결과 및 관련 매개변수 및 정보는 하기 표 1 내지 표 30에 제시되어 있다.

[0200] 이들 산출의 결과를 나타내는 하기의 표들은 설계된 사슬에 대한 각각의 가변 위치(컬럼 1), 각각의 가변 위치에 고려된 아미노산(컬럼 2), 각각의 가변 위치에 대한 야생형 Fc 아미노산 신원(컬럼 3), 및 각각의 클러스터 그룹으로부터의 최저 에너지 서열을 위한 가변 위치에 대한 아미노산 신원(컬럼 4-13)을 제공한다. 표 1-59는 하기에 표지된 것처럼 2개의 PDA^(R) 및 SPATM 기술로 분류된다. PDA^(R) 표의 컬럼 4는 PDA^(R)가 가동하는 동안 상위 1000개의 서열에서 발생하는 각각의 잔기의 빈도를 나타낸다. 그러므로, 표 1의 첫 번째 열, 328번 위치에서, 상기 위치에 대한 가변 잔기의 세트로서 경계면 아미노산을 이용해 가동될 경우, L은 상위 1000개 서열에서 330회 발생하고, M은 302회 발생한다.

[0201] 또한, 리스트된 위치 내의 리스트된 아미노산 잔기를 단독으로 또는 임의의 조합으로 가지는 항체도 본 발명의 조성물 내에 포함된다 (주: 바람직한 조합은 첨부된 청구의 범위, 요약 및 도면에 개시됨). 하나의 바람직한 조합은 바닥 상태의 리스트된 위치의 리스트된 아미노산 잔기이다 (종종, 야생형과 구분하여, 본원에서는 "글로벌 솔루션"("global solution")이라 언급함). 유사하게, 잔기 위치 및 상기 잔기 위치에 대한 특정 아미노산은 표들 사이에 제시된다.

[0202] 표 4에서와 같이, SPATM 기술 표의 경우, 컬럼 4는 여섯 개의 리스트된 위치에 6개의 리스트된 아미노산을 가지는 단백질을 야기하는 SPATM 가동이다(예를 들어, 컬럼 4는 239E, 265G, 267S, 269Y, 270T 및 299S를 제외한 야생형 서열을 가지는 단일 단백질임). 그러므로, 이들 개개의 단백질은 본 발명의 범위 내에 포함된다. 또한, SPATM 단백질 사이의 조합은, 표 내부 및 표 사이에, 포함된다.

[0203] 또한, 각각의 표는 탄수화물의 존재 또는 부재를 나타내지만, 구체적으로 포함된 것은 반대 서열이다. 예를 들어, 표 1에는 아글라이코실화 변이체가 기재되어 있으나, 이들 동일한 아미노산 변화는 글라이코실화 변이체에 대하여 이루어질 수 있다.

[0204] 나아가, 각각의 표는 사용된 주형 구조 및 "플로트된" 잔기의 리스트를 포함한다. 예를 들어, 표 2는 C120, C132 및 C134를 플로트한 PDA^(R) 가동을 이용하였다.

표 1

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
328 A	경계면	L	L	L:330 M:302 E:111 K:62 A:45 Q:39 D:36 S:30 T:28 N:10 R:7
332 A	표면	I	R	R:247 K:209 Q:130 H:95 E:92 T:59 D:51 N:51 S:42 A:24
328 B	경계면	L	L	L:321 M:237 T:166 K:73 R:72 S:55 Q:20 D:17 E:13 A:12 V:10 N:4
332 B	표면	I	E	E:269 Q:180 R:145 K:111 D:97 T:78 N:65 S:28 A:14 H:13

[0205]

[0206] PDA^(R) 기술, 1IIS 주형 구조; - 탄수화물

표 2

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
239 A	표면	S	K	E:349 D:203 K:196 A:95 Q:83 S:63 N:10 R:1
265 A	경계면 XM	D	D	D:616 N:113 L:110 E:104 S:25 A:23 Q:9
299 A	경계면 XM	T	I	I:669 H:196 V:135
327 A	경계면 XM	A	S	A:518 S:389 N:67 D:26
265 B	경계면 XM	D	Q	Q:314 R:247 N:118 I:115 A:63 E:55 D:34 S:22 K:21 V:11

[0207]

[0208] PDA^(R) 기술; 1IIS 주형 구조; + 탄수화물; 플로트된 120 C, 132 C, 134 C

표 3

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
239 A	표면	S	E	E:872 Q:69 D:39 K:16 A:4
265 A	경계면 XM	D	Y	Y:693 H:111 E:69 D:62 F:29 K:19 R:14 W:2 Q:1
267 A	경계면 XM	S	S	S:991 A:9
269 A	코어 XM	E	F	F:938 E:59 Y:3
270 A	표면	D	E	E:267 T:218 K:186 D:89 Q:88 R:46 S:34 N:29 H:23 A:20
299 A	경계면 XM	T	H	H:486 T:245 K:130 E:40 S:39 D:27 Q:27 A:4 N:2

[0209]

[0210] PDA^(R) 기술; 1IIS 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 120 C, 122 C, 132 C, 133 C, 134 C

표 4

위치	고려되는 아미노산	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	표면	S	E	Q	Q	Q	E	E	E	Q	E	E
265 A	20개 모두	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
267 A	20개 모두	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
269 A	코어	E	Y	Y	A	A	V	Y	A	A	A	A
270 A	표면	D	T	S	A	S	T	T	T	A	A	A
299 A	20개 모두	T	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

[0211]

[0212] SPATM 기술; 1IIS 주형 구조; + 탄수화물; 플로트된 120 C, 122 C, 132 C, 133 C, 134 C

표 5

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
235 A	경계면 XM	L	T	T:195 V:131 L:112 W:107 K:85 F:66 Y:56 E:52 Q:38 S:37 I:34 R:29 H:26 N:23 D:9
296 A	표면	Y	N	N:322 D:181 R:172 K:76 Y:70 Q:59 E:48 S:40 H:20 T:11 A:1
298 A	표면	S	T	T:370 R:343 K:193 A:55 S:39
235 B	경계면 XM	L	L	L:922 I:78

[0213]

[0214] PDA^(R) 기술; 1IIS 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 119 C, 128 C, 157 C

표 6

위치	고려되는 아미노산	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
235 A	20개 모두	L	S	S	P	S	S	S	S	S	S	S
296 A	표면	Y	Q	Q	Q	E	E	Q	E	Q	Q	N
298 A	표면	S	S	K	K	K	K	S	S	S	K	S
235 B	20개 모두	L	K	K	K	L	L	L	L	L	L	K

[0215]

[0216] SPA™ 기술; 1IIS 주형 구조; + 탄수화물; 플로트된 119 C, 128 C, 157 C

표 7

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
239 B	표면	S	E	K:402 E:282 H:116 T:67 R:47 Q:39 D:26 A:11 S:7 N:3
265 B	경계면 XM	D	W	Y:341 W:283 I:236 V:77 F:36 H:9 T:7 E:4 K:4 A:2 D:1
327 B	경계면 XM	A	R	R:838 K: 86 H:35 E:12 T:10 Q:7 A:6 D:3 N:3
328 B	코어 XM	L	L	L:1000
329 B	코어 XM	P	P	P:801 A:199
330 B	코어 XM	A	Y	Y:918 F:42 L:22 A:18
332 B	표면	I	I	I:792 E:202 Q:5 K:1

[0217]

[0218] PDA^(R) 기술; 1IIS 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 88 C, 90 C, 113 C, 114 C, 116 C, 160 C, 161 C

표 8

위치	고려되는 아미노산	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	표면	S	D	T	E	E	E	E	E	E	E	E
265 B	20개 모두	D	G	G	K	G	K	G	G	K	K	G
327 B	20개 모두	A	K	M	L	L	N	L	K	L	L	L
328 B	코어	L	M	M	M	L	A	M	L	M	L	L
329 B	코어	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
330 B	코어	A	L	A	A	A	A	A	A	A	A	A
332 B	표면	I	I	Q	I	I	Q	Q	E	D	I	I

[0219]

[0220] SPA™ 기술; 1IIS 주형 구조; + 탄수화물; 플로트된 88 C, 90 C, 113 C, 114 C, 116 C, 160 C, 161 C

표 9

위치	고려되는 아미노산	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	표면	S	Q	Q	Q	E	Q	E	Q	E	Q	Q
265 A	20개 모두	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
299 A	20개 모두	T	S	S	A	S	S	S	S	S	S	S
327 A	20개 모두	A	A	S	S	S	S	S	S	S	A	S
265 B	20개 모두	D	N	G	G	G	G	G	G	G	G	G

[0221]

[0222] SPA™ 기술; 1IIS 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 120 C, 132 C, 134 C

표 10

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
234 A	경계면 XM	L	K	Y:401 L:260 F:151 I:82 K:63 H:17 Q:11 W:7 R:3 T:2 E:2 V:1
235 A	경계면 XM	L	L	W:777 L:200 K:12 Y:5 I:3 F:2 V:1
234 B	경계면 XM	L	W	W:427 Y:203 L:143 F:74 I:59 E:32 K:23 V:14 D:10 T:7 H:4 R:4
235 B	경계면 XM	L	W	W:380 Y:380 F:135 K:38 L:26 E:15 Q:12 H:8 R:4 T:2

[0223]

[0224] PDA^(R) 기술; D129G 1E4K 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 113 C, 116 C, 132 C, 155 C, 157 C

표 11

위치	고려되는 아미노산	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
234 A	20개 모두	L	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
235 A	20개 모두	L	T	L	L	L	L	L	L	L	T	L
234 B	20개 모두	L	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
235 B	20개 모두	L	S	A	S	A	A	S	S	S	A	A

[0225]

[0226] SPA™ 기술; D129G 1E4K 주형 구조; + 탄수화물; 플로트된 113 C, 116 C, 132 C, 155 C, 157 C

표 12

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
239 A	경계면 XM	S	E	E:235 S:122 D:94 Q:93 A:74 K:70 L:67 T:63 N:57 R:51 I:29 V:18 W:15 H:12
328 A	경계면 XM	L	L	L:688 E:121 K:43 Q:41 A:33 D:26 S:14 T:14 N:12 R:8
332 A	경계면 XM	I	W	I:155 W:95 L:82 K:79 E:74 Q:69 H:67 V:63 R:57 T:57 D:45 S:43 N:42 A:35 F:19 Y:18

[0227]

[0228] PDA^(R) 기술; D129G 1IIS 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 120 C

표 13

위치	고려되는 아미노산	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	20개 모두	S	L	E	E	Q	E	E	K	K	K	K
328 A	20개 모두	L	L	Q	L	Q	K	L	L	Q	K	L
332 A	20개 모두	I	K	K	L	Q	A	K	L	Q	A	Q

[0229]

[0230] SPA™ 기술; D129G 1IIS 주형 구조; + 탄수화물; 플로트된 120 C

표 14

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
239 B	경계면 XM	S	I	R:195 I:169 L:126 V:91 K:89 E:61 H:52 T:50 Q:42 N:35 S:34 D:30 A:26
328 B	경계면 XM	L	L	L:671 T:165 K:40 S:38 E:28 R:17 Q:17 V:11 A:8 D:5
332 B	경계면 XM	I	I	I:387 E:157 L:151 V:78 Q:63 K:50 R:33 T:29 D:25 A:12 N:8 S:6 W:1

[0231]

[0232] PDA^(R) 기술; D129G 1IIS 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 90 C, 160 C, 161 C

표 15

위치	고려되는 아미노산	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	20개 모두	S	T	L	L	L	L	L	L	L	L	L
328 B	20개 모두	L	M	R	M	D	T	M	L	Q	D	L
332 B	20개 모두	I	I	D	Q	Q	Q	L	L	T	Q	L

[0233]

[0234] SPA™ 기술; D129G 1IIS 주형 구조; + 탄수화물; 플로트된 90 C, 160 C, 161 C

표 16

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
239 B	경계면 XM	S	T	T:164 S:159 L:156 E:86 W:76 K:71 D:65 A:52 R:43 H:38 Q:38 N:31 I:14 V:7
328 B	경계면 XM	L	L	L:556 E:114 T:84 K:80 S:69 Q:36 A:31 D:15 R:11 N:4
332 B	경계면 XM	I	W	I:188 W:177 E:97 L:94 T:59 Q:57 V:54 K:52 F:51 D:34 H:33 S:27 R:26 N:18 A:17 Y:16

[0235]

[0236] PDA^(R) 기술; D129G 1E4K 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 117 C

표 17

위치	고려되는 아미노산	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	20개 모두	S	P	S	P	E	L	L	L	L	L	L
328 B	20개 모두	L	K	K	K	K	K	L	K	K	K	L
332 B	20개 모두	I	S	S	E	L	L	L	E	L	L	L

[0237]

[0238] SPA™ 기술; D129G 1E4K 주형 구조; + 탄수화물; 플로트된 117 C

표 18

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
239 A	경계면 XM	S	L	K:196 L:171 I:146 E:88 V:76 R:75 T:50 H:45 D:43 Q:39 S:30 N:22 A:19
328 A	경계면 XM	L	W	L:517 F:230 W:164 H:40 K:29 E:11 R:5 T:4 I:283 L:217 E:178 Q:81 V:64 D:47 T:35 K:27 W:18 R:12 A:10 Y:7 N:7 F:6 S:5 H:3
332 A	경계면 XM	I	E	

[0239]

[0240] PDA^(R) 기술; D129G 1E4K 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 87 C, 157 C, 158 C

표 19

위치	고려되는 아미노산	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	20개 모두	S	F	Q	E	T	P	P	T	P	P	P
328 A	20개 모두	L	K	R	R	K	K	M	R	K	M	R
332 A	20개 모두	I	L	L	I	I	E	I	E	E	I	I

[0241]

[0242] SPA™ 기술; D129G 1E4K 주형 구조; + 탄수화물 원자; 플로트된 87 C, 157 C, 158 C

표 20

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
240 A	코어 + Thr	V	V	V:698 M:162 T:140
263 A	코어 + Thr	V	V	V:966 T:34
266 A	코어 + Thr	V	V	V:983 T:17
325 A	경계면	N	N	N:943 T:40 A:17
328 A	경계면	L	L	L:610 M:363 K:27
332 A	Glu	I	E	E:1000

[0243]

[0244] PDA^(R) 기술; D129G 1I1S 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 273 A, 275 A, 302 A, 323 A, 134 C

표 21

위치	고려되는 아미노산	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
240 A	20개 모두	V	V	A	V	V	V	V	V	V	V	V
263 A	20개 모두	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
266 A	20개 모두	V	I	V	I	I	T	V	V	V	V	I
325 A	20개 모두	N	A	N	N	N	Q	T	T	Q	N	T

[0245]

328 A	20개 모두	L	K	K	L	K	L	K	L	L	L	L
332 A	Glu	I	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

[0246]

[0247] SPAT™ 기술; D129G11 1S 주형 구조; + 탄수화물; 플로트된 273 A, 275 A, 302 A, 323 A, 134 C

표 22

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
240 B	코어 + Thr	V	V	V:713 T:287
263 B	코어 + Thr	V	V	V:992 T:8
266 B	코어 + Thr	V	V	V:976 T:24
325 B	경계면	N	N	N:453 T:296 A:116 D:96 S:30 V:9
328 B	경계면	L	L	L:623 M:194 T:100 R:72 K:11
332 B	Glu	I	E	E:1000

[0248]

[0249] PDA^(R) 기술; D129G 1IIS 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 273 B, 275 B, 302 B, 323 B, 161 C

표 23

위치	고려되는 아미노산	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
240 B	20개 모두	V	A	T	A	T	T	A	A	T	T	T
263 B	20개 모두	V	V	A	A	T	T	V	V	T	A	T
266 B	20개 모두	V	V	V	V	V	V	V	V	V	I	V
325 B	20개 모두	N	N	K	K	N	K	K	N	N	N	N
328 B	20개 모두	L	R	L	L	L	L	L	L	L	L	L
332 A	Glu	I	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

[0250]

[0251] SPATM 기술; D129G 1IIS 주형 구조; + 탄수화물; 플로트된 273 B, 275 B, 302 B, 323 B, 161 C

표 24

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
240 B	코어 + Thr	V	M	V:715 M:271 T:12 I:2
263 B	코어 + Thr	V	V	V:992 T:8
266 B	코어 + Thr	V	V	V:996 T:4
325 B	경계면	N	N	N:651 T:232 D:64 A:53
328 B	경계면	L	M	M:556 L:407 K:37
332 B	Glu	I	E	E:1000

[0252]

[0253] PDA^(R) 기술; D129G 1E4K 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 273 B, 275 B, 302 B, 323 B, 131 C

표 25

위치	고려되는 아미노산	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
240 B	20개 모두	V	T	A	T	A	A	A	A	T	A	A
263 B	20개 모두	V	T	W	T	T	A	T	T	T	L	L
266 B	20개 모두	V	L	A	T	T	V	L	T	T	L	V
325 B	20개 모두	N	A	N	A	A	N	A	A	A	A	A
328 B	20개 모두	L	L	K	L	L	L	L	L	L	L	L

[0254]

332 A	Glu	I	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
-------	-----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

[0255]

[0256] SPATM 기술; D129G 1E4K 주형 구조; + 탄수화물; 플로트된 273 B, 275 B, 302 B, 323 B, 131 C

표 26

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
240 A	코어 + Thr	V	V	V:876 T:109 M:15
263 A	코어 + Thr	V	V	V:913 T:87
266 A	코어 + Thr	V	V	V:969 T:31
325 A	경계면	N	V	V:491 N:236 T:187 A:35 D:32 S:19
328 A	경계면	L	L	L:321 W:290 M:271 F:49 K:46 R:23
332 A	Glu	I	E	E:1000

[0257]

[0258] PDA^(R) 기술; D129G 1E4K 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 273 B, 275 B, 302 A, 323 A, 158 C

표 27

위치	고려되는 아미노산	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
240 A	20개 모두	V	A	T	A	A	T	T	A	A	A	T
263 A	20개 모두	V	T	T	V	V	T	V	L	L	V	T
266 A	20개 모두	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
325 A	20개 모두	N	Q	N	Q	Q	Q	Q	Q	Q	N	N
328 A	20개 모두	L	K	M	K	K	K	K	K	K	K	K
332 A	Glu	I	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

[0259]

[0260] SPATM 기술; D129G 1 E4K 주형 구조; + 탄수화물; 플로트된 273 A, 275 A, 302 A, 323 A, 158 C

[0261]

컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 산출은 N297 탄수화물 및 C_γ2 도메인의 형태를 최적화하기 위하여 Fc 변이체를 설계하는데 목적이 있었다. 탄수화물과 상호 작용하는 위치에 대하여 역학적으로 유리한 치환을 조사함으로써,

변이체는 새로운, 잠재적으로 유리한 탄수화물 형태를 샘플링하도록 조작될 수 있다. Fc 잔기 F241, F243, V262, 및 V264는 Fc/탄수화물 상호 작용을 매개한다. 그러므로, 이들은 표적 위치이다. 이들 설계 산출의 결과는 표 28에 제시하였다.

표 28

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
241 A	코어	F	Y	Y:172 M:162 L:144 F:140 W:110 I:97 A:91 V:84
243 A	코어	F	Y	Y:211 L:204 W:199 F:160 M:141 A:85
262 A	코어	V	M	M:302 I:253 V:243 A:202
264 A	코어	V	F	I:159 M:152 V:142 L:140 W:136 F:120 Y:104 A:47

[0262]

[0263]

PDA^(R) 기술, 1IIS 주형 구조; - 탄수화물

[0264]

컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 산출은 C_Y3 및 C_Y2 도메인 사이의 각도를 최적화하기 위하여 Fc 변이를 설계하는데 목적이 있었다. C_Y2/C_Y3 경계면에 있는 잔기, P244, P245, P247, 및 W313은 C_Y2-C_Y3 각도 및 서로 관련된 도메인의 가요성을 결정하는데 중요한 역할을 담당하는 것으로 여겨진다. 이들 위치에 대하여 에너지 면에서 유리한 치환을 조사함으로써, 변이체는 새로운, 잠재적으로 유리한 잠재적으로 각도 및 가요성 정도를 샘플링하도록 조작될 수 있다.

표 29

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
244 A	경계면	P	H	K:164 H:152 R:110 M:100 S:92 N:57 A:54 D:50 Q:49 T:46 E:37 V:30 L:27 W:23 F:9
245 A	경계면	P	A	A:491 S:378 N:131
247 A	경계면	P	V	V:156 T:125 K:101 E:87 Q:79 R:78 S:76 A:72 D:72 H:60 M:47 N:47
313 A	경계면	W	W	W:359 F:255 Y:128 M:114 H:48 K:29 T:24 A:11 E:10 V:10 S:9 Q:3

[0265]

[0266]

PDA^(R) 기술; 1IIS 주형 구조; - 탄수화물

[0267]

PDA^(R) 및 SPATM 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 방법을 이용한 상기 산출 외에도, 정전기적 전위를 단독적으로 이용한 추가적인 산출을 이용해 Fc 변이를 컴퓨터 조작을 통해 스크리닝하였다. 쿨롱의 법칙(Coulomb's law) 및 데이비-허켈 스케일링(Debye-Huckel scaling)을 이용한 산출은, 중성 아미노산의 음전하를 띠는 아미노산으로의 대체가 Fc_YRIIIa와의 결합을 증진할 수 있으며, 및 양전하를 띠는 아미노산의 중성 또는 음전하를 띠는 아미노산으로의 대체가 Fc_YRIIIa와의 결합을 증진할 수 있는 위치를 포함하여, 아미노산 치환은 하나 이상의 Fc_YR과의 결합에 유리하게 영향을 주는 Fc 내의 다수의 위치에 중점을 두었다. 이들 결과는 표 30에 제시되어 있다.

표 30

【+잔기】 -> 【-잔기】	【중성 잔기】 -> 【-잔기】
H268	S239
K326	Y296
K334	A327
	I332

[0268]

[0269]

쿨롱의 법칙 및 데이비-허켈 스케일링; 1IIS 주형 구조; + 탄수화물

[0270]

아글라이코실화된 Fc를 최적화하기 위하여, 즉 N297 탄수화물 부재 하에서의 Fc 구조, 안정성, 용해성, 및 Fc/Fc_YR 친화성을 최적화하기 위하여, 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 산출을 실시하였다. 설계 산출은 297번 잔기, 이것에 인접한 잔기, Fc/Fc_YR 경계면에 있는 잔기, 및 Fc/탄수화물 경계면에 있는 잔기에 대하여 아글라이코실화된 Fc 주형 구조 조건하에서 유리한 치환을 설계하는데 목적을 두었다. 가변 위치는, 상호 작용하는 가변 위치의 상이한 세트에서 분류되었으며, 산출의 개별적인 세트 하에서 설계되었으며, 다양한 주형 구조가 이용되었다. 많은 가변 위치 세트에 대하여, 산출은 PDA^(R) 및 SPATM 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 방법을 이용하여 수행되었다. 이들 산출의 결과 및 관련 정보는 하기 표 31-53에 제시되어 있다.

표 31

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
265 A	경계면 XM	D	Y	Y:531 F:226 W:105 H:92 K:21 D:16 E:6 T:3
297 A	경계면 XM	N	D	A:235 S:229 D:166 E:114 N:92 Y:57 F:55 Q:25 H:10 T:7 K:6 L:3 R:1
299 A	경계면 XM	T	L	L:482 Y:186 F:131 T:55 S:51 K:31 H:22 A:18 E:14 Q:10
297 B	경계면 XM	N	I	I:299 K:147 V:85 R:82 W:71 N:65 D:35 E:35 Q:34 S:32 L:31 H:30 T:28 A:26

[0271]

[0272] PDA^(R) 기술; 1IIS 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 122 C, 129 C, 132 C, 155 C

표 32

위치	고려되는 아미노산	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
265 A	20개 모두	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
297 A	20개 모두	N	A	T	A	E	K	K	A	A	N	N
299 A	20개 모두	T	S	K	S	K	F	F	F	F	F	S
297 B	20개 모두	N	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K

[0273]

[0274] SPATM 기술; 1IIS 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 122 C, 129 C, 132 C, 155 C

표 33

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
239 A	표면	S	E	E:928 Q:65 D:7
265 A	경계면 XM	D	W	W:709 Y:248 F:43
296 A	표면	Y	H	H:449 Y:146 E:137 D:89 K:64 N:32 T:30 R:25 Q:23 S:5
297 A	표면	N	E	E:471 H:189 D:102 T:97 K:96 R:22 Q:15 S:8
298 A	경계면 XM	S	R	R:353 T:275 K:269 A:56 S:38 E:5 Q:2 H:2
299 A	경계면 XM	T	F	Y:398 F:366 L:217 H:15 K:4

[0275]

[0276] PDA^(R) 기술; D129G1IIS 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 120 C, 122 C, 128 C, 132 C, 155 C

표 34

위치	고려되는 아미노산	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	20개 모두	S	E	Q	Q	E	Q	Q	Q	Q	Q	Q
265 A	20개 모두	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
296 A	20개 모두	Y	D	Q	N	N	Q	N	N	N	Q	N

[0277]

297 A	20개 모두	N	A	A	N	A	D	D	E	N	N	E
298 A	20개 모두	S	K	K	K	S	K	K	K	K	S	K
299 A	20개 모두	T	S	Y	F	S	Y	F	K	F	S	K

[0278]

[0279] SPATM 기술; D129G 1 IIS 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 120 C, 122 C, 128 C, 132 C, 155 C

표 35

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
239 B	표면	S	E	E:417 T:122 D:117 Q:94 R:84 S:63 K:47 H:29 N:19 A:8
265 B	경계면 XM	D	W	W:865 Y:79 F:55 K:1
296 B	표면	Y	Y	Y:549 H:97 D:80 S:75 N:48 E:45 K:32 R:30 Q:28 A:16
297 B	표면	N	R	R:265 H:224 E:157 K:154 Q:75 D:47 T:34 N:24 S:13 A:7
298 B	경계면 XM	S	V	V:966 D:10 T:8 A:8 N:4 S:4
299 B	경계면 XM	T	Y	Y:667 F:330 H:3

[0280]

[0281] PDA^(R) 기술; D129G1 E4K 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 117 C, 119 C, 125 C, 129 C, 152 C

표 36

위치	고려되는 아미노산	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	20개 모두	S	S	R	E	K	S	S	E	E	E	K
265 B	20개 모두	D	A	D	K	Y	A	A	F	F	K	Y
296 B	20개 모두	Y	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
297 B	20개 모두	N	T	S	T	T	E	E	E	S	E	E
298 B	20개 모두	S	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
299 B	20개 모두	T	L	F	E	E	Y	F	Y	F	Y	Y

[0282]

[0283] SPATM 기술; D129G1 E4K 주형 구조; -탄수화물; 플로트된 117 C, 119 C, 125 C, 129C, 152 C

표 37

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
239 A	표면	S	E	E:868 Q:92 D:38 K:1 N:1
265 A	경계면 XM	D	W	W:575 Y:343 F:66 H:15 K:1
296 A	표면	Y	H	H:489 Y:103 R:98 K:97 Q:64 D:63 T:41 N:38 E:7
297 A	Asp	N	D	D:1000
298 A	경계면 XM	S	R	R:340 K:262 T:255 A:59 S:57 E:11 Q:10 H:6
299 A	경계면 XM	T	F	Y:375 F:323 L:260 H:24 K:18

[0284]

[0285] PDA^(R) 기술; D129G 1IIS 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 120 C, 122 C, 128 C, 132 C, 155 C

표 38

위치	고려되는 아미노산	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	20개 모두	S	E	Q	E	E	E	E	E	E	Q	E

[0286]

265 A	20개 모두	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
296 A	20개 모두	Y	E	N	Q	E	N	Q	Q	Q	Q	N
297 A	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
298 A	20개 모두	S	K	S	K	S	K	K	K	S	K	K
299 A	20개 모두	T	S	K	Y	S	F	F	F	F	F	K

[0287]

[0288] SPAT 기술; D129G 1IIS 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 120 C, 122 C, 128 C, 132 C, 155 C

표 39

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
239 B	표면	S	E	E:318 Q:123 T:109 D:108 R:93 S:89 K:69 N:40 H:38 A:13
265 B	경계면 XM	D	W	W:745 Y:158 F:85 K:9 E:1 R:1 H:1
296 B	표면	Y	Y	Y:390 H:127 S:83 R:81 K:78 N:65 D:55 E:49 Q:44 A:26 T:2
297 B	Asp	N	D	D:1000
298 B	경계면 XM	S	V	V:890 T:35 A:29 D:19 S:16 N:10 E:1
299 B	경계면 XM	T	Y	Y:627 F:363 H:10

[0289]

[0290] PDA^(R) 기술; D129G1 E4K 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 117 C, 119 C, 125 C, 129 C, 152 C

표 40

위치	고려되는 아미노산	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	20개 모두	S	K	E	E	Q	E	K	Q	E	K	Q
265 B	20개 모두	D	F	K	K	A	K	Y	W	K	L	F
296 B	20개 모두	Y	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
297 B	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
298 B	20개 모두	S	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
299 B	20개 모두	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	F	F	Y	Y

[0291]

[0292] SPA™ 기술; D129G 1E4K 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 117 C, 119 C, 125 C, 129 C, 152 C

표 41

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
239 A	경계면 XM	S	E	E:312 L:148 D:102 Q:98 K:64 I:61 S:57 A:44 T:39 N:29 R:23 V:18 W:5
265 A	경계면 XM	D	W	W:363 Y:352 F:139 H:77 K:39 R:14 D:11 E:4 Q:1
297 A	Asp	N	D	D:1000
299 A	경계면 XM	T	Y	Y:309 F:224 L:212 H:96 K:92 E:28 Q:20 R:16 T:2 S:1

[0293]

[0294] PDA^(R) 기술; D129G 1IIS 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 120 C, 122 C, 132 C, 155 C

표 42

위치	고려되는 아미노산	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	20개 모두	S	E	L	L	L	E	E	E	Q	L	E
265 A	20개 모두	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
297 B	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
299 A	20개 모두	T	S	K	K	F	F	F	K	F	K	F

[0295]

[0296] SPA™ 기술; D129G 1IIS 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 120 C, 122 C, 132 C, 155 C

표 43

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
239 B	경계면 XM	S	L	L:194 T:122 S:120 E:111 D:79 K:71 A:62 Q:57 R:43 H:43 N:37 I:24 W:24 V:13
265 B	경계면 XM	D	W	Y:248 W:233 F:198 K:84 D:57 E:55 H:42 R:28 Q:20 A:10 T:10 N:8 S:7
297 B	Asp	N	D	D:1000
299 B	경계면 XM	T	Y	Y:493 F:380 H:76 T:31 E:10 D:4 A:3 S:3

[0297]

[0298] PDA^(R) 기술; D129G 1 E4K 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 117 C, 119 C, 129 C, 152 C

표 44

위치	고려되는 아미노산	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	20개 모두	S	R	E	P	L	L	F	P	P	L	L
265 B	20개 모두	D	D	K	S	F	S	Y	A	M	A	D
297 B	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
299 B	20개 모두	T	Y	Y	Y	Y	E	Y	Y	Y	Y	Y

[0299]

[0300] SPAT™ 기술; D129G 1E4K 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 117 C, 119 C, 129 C, 152 C

표 45

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
239 A	경계면 XM	S	E	E:251 L:125 D:120 Q:112 S:73 K:65 I:61 A:58 T:45 N:35 R:28 V:23 W:4
265 A	경계면 XM	D	Y	Y:216 H:153 K:135 D:109 W:104 F:86 R:54 T:38 E:29 Q:22 A:21 N:17 S:13 L:3
297 A	Asp	N	D	D:1000

[0301]

[0302] PDA^(R) 기술; D129G 1IIS 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 299 A, 120 C, 122 C, 132 C, 155 C

표 46

위치	고려되는 아미노산	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	20개 모두	S	S	L	E	L	Q	Q	E	Q	Q	E
265 A	20개 모두	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
297 A	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

[0303]

[0304] SPA™ 기술; D129G 1IIS 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 299 A, 120 C, 122 C, 132 C, 155 C

표 47

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
239 B	경계면 XM	S	L	L:158 S:137 T:125 E:115 D:86 K:75 A:62 Q:56 H:43 R:39 N:35 W:30 I:24 V:15
265 B	경계면 XM	D	Y	Y:188 W:159 F:156 D:122 K:77 E:71 H:61 Q:44 R:39 A:24 S:22 N:19 T:18
297 B	Asp	N	D	D:1000

[0305]

[0306] PDA^(R) 기술; D129G 1E4K 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 299 B, 117 C, 119 C, 129 C, 152 C

표 48

위치	고려되는 아미노산	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	20개 모두	S	S	E	P	P	E	S	P	L	F	L
265 B	20개 모두	D	A	K	A	M	K	F	Y	D	F	F
297 B	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

[0307]

[0308] SPA™ 기술; D129G 1E4K 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 299 B, 117 C, 119 C, 129 C, 152 C

표 49

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
297 A	Asp	N	D	D:1000
299 A	경계면 XM	T	Y	T:123 Y:64 H:64 K:64 Q:64 F:64 R:63 D:63 E:63 S:63 L:63 N:62 I:57 A:54 V:52 W:17

[0309]

[0310] PDA^(R) 기술; D129G 1 IIS 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 239 A, 265 A, 120 C, 122 C, 132 C, 155 C

표 50

위치	고려되는 아미노산	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
297 A	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
299 A	20개 모두	T	K	K	K	K	F	F	K	K	K	K

[0311]

[0312] SPA™ 기술; D129G 1IIS 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 239 A, 265 A, 120 C, 122 C, 132 C, 155 C

표 51

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
297 B	Asp	N	D	D:1000
299 B	경계면 XM	T	Y	T:123 F:64 Y:64 H:64 S:63 N:61 Q:61 D:61 E:60 K:58 V:57 A:57 R:54 I:52 L:51 W:50

[0313]

[0314] PDA^(R) 기술; D129G 1 E4K 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 239 B, 265 B, 117 C, 119 C, 129 C, 152 C

표 52

위치	고려되는 아미노산	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
297 B	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
299 B	20개 모두	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

[0315]

[0316] SPA™ 기술; D129G 1 E4K 주형 구조; - 탄수화물; 플로트된 239 B, 265 B, 117 C, 119 C, 129 C, 152 C

[0317]

컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 산출은, 그들이 안정되고, Fc 구조를 유지하며, 응집하는 경향이 없도록 하기 위하여 글라이코실화의 부재 하에서 용매에 노출된 잔기에 유리한 치환을 설계함으로써 아글라이코실화된 Fc를 최적화하기 위하여 수행되었다. N297 탄수화물은 노출된 소수성 패치(patch)를 은폐하며, 이는 보통 Fc의 안정성 및 구조적 무결성을 유지하고, 중심 축에 걸친 C γ 2 도메인의 응집을 억제하는 또 다른 Ig 도메인과의 단백질-단백질 상호 작용에 대한 경계면일 수 있다. 설계를 위한 주요 잔기는 F241, F243, V262, 및 V264 인데, 이들은 L328, I332, 및 I336과 같은 잔기에 이외에, C γ 2 상의 탄수화물 이후에 존재하며, 이들은 마주하는 C γ 2 도

메인을 향해 안쪽을 향하는 노출된 비극성 잔기로서, 이는 이전에 제시된 산술에서 고려되었다. C γ 2 잔기의 중요성은, 서열 정렬에 의한 C γ 3 도메인 내의 해당 잔기는 2개의 C γ 3 도메인 사이의 비극성 상호작용을 매개하거나, C γ 3 코어에 묻혀진다는 사실의 확인을 통해 뒷받침된다.

표 53

위치	고려되는 아미노산	WT	바닥 상태	바닥 상태 주변 서열
241 A	표면	F	E	E:190 R:172 K:138 H:117 T:93 Q:91 D:85 S:49 N:49 A:16
243 A	표면	F	R	R:190 H:164 Q:152 E:149 K:92 T:71 D:64 N:58 S:42 A:18
262 A	표면	V	D	D:416 E:164 N:138 Q:87 T:83 R:44 S:32 K:24 A:11 H:1
264 A	표면	V	H	R:368 H:196 K:147 E:108 Q:68 T:34 N:33 D:25 S:15 A:6

[0318]

[0319] PDA^(R) 기술; 1IIS 주형 구조; - 탄수화물

[0320] 최종 세트의 산출에서, SPATM 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 방법은 20개의 모든 아미노산으로 모든 선택된 가변 위치의 교환을 계산하는데 적용되었다. 20개의 모든 아미노산을 위한 최저 에너지 로타머 형태는 결정되었고, 이들 에너지는 가변 위치의 아미노산에 대한 치환의 에너지로서 규정되었다. 그러므로, 이들 산출은 각각의 가변 위치에 대하여 20개의 아미노산 각각에 대한 치환의 에너지를 제공한다. 이들 데이터는 Fc/Fc γ R 친화성, Fc 안정성, Fc 용해성, 탄수화물 형태, 및 힌지 형태의 최적화를 포함하는 글라이코실화된 및 아글라이코실화된 Fc에 목적으로 하는 다양한 설계에 유용하다. 나아가, 이들 산출은 유리한 및 불리한 치환 모두에 대한 에너지를 공급하기 때문에, 그들은 활성화 대 저해성 Fc γ R에 대한 상이한 결합을 가능하게 할 수 있게 하는 치환을 가이드한다. 다양한 주형 구조가 이용되었으며, 산출은 양쪽 사슬에 대한 치환을 조사하였다. 이들 산출의 결과 및 관련 매개변수 및 정보는 하기 표 54-59에 제시되어 있다. 컬럼 1은 1IIS 주형 구조의 사슬 A 및 B에 가변 위치를 기재한 것이다. 컬럼 2는 각각의 가변 위치에 야생형 아미노산 동일성을 기재하고 있다. 나머지 20 컬럼은 천연 20 아미노산 각각에 대한 에너지를 제공한다 (상위 열에 도시됨). 모든 치환은 0 에너지로 설정된, 최저 에너지 치환에 준하여 표준화되었다. 예를 들어, 표 54에서, 사슬 A 상의 L235의 경우, 세린은 최저 에너지 치환이고, L235A는 L235S 보다 덜 안정된 0.9 kcal/mol이다. 극히 높은 에너지는, 20-50 kcal/mol 사이의 에너지에 대해서는 20 kcal/mol로 설정되었고, 50 kcal/mol 보다 높은 에너지에 대해서는 50 kcal/mol로 설정되었다. 유리한 치환은 각각의 위치에 대한 최저 에너지인 것으로 고려될 수 있으며, 최저 에너지 치환으로부터 작은 에너지 차이를 갖는 치환, 예를 들어, 1-2, 1-3, 1-5, 또는 1-10 kcal/mol 이내의 치환으로 고려될 수 있다.

[0321]

표 54

Pos	W	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
235 A	L	0.9	2.8	2.8	1.5	3.2	3.2	3.4	4.9	1.6	2.1	3.2	0.9	0.3	1.3	0.7	0.0	1.7	4.3	6.5	3.2
236 A	G	0.0	1.9	5.1	6.7	10.0	2.3	4.3	17.2	5.7	20.0	4.6	3.2	6.6	5.6	6.1	0.6	6.2	12.0	6.7	20.0
237 A	G	20.0	20.0	20.0	50.0	50.0	0.0	0.0	50.0	20.0	50.0	20.0	20.0	50.0	50.0	50.0	20.0	20.0	50.0	50.0	50.0
239 A	S	0.2	4.3	2.6	4.0	12.0	4.5	6.9	11.3	1.7	0.1	2.1	1.7	7.8	1.2	2.6	0.3	5.7	11.0	20.0	20.0
285 A	D	9.0	8.1	6.3	7.8	5.1	0.0	7.3	50.0	8.2	9.9	7.7	8.0	50.0	9.0	8.5	7.8	20.0	50.0	20.0	5.8
267 A	S	2.1	3.3	7.3	1.4	50.0	7.3	0.0	20.0	0.9	2.2	5.0	4.8	0.0	2.2	3.1	2.9	20.0	20.0	50.0	50.0
269 A	E	0.5	2.1	1.3	0.6	1.6	3.9	2.0	1.2	1.1	1.3	2.7	0.0	0.0	0.6	1.1	0.3	0.8	1.0	5.6	1.2
270 A	D	0.3	2.8	2.3	2.0	4.0	4.0	3.4	2.4	1.2	0.0	2.3	2.1	20.0	2.0	2.3	1.4	1.8	4.2	5.4	6.0
296 A	Y	2.7	2.0	1.4	0.0	50.0	0.0	0.0	4.6	2.1	2.4	3.3	1.2	50.0	0.2	1.5	1.3	4.6	4.4	16.3	18.2
268 A	S	0.7	2.4	6.7	3.4	20.0	3.8	0.0	6.7	0.0	4.1	1.4	4.1	50.0	1.8	1.1	0.2	2.2	6.3	17.8	20.0
269 A	T	0.6	2.8	11.5	10.1	20.0	5.1	0.0	10.7	7.1	20.0	4.3	5.8	50.0	6.3	12.0	0.0	3.0	7.1	14.8	20.0
234 B	L	2.1	3.2	4.1	4.2	1.6	5.3	0.1	0.7	0.6	1.8	2.0	1.7	50.0	2.8	0.3	2.3	1.7	2.6	13.0	0.0
235 B	L	0.6	2.3	2.5	0.7	5.4	4.8	1.4	3.6	0.1	0.0	2.0	1.7	16.6	0.5	1.2	0.7	0.7	5.3	6.8	5.5
236 B	G	3.1	1.3	4.4	6.2	5.2	0.0	1.9	20.0	3.1	0.0	4.1	2.7	50.0	3.7	1.2	1.2	20.0	20.0	20.0	11.3
237 B	G	20.0	50.0	50.0	50.0	50.0	0.0	0.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
239 B	S	0.9	2.4	3.4	1.8	5.4	5.6	2.7	3.0	0.9	0.0	2.0	1.6	50.0	1.8	1.8	1.4	1.4	5.1	20.0	5.3
265 B	D	4.5	5.1	4.6	4.6	4.9	0.0	3.8	9.0	2.0	2.6	4.1	2.1	50.0	4.5	5.1	4.4	5.8	9.2	11.4	5.8
327 B	A	1.8	3.4	4.7	3.9	20.0	7.0	20.0	20.0	0.8	0.0	1.9	1.5	20.0	3.0	2.6	3.2	20.0	20.0	20.0	20.0

[0322]

328B	L	3.7	3.6	4.0	3.7	0	50.0	0.4	0	6.8	0	50.0	3.8	0.0	2.1	4.1	0	3.6	8.1	4.9	0	0	0	0	50.0	12.5	0	50.0
329B	P	3.4	3.6	2.0	2.0	50.0	8.0	16.8	0	8.0	16.8	50.0	2.0	20.0	16.9	20.0	0.0	20.0	2.0	2.0	1.3	17.1	16.5	0	50.0	16.5	0	50.0
330B	A	0.5	2.0	2.6	0.5	2.4	3.8	1.4	4.2	0.0	2.0	2.2	0.8	2.0	2.2	0.8	0	2.0	0.6	0.9	0.3	5.1	5.1	0	8.0	5.1	0	2.7
332B	I	1.5	2.7	1.2	1.6	11.9	6.8	12.9	1.2	2.9	4.0	1.4	1.7	4.0	1.4	1.7	0	5.0	4.9	1.8	1.7	3.0	3.0	0	20.0	3.0	0	20.0

[0323]

[0324] SPAT™ 기술; 1IIS 주형 구조; + 탄수화물 원자, 플로트되지 않은 위치

[0325]

55

Pos	WT	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
235	L	0.8	2.8	2.6	1.7	3.3	3.3	3.4	5.0	1.5	2.1	3.3	1.0	0.3	1.4	1.8	0.0	1.9	3.6	6.6	3.3
236	A	0.0	1.7	5.2	6.9	11.3	2.3	4.4	17.2	5.8	19.0	4.9	3.3	8.2	5.6	6.0	0.8	5.6	11.8	6.8	20.0
237	G	20.0	20.0	20.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	20.0	50.0	20.0	20.0	50.0	50.0	20.0	20.0	20.0	50.0	50.0	50.0
238	A	8.6	8.0	10.5	13.4	8.4	0.0	5.0	0.0	12.4	11.3	9.7	9.3	3.2	12.4	20.0	8.6	0.0	50.0	20.0	8.4
239	A	0.1	4.2	2.5	0.0	20.0	4.5	9.0	10.8	1.8	0.2	2.1	1.8	9.7	1.3	2.5	0.3	5.7	10.7	20.0	19.0
240	A	1.3	2.4	2.3	5.3	20.0	7.2	20.0	5.1	10.8	6.2	5.7	2.0	1.1	9.5	13.1	2.5	0.5	0.0	20.0	20.0
241	F	0.1	1.6	1.2	0.3	0.2	4.1	1.2	18.0	1.3	0.1	2.1	0.4	7.7	0.5	1.1	0.1	0.0	8.3	3.6	0.4
242	L	3.0	3.4	5.5	8.3	14.4	8.5	11.1	3.3	13.9	2.2	2.7	5.5	0.9	7.9	17.1	3.8	2.3	0.0	20.0	17.5
243	F	1.6	2.2	2.7	0.2	1.4	5.6	2.6	0.0	2.2	2.0	3.0	2.3	2.2	0.5	1.6	1.3	0.9	1.2	5.3	1.6
244	P	1.2	1.8	3.8	0.8	10.2	3.8	4.6	20.0	0.2	2.9	2.0	2.8	2.0	0.8	1.7	0.0	19.3	20.0	7.8	12.2
245	A	3.9	0.0	0.0	0.0	20.0	9.1	20.0	0.0	20.0	20.0	20.0	20.0	0.0	20.0	20.0	8.0	20.0	50.0	20.0	20.0
246	K	1.3	2.7	2.0	2.0	2.9	5.7	2.9	1.4	1.4	1.5	3.1	0.2	0.0	1.2	1.5	1.7	1.4	1.2	5.4	3.0
247	P	1.2	2.1	0.3	0.7	4.0	3.9	3.7	1.8	1.6	1.7	3.3	0.0	0.5	0.9	1.5	0.7	1.1	1.3	8.9	3.7
248	K	0.9	2.7	1.5	0.8	3.1	4.7	3.4	3.3	2.0	1.9	2.6	1.2	3.6	1.5	2.3	0.7	0.0	2.5	5.6	2.7
249	D	1.2	3.7	1.6	0.0	20.0	7.3	19.7	50.0	1.7	20.0	2.2	1.4	20.0	1.5	3.4	2.5	18.3	50.0	20.0	20.0
250	T	0.0	1.8	3.8	5.8	50.0	6.0	20.0	4.5	6.3	6.3	0.3	3.2	50.0	8.7	9.3	1.8	1.3	1.9	20.0	50.0
251	L	1.1	1.9	1.2	0.5	5.8	5.1	1.9	5.6	0.9	0.7	2.4	1.4	50.0	0.0	1.4	0.5	0.8	6.9	8.9	5.8
252	M	0.3	1.2	0.6	0.0	3.0	3.8	3.4	3.9	1.0	0.3	2.2	0.3	17.0	0.1	1.1	0.1	0.2	4.6	4.2	3.3

[0326]

Pos	WT	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
271 A	0.0	5.3	8.1	9.3	20.0	3.1	9.1	20.0	6.0	9.5	5.3	7.3	5.9	5.9	5.9	1.6	4.1	15.2	20.0	20.0	
272 A	0.8	1.9	0.9	1.2	3.0	3.2	3.7	3.7	1.6	1.8	3.2	0.3	50.0	1.1	1.6	0.0	1.0	3.5	4.0	3.4	
273 A	1.2	2.9	1.8	2.0	20.0	7.1	20.0	6.8	0.0	20.0	2.0	0.0	2.8	20.0	2.1	1.4	1.7	20.0	20.0	20.0	
274 A	0.4	1.8	1.4	0.8	1.9	3.9	2.4	1.4	0.7	1.1	2.9	0.9	20.0	0.0	0.1	0.0	0.4	0.7	3.3	2.3	
275 A	8.0	9.5	10.3	9.5	0.0	13.5	5.1	10.1	6.2	6.3	6.0	9.1	6.1	9.1	15.1	3.6	7.2	6.1	13.5	4.3	
276 A	1.3	2.4	2.4	2.2	0.8	5.1	0.8	1.2	0.6	2.3	2.5	1.8	50.0	1.6	2.5	1.2	0.0	0.3	4.2	3.6	
277 A	5.5	7.4	3.4	6.4	15.4	11.2	3.2	8.2	1.9	3.9	3.6	6.6	3.5	5.5	15.4	6.9	6.1	14.1	0.0	20.0	
278 A	1.6	2.7	3.9	1.8	1.0	7.3	3.4	17.7	1.4	7.5	2.1	0.0	50.0	1.9	2.2	2.6	9.9	20.0	15.8	1.4	
279 A	3.1	4.1	4.0	2.2	20.0	8.1	9.7	8.5	0.0	1.4	3.1	3.3	20.0	1.9	4.6	4.3	3.4	4.2	20.0	20.0	
280 A	1.8	2.6	2.7	0.2	11.5	2.9	8.8	20.0	3.4	3.2	2.9	3.8	50.0	0.0	3.7	0.6	6.8	12.7	11.9	11.4	
281 A	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	0.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	
282 A	0.9	2.1	1.6	1.1	2.9	4.2	3.5	1.4	1.6	1.8	3.6	0.4	18.8	0.5	1.0	0.0	0.6	0.9	4.7	3.1	
283 A	0.7	1.6	0.7	0.5	1.0	4.4	1.4	0.4	1.2	1.8	1.9	0.0	0.4	0.6	1.5	0.4	0.3	1.2	4.1	0.9	
284 A	0.0	2.2	3.1	1.2	20.0	5.0	20.0	4.0	0.7	2.6	0.8	2.6	50.0	0.8	0.7	0.8	0.1	1.5	20.0	20.0	
285 A	0.2	1.4	3.1	1.3	3.0	2.0	2.4	3.6	1.1	2.6	3.0	0.7	2.2	0.2	0.8	0.0	1.1	4.7	4.9	4.0	
286 A	0.8	2.5	1.2	1.1	2.4	4.7	2.7	2.1	0.0	0.7	1.8	0.6	20.0	1.2	0.7	0.9	1.7	2.1	5.2	2.7	
287 A	0.6	2.6	5.8	3.3	10.4	5.4	9.1	11.3	0.0	4.4	1.3	3.6	50.0	2.6	2.3	1.0	1.9	12.5	10.4	10.4	
288 A	0.8	2.6	2.0	1.3	3.0	3.4	3.8	2.3	1.4	1.7	2.5	0.3	50.0	0.5	1.3	0.0	0.4	2.0	4.5	3.6	

[0328]

Pos	WT	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	Y	W	Y
306	L	4.3	8.2	7.1	5.9	2.8	10.4	3.4	13.7	3.0	0.0	8.5	6.0	50.0	5.9	0.9	6.2	5.3	11.4	9.6	10.3
307	T	1.4	3.2	3.8	2.2	6.5	5.5	4.2	0.5	0.3	4.2	3.0	2.2	0.0	1.9	1.3	1.4	0.9	1.2	6.2	6.5
308	V	1.8	5.5	6.5	8.0	50.0	7.9	20.0	4.5	20.0	5.5	19.4	7.6	50.0	7.7	5.0	0.0	0.7	5.9	50.0	50.0
309	L	1.1	2.7	0.7	0.7	1.3	4.6	2.7	0.7	1.7	1.0	2.8	0.0	1.8	0.7	1.3	1.0	0.6	0.5	5.0	2.1
310	H	2.0	2.8	0.9	4.1	50.0	5.6	0.2	8.8	4.0	7.1	4.0	0.0	0.2	4.9	10.0	2.0	2.5	6.4	50.0	50.0
311	Q	0.0	2.5	1.6	1.6	2.5	4.3	1.6	1.4	0.6	0.9	2.9	0.9	1.7	0.8	0.9	0.0	0.3	2.2	4.8	2.0
312	N	5.4	5.1	5.9	1.3	20.0	0.0	20.0	10.0	3.4	4.8	3.3	7.1	50.0	2.7	3.9	4.1	3.2	11.9	20.0	20.0
313	W	4.6	6.4	5.5	5.6	1.1	10.8	5.0	11.0	5.6	5.2	7.6	5.4	50.0	4.8	12.9	6.0	3.8	6.6	0.0	2.6
314	L	2.1	2.9	4.3	2.2	5.7	6.1	7.9	5.4	0.7	0.0	1.7	2.3	50.0	1.6	1.6	3.0	4.7	6.3	8.0	6.0
315	D	0.3	1.4	1.6	0.1	3.3	4.2	1.9	1.8	0.8	0.5	1.8	0.6	50.0	0.0	0.7	0.0	0.9	2.4	6.2	3.7
316	G	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	0.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
317	K	0.0	14.0	18.0	17.0	50.0	5.0	50.0	20.0	8.5	5.0	12.7	20.0	15.0	17.0	13.0	2.8	0.2	20.0	50.0	50.0
318	E	2.0	3.0	2.7	1.7	2.7	5.7	2.5	0.0	1.1	1.6	1.3	1.7	20.0	1.4	2.6	2.2	1.3	0.0	6.1	8.5
319	Y	2.9	4.4	3.9	3.4	0.0	8.8	1.8	20.0	0.5	5.2	0.7	3.2	50.0	3.1	5.6	3.4	3.6	20.0	20.0	0.2
320	K	2.3	3.1	3.0	2.7	20.0	7.8	20.0	9.4	0.0	0.6	2.7	1.3	50.0	2.4	1.9	3.3	3.3	7.2	20.0	20.0
321	C	0.0	3.2	20.0	18.0	20.0	6.9	20.0	20.0	20.0	20.0	10.4	20.0	50.0	19.0	20.0	1.5	8.7	18.0	20.0	20.0
322	K	2.0	2.5	3.5	2.8	2.7	6.4	2.1	0.2	0.1	1.2	2.7	2.7	50.0	2.1	0.0	2.3	1.6	0.9	14.5	2.8
323	V	1.5	2.8	7.3	11.0	20.0	8.1	20.0	6.0	9.6	20.0	4.9	8.5	50.0	13.0	20.0	2.8	1.6	0.0	20.0	20.0

[0330]

Pos	MT	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
232	P	1.3	3.2	2.2	2.2	4.1	2.9	3.6	1.8	2.1	2.8	3.9	1.1	0.0	1.1	1.6	0.7	1.4	3.0	6.2	4.1
233	B	0.5	2.2	1.7	0.5	2.6	3.7	2.9	4.4	1.4	1.1	3.2	0.6	2.7	0.4	1.6	0.0	1.2	6.8	5.5	2.6
234	B	2.9	4.0	4.8	4.9	2.0	6.1	0.8	1.5	0.0	1.9	2.7	2.6	2.0	3.6	1.2	3.1	2.5	3.4	13.4	0.5
235	L	0.6	2.3	2.4	0.9	5.7	4.9	1.4	3.7	0.0	0.0	1.9	1.9	17.3	0.8	1.4	0.8	0.7	5.2	7.8	5.3
236	G	3.6	2.5	5.1	11.8	6.8	0.0	2.6	20.0	5.0	20.0	4.5	3.5	50.0	5.5	19.9	2.5	20.0	20.0	20.0	14.1
237	B	20.0	50.0	50.0	50.0	50.0	0.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
238	H	3.5	4.7	8.5	4.2	20.0	9.8	20.0	0.0	5.6	9.6	4.6	8.1	1.3	5.8	20.0	4.9	4.4	13.0	20.0	20.0
239	S	1.0	2.5	3.4	2.0	7.2	5.7	3.1	3.1	0.6	0.0	2.0	1.9	50.0	1.7	1.1	1.5	1.5	5.2	20.0	5.2
240	V	0.1	2.3	7.0	11.9	20.0	8.5	20.0	8.1	12.7	20.0	12.0	7.6	0.0	11.6	20.0	1.2	1.9	0.8	20.0	20.0
241	F	0.0	2.0	1.4	0.8	1.0	4.0	2.0	6.5	1.1	0.6	2.3	0.2	50.0	0.3	1.5	0.1	0.9	5.7	4.1	1.1
242	L	2.2	3.3	6.5	6.6	6.9	7.9	4.3	0.0	8.7	3.9	4.5	5.3	0.0	9.1	6.8	2.9	1.1	0.5	20.0	8.7
243	F	0.8	2.6	1.9	1.7	0.8	4.9	2.0	3.6	1.2	0.8	2.5	0.0	50.0	1.6	2.7	0.1	1.8	3.9	4.3	1.0
244	P	1.1	2.1	4.0	1.1	11.9	3.5	5.4	20.0	1.4	3.2	3.0	2.0	1.8	1.2	1.3	0.0	19.8	20.0	9.1	11.0
245	P	3.2	0.0	0.0	0.0	20.0	8.6	0.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	0.0	20.0	20.0	6.0	20.0	20.0	20.0	20.0
246	K	0.5	2.6	1.4	1.2	2.1	4.4	1.6	0.6	0.9	1.4	2.5	0.2	0.3	0.2	0.3	0.1	0.0	2.0	4.9	2.4
247	P	0.8	2.6	0.7	1.0	3.6	3.9	2.6	6.2	1.8	2.1	2.9	0.3	0.0	0.8	1.5	0.3	0.7	9.5	6.6	3.4
248	K	0.2	2.2	0.2	0.6	2.2	4.1	2.5	2.4	1.7	1.0	2.2	0.0	1.3	0.8	1.7	0.6	0.7	2.8	4.7	2.3
249	D	2.6	3.3	0.0	4.6	10.8	6.2	6.5	50.0	4.6	6.2	4.4	0.5	50.0	4.7	6.3	3.5	6.1	50.0	20.0	7.2

[0332]

B	T	0.0	2.2	4.9	2.8	20.0	6.3	20.0	2.2	4.3	3.2	3.0	9.2	50.0	3.4	4.9	1.3	2.3	3.1	20.0	20.0
250 B																					
251 B	L	0.0	2.4	1.6	1.2	5.6	3.6	2.2	7.4	1.2	0.6	2.3	0.5	50.0	0.8	1.8	0.4	2.5	8.7	8.2	5.9
252 B	M	1.3	2.4	0.8	0.0	1.8	5.7	2.3	0.6	1.8	0.6	2.5	1.0	50.0	1.0	1.8	1.5	1.3	0.8	5.1	1.6
253 B	I	1.6	3.0	2.0	1.2	3.7	4.5	3.5	2.9	0.8	2.4	2.4	1.1	1.0	0.0	1.5	1.2	1.4	3.4	4.4	3.6
254 B	S	1.0	1.5	0.8	0.6	3.8	3.8	3.2	0.5	1.9	2.5	3.1	0.3	6.2	0.5	1.7	0.0	0.1	1.1	5.5	3.7
255 B	R	0.8	2.0	2.0	1.7	0.0	5.4	1.4	2.0	1.0	1.6	1.3	0.8	50.0	1.4	1.1	1.5	2.0	2.0	3.7	0.8
256 B	T	0.6	2.0	1.8	1.1	2.5	3.7	1.8	1.6	1.0	1.4	2.2	0.0	1.2	0.5	0.1	0.8	1.2	1.2	5.5	2.4
257 B	P	2.5	2.0	2.0	2.0	5.0	9.0	0.0	2.0	2.0	2.0	2.0	0.0	0.0	2.0	2.0	4.8	2.0	2.0	5.0	5.0
258 B	E	1.5	2.4	2.7	1.4	2.7	8.4	4.2	0.0	0.2	5.4	2.4	1.1	60.0	1.3	2.5	2.2	1.1	1.0	1.0	3.0
259 B	V	2.9	4.2	6.3	5.2	2.0	9.3	0.0	0.0	8.1	8.9	5.5	5.6	50.0	6.2	2.0	4.5	2.5	0.0	2.0	2.0
260 B	T	0.0	1.6	5.3	1.9	2.0	4.9	0.0	0.0	1.1	2.8	1.4	3.9	0.2	2.3	2.8	0.4	0.1	2.7	2.0	2.0
261 B	C	0.0	10.0	2.0	2.0	2.0	2.6	0.0	2.0	2.0	2.0	2.0	0.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.6	2.0	2.0	2.0
262 B	V	2.1	2.4	2.7	2.4	8.1	7.2	3.8	1.8	3.5	8.6	9.4	2.7	50.0	3.2	4.8	2.9	1.9	0.0	1.4	9.1
263 B	V	2.2	3.7	4.7	2.0	2.0	9.1	0.0	1.5	1.3	2.8	2.0	5.4	60.0	1.3	2.0	3.6	2.1	0.0	2.0	2.0
264 B	V	2.1	3.0	4.8	2.7	8.6	6.8	6.8	0.0	1.8	1.8	3.7	3.6	10.0	3.0	2.2	2.6	2.2	1.0	1.0	2.0
265 B	D	4.5	5.2	4.8	4.7	5.0	0.0	3.8	8.5	1.8	2.6	4.1	1.8	60.0	4.5	5.3	4.5	8.0	9.2	1.2	5.8
266 B	V	5.3	5.5	7.2	7.0	2.0	12.0	2.0	2.1	2.0	2.0	2.0	5.7	50.0	1.8	2.0	5.9	4.7	0.0	5.0	5.0
267 B	S	2.8	4.3	6.2	3.8	0.0	7.4	1.0	50.0	1.0	0.3	3.2	3.2	0.5	1.5	0.8	3.3	1.1	5.0	6.3	5.0

[0333]

Pos	WT	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
268 B	H	2.6	3.7	5.1	4.1	4.9	6.0	1.8	2.8	0.0	2.5	3.8	2.6	3.4	2.1	1.8	2.5	3.8	2.7	7.8	5.5
269 B	E	0.4	2.4	1.7	0.8	2.8	3.7	2.6	1.0	1.0	1.6	3.0	0.0	12.8	0.5	0.7	0.3	0.7	0.6	5.1	2.7
270 B	D	0.0	1.6	1.1	7.3	4.8	4.3	2.6	20.0	3.8	14.5	3.8	1.2	5.9	6.3	2.1	0.3	1.9	5.4	16.3	5.6
271 B	P	1.1	3.3	5.6	3.4	4.1	5.5	4.2	20.0	1.9	3.6	3.9	3.3	7.4	2.7	0.0	1.5	2.2	5.2	4.8	4.4
272 B	Q	0.9	1.9	1.0	0.6	3.0	3.9	2.9	1.3	1.7	2.2	3.5	0.0	4.9	0.0	1.4	0.2	0.6	1.4	3.9	3.2
273 B	Y	3.5	4.8	6.2	8.3	20.0	9.2	20.0	4.6	8.4	3.1	3.5	7.4	50.0	10.6	20.0	2.0	0.0	4.8	20.0	20.0
274 B	K	0.1	1.6	0.4	0.9	1.7	3.8	1.8	1.9	0.4	0.5	2.4	0.3	15.6	0.1	0.0	0.0	0.2	1.6	2.2	1.9
275 B	F	5.7	7.0	8.4	9.2	0.0	11.2	3.5	9.2	7.9	5.7	5.1	7.0	4.1	9.7	12.3	6.9	4.5	3.3	10.3	5.0
276 B	N	0.0	6.2	6.9	6.4	20.0	4.7	12.1	20.0	9.3	10.0	7.4	3.8	50.0	6.4	9.2	2.8	20.0	20.0	20.0	20.0
277 B	W	8.3	10.0	10.6	9.2	2.6	14.2	7.4	12.7	6.7	7.4	6.4	10.8	6.8	9.3	11.9	9.7	8.0	14.4	0.0	15.9
278 B	Y	0.0	2.3	1.7	4.0	50.0	5.1	50.0	20.0	2.8	20.0	2.1	12.6	11.0	4.4	2.0	0.8	2.5	18.8	20.0	4.2
279 B	Y	3.1	3.5	4.2	2.9	20.0	8.5	13.9	0.4	0.0	2.9	2.0	3.4	20.0	1.4	4.0	4.2	2.4	1.2	20.0	20.0
280 B	D	0.5	3.0	2.1	1.5	6.7	3.1	4.7	12.6	2.9	1.8	2.9	1.8	20.0	1.4	3.1	0.0	2.7	5.5	6.1	7.3
281 B	G	5.6	5.8	5.5	4.8	7.8	0.0	7.2	6.5	5.3	5.7	7.1	3.4	50.0	4.0	6.3	3.6	3.2	6.4	10.3	7.6
282 B	V	0.4	1.9	1.1	0.6	2.9	4.1	2.1	1.3	1.0	1.4	2.9	0.2	50.0	0.0	0.7	0.0	0.4	0.7	6.1	2.8
283 B	E	0.8	1.9	4.3	1.7	6.7	4.2	6.2	2.9	0.5	4.4	0.3	2.5	0.0	1.5	1.6	1.0	1.5	3.9	7.9	6.7
284 B	Y	0.4	2.4	2.5	1.1	20.0	5.9	20.0	1.1	1.2	6.2	0.8	2.4	50.0	1.5	3.3	0.0	1.5	1.8	20.0	20.0
285 B	H	1.3	2.4	2.1	1.7	2.4	3.4	1.2	1.8	0.7	2.3	2.7	0.0	1.6	0.9	0.8	0.5	0.4	2.0	5.8	2.4

[0334]



[0336]

Pos	WT	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
304	S	1.5	2.3	8.2	20.0	7.6	20.0	7.6	7.6	0.0	20.0	20.0	6.3	50.0	20.0	20.0	0.0	2.7	3.8	20.0	0.0
305	Y	0.1	1.2	3.3	1.1	20.0	4.6	20.0	3.2	1.1	11.0	1.5	1.8	50.0	0.6	2.0	0.6	0.0	0.7	20.0	20.0
306	L	4.7	6.8	6.3	4.3	10.4	11.4	7.8	4.2	3.0	0.0	3.8	5.7	13.4	4.4	14.1	6.5	4.3	6.0	20.0	12.1
307	T	1.5	3.0	2.7	1.7	4.1	5.2	3.0	1.5	1.9	3.1	3.4	1.7	0.0	1.7	1.9	1.5	1.4	2.0	4.4	4.3
308	Y	0.0	0.6	7.6	20.0	8.6	20.0	20.0	20.0	16.1	15.1	20.0	12.4	50.0	20.0	20.0	1.2	3.6	4.3	20.0	20.0
309	L	1.4	3.0	2.2	1.1	3.0	6.0	3.5	2.0	2.4	1.7	3.6	0.2	0.0	1.6	2.3	1.8	1.4	2.0	5.1	3.3
310	H	2.4	2.9	2.7	4.9	20.0	6.8	4.4	4.8	3.1	15.0	3.4	0.0	2.3	4.6	7.0	1.8	1.6	3.8	20.0	20.0
311	Q	0.0	2.2	1.3	0.7	2.1	3.3	2.4	12.6	0.8	0.9	2.3	0.6	3.2	0.4	0.8	0.2	1.6	1.8	4.6	2.0
312	N	0.0	1.0	0.2	0.3	6.0	5.4	2.3	12.0	2.1	2.9	1.6	0.9	0.0	1.3	5.7	0.1	5.6	3.8	8.0	7.8
313	W	5.3	6.6	7.3	5.4	0.0	11.4	6.2	20.0	4.0	5.2	4.3	6.0	50.0	6.5	8.9	6.6	17.2	20.0	2.1	0.9
314	L	1.7	2.2	3.1	0.0	6.4	5.8	1.5	2.1	0.6	0.2	1.1	1.9	50.0	0.8	1.0	1.7	0.9	3.1	3.7	11.9
315	D	1.4	2.3	2.4	0.7	6.0	5.5	2.3	4.8	2.2	1.0	2.9	1.8	50.0	1.0	2.2	0.2	0.0	4.5	8.5	6.8
316	G	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
317	K	0.9	2.3	4.3	2.6	1.2	4.0	0.8	9.9	13.0	4.8	1.6	1.3	50.0	4.2	0.9	0.4	13.8	10.2	20.0	1.7
318	E	0.7	1.2	3.1	1.0	7.0	5.1	8.2	0.4	1.0	5.7	1.7	2.3	3.8	1.0	1.6	0.4	0.0	1.0	3.8	7.7
319	Y	6.5	7.1	8.5	8.8	0.0	12.5	3.9	3.1	5.2	5.4	8.4	7.2	50.0	9.0	13.7	7.2	5.8	3.9	20.0	1.7
320	K	3.1	4.3	7.3	4.3	20.0	8.6	15.0	1.4	0.0	11.6	3.6	6.6	50.0	2.9	2.4	4.0	3.3	2.0	20.0	20.0
321	C	0.0	6.5	20.0	20.0	20.0	6.6	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	19.0	20.0	20.0	3.1	11.0	20.0	20.0	20.0

[0337]



[0339]

[0340] SPA™ 기술; 1HIS 주형 구조; - 탄수화물, 플로트되지 않은 위치

[0341]

표 56

Pos	WT	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
239	S	0.2	4.6	2.7	0.0	20.0	4.5	14.5	11.0	1.9	0.3	2.0	1.9	8.1	1.4	2.6	0.4	5.7	11.0	20.0	20.0
240	A	1.5	2.4	2.4	6.9	20.0	7.4	20.0	5.1	9.9	5.9	5.5	2.4	1.1	12.3	2.6	0.5	0.0	0.0	20.0	20.0
263	V	2.3	2.8	5.3	5	20.0	8.8	20.0	9.6	7.3	7.3	5.5	4.8	50.0	10.17	2.8	1.4	0.0	0.0	20.0	20.0
264	A	1.8	3.1	2.6	1.8	0.0	6.3	1.9	0.6	2.4	0.8	2.7	2.1	1.6	2.7	2.3	1.1	0.5	3.5	0.0	0.0
266	V	4.8	5.2	6.9	3	20.0	11.20	20.0	0.8	11.0	20.0	8.5	6.6	50.0	12.20	6.1	3.7	0.0	0.0	20.0	20.0
296	A	3.4	2.7	1.1	0.0	50.0	0.7	50.0	5.0	3.6	3.5	4.2	0.9	50.0	0.9	2.2	5.3	5.5	16.1	18.4	18.4
299	T	0.7	3.2	9.9	4	20.0	6.2	20.0	10.7	6.7	20.0	4.1	12.8	50.0	5.9	11.8	0.0	2.5	8.2	13.20	20.0
325	N	2.5	3.5	7.7	2.5	20.0	8.0	20.0	0.0	6.1	20.0	7.8	12.8	12.8	0.8	20.0	2.7	0.0	1.0	20.0	20.0
328	L	6.1	6.3	7.1	4.2	50.0	8.8	20.0	50.0	4.6	0.0	7.2	6.1	50.0	4.0	6.3	6.7	50.0	50.0	20.0	50.0
330	A	0.8	1.8	1.2	0.0	2.5	4.0	2.9	1.7	1.2	1.6	2.8	0.0	20.0	0.4	1.0	0.2	0.5	1.7	6.2	2.9
332	I	1.8	3.8	4.6	1.3	5.1	7.1	1.8	3.4	0.2	0.0	2.6	3.8	20.0	0.6	2.4	2.3	2.5	4.2	20.0	5.6
239	B	1.0	2.4	3.5	2.0	6.7	5.6	2.9	3.1	0.3	0.0	1.9	2.1	50.0	1.5	1.8	1.4	1.4	5.2	20.0	4.2
240	V	0.3	2.4	6.9	7	20.0	6.6	20.0	8.3	12.3	20.0	14.2	7.4	0.0	13.4	2.0	1.3	1.9	0.9	20.0	20.0
263	B	2.4	3.9	4.5	5	20.0	9.3	20.0	15.8	17.1	20.0	20.0	5.3	50.0	13.8	3.9	2.2	0.0	0.0	20.0	20.0
264	B	2.2	3.2	4.8	2.7	7.4	6.9	6.0	0.0	1.9	1.9	3.8	3.7	9.9	8.1	2.2	2.7	2.4	0.9	14.7	18.2
266	B	5.4	5.5	7.5	2	20.0	12.20	20.0	2.6	20.0	20.0	20.0	5.4	50.0	10.20	6.0	4.7	0.0	0.0	50.0	50.0
296	B	1.5	2.7	1.3	1.2	4.0	4.1	3.6	1.1	1.9	2.6	3.5	0.0	20.0	0.7	1.8	1.1	1.4	1.3	6.5	4.2
299	T	0.0	2.2	7.5	10.20	20.0	4.8	20.0	7.7	5.8	20.0	10.0	5.1	50.0	10.18	0.3	1.1	5.4	20.0	20.0	20.0

[0342]

B				2	0	0	0	0	0	3	0	2	4				
325	N	3.4	5.1	8.6	20.0	8.2	20.0	16.7	20.0	20.0	0.0	19.7	20.0	4.8	8.6	18.2	20.0
328	L	3.6	3.5	3.8	50.0	8.3	2.9	50.0	1.9	3.8	50.0	3.4	8.4	4.7	2.8	12.5	50.0
330	A	0.7	2.1	2.9	2.7	4.0	1.4	4.8	2.2	2.3	0.8	0.2	0.8	1.1	0.2	4.7	7.8
332	I	1.8	2.9	1.2	13.5	7.0	3.2	1.7	0.0	1.7	1.9	1.2	5.4	2.0	2.0	3.3	20.0

[0343]

[0344]

SPA™ 기술; D129G IIS 주형 구조; + 탄수화물

[0345]

표 57

Pos	WT	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	V
239	S	1.2	3.5	1.7	0.0	20.0	5.8	11.0	6.5	2.9	3.9	2.7	8.5	1.3	2.7	0.6	3.5	5.4	20.0	20.0	
A																					
240	V	1.2	2.4	6.0	1.4	20.0	7.1	20.0	6.7	0.4	10.1	7.5	4.4	1.8	8.0	2.0	0.4	0.0	20.0	20.0	
A																					
263	V	0.0	0.4	1.0	6.7	20.0	6.9	4.4	11.7	4.9	0.2	19.0	0.8	0.7	11.0	20.0	1.4	0.1	1.0	20.0	
A																					
264	V	2.9	3.7	6.3	2.8	11.6	7.6	13.2	0.0	3.2	3.4	4.1	4.2	7.1	2.9	3.4	3.1	1.9	0.8	12.8	
A																					
286	V	4.8	5.9	6.8	9.5	50.0	10.3	20.0	3.5	12.7	12.7	12.7	4.1	50.0	11.0	11.0	5.2	2.9	0.0	50.0	
A																					
296	Y	0.8	2.0	1.5	0.1	0.2	3.4	1.5	6.6	1.7	0.6	1.8	1.2	2.6	0.0	1.6	0.2	2.5	5.6	3.8	
A																					
298	T	1.9	3.7	7.5	0.0	20.0	7.9	14.2	2.9	0.8	3.4	4.4	2.3	50.0	1.9	3.0	3.5	4.1	3.3	20.0	
A																					
325	N	1.0	1.4	3.1	2.8	20.0	7.4	20.0	8.5	7.7	10.4	6.1	2.8	15.4	5.4	0.0	0.0	0.1	3.8	20.0	
A																					
328	L	2.5	5.3	4.0	1.9	50.0	7.5	20.0	20.0	1.0	0.2	0.0	2.9	90.0	0.4	4.8	3.2	2.9	7.0	50.0	
A																					
330	A	0.9	2.1	1.8	1.2	2.4	2.7	3.1	3.1	1.4	2.1	3.5	0.5	20.0	0.8	1.0	0.0	0.5	2.9	5.2	
A																					
332	I	2.9	3.7	3.9	0.9	6.1	7.8	2.5	0.0	2.7	0.8	2.8	3.5	50.0	0.7	3.7	2.9	2.5	1.0	8.1	
A																					
289	S	1.9	3.1	3.0	1.9	1.5	6.2	2.3	14.1	1.8	1.4	2.9	1.8	0.0	1.9	3.2	1.9	2.3	7.7	15.8	
B																					
240	V	0.5	1.7	5.0	3.0	20.0	6.6	20.0	1.2	1.4	1.1	8.8	4.6	6.3	20.0	20.0	1.0	0.2	0.0	20.0	
B																					
263	V	2.9	3.2	6.4	2.2	10.0	9.2	6.9	12.8	6.0	0.0	10.0	5.7	50.0	17.5	20.0	3.2	2.2	0.0	20.0	
B																					
264	V	2.9	3.6	4.4	3.0	8.8	7.1	6.2	0.0	2.3	1.9	4.5	3.4	1.7	3.2	3.5	3.5	2.0	0.9	12.4	
B																					
256	V	4.4	4.6	2.6	6.8	20.0	10.7	20.0	0.0	4.9	1.7	8.5	5.6	50.0	6.0	12.4	5.3	4.6	1.5	20.0	
B																					
296	Y	0.0	7.1	6.7	7.2	20.0	0.1	18.6	50.0	7.0	2.7	5.6	6.8	50.0	7.2	9.3	2.3	50.0	50.0	14.0	
B																					
299	I	0.0	3.2	10.0	6.0	20.0	5.5	20.0	15.0	3.2	5.9	4.4	0.4	50.0	5.7	8.4	1.2	1.4	13.0	20.0	
A																					

[0346]

B																								
325 B	N	14	2.5	5.0	0.0	20.0	0.0	0.0	20.0	7.0	0.0	20.0	1.0	2.2	1.0	0.3	1.9	1.1	20.0	2.6	5.1	20.0	0.0	20.0
328 B	L	04	1.3	5.6	0.0	50.0	0.0	50.0	50.0	4.5	0.0	50.0	1.9	2.4	2.4	8.3	50.0	0.8	16.4	1.0	1.2	50.0	0.0	50.0
330 B	A	06	1.4	2.5	0.9	3.1	2.5	1.2	20.0	2.5	1.2	20.0	0.0	2.4	2.1	0.3	20.0	0.4	0.6	0.0	4.0	20.0	0.5	3.4
332 B	I	43	5.3	5.7	0.0	11.4	9.3	4.3	2.5	5.8	9.3	4.3	5.8	2.0	4.0	6.5	17.9	3.7	5.9	4.8	4.2	3.7	20.0	11.6

[0347]

[0348] SPATM 기술; D129G 1IIX 주형 구조; + 탄수화물

[0349]

제 58

Pos	WT	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
239 A	S	1.2	2.3	2.2	1.8	7.9	5.5	7.6	0.5	0.2	1.8	2.6	1.4	0.9	1.3	1.9	1.5	0.8	0.0	8.6	9.6
240 A	V	0.7	2.9	6.8	4.3	20.	6.5	20.	0.0	10.	20.	3.1	8.1	2.1	7.7	20.	1.4	1.1	2.4	20.	20.
253 A	V	1.7	2.9	4.6	8.	20.	8.4	5.8	15.	2.3	5	2.1	3.2	0.	20.	15.	3.6	1.2	0.0	20.	20.
264 A	V	2.7	3.3	3.6	1.5	13.	6.7	5.9	0.0	2.3	4.9	3.7	3.2	1.9	2.5	3.0	3.0	2.5	0.7	19.	19.
266 A	V	3.5	3.5	5.7	4	20.	10.	20.	5.7	6.3	7.8	7.4	5.2	0	6	0	4.2	1.7	0.0	20.	50.
296 A	Y	2.6	50.	50.	50.	50.	0.0	60.	50.	18.	18.	50.	50.	50.	50.	50.	50.	50.	50.	50.	13.
299 A	T	0.2	0.7	6.6	1.2	20.	5.8	8.6	1.6	0.8	1.5	1.8	4.8	0	1.0	9.2	0.0	0.0	1.6	20.	20.
325 A	N	3.1	3.6	7.3	2.4	20.	7.7	20.	20.	20.	10.	13.	3.6	0	0.0	20.	4.0	9.7	0	20.	20.
328 A	L	0.6	0.0	1.5	5.4	50.	1.6	50.	50.	3.1	4.2	9.0	1.4	0	8.9	9.6	0.6	0.1	0	50.	50.
330 A	A	1.9	2.5	4.1	2.8	4.5	4.1	3.0	3.2	1.0	2.7	3.5	2.1	0	2.4	2.6	1.3	0.0	3.9	7.8	5.3
332 A	I	2.3	3.5	2.2	0.8	20.	6.8	9.6	0.0	3.4	0.2	2.8	2.8	14.	3.8	4.6	2.8	1.3	0.9	10.	20.
239 B	S	1.4	3.6	2.5	1.4	16.	5.8	6.2	5.0	2.5	1.4	2.0	3.8	0.3	0.5	2.4	0.0	1.6	5.3	20.	19.
240 B	V	0.0	2.8	12.	8	20.	5.7	20.	12.	10.	20.	8.5	15.	3.1	20.	20.	1.0	0.2	2.4	20.	20.
263 B	V	1.1	2.4	3.8	9	20.	7.8	17.	11.	4.5	20.	6.3	3.3	0	50.	20.	3.2	1.2	0.0	20.	20.
284 B	V	3.3	4.0	5.0	2.9	14.	7.5	4.8	0.0	2.6	3.6	4.6	3.5	1.7	3.1	4.1	3.9	2.9	1.3	8.9	20.
288 B	V	2.8	3.3	4.9	3	50.	9.5	20.	20.	20.	7.9	15.	4.5	0	4.9	20.	1.9	0.0	3.6	50.	50.
286 B	Y	2.8	50.	50.	50.	50.	0.0	60.	50.	17.	18.	50.	50.	50.	50.	50.	50.	50.	50.	50.	11.
289	T	0.0	3.8	12.	9.2	20.	5.9	20.	7.3	4.8	3.2	4.3	8.0	50.	12.	8.8	0.2	2.1	4.4	20.	20.

[0350]

	B		6	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
325	N	0.3	2.0	5.5	2.2	50.	6.1	20.	0.0	10.	1.3	14.	16.	10.	2.3	2.0	20.
B						0	0	0	5	0	2.4	5	5	0	0	1.0	50.
328	L	5.4	5.7	7.3	4.4	50.	9.8	20.	50.	50.	2.8	5.1	0.0	2.5	6.4	50.	50.
B						0	0	0	0	0	0.6	7.4	0.0	0	0	0	0
330	A	0.8	1.4	3.2	1.3	3.9	3.2	2.7	4.0	20.	0.7	3.1	3.7	1.3	0.0	0.4	8.2
B										0	1.3	0.0	0.0	0	4.2	4.2	3.6
332	I	1.9	3.1	2.7	1.7	5.2	6.9	3.1	0.4	2.6	7.7	1.9	0.0	1.3	2.3	1.6	10.
B										4	1.3	2.2	2.2	2.2	2.0	2.0	5.6

[0351]

[0352] SPA™ 기술; D129G 1E4K 주형 구조; + 탄수화물

[0353]

부 59

Pos	WT	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
239 A	S	1.4	2.6	3.1	1.0	20.0	5.7	4.8	3.4	2.0	1.2	2.6	1.6	4.8	0.0	2.1	1.3	2.1	3.3	13.8	19.6
240 A	V	2.9	3.5	3.7	4.6	20.0	8.2	10.8	0.0	8.1	3.2	5.4	3.1	4.6	5.5	17.5	4.0	1.8	1.2	20.0	20.0
263 A	V	3.6	4.9	6.2	8.7	20.0	9.9	20.0	3.7	4.2	0.5	6.7	6.1	50.0	9.5	20.0	5.1	3.6	0.0	20.0	20.0
264 A	V	1.8	2.8	3.3	2.0	2.9	6.2	3.1	0.0	2.4	0.8	3.0	2.4	6.1	1.4	2.8	2.4	1.9	0.8	10.2	2.2
266 A	V	4.4	5.2	4.9	7.1	20.0	10.6	20.0	1.0	12.1	4.8	9.1	4.6	50.0	7.9	12.6	5.8	3.5	0.0	20.0	20.0
296 A	Y	1.2	2.9	0.7	1.4	3.1	3.9	2.7	2.4	2.3	1.9	2.2	0.0	1.6	1.4	3.0	0.9	1.0	3.6	6.0	2.6
299 A	T	0.0	2.6	6.0	5.0	20.0	5.3	20.0	20.0	6.0	20.0	4.4	3.0	50.0	14.1	13.2	0.9	3.8	15.1	15.0	20.0
325 A	N	5.2	7.0	6.6	6.9	50.0	11.3	20.0	1.3	14.3	13.5	13.9	0.0	5.0	6.0	20.0	6.0	4.6	3.2	20.0	50.0
328 A	L	4.8	5.5	7.0	3.2	20.0	10.5	20.0	50.0	5.1	0.0	8.5	5.5	50.0	3.5	8.2	5.5	13.4	50.0	20.0	50.0
330 A	A	0.9	1.8	1.1	0.9	3.5	4.0	3.0	2.3	1.2	1.6	2.8	0.0	14.5	0.9	1.1	0.1	0.4	2.0	6.4	3.2
332 A	I	6.3	6.4	6.7	4.8	8.2	9.9	5.2	3.1	0.0	3.6	5.2	6.8	20.0	3.6	4.6	5.5	4.8	4.0	11.2	7.1
239 B	S	0.7	2.3	2.6	2.0	5.3	5.1	3.3	1.7	0.0	0.0	2.0	0.8	15.5	0.9	0.8	0.7	0.7	3.3	8.2	6.0
240 B	V	2.3	3.0	4.1	7.3	20.0	8.1	20.0	5.1	20.0	11.8	10.9	3.8	20.0	17.0	20.0	3.6	1.3	0.0	20.0	20.0
263 B	V	3.2	4.3	7.3	8.3	20.0	9.6	20.0	13.3	8.5	0.6	20.0	6.0	50.0	8.5	20.0	4.6	4.0	0.0	20.0	20.0
264 B	V	2.1	3.2	3.7	2.7	17.8	6.6	11.5	0.0	2.0	0.8	3.5	3.0	7.8	2.0	1.5	2.5	1.3	1.0	13.9	20.0
266 B	V	5.0	5.8	5.2	3.0	20.0	11.2	20.0	2.3	20.0	14.3	17.3	2.5	50.0	11.6	20.0	5.4	3.9	0.0	20.0	20.0
296 B	Y	0.8	2.3	1.0	0.5	2.7	3.7	2.5	1.2	1.3	2.1	3.0	0.0	7.0	0.4	1.1	0.3	0.8	1.8	6.0	2.4
299 B	T	1.1	2.2	7.6	5.4	20.0	6.4	12.1	1.8	3.9	17.6	6.8	3.9	20.0	4.6	10.0	0.8	0.0	1.8	20.0	20.0

[0354]

	10.	11.	13.	11.	11.	20.	15.	20.	8	5	5	16.	10.	11.	10.	20.	0	0
B 325 B	1	5	1	2	0	0	7	0	20	17	20	1	6	1	5	20	0	0
B 328 B	2.9	4.1	4.8	3.5	60	0	8.5	1.7	9.6	0.0	1.6	3.5	3.3	3.3	1.9	50.	0	50.
B 330 B	0.1	2.0	1.4	1.8	1.6	4.0	3.0	2.0	0.5	0.5	2.6	0.0	0.7	0.3	0.6	2.1	4.4	2.4
B 332 B	3.4	4.4	3.5	3.1	6.1	8.2	4.1	0.0	3.3	1.3	3.3	4.0	0.8	3.9	2.7	1.1	20.	6.1

[0355]

[0356] SPA™ 기술; Fc/Fc γ RIIb 모델 주형 구조; - 탄수화물

[0357] 표 1-59에서 이상에 제시된 설계 산출의 결과는 실험적 생산 및 스크리닝을 위한 일련의 Fc 변이체 라이브러리를 구축하는데 이용되었다. 실험적 라이브러리는 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 및 실험적 스크리닝의 연속적인 반복을 통해 설계되었다. 후속하는 Fc 라이브러리의 설계는 이전 라이브러리로부터의 피드백으로부터 이점을 취하였으며, 그러므로, 이는 통상적으로 이전 스크리닝에서 유리한 특성을 나타낸 Fc 변이체의 조합을 포함한다. 구축되고 실험적으로 테스트된 Fc 변이체의 완전한 세트는 표 60에 제시되어 있다. 이 표에서, 1번째 열은 가변 위치를 표시하고, 이후의 열들은 야생형 및 Fc 변이체에 대한 이들 가변 위치에서의 아미노산을 나타낸다. 예를 들어, 변이체 18은 다음과 같은 4개의 돌연변이체를 동반한다: F241E, F243Y, V262T, 및 V264R. Fc 변이체 세트를 구성하는 가변 위치 잔기는 도 3에 구조적으로 도시되어 있으며, 도 4의 인간 IgG1 Fc 서열 상에 표시되어 있다.

[0358]

제 60

Position	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334	
WT	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K	
1												A																			
2											L																				
3											I																				
4				W																											
5				L																											
6					W																										
7					L																										
8					L																										
9					W	W				A																					
10					W	W				A																					
11					L					I																					
12					L					I																					
13					L					I	W																				
14					Y					T																					
15					E	R				T																					
16					E	Q				T	R																				
17					R	Q				T	R																				
18					E	Y				T	R																				
19																															
20																															
21																															
22																															
23																															
24										H																					
25										A																					
26																															
27																															
28										H	A																				
29																															
30																															

[0359]

Position	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	266	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334					
WT	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K					
31					E	R				E	R																								
32					E	Q				F	E																								
33					R	Q				T	R																								
34					E	Y				T	R																								
35																			A																
36																			A																
37																			A																
41					E																														
42					Q																														
43					E																														
44																																			
45																																			
46					E																														
47					E																														
48					E																														
49					E																														
50																																			
51																																			
52																																			
53																																			
54																																			
55																																			
56																																			
57																																			
58																																			
59																																			
60																																			
61																																			
62																																			

[0360]

Position	234	235	239	240	241	243	244	245	247	252	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334						
WT	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	V	D	V	S	E	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	X						
62																																				
63																	S																			
64																	D																			
65																	S																			
66																	D																			
67																	E																			
68													Y				U																			
69												Y					D																			
70												Y					E																			
71												F													I											
72																									Q											
73																																				
74																																				
75												T																								
76												F																								
77																																				
78																																				
79												I																								
80																																				
81																																				
82																																				
83																																				
84																																				
85																																				
86																																				
87																																				
88																																				
89																																				
90																																				
91																																				
92																																				

[0361]

[0362]

Position	234	235	239	240	241	243	244	245	247	252	253	254	255	256	257	259	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334								
WT	L	L	S	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	A	L	P	A	I	E	K				
93			E																																		
94			E																																		
95			E																																		
96			N																																		
97			N																																		
98			M																																		
99			N																																		
100			Q																																		
101			Q																																		
102			Q																																		
103																																					
104																																					
105																																					
106																																					
107									Y																												
108																																					
109																																					
110																																					
111																																					
112																																					
113																																					
114																																					
115																																					
116																																					
117																																					
118																																					
119																																					
120																																					
121																																					
122																																					

Position	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	286	287	296	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334						
WT	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K						
123																																				
124																																				
125																																				
126																																				
127																																				
128																																				
129																																				
131																																				
132																																				
133																																				
134																																				
135																																				
136																																				
137																																				
138																																				
139																																				
140																																				
141																																				
142																																				
143																																				
144																																				
145																																				
146																																				
147																																				
148																																				
149																																				
150																																				
151																																				
152																																				

[0363]

Position	234	235	238	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	268	269	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
WT	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	Y	S	E	Y	N	N	K	A	L	P	A	I	E	K
153																											
154																											
155																								V			
156																								I			
157																								F			
158																								R			
159																								H			
160																											
161																											
162																											
163																											
164																											
165																											
166																											
167																											
168																											
169																											
170																											
171																											
172																											
173																											
174																											
175																											
176																											
177																											
178																											
179																											
180																											
181																											
182																											

[0364]

Position	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334	
WT	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K	
183			D																												
184			E																												
185			D									V																			
186			D									I																			
187			D									L																			
188			D									F																			
189			D									Y																			
190			D									H																			
191			D									T																			
192												E																			
193																	D	D													
194																	E	D													
195																	N	D													
196																	Q	D													
197																	H	D													
198																	T														
199																			V	I											
200																			D	I											
201																			D	L											
202																			D	F											
203																			D	H											
204																			D	E											
205																			D												
206																			D	A							Y	E			
207			D																								Y	E			
208			N																								Y	E			
209			D																								L	E			
210			N																								L	E			
211													I						A												
212			D																A												

[0365]

Position	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
WT	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	S	T	N	K	A	A	L	P	A	L	E	E	K	
213			N														A													
214			D																											
215			D															A												
216			D																											

[0366]

[0367]

[0368]

[0369]

실시예 2

Fc 라이브러리의 실험적 제조 및 스크리닝

Fc 변이체에 대한 대부분 실험은 항암 항체 알렘투주맵(Campath^(R), Ilex Pharmaceuticals LP의 등록 상표) 조건 하에서 수행되었다. 알렘투주맵은 표적 항원 CD52 내의 짧은 선형 에피토프에 결합한다 (Hale *et al.*, 1990, *Tissue Antigens* 35:118-127; Hale, 1995, *Immunotechnology* 1:175-187). 알렘투주맵은 1차 조작 주형으로서 선택되었으며, 이는 그의 효능이 부분적으로 작용체 세포를 상보하는 능력이 있으며(Dyer *et al.*, 1989, *Blood* 73: 1431-1439; Friend *et al.*, 1991, *Transplant Proc* 23:2253-2254; Hale *et al.*, 1998, *Blood* 92: 4581-4590; Glennie *et al.*, 2000, *Immunol Today* 21:403-410), 결합 분석평가에 있어 그의 항체의 생산 및 이용이 비교적 간단하기 때문이다. 기타 항체의 조건 하에서 본 발명의 최적화된 Fc 변이체를 평가하기 위하여, 선택된 Fc 변이체를 항-CD20 항체 리투시맵 (Rituxan^(R) IDEC Pharmaceuticals Corporation의 등록 상표), 및 항-Her2 항체 트라스투주맵 (Herceptin^(R) Genentech의 등록 상표) 하에 측정하였다. 스크리닝 목적을 위하여 알렘투주맵, 리투시맵, 및 트라스투주맵을 이용하는 것이 본 발명을 어느 특정 항체로 제한하는 것을 의미하지는 않는다.

- [0370] 알렘투주맵, 리톡시맵, 및 트라스투주맵에 대한 IgG1 총 길이 경쇄(V_L-C_L) 및 중쇄($V_H-C_{\gamma}1-C_{\gamma}2-C_{\gamma}3$) 항체 유전자를, 서브클로닝을 용이하게 하기 위하여 편리한 말단 제한 위치를 가지도록 제작하였다. 상기 유전자는 포유류 발현 벡터 pcDNA3.1Zeo 내에 결합되었다. pcDNA3.1Zeo 내의 $V_H-C_{\gamma}1-C_{\gamma}2-C_{\gamma}3$ 클론은 Fc 부위의 돌연변이 유발을 위한 주형으로서 이용되었다. 돌연변이는 PCR-기준 돌연변이 유발 기술을 이용하여 상기 클론에 도입하였다. Fc 변이체를 서열 결정하여, 충실도를 확인하였다. 중쇄 유전자($V_H-C_{\gamma}1-C_{\gamma}2-C_{\gamma}3$) (야생형 또는 변이체)를 함유하는 플라스미드를 경쇄 유전자(V_L-C_L)를 함유하는 플라스미드와 함께 293T 세포 내에 공-트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 후 5일 뒤, 배지를 수확하였다. 면역 글로블린의 발현은 트렉스펙토마스(transfectomas)의 배양 상청액을 스크리닝하거나, 퍼옥시다아제-접합 염소의 항-인간 IgG(Jackson ImmunoResearch, catalog # 109-035-088)를 이용한 웨스턴(western)을 통해 모니터링하였다. 표 6은 293T 세포 내에서 야생형 알렘투주맵 및 변이체 1 내지 10의 발현을 나타낸다. 단백질 A 친화성 크로마토그래피(Pierce, Catalog # 20334)를 이용하여 상청액으로부터 항체를 정제하였다. 표 7은 야생형 알렘투주맵에 대한 단백질 정제의 결과를 나타낸다. 항체 Fc 변이체는 야생형과 유사한 발현 및 정제 결과를 나타낸다. 몇몇 Fc 변이체는, 탄수화물의 부재 하에서 그들의 용해 및 기능적 특징을 결정하기 위하여 데글리코실화되었다. 데글리코실화된 항체를 획득하기 위하여, 정제된 알렘투주맵 항체를, 24시간 동안 37°C에서 펩타이드-N-글리코시다아제(peptide-N-glycosidase; PNGase F)와 함께 배양하였다. 표 8은 여러 Fc 변이체 및 야생형 알렘투주맵에 대한 데글리코실화를 확인하는 SDS PAGE 젤을 나타낸다.
- [0371] 이러한 조건 하에서 생산된 알렘투주맵의 기능적 충실성을 확인하기 위하여, GST에 융합된 항원 CD52 펩타이드를 IPTG 유도 하에서 *E. coli* BL21(DE3) 내에서 발현시켰다. 유도되지 않은 샘플 및 유도된 샘플을 SDS-PAGE 젤 상에서 전개시키고, PVDF 멤브레인으로 옮겼다. 웨스턴 분석을 위하여, Sotec(최종 농도 2.5 ng/ μ l) 또는 트랜스펙션된 293T 세포의 배양액(약 0.1-0.2 ng/ μ l의 최종 알렘투주맵 농도) 유래의 알렘투주맵은 1차 항체로서 이용하였고, 퍼옥시다아제-접합 염소의 항-인간 IgG는 2차 항체로서 이용하였다. 표 9는 이들 결과를 나타낸다. 표적 항원에 결합하는 능력은 발현된 알렘투주맵의 구조적 및 기능적 충실성을 통해 확인하였다. WT 알렘투주맵과 동일한 가변 부위를 가지는 Fc 변이체는 항원에 대하여 필적하는 결합 친화성을 유지하리라 여겨진다.
- [0372] Fc/Fc γ R 결합에 대하여 스크리닝하기 위하여, 인간 V158 Fc γ RIIIa, 인간 F158 Fc γ RIIIa, 인간 Fc γ RIIb, 인간 Fc γ RIIa, 및 마우스 Fc γ RIII의 세포의 부위를 발현 및 정제하였다. 표 10은 인간 V158 Fc γ RIIIa의 발현 및 정제의 결과를 보여주는 SDS PAGE 젤을 나타낸다. 상기 수용체의 세포의 Mammalian Gene Collection(MGC:22630)으로부터 입수한 클론으로부터 PCR을 통해 수득하였다. 수용체는 스크리닝을 가능하게 하는 글루타티온 S-트랜스퍼라제(Glutathione S-Transferase(GST))에 융합되었다. 태그 부착된 Fc γ RIIIa를 293T 세포 내로 트랜스펙션시키고, 3일 후 분비된 Fc γ RIIIa를 함유하는 배지를 수확하여, 정제하였다. 웨스턴 분석을 위하여, 멤브레인을 항-GST 항체로 탐침하였다.
- [0373] Fc γ RIIIa 및 Fc γ RIIb에 대한 결합 친화성은 AlphaScreen™ 분석평가(AMPLIFIED Luminescent Proximity Homogeneous Assay(ALPHA), PerkinElmer, Wellesley, MA) 및 비드계 비-방사성 발광 근접(non-radioactive luminescent proximity) 분석평가를 이용하여 모든 설계된 Fc 변이체에 대하여 측정되었다. 공여체 비드의 레이저 여기는 산소를 자극하며, 충분히 수령체 비드에 접근된 경우, 이는 궁극적으로 520-620 nm에서 형광 방출을 유도하는, 화학 발광(chemiluminescent) 현상의 캐스케이드를 발생시킨다. AlphaScreen™ 분석평가는 Fc 변이체를 스크리닝하기 위한 경쟁 분석평가에 적용되었다. 야생형 알렘투주맵 항체는 스트렙트아비딘(streptavidin) 공여체 비드에 부착하기 위해 표준 방법으로 바이오틴화(biotinylate)되었으며, GST-태그 부착된 Fc γ R은 글루타티온 킬레이트 수령체 비드(Glutathion chelate acceptor bead)에 결합되었다. 경쟁하는 Fc 변이체의 부재 하에서, 야생형 항체 및 Fc γ R은 상호 작용하여, 520-620nm에서 신호를 발생시킨다. 태그 부착되지 않은 Fc 변이체의 첨가는 야생형 Fc/Fc γ R 상호 작용에 대하여 경쟁하며, 정량적으로 감소된 형광을 통해 상대적인 결합 친화성이 결정된다. 모든 Fc 변이체는 AlphaScreen™ 분석평가를 이용하여 V158 Fc γ RIIIa 결합에 대하여 스크리닝되었다. 선택된 Fc 변이체는 Fc γ RIIb 및 기타 Fc γ R 및 Fc 리간드에 결합을 위해 스크리닝되었다.
- [0374] 표 11은 인간 V158 Fc γ RIIIa에 대한 선택된 Fc 변이체의 결합에 관한 AlphaScreen™ 데이터를 나타낸다. 상기 결합 데이터는 경쟁자 항체의 각각 고농도 또는 저농도의 기준선에 의해 제공되는 최고 및 최저 발광 신호에 대하여 표준화되었다. 상기 데이터는 비선형 회귀를 이용하여 한 위치 경쟁 모델에 맞추었으며, 고정값은 도에서 곡선으로 표시되었다. 이들 고정값은 각각의 항체에 대하여 50% 저해 농도(즉, 50% 저해를 위해 요구되는

농도)를 제공하며, 도 11에서 점선으로 예시되었다. 그러므로, Fc 변이체의 상대적인 결합 친화성은 정량적으로 측정 될 수 있다. 여기서, WT 알렘투주맵은 $(4.63 \times 10^{-9}) \times (2) = 9.2 \text{ nM}$ 의 IC50을 가지는 반면, S239D는 $(3.98 \times 10^{-10}) \times (2) = 0.8 \text{ nM}$ 의 IC50을 갖는다. 그러므로, S239D 알렘투주맵은 WT 알렘투주맵 결합보다 $9.2\text{nM}/0.8\text{nM} = 11.64$ 배만큼 더욱 단단하게 인간 V158 Fc γ RIIIa에 결합한다. 인간 V158 Fc γ RIIIa에 대하여 모든 Fc 변이체의 결합에 대해 유사한 산출을 실시하였다. 선택된 Fc 변이체는 또한 인간 Fc γ RIIb에 대한 결합에 대하여 스크리닝되었고, 이들의 AlphaScreen™ 결합 데이터의 예는 도 12에 제시되어 있다. 표 61은 AlphaScreen™ 분석평가에 의하여 측정된 바와 같이, 인간 V158 Fc γ RIIIa(컬럼 3) 및 인간 Fc γ RIIb(컬럼 4)에 대한 Fc 변이체의 결합을 모체 항체에 비교하여 배수-향상 또는 배수-감소로 표시하였다. 이들 데이터의 경우, 야생형 Fc와 비교하여 1보다 큰 배수는 결합 친화성에서 개선을 나타내며, 1보다 낮은 배수는 결합 친화성에서 감소를 나타낸다. 별표(*)로 표시된 것들을 제외하고, 알렘투주맵의 조건 하에서 획득된 모든 데이터는 트라스투주맵의 조건 하에서 테스트되었다.

표 61

변이체	치환	Fc γ RIIIa 배수	Fc γ RIIb 배수	Fc γ IIIa-배수: Fc γ RIIb-배수
1	V264A	0.53		
2	V264L	0.56		
3	V264I	1.43		
4	F241W	0.29		
5	F241L	0.26		
6	F243W	0.51		
7	F243L	0.51		
8	F241L/F243L/V262I/V264I	0.09		
9	F241W/F243W	0.07		
10	F241W/F243W/V262A/V264A	0.04		
11	F241L/V262I	0.06		
12	F243L/V264I	1.23		
13	F243L/V262I/V264W	0.02		
14	F241Y/F243Y/V262T/V264T	0.05		
15	F241E/F243R/V262E/V264R	0.05		
16	F241E/F243Q/V262T/V264E	0.07		
17	F241R/F243Q/V262T/V264R	0.02		
18	F241E/F243Y/V262T/V264R	0.05		
19	L328M	0.21		
20	L328E	0.12		
21	L328F	0.24		
22	I332E	6.72	3.93	1.71
23	L328M/I332E	2.60		
24	P244H	0.83		
25	P245A	0.25		
26	P247V	0.53		
27	W313F	0.88		
28	P244H/P245A/P247V	0.93		
29	P247G	0.54		
30	V264I/I332E	12.49	1.57*	7.96
31	F241E/F243R/V262E/V264R/I332E	0.19		
32	F241E/F243Q/V262T/V264E/I332E			
33	F241R/F243Q/V262T/V264R/I332E			
34	F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E	0.10		
35	S298A	2.21		
36	S298A/I332E	21.73		
37	S298A/E333A/K334A	2.56		
41	S239E/I332E	5.80	3.49	1.66
42	S239Q/I332E	6.60	4.68	1.41
43	S239E	10.16		
44	D265G	<0.02		
45	D265N	<0.02		
46	S239E/D265G	<0.02		
47	S239E/D265N	0.02		
48	S239E/D265Q	0.05		
49	Y296E	0.73	1.11	0.66
50	Y296Q	0.52	0.43	1.21

[0375]

51	S298T	0.94	<0.02	
52	S298N	0.41	<0.02	
53	T299I	<0.02		
54	A327S	0.23	0.39	0.69
55	A327N	0.19	1.15	0.17
56	S267Q/A327S	0.03		
57	S267L/A327S	<0.02		
58	A327L	0.05		
59	P329F	<0.02		
60	A330L	0.73	0.38	1.92
61	A330Y	1.64	0.75	2.19
62	I332D	17.80	3.34	5.33
63	N297S	<0.02		
64	N297D	<0.02		
65	N297S/I332E	<0.02		
66	N297D/I332E	0.08	<0.02	
67	N297E/I332E	<0.02		
68	D265Y/N297D/I332E	<0.02		
69	D265Y/N297D/T299L/I332E	<0.02		
70	D265F/N297E/I332E	<0.02		
71	L328I/I332E	7.03		
72	L328C/I332E	1.54		
73	I332N	0.39		
74	I332Q	0.37		
75	V264T	2.79		
76	V264F	0.16		
77	V240I	3.25		
78	V263I	0.10		
79	V266I	1.89		
80	T299A	0.03		
81	T299S	0.15		
82	T299V	<0.02		
83	N325Q	<0.02		
84	N325L	<0.02		
85	N325I	<0.02		
86	S239D	11.64	4.47*	2.60
87	S239N	<0.02		
88	S239F	0.22	<0.02	
89	S239D/I332D	14.10		
90	S239D/I332E	56.10	19.71*	2.85
91	S239D/I332N	7.19		
92	S239D/I332Q	9.29		
93	S239E/I332D	0.33		
94	S239E/I332N	11.93		
95	S239E/I332Q	3.80		
96	S239N/I332D	3.08		
97	S239N/I332E	14.21		
98	S239N/I332N	0.43		

[0376]

99	S239N/I332Q	0.56		
100	S239Q/I332D	5.05		
101	S239Q/I332N	0.39		
102	S239Q/I332Q	0.59		
103	K328E	3.65		
104	Y296D	0.62		
105	Y298N	0.29		
106	F241Y/F243Y/V262TV/264T/N297D/I332E	0.15		
107	A330Y/I332E	12.02	4.40	2.73
108	V264I/A330Y/I332E	12.00	3.54	3.39
109	A330L/I332E	10.34	2.03	5.08
110	V264I/A330L/I332E	11.15	1.79	6.23
111	L234D	0.21		
112	L234E	1.34	2.21	0.61
113	L234N	0.56	1.39	0.40
114	L234Q	0.37		
115	L234T	0.35		
116	L234H	0.33		
117	L234Y	1.42	1.08	1.31
118	L234I	1.55	1.14	1.36
119	L234V	0.36		
120	L234F	0.30		
121	L235D	1.66	3.63	0.46
122	L235S	1.25		
123	L235N	0.40		
124	L235Q	0.51		
125	L235T	0.52		
126	L235H	0.41		
127	L235Y	1.19	10.15	0.12
128	L235I	1.10	0.94	1.17
129	L235V	0.48		
130	L235F	0.73	3.53	0.21
131	S239T	1.34		
132	S239H	0.20		
133	S239Y	0.21		
134	V240A	0.70	0.14	5.00
135	V240T			
136	V240M	2.06	1.38	1.49
137	V263A			
138	V263T	0.43		
139	V263M	0.05		
140	V264M	0.26		
141	V264Y	1.02	0.27	3.78
142	V266A	<0.02		
143	V266T	0.45		
144	V266M	0.62		
145	E269H	<0.02		
146	E269Y	0.12		

[0377]

147	E269F	0.16		
148	E269R	0.05		
149	Y296S	0.12		
150	Y296T	<0.02		
151	Y296L	0.22		
152	Y296I	0.09		
153	A298H	0.27		
154	T299H	<0.02		
155	A330V	0.43		
156	A330I	1.71	0.02	85.5
157	A330F	0.80		
158	A330R	<0.02		
159	A330H	0.52		
160	N325D	0.41		
161	N325E	<0.02		
162	N325A	0.11		
163	N325T	1.10		
164	N325V	0.48		
165	N325H	0.73		
166	L328D/I332E	1.34		
167	L328E/I332E	0.20		
168	L328N/I332E	<0.02		
169	L328Q/I332E	0.70		
170	L328V/I332E	2.06		
171	L328T/I332E	1.10		
172	L328H/I332E	<0.02		
173	L328I/I332E	3.49		
174	L328A	0.20		
175	I332T	0.72		
176	I332H	0.46		
177	I332Y	0.76		
178	I332A	0.89		
179	S239E/V264I/I332E	15.46		
180	S239Q/V264I/I332E	2.14		
181	S239E/V264I/A330Y/I332E	8.53		
182	S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E			
183	S239D/N297D/I332E	0.28		
184	S239E/N297D/I332E	0.06		
185	S239D/D265V/N297D/I332E			
186	S239D/D265I/N297D/I332E			
187	S239D/D265L/N297D/I332E	<0.02		
188	S239D/D265F/N297D/I332E	<0.02		
189	S239D/D265Y/N297D/I332E	0.02		
190	S239D/D265H/N297D/I332E	0.04		
191	S239D/D265T/N297D/I332E	<0.02		
192	V264I/N297D/I332E	0.05		
193	Y296D/N297D/I332E			
194	Y296E/N297D/I332E	<0.02		
[0378]				
195	Y296N/N297D/I332E	0.04		
196	Y296Q/N297D/I332E	<0.02		
197	Y296H/N297D/I332E	<0.02		
198	Y296T/N297D/I332E	<0.02		
199	N297D/T299V/I332E	<0.02		
200	N297D/T299I/I332E	<0.02		
201	N297D/T299L/I332E	<0.02		
202	N297D/T299F/I332E	<0.02		
203	N297D/T299H/I332E	<0.02		
204	N297D/T299E/I332E	<0.02		
205	N297D/A330Y/I332E	0.43		
206	N297D/S298A/A330Y/I332E			
207*	S239D/A330Y/I332E	129.58		
208*	S239N/A330Y/I332E	14.22		
209*	S239D/A330L/I332E	138.63	7.50	18.48
210*	S239N/A330L/I332E	12.95		
211*	V264I/S298A/I332E	16.50		
212*	S239D/S298A/I332E	295.16	6.16	47.92
213*	S239N/S298A/I332E	32.14	6.15	6.24
214*	S239D/V264I/I332E	36.58	14.39	2.54
215*	S239D/V264I/S298A/I332E			
216*	S239D/V264I/A330L/I332E			
[0379]				

[0380]

실시예 3

[0381]

Fc γ R에 선택적으로 향상된 결합

[0382]

최적화된 특성을 가지는 많은 유리한 Fc 변이체는, Fc γ RIIIa 및 Fc γ RIIb 스크리닝을 통해서 획득되었다. 표 61은 Fc γ RIIIa에 대하여 보다 단단하게 결합하는 Fc 변이체를 제공하며, 이들은 항체 및 Fc 융합체의 작동체 기능을 개선시키기 위한 후보 물질이다. 이들은 239, 264, 330, 및 332번 위치에 치환을 포함하는 많은 변이체를 포함한다. 표 13은 이들 몇몇 Fc 변이체에 대한 AlphaScreen™ 결합 데이터를 나타낸다. 이들 Fc 변이체의 대부분은 S298A/E333A/K334A보다 실질적으로 큰 Fc γ RIIIa 결합 개선을 제공한다.

[0383]

대부분의 Fc 변이체가 항체 알렘투주맵의 조건 하에서 스크리닝되었으나, 선택된 Fc 변이체는 리톡시맵 및 트라스투주맵의 조건 하에서도 스크리닝되었다. 인간 V158 Fc γ RIIIa에 대하여 선택된 Fc 변이체의 결합에 관한 AlphaScreen™ 데이터는 각각 표 14 및 15에 제시되어 있다. 상기 결과는 Fc 변이체가 항체 조건 하에 상관없이 일관된 결합 개선을 나타내며, 그러므로 본 발명의 Fc 변이체는 항체 및 Fc 융합체에 광범위하게 적용될 수 있음을 나타내었다.

[0384]

획득된 Fc 변이체는 Fc γ RIIb보다 Fc γ RIIIa에 대하여 상이하게 개선된 결합을 보인다. 이상에서 논의된 바와 같이, 최적화된 작용체 기능은 활성화 Fc γ R에 대한 친화성이 저해성 Fc γ RIIb에 대한 친화성보다 큰 Fc 변이체로부터 기인할 수 있다. 이러한 특이성 프로파일을 가지는 두 개의 Fc 변이체에 대하여 Fc γ RIIIa 및 Fc γ RIIb에 대한 결합을 직접적으로 비교한 AlphaScreen™ 데이터는 표 16a 및 16b에 제시되어 있다. 이 개념은, 활성화된 Fc γ R의 배수-향상 또는 배수-감소(표 61, 컬럼 3)를 저해성 Fc γ R의 배수-향상 또는 포드-감소(표 61, 컬럼 4)로 나눔으로써 정량적으로 규정될 수 있으며, 이는 본원에 있어서 Fc γ RIIIa-배수:Fc γ RIIb-배수 비로서 기재되었다. 이 값은 표 61의 컬럼 5에 제시되어 있다. 표 61은 Fc 변이체가 86:1 정도로 높은 Fc γ RIIIa-배수:Fc γ RIIb-배수 비의 특이성 프로파일을 제공함을 나타낸다.

[0385]

작용체 기능을 개선시키기 위한 본 발명의 몇 가지 가장 유리한 Fc 변이체는 Fc γ RIIIa에 대한 친화성에 있어서 실질적인 증가 및 유리한 Fc γ RIIIa-배수:Fc γ RIIb-배수 비를 갖는다. 예를 들어, 이들은 S239D/1332E (Fc γ RIIIa-배수 = 56, Fc γ RIIIa-배수:Fc γ RIIb-배수 = 3), S239D/A330Y/I332E (Fc γ RIIIa-배수 = 130), S239D/S298A/I332E (Fc γ RIIIa-배수 = 139, Fc γ RIIIa-배수:Fc γ RIIb-배수 = 18), 및 S239D/S298A/I1332E (Fc γ RIIIa-배수 = 295, Fc γ RIIIa-배수:Fc γ RIIb-배수 = 48)를 포함한다. 표 17은 인간 V158 Fc γ RIIIa에 대한 이들 및 기타 Fc 변이체에 관한 AlphaScreen™ 결합 데이터를 나타낸다.

[0386]

작용체 기능에 기여하는 많은 Fc γ R가 존재하기 때문에, 기타 수용체에 대하여 Fc 변이체를 부가적으로 스크리닝하는 것은 가치가 있다. 표 18은 인간 R131 Fc γ RIIIa에 대하여 선택된 Fc 변이체의 결합에 관한 AlphaScreen™ 데이터를 나타낸다. 이를 통해 알 수 있는 바와 같이, 유리한 결합 개선 및 특정 프로파일을 가지는 상기 변이체 또한 이러한 활성화 수용체에 대하여 증진된 결합을 나타낸다. 스크리닝에 대한 Fc γ RIIIa, Fc γ RIIb, 및 Fc γ RIIc의 이용이, 실험적 테스트를 이들 특정한 Fc γ R에 제한하는 것은 아니며, 이상에서 언급한 것과 같이, 이들로 제한되는 것은 아니나, 무수의 이성형 및 인간, 마우스, 래트, 원숭이 등으로부터 유래되는 Fc γ RI, Fc γ RII, 및 Fc γ RIII의 알로타입을 포함하는 기타 Fc γ R도 스크리닝에 고려될 수 있다.

[0387]

요컨대, 도 11-18 및 표 61에서 제시된 Fc γ R 결합 데이터는, 234, 235, 239, 240, 243, 264, 266, 325, 328, 330, 및 332번 위치에 대한 다수의 치환이 항체 및 Fc 융합체의 작동체 기능을 개선시키는 유리한 후보 물질임을 타나낸다. 이들 치환의 일부의 조합은 통상적으로 부가적인 또는 상승적인 결합 개선을 초래하기 때문에, 표 61에 제시된 Fc 변이체의 아직 탐구되지 않은 조합도 유리한 결과를 제공할 것으로 예상된다. 그러므로, 표 61에서 상기 Fc 변이체의 모든 조합이 고려된다. 마찬가지로, 기타 발견된 또는 발견되지 않은 Fc 변이체와 함께, 표 61내의 임의의 Fc 변이체의 조합 또한 유리한 특성들을 제공할 수 있으며, 이들 조합 또한 고려될 수 있다. 나아가, 234, 235, 239, 240, 243, 264, 266, 325, 328, 330, 및 332번 위치에 대하여 기타 치환이 유리한 결합 개선 및 특이성을 제공할 수 있음이 예측된다. 그러므로, 이들 위치에 대하여 표 61에서 제시된 것들 이외의 치환도 고려될 수 있다.

[0388]

실시예 4

[0389]

Fc γ R에 대한 감소된 결합

[0390]

상술한 바와 같이, 보다 큰 작동체 기능이 요구되기는 하나, 몇몇 항체 치료제의 경우에는, 감소된 또는 제거된 작동체 기능이 요구될 수 있다. 표 61에 제시된 여러 Fc 변이체는 실질적으로 Fc γ R 결합을 감소시켰거나 제

거하였으며, 따라서 이들은 작동체 기능이 바람직하지 않은 항체 및 Fc 융합체에 이용될 수 있다. 그러한 변이체의 몇 가지 예에 관한 AlphaScreen™ 결합 데이터는 도 19a 및 19b에 제시하였다. 이들 Fc 변이체 및 그들의 조합적 사용은, 원하는 경우, 작동체 기능을 제거하기 위하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체 및 Fc 융합체에 있어서 그들의 작동 메커니즘은, 표적 항원을 함유하는 세포를 죽이지 않고, 블로킹(blocking) 또는 길항 작용(antagonism)하는 것을 포함한다

[0391]

실시예 5

[0392]

아글라이코실화된 Fc 변이체

[0393]

이상에서 논의한 바와 같이, 현재 실험의 하나의 목적은 최적화된 아글라이코실화된 Fc 변이체를 획득하는 것이다. 여러 Fc 변이체가 이러한 목적에 있어 상당한 진전을 보이고 있다. 이는 글라이코실화되 위치이기 때문에, N297에 대한 치환은 아글라이코실화된 Fc를 야기한다. 표 61 및 도 20에 예시된 바와 같이, N297에 대한 치환을 포함하는 모든 기타 Fc 변이체는 Fc γ R 결합을 완전하게 제거하는 반면, N297D/I332E는 Fc γ RIIIa에 대하여 상당한 결합 친화성을 갖는다. 컴퓨터 조작을 통한 스크리닝 예측은, 새로운 유리한 Fc/Fc γ R 상호 작용 및 유리한 정전기적 특성들의 조합에 기인하여 이것이 유망한 것임을 시사하나, 이들 결과에 대한 정확한 이유는 상기 변이체에 대한 고-해상도 구조의 부재 하에서는 확실하지 않다. 실제로, 기타 정전기적 치환은 아글라이코실화된 Fc의 보다 나은 최적화를 위하여 고안되었다. 표 61은 S239D/N297D/I332E 및 N297D/A330Y/I332E와 같은 기타 아글라이코실화된 Fc 변이체가, 글라이코실화된 WT 알렘투주맷의 각각 0.28- 및 0.43-배수 이내에서 Fc γ RIIIa에 대하여 친화성의 결합 개선을 제공함을 나타낸다. 글라이코실화 모체 Fc보다 대략 동일하거나 우수한 친화성을 가지고 하나 이상의 Fc γ R에 결합하는 아글라이코실화된 Fc 변이체를 획득하고자 하는 목적에서, Fc γ R 결합을 향상시키는 기타 Fc 변이체와 이들 변이체의 조합이 고려되었다. 유리한 부가적인 Fc 변이체의 세트가 탄수화물의 부재 하에서 안정성 및 용해성 개선을 제공한다. F γ R 결합을 매개하지는 않으나, 탄수화물 및 Fc 사이의 경계면을 결정하는 위치인, 241, 243, 262, 및 264번 위치에 대한 치환을 포함하는 Fc 변이체는 F γ R 결합을 제거하며, 이는 아미도 그들이 상기 탄수화물의 형태를 교란시키기 때문인 것으로 생각된다. 그러나, 도 21의 AlphaScreen™ 데이터에서 알 수 있는 바와 같이, Fc 변이체 F241E/F243R/V262E/V264R, F241E/F243Q/V262T/V264E, F241R/F243Q/V262T/V264R, 및 F241E/F243Y/V262T/V264R은 글라이코실화된 형태에서 보다 테글라이코실화된 형태에서 Fc γ RIIIa에 보다 강하게 결합하는 것으로 나타난다. 이러한 결과는, 이것이 아글라이코실화된 Fc의 구조, 안정성, 용해성, 및 기능의 최적화를 위해 중요한 위치임을 나타낸다. 이러한 모든 결과들은, 단백질 조작이 탄수화물의 부재 하에서 항체 및 Fc 융합체의 유리한 기능적 및 용해 특성을 회복시키고, 이들 및 기타 Fc 위치에 대한 치환을 포함하는 유리한 용해 특성 및 완전한 기능성을 가지는 항체 및 Fc 융합체의 아글라이코실화를 가능케 한다는 것을 제시한다.

[0394]

실시예 6

[0395]

Fc γ RIIIa의 다형에 대한 Fc 변이체의 친화성

[0396]

이상에서 논의한 바와 같이, Fc-매개된 작동체 기능의 중요한 매개변수는 V158 및 F158 다형에 대한 Fc γ RIIIa의 Fc의 친화성이다. 2개의 수용체 알로타입에 대한 선택된 변이체의 결합을 비교하는 AlphaScreen™ 데이터는 도 22a (V158 Fc γ RIIIa) 및 도 22b (F158Fc γ RIIIa)에 나타나 있다. 알 수 있는 같이, 모든 변이체는 두 Fc γ RIIIa 알로타입에 대한 결합을 개선시킨다. 이들 데이터는, 증진된 작동체 기능을 가지는 본 발명의 Fc 변이체가 전체 환자 개체군에 폭넓게 적용될 수 있으며, 임상적 효능에 있어 개선은, 이를 가장 필요로 하는 낮은 반응성 환자 개체군에 대해 가장 유용할 것임을 나타낸다.

[0397]

나아가, 이들 Fc 변이체의 Fc γ R 결합 친화성은 표면 플라즈몬 공명(Surface Plasmon Resonance; SPR) (Biacore, Uppsala, Sweden)을 이용하여 조사되었다. SPR은 단백질-단백질 상호 작용의 결합 친화성의 측정을 가능하게 하며, Fc/Fc γ R 결합을 효과적으로 측정하기 위해 이용되는 정교하고 매우 정량적인 방법이다 (Radaev *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 16478-16483). 그러므로, SPR은 AlphaScreen™ 분석평가에 대하여 우수한 상보적인 결합 분석평가를 제공한다. His-태그 부착된 V158 Fc γ RIIIa를 SPR 칩(chip)에 고정시키고, WT 및 Fc 변이체 알렘투주맷 항체는 농도의 범위에서 칩 상에 흘려 보냈다. 결합 상수는 표준 커브-고정(standard curve-fitting) 방법을 이용하여 데이터를 고정화하여 얻었다. 표 62는 SPR을 이용하여 획득한 V158 Fc γ RIIIa 및 F158 Fc γ RIIIa에 대한 선택된 Fc 변이체의 결합에 관한 해리 상수를 제시하며, 이들을 AlphaScreen™ 분석평가를 통해 얻어진 IC50과 비교한다. 각각의 변이체에 대한 Kd 및 IC50을 WT 알렘투주맷의 값으로 나눈으로써, WT(배수)에 대한 배수-개선값을 얻었다.

표 62

	SPR V158 FcγRIIIa Kd (nM) 배수		SPR F158 FcγRIIIa Kd (nM) 배수		AlphaScreen™ V158 FcγRIIIa IC50 (nM) 배수		AlphaScreen™ F158 FcγRIIIa IC50 (nM) 배수	
WT	68		730		6.4		17.2	
V264I	64	1.1	550	1.3	4.5	1.4	11.5	1.5
I332E	31	2.2	72	10.1	1.0	6.4	2.5	6.9
V264I/I332E	17	4.0	52	14.0	0.5	12.8	1.1	15.6
S298A	52	1.3	285	2.6	2.9	2.2	12.0	1.4
S298A/E333A/ K334A	39	1.7	156	4.7	2.5	2.6	7.5	2.3

[0398]

[0399]

SPR 데이터는 AlphaScreen™ 분석평가에 의해 관찰된 FcγRIIIa 친화성 개선을 확실하게 한다. 표 62는 S298A 및 S298A/E333A/K334A에 비하여 V264I/I332E 및 I332E의 우수성을 보여준다. S298A/E333A/K334A는 V158 및 F158 FcγRIIIa에 대한 Fc 결합을 각각 1.7배 및 4.7배 향상시키는 반면, I332E는 각각 2.2배 및 10.1배의 결합 향상, V264I/I332E는 각각 4.0배 및 14배의 결합 향상을 보였다. 또한, 주목할만한 점은, F158 FcγRIIIa(52 nM)에 대한 V264I/I332E의 친화성이 V158 알로타입(68 nM)에 대한 WT의 친화성보다 우수하다는 점이며, 이는 Fc 변이체 및 결합에 있어 상당한 개선을 나타내는 것들은, 낮은 반응성 환자 모집단에 대하여 항체의 임상적 효능이 현재 고도 응답(responder)이 가능해지도록 할 수 있다. SPR 및 AlphaScreen™ 결합 측정값 사이의 상관관계는 도 23a-23d에 나타난다. 도 23a 및 23b는 각각 V158 FcγRIIIa 및 F158 FcγRIIIa에 대한 결합에 관한 Kd-IC50 상관관계를 나타내며, 도 23c 및 23d는 각각 V158 FcγRIIIa 및 F158FcγRIIIa에 대한 결합에 관한 배수-개선 상관관계를 나타낸다. 직선($r^2 = 0.9$, $r^2 = 0.84$, $r^2 = 0.98$, 및 $r^2 = 0.90$)에 대한 이들 데이터의 양호한 고정값은 AlphaScreen™ 측정값의 정확성을 지지하며, Fc 변이체의 상대적인 FcγR 결합 친화성을 측정하는 데 있어 그의 이용을 유효하게 한다.

[0400]

실시예 7

[0401]

Fc 변이체의 ADCC

[0402]

작동체 기능에 대한 영향을 측정하기 위하여, 세포-기준 ADCC 분석평가를 선택된 Fc 변이체에 대하여 실시하였다. ADCC는 작동체 세포로서 정제된 인간 말초 혈액 단핵구(peripheral blood monocyte; PBMCs)를 가지며 DELFIA^(R) EuTDA-기준 세포과괴 분석 평가(Perkin Elmer, MA)를 이용하여 측정되었다. 표적 세포는 1×10^6 세포/ml 농도로 BATDA와 함께 로딩하였으며, 4회 세척한 후, 웰당 10,000개 세포의 밀도로 96-웰 플레이트에 시딩하였다. 그런 다음, 상기 표적 세포를 소정의 최종 농도에서 Fc 변이체 또는 야생형 항체를 이용하여 옅소닌화하였다. 인간 PBMC를 소정의 배수-과량의 표적 세포에 첨가하고, 배지를 4시간 동안 37°C에서 배양하였다. 공-배양된 세포를 500xg의 속도로 원심분리하고, 상청액을 개별적인 배지로 옮긴 뒤, Eu 용액과 함께 배양한 다음, Packard Fusion™ 판독기(Packard Biosciences, IL)를 이용하여 상대적인 형광 단위(unit)를 측정하였다. 샘플링은 3회 중복 실시하여, 오차 추정값($n = 3$, +/-S.D.)을 제공하였다. PBMC는, PCR을 이용하여 V158 또는 F158FcγRIIIa 알로타입에 대하여 알로타입화되었다.

[0403]

ADCC 분석 평가는 DoHH-2 림프종 표적 세포를 이용하여 Fc 변이체 및 야생형 알렘투주맵에 대하여 수행되었다. 도 24a는 10 ng/ml 항체에서 이들 단백질의 ADCC를 보여주는 막대 그래프이다. 결과는 알렘투주맵 Fc 변이체 I332E, V264I, 및 I332E/V264I가 WT 알렘투주맵에 비하여 실질적으로 증진된 ADCC를 나타냄을 보여주며, AlphaScreen™ 분석평가 및 SPR에서 제시된 바와 같이, 상대적인 ADCC 개선이 그들의 FcγRIIIa에 대한 결합 개선에 비례함을 보여준다. 항체 농도에 대한 ADCC의 용량 의존성은 도 24b에 나타난다. 이들 데이터를 각각 항체의 저농도 및 고농도에서의 기준선에 의하여 제공되는 최대 및 최소 형광 신호에 대하여 표준화하였다. 상기 데이터는 도에서 곡선으로 표시된 비선형 회귀를 이용하여 S자형 용량-반응 모델로 고정되었다. 이 고정값은 유효 농도 50%(EC50)(즉, 50%의 유효성에 요구되는 농도)의 측정을 가능하게 하며, 이는 각각의 Fc 변이체에 대한 ADCC에 대한 상대적인 개선값을 제공한다. 이들 결합 데이터에 있어 EC50은 AlphaScreen™ 경쟁 데이터로부터 얻어진 IC50과 유사하고, 이들 값의 편차는 실시예 2 및 도 11에서 언급한 것과 유사하다. 도 24에서, WT, V264I/I332E, 및 S239D/I332E 알렘투주맵에 대하여 데이터 고정으로부터 얻어진 로그(EC50)는 각각 0.99, 0.60, 및 0.49이고, 따라서 그들 각각의 EC50은 9.9, 4.0, 및 3.0이다. 그러므로 V264I/I332E 및 S239E/I332E는 이중 접합성 V158/F158 FcγRIIIa를 발현시키는 PBMC를 이용한 WT 알렘투주맵에 비하여 ADCC에 대하여 각각 2.5배 및 3.3배 개선을 제공한다. 이들 데이터는 아래 표 63에 정리되었다.

표 63

	log(EC50)	EC50 (ng/ml)	WT 기준 배수 개선
WT	0.99	9.9	
V264I/I332E	0.60	4.0	2.5
S239D/I332E	0.49	3.0	3.3

[0404]

[0405]

이들 ADCC 개선이 항체에까지 널리 적용될 수 있는지의 여부를 결정하기 위하여, 선택된 Fc 변이체를 리톡시맵 및 트라스투주맵의 조건 하에서 평가하였다. ADCC 분석 평가는 WIL2-S 림프종 표적 세포를 이용하여 V264I/I332E, WT, 및 S298A/D333A/K334A 리톡시맵 하에 수행되었다. 도 25a는 1 ng/ml 항체에 대한 이들 단백질의 ACDD를 보여주는 막대 그래프를 나타낸다. 결과는 V264I/I332E 리톡시맵이 WT 리톡시맵에 비하여 실질적으로 증진된 ADCC를 제공할 뿐만 아니라, S298A/D333A/K334A에 비해서도 보다 우수한 ADCC를 제공함을 보여주며, 이는 AlphaScreen™ 분석평가 및 SPR에 의해 관찰된 FcγRIIIa 결합 개선과 일치한다. 도 25b는 항체 농도에 따른 ADCC의 용량 의존성을 나타낸다. 이들 데이터의 일치 및 ADCC에 대한 상대적인 배수-개선으로부터 얻어지는 EC50은 아래 표 64에 제시된다. V264I/I332E 리톡시맵은 동종 접합성 F158/F158 FcγRIIIa를 발현시키는 PBMC에 대한 WT보다 EC50에 있어 11.3배의 개선을 제공함을 볼 수 있다. 리톡시맵 대 알렘투주맵에 대하여 관찰된 보다 큰 개선은, 이중 접합성 V158/F158 FcγRIIIa PBMC 보다는 오히려 동종접합성 F158/F158 FcγRIIIa의 이용, 그리고 잠재적으로는 상이한 항체 및 표적 세포주의 이용에 기인한 것으로 여겨진다

표 64

	log(EC50)	EC50 (ng/ml)	WT 기준 배수 개선
WT	0.23	1.7	
S298A/E333A/K334A	-0.44	0.37	4.6
V264I/I332E	-0.83	0.15	11.3

[0406]

[0407]

2개의 유방 카르시노마 표적 세포주 BT474 및 Sk-Br-3을 이용하여 Fc 변이체 및 야생형 트라스투주맵에 대하여 ADCC 분석 평가를 실시하였다. 도 26a는 1 ng/ml 항체에서 ADCC를 예시하는 막대 그래프를 나타낸다. 결과는 V264I 및 V264I/I332E 트라스투주맵이 AlphaScreen 분석 평가 및 SPR에 의해 나타난 바와 같이, FcγRIIIa에 결합 개선에 비례하여 상대적으로 증진된 ADCC, 즉 WT 트라스투주맵에 비하여 실질적으로 증진된 ADCC를 제공한다. 도 26b는 항체 농도에 따른 ADCC의 용량 의존성을 나타낸다. 이들 데이터의 일치 및 ADCC에 있어서의 상대적인 배수-개선으로부터 얻어진 EC50은 하기 표 65에 제시된다. A330L 및 A330Y가 조합되는 경우, I332E 트라스투주맵에 대하여 유의한 ADCC 개선이 관찰되었다.

표 65

	log(EC50)	EC50 (ng/ml)	WT 기준 배수 개선
WT	1.1	11.5	
I332E	0.34	2.2	5.2
A330Y/I332E	-0.04	0.9	12.8
A330L/I332E	0.04	1.1	10.5

[0408]

[0409]

도 26c는 트라스투주맵 변이체에 대한 가변 항체 농도에 따른 용량 반응 ADCC 데이터의 또 다른 하나의 세트를 나타낸다. ADCC에 있어서 이들 데이터의 일치 및 상대적 배수-개선을 통해 얻어진 EC50은 하기 표 66에 제공된다. 결과는 트라스투주맵, Fc 변이체 S239D/I332E, S239D/S298A/I332E, S239D/A330Y/I332E, 및 S239D/A330L/I332E/가 WT 트라스투주맵 및 S298A/E333A/K334A에 비하여 실질적인 ADCC 증진을 제공함을 보여주며, 이는 AlphaScreen™ 분석평가 및 SPR에 의해 관찰된 FcγR 결합 데이터와 일치하였다. S239D/A330L/I332E 트라스투주맵은 지금까지 관찰된 작동체 기능 중에서 가장 큰 증가를 보였으며, 이는 동종 접합성 F158/F158 FcγRIIIa를 발현시키는 PBMC에 대한 WT보다 EC50에 있어 거의 50배 개선된 값을 보인다.

표 66

	log(EC50)	EC50 (ng/ml)	WT 기준 배수 개선
WT	0.45	2.83	
S298A/E333A/K334A	-0.17	0.67	4.2
S239D/I332E	-0.18	0.66	4.3
S239D/A330Y/I332E	-0.29	0.51	5.5
S239D/S298A/I332E	-0.52	0.30	9.4
S239D/A330L/I332E	-1.22	0.06	47.2

[0410]

[0411]

실시예 8

[0412]

Fc 변이체에 의한 상보 결합 및 활성화

[0413]

상보 단백질 C1q는 Fc γ R 결합 부위에 근접한 Fc 부위에 결합하므로, 이는 Fc 변이체가 상보체를 보충하고 활성화하는 능력을 유지하는지의 여부를 결정하는 데에 신중하였다. AlphaScreen™ 분석평가를 이용해, 상보 단백질 C1q에 대하여 선택된 Fc 변이체의 결합을 측정하였다. 상기 분석평가는 실시예 2에서 설명한 바와 같이, 스트렙트아비딘 공여체 비드에 부착된 바이오틴화된 WT 알렘투주맵 항체 및 수령체 비드에 직접 부착된 C1q를 이용해 수행하였다. 도 27a에 제시된 선택된 Fc 변이체의 결합 데이터는 C1q 결합이 손상되지 않았음을 나타낸다. 또한, Fc 변이체가 상보체를 활성화하는 능력을 유지하는지의 여부를 조사하기 위하여, 선택된 Fc 변이체에 대하여 세포-기준 CDC 분석평가를 수행하였다. 아마르 블루(Amar Blue)를 이용해 인간 혈청 보체에 의해 Fc 변이체 및 WT 리톡시맵-옵소닌화된 WIL2-S 림프종 세포의 용해를 모니터링하였다 (Quidel, San Diego, CA). 선택된 Fc 변이체에 대하여 도 27b에 제시된 결과는 CDC가 손상되지 않았음을 나타낸다.

[0414]

실시예 9

[0415]

Fc 변이체에 의한 단백질 A 결합

[0416]

이상에서 논의된 바와 같이, 박테리아 단백질 A는 C γ 2 및 C γ 3 도메인 사이의 Fc 부위에 결합하며, 항체 정제에 있어 자주 사용된다. AlphaScreen™ 분석평가는 실시예 2에서 설명한 바와 같이, 스트렙트아비딘 공여체 비드에 부착된 바이오틴화된 WT 알렘투주맵 항체를 이용하거나, 수령체 비드에 직접 연결된 단백질 A를 이용하여, 단백질 A에 대하여 선택된 Fc 변이체의 결합을 측정하였다. 선택된 Fc 변이체에 대하여 도 28에 제시된 결합 데이터는 단백질 A에 결합하는 Fc 변이체의 능력이 손상되지 않았음을 나타낸다. 이들 결과는 또한, 단백질 G 및 신생 Fc 수용체 FcRn과 같은 단백질 A와 같이 Fc 상의 동일한 부위에 결합하는 기타 Fc 리간드에 대한 상기 Fc 변이체의 친화성이 영향을 받지 않음을 제시한다.

[0417]

실시예 10

[0418]

마우스 Fc γ R에 결합하는 Fc 변이체의 능력

[0419]

비인간 Fc γ R에 대한 Fc의 최적화는 동물 모델에서 실험적으로 Fc 변이체를 테스트하는데 유용할 수 있다. 예를 들어, 마우스(예를 들어 누드 마우스, SCID 마우스, 이종 이식(xenograft) 마우스, 및/또는 트랜스제닉 마우스)에서 테스트하는 경우, 하나 이상의 마우스 Fc γ R에 대하여 최적화된 Fc 변이체를 포함하는 항체 및 Fc 융합체는 효능, 작용 메커니즘 등에 관한 유용한 정보를 제공할 수 있다. 본 발명의 Fc 변이체가 그러한 실험에 유용한지의 여부를 평가하기 위하여, 마우스 Fc γ RIII에 대한 선택된 Fc 변이체의 친화성을 AlphaScreen™ 분석평가를 이용하여 측정하였다. AlphaScreen™ 분석평가는 실시예 2에서 설명한 바와 같이, 스트렙트아비딘 공여체 비드에 부착된 바이오틴화된 WT 알렘투주맵을 이용하여 수행하였으며, 실시예 2에서 설명한 바와 같이, 발현 및 정제된 GST-태그 부착된 마우스 Fc γ RIII는 글루타티온 키레이트 수령체 비드에 결합시켰다. 이들 결합 데이터는 도 29에 제시되어 있다. 그 결과는, 인간 Fc γ RIIIa에 대하여 결합이 증진된 몇몇 Fc 변이체가 마우스 Fc γ RIII에 대한 결합에 대해서도 증진됨을 나타낸다. 상기 결과는, 인간 이외의 Fc γ R에 대하여 최적화된 본 발명의 Fc 변이체, 또는 기타 Fc 변이체가 동물 모델을 이용한 실험에서도 이용될 수 있음을 나타낸다.

[0420]

실시예 11

[0421]

CHO 세포 내에서 발현된 Fc 변이체의 확인

[0422] 본 발명의 Fc 변이체를, 스크리닝 목적으로는 293T 세포 내에서 발현시킨 한편, 항체의 대량 생산 목적으로는 통상적으로 중국 햄스터 난소(Chinese Hamster Ovary; CHO) 세포주 내에서 발현시켰다. CHO-발현에서 발현된 Fc 변이체의 특성을 조사하기 위하여, 선택된 Fc 변이체 및 야생형 알렘투주맵을 CHO 세포에서 발현시키고, 실시예 2에서 설명한 바와 같이 정제하였다. 도 30은, 인간 V158 Fc γ RIIIa에 대한 CHO-발현 Fc 변이체 및 293T-발현 Fc 변이체 및 WT 알렘투주맵의 결합을 비교한 AlphScreen™을 나타낸다. 그 결과는, 본 발명의 Fc 변이체가 293T 또는 CHO에서 동등한 Fc γ R 결합 증진을 나타냄을 보여준다.

[0423] **실시예 12**

[0424] **Fc 변이체의 치료학적 적용**

[0425] 본 발명에 개시한 다수의 Fc 변이체는 항암 항체의 치료학적 효능을 증진시키는 상당한 잠재능을 갖는다. 예시 목적을 위하여, 본 발명의 다수의 Fc 변이체가 항체 리톡시맵 서열 내에 통합되었다. US 5,736,137에 개시된, 야생형 리톡시맵 경쇄 및 중쇄는 도 31a 및 32b에 개시되었다. 개선된 항-CD20 항체 서열은 도 31c에 제시되어 있다. 개선된 항-CD20 항체 서열 X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, 및 X₆으로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 비-WT 아미노산을 포함한다. 이들 개선된 항-CD20 항체 서열은 또한 치환 Z1을 포함할 수 있다. 본원에 있어서 리톡시맵의 사용은 단지 일례일뿐, 이는 Fc 변이체의 적용을 이 항체 또는 임의의 기타 특정 항체 또는 Fc 융합체로 제한하는 것은 아니다.

[0426] 모든 참고문헌은 단지 본원에 참조로 인용된다.

[0427] 당업자면, 본 발명의 특정한 일례들은 예시를 목적으로 제시된 것으로서, 본원에 개시된 바에 대하여, 첨부된 청구의 범위에 개시된 본 발명의 범위를 벗어나지 않고, 다양한 변화가 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

산업상 이용 가능성

[0428] 본 발명은, 다양한 치료학적 특성에 대하여 최적화된 Fc 변이체, 그의 제조하기 위한 조작 방법, 및 그의 용도, 특히 치료 목적에 있어서의 그의 용도를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0159] 도 1: 항체 구조 및 기능. pdb 기탁 코드 1CE1 유래의 인간화된(humanized) Fab 구조(James *et al.*, 1999, *J Mol Biol* 289: 293-301) 및 pdb 기탁 코드 1DN2 유래의 인간 IgG1 Fc 구조(DeLano *et al.*, 2000, *Science* 287: 1279-1283)를 이용하여 모델링된 전체 길이의 인간 IgG1 항체의 모델(model)을 나타내는 도면이다. Fab 및 Fc 부위에 결합하는 가요성 힌지는 도시되어 있지 않다. IgG1은 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄로 구성되는 호모다이머(homodimer)이다. 항체를 포함하는 Ig 도메인은 표지(label)되어 있으며, 상기 경쇄에 대하여 V_L 및 C_L을 포함하며, 상기 중쇄에 대하여 V_H, C_{감마1}(C γ 1), C_{감마2}(C γ 2), 및 C_{감마3}(C γ 3)을 포함한다. 상기 Fc 부위가 표시된다. 가변 부위 내의 항원 결합 부위, 및 상기 Fc 부위 내의 Fc γ R, FcRn, C1q, 및 단백질 A 및 G에 대한 결합 부위를 포함하는, 관련 단백질에 대한 결합 부위가 표시된다.

[0160] 도 2: Fc/Fc γ RIIIb 복합체 구조 1IIS. Fc는 회색 리본 다이어그램(gray ribbon diagram)으로서 도시되어 있으며, Fc γ RIIIb는 검은색 리본으로서 도시되어 있다. N297 탄수화물은 검은색 스틱(stick)으로서 도시되어 있다.

[0161] 도 3: Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 순차적으로 번호가 지정된 위치(아미노산 서열 상의 2번째 라인) 및 위치(아미노산 서열 아래의 2번째 라인)를 예시하는, 항체 알렘투주맵(alemtuzumab)(Campath^(R), Ilex Pharmaceuticals LP의 등록 상표) 중쇄의 아미노산 서열. Ig 도메인 VH1, C γ 1, 힌지, C γ 2, 및 C γ 3의 대략적인 시작부는 순차적인 번호 지정 시 표시된다. 다형들은, 이들로 제한되지는 않으나, Kabat 270, 272, 312, 315, 356, 및 358을 포함하는 다수의 Fc 위치에서 확인되어 있으며, 그러므로, 제시된 서열과 종래의 서열 사이에는 근소한 차이가 존재할 수 있다.

[0162] 도 4: Fc/Fc γ RIIIb 복합체 구조 1IIS 내로 맵핑된 실험적 라이브러리 잔기. Fc는 회색 리본 다이어그램으로서 도시되어 있으며, Fc γ RIIIb는 검은색 리본으로서 도시되어 있다. 실험적 라이브러리 잔기는 검은색 볼(ball) 및 스틱으로서 도시되어 있다. N297 탄수화물은 검은색 스틱으로서 도시되어 있다.

[0163] 도 5: Fc 변이체 실험적 라이브러리의 설계와 관련된 위치를 나타내는 인간 IgG1 Fc 서열. 상기 서열은 힌지

부위, 도메인 C γ 2, 및 도메인 C γ 3을 포함한다. 잔기의 번호는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 지정된다. 상기 실험적 라이브러리와 관련된 위치는 밑줄로 표시되어 있다. 다수의 Fc 위치에서 다형 돌연변이가 관찰되었기 때문에, 제시된 서열과 종래의 서열 사이에는 근소한 차이가 존재할 수 있다.

[0164] 도 6: 293T 세포 내의 알렘투주맵의 Fc 변이체 및 야생형(wild type; WT) 단백질의 발현. 알렘투주맵 중쇄 유전자(WT 또는 변이체)를 함유하는 플라스미드(Plasmid)를 상기 알렘투주맵 경쇄 유전자를 함유하는 플라스미드로써 공-트랜스펙션(co-transfected)시켰다. 트랜스펙션(transfection) 후 5일 뒤에 배지를 수확하였다. 각각의 트랜스펙션된 샘플에 대하여, 10 μ l의 배지를, 웨스턴(Western) 분석을 위하여, SDS-PAGE 젤(gel) 상에 로딩하였다. 웨스턴에 대한 프로브(probe)는 퍼옥시다아제-접합된 염소의 항-인간 IgG(peroxidase-conjugated goat-anti human IgG)(Jackson Immuno-Research, catalog # 109-035-088)이었다. WT: 야생형 알렘투주맵; 1-10: 알렘투주맵 변이체. H 및 L은 각각 항체 중쇄 및 경쇄를 나타낸다.

[0165] 도 7: 단백질 A 크로마토그래피를 이용한 알렘투주맵의 정제. WT 알렘투주맵 단백질을 293T 세포 내에서 발현시키고, 트랜스펙션 후 5일 뒤에 배지를 수확하였다. 상기 배지를 PBS를 이용해 1:1로 희석하고, 단백질 A(Pierce, Catalog # 20334)를 이용해 정제하였다. 0: 정제하기 이전의 원형 샘플; FT: 유속(flow through); E: 용리(elution); C: 농축된 최종 샘플. 좌측 사진은 심플 블루-염색된(Simple Blue-stained) SDS-PAGE 젤을 나타내며, 우측 사진은 퍼옥시다아제-접합된 염소의 항-인간 IgG를 이용해 표지된 웨스턴 블롯을 나타낸다.

[0166] 도 8: 데글라이코실화된 항체(deglycosylated antibody)의 제조. 알렘투주맵의 야생형 및 변이체를 293T 세포 내에서 발현시키고, 단백질 A를 크로마토그래피를 통해 정제하였다. 항체를 펩타이드-N-글라이코시다아제 F(peptide-N-glycosidase; PNGase F)와 함께, 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 각각의 항체에 대하여, 허위 처리된 샘플(mock treated sample)(-PNGase F)을 동시에 실시하였다. WT: 야생형 알렘투주맵; #15, #16, #17, #18, #22: 각각 알렘투주맵 변이체 F241E/F243R/V262E/V264R, F241E/F243Q/V262T/V264E, F241R/F243Q/V262T/V264R, F241E/F243Y/V262T/V264R, 및 I332E. 상기 PNGase F 처리된 샘플 대 상기 허위 처리된 샘플에 있어 빠르게 이동한 것은 데글라이코실화된 중쇄를 나타낸다.

[0167] 도 9: 293T 세포로부터 발현된 알렘투주맵은 그의 항원을 결합시킨다. GST에 융합된 항원성 CD52 펩타이드를, IPTG 유도(induction) 하에 *E. coli* BL21(DE3) 내에서 발현시켰다. 유도되지 않은 샘플 및 유도된 샘플 모두를 SDS-PAGE 젤 상에서 전개시키고, PVDF 멤브레인(membrane)으로 옮겼다. 웨스턴 분석을 위하여, Sotec(α -CD52, Sotec) 유래의 알렘투주맵(최종 농도 2.5 ng/ μ l) 또는 트랜스펙션된 293T 세포의 배지(Campath, Xencor)(최종 알렘투주맵 농도 대략 0.1-0.2ng/ μ l) 중 하나를 1차 항체(primary antibody)로서 사용하고, 퍼옥시다아제-접합된 염소의 항-인간 IgG를 2차 항체(secondary antibody)로서 사용하였다. M: 사전-염색된 마커(marker); U: GST-CD52에 대하여 유도되지 않은 샘플; 1: GST-CD52에 대하여 유도된 샘플.

[0168] 도 10: 인간 V158 Fc γ RIIIa의 세포의 부위의 발현 및 정제. 태그 연결된(Tagged) Fc γ RIIIa를 293T 세포 내에 트랜스펙션시키고, 3일 후, 분비된 Fc γ RIIIa를 함유하는 배지를 수확하고, 친화성 크로마토그래피를 통해 정제하였다. 1: 배지; 2: 유속; 3: 세척; 4-8: 일련의 희석액. 심플 블루-염색된 SDS-PAGE 젤 및 웨스턴 분석 결과를 나타낸다. 웨스턴 블롯을 위하여, 멤브레인을 항-GST 항체로써 탐침하였다.

[0169] 도 11: 실시예 2에 설명된, AlphaScreen™ 분석평가에 의하여 측정된 실험적 라이브러리로부터의 알렘투주맵 Fc 변이체의 선별에 의한 인간 V158 Fc γ RIIIa에 대한 결합. 경쟁자 항체(competitor antibody)(Fc 변이체 또는 WT 알렘투주맵)의 존재 하에서, 특징적인 저해 곡선(inhibition curve)을, 발광 신호(luminescence signal)의 감소로서 관찰한다. 포스페이트 버퍼 식염수(phosphate buffer saline; PBS) 단독을 음성 대조군(negative control)으로서 사용하였다. 이들 데이터를, 각각 경쟁자 항체의 저농도 및 고농도 수준에서 기준선에 의하여 제공되는 최대 및 최소 발광 신호에 대하여 표준화하였다. 상기 곡선은, 비선형 회귀(nonlinear regression)를 이용하여 한 부위의 경쟁 모델에 대한 데이터의 고정값을 나타낸다. 이들 고정값(fit)은 각각의 항체에 대한 IC50을 제공하며, 점선에 의하여 WT 및 S239D에 대하여 예시되어 있다.

[0170] 도 12: 인간 Fc γ RIIb에 대한 선택된 알렘투주맵 Fc 변이체의 결합을 나타내는 AlphaScreen™ 분석평가. 데이터는 표준화되었으며, 곡선은 한 부위의 경쟁 모델에 대한 데이터의 고정값을 나타낸다. PBS가 음성 대조군으로서 사용되었다.

[0171] 도 13: 인간 Val158 Fc γ RIIIa에 대한 선택된 알렘투주맵 Fc 변이체의 결합을 나타내는 AlphaScreen™ 분석평가. 데이터는 표준화되었으며, 곡선은 한 부위의 경쟁 모델에 대한 데이터의 고정값을 나타낸다. PBS가 음성 대조군으로서 사용되었다.

- [0172] 도 14: 리투시맵 하의 선택된 Fc 변이체에 의한 인간 V158 Fc γ RIIIa에 대한 결합을 측정하는 AlphaScreen™ 분석평가. 데이터는 표준화되었으며, 곡선은 한 부위의 경쟁 모델에 대한 데이터의 고정값을 나타낸다. PBS가 음성 대조군으로서 사용되었다.
- [0173] 도 15: 트라스투주맵 하의 선택된 Fc 변이체에 의한 인간 V158 Fc γ RIIIa에 대한 결합을 측정하는 AlphaScreen™ 분석평가. 데이터는 표준화되었으며, 곡선은 한 부위의 경쟁 모델에 대한 데이터의 고정값을 나타낸다. PBS가 음성 대조군으로서 사용되었다.
- [0174] 도 16a-16b: 인간 V158 Fc γ RIIIa(도 16a) 및 인간 Fc γ RIIb(도 16b)에 대한 선택된 알렘투주맵 Fc 변이체의 결합을 비교하는 AlphaScreen™ 분석평가. 데이터는 표준화되었으며, 곡선은 한 부위의 경쟁 모델에 대한 데이터의 고정값을 나타낸다. PBS가 음성 대조군으로서 사용되었다.
- [0175] 도 17: 트라스투주맵 하의 선택된 Fc 변이체에 의한 인간 V158 Fc γ RIIIa에 대한 결합을 측정하는 AlphaScreen™ 분석평가. 데이터는 표준화되었으며, 곡선은 한 부위의 경쟁 모델에 대한 데이터의 고정값을 나타낸다.
- [0176] 도 18: 선택된 알렘투주맵 Fc 변이체에 의한 인간 R131 Fc γ RIIIa에 대한 결합을 나타내는 AlphaScreen™ 분석평가. 데이터는 표준화되었으며, 곡선은 한 부위의 경쟁 모델에 대한 데이터의 고정값을 나타낸다.
- [0177] 도 19a 및 19b: 선택된 알렘투주맵 Fc 변이체에 의한 인간 V158 Fc γ RIIIa에 대한 결합을 나타내는 AlphaScreen™ 분석평가. 데이터는 표준화되었으며, 곡선은 한 부위의 경쟁 모델에 대한 데이터의 고정값을 나타낸다. PBS가 음성 대조군으로서 사용되었다.
- [0178] 도 20: 선택된 아글라이코실화 알렘투주맵 Fc 변이체에 의한 인간 V158 Fc γ RIIIa에 대한 결합을 나타내는 AlphaScreen™ 분석평가. 데이터는 표준화되었으며, 곡선은 한 부위의 경쟁 모델에 대한 데이터의 고정값을 나타낸다. PBS가 음성 대조군으로서 사용되었다.
- [0179] 도 21: 클라이코실화(색칠된 기호(solid symbol), 실선(solid line)) 및 데글라이코실화(색칠되지 않은 기호(open symbol), 점선(dotted line))에 있어서의 선택된 알렘투주맵 Fc 변이체에 의한 인간 V158 Fc γ RIIIa를 비교하는 AlphaScreen™ 분석평가. 데이터는 표준화되었으며, 곡선은 한 부위의 경쟁 모델에 대한 데이터의 고정값을 나타낸다.
- [0180] 도 22a-22b: 선택된 알렘투주맵 Fc 변이체에 의한 인간 V158 Fc γ RIIIa의 V158(도 22a) 및 F158(도 22b) 알로 타입에 대한 결합을 나타내는 AlphaScreen™ 분석평가. 데이터는 표준화되었으며, 곡선은 한 부위의 경쟁 모델에 대한 데이터의 고정값을 나타낸다. PBS가 음성 대조군으로서 사용되었다.
- [0181] 도 23a-23d: 도 23a 및 23b는 선택된 알렘투주맵 Fc 변이체의 V158 Fc γ RIIIa(도 23a) 및 F158 Fc γ RIIIa(도 23b)에 대한 결합에 있어서의 SPR Kd 값 및 AlphaScreen™ IC50 값 사이의 상관관계를 나타내는 도면이다. 도 23c 및 23d는 선택된 알렘투주맵 Fc 변이체에 의한 V158 Fc γ RIIIa(도 23c) 및 F158 Fc γ RIIIa(도 23d)에 대한 결합에 있어서의 WT 전반에 대한 SPR 및 AlphaScreen™ 배수-개선 사이의 상관관계를 나타내는 도면이다. 데이터 전반에서 실선은 데이터의 선형 고정값을 나타내며, r^2 값은 이들 고정값의 유의성(significance)을 나타낸다.
- [0182] 도 24a-24b: 알렘투주맵 하의 선택된 Fc 변이체의 세포-기준 ADCC 분석평가. DoHH-2 림프종 표적 세포 및 50배 과량의 인간 PBMC를 이용하여, 실시예 7에 설명한 바와 같이, DELFIA^(R) EuTDA-기준 세포독성 분석평가(Perkin Elmer, MA)를 이용하여 ADCC를 측정하였다. 도 24a는, 10 ng/ml 농도에서 소정의 알렘투주맵 항체에 대한 표준화되지 않은 형광 데이터(raw fluorescence data)를 나타내는 막대 그래프이다. PBMC 막대는, 항체 부재 하에서의 세포독성의 기초 수준(basal level)을 나타낸다. 도 24b는, 각각 항체의 저농도 및 고농도에서의 기준선에 의하여 제공되는 최대 및 최소 형광 신호에 대하여 표준화된, 소정의 알렘투주맵 항체에 대한 항체 농도에 따른 ADCC의 용량-의존성(dose-dependence)을 나타낸다. 곡선은, 비선형 회귀를 이용한 S자형 용량-반응 모델(sigmoidal dose-response model)에 대한 데이터의 고정값을 나타낸다.
- [0183] 도 25a-25b: 리투시맵 하의 선택된 Fc 변이체의 세포-기준 ADCC 분석평가. WIL2-S 림프종 표적 세포 및 50배 과량의 인간 PBMC를 이용하여, 실시예 7에 설명한 바와 같이, DELFIA^(R) EuTDA-기준 세포독성 분석평가(Perkin Elmer, MA)를 이용하여 ADCC를 측정하였다. 도 25a는, 1 ng/ml 농도에서 소정의 리투시맵 항체에 대한 표준화되지 않은 형광 데이터를 나타내는 막대 그래프이다. PBMC 막대는, 항체 부재 하에서의 세포독성의 기초 수준을 나타낸다. 도 25b는, 각각 항체의 저농도 및 고농도에서의 기준선에 의하여 제공되는 최대 및 최소 형광 신호

호에 대하여 표준화된, 소정의 리톡시맵 항체에 대한 항체 농도에 따른 ADCC의 용량-의존성을 나타낸다. 곡선은, 비선형 회귀를 이용한 S자형 용량-반응 모델에 대한 데이터의 고정값을 나타낸다.

[0184] 도 26a-26c: 트라스투주맵 하의 선택된 Fc 변이체의 세포-기준 ADCC 분석평가. BT474 및 Sk-Br-3 유방 카르시노마(carcinoma) 표적 세포 및 50배 과량의 인간 PBMC를 이용하여, 실시예 7에 설명한 바와 같이, DELFIA^(R) EuTDA-기준 세포독성 분석평가(Perkin Elmer, MA)를 이용하여 ADCC를 측정하였다. 도 26a는, 1 ng/ml 농도에서 소정의 트라스투주맵 항체에 대한 표준화되지 않은 형광 데이터를 나타내는 막대 그래프이다. PBMC 막대는, 항체 부재 하에서의 세포독성의 기초 수준을 나타낸다. 도 26b 및 26c는, 각각 항체의 저농도 및 고농도에서의 기준선에 의하여 제공되는 최대 및 최소 형광 신호에 대하여 표준화된, 소정의 트라스투주맵 항체에 대한 항체 농도에 따른 ADCC의 용량-의존성을 나타낸다. 곡선은, 비선형 회귀를 이용한 S자형 용량-반응 모델에 대한 데이터의 고정값을 나타낸다.

[0185] 도 27a-27b: 상보체의 결합 및 활성화를 매개하는 선택된 Fc 변이체의 역량. 도 27a는 선택된 알렘투주맵 Fc 변이체의 C1q에 대한 결합을 측정하는 AlphaScreenTM 분석평가 결과를 나타낸다. 데이터는 각각 경쟁자 항체의 저농도 및 고농도에서의 기준선에 의하여 제공되는 최대 및 최소 발광 신호에 대하여 표준화하였다. 곡선은 비선형 회귀를 이용한 한 부위의 경쟁 모델에 대한 데이터의 고정값을 나타낸다. 도 27b는 CDC를 매개하는 선택된 리톡시맵 Fc 변이체의 역량을 측정하는 세포-기준 분석평가 결과를 나타낸다. CDC 분석평가는, 인간 혈청 상보체(Quidel, San Diego, CA)에 의하여 Fc 변이체 및 WT 리톡시맵-옵소닌화된(opsonized) WIL2-S 림프종 세포의 용해를 모니터링하는 Amar Blue를 이용하여 측정하였다. 상보체-매개의 용해의 항체 농도에 대한 용량-의존성은, 각각 항체의 저농도 및 고농도에서의 기준선에 의하여 제공되는 최대 및 최소 형광 신호에 대하여 표준화된 소정의 리톡시맵 항체에 대하여 제시된다. 곡선은 비선형 회귀를 이용한 S자형 용량-반응 모델에 대한 데이터의 고정값을 나타낸다.

[0186] 도 28: 실시예 9에 설명한 바와 같은, 박테리아성 단백질 A에 대한 선택된 알렘투주맵 Fc 변이체의 결합을 측정하는 AlphaScreenTM 분석평가. 데이터는 표준화되었으며, 곡선은 한 부위의 경쟁 모델에 대한 데이터의 고정값을 나타낸다. PBS가 음성 대조군으로서 사용되었다.

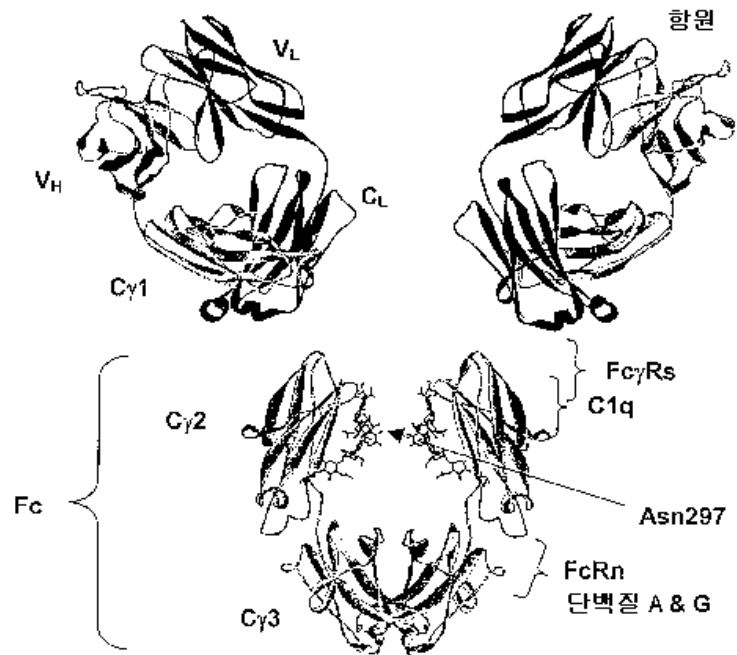
[0187] 도 29: 실시예 10에 설명한 바와 같은, 마우스 Fc γ R1II에 대한 선택된 알렘투주맵 Fc 변이체의 결합을 측정하는 AlphaScreenTM 분석평가. 데이터는 표준화되었으며, 곡선은 한 부위의 경쟁 모델에 대한 데이터의 고정값을 나타낸다. PBS가 음성 대조군으로서 사용되었다.

[0188] 도 30: 실시예 11에 설명한 바와 같은, 293T 및 CHO 세포 내에서 발현되는 선택된 트라스투주맵 Fc 변이체에 의한 인간 V158 Fc γ R1IIa에 대한 결합을 측정하는 AlphaScreenTM 분석평가. 데이터는 표준화되었으며, 곡선은 한 부위의 경쟁 모델에 대한 데이터의 고정값을 나타낸다. PBS가 음성 대조군으로서 사용되었다.

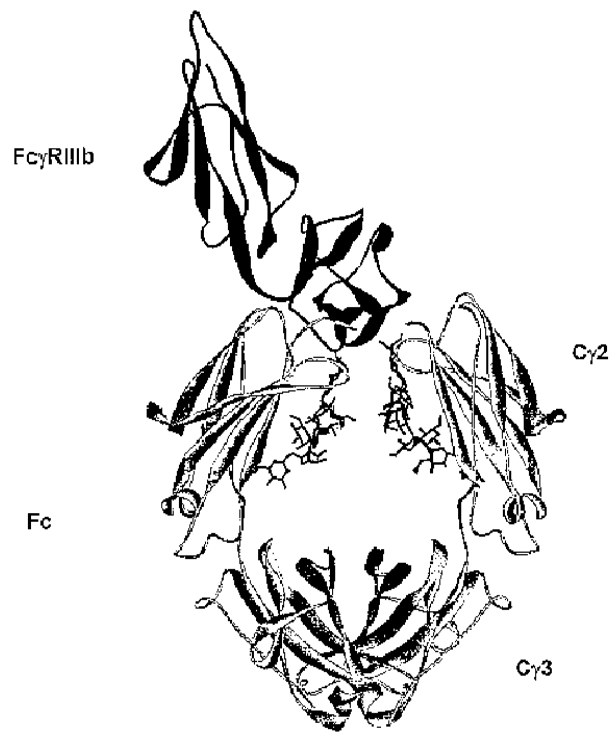
[0189] 도 31a-31c: 개선된 항-CD20 항체를 나타내는 서열. 리톡시맵의 경쇄 및 중쇄 서열은 각각 도 31a 및 도 31b에 제시되어 있으며, US 5,736,137의 번역된 서열로부터 취한 것이다. 도 31b 내의 관련 위치는, S239, V240, V264I, N297, S298, A330, 및 I332를 포함하여, 굵은 글씨체로 표시되어 있다. 도 31c는, X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, 및 Z₁로서 굵은 글씨체로 표시된 가변 위치를 가지는 개선된 항-CD20 항체 중쇄 서열을 나타낸다. 서열 하부의 표는 이들의 위치에 대하여 가능한 치환을 제시한다. 개선된 항-CD20 항체 서열은, X₂, X₂, X₃, X₄, X₅, 및 X₆에 대하여 가능한 치환의 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 비-WT 아미노산을 포함한다. 이들 개선된 항-CD20 항체 서열은 또한, 치환 Z₁을 포함할 수 있다. 이들 위치는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따라 번호가 지정되며, 그러므로, 서열 내의 연속적인 순서와는 대응하지 않는다.

도면

도면1



도면2



도면3

```

WH1->
1      10      20      30      40      50      60
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
QVQLQESGGPGLVFRFSSQTLISLTCTVSGFTITDFTYMNWVVKQDPPGRGSRWTCFIRDKKAKGYTT

      70      80      90      100     110     120
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
RSMPSVVKGRVITMLVDTGSKNQFSIRLSSVTAADTAVYYCAREGHTIADAPPDYWGQGSLSVTVS

    Cy1->
      130      140      150      160      170      180
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
SASTKGFSPVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPEPTVSNWSSGALTSGVHTYPAVLQGS

                                     HINGE->
      190      200      210      220      230      240
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
RGLVSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHRKPSNTKVDKVKVDFKSCDKTHTCPPCPAPPELLG
                                     1234567890123456
                                     KABAT 22      23

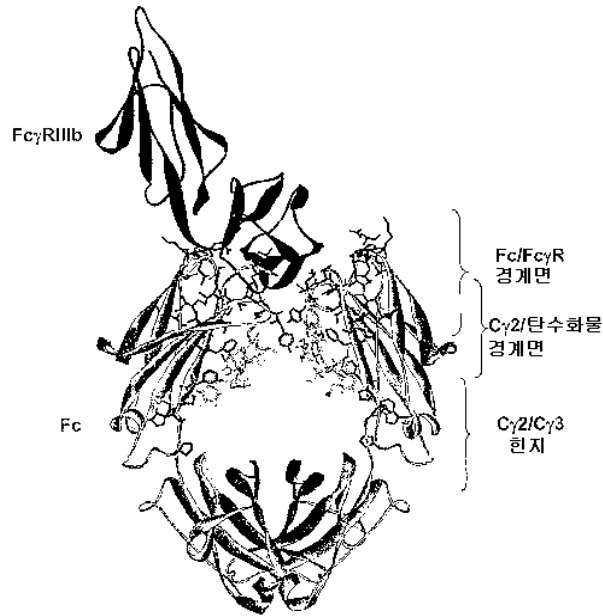
Cy2->
      250      260      270      280      290      300
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
GFEVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456
240      250      260      270      280      290

                                     ?Cy3?->
      310      320      330      340      350      360
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPRTFKTISAKAGQPREPQVYTLPPSRD
789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456
300      310      320      330      340      350

      370      380      390      400      410      420
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSR
789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456
360      370      380      390      400      410

      430      440      450
12345678901234567890123456789012345678901
WQQGNYVFSCFEVNHREALRHHYTTOKSLSLSPGK
7890123456789012345678901234567
420      430      440
    
```

도면4



도면5

```

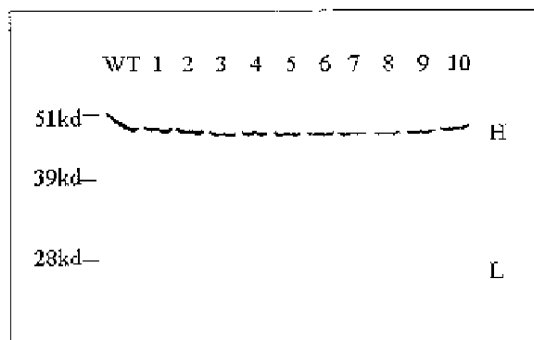
22      23      34      25      26      27      28
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
DKIHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHRDEEVKFNHYVD

      29      30      31      32      33      34
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
GVEVFNAKTKPRREQYNSYFRVVSVLIVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPDKYTIISKAK

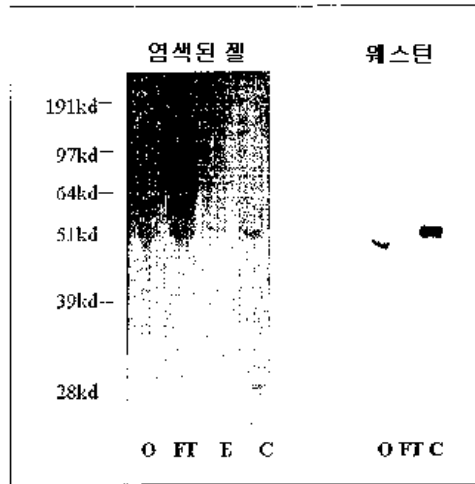
      35      36      37      38      39      40
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNQQPZNNYKRTTPEVLDSE

      41      42      43      44
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567
DGSDFLYAKLITVDRKSRWQQGNVFPSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
    
```

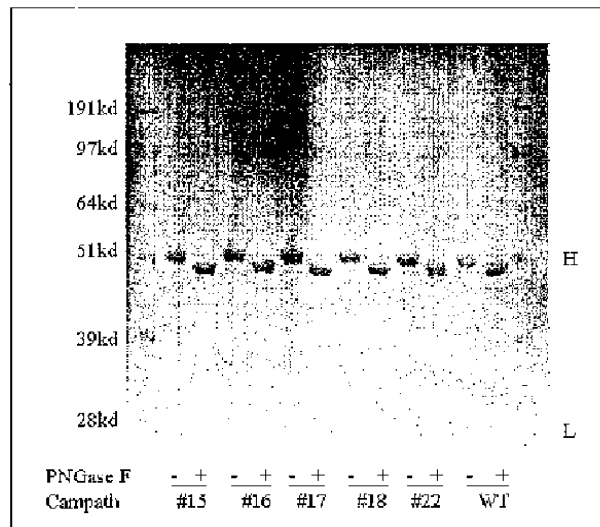
도면6



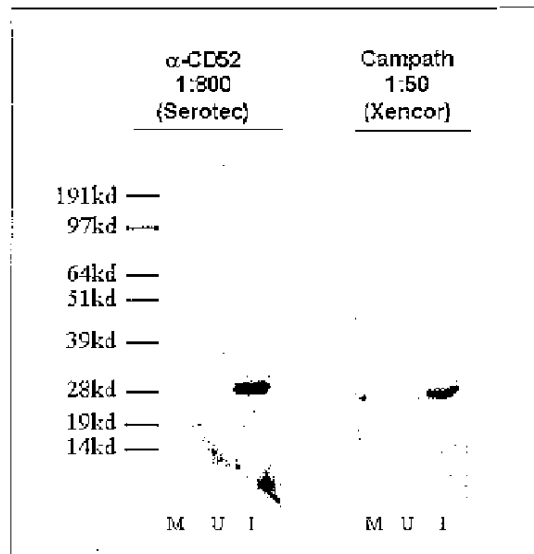
도면7



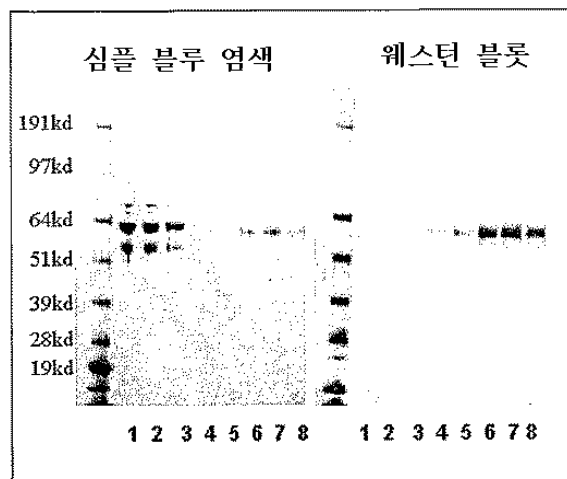
도면8



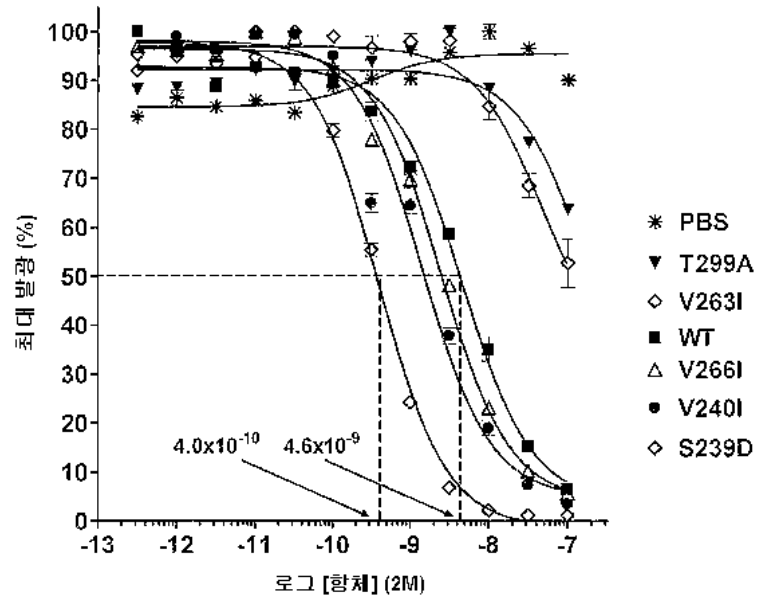
도면9



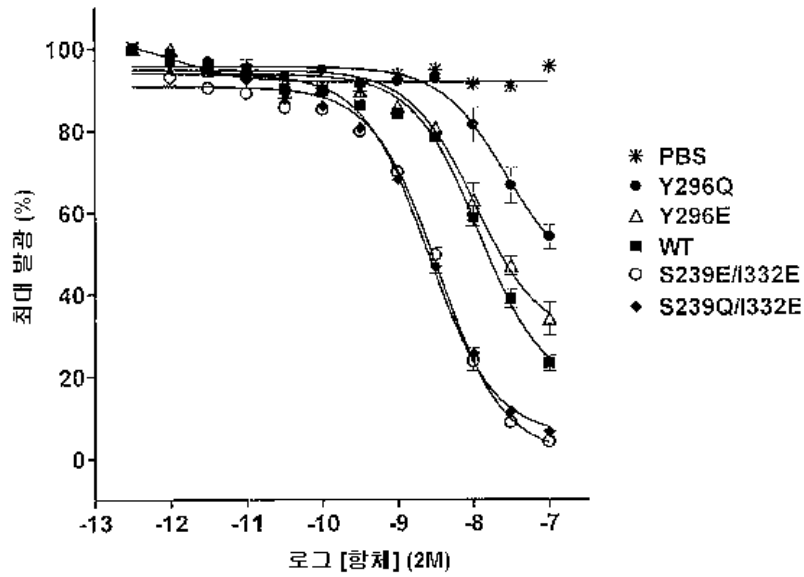
도면10



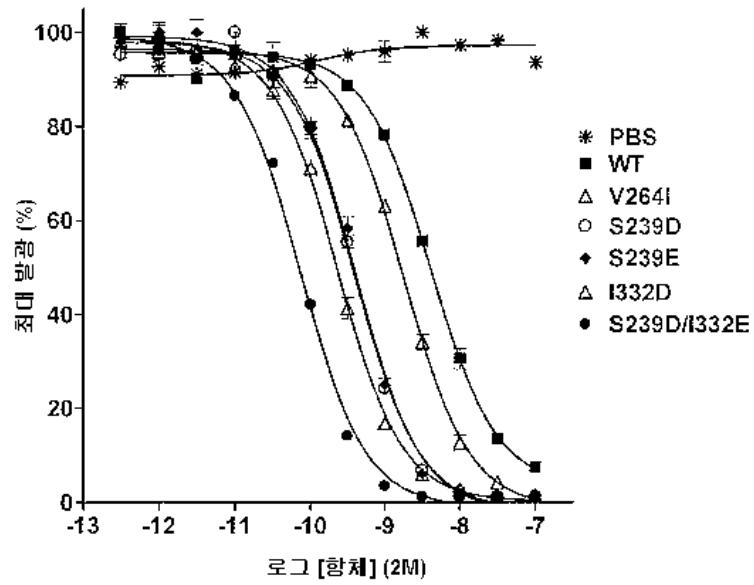
도면11



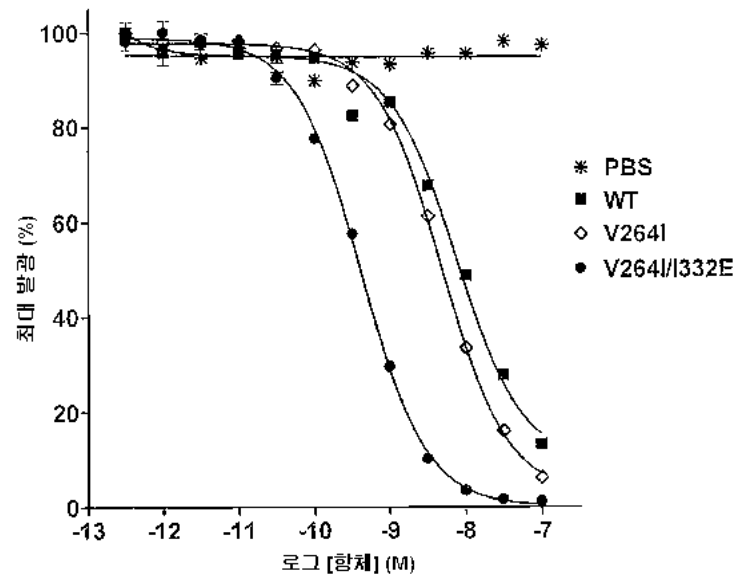
도면12



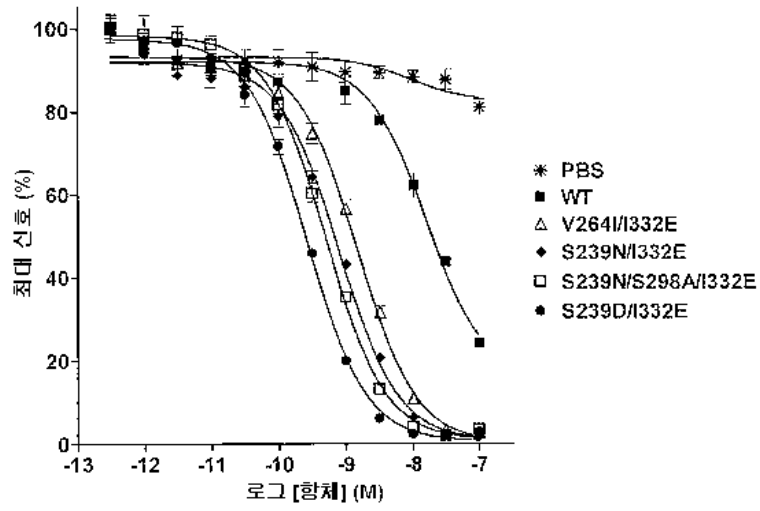
도면13



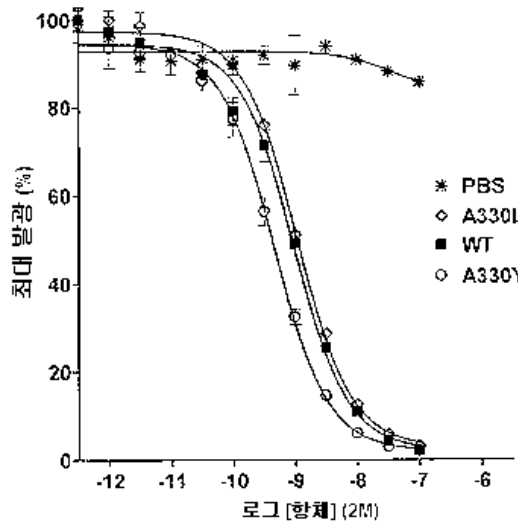
도면14



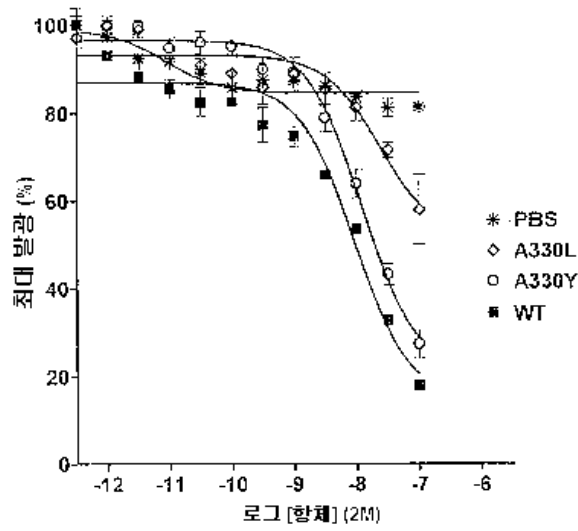
도면15



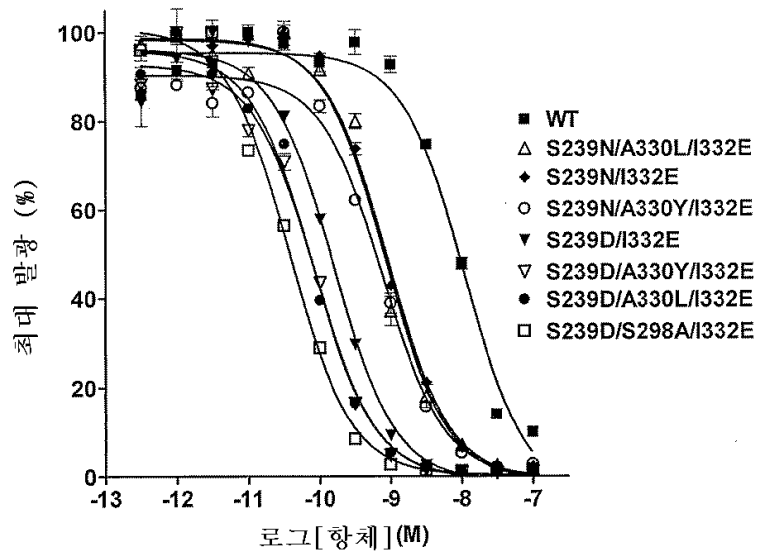
도면16a



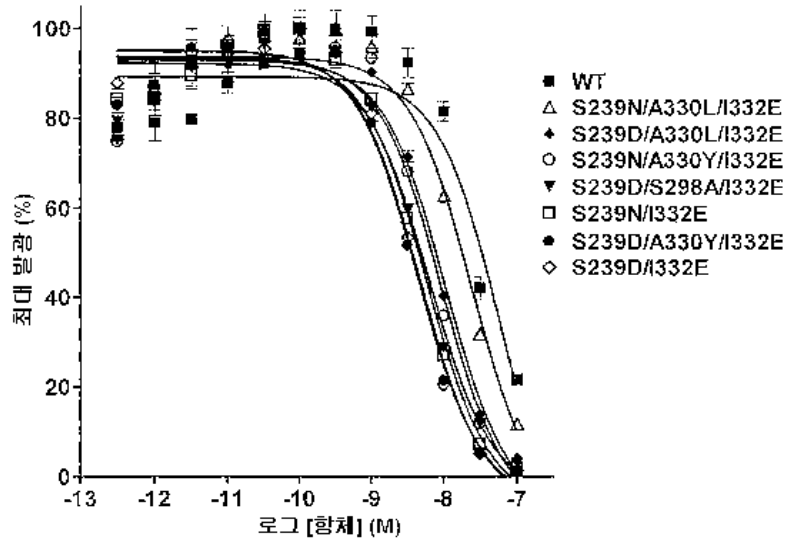
도면16b



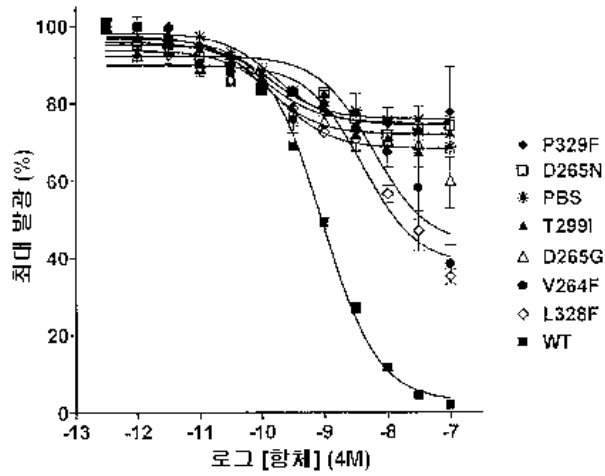
도면17



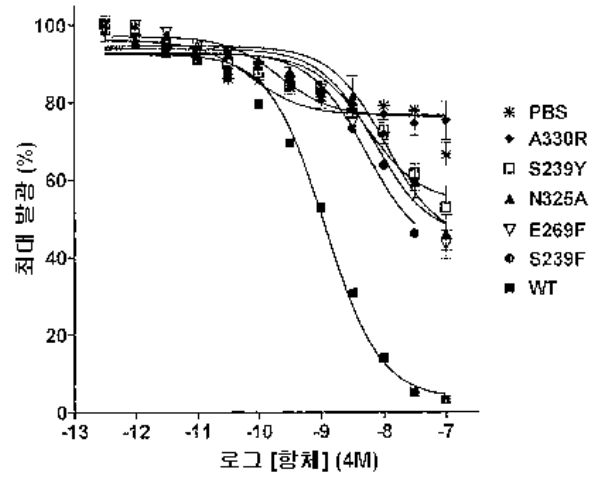
도면18



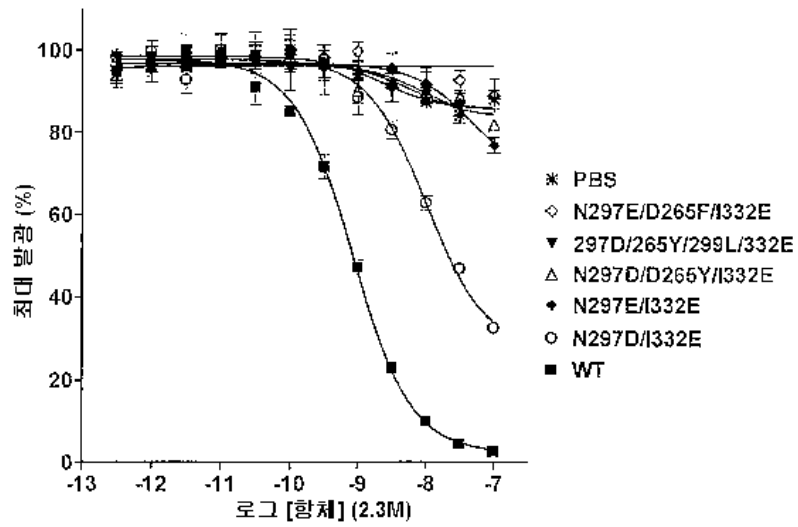
도면19a



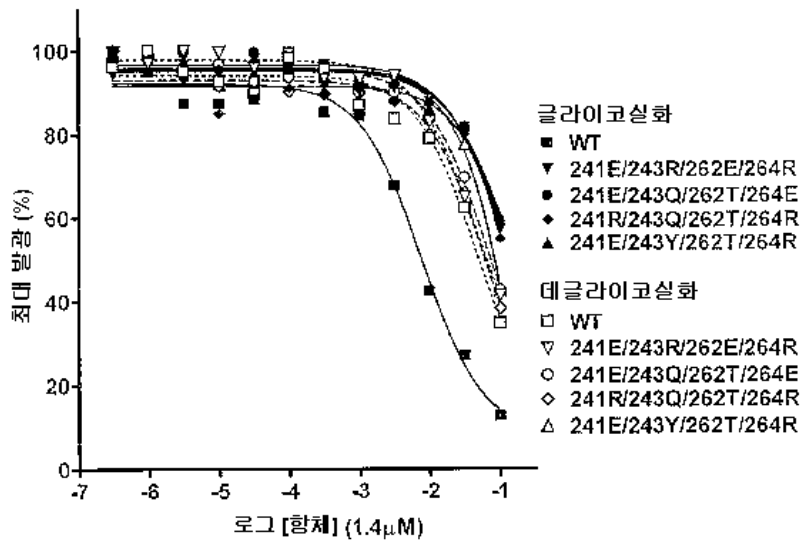
도면19b



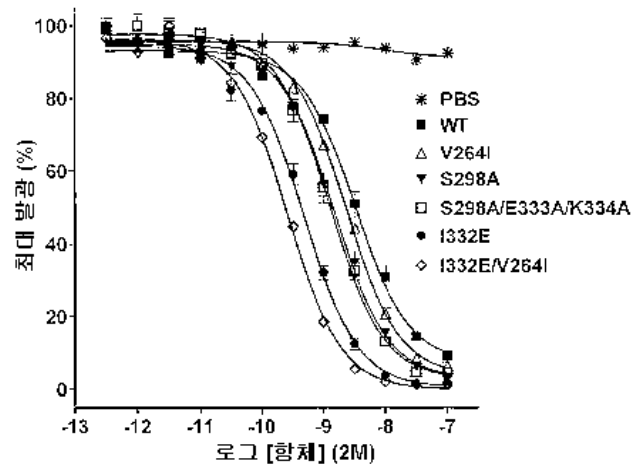
도면20



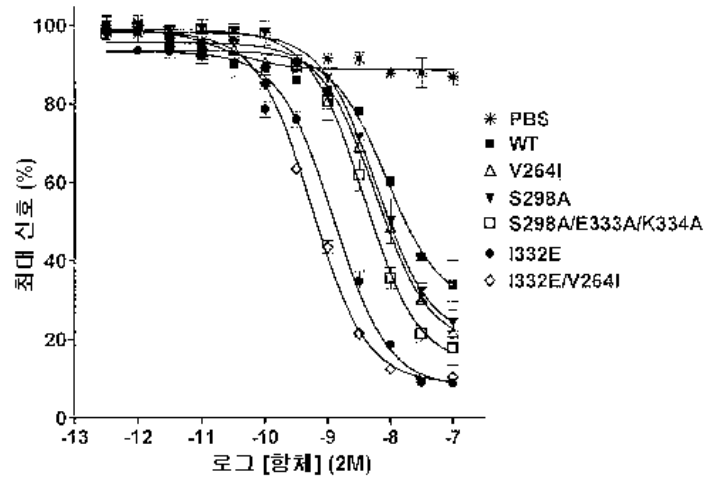
도면21



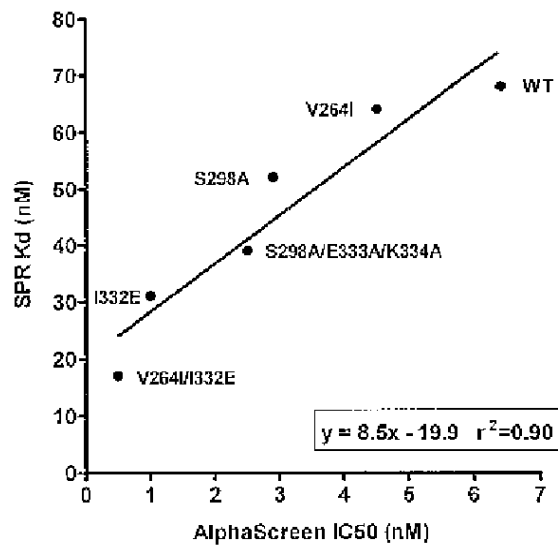
도면22a



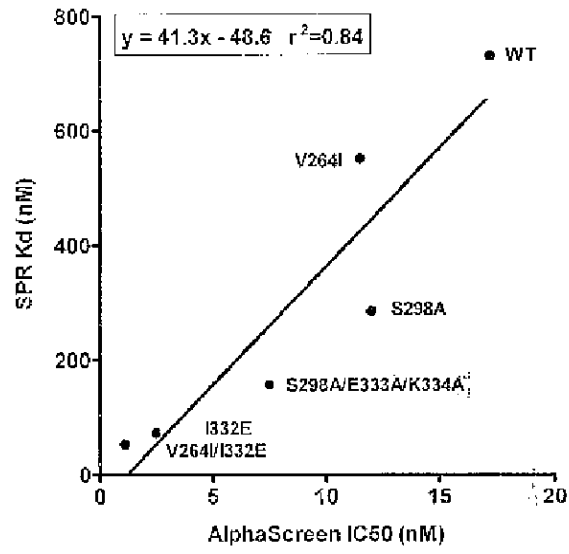
도면22b



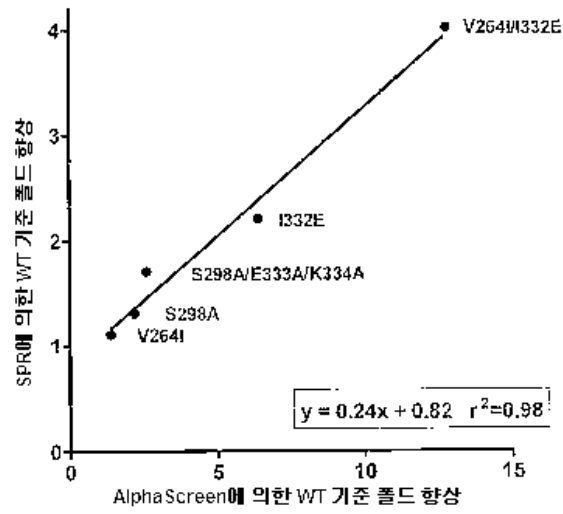
도면23a



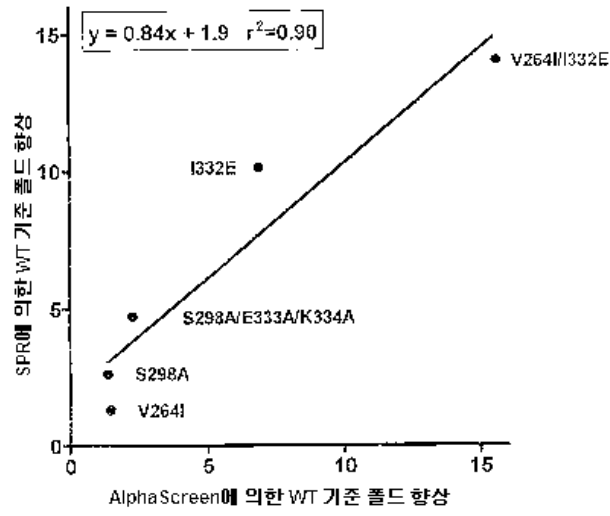
도면23b



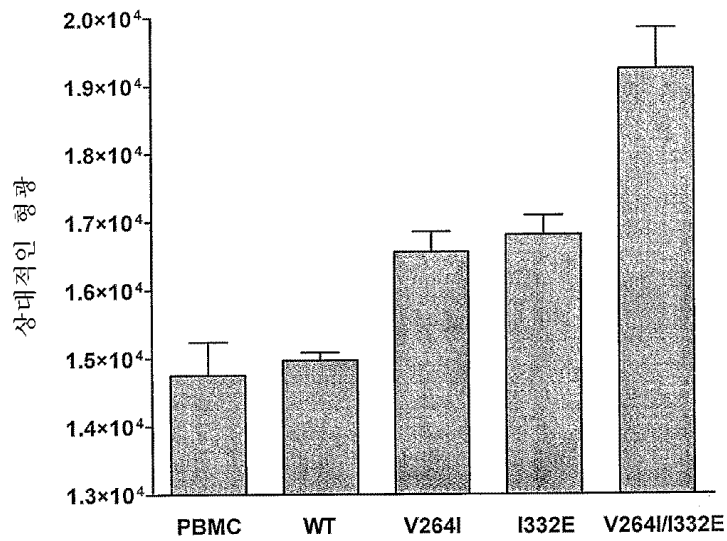
도면23c



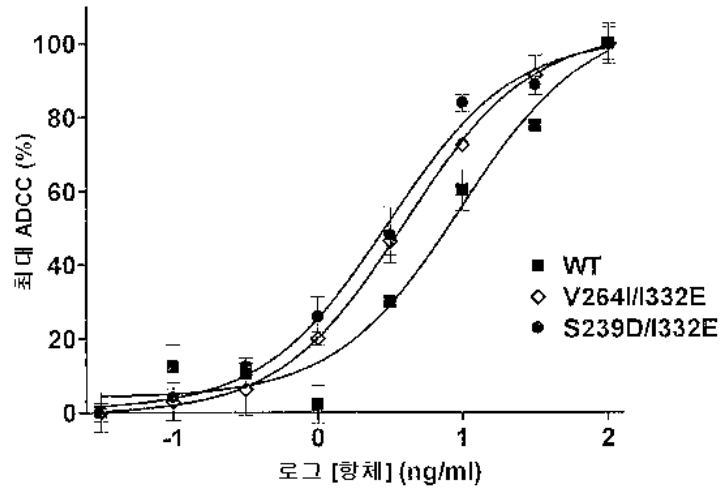
도면23d



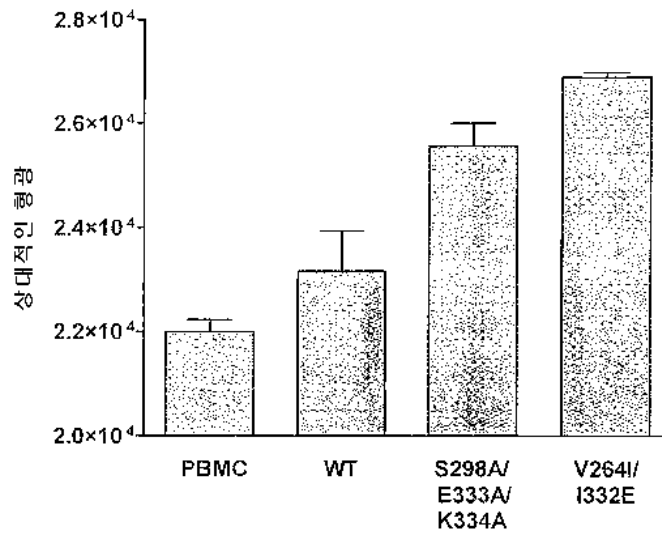
도면24a



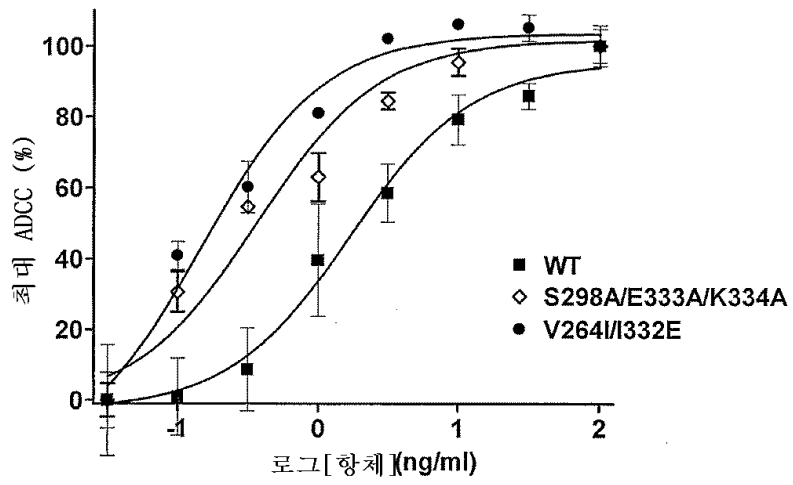
도면24b



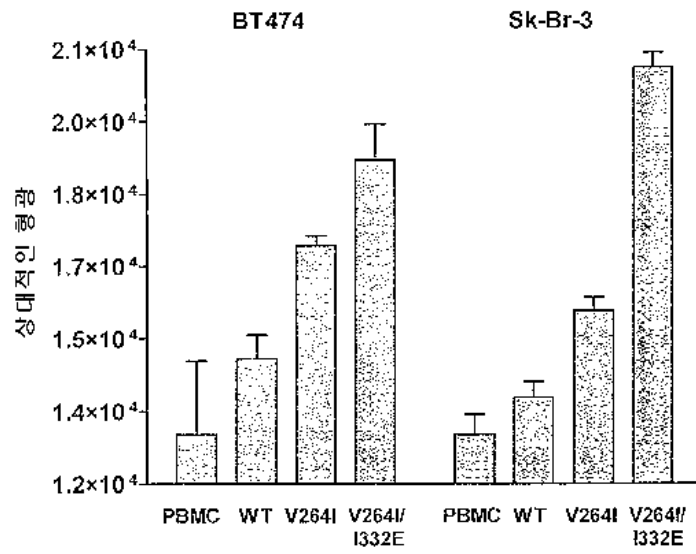
도면25a



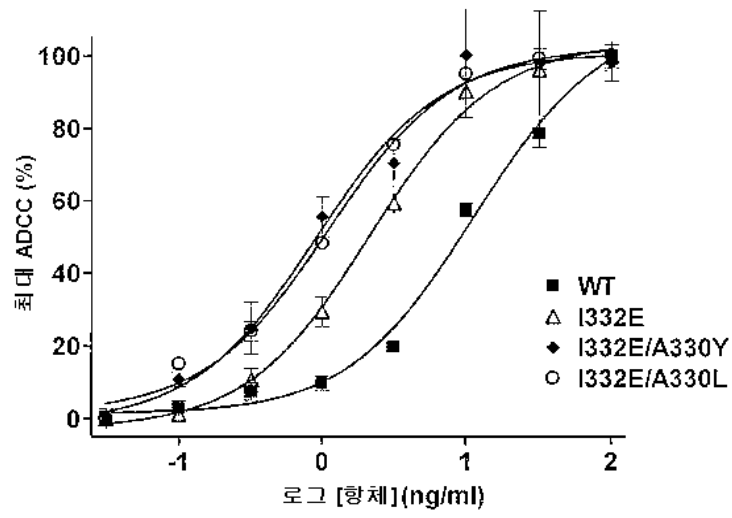
도면25b



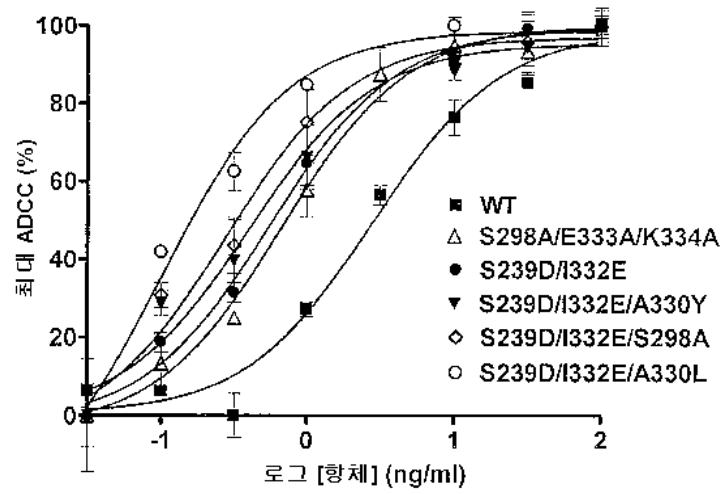
도면26a



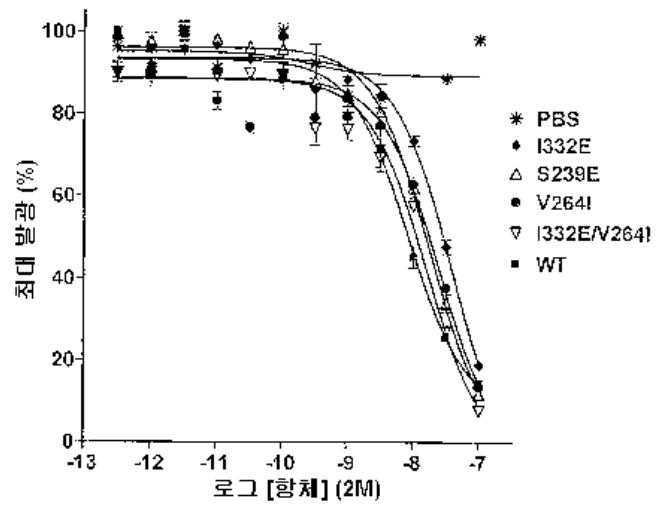
도면26b



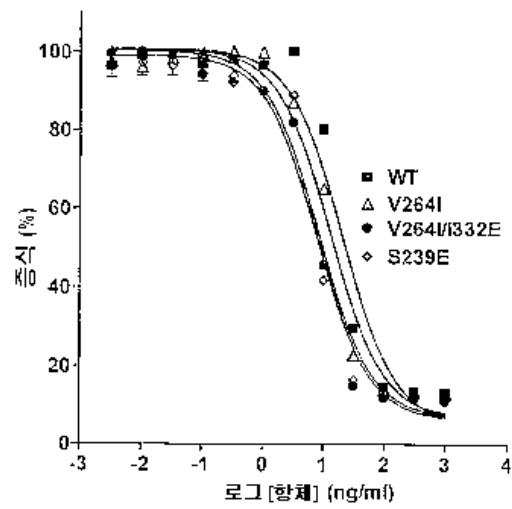
도면26c



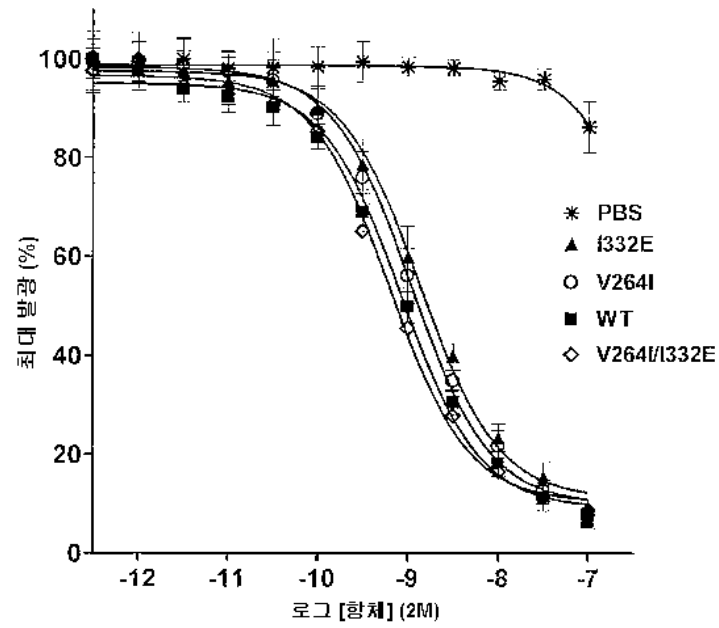
도면27a



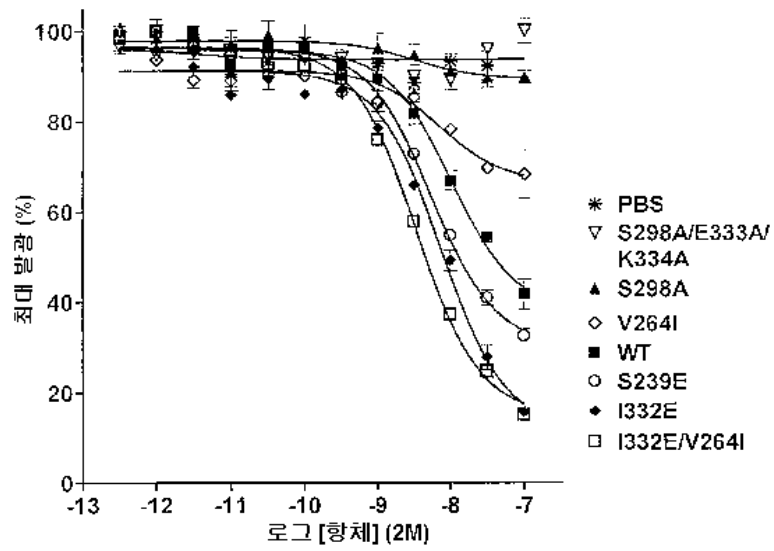
도면27b



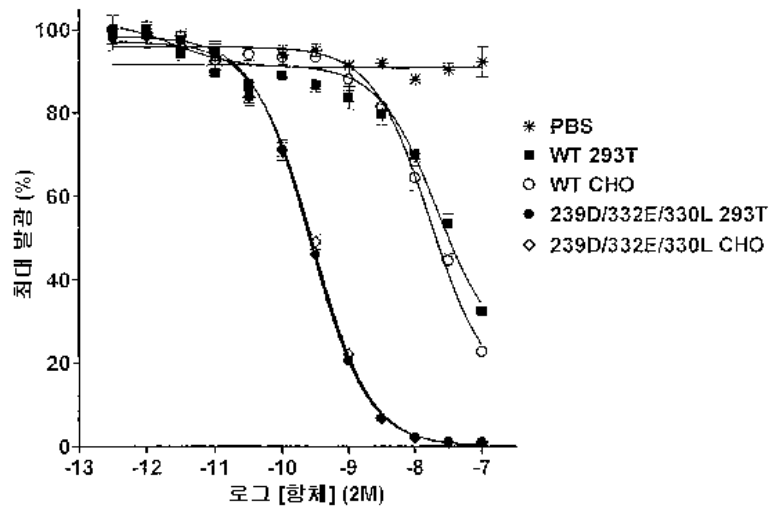
도면28



도면29



도면30



도면31a

QIVLSQSPAILSASPGKEKVTMTCRASSSVSYIHWFQKPGSSPKPWLYATSNLASGVPVRFSGSGSG
 TSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLS
 SPVTKSFNRGEC

도면31b

QVQLQQPGAEELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRIIEWIGAIYPGNGDTSYNQKFK
 GKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNWVGAGTTVTVSAASTKGPSVFP
 LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
 TQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
 PVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

도면31c

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYFGNGDTSYNQIKFK
 GKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWVGAGTTVTVSAASTKGPSVFP
 LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSVVIVPSSSLG
 TQTYICNVNIKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPX₁X₂FLFPPKPKDTLMISRIPEVTC
 VVX₃DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYX₄Z₁TYRWWVSLTVLIHQDWLNGKI.YKCKVSN
 KALPX₅PX₆EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

위치	WT	가능한 치환
X ₁	S	D, E, N, Q, T
X ₂	V	I, M
X ₃	V	I, T, Y
X ₄	N	D
X ₅	A	Y, L, I
X ₆	I	D, E, N, Q
Z ₁	S	A