



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0101717
(43) 공개일자 2024년07월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/00 (2006.01) C07K 16/10 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/00 (2013.01)
C07K 16/1045 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7020823(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2018년02월12일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2019-7026071
원출원일자(국제) 2018년02월12일
심사청구일자 2021년02월15일
- (85) 번역문제출일자 2024년06월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2018/053464
- (87) 국제공개번호 WO 2018/146317
국제공개일자 2018년08월16일
- (30) 우선권주장
PA 2017 00097 2017년02월10일 덴마크(DK)
- (71) 출원인
젠맵 비. 브이
네덜란드 씨티 유포레흐트 3584 워살라란 15
- (72) 발명자
비르스켄스, 프란크
네덜란드 씨엠 유포레흐트 3584 알리란 60 젠맵 비. 브이 내
오베르디, 마리에
네덜란드 씨엠 유포레흐트 3584 알리란 60 젠맵 비. 브이 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 이상영

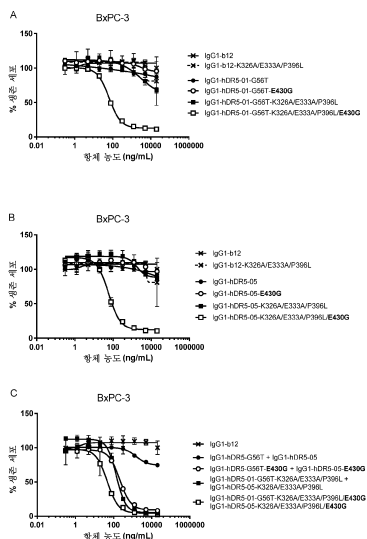
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 폴리펩티드 변이체 및 그의 용도

(57) 요약

Fc 영역 및 항원 결합 영역을 갖는 폴리펩티드 및 항체이며, 여기서 Fc 영역은 Fc-Fc-중진 돌연변이 및 C1q 결합-중진 돌연변이를 가져 증가된 CDC 활성 및/또는 효능작용 활성을 갖는 폴리펩티드 또는 항체를 제공하는 것인, 폴리펩티드 및 항체가 본원에 기재된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 16/2878 (2013.01)
C07K 16/2887 (2013.01)
C07K 16/2893 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/524 (2013.01)
C07K 2317/526 (2013.01)
C07K 2317/72 (2013.01)
C07K 2317/734 (2013.01)
C07K 2317/75 (2013.01)

(72) 발명자

딕스, 아니엑, 엠.

네덜란드 브이제이 하우다 2801 라암 63-취

데 용, 톰

네덜란드 씨엠 유트레흐트 3584 알리란 60 쟈맵
비. 브이 내

스트뤼마너, 크리스틴

네덜란드 씨엠 유트레흐트 3584 알리란 60 쟈맵
비. 브이 내

스뤼르만, 야니너

네덜란드 씨엠 유트레흐트 3584 알리란 60 쟈맵
비. 브이 내

파렌, 파울

네덜란드 피알 오테이크 3984 베르도르페르바르트
17

명세서

청구범위

청구항 1

이뮤노글로불린의 Fc 영역 및 항원 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드로서, Fc 영역이

- a. E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 치환, 및
- b. G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환

을 포함하고, 여기서 위치는 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1에 상응하는 것인 폴리펩티드의 질환 치료용 의약의 제조를 위한 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 모 폴리펩티드 또는 항체와 비교하여 Fc 영역에 적어도 2개의 아미노산 치환을 갖는, 결합 영역을 포함하는 Fc 영역-함유 폴리펩티드, 예컨대 항체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 모노클로날 항체의 Fc-매개된 이펙터 기능, 예컨대 보체-의존성 세포독성 (CDC), 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC) 및 항체-의존성 세포-매개된 식세포작용 (ADCP)은 효능 및 독성에 의해 규정되는 치료 범위에 기여한다. CDC는 C1q가 항체의 Fc 영역에 결합함으로써 개시된다. C1q는 줄기에 부착된 6개의 구상 결합 헤드로 이루어진 다량체 단백질이다.

[0003] 세포 표면 상의 표적에 결합할 때의 IgG 육량체화는 Fc 영역 내의 점 돌연변이에 의해 증진되는 것으로 밝혀졌다. 육량체화는 분자간 비-공유 Fc-Fc 상호작용을 통해 매개되고, Fc-Fc 상호작용은 E345R 및 E430G를 포함한, CH3 도메인 내의 점 돌연변이에 의해 증진될 수 있다.

[0004] W02013/004842는 변형된 이펙터 기능, 예컨대 보체-의존성 세포독성 (CDC)을 유발하는 1개 이상의 아미노산 변형을 갖는 변이체 Fc 영역을 포함하는 항체 또는 폴리펩티드를 개시한다.

[0005] W02014/108198은 증가된 보체-의존성 세포독성 (CDC)을 유발하는 1개 이상의 아미노산 변형을 갖는 변이체 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드, 예컨대 항체를 개시한다.

[0006] W02016/164480은 효능작용 활성을 갖는 항원 결합 복합체를 개시한다.

[0007] 항체 사이의 증진된 Fc-Fc 상호작용을 사용하여 세포 표면 상의 표적에 결합하는 항체의 효과를 증폭시킬 수 있다. 그러나, 단지 Fc 영역 사이의 Fc-Fc 상호작용을 증진시키는 것만으로는, 예를 들어 수용체에 결합함으로써 신호전달 경로를 활성화시키기에 충분히 강한 신호를 생성하는데 항상 충분한 것은 아니다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 모 폴리펩티드와 비교할 때 증가된 Fc-Fc 상호작용 및 효능작용 활성, 예컨대 결합시 표적 수용체의 증가된 활성화를 갖는, 인간 IgG의 Fc 영역 및 항원 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체를 제공하는 것이며, 여기서 모 폴리펩티드는 동일한 이소형의 인간 IgG이고 동일한 항원 결합 영역을 갖지만 Fc 영역에 임의의 돌연변이가 없는 것, 즉 모 폴리펩티드 또는 모 항체이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 폴리펩티드, 예를 들어 항체의 항원 결합 영역이 상응하는 항원에 결합하는 경우에, 모 폴리펩티드와 비교하여 신호전달을 활성화시키는, 임의로 증진된 신호전달을 유도하는 폴리펩티드를 제공하는 것이며, 여기서 모 폴리펩티드는 Fc 영역에 임의의 돌연변이를 갖지 않는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 증진된 Fc-Fc 상호작용 특성 및 증진된 이펙터 기능, 예컨대 CDC를 갖는 폴리펩티드를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 추가의 목적은 Fc 영역에 임의의 돌연변이가 없는 모 폴리펩티드와 비교할 때 증진된 Fc-Fc 상호작용

및 증진된 C1q 결합 특성을 갖는 폴리펩티드를 제공하는 것이다.

발명의 내용

- [0012] 본원에 기재된 바와 같이, 본 발명은 Fc 영역 및 항원 결합 영역을 갖는 폴리펩티드 또는 항체이며, 여기서 Fc 영역은 Fc-Fc 증진 돌연변이 및 C1q 결합 돌연변이를 가져 증가된 CDC 활성 및/또는 효능작용 활성을 갖는 폴리펩티드 또는 항체를 제공하는 것인, 폴리펩티드 또는 항체에 관한 것이다.
- [0013] 이론에 제한되지 않으면서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 항체는 세포 표면 상의 표적에 결합할 때 2종의 폴리펩티드 또는 항체 분자의 Fc 영역 사이에 안정한 결합 상호작용이 가능하여, 증진된 올리고머화, 예컨대 육량체 형성을 유도함으로써, 결합력 있는 표면을 제공하는 것으로 생각된다. 본 발명의 폴리펩티드 또는 항체는 추가로 Fc 영역에 임의의 돌연변이가 없는 그의 모 폴리펩티드 또는 모 항체, 즉 동일한 이소형의 모 폴리펩티드 또는 항체와 비교하여 증가된 Fc 이펙터 반응을 갖는다.
- [0014] 한 측면에서, 본 발명은 인간 이뮤노글로불린의 Fc 영역 및 항원 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체이며, 여기서 Fc 영역은 a) E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 적어도 1개의 Fc-Fc 증진 치환, 및 b) 적어도 1개의 C1q 결합 치환을 포함하고, 여기서 위치는 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1에 상응하는 것인 폴리펩티드 또는 항체를 제공한다 (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1969 May;63(1):78-85; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, 1991 NIH Publication No. 91-3242).
- [0015] 본 발명의 한 측면에서, 이뮤노글로불린의 Fc 영역 및 항원 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체이며, 여기서 Fc 영역은 a) E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 치환, 및 b) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환을 포함하고, 여기서 위치는 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1에 상응하는 것인 폴리펩티드 또는 항체를 제공한다.
- [0016] E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환에 상응하는 위치에서의 치환은 본 발명에 따른 Fc-Fc 증진 치환으로 간주된다.
- [0017] G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환은 본 발명에 따른 C1q 결합 치환으로 간주된다.
- [0018] 즉, 본 발명의 제1 측면에서 본 발명의 발명자들은 Fc-Fc 상호작용을 증진시키는 제1 돌연변이를 C1q 결합을 증진시키는 제2 돌연변이와 함께 도입하는 것이 효능작용 활성 및/또는 증진된 CDC를 갖는 폴리펩티드 또는 항체를 제공한다는 것을 발견하였다.
- [0019] 본 발명의 한 측면에서, 인간 이뮤노글로불린의 Fc 영역 및 항원 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체이며, 여기서 Fc 영역은 a) E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 치환, 및 b) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환을 포함하고, 여기서 위치는 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1에 상응하는 것인 폴리펩티드 또는 항체를 제공한다.
- [0020] 즉, 본 발명자들은 Fc-Fc 증진 돌연변이가 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 1개 이상의 C1q 결합 치환(들)과 함께 효능작용 활성을 제공할 수 있다는 것을 발견하였다.
- [0021] 본 발명자들은 추가로 Fc-Fc 증진 돌연변이가 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 1개 이상의 C1q 결합 치환(들)과 함께 증진된 Fc 매개된 이펙터 기능, 예컨대 증진된 CDC를 제공할 수 있다는 것을 발견하였다.
- [0022] 폴리펩티드 또는 항체에서의 Fc-Fc 증진 돌연변이와 C1q 결합 치환의 조합은 추가로 모 폴리펩티드 또는 모 항체와 비교할 때 효능작용 특성을 갖는 폴리펩티드 또는 항체를 생성시키는 놀라운 효과를 갖는다.
- [0023] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W 및 S440Y로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 치환을 포함한다.
- [0024] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430G, E430S, E430F 및 E430T로 이루어진 군으로부터 선

택된 적어도 1개의 치환을 포함한다.

- [0025] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345K, E345Q, E345R 및 E345Y로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 치환을 포함한다.
- [0026] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 적어도 E430G 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 적어도 E345K 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 적어도 S440Y 치환을 포함한다.
- [0027] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환을 포함한다.
- [0028] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326A, K326W, E333S, E333A 및 P396L로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치, 예컨대 2 또는 3개의 위치에서의 치환을 포함한다.
- [0029] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326A, K326W, E333S, E333A, E333T 및 P396L로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치, 예컨대 2 또는 3개의 위치에서의 치환을 포함한다.
- [0030] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 치환 K326W 및 E333S를 포함한다.
- [0031] 추가의 측면에서, 본 발명은 a) E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 치환을 도입하는 것, 및 b) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환을 도입하는 것을 포함하고, 여기서 위치는 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1에 상응하는 것인, 인간 IgG의 Fc 영역 및 항원 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.
- [0032] 추가의 측면에서, 본 발명은 a) E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 치환을 도입하는 것, 및 b) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환을 도입하는 것을 포함하고, 여기서 위치는 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1에 상응하는 것인, 인간 IgG의 Fc 영역 및 항원 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체의 CDC 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.
- [0033] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 적어도 1종의 폴리펩티드 또는 항체를 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0034] 또 다른 측면에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 폴리펩티드, 항체 또는 조성물에 관한 것이다.
- [0035] 또 다른 측면에서, 본 발명은 암, 자가면역 질환, 염증성 질환 또는 감염성 질환의 치료에 사용하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 폴리펩티드, 항체 또는 조성물에 관한 것이다.
- [0036] 또 다른 측면에서, 본 발명은 질환을 갖는 개체에게 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 폴리펩티드, 항체 또는 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 질환을 갖는 개체를 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0037] 본 발명의 이들 및 다른 측면, 특히 폴리펩티드 또는 항체에 대한 다양한 용도 및 치료적 적용이 하기에 보다 상세히 기재된다.

도면의 간단한 설명

- [0038] 도 1은 3-일 생존율 검정 (셀타이터-글로)에서 결정된 바와 같은 부착 인간 BxPC-3 췌장암 세포에 대한 항-DR5 항체 IgG1-hDR5-01-G56T (A), IgG1-hDR-05 (B) 및 항체 조합 (C)의 효능에 대한 E430G, K326A/E333A/P396L 및 K326A/E333A/P396L/E430G의 효과를 보여준다. 2가지 실험의 대표적인 예가 제시된다.
- 도 2는 3-일 생존율 검정 (셀타이터-글로)에서 결정된 바와 같은 부착 인간 BxPC-3 췌장 (A) 및 COLO 205 결장 (B) 암 세포에 대한 K326A/E333A/P396L/E430G를 갖는 1가 항-DR5 항체의 효능을 보여준다. 1가 항-DR5 항체로서, IgG1-hDR5-01-G56T로부터 유래된 하나의 DR5-특이적 아암 및 IgG1-b12로부터 유래된 HIV 단백질 gp120에 대한 하나의 비-특이적 아암을 갖는 이중특이적 항체를 제어된 Fab-아암 교환에 의해 생성하였다. 3가지 실험의 대표적인 예가 제시된다.
- 도 3은 3-일 생존율 검정 (셀타이터-글로)에서 결정된 바와 같은 부착 인간 BxPC-3 췌장암 (A) 및 COLO 205 결

장암 (B) 암 세포에 대한 및 ELISA 검정에서 결정된 바와 같은 C1q 결합 (C)에 대한 항-DR5 항체 IgG1-hDR5-01-G56T의 효능에 대한 K326A/E333A/P396L 또는 이들 치환 중 2개 E333A/P396L, K326A/E333A 또는 K326A/P396L 과 조합된 E430G의 효과를 보여준다. 3가지 실험의 대표적인 예가 제시된다.

도 4는 ELISA 검정에서 결정된 바와 같은 항-DR5 항체 IgG1-CONA-C49W에의 C1q 결합 (A)에 대한 및 3-일 생존율 검정 (셀타이터-글로)에서 결정된 바와 같은 부착 인간 BxPC-3 췌장암 (B) 및 COLO 205 결장암 (C) 암 세포에 대한 항-DR5 항체 IgG1-hDR5-01-G56T의 효능에 대한 K326A/E333A 또는 K326W/E333S와 조합된 E430G의 효과를 보여준다. 3가지 실험의 대표적인 예가 제시된다.

도 5는 ELISA 검정에서 결정된 바와 같은 항-DR5 항체 IgG1-hDR5-01-G56T에의 C1q 결합 (A)에 대한 및 3-일 생존율 검정 (셀타이터-글로)에서 결정된 바와 같은 부착 인간 BxPC-3 췌장 (B) 및 COLO 205 결장 (C) 암 세포에 대한 항-DR5 항체 IgG1-hDR5-01-G56T의 효능에 대한 C1q 결합 치환 S267E/H268F/S324T 또는 IgG1/IgG3 키메라 이소형 IgG1 변이체 113F와 조합된 E430G의 효과를 보여준다. 3가지 실험의 대표적인 예가 제시된다.

도 6은 나타낸 돌연변이를 함유하는 10 µg/mL IgG1-hDR5-01-G56T 변이체를 사용한 부착 인간 BxPC-3 췌장암 세포에 대한 3-일 생존율 검정 (셀타이터-글로)의 요약을 보여준다. 효과는 100%로 설정된 WT IgG1-hDR5-01-G56T 대비 생존 세포 백분율에 의해 나타내어지고 등급화된다. WT와 비교하여 세포 생존율에 대한 유의한 효과는 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001로 나타낸다 (일원 ANOVA와 던넛 다중 비교 검정).

도 7은 24-시간 생존율 검정에서 결정된 바와 같은 2.5 µg/mL의 정제된 인간 C1q의 존재 또는 부재 하에 무혈청 배지 내 WIL2-S SF 현탁 세포에 대한 항-DR5 항체 IgG1-CONA-C49W-K326A/E333A/P396L/E430G (A) 및 IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G (B)의 효능작용 효과를 보여준다. 생존 세포 백분율은 TO-PRO-3-음성 세포 백분율에 의해 나타내어진다.

도 8은 24-시간 생존율 검정에서 결정된 바와 같은 일련의 농도의 정제된 인간 C1q의 존재 또는 부재 하에 무혈청 배지 내 WIL2-S SF 현탁 세포에 대한, C1q 결합 치환과 조합하여 Fc-Fc 증진 치환 E430G를 갖는 IgG1-hDR5-01-G56T의 2.5 µg/mL 항-DR5 항체 변이체 (A) 및 항체 조합 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G (B)의 효능작용 효과를 보여준다. 생존 세포 백분율은 TO-PRO-3-음성 세포 백분율에 의해 나타내어진다. 4가지 상이한 실험의 데이터는 표준 편차를 나타내는 오차 막대와 함께 나타내어진다.

도 9는 24-시간 생존율 검정에서 결정된 바와 같은 정제된 인간 C1q 및 항-C1q 중화 항체의 존재 또는 부재 하에 무혈청 배지 내 WIL2-S SF 현탁 세포에 대한 2.5 µg/mL 효능작용 항-DR5 IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G (A) 및 항체 조합 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G (B)의 효능을 보여준다. 생존 세포 백분율은 TO-PRO-3-음성 세포 백분율에 의해 나타내어진다.

도 10은 C1q 결합 치환 K326W/E333S, K326A/E333A 또는 K326A/E333A/P396L과 조합하여 Fc-Fc 증진 치환 430G를 함유하는 IgG1-hDR5-01-G56T 항체 변이체에 대한, NHS에서 항체 샘플을 인큐베이션하였을 때의 C4d 침착의 정량화에 의해 측정된 바와 같은 용액 상 보체 활성화를 보여준다. HAGG (열 응집된 감마 글로불린) 및 IgG1-CONA-RGY를 용액 상 보체 활성화에 대한 양성 대조군으로서 시험하였다.

도 11은 ELISA 검정에서 결정된 바와 같은 C1q 결합 (A,B), 유동 세포측정법에 의해 결정된 바와 같은 DR5-양성 WIL2-S SF 세포에 결합된 항체에의 C1q 결합 (C,D) 및 3-일 생존율 검정 (셀타이터-글로)에서 결정된 바와 같은 WIL2-S SF 현탁 세포의 세포 생존율 감소 (E,F,G)에 대한 IgG-CONA-C49W 및 IgG1-CONA-C49W-E430G 내 K326W, E333S 또는 K326W/E333S 치환 도입의 효과를 보여준다. 표준 편차는 2가지 독립적 실험으로부터 계산하였다.

도 12는 24-시간 생존율 검정에서 결정된 바와 같은 일련의 농도의 정제된 인간 C1q의 존재 하에 무혈청 배지 내 WIL2-S SF 현탁 세포의 생존율에 대한 IgG-CONA-C49W 및 IgG1-CONA-C49W-E430G (2.5 µg/mL) 내로의 K326W, E333S 또는 K326W/E333S 치환 도입의 효과를 보여준다. 생존 세포 백분율을 셀타이터-글로 검정에서 결정하였다.

도 13은 정제된 인간 C1q가 보충된 무혈청 배지 내 WIL2-S SF 현탁 세포에 대한 24-시간 생존율 검정에서 C1q 결합-증진 및/또는 Fc-Fc 상호작용-증진 돌연변이를 갖는 항-DR5 IgG1-CONA-C49W 항체 변이체의 효능에 대한 항-C1q 항체 첨가의 효과를 보여준다. 생존 세포 백분율을 셀타이터-글로 검정에서 결정하였다.

도 14는 24-시간 생존율 검정에서 정제된 인간 C1q가 보충된 무혈청 배지에서 인큐베이션된 WIL2-S SF 현탁 세포에 흡소닌화된 항-DR5 IgG1-CONA-C49W 항체 변이체 사이의 Fc-Fc 상호작용을 억제하는 펩티드 첨가의 효과를 보여준다. 생존 세포 백분율을 셀타이터-글로 검정에서 결정하였다. 스크램블링된 펩티드 WCDLEGVTWHACL을 비

-특이적 대조군 펩티드로서 사용하였다.

도 15는 3-일 생존율 검정 (셀타이터-글로)에서 결정된 바와 같은 부착 인간 BxPC-3 체장암 세포에 대한 항-DR5 항체 IgG1-CONA-C49W의 효능제 활성화에 대한 C1q 결합 치환 K326W/E333S와 Fc-Fc-증진 돌연변이 E345K, E345R 또는 S440Y와의 조합의 효과를 보여준다.

도 16은 3-일 생존율 검정 (셀타이터-글로)에서 결정된 바와 같은 부착 인간 BxPC-3 체장암 세포의 생존율에 대한, 항-DR5 항체 IgG1-CONA-C49W 내로 도입된 C1q 결합-증진 돌연변이 S267E/H268F/S324T 또는 IgG1/IgG3 키메라 이소형 IgG1 변이체 113F와 조합된 돌연변이 E430G의 효과를 보여준다.

도 17은 1-일 생존율 검정 (셀타이터-글로)에서 결정된 바와 같은 WIL2-S SF 현탁 세포의 생존율에 대한 K326W/E333S/E430G 돌연변이를 갖는 기능적 1가 항-DR5 항체의 효과를 보여준다. IgG1-CONA-C49W-F405L-K326W/E333S/E430G (DR5-특이적 아암) 및 IgG1-b12-K409R-K326W/E333S/E430G (HIV 단백질 gp120에 대해 지시된 비-특이적 아암)의 제어된 Fab-아암 교환에 의해 이중특이적 항체로서 기능적 1가 항-DR5 항체를 생성하였다. RLU: 상대 발광 단위.

도 18은 WIL2-S SF 세포에 대한 1-일 생존율 검정 (A) 및 BxPC-3 (B), HPAF-II (C) 및 HT-29 세포 (D)에 대한 3-일 생존율 검정에서 결정된 바와 같은 항-DR5 항체의 IgG1 및 IgG3 이소형 변이체 (IgG1-CONA-C49W 및 IgG3-CONA-C49W-R345H)의 효능제 활성화에 대한 K326W/E333S/E430G 치환 도입의 효과를 보여준다. 셀타이터-글로 키트를 사용하여 생존율을 결정하였다.

도 19는 24-시간 생존율 검정 (셀타이터글로)에서 결정된 바와 같은 WIL2-S 현탁 세포에 대한 항-DR5 항체 IgG1-CONA-C49W 내의 E430G 육량체화-증진 돌연변이 및 C1q 결합-증진 돌연변이 K326W/E333T 또는 K326W/E333S 둘 다의 도입의 효과를 보여준다.

도 20은 SCID 마우스에서 450 µg i.v. 투여된 항체의 클리어런스율을 보여준다. (A) 혈청 샘플 내의 총 인간 IgG를 ELISA에 의해 결정하고 농도 대 시간 곡선에 플롯팅하였다. 각각의 데이터 포인트는 삼중 샘플의 평균 +/- 표준 편차를 나타낸다. (B) 항체 투여 후 제21일까지의 클리어런스를 식 $D \times 1.000 / AUC$ 에 따라 결정하였으며, 여기서 D는 주사된 용량이고, AUC는 농도-시간 곡선의 곡선하 면적이다. 2가지 독립적 ELISA 실험의 대표적인 예가 제시된다.

도 21은 pH 6.0 및 7.4에서 코팅된 FcRnECDHis-B2M-B10를 사용한 ELISA에 의해 결정된 바와 같은, 인간 FcRn에의 IgG1-7D8 항체 변이체의 결합에 대한 C1q 결합-증진 돌연변이 (K326A/E333A 또는 K326W/E333S)와 조합된 Fc-Fc-증진 돌연변이 E430G의 효과를 보여준다. IgG1-7D8-I235A/H310A/H435A를 pH 6.0에서 FcRn 결합에 대한 음성 대조군 (FcRn 녹아웃)으로서 사용하였고; IgG1-7D8-M252Y/S254T/T256E를 pH 7.4에서 증진된 FcRn 결합에 대한 대조군으로서 사용하였다.

도 22는 정제된 인간 C1q가 첨가된 및 첨가되지 않은 무혈청 배지 내 표적 세포로서의 WIL2-S SF 및 이펙터 세포로서의 인간 PBMC (3명의 공여자) (E:T 비 100:1)를 사용한 크로뎀-방출 ADCC 검정을 보여준다. C1q의 부재 및 존재 하에, 크로뎀-표지된 WIL2-S SF 세포를 일련의 농도의 항체와 함께 인큐베이션하여 IgG1-7D8-F405L-K326W/E333S/E430G의 ADCC 활성을 IgG1-7D8-E430G 및 WT IgG1-7D8의 경우와 비교하였다. 비-특이적 항체 IgG1-b12를 음성 대조군으로서 사용하였다.

도 23은 24-시간 생존율 검정 (셀타이터글로)에서 결정된 바와 같은 WIL2-S SF 현탁 세포에 대한 항-DR5 항체 IgG1-hDR5-01-G56T 및 IgG1-hDR5-05의 효능작용 활성화에 대한 K326W/E333S/E430G의 효과를 보여준다.

도 24는 24-시간 생존율 검정 (셀타이터글로)에서 결정된 바와 같은 WIL2-S SF 현탁 세포에 대한 항-DR5 이중 에피토프 표적화 항체 조합 IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G + IgG1-hDR5-05-K326W/E333S/E430G의 효능작용 활성화에 대한 상보적 Fc 돌연변이 쌍 K439E; S440K의 효과를 보여준다.

도 25는 육량체화-증진 돌연변이 E430G 또는 K248E/T437R, 및 C1q 결합-증진 돌연변이 K326W/E333S와 조합된 육량체화-증진 돌연변이 K248E/T437R을 갖는 IgG1-캄파트 항체 변이체를 시험한 Wien 133 세포에 대한 CDC 검정의 결과를 보여준다. Wien 133 세포를 20% 풀링된 정상 인간 혈청 (NHS)의 존재 하에 일련의 농도의 항체 변이체와 함께 인큐베이션하였다.

도 26은 3-일 생존율 검정 (셀타이터-글로)에서 결정된 바와 같은 부착 인간 BxPC-3 체장암 세포에 대한 항-DR4 항체 IgG1-DR4-chCTB007의 효능에 대한 육량체화-증진 돌연변이 E430G와 C1q 결합-증진 돌연변이 K326W/E333S

의 조합의 효과를 보여준다.

도 27은 20% 정상 인간 혈청의 존재 하에 항-FAS 항체 IgG1-FAS-E09 (A), IgG1-CD95-AP01 (B) 및 IgG1-CD95-HFE7A (C)의 변이체와 함께 WIL2S SF 인간 B 림프구를 사용한 CDC 검정을 보여준다. WIL2-S SF 세포를 20% 풀링된 정상 인간 혈청 (NHS)의 존재 하에 일련의 농도의 항체 변이체와 함께 45분 동안 인큐베이션하였다. IgG1-b12를 비-결합 대조군 항체로서 사용하였다.

도 28은 C1q가 없는 무혈청 배지에서 항-FAS 항체 IgG1-FAS-E09 (A), IgG1-CD95-AP01 (B) 및 IgG1-CD95-HFE7A (C)의 변이체와 함께 인큐베이션된 WIL2-S SF 세포를 사용한 45-분 생존율 검정 (셀타이터-글로)을 보여준다.

도 29는 가교체로서 C1q를 갖는 무혈청 배지에서 항-FAS 항체 IgG1-FAS-E09 (A), IgG1-CD95-AP01 (B) 및 IgG1-CD95-HFE7A (C)의 변이체와 함께 WIL2-S SF 세포를 사용한 24-시간 생존율 검정 (셀타이터-글로)을 보여준다.

도 30은 C1q가 없는 무혈청 배지에서 항-FAS 항체 IgG1-FAS-E09 (A), IgG1-CD95-AP01 (B) 및 IgG1-CD95-HFE7A (C)의 변이체와 함께 인큐베이션된 WIL2-S SF 세포를 사용한 24-시간 생존율 검정 (셀타이터-글로)을 보여준다.

도 31은 OX40 Jurkat 리포터 검정에서 IgG1-CD134-SF2 (WT), IgG1-CD134-SF2-E345R, IgG1-CD134-SF2-E430G 및 IgG1-CD134-SF2-K326W/E333S/E430G 항체의 활성을 보여준다. 쏘-앤-유즈 글로리스판스(Thaw-and-Use GloResponse) NF κ B-luc2/OX40 Jurkat 세포를 8% 태아 소 혈청의 존재 하에 소정 농도 범위의 항체와 함께 5시간 동안 인큐베이션하였다. 루시페라제 리포터 유전자의 발현을 유도하는 항-OX40 항체에 의한 OX40의 자극 후 검출된 발광에 의해 OX40 검정 반응을 기록하였다. RLU: 상대 발광 단위.

도 32는 IgG1-CD40-SGN40 및 IgG1-CD40-CP870893의 CD40 반응에 대한 C1q 결합-증진 돌연변이 K326W/E333S와 조합된 Fc-Fc-증진 돌연변이 E430G의 효과를 보여준다. 쏘-앤-유즈 글로리스판스 NF κ B-luc2/CD40 Jurkat 세포를 8% 태아 소 혈청의 존재 하에 소정 농도 범위의 항체와 함께 5시간 동안 인큐베이션하였다. 루시페라제 리포터 유전자의 발현을 유도하는 항-CD40 항체 또는 CD40 리간드에 의한 CD40의 자극 후 검출된 발광에 의해 CD40 검정 반응을 기록하였다. RLU: 상대 발광 단위.

도 33은 IgG1-CD137-MOR7480 및 IgG1-BMS-663513의 4-1BB 반응에 대한 C1q 결합-증진 돌연변이 K326W/E333S와 조합된 Fc-Fc-증진 돌연변이 E430G의 효과를 보여준다. 쏘-앤-유즈 글로리스판스™ NF κ B-luc2/4-1BB Jurkat 세포를 1% 태아 소 혈청의 존재 하에 소정 농도 범위의 항체와 함께 5시간 동안 인큐베이션하였다. 루시페라제 리포터 유전자의 발현을 유도하는 항-4-1BB 항체 또는 4-1BB 리간드와 항-His 항체에 의한 4-1BB의 자극 후 검출된 발광에 의해 4-1BB 검정 반응을 기록하였다. IgG-b12-K326W/E333S/E430G를 음성 대조군으로서 사용하였다. RLU: 상대 발광 단위.

도 34는 IgG1-GITR-INCAGN01876의 GITR 반응에 대한 C1q 결합-증진 돌연변이 K326W/E333S와 조합된 Fc-Fc-증진 돌연변이 E430G의 효과를 보여준다. 쏘-앤-유즈 글로리스판스 NF κ B-luc2/GITR Jurkat 세포를 1% 태아 소 혈청의 존재 하에 소정 농도 범위의 항체와 함께 6시간 동안 인큐베이션하였다. 루시페라제 리포터 유전자의 발현을 유도하는 항-GITR 항체에 의한 GITR의 자극 후 검출된 발광에 의해 GITR 검정 반응을 기록하였다. RLU: 상대 발광 단위.

도 35는 하위부류 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 항체 GITR-36E5의 GITR 반응에 대한 C1q 결합-증진 돌연변이 K326W/E333S와 조합된 Fc-Fc-증진 돌연변이 E430G의 효과를 보여준다. 쏘-앤-유즈 글로리스판스 NF κ B-luc2/GITR Jurkat 세포를 1% 태아 소 혈청의 존재 하에 최종 농도 111 ng/mL의 항체와 함께 6시간 동안 인큐베이션하였다. 루시페라제 리포터 유전자의 발현을 유도하는 항-GITR 항체에 의한 GITR의 자극 후 검출된 발광에 의해 GITR 검정 반응을 기록하였다. 항체 IgG1-b12를 비-결합 대조군으로서 사용하였다. RLU: 상대 발광 단위.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 본 발명의 실시양태를 기재하는데 있어서, 명확성을 위해 특정 용어가 사용될 것이다. 그러나, 본 발명은 그렇게 선택된 특정 용어로 제한되는 것으로 의도되지 않으며, 각각의 특정 용어가 유사한 목적을 달성하기 위해 유사한 방식으로 작동하는 모든 기술적 등가물을 포함하는 것으로 이해된다.

[0040] 정의

[0041] 용어 "모 폴리펩티드" 또는 "모 항체"는 본 발명에 따른 폴리펩티드 또는 항체와 동일하지만 본 발명에 따른 Fc-Fc 증진 돌연변이 및 C1q 결합 돌연변이를 갖지 않는 폴리펩티드 또는 항체로서 이해되어야 한다.

- [0042] 용어 "이뮤노글로불린의 Fc-영역 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드"는 본 발명의 문맥에서 이뮤노글로불린의 Fc-영역, 및 예를 들어 세포, 박테리아 또는 비리온 상에 존재하는 임의의 분자, 예컨대 폴리펩티드에 결합할 수 있는 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 이뮤노글로불린의 Fc-영역은 이뮤노글로불린의 2개의 CH2-CH3 영역 및 연결 영역, 예를 들어 힌지 영역을 포함하는, 전형적으로 파과인에 의한 항체의 소화 (이는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지됨) 후에 생성되는 항체의 단편으로서 정의된다. 항체 중쇄의 불변 도메인은 항체 이소형, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD 또는 IgE를 규정한다. Fc-영역은 Fc 수용체로 불리는 세포 표면 수용체 및 보체계의 단백질에 대한 항체의 이펙터 기능을 매개한다. 결합 영역은 세포, 박테리아 또는 비리온에 결합할 수 있는 폴리펩티드 서열, 예컨대 단백질, 단백질 리간드, 수용체, 항원-결합 영역 또는 리간드-결합 영역일 수 있다. 결합 영역이, 예를 들어 수용체인 경우, "이뮤노글로불린의 Fc-영역 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드"는 이뮤노글로불린의 Fc-영역과 상기 결합 영역의 융합 단백질로서 제조될 수 있다. 결합 영역이 항원-결합 영역인 경우, "이뮤노글로불린의 Fc-영역 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드"는 항체, 예컨대 키메라, 인간화 또는 인간 항체, 또는 중쇄 단독 항체 또는 ScFv-Fc-융합체일 수 있다. 이뮤노글로불린의 Fc-영역 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드는 전형적으로 연결 영역, 예를 들어 힌지 영역, 및 이뮤노글로불린의 중쇄의 2개의 CH2-CH3 영역을 포함할 수 있고, 따라서, "이뮤노글로불린의 Fc-영역 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드"는 "적어도 이뮤노글로불린의 Fc-영역 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드"일 수 있다. 용어 "이뮤노글로불린의 Fc-영역"은 본 발명의 문맥에서, 연결 영역, 예를 들어 항체의 하위 유형에 따른 힌지, 및 이뮤노글로불린의 CH2 및 CH3 영역이 존재하는 것을 의미하며, 예를 들어 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgGA2, IgM 또는 IgE이다. 폴리펩티드는 인간 기원으로 제한되는 것이 아니라, 임의의 기원, 예컨대, 예를 들어 마우스 또는 시노몰구스 기원의 것일 수 있다. 용어 "야생형 Fc 영역"은 본 발명의 문맥에서 자연에서 발생하는 아미노산 서열을 갖는 이뮤노글로불린 Fc 영역을 의미한다.
- [0043] 본원에 사용된 용어 "힌지 영역"은 이뮤노글로불린 중쇄의 힌지 영역을 지칭하는 것으로 의도된다. 따라서, 예를 들어 인간 IgG1 항체의 힌지 영역은 EU 넘버링에 따른 아미노산 216-230에 상응한다.
- [0044] 본원에 사용된 용어 "CH2 영역" 또는 "CH2 도메인"은 이뮤노글로불린 중쇄의 CH2 영역을 지칭하는 것으로 의도된다. 따라서, 예를 들어 인간 IgG1 항체의 CH2 영역은 EU 넘버링에 따른 아미노산 231-340에 상응한다. 그러나, CH2 영역은 또한 본원에 기재된 바와 같은 임의의 다른 하위유형일 수 있다.
- [0045] 본원에 사용된 용어 "CH3 영역" 또는 "CH3 도메인"은 이뮤노글로불린 중쇄의 CH3 영역을 지칭하는 것으로 의도된다. 따라서, 예를 들어 인간 IgG1 항체의 CH3 영역은 EU 넘버링에 따른 아미노산 341-447에 상응한다. 그러나, CH3 영역은 또한 본원에 기재된 바와 같은 임의의 다른 하위유형일 수 있다.
- [0046] 용어 "이뮤노글로불린"은 한 쌍의 저분자량 경쇄 (L) 및 한 쌍의 중쇄 (H)인 2쌍의 폴리펩티드 쇠로 이루어져 있으며, 4개 모두가 디설피드 결합에 의해 잠재적으로 상호연결된, 구조적으로 관련된 당단백질의 부류를 지칭한다. 이뮤노글로불린의 구조는 잘 특징화되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))]을 참조한다. 간략하게, 각각의 중쇄는 전형적으로 중쇄 가변 영역 (본원에서 VH로서 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 전형적으로 3개의 도메인 CH1, CH2 및 CH3으로 구성된다. 중쇄는 소위 "힌지 영역"에서 디설피드 결합을 통해 상호연결된다. 각각의 경쇄는 전형적으로 경쇄 가변 영역 (본원에서 VL로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 전형적으로 1개의 도메인 CL로 구성된다. VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역 (FR)으로 지칭되는 보다 보존된 영역들 사이에 삽입된, 상보성 결정 영역 (CDR)으로도 지칭되는 초가변성의 영역 (또는 구조적으로 규정된 루프의 서열 및/또는 형태에서 초가변성일 수 있는 초가변 영역)으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 전형적으로 아미노-말단으로부터 카르복시-말단으로 하기 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (또한 문헌 [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196, 901 917 (1987)] 참조). 달리 언급되지 않거나 문맥에 의해 모순되지 않는 한, 본원에서의 CDR 서열은 도메인갭얼라인 (DomainGapAlign)을 사용하여 IMGT 규칙에 따라 확인된다 (Lefranc MP., Nucleic Acids Research 1999;27:209-212 및 Ehrenmann F., Kaas Q. and Lefranc M.-P. Nucleic Acids Res., 38, D301-307 (2010); 또한 인터넷 http 주소 www.imgt.org/ 참조). 달리 언급되지 않거나 문맥에 의해 모순되지 않는 한, 본 발명에서의 Fc 영역 /Fc 도메인 내의 아미노산 위치에 대한 언급은 EU-넘버링에 따른다 (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1969 May;63(1):78-85; Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - 1991 NIH Publication No. 91-3242).
- [0047] 본 발명의 문맥에서 용어 "항체" (Ab)는 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 이뮤노글로불린 분자, 이뮤노글로불린 분자의 단편, 또는 이 중 어느 하나의 유도체를 지칭한다. 본 발명의 항체는 이뮤노글로불린의 Fc-도

메인 및 항원-결합 영역을 포함한다. 항체는 일반적으로 2개의 CH2-CH3 영역 및 연결 영역, 예를 들어 힌지 영역, 예를 들어 적어도 Fc-도메인을 함유한다. 따라서, 본 발명의 항체는 Fc 영역 및 항원-결합 영역을 포함할 수 있다. 이뮤노글로불린 분자의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 또는 "Fc" 영역은 숙주 조직 또는 인자 (면역계의 다양한 세포 (예컨대 이펙터 세포) 포함) 및 보체계의 성분, 예컨대 C1q (보체 활성화의 전형적 경로에서의 제1 성분)에 대한 이뮤노글로불린의 결합을 매개할 수 있다. 항체는 또한 다중특이적 항체, 예컨대 이중특이적 항체 또는 유사한 분자일 수 있다. 용어 "이중특이적 항체"는 적어도 2개의 상이한 에피토프, 전형적으로 비-중첩 에피토프에 대해 특이성을 갖는 항체를 지칭한다. 이러한 에피토프는 동일한 또는 상이한 표적 상에 존재할 수 있다. 에피토프가 상이한 표적 상에 존재하는 경우에, 이러한 표적은 동일한 세포 또는 상이한 세포 또는 세포 유형 상에 존재할 수 있다. 상기 나타낸 바와 같이, 달리 언급되거나 문맥상 명백하게 모순되지 않는 한, 본원에서의 용어 항체는 Fc-영역의 적어도 한 부분을 포함하고 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 단편을 포함한다. 이러한 단편은 임의의 공지된 기술, 예컨대 효소적 절단, 펩티드 합성 및 재조합 발현 기술에 의해 제공될 수 있다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 나타났다. 용어 "Ab" 또는 "항체" 내에 포괄되는 결합 단편의 예는, 제한 없이, 1가 항체 (WO2007059782 (젠맵(Genmab))에 기재됨); 단지 2개의 중쇄로 이루어지고 예를 들어 낙타류에서 자연 발생하는 중쇄 항체 (예를 들어, Hamers-Casterman (1993) Nature 363:446); 티오맵 (로슈(Roche), WO2011069104), 비대칭이고 이중특이적 항체-유사 분자인 가닥-교환 조작된 도메인 (SEED 또는 시드-바디) (머크(Merck), WO2007110205); 트리오맵 (파마/프레제니우스 바이오테크(Pharma/Fresenius Biotech), Lindhofer et al. 1995 J Immunol 155:219; WO2002020039); Fc Δ Adp (레게네론(Regeneron), WO2010151792), 비대칭 스캐폴드 (자임웍스(Zymeworks)/머크, WO2012/058768), mAb-Fv (젠코르(Xencor), WO2011/028952), Xmap (젠코르), 이중 가변 도메인 이뮤노글로불린 (애보트(Abbott), DVD-Ig, 미국 특허 번호 7,612,181); 이중 도메인 이중 헤드 항체 (유니레버(Unilever)); 사노피 아벤티스(Sanofi Aventis), WO20100226923), 디-디아바디 (임클론(ImClone)/일라이 릴리(Eli Lilly)), 노브-인투-홀 항체 포맷 (제넨테크(Genentech), WO9850431); 듀오바디 (젠맵, WO 2011/131746); 이중특이적 IgG1 및 IgG2 (화이자(Pfizer)/리나트(Rinat), WO11143545), 듀엣맵 (메드이문(MedImmune), US2014/0348839), 정전기적 스티어링 항체 포맷 (암젠(Amgen), EP1870459 및 WO 2009089004; 츠가이(Chugai), US201000155133; 온코메드(Oncomed), WO2010129304A2); 이중특이적 IgG1 및 IgG2 (리나트 뉴로사이언시스 코퍼레이션(Rinat neurosciences Corporation), WO11143545), 크로스맵 (로슈, WO2011117329), LUZ-Y (제넨테크), 비클로닉 (메루스(Merus), WO2013157953), 이중 표적화 도메인 항체 (GSK/도만티스(Domantis)), 2종의 표적을 인식하는 투-인-원 항체 또는 이중 작용 Fab (제넨테크, 노브이문(NovImmune), 아디맵), 가교된 Mab (카르마노스 암 센터(Karmanos Cancer Center)), 공유 융합된 mAb (AIMM), CovX-바디 (CovX/화이자), 피노맵 (코바젠(Covagen)/얀센 실라그(Janssen Cilag)), 듀타맵 (두탈리스(Dutalys)/로슈), iMab (메드이문), IgG-유사 이중특이적 (임클론/일라이 릴리, Shen, J., et al. J Immunol Methods, 2007. 318(1-2): p. 65-74), TIG-바디, DIG-바디 및 PIG-바디 (파맵신(Pharmabcine)), 이중-친화성 재표적화 분자 (Fc-DART 또는 Ig-DART, 마크로제닉스(Macrogenics), WO/2008/157379, WO/2010/080538), BEAT (글렌마크(Glenmark)), 지바디 (진제니아(Zyngenia)), 공통 경쇄 (크루셀(Crucell)/메루스, US7262028) 또는 공통 중쇄 (κ λ 바디, 노브이문, WO2012023053)를 사용한 접근법, 뿐만 아니라 Fc-영역 함유 항체 단편에 융합된 폴리펩티드 서열을 포함하는 융합 단백질, 예컨대 scFv-융합체, 예컨대 BsAb (지모제네틱스(ZymoGenetics)/BMS), 허클레스 (비오젠 아이텍(Biogen Idec) (US007951918)), 스킵온스 (에멀전트 바이오솔루션즈(Emergent BioSolutions)/트루비온(Trubion) 및 지모제네틱스(BMS), Ts2Ab (메드이문/AZ (Dimasi, N., et al. J Mol Biol, 2009. 393(3): p. 672-92)), scFv 융합체 (제넨테크/로슈), scFv 융합체 (노파르티스(Novartis)), scFv 융합체 (이뮤노메딕스(Immunomedics)), scFv 융합체 (창저우 아담 바이오 테크 인크(Changzhou Adam Biotech Inc) (CN 102250246)), TvAb (로슈 (WO 2012025525, WO 2012025530)), mAb² (f-스타(f-Star) (WO2008/003116)), 및 이중 scFv-융합체를 포함한다. 또한, 달리 명시되지 않는다면, 용어 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 (예컨대 인간 모노클로날 항체), 항체 혼합물 (재조합 폴리클로날), 예를 들어 심포젠(Symphogen) 및 메루스 (올리고클로닉스(Oligoclomics))에 의해 개발된 기술에 의해 생성된 것, WO2015/158867에 기재된 바와 같은 다량체 Fc 단백질, WO2014/031646에 기재된 바와 같은 융합 단백질, 및 항체-유사 폴리펩티드, 예컨대 키메라 항체 및 인간화 항체를 또한 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 생성된 항체는 잠재적으로 임의의 이소형을 가질 수 있다.

[0048] 본원에 사용되는 경우 용어 "전장 항체"는 그 이소형의 야생형 항체에서 정상적으로 발견되는 것에 상응하는 모든 중쇄 및 경쇄 불변 및 가변 도메인을 함유하는 항체 (예를 들어, 모 항체)를 지칭한다.

[0049] 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항

체를 포함하는 것으로 의도된다. 본 발명의 인간 항체는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관내에서 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이유발에 의해 또는 생체내에서 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이, 삽입 또는 결실)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 또 다른 포유동물 중, 예컨대 마우스의 배선으로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 상에 그라프팅된 항체는 포함하지 않는 것으로 의도된다.

[0050] 본원에 사용된 용어 "키메라 항체"는쇄 유형 둘 다, 즉 중쇄 및 경쇄가 항체 조각의 결과로서 키메라인 항체를 지칭한다. 키메라쇄는 인간 기원의 불변 영역에 연결된 외인성 가변 도메인 (비-인간 종으로부터 기원하거나, 또는 인간을 포함한 임의의 종으로부터 합성되거나 조작됨)을 함유하는 쇠이다.

[0051] 본원에 사용된 용어 "인간화 항체"는쇄 유형 둘 다가 항체 조각의 결과로서 인간화된 것인 항체를 지칭한다. 인간화쇄는 전형적으로 가변 도메인의 상보성 결정 영역 (CDR)이 외인성 (인간 이외의 종으로부터 기원하거나, 또는 합성됨)인 반면에 나머지쇄는 인간 기원인 것인 쇠이다. 인간화 평가는 사용된 그라프팅 이외의 프로토콜을 허용하는 방법 자체가 아니라, 생성된 아미노산 서열을 기초로 한다.

[0052] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체", "모노클로날 Ab", "모노클로날 항체 조성물", "mAb" 등은 단일 분자 조성의 Ab 분자의 제제를 지칭한다. 모노클로날 항체 조성물은 특정한 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다. 따라서, 용어 "인간 모노클로날 항체"는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는, 단일 결합 특이성을 나타내는 Ab를 지칭한다. 인간 mAb는 기능적 인간 항체를 생성하도록 재배열되고 불멸화 세포에 융합된, 인간 중쇄 트랜스젠 레퍼토리 및 경쇄 트랜스젠 레퍼토리를 포함하는 게놈을 갖는 트랜스제닉 또는 트랜스크로모소말 비-인간 동물, 예컨대 트랜스제닉 마우스로부터 수득된 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생성될 수 있다.

[0053] 본원에 사용된 용어 "이소형"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩되는 이뮤노글로불린 부류 (예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgGA2, IgE 또는 IgM 또는 그의 임의의 동종이형, 예컨대 IgG1m(za) 및 IgG1m(f))를 지칭한다. 추가로, 각각의 중쇄 이소형은 카파 (κ) 또는 람다 (λ) 경쇄와 조합될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "혼합 이소형"은 하나의 이소형과 또 다른 이소형으로부터의 유사한 영역의 구조적 특색을 조합하여 하이브리드 이소형을 생성함으로써 생성된 이뮤노글로불린의 Fc 영역을 지칭한다. 혼합 이소형은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgGA2, IgE 또는 IgM으로부터 선택된 2종 이상의 이소형으로 구성된 서열을 갖는 Fc 영역을 포함할 수 있고, 이에 의해, 예를 들어 IgG1/IgG3, IgG1/IgG4, IgG2/IgG3, IgG2/IgG4 또는 IgG1/IgA와 같은 조합을 생성할 수 있다.

[0054] 본원에 사용된 용어 "항원-결합 영역", "항원 결합 영역", "결합 영역" 또는 항원 결합 도메인은 항원에 결합할 수 있는 항체의 영역을 지칭한다. 이 결합 영역은 전형적으로 프레임워크 영역 (FR)으로 지칭되는 보다 보존된 영역들 사이에 삽입된, 상보성 결정 영역 (CDR)으로도 지칭되는 추가변성의 영역 (또는 구조적으로 규정된 루프의 서열 및/또는 형태에서 추가변성될 수 있는 추가변 영역)으로 추가로 세분될 수 있는 항체의 VH 및 VL 도메인에 의해 규정된다. 항원은, 예를 들어 세포, 박테리아 또는 비리온 상에 존재하는 임의의 분자, 예컨대 폴리펩티드일 수 있다.

[0055] 본원에 사용된 용어 "표적"은 항체의 항원 결합 영역이 결합하는 분자를 지칭한다. 표적은 생성된 항체가 지시되는 임의의 항원을 포함한다. 용어 "항원" 및 "표적"은 항체와 관련하여 상호교환가능하게 사용될 수 있고, 본 발명의 임의의 측면 또는 실시양태에서 동일한 의미 및 목적을 구성할 수 있다.

[0056] 용어 "에피토프"는 항체 가변 도메인에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정기를 의미한다. 에피토프는 통상적으로 분자, 예컨대 아미노산, 당 측쇄 또는 그의 조합의 표면 그룹핑으로 이루어지고, 통상적으로 특이적인 3-차원 구조적 특징, 뿐만 아니라 특이적인 전하 특징을 갖는다. 입체형태적 및 비-입체형태적 에피토프는 전자에 대한 결합이 변성 용매의 존재 하에 상실되지만 후자의 경우는 그렇지 않다는 점에서 구별된다. 에피토프는 결합에 직접 관여하는 아미노산 잔기 (에피토프의 면역우성 성분으로도 불림) 및 결합에 직접 관여하지 않는 다른 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.

[0057] 본 발명의 "변이체" 또는 "항체 변이체" 또는 "모 항체의 변이체"는 "모 항체"와 비교하여 1개 이상의 돌연변이를 포함하는 항체 분자이다. 상이한 용어가 교환가능하게 사용될 수 있고, 본 발명의 임의의 측면 또는 실시양태에서 동일한 의미 및 목적을 구성할 수 있다. 예시적인 모 항체 형태는, 제한 없이, 야생형 항체, 전장 항체 또는 Fc-함유 항체 단편, 이중특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체 또는 그의 임의의 조합을 포함한다. 유사하게, 본 발명의 "폴리펩티드" 또는 "이뮤노글로불린의 Fc-영역 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩

티드의 변이체" 또는 "이뮤노글로불린의 Fc-영역 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 변이체"는 "이뮤노글로불린의 Fc-영역 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드"와 비교하여 1개 이상의 돌연변이를 포함하는 "이뮤노글로불린의 Fc-영역 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드"이다. 상이한 용어가 교환가능하게 사용될 수 있고, 본 발명의 임의의 측면 또는 실시양태에서 동일한 의미 및 목적을 구성할 수 있다. 아미노산 치환은 천연 아미노산을 또 다른 자연 발생 아미노산으로, 또는 비-자연 발생 아미노산 유도체로 교환할 수 있다. 아미노산 치환은 보존적 또는 비-보존적 치환일 수 있다. 본 발명의 문맥에서, 보존적 치환은 하기 3개의 표 중 1개 이상에서 반영되는 아미노산의 부류 내에서의 치환에 의해 규정될 수 있다:

[0058] 보존적 치환을 위한 아미노산 잔기 부류

산성 잔기	Asp (D) 및 Glu (E)
염기성 잔기	Lys (K), Arg (R), 및 His (H)
친수성 비하전 잔기	Ser (S), Thr (T), Asn (N), 및 Gln (Q)
지방족 비하전 잔기	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), 및 Ile (I)
비-극성 비하전 잔기	Cys (C), Met (M), 및 Pro (P)
방향족 잔기	Phe (F), Tyr (Y), 및 Trp (W)

[0059]

[0060] 대안적인 보존적 아미노산 잔기 치환 부류

1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

[0061]

[0062] 아미노산 잔기의 대안적인 물리적 및 기능적 분류

알콜 기-함유 잔기	S 및 T
지방족 잔기	I, L, V, 및 M
시클로알케닐-회합된 잔기	F, H, W, 및 Y
소수성 잔기	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, 및 Y
음으로 하전된 잔기	D 및 E
극성 잔기	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T
양으로 하전된 잔기	H, K, 및 R
작은 잔기	A, C, D, G, N, P, S, T, 및 V
매우 작은 잔기	A, G, 및 S
턴 형성에 관여하는 잔기	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, 및 T
가요성 잔기	Q, T, K, S, G, N, D, E, 및 R

[0063]

[0064] 본 발명의 문맥에서, 변이체 내의 치환은 다음과 같이 나타낸다:

[0065] 원래 아미노산 - 위치 - 치환된 아미노산;

[0066] 아미노산 잔기를 나타내기 위해 코드 Xaa 및 X를 비롯한, 3 문자 코드 또는 1 문자 코드가 사용된다. 따라서, 표기 "E345R" 또는 "Glu345Arg"는 변이체가 모 항체 내의 위치 345에서의 아미노산에 상응하는 변이체 아미노산 위치에서 글루탐산이 아르기닌으로 치환된 것을 포함한다는 것을 의미한다.

- [0067] 상기 위치가 항체 내에 존재하지 않는 경우에도, 변이체는, 예를 들어 아미노산의 삽입을 포함한다:
- [0068] 위치 - 치환된 아미노산; 표기, 예를 들어 "448E"가 사용된다.
- [0069] 이러한 표기는 일련의 상동 폴리펩티드 또는 항체에서의 변형(들)과 관련하여 특히 적절하다.
- [0070] 유사하게, 치환 아미노산 잔기(들)의 정체(들)가 중요하지 않은 경우:
- [0071] 원래 아미노산 - 위치; 또는 "E345".
- [0072] 원래 아미노산(들) 및/또는 치환된 아미노산(들)이 모두는 아닌 1개 초과(들)의 아미노산(들)을 포함할 수 있는 변형의 경우에, 위치 345에서 글루탐산의 아르기닌, 리신 또는 트립토판으로의 치환:
- [0073] "Glu345Arg,Lys,Trp" 또는 "E345R,K,W" 또는 "E345R/K/W" 또는 "E345에서 R, K 또는 W로"가 본 발명의 문맥에서 교환가능하게 사용될 수 있다.
- [0074] 또한, 용어 "치환"은 다른 19개의 천연 아미노산 중의 어느 하나로의, 또는 다른 아미노산, 예컨대 비-천연 아미노산으로의 치환을 포괄한다. 예를 들어, 위치 345에서의 아미노산 E의 치환은 각각의 하기 치환을 포함한다: 345A, 345C, 345D, 345G, 345H, 345F, 345I, 345K, 345L, 345M, 345N, 345P, 345Q, 345R, 345S, 345T, 345V, 345W 및 345Y. 이는 표기 345X와 동등하며, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타낸다. 이들 치환은 또한 E345A, E345C 등, 또는 E345A,C 등, 또는 E345A/C/등으로 표기될 수 있다. 동일한 방식이, 특히 이러한 치환 중 어느 하나가 본원에 포함되도록, 본원에서 언급된 각각의 및 모든 위치에 유사하게 적용된다.
- [0075] 본원에 사용된 용어 "이펙터 세포"는 면역 반응의 인식 및 활성화 단계와는 대조적으로 면역 반응의 이펙터 단계에 관여하는 면역 세포를 지칭한다. 예시적인 면역 세포는 골수 또는 림프 기원의 세포, 예를 들어 림프구 (예컨대 B 세포 및 T 세포 (세포용해 T 세포 (CTL) 포함)), 킬러 세포, 자연 킬러 세포, 대식세포, 단핵구, 호산구, 다형핵 세포, 예컨대 호중구, 과립구, 비만 세포 및 호염기구를 포함한다. 일부 이펙터 세포는 Fc 수용체 (FcR) 또는 보체 수용체를 발현하고, 특정 면역 기능을 수행한다. 일부 실시양태에서, 이펙터 세포, 예컨대, 예를 들어 자연 킬러 세포는 ADCC를 유도할 수 있다. 예를 들어, FcR을 발현하는 단핵구, 대식세포, 호중구, 수지상 세포 및 쿠퍼 세포는 표적 세포의 특이적 사멸 및 면역계의 다른 성분에 대한 항원의 제시, 또는 항원을 제시하는 세포에 대한 결합에 관여한다. 일부 실시양태에서, ADCC는 표적 세포 상에서 활성화된 C3 단편의 침착을 유발하는 항체 구동 전형적 보체 활성화에 의해 추가로 증진될 수 있다. C3 절단 생성물은 골수 세포 상에서 발현되는 보체 수용체 (CR), 예컨대 CR3에 대한 리간드이다. 이펙터 세포 상의 CR에 의한 보체 단편의 인식은 증진된 Fc 수용체-매개된 ADCC를 촉진할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 구동 전형적 보체 활성화는 표적 세포 상으로 C3 단편을 유도한다. 이들 C3 절단 생성물은 직접적인 보체-의존성 세포성 세포독성 (CDC)을 촉진할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이펙터 세포는 표적 항원, 표적 입자 또는 표적 세포를 포식할 수 있다. 이펙터 세포 상의 특정한 FcR 또는 보체 수용체의 발현은 시토키인과 같은 체액성 인자에 의해 조절될 수 있다. 예를 들어, Fc γ RI의 발현은 인터페론 γ (IFN γ) 및/또는 G-CSF에 의해 상향조절되는 것으로 밝혀졌다. 이러한 증진된 발현은 표적에 대한 Fc γ RI-보유 세포의 세포독성 활성을 증가시킨다. 이펙터 세포는 표적 항원을 포식하거나 또는 표적 세포를 포식하거나 용해시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 구동 전형적 보체 활성화는 표적 세포 상으로 C3 단편을 유도한다. 이들 C3 절단 생성물은 식세포작용을 이펙터 세포에 의해 직접적으로 촉진하거나 또는 항체 매개된 식세포작용을 증진시킴으로써 간접적으로 촉진한다.
- [0076] 본원에 사용된 용어 "Fc 이펙터 기능"은 세포 막 상에서 폴리펩티드 또는 항체가 그의 표적, 예컨대 항원에 결합한 결과인 기능을 지칭하는 것으로 의도되며, 여기서 Fc 이펙터 기능은 폴리펩티드 또는 항체의 Fc 영역에서 기인한다. Fc 이펙터 기능의 예는 (i) C1q-결합, (ii) 보체 활성화, (iii) 보체-의존성 세포독성 (CDC), (iv) 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC), (v) Fc-감마 수용체-결합, (vi) 항체-의존성 세포성 식세포작용 (ADCP), (vii) 보체-의존성 세포성 세포독성 (CDC), (viii) 보체-증진된 세포독성, (ix) 항체에 의해 매개된 옵소닌화 항체의 보체 수용체에의 결합, (x) 옵소닌화, 및 (xi) (i) 내지 (x) 중 임의의 것의 조합을 포함한다.
- [0077] 본원에 사용된 용어 "클러스터링-의존성 기능"은 임의로 세포 상에서, 세포 막 상에서, 비리온 상에서 또는 또 다른 입자 상에서, 그의 항원에 결합된 폴리펩티드 또는 항체의 올리고머화 후에 항원 복합체 형성의 결과인 기능을 지칭하는 것으로 의도된다. 클러스터링-의존성 이펙터 기능의 예는 (i) 항체 올리고머 형성, (ii) 항체 올리고머 안정성, (iii) 항원 올리고머 형성, (iv) 항원 올리고머 안정성, (v) 아포토시스의 유도, (vi) 증식 조절, 예컨대 증식 감소, 억제 또는 자극, 및 (vii) (i) 내지 (vi) 중 임의의 것의 조합을 포함한다.
- [0078] 본원에 사용된 용어 "효능작용"은 생물학적 반응, 예컨대 세포내 신호전달을 유발하는 세포막 상의 수용체의 자

극 또는 활성화로서 이해된다. 이러한 효능작용 효과는 아포토시스의 유도 (프로그램화된 세포 사멸) 또는 면역 세포의 활성화, 또는 세포내 경로의 활성화를 유발할 수 있다.

- [0079] 효능작용 활성 또는 증가된 효능작용 활성은 하기 단계를 사용하여 실시예 2에 기재된 바와 같이 세포내 사멸 도메인을 발현하는 표적에 지시된 항체에 대한 생존을 검정에서 결정될 수 있다:
- [0080] i) 37°C에서 밤새 폴리스티렌 96-웰 편평-바닥 플레이트에 항체에 상응하는 표적, 예를 들어 DR5을 발현하는 세포주를 시딩하는 단계,
- [0081] ii) 소정 범위 (0.0003 내지 20,000 ng/mL)의 항체, 예를 들어 항-DR5 항체의 연속 희석물을 첨가하고, 37°C에서 3일 동안 인큐베이션하는 단계,
- [0082] iii) 예를 들어 셀타이어-글로 발광 세포 생존을 검정을 사용하여 ATP의 존재를 정량화함으로써 세포 생존율을 결정하는 단계,
- [0083] iv) 하기 식을 사용하여 생존 세포를 계산하는 단계: % 생존 세포 = [(발광 항체 샘플 - 발광 스타우로스포린 샘플)/(발광 부제 항체 샘플 - 발광 스타우로스포린 샘플)]*100.
- [0084] 효능작용 활성 또는 증가된 효능작용 활성은 하기 단계를 사용하여 실시예 29, 30, 31 및 32에 기재된 바와 같이 세포내 신호전달 경로를 활성화시키는 표적에 지시된 항체에 대한 리포터 검정에서 결정될 수 있다:
- [0085] i) 표적, 예를 들어 OX40, 4-1BB, CD40 또는 GITR 및 NFAT 반응 요소 발현 하류의 루시페라제 리포터 유전자로 안정하게 형질감염된 Jurkat 세포를 시딩하고, 세포를 96-웰 편평-바닥 플레이트에서 37°C에서 밤새 인큐베이션하는 단계,
- [0086] ii) 소정 범위, 예를 들어 19.5 내지 5,000 ng/mL의 항체, 예를 들어 항-OX49, 항-4-1BB, 항-CD40 또는 항-GITR 항체의 연속 희석물을 첨가하고, 5시간 동안 인큐베이션하는 단계,
- [0087] iii) 반딧불이 루시페라제 기질 (5'-플루오로루시페린)을 세포에 첨가하고, 5-10분 동안 인큐베이션하는 단계,
- [0088] iv) 엔비전 멀티라벨 플레이트(Envision MultiLabel Plate) 판독기를 사용하여 발광을 결정하는 단계.
- [0089] 본원에 사용된 용어 "벡터"는 벡터에 라이게이션된 핵산 절편의 전사를 유도할 수 있는 핵산 분자를 지칭하는 것으로 의도된다. 한 유형의 벡터는 "플라스미드"이고, 이는 원형 이중 가닥 DNA 루프의 형태이다. 또 다른 유형의 벡터는 바이러스 벡터이고, 여기서 핵산 절편은 바이러스 게놈 내로 라이게이션될 수 있다. 특정 벡터는 이들이 도입된 숙주 세포 내에서 자가 복제될 수 있다 (예를 들어, 박테리아 복제 기점을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 다른 벡터 (예컨대 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로의 도입시 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있고, 이에 의해 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터" (또는 간단히 "발현 벡터")로 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 상호교환가능하게 사용될 수 있으며, 이는 플라스미드가 가장 통상적으로 사용되는 형태의 벡터이기 때문이다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능을 수행하는 다른 형태의 발현 벡터, 예컨대 바이러스 벡터 (예컨대, 복제 결핍 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스)를 포함하는 것으로 의도된다.
- [0090] 본원에 사용된 용어 "재조합 숙주 세포" (또는 간단히 "숙주 세포")는 발현 벡터가 도입된 세포를 지칭하는 것으로 의도된다. 이러한 용어는 특정한 대상 세포 뿐만 아니라 이러한 세포의 자손을 지칭하는 것으로 의도됨이 이해되어야 한다. 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 후속 세대에서 특정 변형이 발생할 수 있기 때문에, 이러한 자손은 실제로는 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 여전히 본원에 사용된 용어 "숙주 세포"의 범주 내에 포함된다. 재조합 숙주 세포는, 예를 들어 트랜스팩토마, 예컨대 CHO 세포, HEK-293 세포, PER.C6, NS0 세포, 및 림프구성 세포, 및 원핵 세포, 예컨대 이. 콜라이 및 다른 진핵 숙주, 예컨대 식물 세포 및 진균을 포함한다.
- [0091] 본원에 사용된 용어 "트랜스팩토마"는 Ab 또는 표적 항원을 발현하는 재조합 진핵 숙주 세포, 예컨대 CHO 세포, PER.C6, NS0 세포, HEK-293 세포, 식물 세포, 또는 효모 세포를 포함한 진균을 포함한다.
- [0092] 용어 "제제"는 세포와 회합된 항원 (예를 들어, 세포의 표면 상에서 발현된 항원), 세포 막, 비리온 또는 다른 구조와 상호작용할 때 올리고머를 형성하는 능력을 증가시켜, 항원에 의한 증진된 신호전달 및/또는 활성화를 유발할 수 있는 항체 변이체 및 상이한 항체 변이체 혼합물의 제제를 지칭한다.

- [0093] 본원에 사용된 용어 "친화도"는 단일 부위에서 하나의 분자, 예를 들어 항체의 또 다른 분자, 예를 들어 표적 또는 항원에 대한 결합, 예컨대 항체의 개별 항원 결합 부위의 항원에 대한 1가 결합의 강도이다.
- [0094] 본원에 사용된 용어 "결합력"은 2개의 구조 사이, 예컨대 표적과 동시에 상호작용하는 항체의 다중 항원 결합 부위 사이, 또는 예를 들어 항체와 C1q 사이에서의 다중 결합 부위의 조합된 강도를 지칭한다. 1개 초과 결합 상호작용이 존재하는 경우에, 2개의 구조는 모든 결합 부위가 해리될 때에만 해리될 것이고, 따라서 해리율은 개별 결합 부위에서보다 더 느릴 것이고, 이에 의해 개별 결합 부위의 결합 강도 (친화도)와 비교하여 더 큰 효과적인 총 결합 강도 (결합력)를 제공할 것이다.
- [0095] 본원에 사용된 용어 "올리고머"는 적어도 원칙적으로 비제한된 수의 단량체로 이루어진 중합체와 대조적으로 1개를 초과하지만 제한된 수의 단량체 단위로 이루어진 분자 (예를 들어, 항체)를 지칭한다. 예시적인 올리고머는 이량체, 삼량체, 사량체, 오량체 및 육량체이다. 그리스어 접두어가 종종 올리고머 내의 단량체 단위의 수를 지정하기 위해 사용되며, 예를 들어 사량체는 4개의 단위로 구성되고, 육량체는 6개의 단위로 구성된다.
- [0096] 본원에 사용된 용어 "올리고머화"는 단량체를 한정된 정도의 중합으로 전환하는 과정을 지칭하는 것으로 의도된다. 여기서 본 발명에 따른 표적-결합 영역을 포함하는 폴리펩티드, 항체 및/또는 다른 이량체 단백질은, 예를 들어 세포 표면에서 표적 결합 후에 Fc-영역의 비공유 회합을 통해 올리고머, 예컨대 육량체를 형성할 수 있다.
- [0097] 본원에 사용된 용어 "클러스터링"은 비공유 상호작용을 통한 항체, 폴리펩티드, 항원 또는 다른 단백질의 올리고머화를 지칭하는 것으로 의도된다.
- [0098] 본원에 사용된 용어 "Fc-Fc 증진"은 폴리펩티드가 표적 결합 시 올리고머를 형성하도록, 2개의 Fc-영역 함유 항체 또는 폴리펩티드의 Fc 영역들 사이의 결합 강도를 증가시키거나 또는 그 사이의 상호작용을 안정화시키는 것을 지칭하는 것으로 의도된다.
- [0099] 본원에 사용된 Fc-Fc 증진 치환은 EU 넘버링 E430, E345 또는 S440에 따른 인간 IgG1에 상응하는 위치에서의 치환을 지칭하며, 단 위치 S440에서의 치환은 S440Y 또는 S440W이다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같은 Fc-Fc 증진 치환은 하기 아미노산 치환 E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W 및 S440Y를 지칭한다. 바람직한 실시양태에서, Fc-Fc 증진 치환은 E430G 또는 E345K이다.
- [0100] 본원에 사용된 용어 "C1q 결합"은 C1q와 폴리펩티드 또는 항체 사이의 직접적 상호작용을 지칭하는 것으로 의도된다. 직접적 C1q 결합은, 예를 들어 인공 표면 상의 고정화된 항체를 사용하여 평가될 수 있다 (실시예 4, 5 및 6에 기재된 바와 같음). 항체 올리고머에 대한 C1q의 높은 결합력 결합을 유발하는 다가 상호작용은 세포 또는 비리온 표면 상의 미리 결정된 항원에 결합되었을 때 평가될 수 있다.
- [0101] 폴리펩티드 또는 항체에 대한 C1q 결합은 하기 단계를 사용하는 ELISA 검정에서 결정될 수 있다: i) 96-웰 마이크로 ELISA 플레이트를 4°C에서 밤새 100 μl PBS 중 1 μg/mL의 폴리펩티드 또는 항체로 코팅하는 단계, ii) 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 3배 희석으로 최종 C1q 농도 범위 30-0.01 μg/mL인 100 μL/웰의 C1q의 일련의 연속 희석물과 함께 인큐베이션하는 단계, iii) 플레이트를 실온에서 1시간 동안 100 μl/웰의 토끼 항-인간 C1q와 함께 인큐베이션하는 단계, iv) 플레이트를 실온에서 1시간 동안 100 μl/웰의 돼지 항-토끼 IgG-HRP와 함께 인큐베이션하는 단계, v) 플레이트를 실온에서 15분 동안 100 μL/웰의 기질과 1 mg/mL의 2,2'-아자-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-술폰산)과 함께 인큐베이션하는 단계, vi) 100 μL 2% 옥살산/웰을 첨가하여 반응을 정지시키는 단계. 흡광도는 바이오텍(BioTek) EL808 마이크로플레이트 판독기에서 405 nm에서 측정된다.
- [0102] 본원에 사용된 용어 C1q 결합 치환은 C1q와의 직접적 상호작용을 증진시키는 이뮤노글로불린의 Fc 영역 및 항원 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드에서의 치환을 지칭하는 것으로 의도된다. 증진된 C1q 결합은, 예를 들어 상기 기재된 C1q 결합을 결정하기 위한 방법에 따라 측정된, C1q와 이뮤노글로불린의 Fc 영역 및 항원 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드 사이의 상호작용의 감소된 EC50을 유발할 수 있다.
- [0103] 본원에 사용된 용어 "보체 활성화"는 표면 상의 항체-항원 복합체에 결합하는 C1으로 불리는 큰 거대분자 복합체에 의해 개시되는 전형적 보체 경로의 활성화를 지칭한다. C1은 6개의 인식 단백질 C1q 및 세린 프로테아제의 이중-사량체로 이루어진 복합체, C1r2C1s2이다. C1은 C4를 C4a 및 C4b로 절단하고 C2를 C2a 및 C2b로 절단하면서 시작하는 일련의 절단 반응을 수반하는 전형적 보체 캐스케이드의 초기 사건에서의 제1 단백질 복합체이다. C4b는 침착되고 C2a와 함께, C3 컨버타제로 불리는 효소적 활성 컨버타제를 형성하고, 이는 보체 성분 C3을 C3b 및 C3a로 절단하고, 이는 C5 컨버타제를 형성한다. 이러한 C5 컨버타제는 C5를 C5a 및 C5b로 분할하고, 마지막 성분은 막 상에 침착되어, 차례로 말단 보체 성분 C5b, C6, C7, C8 및 C9가 막 공격 복합체 (MAC) 내로

조립되는 보체 활성화의 후기 사건을 촉발한다. 보체 캐스케이드는 보체-의존성 세포독성 (CDC)으로도 공지된 세포의 용해를 야기하는 세포 막 내의 세공의 생성을 유발한다. 보체 활성화는 C1q 효능, CDC 동역학 CDC 검정의 사용 (WO2013/004842, WO2014/108198에 기재된 바와 같음) 또는 문헌 [Beurskens et al. April 1, 2012 vol. 188 no. 7 3532-3541]에 기재된 C3b 및 C4b의 세포 침착 방법에 의해 평가될 수 있다.

- [0104] 본원에 사용된 용어 "보체-의존성 세포독성" ("CDC")은 MAC 조립에 의해 생성되는 막 내의 세공의 결과로서 항체가 세포 또는 비리온 상의 그의 표적에 결합되었을 때 세포 또는 비리온의 용해를 유도하는 항체-매개된 보체 활성화의 과정을 지칭하는 것으로 의도된다.
- [0105] 본원에 사용된 용어 "항체-의존성 세포-매개된 세포독성" ("ADCC")은 결합된 항체의 불변 영역을 인식하는 Fc 수용체를 발현하는 세포에 의한 항체-코팅된 표적 세포 또는 비리온의 사멸 메커니즘을 지칭하는 것으로 의도된다. 본원에 사용된 용어 "항체-의존성 세포성 식세포작용" ("ADCP")은 식세포에 의한 내재화에 의한 항체-코팅된 표적 세포 또는 비리온의 제거 메커니즘을 지칭하는 것으로 의도된다. 내재화된 항체-코팅된 표적 세포 또는 비리온은 파고솜으로 불리는 소포 내에 함유되며, 이는 이어서 1개 이상의 리소솜과 융합되어 파고리소솜을 형성한다. ADCP는 문헌 [van Bij et al. Journal of Hepatology Volume 53, Issue 4, October 2010, Pages 677-685]에 기재된 바와 같이 이펙터 세포로서 대식세포 및 비디오 현미경검사를 사용한 시험관내 세포독성 검정을 사용함으로써 평가될 수 있다.
- [0106] 본원에 사용된 용어 "보체-의존성 세포성 세포독성" ("CDCC")은 항체-매개된 보체 활성화의 결과로서 표적 세포 또는 비리온에 공유 결합된 보체 3 (C3) 절단 생성물을 인식하는 보체 수용체를 발현하는 세포에 의한 표적 세포 또는 비리온의 사멸 메커니즘을 지칭하는 것으로 의도된다. CDCC는 ADCC에 대해 기재된 바와 유사한 방식으로 평가될 수 있다.
- [0107] 본원에 사용된 용어 "혈장 반감기"는 혈장 중의 폴리펩티드의 농도를 제거 동안 (분포 단계 후에) 그의 초기 농도의 1/2로 감소시키는데 소요되는 시간을 나타낸다. 항체의 경우에 분포 단계는 전형적으로 1 - 3일일 것이며, 이 단계 동안 혈장과 조직 사이의 재분포로 인해 혈장 농도의 약 50% 감소가 존재한다. 혈장 반감기는 관련 기술분야에 널리 공지된 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0108] 본원에 사용된 용어 "혈장 클리어런스율"은 폴리펩티드가 살아있는 유기체에 투여 시에 혈액으로부터 제거되는 비율의 정량적 측정치이다. 혈장 클리어런스율은 용량/AUC (mL/일/kg)로서 계산될 수 있고, 여기서 AUC 값 (곡선하 면적)은 농도-시간 곡선으로부터 결정된다.
- [0109] 본원에 사용된 용어 "항체-약물 접합체"는 적어도 한 유형의 악성 세포에 대한 특이성을 갖는 항체 또는 Fc-함유 폴리펩티드, 약물, 및 약물을, 예를 들어 항체에 커플링시키는 링커를 지칭한다. 링커는 악성 세포의 존재 하에 절단가능하거나 비-절단가능하고; 여기서 항체-약물 접합체는 악성 세포를 사멸시킨다.
- [0110] 본원에 사용된 용어 "항체-약물 접합체 흡수"는 항체-약물 접합체가 세포 상의 표적에 결합한 후, 세포막에 의해 흡수/포식되어 세포 내로 유입되는 과정을 지칭한다. 항체-약물 접합체 흡수는 WO 2011/157741에 기재된 바와 같이 "시험관내 사멸 검정에서 항-TF ADC에 의한 항체-매개된 내재화 및 세포 사멸"로서 평가될 수 있다.
- [0111] 본원에 사용된 용어 "아포토시스"는 세포에서 발생할 수 있는 프로그램화된 세포 사멸 (PCD)의 과정을 지칭한다. 생화학적 사건은 특징적인 세포 변화 (형태) 및 사멸을 유도한다. 이들 변화는 수포화, 세포 수축, 핵 단편화, 염색질 응축 및 염색체 DNA 단편화를 포함한다. 특정 수용체에 대한 항체의 결합은 아포토시스를 유도할 수 있다.
- [0112] 본원에 사용된 용어 "프로그램화된 세포-사멸" 또는 "PCD"는 세포내 프로그램에 의해 매개되는 임의의 형태의 세포의 사멸을 지칭한다. 상이한 형태의 PCD가 존재하고, 다양한 유형의 PCD는 이들이 세포내 신호전달을 방해함으로써 차단될 수 있는 활성 세포 과정에 의해 실행된다는 점에서 공통적이다. 특정한 실시양태에서, 세포 또는 조직에서의 임의의 형태의 PCD의 발생은 세포 또는 조직을 접합된 아넥신 V로 염색하고, 포스파티딜세린 노출과 상관시킴으로써 결정될 수 있다.
- [0113] 본원에 사용된 용어 "아넥신 V"는 세포 표면 상의 포스파티딜세린 (PS)에 결합하는 아넥신 군의 단백질을 지칭한다.
- [0114] 본원에 사용된 용어 "FcRn"은 Fc 수용체인 신생아 Fc 수용체를 지칭하는 것으로 의도된다. 이것은 모체의 유액으로부터 설치류 신생아의 장의 상피를 거쳐 신생아의 혈류 내로 IgG를 수송할 수 있는 특유한 수용체로서 설치류에서 처음 발견되었다. 추가의 연구는 인간에서 유사한 수용체를 밝혀내었다. 그러나, 인간에서는, 이것이

태반에서 모체 IgG의 성장하는 태아로의 수송을 용이하게 하도록 돕는다는 것이 밝혀졌고, 또한 IgG 턴오버를 모니터링하는데 소정 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. FcRn은 6.0-6.5의 산성 pH에서 IgG에 결합하지만, 중성 또는 보다 높은 pH에서는 결합하지 않는다. 따라서, FcRn은 약산성 pH에서 장 내강 (장의 내부)으로부터의 IgG에 결합할 수 있고, pH가 중성 내지 염기성 (pH 7.0-7.5)인 기저측 측면 (신체 내부)으로의 효율적인 일방향 수송을 보장할 수 있다. 이 수용체는 또한 내피 세포에서 세포내이입의 경로에서의 그의 발생을 통해 IgG의 성체 샬비지에 있어서 소정 역할을 한다. 산성 엔도솜 내의 FcRn 수용체는 음세포작용을 통해 내재화된 IgG에 결합하여, 이를 세포 표면으로 재순환시키고 혈액의 염기성 pH에서 방출시켜, 그것이 리소솜 분해를 겪는 것을 방지한다. 이러한 메카니즘은 다른 이소형과 비교하여 혈액 내의 IgG의 보다 큰 반감기에 대한 설명을 제공할 수 있다.

[0115] 본원에 사용된 용어 "단백질 A"는 박테리아 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)의 세포벽에서 최초로 발견된 56 kDa MSCRAMM 표면 단백질을 지칭하는 것으로 의도된다. 이는 spa 유전자에 의해 코딩되고, 그의 조절은 DNA 토폴로지, 세포 오스몰농도, 및 Ar1S-Ar1R로 불리는 2-성분 시스템에 의해 제어된다. 이는 이뮤노글로불린에 결합하는 능력 때문에 생화학적 연구에서 사용되는 것으로 밝혀졌다. 이는 3중-나선 다발로 폴딩되는 5개의 상동 Ig-결합 도메인으로 구성된다. 각각의 도메인은 많은 포유동물 종으로부터의 단백질, 가장 주목할만하게 IgG에 결합할 수 있다. 이는 대부분의 이뮤노글로불린의 중쇄 Fc 영역 (FcRn 수용체의 보존된 결합 부위와 중첩됨)에 결합하고, 또한 인간 VH3 패밀리의 Fab 영역과 상호작용한다. 혈청 내에서의 이들 상호작용을 통해, IgG 분자는 오직 박테리아가 흡수, 보체 활성화 및 식세포작용을 파괴하는 그의 Fab 영역을 통한 대신에 그의 Fc 영역을 통해 박테리아에 결합한다.

[0116] 본원에 사용된 용어 "단백질 G"는 단백질 A와 유사하지만 상이한 특이성을 갖는, 군 C 및 G 스트렙토코쿠스 박테리아에서 발견되는 이뮤노글로불린-결합 단백질을 지칭하는 것으로 의도된다. 이는 Fc 영역에 대한 결합을 통해 항체를 정제하는데 적용되는 것으로 밝혀진 65-kDa (G148 단백질 G) 및 58 kDa (C40 단백질 G)의 세포 표면 단백질이다.

[0117] 본 발명의 구체적 실시양태

[0118] 본원에 기재된 바와 같이, 놀랍게도, 폴리펩티드 또는 항체의 Fc 영역 내의 아미노산의 치환은 증진된 이펙터 기능, 예를 들어 CDC 및/또는 효능작용 활성을 갖는 폴리펩티드 또는 항체를 제공한다. 본 발명자들은 Fc-Fc 상호작용을 증진시키는 돌연변이, 예컨대 E430, E345 및 S440으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 치환을 C1q 결합 치환과 함께 도입함으로써, 폴리펩티드 또는 항체의 Fc 이펙터 기능이 증진될 수 있다는 것을 발견하였다. 추가로, 본 발명자들은 또한 Fc-Fc 증진 돌연변이와 C1q 결합 치환의 조합이 효능작용 특성 또는 증진된 효능작용 특성을 갖는 폴리펩티드, 예컨대 항체를 생성할 수 있다는 것을 발견하였다.

[0119] 한 측면에서, 본 발명은 인간 이뮤노글로불린의 Fc 영역 및 항원 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체이며, 여기서 Fc 영역은 a) E430, E345 및 S440으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 적어도 1개의 Fc-Fc 증진 치환 (단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임), 및 b) 적어도 1개의 C1q 결합 치환을 포함하고, 여기서 위치는 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1에 상응하는 것인 폴리펩티드 또는 항체를 제공한다 (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1969 May;63(1):78-85; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. 1991 NIH Publication No. 91-3242)

[0120] 본 발명의 한 측면에서, 이뮤노글로불린의 Fc 영역 및 항원 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체이며, 여기서 Fc 영역은 a) E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 치환, 및 b) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환을 포함하고, 여기서 위치는 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1에 상응하는 것인 폴리펩티드 또는 항체를 제공한다.

[0121] E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환에 상응하는 위치에서의 치환은 본 발명에 따른 Fc-Fc 증진 치환으로 간주된다.

[0122] G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환은 본 발명에 따른 C1q 결합 치환으로 간주된다.

[0123] 하기 위치 E430, E345 또는 S440 중 1개에서의 돌연변이이며 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W인 것은 폴리펩티드 또는 항체에 증진된 Fc-Fc 상호작용 및 올리고머화의 효과를 도입한다. 증진된 올리고머화는 폴리펩티드 또는 항체의 항원 결합 영역이 상응하는 표적 항원에 결합되는 경우에 발생한다. 증진된 올리고머화

는 올리고머, 예컨대 예를 들어 육량체를 생성한다. 올리고머 구조, 예컨대 육량체의 생성은 폴리펩티드의 C1q 결합 결합력을 증가시킴으로써 Fc 이펙터 기능, 예를 들어 CDC를 증가시키는 효과를 갖는다. Fc-Fc 증진 돌연변이와 C1q 결합 치환, 예컨대 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환(들)과의 조합은 증진된 이펙터 기능을 갖는 폴리펩티드 또는 항체를 생성한다. Fc-Fc 증진 치환과 C1q 결합 치환의 조합은 효능작용 활성을 갖는 폴리펩티드 또는 항체를 생성하는 효과를 추가로 갖는다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 모 폴리펩티드 또는 모 항체와 비교할 때 증가된 효능작용 활성을 가질 수 있다.

- [0124] 본 발명에 따른 폴리펩티드 또는 항체는 세포 표면 수용체에의 결합을 통해 세포내 신호전달 경로를 활성화시키는 경우에 특히 관심대상이다.
- [0125] 본 발명에 따른 한 실시양태에서, Fc-Fc 증진 치환 및 C1q 결합 치환을 갖는 폴리펩티드 또는 항체의 증가된 또는 증진된 Fc 이펙터 기능 또는 활성은, 폴리펩티드 또는 항체가 모 폴리펩티드 또는 모 항체, 즉 본 발명에 따른 치환은 없지만 그 외에는 동일한 모 폴리펩티드 또는 모 항체와 비교되는 경우에 관한 것으로 이해되어야 한다.
- [0126] 본 발명은 증가된 특성, 예컨대 CDC 또는 효능작용 활성을 갖는 신규 폴리펩티드 또는 항체-기반 치료제를 가능하게 한다. 즉, 본 발명에 따른 폴리펩티드 또는 항체는 Fc 영역에 따라 증가된 특성, 예컨대 CDC를 갖고, 또한 항원 결합 영역에 따라 증가된 특성, 예컨대 효능작용 활성을 갖는다.
- [0127] 본 발명의 한 측면에서, 인간 이뮤노글로불린의 Fc 영역 및 항원 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체이며, 여기서 Fc 영역은 a) E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 치환, 및 b) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환을 포함하고, 여기서 위치는 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1에 상응하는 것인 폴리펩티드 또는 항체를 제공한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 적어도 1개의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환(들)을 포함한다.
- [0128] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 2 또는 3개의 위치(들)에서의 치환을 포함한다.
- [0129] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 하기로 이루어진 군 중 하나로부터 선택된 C1q 결합 치환을 포함한다:
- [0130] i) 위치 K326, E333에서의 2개의 C1q 결합 치환
- [0131] ii) 위치 K326, E333 및 P396에서의 3개의 C1q 결합 치환, 및
- [0132] iii) 위치 S267, H268 및 S324에서의 3개의 C1q 결합 치환.
- [0133] 본 발명의 한 실시양태에서, 1개 이상의 C1q 결합 치환(들)은 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 것이고, 단 위치 G236에서의 치환은 G236F, G236R, G236Y가 아니다.
- [0134] 본 발명의 한 실시양태에서, 1개 이상의 C1q 결합 치환(들)은 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 것이고, 단 위치 S267에서의 치환은 S267H, S267I, S267K, S267G가 아니다.
- [0135] 본 발명의 한 실시양태에서, 1개 이상의 C1q 결합 치환(들)은 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 것이고, 단 위치 H268에서의 치환은 H268K, H268D, H268E가 아니다.
- [0136] 본 발명의 한 실시양태에서, 적어도 1개의 Fc-Fc 증진 치환은 E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W 및 S440Y로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0137] 본 발명의 한 실시양태에서, 적어도 1개의 Fc-Fc 증진 치환은 E430G, E430S, E430F 및 E430T로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0138] 본 발명의 한 실시양태에서, 적어도 1개의 Fc-Fc 증진 치환은 E345K, E345Q, E345R 및 E345Y로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0139] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 적어도 E430G 치환을 갖는다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 적어도 E345K 치환을 갖는다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 적어도 E345R 치환을 갖는다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 적어도 S440Y 치환을 갖는다.
- [0140] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430G, E430S, E430F 및 E430T로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 치환, 및 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환을 포함한다.
- [0141] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430G, E430S, E430F 및 E430T로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 치환, 및 K326, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환을 포함한다.
- [0142] 본 발명의 한 실시양태에서, Fc 영역은 E430G 치환, 및 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환을 포함한다.
- [0143] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345K, E345Q, E345R 및 E345Y로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 치환, 및 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환을 포함한다.
- [0144] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345K, E345Q, E345R 및 E345Y로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 치환, 및 K326, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환을 포함한다.
- [0145] 본 발명의 한 실시양태에서, Fc 영역은 E345K 치환, 및 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치에서의 치환을 포함한다.
- [0146] 본 발명의 한 실시양태에서, Fc 영역은 E345R 치환, 및 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환을 포함한다.
- [0147] 본 발명의 한 실시양태에서, Fc 영역은 S440Y 또는 S440W로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 치환, 및 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환을 포함한다.
- [0148] 본 발명의 한 실시양태에서, Fc 영역은 S440Y 또는 S440W로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 치환, 및 K326, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환을 포함한다.
- [0149] 본 발명의 한 실시양태에서, Fc 영역은 S440Y 치환, 및 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환을 포함한다.
- [0150] 세포 표면 항원 결합 시에 폴리펩티드 또는 항체의 증진된 C1q 결합 및/또는 효능작용 특성을 가능하게 하는 실시양태가 본원에 제공된다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 증진된 효능작용 특성을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 제1 중쇄 및 제2 중쇄를 포함하는 Fc 영역을 포함하고, 여기서 상기 언급된 치환 중 1개가 제1 및/또는 제2 중쇄에 존재할 수 있다.
- [0151] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환, 예컨대 2 또는 3개의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 K326 및 E333에서의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 K326 및 P396에서의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 P396 및 E333에서의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 K326, E333 및 P396에서의 치환을 포함한다.
- [0152] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 E430에서의 치환, 및 K326, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 E430에서의 치환, 및 K326, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치,

의 치환을 포함한다:

- [0165] i. K326A,
 - [0166] ii. E333A,
 - [0167] iii. E333T
 - [0168] iv. P396L,
 - [0169] v. E333S,
 - [0170] vi. K326W, E333S
 - [0171] vii. K326W, E333T
 - [0172] viii. K326A, E333A,
 - [0173] ix. K326A, K333A, P396L
 - [0174] x. S267E, H268F,
 - [0175] xi. S267E, S324T,
 - [0176] xii. H268F, S324T,
 - [0177] xiii. S267E, H268F, S324T, 및
 - [0178] xiv. S324, I332.
- [0179] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 E430에서의 치환 및 하기로 이루어진 군 중 하나로부터 선택된 적어도 1개의 치환을 포함한다:
- [0180] i. K326A,
 - [0181] ii. E333A,
 - [0182] iii. E333T
 - [0183] iv. P396L,
 - [0184] v. E333S,
 - [0185] vi. K326W, E333S
 - [0186] vii. K326W, E333T
 - [0187] viii. K326A, E333A,
 - [0188] ix. K326A, K333A, P396L
 - [0189] x. S267E, H268F,
 - [0190] xi. S267E, S324T,
 - [0191] xii. H268F, S324T
 - [0192] xiii. S267E, H268F, S324T, 및
 - [0193] xiv. S324, I332.
- [0194] 1개의 치환이 위치 E430에서의 것인 실시양태가 본원에 제공된다. 한 실시양태에서, 위치 E430에서의 치환은 E430G, E430S, E430F, E430T로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0195] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430G 치환 및 하기로 이루어진 군 중 하나로부터 선택된 치환을 포함한다:
- [0196] i. K326A,
 - [0197] ii. E333A,

- [0198] iii. E333T
- [0199] iv. P396L,
- [0200] v. E333S,
- [0201] vi. K326W, E333S
- [0202] vii. K326W, E333T
- [0203] viii. K326A, E333A,
- [0204] ix. K326A, K333A, P396L
- [0205] x. S267E, H268F,
- [0206] xi. S267E, S324T,
- [0207] xii. H268F, S324T,
- [0208] xiii. S267E, H268F, S324T, 및
- [0209] xiv. S324, I332.
- [0210] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430G, K326W 및 E333S 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430G, K326A 및 E333A 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430G, K333A 및 P396L 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430G, K326A, E333A 및 P396L 치환을 포함한다.
- [0211] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430S, K326W 및 E333S 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430S, K326A 및 E333A 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430S, K333A 및 P396L 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430S, K326A, E333A 및 P396L 치환을 포함한다.
- [0212] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430F, K326W 및 E333S 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430F, K326A 및 E333A 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430F, K333A 및 P396L 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430F, K326A, E333A 및 P396L 치환을 포함한다.
- [0213] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430T, K326W 및 E333S 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430T, K326A 및 E333A 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430T, K333A 및 P396L 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430T, K326A, E333A 및 P396L 치환을 포함한다.
- [0214] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 E345에서의 치환 및 하기로 이루어진 군 중 하나로부터 선택된 적어도 1개의 치환을 포함한다:
- [0215] i. K326A,
- [0216] ii. E333A,
- [0217] iii. E333T
- [0218] iv. P396L,
- [0219] v. E333S,
- [0220] vi. K326W, E333S
- [0221] vii. K326W, E333T
- [0222] viii. K326A, E333A,
- [0223] ix. K326A, K333A, P396L

- [0224] x. S267E, H268F,
- [0225] xi. S267E, S324T,
- [0226] xii. H268F, S324T,
- [0227] xiii. S267E, H268F, S324T, 및
- [0228] xiv. S324, I332.
- [0229] 1개의 치환이 위치 E345에서의 것인 실시양태가 본원에 제공된다. 한 실시양태에서, 위치 E345에서의 치환은 E345K, E345Q, E345R, E345Y로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0230] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345K 치환 및 하기로 이루어진 군 중 하나로부터 선택된 적어도 1개의 치환을 포함한다:
- [0231] i. K326A,
- [0232] ii. E333A,
- [0233] iii. E333T
- [0234] iv. P396L,
- [0235] v. E333S,
- [0236] vi. K326W, E333S
- [0237] vii. K326W, E333T
- [0238] viii. K326A, E333A,
- [0239] ix. K326A, K333A, P396L
- [0240] x. S267E, H268F,
- [0241] xi. S267E, S324T,
- [0242] xii. H268F, S324T,
- [0243] xiii. S267E, H268F, S324T, 및
- [0244] xiv. S324, I332.
- [0245] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345K, K326W 및 E333S 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345K, K326A 및 E333A 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345R, K333A 및 P396L 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345K, K326A, E333A 및 P396L 치환을 포함한다.
- [0246] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345R 치환 및 하기로 이루어진 군 중 하나로부터 선택된 적어도 1개의 치환을 포함한다:
- [0247] i. K326A,
- [0248] ii. E333A,
- [0249] iii. E333T
- [0250] iv. P396L,
- [0251] v. E333S,
- [0252] vi. K326W, E333S
- [0253] vii. K326W, E333T
- [0254] viii. K326A, E333A,

- [0255] ix. K326A, K333A, P396L
- [0256] x. S267E, H268F,
- [0257] xi. S267E, S324T,
- [0258] xii. H268F, S324T,
- [0259] xiii. S267E, H268F, S324T, 및
- [0260] xiv. S324, I332.
- [0261] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345R, K326W 및 E333S 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345R, K326A 및 E333A 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345R, K333A 및 P396L 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345R, K326A, E333A 및 P396L 치환을 포함한다.
- [0262] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345Q, K326W 및 E333S 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345Q, K326A 및 E333A 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345Q, K333A 및 P396L 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345Q, K326A, E333A 및 P396L 치환을 포함한다.
- [0263] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345Y, K326W 및 E333S 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345Y, K326A 및 E333A 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345Y, K333A 및 P396L 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345Y, K326A, E333A 및 P396L 치환을 포함한다.
- [0264] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S440Y 또는 S440W 치환 및 하기로 이루어진 군 중 하나로부터 선택된 적어도 1개의 치환을 포함한다:
- [0265] i. K326A,
- [0266] ii. E333A,
- [0267] iii. E333T
- [0268] iv. P396L,
- [0269] v. E333S,
- [0270] vi. K326W, E333S
- [0271] vii. K326W, E333T
- [0272] viii. K326A, E333A,
- [0273] ix. K326A, K333A, P396L
- [0274] x. S267E, H268F,
- [0275] xi. S267E, S324T,
- [0276] xii. H268F, S324T,
- [0277] xiii. S267E, H268F, S324T, 및
- [0278] xiv. S324, I332.
- [0279] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S440Y 치환 및 하기로 이루어진 군 중 하나로부터 선택된 적어도 1개의 치환을 포함한다:
- [0280] i. K326A,
- [0281] ii. E333A,
- [0282] iii. E333T

- [0283] iv. P396L,
- [0284] v. E333S,
- [0285] vi. K326W, E333S
- [0286] vii. K326W, E333T
- [0287] viii. K326A, E333A,
- [0288] ix. K326A, K333A, P396L
- [0289] x. S267E, H268F,
- [0290] xi. S267E, S324T,
- [0291] xii. H268F, S324T,
- [0292] xiii. S267E, H268F, S324T, 및
- [0293] xiv. S324, I332.
- [0294] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S440Y, K326W 및 E333S 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S440Y, K326A 및 E333A 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S440Y, K333A 및 P396L 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S440Y, K326A, E333A 및 P396L 치환을 포함한다.
- [0295] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S440W, K326W 및 E333S 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S440W, K326A 및 E333A 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S440W, K333A 및 P396L 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S440W, K326A, E333A 및 P396L 치환을 포함한다.
- [0296] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 G236A, I332E, S239D 및 I332E로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 치환을 추가로 포함한다.
- [0297] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 2개의 치환을 추가로 포함한다:
- [0298] i. G236A, I332E, 및
- [0299] ii. S239D, I332E.
- [0300] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 a) E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 적어도 1개의 치환, 및 b) 하기로 이루어진 군 중 하나로부터 선택된 치환을 포함한다:
- [0301] i. H268F, S324T, G236A, I332E,
- [0302] ii. H268F, S324T, S239D, I332E
- [0303] iii. S267E, H268F, S324T, G236A, I332E, 및
- [0304] iv. S267E, H268F, S324T, S239D, I332E.
- [0305] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 E430에서의 치환 및 하기로 이루어진 군 중 하나로부터 선택된 치환을 포함한다:
- [0306] i. H268F, S324T, G236A, I332E,
- [0307] ii. H268F, S324T, S239D, I332E
- [0308] iii. S267E, H268F, S324T, G236A, I332E, 및
- [0309] iv. S267E, H268F, S324T, S239D, I332E.
- [0310] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430G 치환 및 하기로 이루어진 군 중 하나로부터 선택된

치환을 포함한다:

- [0311] i. H268F, S324T, G236A, I332E,
- [0312] ii. H268F, S324T, S239D, I332E
- [0313] iii. S267E, H268F, S324T, G236A, I332E, 및
- [0314] iv. S267E, H268F, S324T, S239D, I332E.
- [0315] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 E345에서의 치환 및 하기로 이루어진 군 중 하나로부터 선택된 치환을 포함한다:
- [0316] i. H268F, S324T, G236A, I332E,
- [0317] ii. H268F, S324T, S239D, I332E
- [0318] iii. S267E, H268F, S324T, G236A, I332E, 및
- [0319] iv. S267E, H268F, S324T, S239D, I332E.
- [0320] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345K 치환 및 하기로 이루어진 군 중 하나로부터 선택된 치환을 포함한다:
- [0321] i. H268F, S324T, G236A, I332E,
- [0322] ii. H268F, S324T, S239D, I332E
- [0323] iii. S267E, H268F, S324T, G236A, I332E, 및
- [0324] iv. S267E, H268F, S324T, S239D, I332E.
- [0325] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345R 치환 및 하기로 이루어진 군 중 하나로부터 선택된 치환을 포함한다:
- [0326] i. H268F, S324T, G236A, I332E,
- [0327] ii. H268F, S324T, S239D, I332E
- [0328] iii. S267E, H268F, S324T, G236A, I332E, 및
- [0329] iv. S267E, H268F, S324T, S239D, I332E.
- [0330] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S440Y 또는 S440W 치환 및 하기로 이루어진 군 중 하나로부터 선택된 치환을 포함한다:
- [0331] i. H268F, S324T, G236A, I332E,
- [0332] ii. H268F, S324T, S239D, I332E
- [0333] iii. S267E, H268F, S324T, G236A, I332E, 및
- [0334] iv. S267E, H268F, S324T, S239D, I332E.
- [0335] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S440Y 치환 및 하기로 이루어진 군 중 하나로부터 선택된 치환을 포함한다:
- [0336] i. H268F, S324T, G236A, I332E,
- [0337] ii. H268F, S324T, S239D, I332E,
- [0338] iii. S267E, H268F, S324T, G236A, I332E, 및
- [0339] iv. S267E, H268F, S324T, S239D, I332E.
- [0340] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 1개 이상의 추가의 치환을 포함한다. 즉, 본 발명의 한 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 측면 또는 실시양태에 따른 폴리펩티드 또는 항체는 Fc 영역에 1개 이상의 추가의 치환을 포함한다.

- [0341] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 K439에 상응하는 추가의 치환을 포함하거나, 또는 Fc 영역이 위치 S440에서의 치환을 포함하지 않는 경우에 추가의 치환은 위치 S440에서의 것일 수 있다.
- [0342] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 K439 또는 S440에 상응하는 폴리펩티드 또는 항체 내의 추가의 치환을 포함하며, 단 S440에서의 치환은 S440Y 또는 S440W가 아니다.
- [0343] 본 발명에 따른 Fc-Fc 증진 치환 및 C1q 결합 치환 및 위치 S440에서의 추가의 치환, 예컨대 S440K를 포함하는 폴리펩티드 또는 항체는 위치 S440에서의 치환, 예컨대 S440K를 포함하는 폴리펩티드 또는 항체와 올리고머를 형성하지 않는다. 본 발명에 따른 Fc-Fc 증진 치환 및 C1q 결합 치환 및 위치 K439에서의 추가의 치환, 예컨대 K439E를 포함하는 폴리펩티드 또는 항체는 위치 K439에서의 돌연변이, 예컨대 K439E를 포함하는 폴리펩티드 또는 항체와 올리고머를 형성하지 않는다. 본 발명의 한 실시양태에서, 추가의 치환은 S440K 또는 K439E로부터 선택된다.
- [0344] 본 발명의 한 실시양태에서, Fc 영역은 인간 IgG1 EU 넘버링에서 K439E 또는 S440K에 상응하는 육량체화-억제 치환인 추가의 치환을 포함한다. 즉, 본 발명의 한 실시양태에서 Fc 영역은 Fc-Fc 증진 치환, 예컨대 E430G 및 육량체화-억제 치환 K439E를 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, Fc 영역은 Fc-Fc 증진 치환, 예컨대 E345K 및 육량체화-억제 치환 K439E를 포함한다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, Fc 영역은 Fc-Fc 증진 치환, 예컨대 E430G 및 육량체화-억제 치환 S440K를 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, Fc 영역은 Fc-Fc 증진 치환, 예컨대 E345K 및 육량체화-억제 치환, 예컨대 S440K를 포함한다. K439E 치환을 포함하는 항체와 S440K 치환을 포함하는 항체의 조합 사이에 배타적인 육량체화를 가능하게 하는 실시양태가 본원에 제공된다. 즉, 억제 치환 K439E 및 S440K는 상보적 치환으로 간주될 수 있다. 2개의 상이한 상보적 육량체화-억제 치환을 갖는 항체의 조합은 상이한 특이성을 갖는 적어도 2종의 항체를 갖는 조성물에서 특히 관심대상이다.
- [0345] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 a) E430, E345 및 S440으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 치환 (단 S440에서의 치환은 S440Y 또는 S440W가 아님) 및 b) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환 및 c) K439E 치환을 포함한다.
- [0346] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 a) E430 및 E345로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 치환 및 b) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환 및 c) S440K 치환을 포함한다.
- [0347] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430G, K326W, E333S 및 K439E 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430G, K326A, E333A 및 K439E 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430G, K333A, P396L 및 K439E 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430G, K326A, E333A, P396L 및 K439E 치환을 포함한다.
- [0348] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345K, K326W, E333S 및 K439E 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345K, K326A, E333A 및 K439E 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345K, K333A, P396L 및 K439E 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345K, K326A, E333A, P396L 및 K439E 치환을 포함한다.
- [0349] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345R, K326W, E333S 및 K439E 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345R, K326A, E333A 및 K439E 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345R, K333A, P396L 및 K439E 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345R, K326A, E333A, P396L 및 K439E 치환을 포함한다.
- [0350] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S440Y, K326W, E333S 및 K439E 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S440Y, K326A, E333A 및 K439E 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S440Y, K333A, P396L 및 K439E 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S440Y, K326A, E333A, P396L 및 K439E 치환을 포함한다.
- [0351] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 a) E430 및 E345로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 치환 및 b) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환 및 c) S440K 치환을 포함한다.
- [0352] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430G, K326W, E333S 및 S440K 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430G, K326A, E333A 및 S440S 치환을 포함한다. 본 발명의 한

실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430G, K333A, P396L 및 S440S 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E430G, K326A, E333A, P396L 및 S440K 치환을 포함한다.

[0353] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345K, K326W, E333S 및 S440K 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345K, K326A, E333A 및 S440K 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345K, K333A, P396L 및 S440K 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345K, K326A, E333A, P396L 및 S440K 치환을 포함한다.

[0354] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345R, K326W, E333S 및 S440K 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345R, K326A, E333A 및 S440S 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345R, K333A, P396L 및 S440K 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E345R, K326A, E333A, P396L 및 S440K 치환을 포함한다.

[0355] 본 발명에 따른 폴리펩티드 또는 항체는 적어도 Fc-Fc 증진 치환 및 1개 이상의 C1q 결합 치환을 가질 뿐만 아니라, 상기 기재된 바와 같이 추가의 기능을 폴리펩티드 또는 항체 내로 도입하기 위한 추가의 치환을 가질 수도 있다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 최대 10개의 치환, 예컨대 9개의 치환, 예컨대 8개의 치환, 예컨대 7개의 치환, 예컨대 6개의 치환, 예컨대 5개의 치환, 예컨대 4개의 치환, 예컨대 3개의 치환 또는 예컨대 2개의 치환을 포함한다.

[0356] 본 발명의 폴리펩티드 또는 항체가 추가의 특색을 폴리펩티드 또는 항체 내로 도입하는 추가의 치환을 갖도록 하는 실시양태가 본원에 제공된다. 추가로, 추가의 치환은 Fc-Fc 상호작용에 관여하지 않는 위치, 뿐만 아니라 Fc 이펙터 기능에 관여하지 않는 위치에서의 Fc 영역 내의 변이를 가능하게 한다. 추가로, 추가의 치환은 또한 대립유전자 변이로 인한 것일 수 있다.

[0357] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 Fc 영역에 Fc-Fc 증진 치환 및 C1q 결합 치환을 포함하지 않는 것을 제외하고는 항체와 동일한 모 폴리펩티드 또는 모 항체와 비교하여 적어도 20% 증가된 Fc 이펙터 기능을 갖는다.

[0358] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 Fc 영역에 Fc-Fc 증진 치환 및 C1q 결합 치환을 포함하지 않는 것을 제외하고는 항체와 동일한 모 폴리펩티드 또는 모 항체와 비교하여 적어도 40%, 적어도 50% 또는 적어도 60% 증가된 Fc 이펙터 기능을 갖는다.

[0359] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 증가된 Fc 이펙터 기능을 포함한다.

[0360] 본 발명의 한 실시양태에서, Fc 이펙터 기능은 하기 군으로부터 선택된다: 보체-의존성 세포독성 (CDC), 보체-의존성 세포-매개된 세포독성, 보체 활성화, 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC), 항체-의존성 세포-매개된 식세포작용, C1q 결합 및 Fc γ R 결합. 한 실시양태에서, Fc 이펙터 기능은 Fc γ RIIIa 신호전달이다. 즉, 본 발명에 따른 제2 돌연변이는 적어도 1개의 Fc 이펙터 기능을 감소시킬 수 있다.

[0361] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 효능작용 활성을 포함한다. 즉, 폴리펩티드 또는 항체는 모 폴리펩티드 또는 모 항체와 비교할 때 효능작용 활성을 포함한다.

[0362] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 증진된 효능작용 활성을 포함한다. 즉, 폴리펩티드 또는 항체는 모 폴리펩티드 또는 모 항체와 비교할 때 증진된 효능작용 활성을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 동일한 Fc-Fc 증진된 돌연변이를 포함하지만 C1q 결합 돌연변이는 포함하지 않는 폴리펩티드 또는 항체와 비교할 때 증진된 효능작용 활성을 포함한다.

[0363] TNFR-SF의 수용체의 효능작용 활성은 효능작용 활성을 달성하기 위해 외인성 가교를 필요로 한다. 이것은, 예를 들어 관심 TNFR-SF 수용체로 안정하게 형질감염된, NF-kB-구동 분비된 리포터 유전자 (예를 들어, 루시페라제를 발현하는 pMetLuc-리포터 유전자, 클론테크(Clontech))를 함유하는 HEK293 세포를 사용하는 대용 검정에서 측정될 수 있다. 수용체의 가교는 배지에서, 예를 들어 루시페라제 단백질의 프로모터 활성화 및 분비를 유도한다. 목적하는 시점에, 배지 샘플을 옮기고 기질을 첨가함으로써 검정 루시페라제 활성이 측정될 수 있다. 루시페라제 활성은 발광측정기에서 측정될 수 있으며, 이는 효능작용 활성에 대한 척도이다. OX40의 예에 대해서는 문헌 [Zhang et al. J Biol Chem. 2016 Dec 30;291(53):27134-27146]을 참조한다.

[0364] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 증가된 효능작용 활성을 포함한다. 즉, 폴리펩티드 또는 항체는 모 폴리펩티드 또는 모 항체와 비교할 때 증가된 효능작용 활성을 포함한다.

- [0365] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 항체, 단일특이적 항체, 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 단일특이적 폴리펩티드, 이중특이적 폴리펩티드 또는 다중특이적 폴리펩티드이다.
- [0366] 본 발명의 폴리펩티드는 천연, 예를 들어 인간 Fc 도메인을 갖는 항체로 제한되지 않을 뿐만 아니라, 본 발명의 돌연변이 이외의 다른 돌연변이, 예컨대 예를 들어 글리코실화에 영향을 주거나 항체가 이중특이적 항체가 되도록 할 수 있는 돌연변이를 갖는 항체일 수도 있다. 용어 "천연 항체"는 임의의 유전자 도입된 돌연변이를 포함하지 않는 임의의 항체를 의미한다. 자연 발생 변형을 포함하는 항체, 예를 들어 상이한 동종이형은 따라서 본 발명의 의미에서 "천연 항체"로서 이해되어야 하고, 이에 의해 모 항체로서 이해될 수 있다. 이러한 항체는 본 발명에 따른 적어도 2개의 치환에 대한 주형으로서의 역할을 할 수 있고, 이에 의해 본 발명의 변이체 항체를 제공한다. 본 발명의 치환 이외의 다른 치환을 포함하는 모 항체의 예는 IgG4-유사 CH3 영역을 포함하는 2종의 항체의 절반-분자 교환을 촉진하고, 따라서 응집체의 형성을 수반하지 않으면서 이중특이적 항체를 형성하는 환원 조건을 이용하는, W02011/131746 (젠맵)에 기재된 바와 같은 이중특이적 항체이다. 모 항체의 다른 예는 이중특이적 항체, 예컨대 이중이량체 이중특이적 항체: 트리오맵 (프레제니우스); 이중특이적 IgG1 및 IgG2 (리나트 뉴로사이언시스 코퍼레이션); Fc Δ Adp (레게네론); 노브-인투-홀 (제넨테크); 정전기적 스티어링 (암젠, 슈가이, 온코메드); 시드바디 (머크); 아지메트릭 스캐폴드 (자임웍스); mAb-Fv (젠코르); 및 LUZ-Y (제넨테크)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 다른 예시적인 모 항체 포맷은, 제한 없이, 야생형 항체, 전장 항체 또는 Fc-함유 항체 단편, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체 또는 그의 임의의 조합을 포함한다.
- [0367] 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 R435H 치환을 포함하는 Fc 영역을 포함한다.
- [0368] 한 실시양태에서, 본 발명은 인간 이뮤노글로불린의 Fc 영역 및 항원-결합 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체이며, 여기서 Fc 영역은 a) E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 치환, 및 b) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환, 및 c) R435H 치환을 포함하고, 여기서 치환은 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1에 상응하는 것인 폴리펩티드 또는 항체를 제공한다.
- [0369] 폴리펩티드 또는 항체는 임의의 이소형의 임의의 인간 항체, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgD, IgM 또는 IgA, 임의로 인간 전장 항체, 예컨대 인간 전장 IgG1 항체일 수 있다.
- [0370] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 인간 IgG1 항체, 예를 들어 IgG1m(za) 또는 IgG1m(f) 동종이형이다.
- [0371] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgD, IgM, IgA 이소형 또는 혼합 이소형인 Fc 영역을 갖는다. 즉, 본 발명에 따른 폴리펩티드 또는 항체의 Fc 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgD, IgM, IgA 이소형 또는 혼합 이소형에 상응하는 Fc 영역 내로 도입된 적어도 제1 및 제2 돌연변이를 갖는다. 본 발명의 한 실시양태에서, Fc 영역은 하기 군으로부터 선택된 혼합 이소형이다: IgG1/IgG2, IgG1/IgG3, IgG1/IgG4, IgG2/IgG3, IgG2/IgG4 및 IgG3/IgG4. 혼합 이소형에서, Fc 영역은 1개 초과개의 이소형으로부터의 아미노산 서열로 구성된다.
- [0372] 본 발명의 한 실시양태에서, Fc 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 이소형 또는 혼합 이소형이다.
- [0373] 본 발명의 한 실시양태에서, Fc 영역은 인간 IgG이다.
- [0374] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 인간 IgG1 이소형인 Fc 영역을 갖는다.
- [0375] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 IgG1m(f), IgG1m(a), IgG1m(z), IgG1m(x) 동종이형 또는 혼합 동종이형인 Fc 영역을 갖는다.
- [0376] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 서열식별번호(SEQ ID NO): 73, 74, 75, 76, 89, 168, 169 또는 170에 제시된 바와 같은 Fc 영역을 포함하고, 여기서 Fc 영역은 E430, E345 및 S440에 상응하는 군으로부터 선택된 위치에서의 치환 (단 S440에서의 치환은 S440Y 또는 S440W임) 및 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치에서의 치환을 포함하고, 여기서 위치는 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1에 상응한다.
- [0377] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 서열식별번호: 77, 78 또는 90에 제시된 바와 같은 Fc 영역을 포함하고, 여기서 Fc 영역은 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환을 포함하고, 여기서 위치는 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1에 상

응한다.

- [0378] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 서열식별번호: 80, 82, 83, 84, 87 또는 88에 제시된 바와 같은 Fc 영역을 포함한다.
- [0379] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체이다.
- [0380] 다중특이적 항체
- [0381] 본 발명의 폴리펩티드 또는 항체는 천연, 예를 들어 인간 Fc 도메인을 갖는 항체로 제한되지 않을 뿐만 아니라, 본 발명의 돌연변이 이외의 다른 돌연변이, 예컨대 예를 들어 글리코실화에 영향을 주거나 항체가 다중특이적 항체 또는 이중특이적 항체가 되도록 할 수 있는 돌연변이를 갖는 항체일 수도 있다. 용어 "천연 항체"는 임의의 유전자 도입된 돌연변이를 포함하지 않는 임의의 항체를 의미한다. 자연 발생 변형을 포함하는 항체, 예를 들어 상이한 동종이형은 따라서 본 발명의 의미에서 "천연 항체"로서 이해되어야 하고, 이에 의해 모 항체로서 이해될 수 있다. 이러한 항체는 본 발명에 따른 적어도 2개의 치환에 대한 주형으로서의 역할을 할 수 있고, 이에 의해 본 발명의 항체를 제공한다. 본 발명의 치환 이외의 다른 치환을 포함하는 모 항체의 예는 IgG4-유사 CH3 영역을 포함하는 2종의 항체의 절반-분자 교환을 촉진하고, 따라서 응집체의 형성을 수반하지 않으면서 이중특이적 항체를 형성하는 환원 조건을 이용하는, W02011/131746 (젠맘)에 기재된 바와 같은 이중특이적 항체이다. 모 항체의 다른 예는 이중특이적 항체, 예컨대 이중이량체 이중특이적 항체: 트리오맵 (프레제니우스); 이중특이적 IgG1 및 IgG2 (리나트 뉴로사이언시스 코퍼레이션); Fc Δ Adp (레게네론); 노브-인투-홀 (제넨테크); 정전기적 스티어링 (암젠, 쉐가이, 온코메드); 시드바디 (머크); 아지메트릭 스캐폴드 (자임웁스); mAb-Fv (젠코르); 및 LUZ-Y (제넨테크)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 다른 예시적인 모 항체 포맷은, 제한 없이, 야생형 항체, 전장 항체 또는 Fc-함유 항체 단편, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체 또는 그의 임의의 조합을 포함한다.
- [0382] 본원에 기재된 본 발명의 임의의 실시양태가 하기 기재된 다중특이적 항체 측면에서 사용될 수 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0383] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명의 변이체는 단일특이적 항체, 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체로부터 선택된 항체이다.
- [0384] 특정한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 WO 2011/131746에 기재된 포맷을 갖는다.
- [0385] 본 발명의 이중특이적 항체는 특정한 포맷으로 제한되지 않고, 본원에 기재된 임의의 것일 수 있다.
- [0386] 또 다른 측면에서, 본 발명은 이뮤노글로불린의 제1 중쇄 및 제1 항원-결합 영역을 포함하는 이중특이적 폴리펩티드 또는 항체, 및 이뮤노글로불린의 제2 중쇄 및 제2 항원-결합 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체인 폴리펩티드 또는 항체에 관한 것이며, 여기서 제1 및 제2 항원-결합 영역은 동일하거나 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하고, 제1 및/또는 제2 중쇄는
 - [0387] a) E430, E345 및 S440에 상응하는 군으로부터 선택된 위치에서의 치환 (단 S440에서의 치환은 S440Y 또는 S440W임),
 - [0388] b) G236, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환(들)을 포함하고,
 - [0389] c) 여기서 제1 중쇄는 K409, T366, L368, K370, D399, F405 및 Y407로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 추가의 치환을 포함하고,
 - [0390] 제2 중쇄는 F405, T366, L368, K370, D399, Y407 및 K409로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 추가의 치환을 포함하고, 제1 폴리펩티드 내의 추가의 돌연변이는 제2 폴리펩티드 내의 추가의 돌연변이와 상이하다.
 - [0391] 한 측면에서, 본 발명은 제1 중쇄 및 제1 항원 결합 영역, 제2 중쇄 및 제2 항원 결합 영역을 포함하는 인간 IgG의 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체를 제공하며, 여기서 상기 제1 및 제2 중쇄는 a) E430, E345 및 S440으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 치환 (단 S440에서의 치환은 S440Y 또는 S440W임), b) G236, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환 및 c) 위치 F405 또는 K409에서의 추가의 치환을 포함하고, 여기서 추가의 치환은 제1 중쇄 및 제2 중쇄에서 상이하어, 제1 중쇄가 위치 F405에서의 치환을 갖는 경우에 제2 중쇄는 K409에서의 치환을 갖고 또한 그 반대의 경우이다.

- [0392] 제1 중쇄 및 제2 중쇄가, (c) 추가의 돌연변이가 제1 및 제2 중쇄 내의 동일한 위치에 위치하지 않는 것으로 인해 동일하지 않은 것인 실시양태가 본원에 제공된다.
- [0393] 본원에 기재된 본 발명의 임의의 실시양태가 하기 기재된 다중특이적 항체 측면에서 사용될 수 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0394] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명의 변이체는 단일특이적 항체, 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체로부터 선택된 항체이다.
- [0395] 특정한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 WO 2011/131746에 기재된 포맷을 갖는다.
- [0396] 본 발명의 한 특정한 실시양태에서, 제1 중쇄는 K409에 상응하는 추가의 치환, 예컨대 K409R을 포함하고;
- [0397] 제2 중쇄는 F405에 상응하는 추가의 치환, 예컨대 F405L을 포함한다.
- [0398] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 중쇄는
- [0399] a) 위치 E430에 상응하는 치환,
- [0400] b) G236, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환을 포함하고,
- [0401] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고; 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.
- [0402] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 중쇄는
- [0403] a) 위치 E345에 상응하는 치환,
- [0404] b) G236, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환을 포함하고,
- [0405] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고; 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.
- [0406] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 Fc 중쇄는
- [0407] a) S440Y 또는 S440W에 상응하는 치환,
- [0408] b) G236, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 위치(들)에서의 치환을 포함하고,
- [0409] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고; 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.
- [0410] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 Fc 중쇄는
- [0411] a) E430G에 상응하는 치환,
- [0412] b) K326W, E333S에 상응하는 2개의 치환을 포함하고,
- [0413] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고, 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.
- [0414] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 Fc 중쇄는
- [0415] a) E430G에 상응하는 치환,
- [0416] b) K326W, E333T에 상응하는 2개의 치환을 포함하고,
- [0417] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고, 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.
- [0418] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 Fc 영역은
- [0419] a) E430G에 상응하는 치환,

- [0420] b) K326A, E333A에 상응하는 2개의 치환을 포함하고,
- [0421] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고, 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.
- [0422] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 중쇄는
- [0423] a) E430G에 상응하는 치환,
- [0424] b) K333A, P396L에 상응하는 2개의 치환을 포함하고,
- [0425] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고, 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.
- [0426] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 중쇄는
- [0427] a) E430G에 상응하는 치환,
- [0428] b) K326A, E333A, P396L에 상응하는 3개의 치환을 포함하고,
- [0429] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고, 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.
- [0430] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 중쇄는
- [0431] a) E430G에 상응하는 치환,
- [0432] b) K326A, E333T, P396L에 상응하는 3개의 치환을 포함하고,
- [0433] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고, 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.
- [0434] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 중쇄는
- [0435] a) E345K에 상응하는 치환,
- [0436] b) K326W, E333S에 상응하는 2개의 치환을 포함하고,
- [0437] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고; 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.
- [0438] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 중쇄는
- [0439] a) E345K에 상응하는 치환,
- [0440] b) K326W, E333T에 상응하는 2개의 치환을 포함하고,
- [0441] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고; 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.
- [0442] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 중쇄는
- [0443] a) E345K에 상응하는 치환,
- [0444] b) K326A, E333A에 상응하는 2개의 치환을 포함하고,
- [0445] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고; 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.
- [0446] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 중쇄는
- [0447] a) E345K에 상응하는 치환,
- [0448] b) K333A, P396L에 상응하는 2개의 치환을 포함하고,
- [0449] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고; 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.

- [0450] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 중쇄는
- [0451] a) E345K에 상응하는 치환,
- [0452] b) K326A, E333A, P396L에 상응하는 3개의 치환을 포함하고,
- [0453] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고; 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.
- [0454] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 중쇄는
- [0455] a) E345K에 상응하는 치환,
- [0456] b) K326A, E333T, P396L에 상응하는 3개의 치환을 포함하고,
- [0457] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고; 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.
- [0458] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 중쇄는
- [0459] a) E345R에 상응하는 치환,
- [0460] b) K326W, E333S에 상응하는 2개의 치환을 포함하고,
- [0461] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고; 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.
- [0462] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 중쇄는
- [0463] a) E345R에 상응하는 치환,
- [0464] b) K326W, E333T에 상응하는 2개의 치환을 포함하고,
- [0465] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고; 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.
- [0466] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 중쇄는
- [0467] a) E345R에 상응하는 치환,
- [0468] b) K326A, E333A에 상응하는 2개의 치환을 포함하고,
- [0469] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고, 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.
- [0470] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 중쇄는
- [0471] a) E345R에 상응하는 치환,
- [0472] b) K333A, P396L에 상응하는 2개의 치환을 포함하고,
- [0473] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고, 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.
- [0474] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 중쇄는
- [0475] a) E345R에 상응하는 치환,
- [0476] b) K326A, E333A, P396L에 상응하는 3개의 치환을 포함하고,
- [0477] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고, 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.
- [0478] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 중쇄는
- [0479] a) S440Y에 상응하는 치환,
- [0480] b) K326W, E333S에 상응하는 2개의 치환을 포함하고,

- [0481] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고, 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.
- [0482] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 중쇄는
- [0483] a) S440Y에 상응하는 치환,
- [0484] b) K326W, E333T에 상응하는 2개의 치환을 포함하고,
- [0485] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고, 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.
- [0486] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 중쇄는
- [0487] a) S440Y에 상응하는 치환,
- [0488] b) K326A, E333A에 상응하는 2개의 치환을 포함하고,
- [0489] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고, 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.
- [0490] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 중쇄는
- [0491] a) S440Y에 상응하는 치환,
- [0492] b) K333A, P396L에 상응하는 2개의 치환을 포함하고,
- [0493] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고; 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.
- [0494] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 중쇄는
- [0495] a) S440Y에 상응하는 치환,
- [0496] b) K326A, E333A, P396L에 상응하는 3개의 치환을 포함하고,
- [0497] c) 여기서 제1 중쇄는 K409R에 상응하는 추가의 치환을 포함하고; 제2 중쇄는 F405L에 상응하는 추가의 치환을 포함한다.
- [0498] 표적 및 사용 방법
- [0499] 본 발명에 따른 폴리펩티드 또는 항체는 신호 전달 경로를 활성화시키는 표적에 결합할 수 있다. 한 실시양태에서, 표적은 신호 전달 경로를 활성화, 억제, 조정 및/또는 조절하는 표적이다. 본 발명에 따른 표적으로서 특히 적합할 수 있는 표적의 예는 세포 표면 수용체 및 리간드이다.
- [0500] 세포 표면 수용체는, 예를 들어 수용체 패밀리에 속하는 수용체, 예컨대 조혈 인자 수용체 패밀리에 속하는 수용체 패밀리에 속하는 수용체, 티로신 키나제 수용체 패밀리에 속하는 수용체 패밀리에 속하는 수용체, 세린/트레오닌 키나제 수용체 패밀리에 속하는 수용체 패밀리에 속하는 수용체, TNF 수용체 패밀리에 속하는 수용체 패밀리에 속하는 수용체, G 단백질-커플링된 수용체 패밀리에 속하는 수용체 패밀리에 속하는 수용체, GPI-앵커링된 수용체 패밀리에 속하는 수용체 패밀리에 속하는 수용체, 티로신 포스파타제 수용체 패밀리에 속하는 수용체 패밀리에 속하는 수용체, 부착 인자 패밀리에 속하는 수용체 패밀리에 속하는 수용체, 호르몬 수용체 패밀리에 속하는 수용체 패밀리에 속하는 수용체 및 그의 특징과 관련된 다양한 참고문헌이 이용가능하고, 예를 들어 문헌 [Cooke B A., King R J B., van der Molen H J. ed. *New Comprehensive Biochemistry Vol. 18B "Hormones and their Actions Part"* pp. 1-46 (1988) Elsevier Science Publishers BV., New York, USA; Patthy L. (1990) *Cell*, 61: 13-14; Ullrich A., et al. (1990) *Cell*, 61: 203-212; Massagui J. (1992) *Cell*, 69: 1067-1070; Miyajima A., et al. (1992) *Annu. Rev. Immunol.*, 10: 295-331; Taga T. and Kishimoto T. (1992) *FASEB J.*, 7: 3387-3396; Fantl W I., et al. (1993) *Annu. Rev. Biochem.*, 62: 453-481; Smith C A., et al. (1994) *Cell*, 76: 959-962; Flower D R. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, 1422: 207-234; and M. Miyasaka ed., *Cell Technology*, supplementary volume, Handbook series, "Handbook for Adhesion Factors" (1994) (Shujunsha, Tokyo, Japan)]을 포함한다.
- [0501] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼 패밀리에 속하는 수용체 패밀리에 속하는 수용체 (TNFR-SF) 또는 G-단백질 커플링된 수용체 (GPCR) 슈퍼패밀리에 속하는 수용체 패밀리에 속하는 수용체에 결합하는 항원 결합 영역을 포함한다.
- [0502] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는, 예를 들어 호르몬 수용체 및 시토카인 수용체를 포함한 세포 표면 수용체에 결합한다. 예시적인 시토카인 수용체는 예를 들어 조혈 인자 수용체, 림포카인 수용체, 성

장 인자 수용체, 분화 제어 인자 수용체 등을 포함한다. 시토카인 수용체의 예로는 에리트로포이에틴 (EPO) 수용체, 트롬보포이에틴 (TPO) 수용체, 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF) 수용체, 대식세포 콜로니 자극 인자 (M-CSF) 수용체, 과립상 대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF) 수용체, 종양 괴사 인자 (TNF) 수용체, 인터류킨-1 (IL-1) 수용체, 인터류킨-2 (IL-2) 수용체, 인터류킨-3 (IL-3) 수용체, 인터류킨-4 (IL-4) 수용체, 인터류킨-5 (IL-5) 수용체, 인터류킨-6 (IL-6) 수용체, 인터류킨-7 (IL-7) 수용체, 인터류킨-9 (IL-9) 수용체, 인터류킨-10 (IL-10) 수용체, 인터류킨-11 (IL-11) 수용체, 인터류킨-12 (IL-12) 수용체, 인터류킨-13 (IL-13) 수용체, 인터류킨-15 (IL-15) 수용체, 인터페론-알파 (IFN-알파) 수용체, 인터페론-베타 (IFN-베타) 수용체, 인터페론-감마 (IFN-감마) 수용체, 성장 호르몬 (GH) 수용체, 인슐린 수용체, 혈액 줄기 세포 증식 인자 (SCF) 수용체, 혈관 표피 성장 인자 (VEGF) 수용체, 표피 세포 성장 인자 (EGF) 수용체, 신경 성장 인자 (NGF) 수용체, 섬유모세포 성장 인자 (FGF) 수용체, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF) 수용체, 형질전환 성장 인자-베타 (TGF-베타) 수용체, 백혈구 이동 억제 인자 (LIF) 수용체, 섬유모 신경영양 인자 (CNTF) 수용체, 온코스타틴 M (OSM) 수용체, 및 Notch 패밀리 수용체가 있다.

[0503] 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 (TNFRSF)는 세포의 시스테인-풍부 도메인을 통해 종양 괴사 인자 슈퍼패밀리 (TNFSF)의 리간드에 결합하는 능력을 특징으로 하는 수용체 군이다. TNF 수용체는 원형질막에서 삼량체 복합체를 형성한다. TNFRSF는 하기 목록의 29종 단백질을 포함한다: TNFR1 (유니프روت(Uniprot) P19438), FAS (유니프روت P25445), DR3 (유니프روت Q93038), DR4(유니프روت O00220), DR5 (유니프روت O14763), DR6 (유니프روت O75509), NGFR (유니프روت P08138), EDAR (유니프روت Q9UNE0), DcR1 (유니프روت O14798), DcR2(유니프روت Q9UBN6), DcR3 (유니프روت O95407), OPG (유니프روت O00300), TROY (유니프روت Q9NS68), XEDAR (유니프روت Q9HAV5), LTbR (유니프روت P36941), HVEM (유니프روت Q92956), TWEAKR (유니프روت Q9NP84), CD120b (유니프روت P20333), OX40 (유니프روت P43489), CD40 (유니프روت P25942), CD27 (유니프روت P26842), CD30 (유니프روت P28908), 4-1BB (유니프روت Q07011), RANK (유니프روت Q9Y6Q6), TACI (유니프روت O14836), BlySR (유니프روت Q96RJ3), BCMA(유니프روت Q02223), GITR (유니프روت Q9Y5U5), RELT (유니프روت Q969Z4).

[0504] 일부 TNFRSF, 예컨대 FAS, DR4, DR5, TNFR1, DR6, DR3, EDAR 및 NGFR은 아포토시스에 관여하고, 세포내 사멸 도메인을 함유한다. 다른 TNFRSF, 예컨대 DcR1, DcR2, DcR3, OPG, TROY, XEDAR, LTbR, HVEM, TWEAKR, CD120b, OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, RANK, TACI, BlySR, BCMA, GITR, RELT는 다른 신호 전달 경로, 예컨대 증식, 생존 및 분화에 관여한다. TNF 수용체는 포유동물 내의 매우 다양한 조직에서, 특히 백혈구에서 발견된다.

[0505] 본 발명의 한 실시양태에서, 항원 결합 영역은 FAS, DR4, DR5, TNFR1, DR6, DR3, EDAR, NGFR, OX40, CD40, CD30, CD27, 4-1BB, RANK, TACI, BlySR, BCMA, RELT 및 GITR로 이루어진 군으로부터 선택된 TNFR-SF의 구성원에 결합한다.

[0506] 본 발명의 한 실시양태에서, 항원 결합 영역은 TNFR-SF의 구성원에 결합한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 항원 결합 영역은 세포내 사멸 도메인을 포함하지 않는 TNFR-SF의 구성원에 결합한다. 본 발명의 한 실시양태에서, TNFR-SF는 OX40, CD40, CD30, CD27, 4-1BB, RANK, TACI, BlySR, BCMA, RELT 및 GITR의 군으로부터 선택된다. 본 발명의 한 실시양태에서, TNFR-SF는 FAS, DR4, DR4, TNFR1, DR6, DR3, EDAR 및 NGFR의 군으로부터 선택된다.

[0507] 본 발명의 한 실시양태에서 항체는 OX40에 결합하는 항원 결합 영역을 포함하고, 여기서 IgG1 Fc 영역은

[0508] a. E430G 치환, 및

[0509] b. K326W 및 E333S 치환을 포함한다.

[0510] 본 발명의 한 실시양태에서 항체는 CD40에 결합하는 항원 결합 영역을 포함하고, 여기서 IgG1 Fc 영역은

[0511] a. E430G 치환, 및

[0512] b. K326W 및 E333S 치환을 포함한다.

[0513] 본 발명의 한 실시양태에서 항체는 CD137에 결합하는 항원 결합 영역을 포함하고, 여기서 IgG1 Fc 영역은

[0514] a. E430G 치환, 및

[0515] b. K326W 및 E333S 치환을 포함한다.

[0516] 본 발명의 한 실시양태에서 항체는 GITR에 결합하는 항원 결합 영역을 포함하고, 여기서 IgG Fc 영역은

- [0517] a. E430G 치환, 및
- [0518] b. K326W 및 E333S 치환을 포함한다.
- [0519] 본 발명의 한 실시양태에서 항체는 GITR에 결합하는 항원 결합 영역을 포함하고, 여기서 IgG1 Fc 영역은
- [0520] a. E430G 치환, 및
- [0521] b. K326W 및 E333S 치환을 포함한다.
- [0522] 본 발명의 한 실시양태에서 항체는 GITR에 결합하는 항원 결합 영역을 포함하고, 여기서 IgG2 Fc 영역은
- [0523] a. E430G 치환, 및
- [0524] b. K326W 및 E333S 치환을 포함한다.
- [0525] 본 발명에 따른 폴리펩티드 또는 항체는 임의의 표적에 결합할 수 있고, 본 발명에 따른 이러한 표적 또는 항원의 예는 다음과 같을 수 있다: TNFR1, FAS, DR3, DR4, DR5, DR6, NGFR, EDAR, DcR1, DcR2, DcR3, OPG, TROY, XEDAR, LTbR, HVEM, TWEAKR, CD120b, OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, RANK, TACI, BLySR, BCMA, GITR, RELT.
- [0526] 본 발명의 한 실시양태에서 항체는 FAS에 결합하는 항원 결합 영역을 포함하고, 여기서 IgG1 Fc 영역은
- [0527] a. E430G 치환, 및
- [0528] b. K326W 및 E333S 치환을 포함한다.
- [0529] 본 발명의 한 실시양태에서 항체는 DR5에 결합하는 항원 결합 영역을 포함하고, 여기서 IgG1 Fc 영역은
- [0530] a. E430G 치환, 및
- [0531] b. K326A 및 E333A 치환을 포함한다.
- [0532] 본 발명의 한 실시양태에서 항체는 DR5에 결합하는 항원 결합 영역을 포함하고, 여기서 IgG1 Fc 영역은
- [0533] a. E430G 치환, 및
- [0534] b. K326A 및 E333T 치환을 포함한다.
- [0535] 본 발명의 한 실시양태에서 항체는 DR5에 결합하는 항원 결합 영역을 포함하고, 여기서 IgG1 Fc 영역은
- [0536] a. E430G 치환, 및
- [0537] b. K326A 치환을 포함한다.
- [0538] 본 발명의 한 실시양태에서 항체는 DR5에 결합하는 항원 결합 영역을 포함하고, 여기서 IgG1 Fc 영역은
- [0539] a. E430G 치환, 및
- [0540] b. E333A 치환을 포함한다.
- [0541] 본 발명의 한 실시양태에서 항체는 DR5에 결합하는 항원 결합 영역을 포함하고, 여기서 IgG1 Fc 영역은
- [0542] a. E430G 치환, 및
- [0543] b. K326W 및 E333S 치환을 포함한다.
- [0544] 본 발명의 한 실시양태에서, 항체는 CD20에 결합하는 항원 결합 영역을 포함하고, 여기서 IgG1 Fc 영역은
- [0545] a. E430G 치환, 및
- [0546] b. K326W 및 E333S 치환을 포함한다.
- [0547] 본 발명의 한 실시양태에서, 항원 결합 영역은 종양 괴사 인자 슈퍼패밀리 (TNF-SF)의 구성원에 결합한다.
- [0548] 본 발명의 한 실시양태에서, 항원 결합 영역은 림프독소 베타 (TNF-C), OX40L, CD154, FasL, CD70, CD153, RANKL, APRIL 및 BAFF로 이루어진 군으로부터 선택된 TNF-SF의 구성원에 결합한다.
- [0549] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는, 예를 들어 호르몬 수용체 및 시토카인 수용체를 포함한 세포 표면 수용체에 결합한다. 예시적인 시토카인 수용체는 예를 들어 조혈 인자 수용체, 림포카인 수용체, 성

장 인자 수용체, 분화 제어 인자 수용체 등을 포함한다. 시토카인 수용체의 예로는 에리트로포이에틴 (EPO) 수용체, 트롬보포이에틴 (TPO) 수용체, 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF) 수용체, 대식세포 콜로니 자극 인자 (M-CSF) 수용체, 과립상 대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF) 수용체, 종양 괴사 인자 (TNF) 수용체, 인터류킨-1 (IL-1) 수용체, 인터류킨-2 (IL-2) 수용체, 인터류킨-3 (IL-3) 수용체, 인터류킨-4 (IL-4) 수용체, 인터류킨-5 (IL-5) 수용체, 인터류킨-6 (IL-6) 수용체, 인터류킨-7 (IL-7) 수용체, 인터류킨-9 (IL-9) 수용체, 인터류킨-10 (IL-10) 수용체, 인터류킨-11 (IL-11) 수용체, 인터류킨-12 (IL-12) 수용체, 인터류킨-13 (IL-13) 수용체, 인터류킨-15 (IL-15) 수용체, 인터페론-알파 (IFN-알파) 수용체, 인터페론-베타 (IFN-베타) 수용체, 인터페론-감마 (IFN-감마) 수용체, 성장 호르몬 (GH) 수용체, 인슐린 수용체, 혈액 줄기 세포 증식 인자 (SCF) 수용체, 혈관 표피 성장 인자 (VEGF) 수용체, 표피 세포 성장 인자 (EGF) 수용체, 신경 성장 인자 (NGF) 수용체, 섬유모세포 성장 인자 (FGF) 수용체, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF) 수용체, 형질전환 성장 인자-베타 (TGF-베타) 수용체, 백혈구 이동 억제 인자 (LIF) 수용체, 섬유모 신경영양 인자 (CNTF) 수용체, 온코스타틴 M (OSM) 수용체, 및 Notch 패밀리 수용체가 있다.

- [0550] 본 발명의 한 실시양태에서, 항원 결합 영역은 CTLA-4, PD1, TIM-3, LAG-3, ICOS, CD28 및 PDL-1로 이루어진 군으로부터 선택된 세포 표면 수용체에 결합한다.
- [0551] 본 발명에 따른 폴리펩티드 또는 항체는 임의의 표적에 결합할 수 있고, 이러한 표적 또는 항원의 예는 상기에 기재되어 있다.
- [0552] 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 방법
- [0553] 폴리펩티드 또는 항체와 관련하여 하기 기재된 실시양태는 이뮤노글로불린의 Fc 영역 및 항원-결합 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체를 지칭하고, 폴리펩티드 또는 항체는 또한 이뮤노글로불린의 제1 Fc 영역 및 제1 항원-결합 영역을 갖는 다중특이적 폴리펩티드 또는 항체, 및 이뮤노글로불린의 제2 Fc 영역 및 제2 항원-결합 영역을 갖는 제2 폴리펩티드 또는 항체일 수 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0554] 한 측면에서, 본 발명은 Fc-Fc 증진 치환 및 C1q 결합 치환을 도입함으로써 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.
- [0555] 한 측면에서, 본 발명은 a) E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 적어도 1개의 치환을 도입하는 것, 및 b) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환을 도입하는 것을 포함하고, 여기서 위치는 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1에 상응하는 것인, 인간 이뮤노글로불린의 Fc 영역 및 항원 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.
- [0556] a) 하기 위치 E430, E345 또는 S440 중 하나에서의 본 발명에 따른 적어도 1개의 치환을 도입하는 것은 폴리펩티드 또는 항체의 증진된 Fc-Fc 상호작용의 효과를 가져온다. b) 하기 위치 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396 중 하나에서의 본 발명에 따른 1개 이상의 치환을 도입하는 것은 폴리펩티드 또는 항체에 증가된 효능작용 활성의 효과를 가져온다.
- [0557] 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간 이뮤노글로불린의 Fc 영역 및 항원 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 a) E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 적어도 1개의 치환을 포함하고, 방법은 b) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환을 도입하는 것을 포함하고, 여기서 위치는 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1에 상응한다.
- [0558] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 이뮤노글로불린의 Fc 영역 및 항원 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 a) E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 적어도 1개의 치환을 포함하고, 방법은 b) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 적어도 2개의 치환을 도입하는 것을 포함하고, 여기서 위치는 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1에 상응한다.
- [0559] 본 발명에 따른 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 것은 모 폴리펩티드 또는 항체와 비교하여 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 것으로 이해되어야 하고, 대안적으로 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 것은 또한 폴리펩티드 또는 항체가 Fc-Fc 증진 돌연변이를 포함하지만 C1q 결합 돌연변이는 포함하지 않는 폴리펩티드 또는 항체와 비교되는 경우를 지칭할 수 있다. 따라서, 폴리펩티드 또는 항체는 Fc-Fc 증진 치환이 없고 C1q 결합 치환이 없는 동일한 항원 결합 영역 및 Fc 영역을 갖는 모 폴리

펩티드 또는 모 항체와 비교될 수 있고, 대안적으로 폴리펩티드 또는 항체는 Fc-Fc 증진 치환을 갖지만 C1q 결합 치환은 없는 동일한 항원 결합 영역 및 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드 또는 항체와 비교될 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

- [0560] 본 발명의 한 실시양태에서, G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환(들)이 존재하며, 단 위치 G236에서의 치환은 G236F, G236R, G236Y가 아니다.
- [0561] 본 발명의 한 실시양태에서, G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환(들)이 존재하며, 단 위치 S267에서의 치환은 S267H, S267I, S267K, S267G가 아니다.
- [0562] 본 발명의 한 실시양태에서, G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환(들)이 존재하며, 단 위치 H268에서의 치환은 H268K, H268D, H268E가 아니다.
- [0563] 본 발명의 한 실시양태에서, 적어도 1개의 치환은 E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W 및 S440Y로 이루어진 군으로부터 선택된다. 치환이 Fc-Fc 상호작용을 증진시키는 실시양태가 본원에 제공된다.
- [0564] 본 발명의 한 실시양태에서, 적어도 1개의 치환은 E430G, E430S, E430F, E430T로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0565] 본 발명의 한 실시양태에서, 적어도 1개의 치환은 E345K, E345Q, E345R, E345Y로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0566] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 적어도 E430G 치환을 갖는다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 적어도 E345K 치환을 갖는다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 적어도 E345R 치환을 갖는다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 적어도 S440Y 치환을 갖는다.
- [0567] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E430G, E430S, E430F 및 E430T로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 치환을 포함하고, 방법은 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.
- [0568] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E430G, E430S, E430F 및 E430T로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 치환을 포함하고, 방법은 K326A, K326W, E333A, E333S, E333T 및 P396L의 군으로부터 선택된 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.
- [0569] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E430G 치환을 포함하고, 방법은 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.
- [0570] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E430G 치환을 포함하고, 방법은 K326A, K326W, E333A, E333S, E333T 및 P396L의 군으로부터 선택된 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.
- [0571] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E430G 치환을 포함하고, 방법은 하기로 이루어진 군 중 하나로부터의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다:
- [0572] i) K326W 및 E333S,
- [0573] ii) K326W 및 E333T,
- [0574] iii) K326A 및 E333A,
- [0575] iv) K326A, E333A 및 P396L,
- [0576] v) K326W,

- [0577] vi) E333S, 및
- [0578] vii) E333T.
- [0579] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E345K, E345Q, E345R 및 E345Y로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 치환을 포함하고, 방법은 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.
- [0580] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E345K, E345Q, E345R 및 E345Y로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 치환을 포함하고, 방법은 K326A, K326W, E333A, E333S, E333T 및 P396L의 군으로부터 선택된 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.
- [0581] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E345K 치환을 포함하고, G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.
- [0582] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E345K 치환을 포함하고, 방법은 K326A, K326W, E333A, E333S, E333T 및 P396L의 군으로부터 선택된 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.
- [0583] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E345K 치환을 포함하고, 방법은 하기로 이루어진 군 중 하나로부터의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다:
- [0584] i) K326W 및 E333S,
- [0585] ii) K326W 및 E333T,
- [0586] iii) K326A 및 E333A,
- [0587] iv) K326A, E333A 및 P396L,
- [0588] v) K326W,
- [0589] vi) E333S, 및
- [0590] vii) E333T.
- [0591] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E345R 치환을 포함하고, 방법은 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.
- [0592] 한 실시양태에서, 본 발명은 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E345R 치환을 포함하고, 방법은 K326A, K326W, E333A, E333S, E333T 및 P396L의 군으로부터 선택된 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.
- [0593] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E345R 치환을 포함하고, 방법은 하기로 이루어진 군 중 하나로부터의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다:
- [0594] i) K326W 및 E333S,
- [0595] ii) K326W 및 E333T,
- [0596] iii) K326A 및 E333A,
- [0597] iv) K326A, E333A 및 P396L,
- [0598] v) K326W,
- [0599] vi) E333S, 및

- [0600] vii) E333T.
- [0601] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 S440Y 및 S440W로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 치환을 포함하고, 방법은 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.
- [0602] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 S440W 및 S440W로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 치환을 포함하고, 방법은 K326A, K326W, E333A, E333S, E333T 및 P396L로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.
- [0603] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 S440Y 치환을 포함하고, 방법은 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환(들)을 포함한다.
- [0604] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 S440Y 치환을 포함하고, 방법은 K326A, K326W, E333A, E333S, E333T 및 P396L의 군으로부터 선택된 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.
- [0605] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 S440Y 치환을 포함하고, 방법은 하기로 이루어진 군 중 하나로부터의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다:
- [0606] i) K326W 및 E333S,
- [0607] ii) K326W 및 E333T,
- [0608] iii) K326A 및 E333A,
- [0609] iv) K326A, E333A 및 P396L,
- [0610] v) K326W,
- [0611] vi) E333S, 및
- [0612] vii) E333T.
- [0613] 세포 표면 항원 결합 시에 폴리펩티드 또는 항체의 증가된 효능작용 특성을 가능하게 하는 실시양태가 본원에 제공된다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 증가된 효능작용 특성을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 제1 중쇄 및 제2 중쇄를 포함하는 Fc 영역을 포함하고, 여기서 상기 언급된 치환 중 1개가 제1 및/또는 제2 중쇄에 존재할 수 있다.
- [0614] 본 발명의 한 실시양태에서, K326, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환이 존재한다. 본 발명의 한 실시양태에서, K326, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환, 예컨대 2 또는 3개의 치환이 존재한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 K326 및 E333에서의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 K326 및 P396에서의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 P396 및 E333에서의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 K326, E333 및 P396에서의 치환을 포함한다.
- [0615] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326A, K326W, E333S, E333A 및 P396L로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상, 예컨대 2 또는 3개의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326A 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326W 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E333S 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E333A 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 P396L 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326W 및 E333S의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326W 및 E333A의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326W 및 P396L의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326A 및 E333A의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326A 및

E333S의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326A 및 P396L의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E333A 및 P396L의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E333S 및 P396L의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326A, E333A 및 P396L의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326S, E333A 및 P396L의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326W, E333A 및 P396L의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326W, E333S 및 P396L의 치환을 포함한다.

[0616] 본 발명의 한 실시양태에서, S267, H268 및 S324로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환이 존재한다. 본 발명의 한 실시양태에서, S267, H268 및 S324로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환, 예컨대 2 또는 3개의 치환이 존재한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 S267 및 H268에서의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 S267 및 S324에서의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 H268 및 S324에서의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 S267, H268 및 S324에서의 치환을 포함한다.

[0617] 본 발명의 한 실시양태에서, S267E, H268F 및 S324T로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환이 존재한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S267E, H268F 및 S324T로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상, 예컨대 2 또는 3개의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S267E 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 H268F 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S324T 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S267E 및 H268F의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S267E 및 S324T의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 H268F 및 S324T의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S267E, H268F 및 S324T의 치환을 포함한다.

[0618] 한 실시양태에서, 본 발명은 Fc 영역이 1개 이상의 추가의 치환을 포함하는 것인 방법에 관한 것이다.

[0619] 한 실시양태에서, 본 발명은 Fc 영역이 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1에서의 하기 위치: S440 또는 K439에서의 추가의 치환을 포함하는 것인 방법에 관한 것이다. 본 발명의 한 실시양태에서, Fc 영역은 하기 위치 S440 또는 K439 중 하나에 상응하는 추가의 치환을 포함하며, 단 Fc-Fc 증진 치환이 S440에서의 것인 경우 추가의 치환은 위치 S440에서의 것이 아니다. 본 발명에 따른 Fc-Fc 증진 치환 및 C1q 결합 치환, 및 위치 S440에서의 추가의 치환, 예컨대 S440K를 포함하는 폴리펩티드 또는 항체는 위치 S440에서의 돌연변이, 예컨대 S440K를 포함하는 폴리펩티드 또는 항체와 올리고머를 형성하지 않는다. 본 발명에 따른 Fc-Fc 증진 치환 및 C1q 결합 치환, 및 위치 K439에서의 추가의 치환, 예컨대 K439E를 포함하는 폴리펩티드 또는 항체는 위치 K439에서의 돌연변이, 예컨대 K439E를 포함하는 폴리펩티드 또는 항체와 올리고머를 형성하지 않는다. 제1 폴리펩티드 또는 항체가 K439E 치환을 포함하고 제2 폴리펩티드 또는 항체가 S440K 치환을 포함하는 것인 폴리펩티드들 또는 항체들 사이의 올리고머의 형성을 가능하게 하는 방법이 본원에 제공된다. 이러한 방식으로 올리고머, 예컨대 예를 들어 육량체가 제1 및 제2 폴리펩티드의 특정 패턴으로 형성되도록 강제될 수 있다. 이것은 폴리펩티드가 상이한 표적 또는 에피토프에 결합하고 이들 상이한 표적 또는 에피토프의 조합에서 올리고머가 형성되어야 하는 방법에서 관심대상일 수 있다.

[0620] 한 실시양태에서, 본 발명은 추가의 치환이 S440K 또는 K439E로부터 선택되는 것인 방법에 관한 것이다.

[0621] 한 실시양태에서, 본 발명은 효능작용 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 효능작용 활성은 폴리펩티드 또는 항체와 동일한 모 폴리펩티드 또는 모 항체 또는 대안적으로 동일한 Fc-Fc 증진 치환을 갖지만 C1q 결합 치환은 없는 폴리펩티드 또는 항체와 비교하여 적어도 20% 증가된다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 모 폴리펩티드 또는 모 항체 또는 대안적으로 동일한 Fc-Fc 증진 치환을 갖지만 C1q 결합 치환은 없는 폴리펩티드 또는 항체와 비교하여 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%의 증가된 효능작용 활성을 갖는다.

[0622] CDC 활성을 증가시키는 방법

[0623] 한 측면에서, 본 발명은 Fc-Fc 증진 치환 및 C1q 결합 치환을 도입함으로써 폴리펩티드 또는 항체의 CDC 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

- [0624] 한 측면에서, 본 발명은 a) E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 적어도 1개의 치환을 도입하는 것, 및 b) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환을 도입하는 것을 포함하고, 여기서 위치는 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1에 상응하는 것인, 인간 이뮤노글로불린의 Fc 영역 및 항원 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체의 CDC 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.
- [0625] a) 하기 위치 E430, E345 또는 S440 중 하나에서의 본 발명에 따른 적어도 1개의 치환을 도입하는 것은 폴리펩티드 또는 항체의 증진된 Fc-Fc 상호작용의 효과를 가져온다. b) 하기 위치 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396 중 하나에서의 본 발명에 따른 1개 이상의 치환을 도입하는 것은 폴리펩티드 또는 항체에 증가된 CDC 활성의 효과를 가져온다.
- [0626] 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간 이뮤노글로불린의 Fc 영역 및 항원 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체의 CDC 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 a) E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 적어도 1개의 치환을 포함하고, 방법은 b) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환을 도입하는 것을 포함하고, 여기서 위치는 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1에 상응한다.
- [0627] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 이뮤노글로불린의 Fc 영역 및 항원 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체의 CDC 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 a) E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 적어도 1개의 치환을 포함하고, 방법은 b) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 적어도 2개의 치환을 도입하는 것을 포함하고, 여기서 위치는 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1에 상응한다.
- [0628] 본 발명에 따른 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 것은 모 폴리펩티드 또는 항체와 비교하여 폴리펩티드 또는 항체의 CDC 활성을 증가시키는 것으로 이해되어야 하고, 대안적으로 폴리펩티드 또는 항체의 효능작용 활성을 증가시키는 것은 또한 폴리펩티드 또는 항체가 Fc-Fc 증진 돌연변이를 포함하지만 C1q 결합 돌연변이는 포함하지 않는 폴리펩티드 또는 항체와 비교되는 경우를 지칭할 수 있다. 따라서, 폴리펩티드 또는 항체는 Fc-Fc 증진 치환이 없고 C1q 결합 치환이 없는 동일한 항원 결합 영역 및 Fc 영역을 갖는 모 폴리펩티드 또는 모 항체와 비교될 수 있고, 대안적으로 폴리펩티드 또는 항체는 Fc-Fc 증진 치환을 갖지만 C1q 결합 치환은 없는 동일한 항원 결합 영역 및 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드 또는 항체와 비교될 수 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0629] 본 발명의 한 실시양태에서, G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환(들)이 존재하며, 단 위치 G236에서의 치환은 G236F, G236R, G236Y가 아니다.
- [0630] 본 발명의 한 실시양태에서, G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환(들)이 존재하며, 단 위치 S267에서의 치환은 S267H, S267I, S267K, S267G가 아니다.
- [0631] 본 발명의 한 실시양태에서, G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환(들)이 존재하며, 단 위치 H268에서의 치환은 H268K, H268D, H268E가 아니다.
- [0632] 본 발명의 한 실시양태에서, 적어도 1개의 치환은 E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W 및 S440Y로 이루어진 군으로부터 선택된다. 치환이 Fc-Fc 상호작용을 증진시키는 실시양태가 본원에 제공된다.
- [0633] 본 발명의 한 실시양태에서, 적어도 1개의 치환은 E430G, E430S, E430F, E430T로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0634] 본 발명의 한 실시양태에서, 적어도 1개의 치환은 E345K, E345Q, E345R, E345Y로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0635] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 적어도 E430G 치환을 갖는다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 적어도 E345K 치환을 갖는다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 적어도 E345R 치환을 갖는다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 적어도 S440Y 치환을 갖는다.
- [0636] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 CDC 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영

역은 E430G, E430S, E430F 및 E430T로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 치환을 포함하고, 방법은 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.

[0637] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 CDC 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E430G, E430S, E430F 및 E430T로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 치환을 포함하고, 방법은 K326A, K326W, E333A, E333S, E333T 및 P396L의 군으로부터 선택된 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.

[0638] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 CDC 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E430G 치환을 포함하고, 방법은 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.

[0639] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 CDC 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E430G 치환을 포함하고, 방법은 K326A, K326W, E333A, E333S, E333T 및 P396L의 군으로부터 선택된 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.

[0640] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 CDC 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E430G 치환을 포함하고, 방법은 하기로 이루어진 군 중 하나로부터의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다:

[0641] i) K326W 및 E333S,

[0642] ii) K326W 및 E333T,

[0643] iii) K326A 및 E333A,

[0644] iv) K326A, E333A 및 P396L,

[0645] v) K326W,

[0646] vi) E333S, 및

[0647] vii) E333T.

[0648] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 CDC 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E345K, E345Q, E345R 및 E345Y로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 치환을 포함하고, 방법은 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.

[0649] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 CDC 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E345K, E345Q, E345R 및 E345Y로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 치환을 포함하고, 방법은 K326A, K326W, E333A, E333S, E333T 및 P396L의 군으로부터 선택된 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.

[0650] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 CDC 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E345K 치환을 포함하고, 방법은 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.

[0651] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 CDC 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E345K 치환을 포함하고, 방법은 K326A, K326W, E333A, E333S, E333T 및 P396L의 군으로부터 선택된 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.

[0652] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 CDC 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E345K 치환을 포함하고, 방법은 하기로 이루어진 군 중 하나로부터의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다:

[0653] i) K326W 및 E333S,

[0654] ii) K326W 및 E333T,

[0655] iii) K326A 및 E333A,

[0656] iv) K326A, E333A 및 P396L,

- [0657] v) K326W,
- [0658] vi) E333S, 및
- [0659] vii) E333T.
- [0660] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 CDC 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E345R 치환을 포함하고, 방법은 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.
- [0661] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 CDC 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E345R 치환을 포함하고, 방법은 K326A, K326W, E333A, E333S, E333T 및 P396L의 군으로부터 선택된 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.
- [0662] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 CDC 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 E345R 치환을 포함하고, 방법은 하기로 이루어진 군 중 하나로부터의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다:
- [0663] i) K326W 및 E333S,
- [0664] ii) K326W 및 E333T,
- [0665] iii) K326A 및 E333A,
- [0666] iv) K326A, E333A 및 P396L,
- [0667] v) K326W,
- [0668] vi) E333S, 및
- [0669] vii) E333T.
- [0670] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 CDC 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 S440Y 및 S440W로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 치환을 포함하고, 방법은 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.
- [0671] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 CDC 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 S440W 및 S440W로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 치환을 포함하고, 방법은 K326A, K326W, E333A, E333S, E333T 및 P396L의 군으로부터 선택된 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.
- [0672] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 CDC 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 S440Y 치환을 포함하고, 방법은 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396의 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환(들)을 포함한다.
- [0673] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 CDC 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 S440Y 치환을 포함하고, 방법은 K326A, K326W, E333A, E333S, E333T 및 P396L의 군으로부터 선택된 1개 이상의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다.
- [0674] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드 또는 항체의 CDC 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 Fc 영역은 S440Y 치환을 포함하고, 방법은 하기로 이루어진 군 중 하나로부터의 치환(들)을 도입하는 것을 포함한다:
- [0675] i) K326W 및 E333S,
- [0676] ii) K326W 및 E333T,
- [0677] iii) K326A 및 E333A,
- [0678] iv) K326A, E333A 및 P396L,
- [0679] v) K326W,
- [0680] vi) E333S, 및
- [0681] vii) E333T.

- [0682] 세포 표면 항원 결합 시에 폴리펩티드 또는 항체의 증가된 CDC 활성을 가능하게 하는 실시양태가 본원에 제공된다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 증가된 CDC 활성을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 제1 중쇄 및 제2 중쇄를 포함하는 Fc 영역을 포함하고, 여기서 상기 언급된 치환 중 1개가 제1 및/또는 제2 중쇄에 존재할 수 있다.
- [0683] 본 발명의 한 실시양태에서, K326, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환이 존재한다. 본 발명의 한 실시양태에서, K326, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환, 예컨대 2 또는 3개의 치환이 존재한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 K326 및 E333에서의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 K326 및 P396에서의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 P396 및 E333에서의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 K326, E333 및 P396에서의 치환을 포함한다.
- [0684] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326A, K326W, E333S, E333A 및 P396L로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상, 예컨대 2 또는 3개의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326A 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326W 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E333S 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E333A 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 P396L 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326W 및 E333S의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326W 및 P396L의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326A 및 E333A의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326A 및 E333S의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326A 및 P396L의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E333A 및 P396L의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 E333S 및 P396L의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326A, E333A 및 P396L의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326S, E333A 및 P396L의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326W, E333A 및 P396L의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 K326W, E333S 및 P396L의 치환을 포함한다.
- [0685] 본 발명의 한 실시양태에서, S267, H268 및 S324로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환이 존재한다. 본 발명의 한 실시양태에서, S267, H268 및 S324로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환, 예컨대 2 또는 3개의 치환이 존재한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 S267 및 H268에서의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 S267 및 S324에서의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 H268 및 S324에서의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 위치 S267, H268 및 S324에서의 치환을 포함한다.
- [0686] 본 발명의 한 실시양태에서, S267E, H268F 및 S324T로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환이 존재한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S267E, H268F 및 S324T로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상, 예컨대 2 또는 3개의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S267E 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 H268F 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S324T 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S267E 및 H268F의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S267E 및 S324T의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 H268F 및 S324T의 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 항체는 S267E, H268F 및 S324T의 치환을 포함한다.
- [0687] 조성물
- [0688] 폴리펩티드 또는 항체와 관련하여 하기 기재된 실시양태는 이뮤노글로불린의 Fc 영역 및 항원-결합 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체를 지칭하고, 폴리펩티드 또는 항체는 또한 이뮤노글로불린의 제1 Fc 영역 및 제1 항원-결합 영역을 갖는 다중특이적 폴리펩티드 또는 항체, 및 이뮤노글로불린의 제2 Fc 영역 및 제2 항원-결합 영역을 갖는 제2 폴리펩티드 또는 항체일 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

- [0689] 본 발명은 또한 본원에 기재된 폴리펩티드 또는 항체 및 그의 변이를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 구체적인 측면 및 실시양태가 하기 기재될 것이다. 또한, 이러한 폴리펩티드 또는 항체는 본원에 기재된 임의의 방법에 따라 수득될 수 있다.
- [0690] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 적어도 1종의 폴리펩티드 또는 항체를 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0691] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 본원에 기재된 임의의 측면 또는 실시양태에 따른 1종 이상의 폴리펩티드 또는 항체를 포함한다.
- [0692] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 본원의 임의의 측면 또는 실시양태에 기재된 바와 같은 제1 폴리펩티드 또는 항체 및 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함한다.
- [0693] 본 발명의 한 측면에서, 조성물은 제1 및 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 폴리펩티드 또는 항체는
- [0694] (i) Fc-Fc 증진 돌연변이인 적어도 1개의 치환; 및
- [0695] (ii) C1q 결합 치환인 1개 이상의 치환; 및
- [0696] (iii) 동일한 추가의 돌연변이를 갖는 Fc 영역들 사이의 올리고머화를 방지하는 추가의 돌연변이를 포함하는 Fc 영역을 포함하고, 여기서 제1 및 제2 폴리펩티드 또는 항체는 동일한 추가의 돌연변이를 포함하지는 않는다.
- [0697] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 폴리펩티드 또는 항체 및 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 폴리펩티드 또는 항체는 i) E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개 이상의 치환, 및 ii) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환, 및 iii) 추가의 돌연변이를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 폴리펩티드 또는 항체는 동일한 추가의 돌연변이를 포함하지는 않는다. 따라서, 조성물은 제1 Fc 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 및 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함한다.
- [0698] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원-결합 영역 및 제1 Fc 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 제2 항원-결합 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 영역은
- [0699] (i) E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개 이상의 치환; 및
- [0700] (ii) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환; 및
- [0701] (iii) 위치 K439 또는 S440에서 추가의 치환을 포함하며, 단 추가의 치환이 S440에서의 것인 경우, (i)에 따른 치환은 S440에서의 것이 아니고, 단 제1 및 제2 Fc 영역은 동일한 아미노산 위치에서 (iii)에 따른 추가의 치환을 포함하지 않고,
- [0702] (iv) 여기서 치환은 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 내의 아미노산 위치에 상응한다.
- [0703] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원 결합 영역 및 제1 Fc 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 제2 항원 결합 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 영역은 (i) 제1 돌연변이, (ii) 제2 돌연변이, (iii) 추가의 돌연변이를 포함하고, 여기서 돌연변이는 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 내의 하기 아미노산 위치:
- [0704] (i) E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개 이상의 치환; 및
- [0705] (ii) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환; 및
- [0706] (iii) 제1 Fc 영역 내의 위치 K439에서의 추가의 치환 및 제2 Fc 영역 내의 위치 S440에서의 추가의 치환, 또는 그 반대의 경우에 상응하며, 단 추가의 치환이 S440에서의 것인 경우, 제1 치환은 S440에서의 것이 아니고,
- [0707] (iv) 여기서 치환은 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 내의 아미노산 위치에 상응한다.
- [0708] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원-결합 영역 및 제1 Fc 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 제2 항원-결합 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 및 제2

Fc 영역은

- [0709] (i) E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 치환; 및
- [0710] (ii) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환; 및
- [0711] (iii) 제1 Fc 영역 내의 추가의 K439E 치환 및 제2 Fc 영역 내의 추가의 S440K 치환을 포함하고,
- [0712] (iv) 여기서 치환은 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 내의 아미노산 위치에 상응한다.
- [0713] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원-결합 영역 및 제1 Fc 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 제2 항원-결합 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 영역은
- [0714] (i) E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 치환; 및
- [0715] (ii) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환; 및
- [0716] (iii) 제1 Fc 영역 내의 추가의 S440K 치환 및 제2 Fc 영역 내의 추가의 K439E 치환을 포함하고,
- [0717] (iv) 여기서 치환은 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 내의 아미노산 위치에 상응한다.
- [0718] 제1 및 제2 폴리펩티드 또는 항체 둘 다가 증가된 효능작용 활성 및/또는 CDC 활성을 갖거나, 또는 단지 제1 또는 제2 폴리펩티드만이 증가된 효능작용 활성 및/또는 CDC 활성을 갖는 것인 실시양태가 본원에 제공된다.
- [0719] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원-결합 영역 및 제1 Fc 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 제2 항원-결합 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 영역은
- [0720] (i) E430에 상응하는 아미노산 위치에서의 치환, 및
- [0721] (ii) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환; 및
- [0722] (iii) 제1 Fc 영역 내의 추가의 K439E 치환 및 제2 Fc 영역 내의 추가의 S440K 치환, 또는 그 반대의 경우를 포함한다.
- [0723] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원-결합 영역 및 제1 Fc 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 제2 항원-결합 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 영역은
- [0724] i) E345에 상응하는 아미노산 위치에서의 치환, 및
- [0725] ii) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환; 및
- [0726] iii) 제1 Fc 영역 내의 추가의 K439E 치환 및 제2 Fc 영역 내의 추가의 S440K 치환, 또는 그 반대의 경우를 포함한다.
- [0727] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원-결합 영역 및 제1 Fc 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 제2 항원-결합 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 영역은
- [0728] i) E430G, 및
- [0729] ii) K326W, K326A, E333S, E333A, P396L, S267E, H268F, S324T, G263A, S324E, I332E 및 S239D로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 치환; 및
- [0730] iii) 제1 Fc 영역 내의 추가의 K439E 치환 및 제2 Fc 영역 내의 추가의 S440K 치환, 또는 그 반대의 경우를 포함한다.
- [0731] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원-결합 영역 및 제1 Fc 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항

체, 제2 항원-결합 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 영역은

- [0732] i) E430G, 및
- [0733] ii) K326W, K326A, E333S, E333A 및 P396L로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 치환; 및
- [0734] iii) 제1 Fc 영역 내의 추가의 K439E 치환 및 제2 Fc 영역 내의 추가의 S440K 치환, 또는 그 반대의 경우를 포함한다.
- [0735] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원-결합 영역 및 제1 Fc 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 제2 항원-결합 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 영역은
- [0736] i) E430G, 및
- [0737] ii) K326W, K326A, E333S, E333A 및 P396L로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 2개의 치환; 및
- [0738] iii) 제1 Fc 영역 내의 추가의 K439E 치환 및 제2 Fc 영역 내의 추가의 S440K 치환, 또는 그 반대의 경우를 포함한다.
- [0739] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원-결합 영역 및 제1 Fc 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 제2 항원-결합 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 영역은
- [0740] i) E430G 치환, 및
- [0741] ii) K326W 및 E333S 치환; 및
- [0742] iii) 제1 Fc 영역 내의 추가의 K439E 치환 및 제2 Fc 영역 내의 추가의 S440K 치환, 또는 그 반대의 경우를 포함한다.
- [0743] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원-결합 영역 및 제1 Fc 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 제2 항원-결합 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 영역은
- [0744] i) E345K, 및
- [0745] ii) K326W, K326A, E333S, E333A, P396L, S267E, H268F, S324T, G263A, S324E, I332E 및 S239D로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 치환; 및
- [0746] iii) 제1 Fc 영역 내의 추가의 K439E 치환 및 제2 Fc 영역 내의 추가의 S440K 치환, 또는 그 반대의 경우를 포함한다.
- [0747] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원-결합 영역 및 제1 Fc 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 제2 항원-결합 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 영역은
- [0748] i) E345K, 및
- [0749] ii) K326W, K326A, E333S, E333A 및 P396L로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 치환; 및
- [0750] iii) 제1 Fc 영역 내의 추가의 K439E 치환 및 제2 Fc 영역 내의 추가의 S440K 치환, 또는 그 반대의 경우를 포함한다.
- [0751] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원-결합 영역 및 제1 Fc 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 제2 항원-결합 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 영역은
- [0752] i) E345K, 및
- [0753] ii) K326W, K326A, E333S, E333A 및 P396L로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 2개의 치환; 및
- [0754] iii) 제1 Fc 영역 내의 추가의 K439E 치환 및 제2 Fc 영역 내의 추가의 S440K 치환, 또는 그 반대의 경우를 포

함한다.

- [0755] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원-결합 영역 및 제1 Fc 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 제2 항원-결합 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 영역은
- [0756] i) E345K 치환, 및
- [0757] ii) K326W 및 E333S 치환; 및
- [0758] iii) 제1 Fc 영역 내의 추가의 K439E 치환 및 제2 Fc 영역 내의 추가의 S440K 치환, 또는 그 반대의 경우를 포함한다.
- [0759] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원-결합 영역 및 제1 Fc 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 제2 항원-결합 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 영역은
- [0760] i) E345R, 및
- [0761] ii) K326W, K326A, E333S, E333A, P396L, S267E, H268F, S324T, G263A, S324E, I332E 및 S239D로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 치환; 및
- [0762] iii) 제1 Fc 영역 내의 추가의 K439E 치환 및 제2 Fc 영역 내의 추가의 S440K 치환, 또는 그 반대의 경우를 포함한다.
- [0763] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원-결합 영역 및 제1 Fc 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 제2 항원-결합 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 영역은
- [0764] i) E345R, 및
- [0765] ii) K326W, K326A, E333S, E333A 및 P396L로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 치환; 및
- [0766] iii) 제1 Fc 영역 내의 추가의 K439E 치환 및 제2 Fc 영역 내의 추가의 S440K 치환, 또는 그 반대의 경우를 포함한다.
- [0767] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원-결합 영역 및 제1 Fc 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 제2 항원-결합 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 영역은
- [0768] i) E345R, 및
- [0769] ii) K326W, K326A, E333S, E333A 및 P396L로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 2개의 치환; 및
- [0770] iii) 제1 Fc 영역 내의 추가의 K439E 치환 및 제2 Fc 영역 내의 추가의 S440K 치환, 또는 그 반대의 경우를 포함한다.
- [0771] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원-결합 영역 및 제1 Fc 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 제2 항원-결합 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 영역은
- [0772] i) E345R 치환, 및
- [0773] ii) K326W 및 E333S 치환; 및
- [0774] iii) 제1 Fc 영역 내의 추가의 K439E 치환 및 제2 Fc 영역 내의 추가의 S440K 치환, 또는 그 반대의 경우를 포함한다.
- [0775] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 조성물은 제1 및 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 폴리펩티드 또는 항체는
- [0776] (i) Fc-Fc 증진 돌연변이인 적어도 1개의 치환;
- [0777] (ii) 동일한 추가의 돌연변이를 갖는 Fc 영역들 사이의 올리고머화를 방지하는 추가의 돌연변이를 포함하는 Fc

영역을 포함하고, 여기서 제1 및 제2 폴리펩티드 또는 항체는 동일한 추가의 돌연변이를 포함하지는 않고,

- [0778] (iii) 제1 또는 제2 Fc 영역은 C1q 결합 치환인 1개 이상의 치환을 포함한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 단지 제1 또는 제2 폴리펩티드 또는 항체는 Fc 이펙터 기능을 감소시키는 제2 돌연변이를 포함한다.
- [0779] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원-결합 영역 및 제1 Fc 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 제2 항원-결합 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 영역은
 - [0780] (i) E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개 이상의 치환,
 - [0781] (ii) 추가의 K439E 또는 S440K 돌연변이를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 영역은 동일한 추가의 치환을 포함하지는 않고, 적어도 1개의 치환이 S440Y 또는 S440W인 경우, 추가의 돌연변이는 S440K가 아니고,
 - [0782] (iii) 제1 또는 제2 Fc 영역은 G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환을 포함한다.
- [0783] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원-결합 영역 및 제1 Fc-영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 제2 항원-결합 영역 및 제2 Fc-영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 Fc-영역은 (i) E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개 이상의 치환, 및 ii) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환, 및 iii) 추가의 K439E 돌연변이를 포함하고; 제2 Fc-영역은 i) E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 치환, 및 추가의 S440K 돌연변이를 포함한다. 단지 제1 폴리펩티드 또는 항체만이 증가된 효능작용 활성 및/또는 증가된 CDC 활성을 갖는 것인 실시양태가 본원에 제공된다.
- [0784] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원-결합 영역 및 제1 Fc-영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 제2 항원-결합 영역 및 제2 Fc-영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 Fc-영역은 (i) E430, E345로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개 이상의 치환, 및 ii) G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 및 P396으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환, 및 iii) 추가의 S440K 돌연변이를 포함하고; 제2 Fc-영역은 i) E430, E345 또는 S440Y 또는 S440W 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개 이상의 치환, 및 추가의 K439E 돌연변이를 포함한다. 단지 제1 폴리펩티드 또는 항체만이 증가된 효능작용 활성 및/또는 증가된 CDC 활성을 갖는 것인 실시양태가 본원에 제공된다.
- [0785] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원-결합 영역 및 제1 Fc-영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 제2 항원-결합 영역 및 제2 Fc-영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 Fc-영역은 (i) E430G 치환, 및 ii) K326W, K326A, E333S, E333A 및 P396L로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 치환, 및 iii) 추가의 K439E 치환을 포함하고; 제2 Fc-영역은 i) E430G 치환, 및 추가의 S440K 치환을 포함한다.
- [0786] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원-결합 영역 및 제1 Fc-영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 제2 항원-결합 영역 및 제2 Fc-영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 Fc-영역은 (i) E430G 치환, 및 ii) K326W, K326A, E333S, E333A 및 P396L로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 치환, 및 iii) 추가의 S440K 치환을 포함하고; 제2 Fc-영역은 i) E430G 치환, 및 추가의 K439E 치환을 포함한다.
- [0787] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원-결합 영역 및 제1 Fc-영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 제2 항원-결합 영역 및 제2 Fc-영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 Fc-영역은 (i) E430G 치환, 및 ii) K326W 및 E333S 치환, 및 iii) 추가의 S440K 치환을 포함하고; 제2 Fc-영역은 i) E430G 치환, 및 추가의 K439E 치환을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 항원-결합 영역 및 제1 Fc-영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 또는 항체, 제2 항원-결합 영역 및 제2 Fc-영역을 포함하는 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하고, 여기서 제1 Fc-영역은 (i) E430G 치환, 및 ii) K326W 및 E333S 치환, 및 iii) 추가의 K439E 치환을 포함하고; 제2 Fc-영역은 i) E430G 치환, 및 추가의 S440K 치환을 포함한다.
- [0788] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 중양 피사 인자 수용체 슈퍼패밀리 (TNFR-SF) 또는 G-단백질 커플링된 수용체 (GPCR) 슈퍼패밀리의 구성원에 결합할 수 있는 폴리펩티드 또는 항체를 포함한다.
- [0789] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 TNFR1, FAS, DR3, DR4, DR5, DR6, NGFR, EDAR DcR1, DcR2, DcR3, OPG,

TROY, XEDAR, LTbR, HVEM, TWEAKR, CD120b, OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, RANK, TACI, BLySR, BCMA, GITR 및 RELT로 이루어진 군으로부터 선택된 TNFR-SF의 구성원에 결합할 수 있는 폴리펩티드 또는 항체를 포함한다.

- [0790] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 TNFR1, FAS, DR3, DR4, DR5, DR6, NGFR 및 EDAR로 이루어진 군으로부터 선택된, 세포내 사멸 도메인을 갖는 TNFR-SF의 구성원에 결합할 수 있는 폴리펩티드 또는 항체를 포함한다.
- [0791] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 DcR1, DcR2, DcR3, OPG, TROY, XEDAR, LTbR, HVEM, TWEAKR, CD120b, OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, RANK, TACI, BLySR, BCMA, GITR, RELT로 이루어진 군으로부터 선택된, 세포내 사멸 도메인이 없는 TNFR-SF의 구성원에 결합할 수 있는 폴리펩티드 또는 항체를 포함한다.
- [0792] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, RANK, TACI, BLySR, BCMA, GITR 및 RELT로 이루어진 면역 활성화제의 군에 속하는 TNFR-SF의 구성원에 결합할 수 있는 폴리펩티드 또는 항체를 포함한다.
- [0793] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드가 OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, RANK, TACI, BLySR, BCMA, GITR 및 RELT로 이루어진 군으로부터 선택된, 세포내 사멸 도메인이 없는 TNFR-SF의 1개 이상의 구성원 상의 상이한 에피토프에 결합하는 것인 폴리펩티드 또는 항체를 포함한다.
- [0794] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, RANK, TACI, BLySR, BCMA, GITR 및 RELT로 이루어진 군으로부터 선택된, 세포내 사멸 도메인이 없는 TNFR-SF의 하나의 구성원에 결합하는 제1 폴리펩티드가 OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, RANK, TACI, BLySR, BCMA, GITR 및 RELT로 이루어진 군으로부터 선택된, 세포내 사멸 도메인이 없는 TNFR-SF의 하나의 구성원에 결합하는 상기 제2 항체의 결합을 차단하지 않는 것인 폴리펩티드 또는 항체를 포함한다.
- [0795] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 또는 항체 및 제2 폴리펩티드 또는 항체를 포함하는 조성물은 조성물 중에 1:49 내지 49:1 몰비, 예컨대 1:1 몰비, 1:2 몰비, 1:3 몰비, 1:4 몰비, 1:5 몰비, 1:6 몰비, 1:7 몰비, 1:8 몰비, 1:9 몰비, 1:10 몰비, 1:15 몰비, 1:20 몰비, 1:25 몰비, 1:30 몰비, 1:35 몰비, 1:40 몰비, 1:45 몰비, 1:50 몰비, 50:1 몰비, 45:1 몰비, 40:1 몰비, 35:1 몰비, 30:1 몰비, 25:1 몰비, 20:1 몰비, 15:1 몰비, 10:1 몰비, 9:1 몰비, 8:1 몰비, 7:1 몰비, 6:1 몰비, 5:1 몰비, 4:1 몰비, 3:1 몰비, 2:1 몰비로 존재한다.
- [0796] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드 및/또는 임의의 추가 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 조성물 중에 등몰비로 존재한다.
- [0797] 본 발명의 한 실시양태에서, 임의의 측면 또는 실시양태에 따른 조성물은 제약 조성물이다.
- [0798] 치료 용도
- [0799] 본 발명의 임의의 측면 또는 실시양태에 따른 폴리펩티드, 항체, 이중특이적 항체 또는 조성물은 의약으로서, 즉 치료 용도를 위해 사용될 수 있다.
- [0800] 한 측면에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한 본원에 개시된 임의의 측면 또는 실시양태에 따른 폴리펩티드, 항체 또는 조성물을 제공한다.
- [0801] 또 다른 측면에서, 본 발명은 암, 자가면역 질환, 염증성 질환 또는 감염성 질환의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 임의의 측면 또는 실시양태에 따른 폴리펩티드, 항체 또는 조성물을 제공한다.
- [0802] 또 다른 측면에서, 본 발명은 질환을 갖는 개체에게 유효량의 본원에 개시된 임의의 측면 또는 실시양태에 따른 폴리펩티드, 항체 또는 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 질환을 갖는 개체를 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0803] 본 발명의 한 실시양태에서, 질환은 암, 자가면역 질환, 염증성 질환 및 감염성 질환의 군으로부터 선택된다.
- [0804] 본 발명의 한 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 측면 또는 실시양태에 따른 방법은 추가로 추가의 치료제를 투여하는 것에 관한 것이다.
- [0805] 본 발명의 한 실시양태에서, 추가의 치료제는 화학요법제 (파클리탁셀, 테모졸로미드, 시스플라틴, 카르보플라틴, 옥살리플라틴, 이리노테칸, 독소루비신, 겐시타빈, 5-플루오로우라실, 페메트렉세드를 포함하나 이에 제한되지는 않음), 키나제 억제제 (소라페닙, 수니티닙 또는 에베롤리무스를 포함하나 이에 제한되지는 않음), 아폽토시스-조절제 (재조합 인간 TRAIL 또는 비리나판트를 포함하나 이에 제한되지는 않음), RAS 억제제, 프로테아솜 억제제 (보르테조미드를 포함하나 이에 제한되지는 않음), 히스톤 데아세틸라제 억제제 (보리노스타트를 포함

하나 이에 제한되지는 않음), 기능식품, 시토카인 (IFN- γ 를 포함하나 이에 제한되지는 않음), 항체 또는 항체 모방체 (항-EGFR, 항-IGF-1R, 항-VEGF, 항-CD20, 항-CD38, 항-HER2, 항-PD-1, 항-PD-L1, 항-CTLA4, 항-CD40, 항-CD137, 항-GITR 항체 및 항체 모방체를 포함하나 이에 제한되지는 않음), 항체-약물 접합체로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 항암제(들)이다.

- [0806] 부분들의 키트
- [0807] 폴리펩티드 또는 항체와 관련하여 하기 기재된 실시양태는 이뮤노글로불린의 Fc 영역 및 항원-결합 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체를 지칭하고, 폴리펩티드 또는 항체는 또한 이뮤노글로불린의 제1 Fc 영역 및 제1 항원-결합 영역을 갖는 다중특이적 폴리펩티드 또는 항체, 및 이뮤노글로불린의 제2 Fc 영역 및 제2 항원-결합 영역을 갖는 제2 폴리펩티드 또는 항체일 수 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0808] 본 발명은 또한 본원에 기재된 폴리펩티드 또는 항체를 포함하는 요법에서의 동시, 개별 또는 순차적 사용을 위한 부분들의 키트에 관한 것이다. 또한, 이러한 변이체는 본원에 기재된 임의의 방법에 따라 수득될 수 있다.
- [0809] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 측면 또는 실시양태에 따른 폴리펩티드, 항체 또는 조성물을 포함하는 부분들의 키트에 관한 것이며, 여기서 상기 폴리펩티드, 항체 또는 조성물은 바이알과 같은 1개 이상의 용기 내에 존재한다.
- [0810] 본 발명의 한 실시양태에서, 부분들의 키트는 요법에서의 동시, 개별 또는 순차적 사용을 위한, 본원에 기재된 임의의 측면 또는 실시양태에 따른 폴리펩티드, 항체 또는 조성물을 포함한다.
- [0811] 또 다른 측면에서, 본 발명은 진단 방법에 사용하기 위한 본원에 기재된 임의의 실시양태에 따른 폴리펩티드, 항체, 조성물 또는 부분들의 키트의 용도에 관한 것이다.
- [0812] 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간 또는 다른 포유동물의 신체의 적어도 일부에 본원에 기재된 임의의 실시양태에 따른 폴리펩티드, 항체, 조성물 또는 부분들의 키트를 투여하는 것을 포함하는 진단 방법에 관한 것이다.
- [0813] 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간 또는 다른 포유동물의 신체의 적어도 일부를 영상화하는데 있어서 본원에 기재된 임의의 실시양태에 따른 폴리펩티드, 항체, 조성물 또는 부분들의 키트의 용도에 관한 것이다.
- [0814] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 실시양태에 따른 변이체, 조성물 또는 부분들의 키트를 투여하는 것을 포함하는, 인간 또는 다른 포유동물의 신체의 적어도 일부를 영상화하는 방법에 관한 것이다.
- [0815] 추가의 용도
- [0816] 폴리펩티드 또는 항체와 관련하여 하기 기재된 실시양태는 이뮤노글로불린의 Fc 영역 및 항원-결합 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체를 지칭하고, 폴리펩티드 또는 항체는 또한 이뮤노글로불린의 제1 Fc 영역 및 제1 항원-결합 영역을 갖는 다중특이적 폴리펩티드 또는 항체, 및 이뮤노글로불린의 제2 Fc 영역 및 제2 항원-결합 영역을 갖는 제2 폴리펩티드 또는 항체일 수 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0817] 추가 측면에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한, 특히 질환 또는 장애의 치료를 위한 의약으로서 사용하기 위한 상기 기재된 바와 같은 본 발명의 폴리펩티드, 항체에 관한 것이다. 이러한 질환 및 장애의 예는, 제한 없이, 암, 자가면역 질환, 염증성 질환, 감염성 질환, 박테리아, 바이러스 또는 진균 감염을 포함한다.
- [0818] 또 다른 측면에서, 본 발명은 암과 같은 질환의 치료를 위한 본원에 기재된 폴리펩티드, 항체, 이중특이적 항체, 조성물 및 부분들의 키트에 관한 것이다.
- [0819] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 변이체, 조성물 또는 부분들의 키트의 투여를 포함하는, 인간 질환의 치료 방법에 관한 것이다.
- [0820] 또 다른 측면에서, 본 발명은 변이체, 조성물 또는 부분들의 키트를 투여하는 것을 포함하는, 인간에서의 암 치료 방법에 관한 것이다.
- [0821] "치료"는 증상 또는 질환 상태의 진정, 호전, 정지 또는 근절 (치유)을 목적으로 유효량의 본 발명의 치료 활성 화합물을 투여하는 것을 지칭한다.
- [0822] "유효량" 또는 "치료 유효량"은 목적하는 치료 결과를 달성하는데 필요한 투여량으로 및 필요한 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다. 항체의 치료 유효량은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 목적하는 반응을 도출하는 항체의 능력과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 또한, 치료 유효량은 항체 또는 항체 부분의

임의의 독성 또는 유해 효과를 치료상 유익한 효과가 능가하는 양이다.

- [0823] 투여량
- [0824] 폴리펩티드 또는 항체와 관련하여 하기 기재된 실시양태는 이뮤노글로불린의 Fc 영역 및 항원-결합 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체를 지칭하고, 폴리펩티드 또는 항체는 또한 이뮤노글로불린의 제1 Fc 영역 및 제1 항원-결합 영역을 갖는 다중특이적 폴리펩티드 또는 항체, 및 이뮤노글로불린의 제2 Fc 영역 및 제2 항원-결합 영역을 갖는 제2 폴리펩티드 또는 항체일 수 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0825] 항체에 대한 효율적인 투여량 및 투여 요법은 치료될 질환 또는 상태에 좌우되고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 결정될 수 있다. 본 발명의 항체의 치료 유효량에 대한 예시적인 비-제한적 범위는 약 0.1 내지 100 mg/kg, 예컨대 약 0.1 내지 50 mg/kg, 예를 들어 약 0.1 내지 20 mg/kg, 예컨대 약 0.1 내지 10 mg/kg, 예를 들어 약 0.5, 예컨대 약 0.3, 약 1, 약 3, 약 5, 또는 약 8 mg/kg이다.
- [0826] 본 발명의 폴리펩티드 또는 항체는 또한 조합 요법으로, 즉 치료할 질환 또는 상태에 적절한 다른 치료제와 조합되어 투여될 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 항체-함유 의약은 1종 이상의 추가의 치료제, 예컨대 세포독성제, 화학요법제 또는 항혈관신생제와 조합된다. 이러한 조합 투여는 동시, 개별 또는 순차적일 수 있다.
- [0827] 추가 실시양태에서, 본 발명은 암과 같은 질환의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 본 발명의 변이체 또는 제약 조성물을 방사선요법 및/또는 수술과 조합하여 투여하는 것을 포함하는, 암과 같은 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0828] 제조 방법
- [0829] 폴리펩티드 또는 항체와 관련하여 하기 기재된 실시양태는 이뮤노글로불린의 Fc 영역 및 항원-결합 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체를 지칭하고, 폴리펩티드 또는 항체는 또한 이뮤노글로불린의 제1 Fc 영역 및 제1 항원-결합 영역을 갖는 다중특이적 폴리펩티드 또는 항체, 및 이뮤노글로불린의 제2 Fc 영역 및 제2 항원-결합 영역을 갖는 제2 폴리펩티드 또는 항체일 수 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0830] 본 발명은 또한 상기 기재된 측면 중 어느 하나에 따른 변이체를 코딩하는 단리된 핵산 및 벡터, 뿐만 아니라 변이체를 코딩하는 벡터 및 발현 시스템을 제공한다. 항체 및 그의 변이체에 대한 적합한 핵산 구축물, 벡터 및 발현 시스템은 관련 기술분야에 공지되어 있고 실시예에 기재되어 있다. 변이체가 중쇄 (또는 그의 Fc-함유 단편) 뿐만 아니라 경쇄도 포함하는 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄 부분을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 동일하거나 상이한 핵산 또는 벡터 상에 존재할 수 있다.
- [0831] 본 발명은 또한 상기 기재된 측면 중 어느 하나에 따른 폴리펩티드 또는 항체를 숙주 세포에서 생산하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 폴리펩티드 또는 항체는 적어도 중쇄의 Fc 영역을 포함하고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0832] a) 상기 변이체의 상기 Fc 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 구축물을 제공하는 단계,
- [0833] b) 상기 뉴클레오티드 구축물을 숙주 세포에서 발현시키는 단계, 및
- [0834] c) 상기 항체 변이체를 상기 숙주 세포의 세포 배양물로부터 회수하는 단계.
- [0835] 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄 항체이다. 그러나, 대부분의 실시양태에서, 항체는 또한 경쇄를 함유할 것이고, 따라서 상기 숙주 세포는 동일하거나 상이한 벡터 상의 경쇄-코딩 구축물을 추가로 발현한다.
- [0836] 항체의 재조합 발현에 적합한 숙주 세포는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, CHO, HEK-293, Expi293, PER-C6, NS/0 및 Sp2/0 세포를 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 숙주 세포는 단백질의 Asn-연결된 글리코실화가 가능한 세포, 예를 들어 진핵 세포, 예컨대 포유동물 세포, 예를 들어 인간 세포이다. 추가 실시양태에서, 상기 숙주 세포는 인간-유사 또는 인간 글리코실화를 갖는 당단백질을 생산하도록 유전자 조작된 비-인간 세포이다. 이러한 세포의 예로는 유전자 변형된 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) (Hamilton et al., Science 301 (2003) 1244-1246; Potgieter et al., J. Biotechnology 139 (2009) 318-325) 및 유전자 변형된 렘나 마이너(*Lemna minor*) (Cox et al., Nature Biotechnology 12 (2006) 1591-1597)가 있다.
- [0837] 한 실시양태에서, 상기 숙주 세포는 항체 중쇄로부터 C-말단 리신 K447 잔기를 효율적으로 제거할 수 없는 숙주 세포이다. 예를 들어, 문헌 [Liu et al. (2008) J Pharm Sci 97: 2426] (본원에 참조로 포함됨) 내의 표 2는 다수의 이러한 항체 생산 시스템, 예를 들어 Sp2/0, NS/0 또는 트랜스제닉 유선 (염소)을 열거하고 있으며, 여

기서 단지 C-말단 리신의 부분적 제거만이 얻어진다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 변경된 글리코실화 기구를 갖는 숙주 세포이다. 이러한 세포는 관련 기술분야에 설명되어 있고, 본 발명의 변이체를 발현하여 변경된 글리코실화를 갖는 항체를 생산하기 위한 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Shields, R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1], 뿐만 아니라 EP1176195; W003/035835; 및 W099/54342를 참조한다. 조작된 당형태를 생성하는 추가의 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 문헌 [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), US6602684, W000/61739A1; W001/292246A1; W002/311140A1; WO 02/30954A1]에 기재된 것; 포텔리젠트(Potelligent)TM 기술 (바이오와 인크.(Biowa, Inc.), 뉴저지주 프린스턴); 글리코맵(GlycoMAb)TM 글리코실화 조작 기술 (글리카르트 바이오테크놀로지 아게(GLYCART biotechnology AG), 스위스 취리히); [US 20030115614; Okazaki et al., 2004, JMB, 336: 1239-49]에 기재된 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0838] 본 발명은 또한 상기 기재된 본 발명의 방법에 의해 수득된 또는 수득가능한 항체에 관한 것이다.

[0839] 추가 측면에서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드 또는 항체를 생산할 수 있는 숙주 세포에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 본 발명의 뉴클레오티드 구축물로 형질전환 또는 형질감염되었다.

[0840] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되며, 이는 추가의 제한으로서 해석되지 않아야 한다.

[0841] 표 1

SEQ ID NO:	명칭	서열	클론
SEQ ID NO: 1	VH hDR5-01-G56T CDR1	GFNIKDTF	hDR5-01-G56T
SEQ ID NO: 2	VH hDR5-01-G56T CDR2	IDPANTNT	
SEQ ID NO: 3	VH hDR5-01-G56T CDR3	VRGLYTYFDY	
SEQ ID NO: 4	VH hDR5-01-G56T	EVQLQQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDTFIHWVKQAPG QGLEWIGRIDPANTNKYDPKFKGKATITDTSSNTAYMELSS LRSEDTAVYYCVRGLYTYFDYWGQGLVTVSS	
SEQ ID NO: 5	HC hDR5-01-G56T	EVQLQQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDTFIHWVKQAPG QGLEWIGRIDPANTNKYDPKFKGKATITDTSSNTAYMELSS LRSEDTAVYYCVRGLYTYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 6	VL hDR5-01 CDR1	QSISNN	
	VL hDR5-01 CDR2	FAS	
SEQ ID NO: 7	VL hDR5-01 CDR3	QQGNSWPYT	
SEQ ID NO: 8	VL hDR5-01	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQISISNNLHWYQQKPGQ APRLLIKFASQSITGIPARFSGSGSSTEFTLTISSLQSEDFAVYYC QQGNSWPYTFGQGTKLEIK	
SEQ ID NO: 9	LC hDR5-01	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQISISNNLHWYQQKPGQ APRLLIKFASQSITGIPARFSGSGSSTEFTLTISSLQSEDFAVYYC QQGNSWPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSSLTLLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
SEQ ID NO: 10	VH hDR5-05 CDR1	GFNIKDTH	hDR5-05
SEQ ID NO: 11	VH hDR5-05 CDR2	IDPANGNT	
SEQ ID NO: 12	VH hDR5-05 CDR3	ARWGTVNYFAY	
SEQ ID NO: 13	VH hDR5-05	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFNIKDTHMHVWRQAP GQRLEWIGRIDPANGNTEYDQKFKGRVTITVDTSSASTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARWGTVNYFAYWGQGLVTVSS	

[0842]

SEQ ID NO: 14	HC hDR5-05	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTHMHVWRQAP GQRLEWIGRIDPANGNTEYDQKFQGRVTITVDTASASTAYMEL SSLRSED A VVYCARWGTN V FAYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSPGK	
SEQ ID NO: 15	VL hDR5-05 CDR1	SSVSY	
	VL hDR5-05 CDR2	RTS	
SEQ ID NO: 16	VL hDR5-05 CDR3	QQYHSYPPT	
SEQ ID NO: 17	VL hDR5-05	DIQLTQSPSSLSASVGD R VITITCSA S SSVSYMYWYQQKPGKAP KPWIYRTSNLASGVP S RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYHSYPPTFGGGTKVEIK	
SEQ ID NO: 18	LC hDR5-05	DIQLTQSPSSLSASVGD R VITITCSA S SSVSYMYWYQQKPGKAP KPWIYRTSNLASGVP S RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYHSYPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
SEQ ID NO: 19	VH CONA-C49W- CDR1	GGSISSGDYF	IgG1- CONA- C49W
SEQ ID NO: 20	VH CONA-C49W- CDR2	IHN S GTT	
SEQ ID NO: 21	VH CONA-C49W- CDR3	ARDRGGDYYGMDV	
SEQ ID NO: 22	VH CONA-C49W- C49W	QVQLQESGPGLVKPSQTL S LTCTV S GGSISSGDYF E WSWIRQLP GKGLEWIGHIHN S GTTYYNPSL K SRVTISVDT S SKQFSLRLSSVT AADTAVYYCARD R GGDYYGMDVWGQGT T TVSS	
SEQ ID NO: 23	HC CONA-C49W	QVQLQESGPGLVKPSQTL S LTCTV S GGSISSGDYF E WSWIRQLP GKGLEWIGHIHN S GTTYYNPSL K SRVTISVDT S SKQFSLRLSSVT AADTAVYYCARD R GGDYYGMDVWGQGT T TVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSPGK	
SEQ ID NO: 24	VL CONA-C49W- CDR1	QGISRSY	

[0843]

	VL CONA-C49W-CDR2	GAS	
SEQ ID NO: 25	VL CONA-C49W-CDR3	QQFGSSPWTT	
SEQ ID NO: 26	VL CONA-C49W	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQGISRSYLAWYQQKPGQA PSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QFGSSPWTFGQGTKEIK	
SEQ ID NO: 27	LC CONA-C49W	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQGISRSYLAWYQQKPGQA PSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QFGSSPWTFGQGTKEIK EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQGISRSYLAWYQQKPGQA PSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QFGSSPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
SEQ ID NO: 28	VH 7D8 CDR1	GFTFHDYA	7D8
SEQ ID NO: 29	VH 7D8 CDR2	ISWNSGTI	
SEQ ID NO: 30	VH 7D8 CDR3	AKDIQYGNYYYGMDV	
SEQ ID NO: 31	VH 7D8	EVQLVESGGGLVQPDRSLRLSCAASGFTFHDYAMHW VRQAPGKGLEWVSTISWNSGTIGYADSVKGRFTISRDN NAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMD VWGQGTITVTVSS	
SEQ ID NO: 32	HC 7D8	EVQLVESGGGLVQPDRSLRLSCAASGFTFHDYAMHW VRQAPGKGLEWVSTISWNSGTIGYADSVKGRFTISRDN NAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMD VWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSLVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEP KSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK	
SEQ ID NO: 33	VL 7D8 CDR1	QSVSSY	
	VL 7D8 CDR2	DAS	
SEQ ID NO: 34	VL 7D8 CDR3	QQRSNWPIT	
SEQ ID NO: 35	VL 7D8	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTREIK	

[0844]

SEQ ID NO: 36	LC 7D8	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQ QRSNWPITFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
SEQ ID NO: 37	VH 11B8 CDR1	GFTFSYHA	11B8
SEQ ID NO: 38	VH 11B8CDR2	IGTGGVT	
SEQ ID NO: 39	VH 11B8CDR3	ARDYYGAGSFYDGLYGM DV	
SEQ ID NO: 40	VH 11B8	EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCTGSGFTFSYHAMHW VRQAPGKGLEWVSIIGTGGVITYYADSVKGRFTISRDN VKNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARDYYGAGSFYDGLY GMDVWGQGTITVTVSS	
SEQ ID NO: 41	HC 11B8	EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCTGSGFTFSYHAMHW VRQAPGKGLEWVSIIGTGGVITYYADSVKGRFTISRDN VKNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARDYYGAGSFYDGLY GMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	
SEQ ID NO: 42	VL 11B8CDR1	QSVSSY	
	VL 11B8 CDR2	DAS	
SEQ ID NO: 43	VL 11B8 CDR3	QQRSDWPLT	
SEQ ID NO: 44	VL 11B8	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTSS LEPEDFAVYYCQQRSDWPLTFGGGTKVEIK	
SEQ ID NO: 45	LC 11B8	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQ QRSNWPITFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
SEQ ID NO: 46	VH ALEM CDR1	GFTFTDFY	알렘투 주맙
SEQ ID NO: 47	VH ALEM CDR2	IRDKAKGYTT	
SEQ ID NO: 48	VH ALEM CDR3	AREGH TAAPFDY	

[0845]

SEQ ID NO: 49	VH ALEM	QVQLQESGPGLVLRPSQTLSTCTVSGFTFTDFYMNWV RQPPGRGLEWIGFIRDKAKGYTTEYNPSVKGRVTMLV DTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCAREGHTAAPFDYW GQGSLVTVSS	
SEQ ID NO: 50	HC ALEM	QVQLQESGPGLVLRPSQTLSTCTVSGFTFTDFYMNWV RQPPGRGLEWIGFIRDKAKGYTTEYNPSVKGRVTMLV DTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCAREGHTAAPFDYW GQGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	
SEQ ID NO: 51	VL ALEM CDR1	QNIDKY	
	VL ALEM CDR2	NTN	
SEQ ID NO: 52	VL ALEM CDR3	LQHISRPT	
SEQ ID NO: 53	VL ALEM	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNIDKYLNWYQQKPGK APKLLIYNTNNLQTVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYY CLQHISRPTFGQGTKEIK	
SEQ ID NO:54	LC ALEM	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNIDKYLNWYQQKPGK APKLLIYNTNNLQTVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYY CLQHISRPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
SEQ ID NO: 55	VH 2F8 CDR1	GFTFSTYG	2F8
SEQ ID NO: 56	VH 2F8 CDR2	IWDDGSYK	
SEQ ID NO: 57	VH 2F8 CDR3	ARDGITMVRGVMKDYFDY	
SEQ ID NO: 58	VH 2F8	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHW VRQAPGKGLEWVAVIWDGGSYKYGDSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMK DYFDYWGQGLVTVSS	

[0846]

SEQ ID NO: 59	HC 2F8	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHW VRQAPGKGLEWVAVIWDGGSYKYYGDSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMK DYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	
SEQ ID NO: 60	VL 2F8 CDR1	QDISSA	
	VL 2F8 CDR2	DAS	
SEQ ID NO: 61	VL 2F8 CDR3	QQFNYSYPLT	
SEQ ID NO: 62	VL 2F8	AIQLTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAP KLLIYDASSLESGVPSRFSGSESGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ FNSYPLTFGGGKVEIK	
SEQ ID NO:63	LC 2F8	AIQLTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAP KLLIYDASSLESGVPSRFSGSESGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ FNSYPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLS TLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
SEQ ID NO: 64	VH b12 CDR1	GYRFSNFV	b12
SEQ ID NO: 65	VH b12 CDR2	INPYNGNK	
SEQ ID NO:66	VH b12 CDR3	ARVGPYSWDDSPQDNYYMDV	
SEQ ID NO: 67	VH b12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHW VRQAPGQRFWWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVTFDA DTSANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQ DNYYMDVWVGKTTIVIVSS	
SEQ ID NO:68	HC b12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHW VRQAPGQRFWWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVTFDA DTSANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQ DNYYMDVWVGKTTIVIVSSASTKGPSVFLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	

[0847]

SEQ ID NO:69	VL b12 CDR1	HSIRSRR	
	VL b12 CDR2	GVS	
SEQ ID NO:70	VL b12 CDR3	QVYGASSYT	
SEQ ID NO:71	VL b12	EIVLTQSPGTLSPGERATFSCRSSHISRRVAVYQHKGQA PRLVIHGVSNRASGISDRFSGSGSGTDFLTITRVEPEDFALYYC QVYGASSYTFGQGTKLERK	
SEQ ID NO:72	LC b12	EIVLTQSPGTLSPGERATFSCRSSHISRRVAVYQHKGQA PRLVIHGVSNRASGISDRFSGSGSGTDFLTITRVEPEDFALYYC QVYGASSYTFGQGTKLERKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
SEQ ID NO:73	Fc IgG1m(f)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSPGK	
SEQ ID NO:74	Fc IgG1m(z)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDK K VEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSPGK	
SEQ ID NO:75	Fc IgG1m(a)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDK P VEPKSCDKTHTCPPC APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSR D ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSPGK	
SEQ ID NO:76	Fc IgG1m(x)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDK P VEPKSCDKTHTCPPC APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVME G LHNHYTQKLSLSPGK	

[0848]

SEQ ID NO: 77	Fc IgG1m(f)- E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHGALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 78	Fc IgG1m(f)- E345K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP RKPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 79	Fc IgG1m(f)- K326A/E333A/P3 96L	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 80	Fc IgG1m(f)- K326A/E333A/P3 96L/E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHGALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:81	Fc IgG1m(f)- K326A/E333A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0849]

SEQ ID NO:82	Fc IgG1m(f)-K326A/E333A/E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAPIAKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGQGNVFSCSVMHGALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:83	Fc IgG1m(f)-K326A/P396L/E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGQGNVFSCSVMHGALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:84	Fc IgG1m(f)-E333A/P396L/E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGQGNVFSCSVMHGALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:85	Fc IgG1m(f)-I253D/K322A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:86	Fc IgG1m(f)-K326W/E333S	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNWALPAPIAKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0850]

SEQ ID NO:87	Fc IgG1m(f)-K326W/E333S/E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNWALPAPISTKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHGALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO:88	Fc IgG1m(f)-S267E/H268F/S324T/E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSEFEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVTINKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHGALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO:89	Fc IgG113F [Fc IgG1(f)m-K274Q/N276K/Y300F/A339T/N384S/K392N/V397M/V422I]	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSGSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNJFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO:90	Fc IgG113F-E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSGSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNJFSCSVMHGALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO:91	VH BMS-663513 CDR1	GGSFSGYY	BMS-663513
SEQ ID NO:92	VH BMS-663513 CDR2	INHGGYV	
SEQ ID NO:93	VH BMS-663513 CDR3	ARDYGPGNYDWYFDL	
SEQ ID NO:94	VH BMS-663513	QVQLQQWAGALLKPSSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQSPEKGLEWIGEINHGYYTYNPSLESRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDYGPGNYDWYFDLWGRGTLVTVSS	
SEQ ID NO:95	VL BMS-663513 CDR1	QSVSSY	
	VL BMS-663513 CDR2	DAS	

[0851]

SEQ ID NO: 96	VL BMS-663513 CDR3	QQRSNWPPALT	
SEQ ID NO: 97	VL BMS-663513	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QRSNWPPALTFGGGTKVEIK	
SEQ ID NO: 98	VH CD134-SF2 CDR1	GYTFKDYT	CD134- SF2
SEQ ID NO: 99	VH CD134-SF2 CDR2	IYPNNGGS	
SEQ ID NO: 100	VH CD134-SF2 CDR3	ARMGYHGPHLDFDV	
SEQ ID NO: 101	VH CD134-SF2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFKDYTMHWVRQAP GGGLEWIGGIYPNNGGSTYNQNFKDRVTLTADKSTSTAYMEL SSLRSEDAVYYCARMGYHGPHLDFDVWGQGTITVTVSS	
SEQ ID NO: 102	VL CD134-SF2 CDR1	QDVGAA	
	VL CD134-SF2 CDR2	WAS	
SEQ ID NO: 103	VL CD134-SF2 CDR3	QQYINYPLT	
SEQ ID NO: 104	VL CD134-SF2	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVGAAVAWYQQKPG KAPKLLIYWASTRHTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATY YCQQYINYPLTFGGGTKVEIK	
SEQ ID NO: 105	VH CD137- MOR7480 CDR1	GYSFSTYW	CD137- MOR7480
SEQ ID NO: 106	VH CD137- MOR7480 CDR2	IYPGDSYT	
SEQ ID NO: 107	VH CD137- MOR7480 CDR3	ARGYGIFDY	
SEQ ID NO: 108	VH CD137- MOR7480	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWISWVRQMPG KGLEWMGKIYPGDSYTNYSFSGSGTDFTLTISSADKISTAYLQWSS LKASDTAMYYCARGYGIFDYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO: 109	VL CD137- MOR7480 CDR1	NIGDQY	
	VL CD137- MOR7480 CDR2	QDK	
SEQ ID NO: 110	VL CD137- MOR7480 CDR3	ATYTGFGSLAV	
SEQ ID NO:111	VL CD137- MOR7480	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQS PVLVIYQDKNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADY YCATYTGFGSLAVFGGGKLTVL	
SEQ ID NO: 112	VH CD40- CP870893 CDR1	GYTFTGY	CD40- CP870893
SEQ ID NO: 113	VH CD40- CP870893 CDR2	INPDSGGT	
SEQ ID NO: 114	VH CD40- CP870893 CDR3	ARDQPLGYCTNGVCSYFDY	

[0852]

SEQ ID NO: 115	VH CD40-CP870893	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTF FTGY MHWVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO: 116	VL CD40-CP870893 CDR1	QGIYSW	
	VL CD40-CP870893 CDR2	TAS	
SEQ ID NO: 117	VL CD40-CP870893 CDR3	QQANIFPLT	
SEQ ID NO: 118	VL CD40-CP870893	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIYSW LAWY QQKPGKAPNLLIY TAST LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGTKVEIK	
SEQ ID NO: 119	VH CD40-SGN40 CDR1	GYSFTGY	CD40-SGN40
SEQ ID NO: 120	VH CD40-SGN40 CDR2	VIPNAGGT	
SEQ ID NO: 121	VH CD40-SGN40 CDR3	AREGIYW	
SEQ ID NO: 122	VH CD40-SGN40	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYI HWVR QAPGKGLEWVARVIPNAGGTSYNQKFKGRFTLSVDNSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCAREGIYWWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO: 123	VL CD40-SGN40 CDR1	QSLVHSGNTF	
	VL CD40-SGN40 CDR2	TVS	
SEQ ID NO: 124	VL CD40-SGN40 CDR3	SQTHVPWT	
SEQ ID NO: 125	VL CD40-SGN40	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSLVHSGNTFLHWYQKPGKAPKLLIY TVSN RFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCSQTHVPWTFGGGTKVEIK	
SEQ ID NO: 126	VH CD95-APO1 CDR1	GFTFNTNA	CD95-APO1
SEQ ID NO: 127	VH CD95-APO1 CDR2	IRSKSNNYAT	
SEQ ID NO: 128	VH CD95-APO1 CDR3	VTDGY	
SEQ ID NO: 129	VH CD95-APO1	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTNAMN WVR QAPGKGLEWVARIRSKSNNYATYYAESVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKAEDTAMYYCVTDGYWGGGTTLVSS	
SEQ ID NO: 130	VL CD95-APO1 CDR1	ESVEYGTSL	
	VL CD95-APO1 CDR2	VAS	
SEQ ID NO: 131	VL CD95-APO1 CDR3	QQSTKVPWT	

[0853]

SEQ ID NO: 132	VL CD95-APO1	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYGTSLMQWYQQK PGQPPKLLIYVASNVESGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDI AMYFCQQSTKVPWTFGGGKLEIK	
SEQ ID NO: 133	VH CD95-HFE7A CDR1	GYTFTSYW	CD95- HFE7A
SEQ ID NO: 134	VH CD95-HFE7A CDR2	IDPSDSYT	
SEQ ID NO: 135	VH CD95-HFE7A CDR3	ARNRDYSNNWYFDV	
SEQ ID NO: 136	VH CD95-HFE7A	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMQWVKQR PGQGLEWIGEDIDPSDSYINYNQKFKGKATLTVDTSSSTAYMQL SSLTSEDSAVYYCARNRDYSNNWYFDVWGTGTTVTVSS	
SEQ ID NO: 137	VL CD95-HFE7A CDR1	QSVDYDGDYSY	
	VL CD95-HFE7A CDR2	AAS	
SEQ ID NO:138	VL CD95-HFE7A CDR3	QQSNEDPRT	
SEQ ID NO: 139	VL CD95-HFE7A	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDYSYMNWYQQ KPGQPPKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEEDA ATYYCQQSNEDPRTFGGGKLEIK	
SEQ ID NO: 140	VH DR4-chCTB007 CDR1	GFNIKDTY	DR4- chCTB007
SEQ ID NO: 141	VH DR4-chCTB007 CDR2	IDPANGNT	
SEQ ID NO: 142	VH DR4-chCTB007 CDR3	AYYYVSNWFTY	
SEQ ID NO: 143	VH DR4-chCTB007	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHWVKRPE QGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFKGKATITADTSSNTAYLQLSS LTSEDTAVYYCAYYYVSNWFTYWGQGLTVVSA	
SEQ ID NO: 144	VL DR4-chCTB007 CDR1	ENIYSN	
	VL DR4-chCTB007 CDR2	AAT	
SEQ ID NO: 145	VL DR4-chCTB007 CDR3	QHFWGTWT	
SEQ ID NO: 146	VL DR4-chCTB007	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLEWYQQKQGKS PQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLSQSEDFGSYY CQHFWGTWTFGGGKLEIK	
SEQ ID NO: 147	VH FAS-E09 CDR1	GASISANSYY	FAS-E09
SEQ ID NO: 148	VH FAS-E09 CDR2	IAYRGNNSGSGT	
SEQ ID NO: 149	VH FAS-E09 CDR3	ARRQLDDGTGYQWAAFDV	

[0854]

SEQ ID NO: 150	VH FAS-E09	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISANSYGVVVRQSP GKGLEWVGSIAYRGNNSGSTYYNPSLKSRAVSDTSKNQVS LRLTSVTAADTALYYCARRQLLDDGTGYQWAAFDVWGQGT MVTVSS	
SEQ ID NO: 151	VL FAS-E09 CDR1	SFNIGRYP	
	VL FAS-E09 CDR2	YNN	
SEQ ID NO: 152	VL FAS-E09 CDR3	STWDDTLKGWV	
SEQ ID NO: 153	VL FAS-E09	QSVLTQPPSVSEAPRQTVTISCSGNSFNIGRYPVNWYQQLPGK APKLLIYYNNLRFSGVSDRFSGSKSGTSASLAIRDLLSEADYY CSTWDDTLKGWVFGGGTKVTVL	
SEQ ID NO: 154	VH GITR-36E5 CDR1	GFTFSSYA	GITR- 36E5
SEQ ID NO:155	VH GITR-36E5 CDR2	ISSGGTT	
SEQ ID NO: 156	VH GITR-36E5 CDR3	ARVGGYYDSMDY	
SEQ ID NO: 157	VH GITR-36E5	EVNLVESGGGLVKPGGSLKVS CAASGFTFSSYAMSWVRQTP E KRLEWVASISSGGTTYYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLR SEDTAMYCARVGGYYDSMDYWGQGISVTDSS	
SEQ ID NO: 158	VL GITR-36E5 CDR1	ESVDNYGVSF	
	VL GITR-36E5 CDR2	AAS	
SEQ ID NO: 159	VL GITR-36E5 CDR3	QQTKEVTWT	
SEQ ID NO: 160	VL GITR-36E5	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGVSF MNWFQQ KPGQPPKLLIYAASNQGSVGPARFSGSGGDFSLNIHPMEED DTAMYFCQQTKEVTWTFGGGKLEIK	
SEQ ID NO: 161	VH GITR- INCAGN01876 CDR1	GYFTDYA	GITR- INCAGNO 1876
SEQ ID NO: 162	VH GITR- INCAGN01876 CDR2	IRTYSGDV	
SEQ ID NO: 163	VH GITR- INCAGN01876 CDR3	AKSGTVRGFAY	
SEQ ID NO: 164	VH GITR- INCAGN01876	QVQLLQSGTELVPRPGVSVKISCKGSGYFTDYAMYWVKQSHA KSLEWIGVIRTYSGDVTYNQKFKDKATMTVDKSSSIAYMELAR LSEDSAIYYCAKSGTVRGFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO: 165	VL GITR- INCAGN01876 CDR1	QSLNLSGNQKNY	
	VL GITR- INCAGN01876 CDR2	WAS	
SEQ ID NO: 166	VL GITR- INCAGN01876 CDR3	QNDYSYPYT	

[0855]

SEQ ID NO: 167	VL G1TR- INCAGN01876	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVMISCKSSQSLNSGNQKNYLTWY QQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQ AEDLAVYHCQNDYSYPYTFGGGKLEIK	
SEQ ID NO: 168	Fc IgG2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVNHDH PSNTKVDKTKVERKCCVCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTFRVVSIVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPMMLDSDGFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK	인간 IgG2
SEQ ID NO:169	Fc IgG3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYTCNVNH KPSNTKVDKRVKELKTLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPCPRCPE PKSCDTPPCPRCPEPKSCDTPPCPRCPELGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTFRVVSIVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESSGQPENNYNTTPMMLDSDGFFLYSKLTVDKSRW QQGNIFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK	인간 IgG3
SEQ ID NO: 170	Fc IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYTCNVNHDH PSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSIVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK	인간 IgG4
SEQ ID NO: 171	FcRnECDHisBAP	AESHLISLHYHLTAVSSPAPGTPAFVWVSGWLGPPQYLSYNSLRG EAEPGAWVWENQVSWYWEKETTDLRIKEKLFLEAFKALGGK GPYTLQGLLGCELGPDNTSVPTAKFALNGEEMFNDLKQGTW GGDWPEALAIQRWQQQDKAANKELTFLFSCPHRLREHLER GRGNLEWKEPPSMRLKARPSSPGFVLTCSAFSFPPELQLRFL RNLAAAGTGQDFGPNSDGFSHFASSSLTVKSGDEHHYCCIVQ HAGLAQPLRVELESPAESSPSSSSHHHHHPGGGLNDIFEAQ <u>KIEWHE</u>	인간 FcRn
SEQ ID NO: 172	B2M	IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGE RIEKVEHSDLSFSKDWFSYLLYTEFTPEKDEYACRVNHVTLTSLQ PKIVKWDRDM	B2M

[0856]

[0857]

실시예

[0858]

실시예 1: 항체 생성, 생산 및 정제.

[0859]

항체에 대한 발현 구축물

[0860]

항체 발현을 위해, 가변 중쇄 (VH) 및 가변 경쇄 (VL) 서열을 유전자 합성 (진아트(GeneArt) 유전자 합성; 써모 피셔 사이언티픽(ThermoFisher Scientific), 독일)에 의해 제조하고, IgG1 중쇄 (HC) 및 경쇄 (LC) 불변 영역을 함유하는 pcDNA3.3 발현 벡터 (써모피셔 사이언티픽, 미국)에 클로닝하였다. 목적하는 돌연변이를 유전자 합성 또는 부위 지정 돌연변이유발에 의해 도입하였다. 본 출원에 언급된 항체는 이전에 기재된 DR5 항체 hDR5-01, hDR5-05 (WO2014/009358) 및 코나투무맙 (US7521048 B2 및 WO2010/138725), DR4 항체 chCTB007 (US2009/0136503), FAS 항체 E09 (Chodorge Cell Death Differ. 2012 Jul; 19(7): 1187-1195), AP01 (WO 2014/076292) 및 HFE7A (US6972323), OX40 항체 SF2 (US2014/0377284), CD40 항체 SGN 40 (US6838261) 및 CP870893 (US7338660), 4-1BB 항체 MOR7480 (WO 2012/032433) 및 BMS-663513 (US8475790), CD20 항체 HuMab-7D8 및 11B8 (WO2004/035607), CD52 항체 알렘투주맙 (Crowe et al., Clin Exp Immunol. 1992;87(1):105-10), 및 EGFR 항체 2F8 (WO2002/100348)로부터 유래된 VH 및 VL 서열을 갖는다. 실시예 중 일부에서, gp120-특이적 항체인 인간 IgG1 항체 b12를 음성 대조군으로서 사용하였다 (Barbas et al., J Mol Biol. 1993 Apr 5;230(3):812-23).

[0861]

일시적 발현

[0862]

항체를 IgG1, κ로서 발현시켰다. 항체의 중쇄 및 경쇄 둘 다를 코딩하는 플라스미드 DNA 혼합물을 엑스피펙타민 (인비트로젠(Invitrogen), 미국)을 사용하여 본질적으로 제조업체에 의해 설명된 바와 같이 Expi293 세포 (라이프/써모 사이언티픽, 미국)에서 일시적으로 형질감염시켰다.

- [0863] 단백질의 정제 및 분석
- [0864] 항체를 단백질 A 친화도 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 배양 상청액을 0.20 μM 데드-엔드 필터 상에서 여과하고, 5 mL 맵셀렉트 슈어(MabSelect SuRe) 칼럼 (지이 헬스케어(GE Healthcare)) 상에 로딩하고, 세척하고, 0.02 M 시트르산나트륨-NaOH, pH 3으로 용리시켰다. 용리액을 정제 직후 하이프랩 탈염 칼럼 (지이 헬스케어) 상에 로딩하고, 항체를 12.6 mM NaH_2PO_4 , 140 mM NaCl, pH 7.4 완충제 (비.브라운(B.Braun) 또는 써모피셔) 내로 완충제 교환하였다. 완충제 교환 후, 샘플을 0.2 μm 데드-엔드 필터 상에서 멸균 여과하였다. 정제된 단백질을 소듐 도데실 술페이트-폴리아크릴아미드 겔 (CE-SDS) 상의 모세관 전기영동 및 고성능 크기 배제 크로마토그래피 (HP-SEC)를 포함한 다수의 생물분석 검정에 의해 분석하였다. 농도를 280 nm에서의 흡광도에 의해 측정하였다. 정제된 항체를 2-8°C에서 저장하였다.
- [0865] 이중특이적 항체의 생성
- [0866] 이중특이적 IgG1 항체를 제어된 환원 조건 하에 Fab-아암-교환에 의해 생성하였다. 이러한 방법에 대한 기초는 WO2011/131746에 기재된 바와 같은 특정 검정 조건 하에서 이중이량체의 형성을 촉진하는 상보적 CH3 도메인의 사용이다. F405L 및 K409R (EU 넘버링) 돌연변이를 항-DR5 IgG1 항체에 도입하여 상보적 CH3 도메인을 갖는 항체 쌍을 생성하였다. F405L 돌연변이를 IgG1-b12-K326A/E333A/P396L/E430G 및 IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G에 도입하고; K409R 돌연변이를 IgG1-b12-K326W/E333S/E430G 및 IgG1-hDR5-01-G56T-K326A/E333A/P396L/E430G에 도입하였다. 이중특이적 항체를 생성하기 위해, 각각의 항체가 0.5 mg/mL의 최종 농도인 2종의 모 상보적 항체를 총 부피 100 μL PBS 중 75 mM 2-메르캅토에틸아민-HCl (2-MEA)과 함께 31°C에서 5시간 동안 인큐베이션하였다. 스핀 칼럼 (마이크로콘 원심분리 필터, 30k, 밀리포어(Millipore))을 제조업체의 프로토콜에 따라 사용하여 환원제 2-MEA를 제거함으로써 환원 반응을 정지시켰다. 항체를 12.6 mM NaH_2PO_4 , 140 mM NaCl, pH 7.4 완충제 (비.브라운 또는 써모) 내로 완충제 교환하였다. 이러한 방식으로 이중특이적 항체인 BsAb (hDR5-01-G56T-K409Rxb12-F405L)-K326A/E333A/P396L/E430G로 지칭되는 IgG1-hDR5-01-G56T-K326A/E333A/P396L/K409R/E430G x IgG1-b12-K326A/E333A/P396L/F405L/E430G 및 BsAb (IgG1-CONA-C49W-F405L x IgG1-b12-K409R)-K326W/E333S/E430G로 지칭되는 IgG1-CONA-C49W-F405L-K326W/E333S/E430G x IgG1-b12-K409R-K326W/E333S/E430G를 생성하였다.
- [0867] 실시예 2: 효능작용 항-DR5 항체의 효능에 대한 E430G와 K326A/E333A/P396L의 조합의 효과.
- [0868] DR5-양성 BxPC-3 세포 (ATCC, CRL-1687)에 대한 항-DR5 항체 IgG1-hDR5-01-G56T 및 IgG1-hDR-05의 효능작용 활성에 대한 Fc-Fc-중진 치환 E430G (WO2013/004842; WO2014/108198; WO2014/006217; de Jong et al. 2016)와 K326A/E333A/P396L (WO2016/116635)의 조합의 효과를 평가하기 위해 생존을 검정을 수행하였다. 세포를 트립신 처리에 의해 수거하고 세포 스트레이너에 통과시켰다. 세포를 1,200 rpm에서 5분 동안 원심분리에 의해 펠릿화하고, 배양 배지 (25mM HEPES 및 L-글루타민 (론자(Lonza) 카탈로그 번호 BE12-115F) + 철을 함유한 10% 열 불활성화된 공여자 소 혈청 (DBSI; 라이프 테크놀로지스(Life Technologies) 카탈로그 번호 10371-029) + 50 U/mL 페니실린/스트렙토마이신 (Pen/Strep; 론자; 카탈로그 번호 DE17-603E)을 함유한 RPMI 1640)에 0.5×10^5 개 세포/mL의 농도로 재현탁시켰다. 100 μL 의 단세포 현탁액 (웰당 5,000개 세포)을 폴리스티렌 96-웰 편평-바닥 플레이트 (그라이너 바이오-원(Greiner Bio-One), 카탈로그 번호 655182)에 시딩하고, 37°C에서 밤새 부착되도록 하였다. 이어서, 50 μL 의 일련의 연속 희석 항체 제제 (4배 희석으로 범위 0.0003 내지 20,000 ng/mL 최종 농도)를 첨가하고, 37°C에서 3일 동안 인큐베이션하였다. 음성 및 양성 대조군으로서, 세포를 각각 항체 없이 또는 5 μM 스타우로스포린 (시그마 알드리치(Sigma Aldrich), 카탈로그 번호 S6942)과 함께 인큐베이션하였다. 세포 배양물의 생존율을 대사적으로 활성인 세포의 지표인 존재하는 ATP를 정량화하는 셀타이터-글로벌 발광 세포 생존을 검정 (프로메가(Promega), 카탈로그 번호 G7571)에서 결정하였다. 키트로부터, 웰당 20 μL 루시페린 용액 시약을 첨가하고, 플레이트를 500 rpm에서 2분 동안 진탕함으로써 혼합하였다. 이어서, 플레이트를 37°C에서 1.5시간 동안 인큐베이션하였다. 100 μL 상청액을 백색 옵티플레이트-96 (퍼킨 엘머(Perkin Elmer), 카탈로그 번호 6005299)으로 옮기고, 발광을 엔비전 멀티라벨 판독기 (퍼킨엘머) 상에서 측정하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 비-선형 회귀 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)를 사용하여 데이터를 분석하고 플롯팅하였다. 도 1은 하기 식을 사용하여 계산된 바와 같은 생존 세포 백분율을 보여준다: % 생존 세포 = [(발광 항체 샘플 - 발광 스타우로스포린 샘플)/(발광 부제 항체 샘플 - 발광 스타우로스포린 샘플)]*100.
- [0869] 도 1은 Fc-Fc-중진 치환 E430G와 3개의 치환 K326A/E333A/P396L을 조합하는 것이 부착 인간 BxPC-3 체장암 세포에 대한 시험관내 생존을 검정에서 단일 작용제로서 시험하였을 때 항-DR5 항체 IgG1-hDR5-01-G56T (도 1A)

및 IgG1-hDR5-05 (도 1B)에 대한 사멸 효능의 유도를 일으켰다는 것을 보여준다. 대조적으로, 이들 항체는 단지 E430G 또는 K326A/E333A/P396L이 존재할 때에만 이들 사전-부착된 BxPC-3 세포에 대해 효율적인 사멸을 나타내지 않았다. 또한, 비-교차차단 항체 IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05의 조합의 경우, 조합된 치환 K326A/E333A/P396L/E430G의 도입은 사전-부착된 BxPC-3 세포의 가장 효과적인 사멸을 유발하였다 (도 1C).

[0870] 이들 데이터는 K326A/E333A/P396L/E430G 치환이 부착 BxPC-3 세포에 대한 항-DR5 항체의 강한 효능작용 활성을 유도하였다는 것을 보여준다.

[0871] 실시예 3: K326A/E333A/P396L/E430G를 함유하는 1가 항-DR5 항체의 효능.

[0872] K326A/E333A/P396L/E430G를 함유하는 1가 항-DR5 항체의 효능을 연구하기 위해 인간 BxPC-3 췌장암 및 COLO 205 결장암 세포에 대해 생존을 검정을 수행하였다. 1가 DR5 항체를 실시예 1에 기재된 바와 같이 IgG1-hDR5-01-G56T-K326A/E333A/P396L/K409R/E430G와 IgG1-b12-K326A/E333A/P396L/F405L/E430G 사이의 제어된 Fab-아암 교환에 의해 생성하였다. BsAb (hDR5-01-G56T-K409Rxb12-F405L)-K326A/E333A/P396L/E430G로 지칭되는 생성된 이중특이적 항체는 DR5에 특이적인 하나의 아암 및 HIV 당단백질 gp120에 대한 하나의 비-특이적 아암을 함유하여, DR5-양성 인간 암 세포에 대한 1가 DR5 결합을 유발한다. BxPC-3 세포를 실시예 2에 기재된 바와 같이 수거하였다. COLO 205 세포 (ATCC, CCL-222)를 비-부착 세포 및 트립신처리된 부착 COLO 205 세포를 함유하는 배양 상청액을 폴림함으로써 수거하였다. 세포를 1,200 rpm에서 5분 동안 원심분리에 의해 펠릿화하고, 배양 배지 (25mM HEPES 및 L-글루타민 + 10% 열 불활성화된 DBSI + 50 U/mL Pen/Strep을 함유한 RPMI 1640)에 0.5×10^5 개 세포/mL의 농도로 재현탁시켰다. 100 μ L의 단세포 현탁액 (웰당 5,000개 세포)을 폴리스티렌 96-웰 편평-바닥 플레이트에 시딩하고, 37°C에서 밤새 부착되도록 하였다. 이어서, 50 μ L의 일련의 연속 희석 항체 제제 (4배 희석으로 범위 0.0024 내지 10,000 ng/mL 최종 농도)를 첨가하고, 37°C에서 3일 동안 인큐베이션하였다. 음성 및 양성 대조군으로서, 세포를 각각 항체 없이 또는 5 μ M 스타우로스포린과 함께 인큐베이션하였다. 배양된 세포의 생존율을 실시예 2에 기재된 바와 같이 셀타이터-글로 발광 세포 생존을 검정에서 결정하였다.

[0873] 도 2는 K326A/E333A/P396L/E430G 돌연변이의 존재 하에, IgG1-hDR5-01-G56T의 1가 변이체가 또한 인간 BxPC-3 췌장암 및 COLO 205 결장암 세포의 사멸을 유도할 수 있었다는 것을 보여준다.

[0874] 실시예 4: C1q 결합 및 효능작용 항-DR5 항체의 효능에 대한 E430G와 K326A/E333A, K326A/P396L 또는 E333A/P396L의 조합의 효과.

[0875] DR5-양성 BxPC-3 및 COLO 205 세포에 대한 항-DR5 항체 IgG1-hDR5-01-G56T의 효능작용 활성에 대한 Fc-Fc-증진 치환 E430G와 K326A/E333A/P396L의 3개의 치환 중 2개와의 조합의 효과를 연구하기 위해 생존을 검정을 수행하였다. 참조로서, 실시예 2에 기재된 바와 같은 E430G와 모든 3개의 치환 K326A/E333A/P396L과의 조합을 실험에 포함시켰다. 생존을 검정을 실시예 3에 기재된 바와 같이 수행하였다. 배양된 세포의 생존율을 실시예 2에 기재된 바와 같이 셀타이터-글로 발광 세포 생존을 검정에서 결정하였다.

[0876] 도 3은 Fc-Fc-증진 치환 E430G와 K326A/E333A/P396L로부터의 2개의 치환 (E333A/P396L, K326A/E333A 또는 K326A/P396L)을 조합하는 것이 부착 인간 BxPC-3 췌장 (도 3A) 및 COLO 205 결장 (도 3B) 암 세포에 대한 시험 관내 생존을 검정에서 단일 작용제로서 시험하였을 때 항-DR5 항체 IgG1-hDR5-01-G56T에 대한 사멸 효능의 유도를 일으켰다는 것을 보여준다. 대조적으로, 단지 E430G만이 존재하는 경우에는 이들 사전-부착된 암 세포에 대한 사멸이 관찰되지 않았다. E430G가 모든 3개의 돌연변이 K326A/E333A/P396L과 조합된 경우에 가장 효율적인 사멸이 관찰되었다.

[0877] 결합 ELISA를 수행하여 C1q 결합에 대한 상이한 치환의 효과를 평가하였다. K326A/E333A, K326A/P396L, E333A/P396L 또는 K326A/E333A/P396L 치환과 조합하여 E430G 치환을 함유하는 IgG-hDR5-01-G56T 변이체의 정제된 항체 샘플을 시험하고, WT IgG-hDR5-01-G56T 및 IgG-hDR5-01-G56T-E430G와 비교하였다. IgG-2F8-I253D/K322A를 C1q 결합에 대한 음성 대조군으로서 사용하였다. 100 μ L PBS 중 1 μ g/mL 항체 샘플과 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션함으로써 96-웰 마이크로론 ELISA 플레이트 (그라이너 카탈로그 번호 655092)의 코팅을 수행하였다. 플레이트를 세척하고, 진탕시키면서 0.025% 트윈 20 및 0.1% 젤라틴이 보충된 200 μ L/웰의 0.5x PBS로 실온에서 1시간 동안 차단시켰다. 인큐베이션 사이에 세척을 수행하면서, 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 100 μ L/웰의 정제된 C1q의 일련의 연속 희석물 (퀴델(Quidel) 카탈로그 번호 A400; 3배 희석으로 최종 C1q 농도 범위 30 - 0.010 μ g/mL)과 함께, 실온에서 1시간 동안 100 μ L/웰의 토끼 항-인간 C1q (다코(DAKO), 제품 번호 A0136, 1/4,000)와 함께, 및 실온에서 1시간 동안 검출 항체로서 100 μ L/웰의 돼지 항-토끼 IgG-HRP (다코, P0399, 1:10,000)와 함께 순차적으로 인큐베이션하고, 최종적으로 실온에서 약 15분 동안 100 μ L/웰의

기질과 1 mg/mL의 2,2'-아자-비스 (3-에틸벤조티아졸린-6-술폰산) (ABTS; 로슈 카탈로그 번호 11112 597001)과 함께 인큐베이션하였다. 100 µL 2% 옥살산의 첨가에 의해 반응을 정지시켰다. 흡광도를 바이오텍 EL808 마이크로플레이트 판독기 (바이오SPX)에서 405 nm에서 측정하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응 곡선에 피팅함으로써 log 변환된 데이터를 분석하였다.

[0878] 도 3C는 E430G Fc-Fc-증진 치환의 도입이 1 µg/mL의 코팅된 IgG1-hDR5-01-G56T 항체에 대한 겔보기 C1q 결합 친화도에 영향을 미치지 않은 반면, E430G 치환과 K326A/E333A, K326A/P396L, E333A/P396L 또는 K326A/E333A/P396L 치환의 조합을 함유하는 항체 변이체는 IgG1-hDR5-01-G56T 및 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G와 비교하여 증진된 C1q 결합을 나타냈다는 것을 보여준다 (표 2).

[0879] 표 2: IgG1-hDR5-01-G56T 항체 변이체에 대한 C1q 결합의 EC50 값 (ELISA)

IgG1-hDR5-01-G56T 항체 변이체 (1 µg/mL)	C1q 결합 EC50 (µg/mL)	SD	n	항체 변이체 대 WT ¹	항체 변이체 대 E430G ¹
WT	18.8	9.9	6	적용되지 않음	유의하지 않음
E430G	20.7	12.6	6	유의하지 않음	적용되지 않음
K326A/E333A/P396L /E430G	1.3	0.2	3	p<0.05	p<0.05
K326A/E333A/E430G	0.8	0.1	3	p<0.05	p<0.05
K326A/P396L/E430G	0.6	0.1	3	p<0.05	p<0.05
E333A/P396L/E430G	1.9	0.8	3	p<0.05	p<0.05

[0880]

¹일원 ANOVA p 값 = 0.0022; 본페로니 사후 검정 Ab 대 WT: 나타낸 바와 같이 p < 0.05.

[0881]

[0882] 종합하면, 이들 데이터는 E430G Fc-Fc-증진 치환을 K326A/E333A, K326A/P396L, E333A/P396L 또는 K326A/E333A/P396L 치환과 조합하는 것이 단지 E430G Fc-Fc-증진 돌연변이만을 갖는 항-DR5 항체 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G의 증가된 C1q 결합 및 증가된 효능작용 활성을 유발하였다는 것을 나타냈다.

[0883]

실시예 5: C1q 결합 및 효능작용 항-DR5 항체의 효능에 대한 E430G와 K326W/E333S의 조합의 효과.

[0884]

E430G Fc-Fc-증진 돌연변이를 함유하는 항체에 대한 C1q 결합에 대한 K326A/E333A 및 K326W/E333S의 효과를 평가하기 위해 결합 ELISA를 수행하였다. K326A/E333A 또는 K326W/E333S 돌연변이와 조합하여 E430G 치환을 함유하는 IgG1-CONA-C49W 변이체의 정제된 항체 샘플을 시험하고, WT IgG1-CONA-C49W 및 IgG1-CONA-C49W-E430G와 비교하였다. 또한, E430G 치환이 없는 IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S를 시험하였다. IgG1-2F8-I253D/K322A를 C1q 결합에 대한 음성 대조군으로서 사용하였다. C1q 결합 ELISA를 실시예 4에 기재된 바와 같이 1 µg/mL 항체로 코팅된 ELISA 플레이트 상에서 수행하였다.

[0885]

WT 항체와 비교하였을 때 K326W/E333S 치환의 도입에 의한 C1q 결합의 강한 증진이 확인되었다 (도 4A). 대조적으로, E430G Fc-Fc-증진 돌연변이의 도입은 1 µg/mL의 코팅된 IgG1-CONA-C49W 항체에 대한 겔보기 C1q 결합 친화도에 영향을 미치지 않았다. E430G 치환과 K326A/E333A 또는 K326W/E333S 치환의 조합을 함유하는 항체 변이체는 IgG1-hDR5-01-G56T 및 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G와 비교하여 강하게 증진된 C1q 결합을 나타냈다 (표 3).

[0886] 표 3: IgG1-CONA-C49W 항체 변이체에 대한 C1q 결합의 EC50 (ELISA)

IgG1-CONA-C49W 항체 변이체 (1 µg/mL)	C1q 결합 EC50 (µg/mL)	SD	n	항체 변이체 대 WT ¹	항체 변이체 대 E430G ¹
WT	15.2	12.2	3	적용되지 않음	유의하지 않음
E430G	15.4	6.1	3	유의하지 않음	적용되지 않음
K326W/E333S	0.3	0.1	3	p<0.05	p<0.05
K326A/E333A/E430G	0.8	0.3	3	p<0.05	p<0.05
K326W/E333S/E430G	0.5	0.1	3	p<0.05	p<0.05

[0887]

[0888] ¹일원 ANOVA p 값 = 0.0013; 본페로니 사후 검정 Ab 대 WT: 나타낸 바와 같이 p < 0.05.

[0889] DR5-양성 BxPC-3 및 COLO 205 세포에 대한 항-DR5 항체 IgG1-hDR5-01-G56T의 효능작용 활성에 대한 Fc-Fc-증진 돌연변이 E430G와 C1q 결합 치환 K326A/E333A 또는 K326W/E333S와의 조합의 효과를 연구하기 위해 생존율 검정을 수행하였다. 생존율 검정을 실시예 3에 기재된 바와 같이 수행하였다. 배양된 세포의 생존율을 실시예 2에 기재된 바와 같이 셀타이터-글로 발광 세포 생존율 검정에서 결정하였다.

[0890] 도 4B/C는 Fc-Fc-증진 치환 E430G와 2개의 돌연변이 K326W/E333S를 조합하는 것이 부착 인간 BxPC-3 췌장 (도 4B) 및 COLO 205 결장 (도 4C) 암 세포에 대한 시험관내 생존율 검정에서 단일 작용제로 시험하였을 때 항-DR5 항체 IgG1-hDR5-01-G56T에 대한 강한 사멸 효능의 유도를 일으켰다는 것을 보여준다. 대조적으로, WT 항체 및 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G는 효능을 나타내지 않았다. BxPC-3 및 COLO 205 암 세포 둘 다에 대해 IgG1-hDR5-01-G56T-K326A/E333A/E430G보다 IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G의 사멸 효능이 더 우수하였다.

[0891] 종합하면, 이들 데이터는 E430G Fc-Fc-증진 치환을 K326A/E333A 또는 K326W/E333S 치환과 조합하는 것이 단지 E430G 육량체화-증진 돌연변이만을 갖는 항-DR5 항체 IgG1-CONA-C49W-E430G의 증가된 C1q 결합 및 증가된 효능 작용 활성을 유발하였다는 것을 나타냈다.

[0892] 실시예 6: C1q 결합 및 효능작용 항-DR5 항체의 효능에 대한 E430G와 다른 Fc 변이체와의 조합의 효과.

[0893] E430G Fc-Fc 증진 치환을 함유하는 항체에의 C1q 결합에 대한 C1q 결합 치환 S267E/H268F/S324T 또는 IgG1/IgG3 키메라 이소형 IgG1 변이체 113F의 효과를 연구하기 위해 C1q 결합 ELISA를 수행하였다 (Tammen et al., J Immunol. 2017). 이들 치환을 갖는 및 갖지 않는 IgG1-hDR5-01-G56T 변이체의 정제된 항체 샘플을 시험하고, WT IgG1-hDR5-01-G56T 및 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G와 비교하였다. IgG1-2F8-I253D/K322A를 C1q 결합에 대한 음성 대조군으로서 사용하였다. C1q 결합 ELISA를 실시예 4에 기재된 바와 같이 1 µg/mL 항체로 코팅된 ELISA 플레이트 상에서 수행하였다.

[0894] 도 5A는 E430G Fc-Fc 증진 치환의 도입이 1 µg/mL의 코팅된 IgG1-hDR5-01-G56T 항체에 대한 걸보기 C1q 결합 친화도에 영향을 미치지 않았다는 것을 보여준다. 대조적으로, E430G 치환과 S267E/H268F/S324T 치환의 조합을 함유하는 항체 변이체는 IgG1-hDR5-01-G56T 및 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G와 비교하여 강하게 증진된 C1q 결합을 나타낸 반면, IgG113F-hDR5-01-G56T 포맷 변이체 내의 E430G 치환의 도입은 IgG1-hDR5-01-G56T 및 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G와 비교하여 약간 증진된 C1q 결합을 유발하였다 (표 4).

[0895] 표 4: IgG1-hDR5-01-G56T 항체 변이체에 대한 C1q 결합의 EC50 값 (ELISA)

IgG1-hDR5-01-G56T 항체 변이체 (1 µg/mL)	C1q 결합 EC50 (µg/mL)	SD	n	항체 변이체 대 WT ¹	항체 변이체 대 E430G ¹
WT	15.2	12.2	3	적용되지 않음	유의하지 않음
E430G	15.4	6.1	3	유의하지 않음	적용되지 않음
S267E/H268F/S324T/E430G	0.5	0.1	3	p<0.05	p<0.05
IgG113F-E430G	11.4	3.9	3	유의하지 않음	유의하지 않음

[0896]

[0897] ¹일원 ANOVA p 값 = 0.0013; 본페로니 사후 검정 Ab 대 WT: 나타낸 바와 같이 p < 0.05.

- [0898] DR5-양성 BxPC-3 및 COLO 205 세포에 대한 항-DR5 항체 IgG1-hDR5-01-G56T의 효능작용 활성에 대한 Fc-Fc 증진 치환 E430G와 C1q 결합 치환 S267E/H268F/S324T (Moore et al., MAbs 2010) 또는 IgG1/IgG3 키메라 이소형 변이체 113F (Natsume et al., Cancer Res. 2008)와의 조합의 효과를 연구하기 위해 생존율 검정을 수행하였다. 생존율 검정을 실시예 3에 기재된 바와 같이 수행하였다. 배양된 세포의 생존율을 실시예 2에 기재된 바와 같이 셀타이터-글로 발광 세포 생존율 검정에서 결정하였다.
- [0899] 도 5B/C는 Fc-Fc 증진 치환 E430G를 C1q 결합 치환 S267E/H268F/S324T와 조합하는 것이 부착 인간 BxPC-3 채장 (도 5B) 및 COLO 205 결장 (도 5C) 암 세포에 대한 시험관내 생존율 검정에서 단일 작용체로서 시험하였을 때 항-DR5 항체 IgG1-hDR5-01-G56T에 대한 사멸 효능의 유도를 일으켰다는 것을 보여준다. E430G가 IgG1-hDR5-01-G56T의 IgG1/IgG3 키메라 이소형 IgG1 변이체 113F에 혼입되었을 때, 사멸 효능의 유도가 COLO 205에서 관찰되었고 (도 5C), BxPC-3에서는 약간만, 즉 효능작용 활성이 단지 시험된 최고 항체 농도에서만 관찰되었다 (도 5B). 그러나, 이들 변이체 IgG1-hDR5-01-G56T-S267E/H268F/S324T/E430G 및 IgG113F-hDR5-01-G56T-E430G의 효능은 두 세포주 모두에서 IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G 및 IgG1-hDR5-01-G56T-K326A/E333A/P396L/E430G의 경우보다 유의하게 더 낮았다. 이전 실시예에서와 같이, WT 항체 및 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G는 효능을 나타내지 않았다.
- [0900] 종합하면, 이들 데이터는 E430G Fc-Fc 증진 치환을 S267E/H268F/S324T 치환과 조합하는 것이 단지 E430G Fc-Fc 증진 치환만을 갖는 항-DR5 항체 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G의 강하게 증가된 C1q 결합 및 효능작용 활성을 유발하였다는 것을 나타냈다. IgG113F-hDR5-01-G56T 포맷 변이체 내의 E430G 치환의 도입은 항체의 약간 증진된 C1q 결합 및 효능작용 활성을 유발하였다.
- [0901] 실시예 7: 효능작용 항-DR5 항체의 효능에 대한 E430G와 다른 Fc 돌연변이 및 변이체와의 조합의 효과의 요약
- [0902] 이전 실시예에서, Fc-Fc 증진 치환 E430G를 DR5 효능작용 또는 C1q 결합에 영향을 미치는 것으로 기재된 다른 Fc 영역 치환 또는 변이체와 조합하였을 때 항-DR5 항체 IgG1-hDR5-01-G56T의 효능작용 활성에 대한 효과를 시험하는 생존율 검정을 기재하였다. 본 실시예에서는, 실시예 2, 4, 5 및 6에서 효과가 없는 것으로 나타난 WT IgG1-hDR5-01-G56T에 비해 10 µg/mL의 나타난 항체와 3일 동안 인큐베이션한 후 생존 세포 백분율의 표시 및 순위에 의해 부착 인간 채장 BxPC-3 암 세포에 대한 모든 생존율 검정을 요약한 것이 제시된다. 부착 BxPC-3 세포에 대한 생존율 검정 및 셀타이터-글로 발광 검정에 대한 세부사항은 실시예 2에 기재되어 있다.
- [0903] 도 6은 열 불활성화된 태아 소 혈청을 함유하는 완전 배양 배지에서 10 µg/mL 항체와 부착 인간 BxPC-3 채장암 세포의 3일 인큐베이션 기간 후, Fc-Fc 증진 치환 E430G와 C1q 결합 이중 치환 K326W/E333S의 조합이 WT IgG1-hDR5-01-G56T 항체와 비교하였을 때 가장 유의한 효과를 나타냈다는 것을 보여준다. 또한, E430G와 K326A/E333A/P396L, E333A/P396L 및 K326A/E333A와의 조합은 WT 항체보다 유의하게 더 낮은 백분율의 생존 세포를 가져왔다. C1q 결합을 증진시키는 것으로 나타난 다른 Fc 변이체, 예컨대 S267E/H268F/S324T 및 IgG1/IgG3 키메라 IgG-113F는, 부착 BxPC-3 세포에서 10 µg/mL 항체를 사용한 실험 설정에서 IgG1-hDR5-01-G56T 내에서 E430G와 조합되었을 때 유의한 사멸 효능의 유도를 나타내지 않았고, 여기서 또한 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G는 단일 작용체로서 시험하였을 때 사멸 효능의 유도를 일으키지 않았다.
- [0904] 실시예 8: C1q 결합 치환과 조합하여 Fc-Fc 증진 치환을 갖는 효능작용 항-DR5 항체의 시험관내 활성에 대한 C1q의 효과.
- [0905] 이전 실시예는 증진된 C1q 결합이 E430G Fc-Fc-증진 돌연변이를 함유하는 시험된 항-DR5 항체의 보다 우수한 효능작용 활성에 기여한다는 것을 시사하였다. C1q의 효과를 시험하기 위해, 정제된 인간 C1q의 존재 또는 부재 하에 무혈청 배지 내 WIL2-S SF 세포에서 IgG1-CONA-K326A/E333A/P396L/E430G 및 IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G를 사용하여 생존율 검정을 수행하였다. WIL2-S SF 세포는 WIL2-S (ATCC, CRL-8885) B 림프 모구로부터 유래되었으며, 이를 50 U/mL Pen/Strep 및 1 mM 피루브산나트륨을 함유하는 HyQ-ADCF-Mab로 제제화된 배양 배지 (피바이오(Perbio), 카탈로그 번호 SH30349)에서 무혈청 조건 하에 성장하도록 적응시켰다. WIL2-S SF 현탁 세포를 세포 스트레이너에 통과시키고, 300xg에서 5분 동안 원심분리에 의해 펠릿화하고, 무혈청 배양 배지에 0.5×10^6 개 세포/mL의 농도로 재현탁시켰다. 100 µL의 단세포 현탁액 (웰당 50,000개 세포)을 폴리스티렌 96-웰 편평-바닥 플레이트 (그라이너 바이오-원, 카탈로그 번호 655182)에 시딩하였다. 25 µL의 일련의 연속 희석 항체 제제 (4배 희석으로 범위 0.0003 내지 20,000 ng/mL 최종 농도) 및 25 µL의 정제된 C1q (퀴델, 카탈로그 번호 A400; 2.5 µg/mL 최종 농도)를 첨가하고, 37°C에서 1일 동안 인큐베이션하였다. 음성 및 양성 대조군으로서, 세포를 각각 항체 없이 또는 5 µM 스타우로스포린 (시그마 알드리치, 카탈로그 번호

S6942)과 함께 배지에서 인큐베이션하였다. 세포 생존율을 TO-PRO-3 염색에 의해 결정하였다. TO-PRO-3은 이중 가닥 DNA에 결합하는 세포-불투과성 카르보시아닌 단량체 염색제이다. 이에 따라, TO-PRO-3은 사멸 세포 지표로서 사용될 수 있다. 모든 샘플을 폴리스티렌 96-웰 U-바닥 플레이트 (그라이너 바이오-원, 카탈로그 번호 650261)로 옮기고, 300 x g에서 3분 동안 원심분리한 후, 70 μ L의 상청액을 분리해내었다. 10 μ L TO-PRO-3 혼합물 (인비트로젠, 카탈로그 번호 T3605, 20 μ L TO-PRO-3 + 1980 μ L PBS)을 첨가한 후, 세포를 피펫팅에 의해 재현탁시켰다. TO-PRO-3-양성 세포의 양을 BD LSR포르테사 X-20 세포 분석기 (BD 바이오사이언시스(BD Biosciences)) 상에서 유동 세포측정법에 의해 결정하였다.

[0906] 도 7은 정제된 C1q를 무혈청 배지에 첨가하는 것이 WIL2-S SF 세포에 대한 IgG1-CONA-K326A/E333A/P396L/E430G (도 7A) 및 IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G (도 7B) 둘 다의 효력을 크게 증진시켰다는 것을 보여준다. 이들 데이터는 C1q 결합이 K326A/E333A/P396L 또는 C1q 결합 K326W/E333S 치환과 조합하여 E430G Fc-Fc 증진 치환을 함유하는 효능작용 항-DR5 항체의 보다 우수한 효능작용 활성화에 기여한다는 것을 나타낸다.

[0907] 실시예 9: C1q 결합 치환과 조합하여 Fc-Fc 증진 치환을 갖는 효능작용 항-DR5 항체의 시험관내 효능작용 활성화에 대한 C1q의 효과.

[0908] 실시예 8에서, 효능작용 항-DR5 항체의 효능에 대한 C1q의 효과를 일련의 항체 농도 및 고정된 C1q 농도를 갖는 무혈청 배지 내 WIL2-S SF 세포에 대한 생존율 검정에서 시험하였다. 본 실시예에서, 무혈청 배지 내 WIL2-S SF 세포에 대한 생존율 검정에서 C1q 결합 치환 (K326A/E333S/P396L, K326W/E333S 또는 K326A/E333A)과 조합하여 Fc-Fc 증진 치환 (E430G)을 갖는 효능작용 IgG1-hDR5-01-G56T 항체 변이체의 효능에 대한 일련의 농도의 C1q의 효과를 시험하였다. 2.5 μ g/mL의 고정된 항체 농도 및 4배 희석으로 0.0002 내지 2.5 μ g/mL 최종 농도 범위의 일련의 농도의 정제된 C1q를 사용하여, 본질적으로 실시예 8에 기재된 바와 같이 생존율을 검정을 수행하였다.

[0909] 도 8은 정제된 C1q를 무혈청 배지에 첨가하는 것이 E430G Fc-Fc 증진 치환을 함유하는 항-DR5 항체의 효력을 증진시켰다는 것을 보여준다. C1q 결합-증진 치환 (K326A/E333S/P396L, K326W/E333S 또는 K326A/E333A)을 함유하는 모든 시험된 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G 항체 변이체는 C1q 용량-의존성 방식으로 WIL2-S SF 세포에 대한 효능을 나타냈다 (도 8A). IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G는 모든 시험된 항체의 최고 효능을 나타냈고, 0.16 μ g/mL로부터 시작하는 C1q 농도 범위에서 최대 사멸에 도달하였다. 이들 데이터는 C1q 결합이 K326A/E333A/P396L, K326W/E333S 또는 K326A/E333A C1q 결합 치환과 조합하여 E430G Fc-Fc-증진 치환을 함유하는 효능작용 항-DR5 항체의 보다 우수한 활성화에 기여한다는 것을 나타낸다. 또한, 이중 에피토프 표적화 항체 조합 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G는 무혈청 배지 내 WIL2S-SF 세포를 사멸시키는 효능의 C1q 용량-의존성 증가를 나타냈으며, 약 0.16 μ g/mL C1q에서 최대 사멸에 도달하였다 (도 8B).

[0910] 실시예 10: C1q 결합 치환과 조합하여 Fc-Fc 증진 치환을 갖는 효능작용 항-DR5 항체의 시험관내 효능작용 활성화에 대한 C1q 증화의 효과.

[0911] 정제된 C1q를 함유하는 무혈청 배지 내 WIL2-S SF 세포에 대한 생존율 검정에서 C1q 구상 헤드 영역에 대해 지시된 항-C1q 중화 항체를 사용함으로써, C1q 결합을 위한 K326W/E333S 치환과 조합하여 E430G Fc-Fc 증진 치환을 함유하는 효능작용 항-DR5 IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G의 효능에 대한 C1q의 요건을 시험하였다. 유사하게, 이중 에피토프 표적화 항체 조합 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G에 대해 동일한 세팅에서 중화 C1q의 효과를 또한 시험하였다. 생존율 검정을 본질적으로 실시예 8에 기재된 바와 같이 수행하였다. 간략하게, WIL2-S SF 세포를 0.67×10^6 개 세포/mL의 농도로 무혈청 배양 배지에 재현탁시켰다. 75 μ L의 단세포 현탁액 (웰당 50,000개 세포)을 폴리스티렌 96-웰 편평-바닥 플레이트 내 무혈청 배양 배지에 시딩하였다. 이어서, 25 μ L 항-DR5 항체 샘플 (2.5 μ g/mL 최종 농도), 25 μ L의 정제된 C1q (0.01 μ g/mL 최종 농도) 및 25 μ L 항-C1q 항체 샘플 (산퀸(Sanquin), CLB/C1q-85 카탈로그 번호 MW1828; 10 μ g/mL 최종 농도)을 첨가하고, 37°C에서 1일 동안 인큐베이션하였다. 세포 생존율을 실시예 8에 기재된 바와 같이 TO-PRO-3 염색에 의해 결정하였다.

[0912] 실시예 9에 기재된 바와 같이 항-DR5 항체 IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G의 효력을 증진시키기 위해 정제된 C1q를 무혈청 배지에 첨가하는 효과가 본 실험에서 확인되었다 (도 9A). 또한, 이러한 효력은 항-DR5 항체에 대한 보충된 C1q의 결합이 과량의 항-C1q 항체의 존재에 의해 중화되었을 때 감소되었다 (도 9A). 이들 데이터는 K326W/E333S C1q 결합 치환과 조합하여 E430G Fc-Fc 증진 치환을 함유하는 효능작용 항-DR5 항체의 최적 활성을 위해 C1q 결합이 필요하다는 것을 설명해준다. 또한, 이중 에피토프 표적화 항체 항체 조합 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G에 대해 WIL2S-SF 세포를 사멸시키기 위한 C1q-의존성 효능이 확인되

었으며, 이는 무혈청 배지에 C1q 첨가시 증진된 효능 및 과량의 항-C1q 항체의 존재에 의한 이러한 효과의 중화를 나타낸다 (도 9B).

[0913] 실시예 11: C1q 결합 치환과 조합하여 Fc-Fc 증진 치환을 갖는 항체에 대한 용액 상 보체 활성화 검정.

[0914] 항체를 정상 인간 혈청 (NHS)에서 인큐베이션한 후 전형적 보체 경로 활성화에 대한 마커인 C4d의 정량화에 의해 항체 변이체에 의한 표적 결합-비의존성 보체 활성화를 결정하였다. (1) 인간 C4의 C4d-함유 활성화 단편에 특이적으로 결합하는 마우스 모노클로날 항체로 코팅된 마이크로어레이 플레이트, (2) HRP-접합된 염소 항-인간 C4d 항체, 및 (3) 발색 기질을 함유하는 마이크로뷰(MicroVue) C4d 효소 면역 검정 (퀴넬, 카탈로그 번호 A0008)을 사용하여 3-단계 ELISA 절차를 수행하였다. 내부 대조군 및 표준물을 키트에 보충하고, 제조업체 설명서에 기재된 바와 같이 사용하였다. 양성 대조군으로서, 열 응집된 감마 글로블린을 하기와 같이 제조하였다. IVIG 용액의 1.5 ml 바이알 내 1 mL 분취물 (60 mg/mL; 산킨, 카탈로그 번호 04H04H443A)을 63°C에서 20분 동안 가열하였다. 바이알을 풀링하고, PBS에 의해 20 mg/mL로 희석하고, 0.22 µm 세공 무계면활성제 셀룰로스 아세테이트 (SFCA) 막 시린지 필터 (코닝(Corning), 카탈로그 번호 431219)를 통해 여과하였다. ~0.2 mL의 분취물을 4°C에서 저장하였다. 항체 샘플의 경우, 90% 정상 인간 혈청 (NHS, 산킨 M0008AC) 중 100 µg/mL 항체 제제의 50 µL 샘플을 폴리프로필렌 96-웰 U-바닥 플레이트 (그라이너 바이오-원; 카탈로그 번호 650261)에서 1시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 이어서, 5 µL의 이들 샘플을 시편 희석제에 의해 90x 희석하고, 웰당 100 µL의 희석된 샘플을 250 µL 세척 용액으로 3회 사전세척한 코팅된 스트립에서 진탕시키면서 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 웰을 250 µL 세척 용액으로 5회 세척한 후, 웰당 50 µL C4d 접합체를 진탕시키면서 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 웰을 250 µL 세척 용액으로 5회 세척한 후, 웰당 100 µL 기질을 진탕시키면서 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 웰당 50 µL 정지 용액을 첨가하여 반응을 정지시키고, 바이오텍 EL808 마이크로플레이트 판독기 (바이오SPX)에서 405 nm에서 분광광도계로 색 강도를 측정하였다.

[0915] 양성 대조군 샘플은 음성 대조군 샘플과 비교하여 명확하게 증진된 C4d 수준을 나타냈다 (도 10). 대조적으로, C1q 결합 치환 K326W/E333S, K326A/E333A 또는 K326A/E333A/P396L과 조합하여 E430G Fc-Fc 증진 치환을 함유하는 모든 시험된 IgG1-hDR5-01-G56T 항체 변이체에 대해 표적 세포의 부재 하에 NHS에서 인큐베이션하였을 때 C4d 수준의 명확한 증진은 관찰되지 않았고 (도 10), 반면에 무작위 면역 복합체를 나타내는 양성 대조군 HAGG 및 유체 상 IgG1 육량체를 나타내는 IgG1-CONA-RGY를 NHS에서 인큐베이션하였을 때 C4d가 생성되었다. 이들 데이터는 C1q 결합 치환 K326W/E333S, K326A/E333A 또는 K326A/E333A/P396L과 조합하여 E430G Fc-Fc 증진 치환을 함유하는 IgG1-hDR5-01-G56T 항체 변이체가 용액 상에서 표적-비의존성 육량체화 및 보체 활성화를 보이지 않는다는 것을 나타낸다.

[0916] 실시예 12: C1q 결합 및 효능작용 항-DR5 항체의 효능에 대한 E430G와 K326W, E333S 또는 K326W/E333S의 조합의 효과.

[0917] E430G 치환을 갖거나 갖지 않는 IgG-CONA-C49W 변이체에의 C1q 결합에 대한 K326W, E333S 또는 K326W/E333S 치환 도입의 효과를 평가하기 위해 C1q 결합 ELISA를 수행하였다. IgG-2F8-I253D/K322A를 C1q 결합에 대한 음성 대조군으로서 사용하였다. 실시예 4에 기재된 바와 같이 상이한 농도의 정제된 C1q (3배 희석으로 범위 0.010 - 30 µg/mL)의 결합에 대해 시험된, 1 µg/mL 항체로 코팅된 96-웰 플레이트에서 ELISA 실험을 수행하였다. 405 nm에서 흡광도를 측정하고, 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응 곡선에 피팅함으로써 log-변환된 데이터를 분석하였다. 도 11A,B는 K326W, E333S 또는 K326W/E333S 치환의 도입이 모두 항-DR5 항체 IgG1-CONA-C49W 및 E430G Fc-Fc 상호작용 증진 및 육량체화-증진 돌연변이를 갖는 그의 변이체 IgG1-CONA-C49W-E430G 둘 다의 경우 무작위로 고정화된 항체에 대한 증가된 C1q 결합을 유발하였다는 것을 보여준다. IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G는 모든 시험된 항체 변이체의 가장 높은 걸보기 C1q 결합 친화도를 나타냈다.

[0918] WIL2-S SF 현탁 세포의 정제된 항체 변이체의 결합을 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 세포를 수거하고, 계수하고, PBS 중에서 세척하고, 배양 배지에 3.33×10^6 개 세포/mL로 재현탁시켰다. 30 µL 세포 (웰당 1×10^5 개 세포)를 96-웰 플레이트에 피펫팅하였다. 50 µL의 일련의 항체 적정 샘플 (3배 희석으로 범위 0.001 - 2.5 µg/mL 최종 항체 농도)을 첨가하고, 37°C에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 후속적으로, 20 µL의 정제된 C1q (2.5 µg/mL 최종 농도)를 첨가하고, 4°C에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 100 µL FACS 완충제 (PBS + 0.1% (w/v) 소 혈청 알부민 (BSA) + 0.02% (w/v) 아지드화나트륨)를 첨가한 후, 세포를 150 µL FACS 완충제로 2회 세척하였다. 세척된 세포를 50 µL의 FITC-표지된 토끼 항-인간 C1q 항체 (20 µg/mL 최종 농도; 다코

카탈로그 번호 F0254)와 함께 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 100 μL FACS 완충제를 첨가하고, 세포를 FACS 완충제로 2회 세척하였다. 세포를 30 μL FACS 완충제 중에 재현탁시키고, 아이큐 스크리너(iQue Screener) (인텔리사이트(IntelliCyt))를 사용하여 유동 세포측정법에 의해 형광을 측정하였다. 로그 변환된 C1q 농도 축을 갖는 결합 곡선을 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 비선형 회귀 분석 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)을 사용하여 분석하였다. 도 11C, D는 항-DR5 항체 IgG1-CONA-C49W 내 E333S 또는 E430G 치환만의 도입이 DR5-양성 WIL2-S SF 세포에 결합된 항체에 대한 C1q 결합에 대해 효과가 없었다는 것을 보여준다 (도 11C). 항-DR5 항체 IgG1-CONA-C49W 또는 IgG1-CONA-C49W-E430G 내 K326W 돌연변이의 도입은 항-DR5 항체-옵소닌화된 WIL2-S SF 세포에 대한 증가된 C1q 결합을 유발하였으며, 이는 IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G로 옵소닌화된 세포에 대해 관찰된 증가된 C1q 결합과 일치하였다 (도 11C, D). 항-DR5 항체 IgG1-CONA-C49W-E430G 내 E333S의 도입은 항체-옵소닌화된 WIL2-S SF 세포에 대한 C1q 결합의 보통의 증가를 유발하였다 (도 11D). 이들 유동 세포측정법 데이터는 세포-결합된 IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G가 가장 큰 결합력의 C1q 결합을 보였다는 것을 나타낸다.

[0919] WIL2-S SF 세포에 대한 DR5 효능제 활성화에 대한, E430G 치환을 갖거나 갖지 않는 항-DR5 IgG1-CONA-C49W 변이체 내 K326W, E333S 또는 K326W/E333S 도입의 효과를 평가하기 위해 생존율 검정을 수행하였다. 1-일 생존율 검정을 본질적으로 실시예 8에 기재된 바와 같이 수행하였다. 간략하게, 100 μL 세포를 96-웰 플레이트 내 무혈청 배지에 피펫팅하였다 (50,000개 셀/웰). 25 μL의 정제된 C1q (최종 농도 2.5 μg/mL) 및 25 μL의 일련의 농도 희석물의 항체 샘플 (5배 희석으로 범위 0.0003 - 20 μg/mL 최종 농도)을 첨가하고, 37°C에서 1일 동안 인큐베이션하였다. 실시예 2에 기재된 바와 같이 셀타이타글로 검정을 사용하여 세포 생존율을 결정하였다. 엔비전 멀티라벨 판독기 (피킨엘머) 상에서 발광을 측정하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 비선형 회귀 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)를 사용하여 로그-변환된 C1q 농도 데이터를 분석하고 플롯팅하였다. 도 11E-G는 항-DR5 항체 IgG1-CONA-C49W 내 K326W, E333S 또는 E430G 돌연변이만의 도입이 WIL2-S SF 세포에서 DR5 효능제 활성화의 유도를 일으키지 않은 반면, IgG1-CONA-C49W 내 K326W/E333S 이중 돌연변이는 DR5 효능제 활성화의 유도 및 WIL2-S SF 세포의 부분적 사멸을 일으켰다는 것을 보여준다 (도 11E). 항-DR5 항체 IgG1-CONA-C49W 내 돌연변이 K326W, E333S 돌연변이 또는 이중 돌연변이 K326W/E333S와 Fc-Fc-중진 돌연변이 E430G와의 조합은 DR5 효능제 활성화의 유도를 일으켰으며, K326W/E333S/E430G가 WIL2-S SF 세포에서 최고 최대 사멸을 나타냈다 (도 11F).

[0920] 실시예 13: 효능작용 항-DR5 항체의 C1q-의존성 효능에 대한 E430G와 K326W, E333S 또는 K326W/E333S의 조합의 효과.

[0921] C1q-의존성 효능작용 활성화에 대한, 돌연변이 E430G를 갖거나 갖지 않는 항-DR5 IgG-CONA-C49W 항체 변이체 내 K326W, E333S 또는 K326W/E333S 치환 도입의 효과를 시험하였다. 본질적으로 실시예 8에 기재된 바와 같이, 일련의 C1q 농도 희석물을 사용하여 무혈청 배지 내 WIL2-S SF 세포를 사용하여 시험관내에서 1-일 생존율 검정을 수행하였다. 간략하게, 100 μL 세포를 96-웰 플레이트 내 무혈청 배지에 피펫팅하였다 (50,000개 셀/웰). 25 μL 항체 샘플 (2.5 μg/mL 최종 농도) 및 25 μL의 정제된 C1q의 일련의 농도 희석물 (3배 희석으로 범위 42 pg/mL - 2.5 μg/mL 최종 농도)을 첨가하고, 37°C에서 1일 동안 인큐베이션하였다. 실시예 2에 기재된 바와 같이 셀타이타-글로 검정을 사용하여 세포 생존율을 결정하였다. 엔비전 멀티라벨 판독기 (피킨엘머) 상에서 발광을 측정하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 비선형 회귀 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)를 사용하여 C1q 농도 로그-변환 데이터를 분석하고 플롯팅하였다. 도 12는 Fc-Fc-중진 치환 E430G 또는 C1q 결합-중진 치환 K326W 또는 E333S를 단일 돌연변이로서 항-DR5 항체 IgG1-CONA-C49W에 도입하는 것이 WIL2-S SF 세포의 C1q 용량-의존성 사멸의 유도를 일으키고, 이와 비교하여, K326W/E333S 이중 돌연변이의 도입은 WIL2-S SF 세포의 C1q 용량-의존성 사멸의 보다 효율적인 유도를 일으켰다는 것을 보여준다. E430G Fc-Fc-중진 치환 및 시험된 C1q 결합 치환을 조합하는 것은 보다 효율적인 사멸을 일으켰으며, IgG-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G가 WIL2-S SF 세포의 가장 효율적인 C1q 용량-의존성 사멸을 유도하였다 (도 12).

[0922] 실시예 14: K326W, E333S 또는 K326W/E333S 돌연변이와 조합하여 E430G 돌연변이를 갖는 항-DR5 항체의 시험관내 효능작용 활성화에 대한 C1q 중화의 효과.

[0923] E430G Fc-Fc-중진 돌연변이를 함유하는 효능제 항-DR5 항체의 효능에 대한 C1q의 기여를 시험하기 위해, 정제된 인간 C1q를 함유하는 무혈청 배지 내 IgG1-CONA-C49W 변이체로 옵소닌화된 WIL2-S SF 세포를 사용한 생존율 검정에서 C1q-중화 항체를 첨가하였다. 실험을 본질적으로 실시예 8에 기재된 바와 같이 수행하였다. 간략하게, 75 μL 세포 현탁액을 폴리스티렌 96-웰 편평 플레이트 내 무혈청 배지에 (웰당 50,000개 세포) 시딩하였다. 25 μL IgG1-CONA-C49W 항체 변이체 (2.5 μg/mL 최종 농도), 25 μL의 정제된 C1q (표 5에 따른 각각의 상이

한 항체에 대한 EC90 농도에 근사한 최종 C1q 농도) 및 25 μ L (10 μ g/mL 최종 농도) C1q-중화 항체 (CLB-C1q-85; 산킨, 물품 번호 MW1828) 또는 이소형 대조군 항체 (정제된 마우스 IgG1, κ 클론 MOPC-21; BD 바이오 사이언시스 카탈로그 번호 555746)를 WIL2-S SF 세포에 첨가하고, 37°C에서 1일 동안 인큐베이션하였다. 실시예 2에 기재된 바와 같이 셀타이터-글로 검정을 사용하여 세포 생존율을 결정하였다. 엔비전 멀티라벨 판독기 (퍼킨엘머) 상에서 발광을 측정하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하고 플롯팅하였다. 도 13은 C1q-중화 항체의 존재 하에, K326W/E430G, E333S/E430G 또는 K326W/E333S 치환을 갖는 IgG1-CONA-C49W 변이체의 DR5 효능제 활성이 완전히 억제되었다는 것을 보여준다. IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G의 경우, C1q 중화는 DR5 효능제 활성의 부분적 억제를 일으켰다.

[0924] 표 5: 실시예 13에 기재된 바와 같이 일련의 농도의 정제된 C1q가 보충된 무혈청 배지 내 WIL2-S SF 세포에 대한 생존율 검정에서 2.5 μ g/mL의 나타낸 항체에 대한 C1q EC90 값 (데이터는 제시되지 않음).

항체	C1q EC90 (μ g/mL)	도 13에서의 C1q 농도 (μ g/mL)
IgG1-b12	>2.5	2.5
IgG1-CONA-C49W	>2.5	2.5
IgG1-CONA-C49W-K326W/E430G	1.0	1.0
IgG1-CONA-C49W-E333S/E430G	>2.5	2.5
IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S	0.3	0.3
IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G	0.1	0.1

[0925]

[0926] 실시예 15: K326W, E333S 또는 K326W/E333S와 조합하여 E430G 돌연변이를 갖는 항-DR5 항체의 시험관내 효능작용 활성에 대한 Fc-Fc 상호작용 억제의 효과.

[0927] IgG1-CONA 항체 변이체에 의한 세포 사멸의 유도에서 Fc-Fc-매개된 항체 육량체화의 관여를 시험하기 위해, 본 발명자들은 Fc-Fc 상호작용에 관여하는 소수성 노브 영역 내의 코어 아미노산 (Diebolder et al., Science. 2014 Mar 14;343(6176):1260-3)을 함유하는 영역에서 Fc에 결합하는 13-잔기 펩티드 DCAWHLGELVWCT (DeLano et al., Science 2000 Feb 18;287(5456):1279-83)를 사용하였다. WIL2-S SF 세포의 생존율을 본질적으로 실시예 14에 기재된 바와 같이 DCAWHLGELVWCT 펩티드의 존재 또는 부재 하에 결정하였다. 간략하게, 75 μ L WIL2-S SF 세포 현탁액을 폴리스티렌 96-웰 편평-바닥 플레이트 내 무혈청 배지에 (웰당 50,000개 세포) 시딩하였다. 25 μ L의 항체 (2.5 μ g/mL 최종 농도)를 첨가하고, 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 25 μ L의 Fc-Fc-억제 펩티드 DCAWHLGELVWCT 또는 스크램블링된 대조군 펩티드 WCDLEGVTWHACL (80 μ g/mL)을 첨가하고, 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 25 μ L의 정제된 C1q (실시예 14, 표 1에 열거된 바와 같은 각각의 상이한 항체에 대한 EC90에 근사한 최종 C1q 농도)를 첨가하고, 반응 혼합물을 37°C에서 1일 동안 인큐베이션하였다. 실시예 2에 기재된 바와 같이 셀타이터-글로 검정을 사용하여 세포 생존율을 결정하였다. 엔비전 멀티라벨 판독기 (퍼킨엘머) 상에서 발광을 측정하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하고 플롯팅하였다. 도 14는 Fc-Fc-억제 펩티드 DCAWHLGELVWCT의 존재 하에, K326W/E430G, E333S/E430G, K326W/E333S 또는 K326W/E333S/E430G 치환을 갖는 IgG1-CONA-C49W 변이체의 DR5 효능제 활성이 부분적으로 억제되었다는 것을 보여준다. Fc-Fc-억제 펩티드는 돌연변이 E430G를 갖지 않는 IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S보다 Fc-Fc-증진 돌연변이 E430G를 갖는 IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G의 효능작용 활성을 더 강하게 억제하였다.

[0928] 실시예 16: 항-DR5 항체의 효능제 활성에 대한 K326W/E333S와 Fc-Fc-증진 돌연변이 E345K, E345R 또는 S440Y와의 조합의 효과

[0929] BxPC-3 세포에 흡수된 항-DR5 항체 IgG1-CONA-C49W의 효능제 활성에 대한, C1q 결합 치환 K326W/E333S와 Fc-Fc-증진 돌연변이 E345K, E345R 또는 S440Y와의 조합의 효과를 연구하기 위해 생존율 검정을 수행하였다. 생존율 검정을 본질적으로 실시예 2에 기재된 바와 같이 수행하였다. 간략하게, 100 μ L BxPC-3 단세포 현탁액을 폴리스티렌 96-웰 편평-바닥 플레이트 내 완전 배양 배지 (10% DBSI를 함유하는 RPMI)에 (웰당 5,000개 세포) 시딩하고, 37°C에서 밤새 부착되도록 하였다. 이어서, 50 μ L의 일련의 연속 희석 항체 제제 (5배 희석으로 범위 0.0003 내지 20 μ g/mL 최종 농도)를 첨가하고, 37°C에서 3일 동안 인큐베이션하였다. 셀타이터-글

로 검정을 사용하여 세포 생존율을 결정하였다. 엔비전 멀티라벨 판독기 (피킨엘머) 상에서 발광을 측정하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 비-선형 회귀 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)를 사용하여 로그-변환된 농도 축을 갖는 데이터를 분석하고 플롯팅하였다. 도 15A는 IgG1-CONA-C49W에 의한 BxPC-3 세포의 사멸이 E345R 돌연변이의 도입에 의해 강하게 유도되었고, E430G 또는 E345K 돌연변이에 의해 약간 유도된 반면, S440Y는 효과를 나타내지 않았다는 것을 보여준다. 도 15B는 IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S 변이체에 의한 BxPC-3 세포의 사멸이 E430G, E345K 또는 E345R 돌연변이의 도입에 의해 증가된 반면, S440Y 돌연변이의 도입에 의해서는 추가로 증진되지 않았다는 것을 보여준다. 종합하면, 이들 데이터는 C1q 결합-증진 K326W/E333S 돌연변이가 상이한 Fc-Fc-증진 돌연변이, 예컨대 E430G, E345K 또는 E345R을 갖는 항-DR5 효능제 IgG1 항체의 효능을 증진시킬 수 있다는 것을 나타낸다.

[0930] 실시예 17: 효능작용 항-DR5 항체의 효능에 대한, E430G와 다른 Fc 변형과의 조합의 효과

[0931] DR5-양성 BxPC-3 세포에 옴소닌화된 항-DR5 항체 IgG1-CONA-C49W의 효능작용 활성에 대한, Fc-Fc 증진 치환 E430G와 C1q 결합 치환 S267E/H268F/S324T 또는 IgG1/IgG3 키메라 이소형 변이체 113F와의 조합의 효과를 연구하기 위해 생존율 검정을 수행하였다. 생존율 검정을 본질적으로 실시예 3에 기재된 바와 같이 수행하였다. 간략하게, 100 μ L BxPC-3 단세포 현탁액을 폴리스티렌 96-웰 편평-바닥 플레이트 내 배양 배지 (10% 열-불활성화된 DBSI를 함유하는 RPMI)에 (웰당 5,000개 세포) 시딩하고, 37°C에서 밤새 부착되도록 하였다. 25 μ L의 정제된 C1q (2.5 μ g/mL 최종 농도) 및 25 μ L의 일련의 농도 희석물의 항체 샘플 (5배 희석으로 범위 0.0003 - 20 μ g/mL 최종 농도)을 첨가하고, 37°C에서 3일 동안 인큐베이션하였다. 배양된 세포의 생존율을 실시예 2에 기재된 바와 같이 셀타이타-글로 검정에서 결정하였다. 엔비전 멀티라벨 판독기 (피킨엘머) 상에서 발광을 측정하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 비-선형 회귀 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)를 사용하여 로그-변환된 농도 축을 갖는 데이터를 분석하고 플롯팅하였다. 도 16은 E430G Fc-Fc 증진 치환을 C1q 결합-증진 포맷 S267E/H268F/S324T (도 16A) 또는 IgG113F (도 16B)와 조합하는 것이 부착 인간 BxPC-3 체장암 세포에 대한 항-DR5 항체 IgG1-CONA-C49W의 효능제 활성의 유도를 일으켰다는 것을 보여준다. E430G 치환을 K326W/E333S C1q 결합-증진 돌연변이와 조합하는 것은 IgG1-CONA-C49W-S267E/H268F/S324T/E430G 및 IgG113F-CONA-C49W-E430G와 비교하여 IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G에 의한 더 강한 DR5 효능작용 활성을 유발하였다.

[0932] 실시예 18: K326W/E333S/E430G 치환을 함유하는 1가 항-DR5 항체의 효능

[0933] BxPC-3 체장암 세포에 옴소닌화된 K326W/E333S/E430G 치환을 함유하는 1가 항-DR5 항체의 효능제 활성에 대한 효과를 연구하기 위해 생존율 검정을 수행하였다. 실시예 1에 기재된 바와 같이 IgG1-CONA-C49W-F405L-K326W/E333S/E430G와 IgG1-b12-K409R-K326W/E333S/E430G 사이의 제어된 Fab-아암 교환에 의해 1가 DR5 항체를 생성하였다. BsAb (IgG1-CONA-C49W-F405L x IgG1-b12-K409R)-K326W/E333S/E430G로 지칭되는 생성된 이중특이적 항체는 DR5에 특이적인 하나의 아암 및 HIV 당단백질 gp120에 대한 하나의 비-특이적 아암을 함유하여, DR5-양성 인간 세포에 대한 1가 DR5 결합을 유발한다. 1-일 생존율 검정을 본질적으로 실시예 8에 기재된 바와 같이 WIL2-S SF 세포에 대해 수행하였다. 간략하게, 100 μ L WIL2-S SF 세포를 96-웰 플레이트 내 무혈청 배지에 피펫팅하였다 (50,000개 셀/웰). 25 μ L의 정제된 C1q (2.5 μ g/mL 최종 농도) 및 25 μ L의 일련의 농도 희석물의 항체 샘플 (5배 희석으로 범위 0.0003 - 20 μ g/mL 최종 농도)을 세포에 첨가하고, 37°C에서 1일 동안 인큐베이션하였다. 실시예 2에 기재된 바와 같이 셀타이타-글로 검정을 사용하여 세포 생존율을 결정하였다. 엔비전 멀티라벨 판독기 (피킨엘머) 상에서 발광을 측정하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 비-선형 회귀 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)를 사용하여 로그-변환된 농도 축을 갖는 데이터를 분석하고 플롯팅하였다. 도 17은 K326W/E333S/E430G 돌연변이의 존재 하에, IgG1-CONA-C49W의 1가 변이체가 또한 WIL2-S SF 세포의 사멸을 유도할 수 있었다는 것을 보여준다.

[0934] 실시예 19: 항-DR5 항체의 상이한 이소형 변이체의 효능제 활성에 대한 E430G와 K326W/E333S의 조합의 효과.

[0935] K326W/E333S/E430G 치환의 도입이 비-IgG1 항체 백본의 항-DR5 항체의 효능제 활성을 유도할 수 있는지를 시험하기 위해, 인간 IgG3의 불변 도메인을 갖는 IgG1-CONA-C49W의 IgG3 이소형 변이체를 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 생성하여, IgG3-CONA-C49W를 얻었다. IgG3 백본은 또한 증진된 FcRn 결합을 위한 R345H 돌연변이를 함유하였다 (Stapleton et al., 2011 Nat Commun). K326W/E333S/E430G 치환을 IgG1 및 IgG3 이소형 변이체 둘 다에 도입하였고, 상이한 항체의 효능제 활성을 상이한 세포주: 인간 WIL2-S SF B 림프모구 세포, BxPC-3 및 HPAF-II (ATCC, CRL-1997) 체장암 세포 및 HT-29 (ATCC, HTB-38) 결장암 세포를 사용하여 시험관내 생존율 검정에서 시험하였다. WIL2-S SF 현탁 세포를 사용하는 생존율 검정을 본질적으로 실시예 8에 기재된 바와 같이

수행하였다. 간략하게, 100 μ L WIL2-S SF 세포를 96-웰 플레이트 내 무혈청 배지에 피켓팅하였다 (50,000개 셀/웰). 이어서, 25 μ L의 정제된 C1q 샘플 (2.5 μ g/mL 최종 농도) 및 25 μ L의 일련의 농도 희석물의 항체 샘플 (5배 희석으로 범위 0.0003 - 20 μ g/mL 최종 농도)을 세포에 첨가하고, 37°C에서 1일 동안 인큐베이션하였다. 부착 세포 BxPC-3, HPAF-II 및 HT-29에 대해, 3-일 생존을 검정을 본질적으로 실시예 3에 기재된 바와 같이 수행하였다. 간략하게, 100 μ L 세포를 96-웰 플레이트 내 배양 배지 (25mM HEPES 및 L-글루타민 + 10% 열 불활성화된 DBSI + 50 U/mL Pen/Strep를 함유한 RPMI 1640)에 피켓팅하고 (5,000개 세포/웰), 37°C에서 밤새 인큐베이션하여 부착되도록 하였다. 이어서, 25 μ L의 정제된 C1q 샘플 (2.5 μ g/mL 최종 농도) 및 25 μ L의 일련의 농도 희석물의 항체 샘플 (5배 희석으로 범위 0.0003 - 20 μ g/mL 최종 농도)을 세포에 첨가하고, 37°C에서 3일 동안 인큐베이션하였다. 실시예 2에 기재된 바와 같이 셀타이터-글로 검정을 사용하여 세포 생존율을 결정하였다. 엔비전 멀티라벨 판독기 (피킨엘머) 상에서 발광을 측정하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 비-선형 회귀 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)를 사용하여 로그-변환된 농도 축을 갖는 데이터를 분석하고 플롯팅하였다. 도 18은 항-DR5 항체의 IgG3 변이체 내 K326W/E333S/E430G 치환의 도입 (IgG3-DR5-CONA-C49W-R435H-K326W/E333S/E430G)이 모든 시험된 세포주에서 효능제 활성의 유도를 일으켰다는 것을 보여준다: WIL2S-SF (도 18A), BxPC-3 (도 18B), HPAF-II (도 18C) 및 HT29 (도 18D). 모든 시험된 세포주에서 IgG1 변이체 IgG1-DR5-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G는 IgG3 변이체 IgG3-DR5-CONA-C49W-R435H-K326W/E333S/E430G보다 더 강력하였다.

[0936] 실시예 20: 항-DR5 항체의 효능제 활성에 대한 E430G와 K326W/E333T와의 조합의 효과

[0937] DR5-양성 WIL2-S 세포에 대한 항-DR5 항체 IgG1-CONA-C49W의 효능작용 활성에 대한, K326W/E333S와 비교하여 Fc-Fc-중진 치환 E430G와 K326W/E333T의 조합의 효과를 평가하기 위해 생존을 검정을 수행하였다. 시험관내 생존을 검정을 본질적으로 실시예 8에 기재된 바와 같이 수행하였다. 간략하게, 100 μ L WIL2-S 세포를 96-웰 플레이트 내 배양 배지 (25mM HEPES 및 L-글루타민 (론자, 카탈로그 번호 BE12-115F) + 10% 열 불활성화된 DBSI + 1 mM 피루브산나트륨 (론자, 카탈로그 번호 BE13-115E) + 50 U/mL Pen/Strep를 함유한 RPMI 1640)에 피켓팅하였다 (50,000개 세포/웰). 이어서, 50 μ L의 일련의 농도 희석물의 항체 샘플 (5배 희석으로 범위 0.001 - 20 μ g/mL 최종 농도) 및 10 μ L의 정제된 C1q 샘플 (2.5 μ g/mL 최종 농도)을 세포에 첨가하고, 37°C에서 1일 동안 인큐베이션하였다. 실시예 2에 기재된 바와 같이 셀타이터글로 검정을 사용하여 세포 생존율을 결정하였다. 엔비전 멀티라벨 판독기 (피킨엘머) 상에서 발광을 측정하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 비-선형 회귀 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)를 사용하여 데이터를 분석하고 플롯팅하였다. 도 19는 WIL2-S 세포에 대한 시험관내 생존을 검정에서 IgG1-CONA-C49W 내 K326W/E333T/E430G의 도입이 K326W/E333S/E430G의 도입에 의한 것과 유사한 사멸 효능을 갖는 단일 작용제의 DR5 효능제 활성의 유도를 일으켰다는 것을 보여준다.

[0938] 실시예 21: Fc-Fc-중진 돌연변이(들) 및/또는 C1q 결합에 영향을 미치는 Fc 돌연변이를 함유하는 IgG1-CONA-C49W 항체 변이체의 약동학 (PK) 분석.

[0939] IgG1-CONA-C49W의 클리어런스율에 대한 E430G Fc-Fc-중진 돌연변이 및 C1q 결합-중진 돌연변이의 효과를 SCID 마우스에서의 PK 실험에서 연구하였다. 모든 시험된 항체 변이체가 표 6에 열거되어 있다. 동물 실험을 법령 (2010/63/EU)으로부터 번역된 네덜란드 동물 보호법 (WoD) 및 적용가능한 경우, 문헌 [Code of Practice "animal experiments for cancer research" (Inspection V&W, Zutphen, The Netherlands, 1999)]에 따라 수행하였으며, 위트레흐트 윤리 위원회에 의해 승인받았다. 동물을 수용하고, AAALAC 및 ISO 9001:2000 인증 동물 시설 (GDL)에서 FELASA에 의해 규정된 바와 같은 우수 동물 관리기준에 따라 취급하였다. 11-12주령 암컷 SCID 마우스 (C.B-17/IcrHan[®]Hsd-Prkdc^{scid}; 엔비고(Envigo) SCID 마우스)에게 200 μ L 주사 부피 중 450 μ g 항체 (22.5 mg/kg)를 정맥내로 주사하였다 (군당 3마리 마우스). 50 μ L 혈액 샘플을 항체 투여 10분, 4시간, 1일, 2일, 7일, 14일 및 20일 후에 복제 정맥으로부터 수집하였다. 혈액을 헤파린-함유 바이알 내로 수집하고, 14,000 g에서 10분 동안 원심분리하였다. 20 μ L 혈장 샘플을 380 μ L PBS로 희석하고 (1:20), 항체 농도의 결정시까지 -20°C에서 저장하였다. 총 인간 IgG 농도를 샌드위치 ELISA를 사용하여 결정하였다. 마우스 항-인간 IgG-카파 mAb 클론 MH16 (CLB 산퀸, 카탈로그 번호 M1268)을 포획 항체로서 사용하고, 100 μ L로 4°C에서 밤새 96-웰 마이크로론 ELISA 플레이트 (그라이너, 독일)에 PBS 중 2 μ g/mL의 농도로 코팅하였다. 플레이트 진탕기 상에서 0.2% 소 혈청 알부민 (BSA)이 보충된 PBS와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션함으로써 플레이트를 차단하였다. 세척 후, 100 μ L의 희석된 혈장 샘플을 첨가하고, 플레이트 진탕기 상에서 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 300 μ L PBST (0.05% 트윈 20이 보충된 PBS)로 3회 세척하고, 후속적으로 플레이트 진탕기 상에서 100 μ L 퍼옥시다제-표지된 염소 항-인간 IgG 이뮤노글로불린 (#109-035-098, 잭슨

(Jackson), 펜실베이니아주 웨스트 그레이스; 0.2% BSA가 보충된 PBST 중 1:10.000)과 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 다시 300 μ L PBST로 3회 세척한 후, 빛으로부터 보호된 100 μ L 기질 2,2'-아지노-비스 (3-에틸벤즈티아졸린-6-술폰산) [ABTS; 로슈, 카탈로그 번호 11112 422001; 50 mL ABTS 완충제 (로슈, 카탈로그 번호 11112 597001) 중 1개의 정제]과 함께 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 100 μ L 2% 옥살산을 첨가하고 실온에서 10분 동안 인큐베이션함으로써 반응을 정지시켰다. 흡광도를 마이크로플레이트 판독기 (비오텍, 버몬트주 위누스키)에서 405 nm에서 측정하였다. 참조 곡선으로서 주사된 물질을 사용하여 농도를 계산하였다. 플레이트 대조군으로서 IgG를 함유하는 인간 골수종 단백질 (더 바인딩 사이트(The binding site), 카탈로그 번호 BP078)을 포함시켰다. 인간 IgG 농도 (μ g/mL)를 플롯팅하고 (도 20A), 그래프패드 프리즘을 사용하여 곡선하 면적 (AUC)을 계산하였다. 마지막 혈액 샘플링 날 (제21일)까지의 클리어런스를 식 $D \times 1.000 / AUC$ 에 의해 결정하였으며, 여기서 D는 22.5 mg/kg의 주사 용량이다 (도 20B). E430G Fc-Fc-중진 돌연변이 및/또는 C1q 결합-중진 돌연변이를 함유하는 모든 시험된 IgG1-CONA-C-49W 변이체는 WT IgG1과 대등한 클리어런스를 나타냈다 (도 20A,B). 결론적으로, C1q 결합-중진 돌연변이, 예컨대 K326W/E333S 또는 K326A/E333A의 도입은 E430G Fc-Fc-중진 돌연변이를 함유하는 IgG1 항체, 예컨대 IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G 및 IgG1-CONA-C49W-K326A/E333A/E430G에서의 클리어런스에 유의하게 영향을 미치지 않는다.

[0940] 표 6: scid 마우스에서의 PK 분석에서 시험된 IgG1-CONA-C49W 항체 변이체

항체 변이체	Fc-Fc-중진 돌연변이	C1q 결합-중진 돌연변이
IgG1-CONA-C49W	-	-
IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S	-	K326W/E333S
IgG1-CONA-C49W-K326W/E430G	E430G	K326W
IgG1-CONA-C49W-E333S/E430G	E430G	E333S
IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G	E430G	K326W/E333S
IgG1-CONA-C49W-K326A/E333A/E430G	E430G	K326A/E333A

[0941]

[0942] 실시예 22: IgG1 항체의 FcRn 결합에 대한 E430G Fc-Fc-중진 돌연변이와 C1q 결합-중진 돌연변이 K326A/E333A 또는 K326W/E333S의 조합의 효과.

[0943] 신생아 Fc 수용체 (FcRn)는 IgG를 분해로부터 보호함으로써 IgG의 긴 혈장 반감기를 담당한다. 항체의 내재화 후, FcRn은 엔도솜에서 항체 Fc 영역에 결합하며, 여기서 상호작용은 온화한 산성 환경 (pH 6.0) 하에 안정하다. 환경이 중성 (pH 7.4)인 형질막으로 재순환할 때, 상호작용은 상실되고, 항체는 다시 순환으로 방출된다. 이것은 IgG의 혈장 반감기에 영향을 미친다.

[0944] 인간 FcRn의 IgG1-7D8 항체 변이체에의 결합에 대한 Fc-Fc-중진 돌연변이와 C1q 결합-중진 돌연변이 K326A/E333A 또는 K326W/E333S의 조합 도입의 효과를 평가하기 위해 FcRn 결합 ELISA를 수행하였다. IgG1-7D8-I235A/H310A/H435A를 FcRn 결합에 대한 음성 대조군 (FcRn 녹아웃; 문헌 [Shields et al., J. Biol. Chem. 2001;276:6591])으로서 사용하였고; IgG1-7D8-M252Y/S254T/T256E를 중진된 FcRn 결합에 대한 대조군 (Da11'Acqua et al., J Biol Chem. 2006 Aug 18;281(33):23514-24)으로서 사용하였다. 모든 인큐베이션을 실온에서 수행하였다. 96 스트랩타웰 플레이트 (로슈, 카탈로그 번호 1734776001)를 PBST 플러스 0.2% BSA로 희석된, 인간 FcRn의 재조합적으로 생산된 비오틴화된 세포외 도메인 (FcRnECDHis-B2M-BIO, 즉 이량체로서 베타 2-마이크로글로불린을 갖는 C-말단 His 및 BAP 태그를 갖는 인간 FcRn의 세포외 도메인) 5 μ g/mL (100 μ L/웰)로 1시간 동안 코팅하였다. 플레이트를 PBST로 3회 세척하였다. 연속 희석된 항체 샘플 (PBST/0.2% BSA, pH 6.0 중 3배 희석으로 범위 0.003 - 10 μ g/mL 최종 농도)을 첨가하고, 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBST/0.2% BSA, pH 6.0으로 세척하였다. PBST/0.2% BSA, pH 6.0 또는 7.4로 희석된 양고추냉이 퍼옥시다제

(HRP)-접합된 폴리클로날 염소-항-인간 IgG (1:10,000; 잭슨 이뮤노리서치, 카탈로그 번호 109-035-097)를 첨가하고, 플레이트를 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 100 μ L ABTS (1mg/mL)를 기질로서 첨가하고, 플레이트를 빛으로부터 보호하면서 30분 동안 인큐베이션하였다. 100 μ L 2% 옥살산을 사용하여 반응을 정지시키고, ELx808 흡광도 마이크로플레이트 판독기 (바이오텍)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응 곡선에 피팅함으로써 log-변환된 데이터를 분석하였다. 음성 대조군 (IgG1-7D8-I235A/H310A/H435A)은 pH 6.0에서 인간 FcRn 결합의 완전한 상실을 나타낸 반면 (도 21A), 양성 대조군 (IgG1-7D8-M252Y/S254T/T256E)은 pH 6.0에서는 WT IgG1-7D8과 비교하여 인간 FcRn에 대한 증진된 결합을 나타냈고 pH 7.4에서는 결합의 상실을 나타냈다 (도 21B). C1q 결합-증진 돌연변이를 갖거나 갖지 않으면서 Fc-Fc-증진 돌연변이를 갖는 모든 시험된 IgG1-7D8 변이체는 pH 6.0에서 인간 FcRn에 대한 효율적인 결합 및 pH 7.4에서 결합의 상실을 나타냈다. 그러나, WT IgG1-7D8과 비교하여, Fc-Fc-증진 돌연변이 E430G 단독의 도입은 pH 6.0에서 인간 FcRn에 대한 약간 감소된 결합을 유발하였으며, 이는 C1q 결합-증진 돌연변이 K326A/E333A 또는 K326W/E333S 돌연변이와 조합하였을 때 약간 더 감소되었다.

[0945] 실시예 23: K326W/E333S/E430G 치환을 함유하는 항-CD20 IgG1-7D8 항체 변이체에 의한 ADCC 활성화에 대한 C1q의 효과.

[0946] E430G Fc-Fc-증진 돌연변이 및 C1q 결합-증진 치환 K326W/E333S를 둘 다 함유하는 항-CD20 IgG1-7D8 항체 변이체의 ADCC 활성화에 대한 C1q의 효과를 무혈청 배지 내 WIL2-S SF 세포를 사용하여 크로뎀-방출 검정에서 시험하였다. WIL2-S SF 세포를 수거하고 (5×10^6 개 세포/mL), 세척하고 (PBS로 2회, 1,200 rpm, 5분), 1 mL 무혈청 배지 (10% 피루브산나트륨이 보충된 HyQ ADFC-Mab 배지)에 수집하였다. 200 μ Ci 51 Cr (크로뎀-51; 아머샴 바이오사이언시스 유럽 게엠베하(Amersham Biosciences Europe GmbH))을 첨가하고, 진탕 수조에서 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포의 세척 (PBS로 2회, 1,200 rpm, 5분) 후, 세포를 무혈청 배지에 재현탁시켰다. 크로뎀-표지된 세포를 트리판 블루 배지에 의해 계수하고, 1×10^5 개 세포/mL의 농도로 희석하였다. 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 제조업체의 설명서 (림프구 분리 배지; 톤자)에 따라 표준 피콜 밀도 원심분리를 사용하여 건강한 공여자 (산균)로부터의 신선한 백혈구 연층으로부터 단리하였다. PBMC를 무혈청 배지에 재현탁시킨 후, PBMC를 트리판 블루 배지에 의해 계수하고, 1×10^7 개 세포/mL로 농축시켰다. ADCC 실험을 위해, 50 μ L 크로뎀-표지된 WIL2-S SF 세포를 96-웰 플레이트에 피펫팅하였다 (5,000개 세포/웰). 25 μ L의 일련의 희석물로부터의 항체 샘플 (3배 희석으로 범위 0.003 - 10 μ g/mL 최종 농도) 및 25 μ L의 정제된 인간 C1q (2.5 μ g/mL 최종 농도) 또는 배지를 첨가하고, 실온에서 10분 동안 사전-인큐베이션하였다. 이어서, 50 μ L PBMC (500,000개 세포/웰)를 첨가하여, 이펙터 대 표적 비가 100:1이 되도록 하고, 37°C에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 50 μ L 크로뎀-표지된 WIL2-S SF 세포 (5,000개 세포/웰)를 100 μ L 5% 트리톤-X100 (시그마-알드리치)과 함께 인큐베이션함으로써 최대 세포 용해를 결정하였다. 크로뎀-표지된 WIL2-S SF 세포 (5,000개 세포/웰)를 항체 및 이펙터 세포가 없는 150 μ L 배지에서 인큐베이션함으로써 자발적 용해를 결정하였다. 크로뎀-표지된 WIL2-S SF 세포 (5,000개 세포/웰)를 PBMC (500,000개 세포/웰)와 함께 항체의 부재하에 총 150 μ L의 부피로 인큐베이션함으로써 항체-비의존성 세포 용해를 결정하였다. 세포 용해의 양을 섬광 계수기를 사용하여 결정하였다. 세포를 원심분리하고 (1,200 rpm; 3분), 25 μ L 상청액을 100 μ L 마이크로싯트-40 용액이 채워진 96-웰 백색 오퍼레이티브 플레이트로 옮겼다. 상청액 내 방출된 51 Cr을 섬광 계수기를 사용하여 계수하였다. 측정된 분당 카운트 (cpm)를 사용하여 하기 식에 따라 항체-매개된 용해의 백분율을 계산하였다: $(\text{cpm 샘플} - \text{cpm 항체-비의존성 용해}) / (\text{cpm 최대 용해} - \text{cpm 자발적 용해}) \times 100\%$. 음성 대조군으로서, 보체 결합 및 활성화 뿐만 아니라 Fc γ R 결합 및 ADCC의 유도를 제거하는 것으로 공지된 (Lo et al. JBC 2017) L234A/L235A/P329G 치환을 갖는 IgG1-7D8 변이체 및 비-특이적 IgG1-b12 항체를 시험하였다. 예상된 바와 같이, 비-특이적 항체 IgG1-b12에 대해 C1q의 부재 하에서도 또는 존재 하에서도 ADCC 활성이 관찰되지 않았다 (도 22). IgG1-7D8-F405L-K326W/E333S/E430G 항체의 경우, 2.5 μ g/mL의 정제된 인간 C1q를 첨가하는 것은 무혈청 배지 내 WIL2-S SF 세포에 대한 ADCC 활성의 억제를 일으켰다. 대조적으로, C1q는 WT IgG1-7D8 및 IgG1-7D8-E430G의 ADCC 활성화에 영향을 미치지 않았다.

[0947] 실시예 24: 항-DR5 항체 IgG1-hDR5-01-G56T 및 IgG1-hDR5-05의 효능제 활성화에 대한 K326W/E333S/E430G의 효과.

[0948] 항-DR5 항체 IgG1-hDR5-01-G56T 및 IgG1-hDR5-05의 효능제 활성화에 대한 Fc-Fc-증진 돌연변이 E430G와 C1q 결합-증진 돌연변이 K326W/E333S의 조합 도입의 효과를 WIL2-S SF 세포를 사용하여 시험관내 생존율 검정에서 시험하였다. 1-일 생존율 검정을 본질적으로 실시예 8에 기재된 바와 같이 수행하였다. 간략하게, 100 μ L 세포를

96-웰 플레이트 내 무혈청 배지에 피펫팅하였다 (50.000개 셀/웰). 이어서, 25 μ L의 일련의 농도 희석물의 항체 샘플 (5배 희석으로 범위 0.0003 - 20 μ g/mL 최종 농도) 및 25 μ L의 정제된 C1q 샘플 (2.5 μ g/mL 최종 농도)을 세포에 첨가하고, 37°C에서 1일 동안 인큐베이션하였다. 실시예 2에 기재된 바와 같이 셀타이타더글로 검정을 사용하여 세포 생존율을 결정하였다. 엔비전 멀티라벨 판독기 (피킨엘머) 상에서 발광을 측정하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 비-선형 회귀 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)를 사용하여 데이터를 분석하고 플롯팅하였다.

[0949] E430G Fc-Fc-중진 및 K326W/E333S C1q 결합-중진 돌연변이 둘 다의 도입은 시험된 항체 IgG1-hDR5-01-G56T 및 IgG1-hDR5-05 둘 다에 대한 DR5 효능제 활성의 유도를 일으킨 반면에, 이들 항체는 단지 E430G Fc-Fc-중진 돌연변이만이 도입되었을 때에는 세포 사멸을 유도하지 않았다 (도 23).

[0950] 실시예 25: 항-DR5 항체 조합 효능제에서 K326W/E333S/E430G와 상보적 Fc 돌연변이 쌍 K439E; S440K와의 상용성.

[0951] K326W/E333S/E430G 돌연변이와, 상이한 세포-표면-표적-결합된 항체 사이의 분자간 Fc-Fc 상호작용을 제어할 수 있는 다른 Fc-조작 돌연변이, 예컨대 상보적 Fc 돌연변이 쌍 K439E; S440K과의 상용성을, WIL2-S SF 세포에 대한 시험관내 생존율 검정에서 항-DR5 효능제 항체 조합 IgG1-hDR5-01-K326W/E333S/E430G + IgG1-hDR5-05-K326W/E333S/E430G를 사용하여 시험하였다. 1-일 생존율 검정을 본질적으로 실시예 8에 기재된 바와 같이 수행하였다. 간략하게, 100 μ L 세포를 96-웰 플레이트 내 무혈청 배지에 피펫팅하였다 (50.000개 셀/웰). 이어서, 25 μ L의 일련의 농도 희석물의 항체 샘플 (5배 희석으로 범위 0.0003 - 20 μ g/mL 최종 농도) 및 25 μ L의 정제된 C1q 샘플 (2.5 μ g/mL 최종 농도)을 세포에 첨가하고, 37°C에서 1일 동안 인큐베이션하였다. 실시예 2에 기재된 바와 같이 셀타이타더글로 검정을 사용하여 세포 생존율을 결정하였다. 엔비전 멀티라벨 판독기 (피킨엘머) 상에서 발광을 측정하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 비-선형 회귀 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)를 사용하여 데이터를 분석하고 플롯팅하였다. 도 24는 Fc-Fc-억제 돌연변이 K439E를 함유하는 단일 항체 IgG1-hDR5-01-K326W/E333S/E430G-K439E가 임의의 세포 사멸을 거의 유도하지 않았다는 것을 보여준다. Fc-Fc-억제 돌연변이 S440K를 함유하는 IgG1-hDR5-05-K326W/E333S/E430G-S440K는 최대 사멸이 100%는 아니었지만, 일부 세포 사멸을 유도하였다. 대조적으로, 2개의 상보적 Fc-Fc 제어 돌연변이 K439E 및 S440K를 조합한, IgG1-hDR5-01-K326W/E333S/E430G-K439E + IgG1-hDR5-05-K326W/E333S/E430G-S440K 둘 다의 조합은, 상보적 Fc-Fc 제어 돌연변이 K439E 및 S440K가 없는 조합의 경우와 유사한, 효율적인 세포 사멸을 나타냈다. K326W/E333S/E430G 돌연변이를 함유하는 항체 조합 (상보적 돌연변이 K439E; S440K를 갖는 것 및 갖지 않는 것) (IgG1-hDR5-01-K326W/E333S/E430G-K439E + IgG1-hDR5-05-K326W/E333S/E430G-S440K)에 의한 세포 사멸은 단지 E430G Fc-Fc-중진 돌연변이만을 함유하는 항체의 조합보다 훨씬 더 효율적이었다.

[0952] 실시예 26: 항-CD52 항체의 CDC 효능에 대한 C1q 결합-중진 치환 K326W/E333S와 K248E/T437R과의 조합의 효과

[0953] CDC 효능에 대한, K326W/E333S C1q 결합-중진 돌연변이와 세포 표면 상의 항체 다량체화를 용이하게 하는 K248E/T437R 치환 (Zhang et al., 2017 MAbs (9)7:1129-42)과의 조합의 효과를, CD52-양성 Wien 133 B 세포 림프종 세포 상에서 항-CD52 IgG1-감파트 변이체 (알렘투주맙 기반)를 사용하여 시험하였다. Wien 133 세포 (영국 옥스포드 소재 바이오아나랩 리미티드(BioAnaLab Limited)의 제프 홀 박사(Dr. Geoff Hale)에 의해 친절하게 제공됨)를 수거하고, 배지 [0.2% 소 혈청 알부민 (BSA; 로슈 카탈로그 번호 10735086001)을 함유하는 RPMI (론자, 카탈로그 번호 BE12-115F)]에 재현탁시켰다. 40 μ L 세포를 둥근-바닥 96-웰 플레이트에 피펫팅하였다 (0.1x10⁶개 세포/웰). 40 μ L의 연속 희석된 항체 샘플 (4배 희석으로 범위 0.002 - 40 μ g/mL 최종 농도)을 첨가하고, 진탕시키면서 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 20 μ L NHS (20% 최종 농도)를 인간 보체의 공급원으로서 첨가하고, 37°C에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 얼음 상에 배치하여 반응을 정지시켰다. 냉각된 세포를 펠릿화하고, 30 μ L의 2 μ g/mL 아이오딘화프로피듐 (PI; 시그마 알드리치)에 재현탁시켰다. 샘플을 인텔리사이트 아이큐 스크리너 플러스 상에서 유동 세포측정법에 의해 분석하고, 용해 백분율을 하기 식에 따라 결정하였다: % 용해 = (PI-양성 세포의 수/총 세포 수) x 100%. 도 25는 WT IgG1-감파트에 육량체화-중진 단일 돌연변이 E430G 또는 다량체화-중진 이중 돌연변이 K248E/T437R의 도입이 Wien 133 세포에 대한 증가된 CDC 효능을 유발하였다는 것을 보여준다. 세포 표면 상의 다량체화를 용이하게 하는 K248E/T437R 돌연변이와 C1q 결합을 증진시키는 K326W/E333S 돌연변이를 조합함으로써 IgG1-감파트-K248E/K326W/E333S/T437R에서 CDC 효능이 추가로 증진되었다.

[0954] 실시예 27: C1q의 존재 하에 효능작용 항-DR4 항체의 효능에 대한 E430G와 K326W/E333S의 조합의 효과.

[0955] DR4-양성 BxPC-3 세포에 대한 항-DR4 항체 chCTB007의 효능작용 활성에 대한 육량체화-중진 돌연변이 E430G와

K326W/E333S의 조합의 효과를 연구하기 위해 생존율 검정을 수행하였다. 생존율 검정을 본질적으로 실시예 2에 기재된 바와 같이 수행하였다. 간략하게, 100 μ L BxPC-3 단세포 현탁액을 폴리스티렌 96-웰 편평-바닥 플레이트 내 배양 배지 (10% 열-불활성화된 DBSI를 함유하는 RPMI)에 (웰당 5,000개 세포) 시딩하고, 37°C에서 밤새 부착되도록 하였다. 25 μ L의 정제된 C1q 샘플 (2.5 μ g/mL 최종 농도) 및 25 μ L의 일련의 농도 희석물의 항체 샘플 (5배 희석으로 범위 0.00001 - 20 μ g/mL 최종 농도)을 첨가하고, 37°C에서 3일 동안 인큐베이션하였다. 배양된 세포의 생존율을 실시예 2에 기재된 바와 같이 셀타이타-글로 발광 세포 생존율 검정에서 결정하였다. 발광을 엔비전 멀티라벨 판독기 (퍼킨엘머) 상에서 측정하고, 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 비-선형 회귀 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)를 사용하여 데이터를 분석하고 플롯팅하였다. 도 26은 용량체화-증진 돌연변이 E430G와 2개의 돌연변이 K326W/E333S를 조합하는 것이 2.5 μ g/mL의 정제된 C1q가 보충된 열 불활성화된 태아 소 혈청의 존재 하에 부착 인간 BxPC-3 웨장암 세포에 대한 시험관내 생존율 검정에서 단일 작용제로서 시험하였을 때 삼중 돌연변이체 E345R/E430G/S440Y와 유사한 항-DR4 항체 IgG1-DR4-chCTB007에 대한 강한 사멸 효능의 유도를 일으켰다는 것을 보여준다. 대조적으로, 이들 항체는 야생형 항체 IgG1-DR4-chCTB007로 시험하였을 때 또는 단지 돌연변이 E430G만이 존재한 경우에 이들 사전-부착된 BxPC-3 세포에 대해 효율적인 사멸을 나타내지 않았다. 이들 데이터는 K326W/E333S/E430G 돌연변이가 C1q가 보충된 부착 BxPC-3 세포에 대한 항-DR4 항체의 강한 효능작용 활성을 유도하였다는 것을 보여준다.

[0956] 실시예 28: C1q 결합-증진 돌연변이 K326W/E333S와 조합된 용량체화-증진 E430G 돌연변이의 도입은 FAS 항체에 의한 보체 의존성 세포독성 (CDC) 및 세포 사멸 유도의 효능을 개선시킨다.

[0957] FAS 수용체는 Fas 리간드에 의한 수용체의 가교에 의해 프로그램화된 세포 사멸 (아포토시스)을 유도하는 세포 표면 상의 사멸 수용체이다 (Wajant et al., 2002 Science 296 (5573): 1635-6). FAS는 또한 아포토시스 항원 1 (APO-1 또는 APT), 분화 클러스터 95 (CD95) 또는 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 6 (TNFRSF6)으로 공지되어 있다. K326W/E333S/E430G 삼중 돌연변이를 함유하는 항-FAS 항체에 의한 CDC를 FAS-양성 WIL2-S B-림프구에 대한 시험관내 CDC 검정에서 분석하였다. 상이한 FAS 항체 IgG1-FAS-E09, IgG1-CD95-AP01 및 IgG1-CD95-HFE7A에 C1q 결합-증진 돌연변이 K326W E333S와 조합하여 용량체화-증진 돌연변이 E430G를 도입하는 것을 본질적으로 실시예 26에 기재된 바와 같이 WIL2-S SF 세포를 사용하여 CDC 검정에서 연구하였다. 간략하게, 진탕기 상에서 실온에서 15분 동안 RPMI-1640 배지 내 30 μ L WIL2-S SF 세포 (3.33×10^6 개 세포/mL)를 50 μ L의 일련의 농도의 항체 (3배 희석으로 0.003-10.0 μ g/mL 최종 농도)와 함께 둥근-바닥 96-웰 플레이트 (0.1×10^6 개 세포/웰)에서 사전-인큐베이션하였다. 이어서, 20 μ L 정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 정지시켰다. 세포 용해를 아이오딘화프로피듐 염색에 의해 결정하였다. 샘플을 아이큐 스크리너를 사용하여 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 비-선형 회귀 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)를 사용하여 로그-변환된 농도 축을 갖는 데이터를 분석하고 플롯팅하였다. 모든 3종의 야생형 항-FAS 항체 IgG1-FAS-E09 (도 27A), IgG1-CD95-AP01 (도 27B) 및 IgG1-CD95-HFE7A (도 27C)는 음성 대조군 항체 IgG1-b12와 유사한 CDC를 유도하지 않았다. Fc-Fc-증진 돌연변이 (E430G) 또는 C1q 결합-증진 돌연변이 (K326W/E333S)를 갖는 IgG1-FAS-E09는 CDC를 유도한다. IgG1-FAS-E09에서 E430G를 K326W/E333S와 조합하는 것은 IgG1-FAS-E09-E345R/E430G/S440Y와 유사한 최대 CDC를 유발하였다. IgG1-CD95-AP01에서 유사한 패턴이 관찰되었으며, 여기서 IgG1-CD95-AP01-E430G는 CDC를 유도하고 IgG1-FAS-E09-K326W/E333S/E430G는 CDC를 추가로 강화시킬 수 있다. 항체 IgG1-CD95-HFE7A의 경우 돌연변이 E430G의 부가는 CDC에 대해 효과를 나타내지 않았지만, 삼중 돌연변이 K326W/E333S/E430G를 갖는 IgG1-CD95-HFE7A는 CDC를 최대 용해로 완전히 회복시켰다.

[0958] 상기 기재된 CDC 검정에서 관찰된 세포 사멸이 보체-매개된 용해로 인한 것임을 확인하기 위해, 정제된 C1q (퀴텔)가 가교제로서 첨가된 무혈청 배지 내 WIL2-S SF를 사용하여 생존율 검정을 수행하였다. 생존율 검정을 본질적으로 실시예 8에 기재된 바와 같이 수행하였다. 간략하게, 100 μ L WIL2-S SF 세포를 96-웰 플레이트 내 무혈청 배지에 피펫팅하였다 (50,000개 셀/웰). 이어서, 50 μ L의 일련의 농도 희석물의 항체 샘플 (5배 희석으로 범위 0.0003 - 20 μ g/mL 최종 농도) 및 10 μ L의 정제된 C1q 샘플 (2.5 μ g/mL 최종 농도)을 세포에 첨가하고, 37°C에서 45분 또는 24시간 동안 인큐베이션하였다. 배양된 세포의 생존율을 실시예 2에 기재된 바와 같이 셀타이타-글로 검정을 사용하여 결정하였다. 엔비전 멀티라벨 판독기 (퍼킨엘머) 상에서 발광을 측정하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 비-선형 회귀 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)를 사용하여 로그-변환된 농도 축을 갖는 데이터를 분석하고 플롯팅하였다. 도 28은 2.5 μ g/mL C1q의 존재 하에 항체와 45분 인큐베이션한 후 세포의 RLU (미가공 데이터)를 보여준다. 이러한 짧은 인큐베이션 기간 후 항체 중 어느

것도 세포의 생존율에 영향을 미치지 않았다.

- [0959] 도 29A는 24-시간 생존율 검정에서, 단일 욕량체화-증진 돌연변이 E430G 뿐만 아니라 C1q 결합-증진 돌연변이 K326W/E333S의 도입은 FAS 항체 IgG1-FAS-E09가 C1q의 존재 하에 WIL2-S SF 세포의 용량-의존성 사멸을 유도하도록 할 수 있는 반면, 야생형 항체는 시험된 항체 농도에서 사멸을 유도할 수 없었다는 것을 보여준다. IgG1-FAS-E09에서 Fc-Fc-증진 돌연변이 E430G가 C1q 결합-증진 돌연변이 K326W/E333S와 조합되었을 때, 항체는 C1q의 존재 하에 24-시간 생존율 검정에서 E345R/E430G/S440Y를 사용한 경우만큼 강력해졌다. 도 29B는 또한 IgG1-CD95-AP01 항체를 사용한 경우, E430G 또는 K326W/E333S/E430G의 도입이 C1q의 존재 하에 WIL2-S SF의 용량-의존성 사멸을 유발하였으며, K326W/E333S/E430G 삼중 돌연변이체가 가장 강력하다는 것을 보여준다. 도 29C는 IgG1-CD95-HFA7E의 경우, C1q의 존재 하에 증식 억제를 유도하는데 C1q 결합 증진과 Fc-Fc 증진의 조합(K326W/E333S/E430G)이 필요하였다는 것을 보여준다.
- [0960] 대조군 실험으로서, C1q의 부재 하에 WIL2-S SF 세포를 사용하여 24-시간 생존율 검정을 또한 수행하였다. 도 30A는, 욕량체화-증진 돌연변이 E345R/E430G/S440Y의 도입은 FAS 항체 IgG1-FAS-E09가 C1q와 독립적으로 WIL2-S SF 세포의 용량-의존성 사멸을 유도하도록 할 수 있는 반면, 야생형 항체 및 단지 Fc-Fc-증진 돌연변이 E430G 또는 C1q 결합-증진 돌연변이 K326W/E333S만을 갖는 항체 변이체는 C1q의 부재 하에 시험된 항체 농도에서 사멸을 유도할 수 없었다는 것을 보여준다. 그러나, Fc-Fc-증진 및 C1q 결합-증진 돌연변이 둘 다 (IgG1-FAS-E09-K326W/E333S/E430G)의 도입은 C1q의 부재 하에 세포 생존율의 최대 25% 상실을 유발하였다. C1q의 부재 하에, K326W/E333S/E430G의 도입은 IgG1-CD95-AP01에 대해 유사한 효과를 나타냈지만 (도 30B), IgG1-CD95-HFA7E에 대해서는 효과를 나타내지 않았다 (도 30C).
- [0961] 결론적으로, 항-FAS 항체에서 Fc-Fc 증진 돌연변이 E430G와 C1q 결합-증진 돌연변이 K326W/E333S를 조합하는 것은 45분 후 WIL2-S SF 세포의 CDC를 유도할 수 있었다. C1q 단독으로는 45분 후 세포 사멸을 유도하지 않았기 때문에 이 과정은 완전히 혈청-의존성이었다. 그러나, C1q의 존재 하에 돌연변이 K326W/E333S/E430G를 갖는 항-FAS 항체의 24시간 인큐베이션 후에는 사멸을 유도하였고, E430G 및 K326W/E333S 돌연변이체의 사멸 효력을 증가하였다.
- [0962] 실시예 29: 항-OX40 항체에 의한 Jurkat 세포 상의 OX40의 활성화에 대한 E430G Fc-Fc-증진 돌연변이와 K326W/E333S 돌연변이의 조합의 효과.
- [0963] OX40 리간드 (OX40L)에 의한 OX40 리간드 수용체 (CD134)의 가교는 OX40을 발현하는 T 세포의 증식을 유도할 수 있다 (Gramaglia et al., 1998 J. Immunol. 161, 6510-6517). OX40 바이오어세이 키트 (프로메가, 카탈로그 번호 CS197704)를, 본질적으로 제조업체에 의해 공급된 설명서에 따라 사용하여, 항-OX40 항체 IgG1-SF2의 상이한 변이체를 사용하여 OX40 신호전달에 대한 돌연변이 K326W/E333S의 효과를 시험하였다. 인간 OX40 및 NFAT 반응 요소 하류의 루시페라제 리포터 유전자를 안정하게 발현하는 쏘-앤-유즈 글로리스판스 NF κ B-luc2/OX40 Jurkat 세포 (프로메가, 카탈로그 번호 CS197704)는 OX40 활성화시 루시페라제를 발현한다. 25 μ L의 새로 해동된 세포를 96-웰 백색 F-바닥 오프플레이트 (피킨 엘머, 카탈로그 번호 6005299) 내 25 μ L RPMI 1640 배지 (프로메가, 카탈로그 번호 G708A)에서 8% 태아 소 혈청 (FBS, 프로메가 Ref. J121A)의 존재 하에 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날, 연속 희석물의 항체 (4배 희석으로 19.5 - 5,000 ng/mL 최종 농도)를 80 μ L의 최종 부피로 배지 내 세포에 첨가하였다. 세포를 추가 5시간 동안 인큐베이션한 후, 바이오-글로 시약 (프로메가, 카탈로그 번호 CS197704)을 첨가하였다. 주위 온도에서 5-10분 인큐베이션한 후, 엔비전 멀티라벨 플레이트 판독기를 사용하여 발광을 기록하였다. 도 31은 야생형 항-OX40 항체 IgG1-CD134-SF2가 OX40 반응을 유도하지 않았다는 것을 보여준다. Fc-Fc-증진 돌연변이의 도입은 E345R의 경우 OX40 반응의 강한 유도를 일으켰고 E430G의 경우 약한 유도를 일으켰다. E430G Fc-Fc-증진 돌연변이를 C1q 결합-증진 돌연변이 K326W/E333S와 조합하는 것은 IgG1-SF2의 강한 효능제 활성을 유발하였다.
- [0964] 실시예 30: 태아 소 혈청의 존재 하에 항-CD40 항체에 의한 U20S 세포 상의 CD40 활성화에 대한 K326W/E333S/E430G 돌연변이의 효과.
- [0965] TH 세포 상의 CD40 리간드에 의한, 항원 제시 세포 상에서 발견되는 CD40 수용체의 가교는 다양한 하류 효과를 유도할 수 있다 (Chatzigeorgiou et al., 2009 BioFactors (Oxford, England) 35 (6): 474-83). CD40 바이오어세이 키트 (프로메가, 카탈로그 번호 CS1979A06)를, 본질적으로 제조업체에 의해 공급된 설명서에 따라 사용하여, 항-CD40 항체 SGN40 및 CP870893의 상이한 변이체를 사용하여 CD40 신호전달에 대한 돌연변이 K326W/E333S/E430G의 효과를 시험하였다. 인간 CD40 및 NFAT 반응 요소 하류의 루시페라제 리포터 유전자를 안정하게 발현하는 쏘-앤-유즈 글로리스판스 NF κ B-luc2P/U20S 세포는 CD40 활성화시 루시페라제를 발현한다. 25

μL의 새로 해동된 세포를 96-웰 백색 F-바닥 옵티플레이트 (피킨 엘머, 카탈로그 번호 6005299) 내 25 μL RPMI 1640 배지 (프로메가, 카탈로그 번호 G708A)에서 8% 태아 소 혈청 (J1211)의 존재 하에 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날, 연속 희석물의 항체 또는 정제된 재조합 CD40 리간드 (알앤디 시스템즈(R&D systems), 카탈로그 번호 6420-CL-025/CF)를 80 μL의 최종 부피로 배지 내 세포에 첨가하였다. 세포를 추가 5시간 동안 인큐베이션한 후, 바이오-글로 시약 (프로메가, 카탈로그 번호 CS197704)을 첨가하였다. 주위 온도에서 5-10분 인큐베이션한 후, 엔비전 멀티라벨 플레이트 판독기를 사용하여 발광을 기록하였다. 태아 소 혈청 (FBS, 프로메가 Ref. J121A)을 혈청 공급원으로서 사용하였다. 0.1 내지 25,000 ng/mL 범위의 연속 희석물로 항체를 시험하였다. CD40 반응 검정에서 양성 대조군으로서 사용된 재조합 CD40 리간드 (0.04 내지 10,000 ng/mL 범위의 연속 희석물)는 비-결합 음성 대조군 항체 IgG1-b12에 비해 명확한 반응 신호를 유도하였다 (도 32). 야생형 항-CD40 항체 IgG1-SGN40은 음성 대조군 항체 IgG1-b12와 본질적으로 유사한 CD40 반응 수준을 유도하였다. 대조적으로, 세포 표면 결합 후 항체 사이의 Fc-Fc 상호작용을 유도하는 E430G 돌연변이만을 함유한 IgG1-CD40-SGN40 변이체는 CD40 반응을 유도하였다 (EC50 336.4 ± 15.3 SD ng/mL). C1q 결합-증진 돌연변이 K326W/E333S와 조합된 E430G Fc-Fc-증진 돌연변이를 갖는 IgG1-CD40-SGN40 변이체는 IgG1-SGN40의 효력을 추가로 증진시켰다 (EC50 18.0 ± 1.1 SD ng/mL). 야생형 항체 IgG1-CD40-CP870893은 이미 CD40 반응을 유도할 수 있으며 (EC50 187.4 ± 9.2 SD ng/mL), 이는 K326W/E333S/E430G (EC50 45.9 ± 3.3 SD ng/mL)에 의해 CD40 리간드와 유사한 수준으로 추가로 강화될 수 있었다.

[0966] 결론적으로, K326W/E333S/E430G 돌연변이는 태아 소 혈청의 존재 하에 항-CD40 항체에 의한 U2OS 세포 상의 CD40의 활성화를 강화시켰다.

[0967] 표 7: CD40 리간드 및 IgG1 - CD40 항체 및 변이체의 EC50 및 SD

	평균 EC50 (ng/mL)	SD (ng/mL)
CD40 리간드	112.5	48.0
IgG1-CD40-SGN40	3356.0	0.0
IgG1-CD40-SGN40-E430G	336.4	15.3
IgG1-CD40-SGN40-WSG	18.0	1.1
IgG1-CD40-CP870893	187.4	9.2
IgG1-CD40-CP870893-WSG	45.9	3.3

[0968]

[0969] 실시예 31: 태아 소 혈청의 존재 하에 항-4-IBB 항체에 의한 Jurkat 세포 상의 4-IBB (CD137)의 활성화에 대한 K326W/E333S/E430G 돌연변이의 효과.

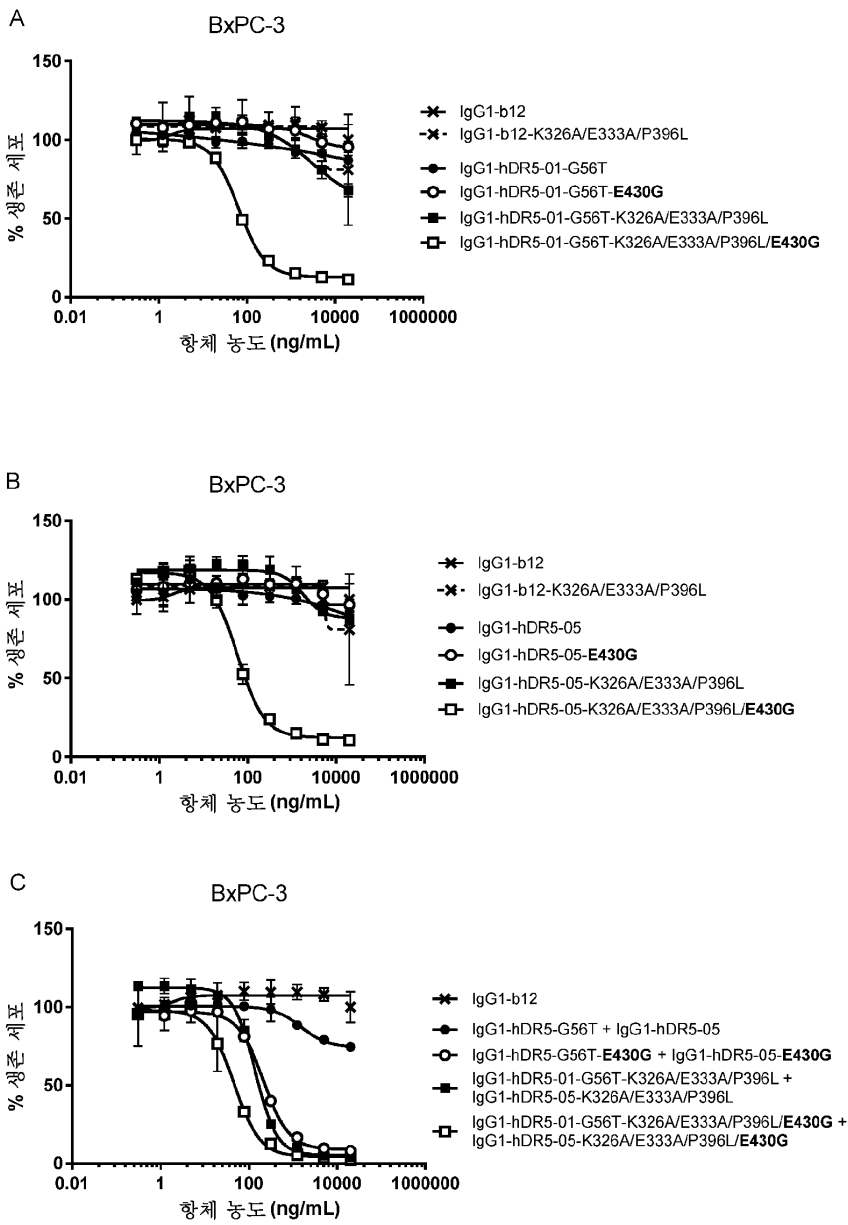
[0970] 4-IBB 또는 CD137 또는 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 9 (TNFRSF9)는 종양 괴사 인자 수용체 (TNFR) 슈퍼 패밀리의 구성원이고, 림프구 활성화에 의해 유도된다 (ILA) (Schwarz et al., 1993, Gene. 134 (2): 295-8). 4-IBB의 가교는 T 세포 증식, IL-2 분비, 생존 및 세포용해 활성을 증진시킨다 (Sica et al., 2000 Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.). 47 (5): 275-9). 4-IBB 바이오어세이 키트 (프로메가, 카탈로그 번호 CS196005)를, 본질적으로 제조업체에 의해 공급된 설명서에 따라 사용하여, 항-4-IBB 항체 MOR7480 및 BMS-663513의 상이한 변이체를 사용하여 4-IBB 신호전달에 대한 돌연변이 K326W/E333S/E430G의 효과를 시험하였다. 인간 4-IBB 및 NFAT 반응 요소 하류의 루시페라제 리포터 유전자를 안정하게 발현하는 쏘-앤-유즈 글로리스판스™ NFκB-luc2/4-1BB Jurkat 세포는 CD40 활성화시 루시페라제를 발현한다. 25 μL의 새로 해동된 세포를 96-웰 백색 F-바닥 옵티플레이트 (피킨 엘머, 카탈로그 번호 6005299) 내 25 μL RPMI 1640 배지 (프로메가, 카탈로그 번호 G708A)에서 1% 태아 소 혈청 (J121A)의 존재 하에 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날, 연속 희석물의 항체 또는 His 태그를 갖는 정제된 재조합 4-IBB 리간드 (알앤디 시스템즈, 카탈로그 번호 2295-4L-025/CF) 항-His-태그 항체 (클론 J099B12)를 80 μL의 최종 부피로 배지 내 세포에 첨가하였다. 세포를 추가 5시간 동안 인큐베이션한 후, 바이오-글로 시약 (프로메가, 카탈로그 번호 CS197704)을 첨가하였다. 주위 온도에서 5-10분 인큐베이션한 후, 엔비전 멀티라벨 플레이트 판독기를 사용하여 발광을 기록하였다. 태아 소 혈청 (FBS, 프로메가 Ref. J121A)을 혈청 공급원으로서 사용하였다. 4-IBB 반응 검정에서 양성 대조군으로서 사용된 재조합 4-IBB 리간드 및 항-His Ab 혼합물은 비-결합 음성 대조군 항체 IgG1-b12-WSG에 비해 명확한 반응 신호를 유도하였다 (도 33). C1q 결합-증진 돌연변이 K326W/E333S와 조합된 Fc-Fc-증진 돌연변이 E430G를 함유하는 시험된 항체는 태아 소 혈청의 존재 하에 Jurkat 세포 상에서 4-IBB 신호전달의 용량-의존성 활성화를 유도하였다 (IgG1-CD137-MOR7480-K326W/E333S/E430G의 경우 EC50 16.9 ng/mL 및 IgG1-BMS-663513-K326W/E333S/E430G의 경우 EC50 32.9 ng/mL).

[0971] 실시예 32: 태아 소 혈청의 존재 하에 항-GITR 항체에 의한 Jurkat 세포 상의 GITR의 활성화에 대한 K326W/E333S/E430G 돌연변이의 효과.

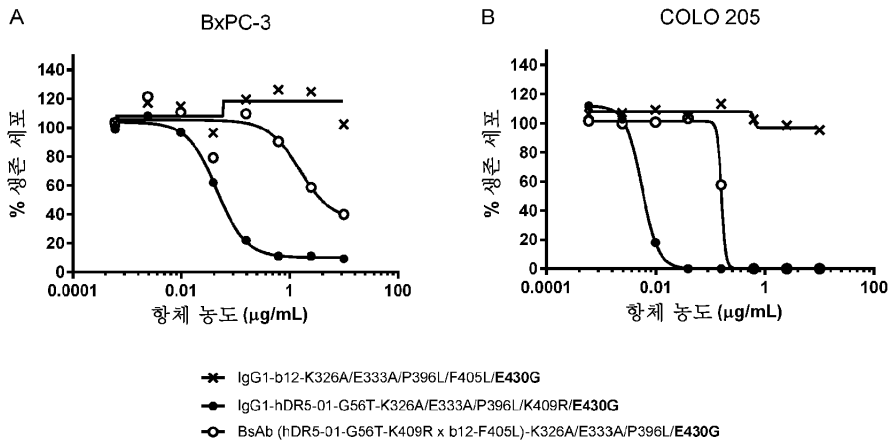
- [0972] GITR (글루코코르티코이드-유도된 TNFR-관련 단백질) 또는 중앙 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 18 (TNFRSF18)은 TNFR 슈퍼 패밀리의 구성원이다. GITR은 주로 APC 상에서 발견되는 GITR 리간드 (GITRL)에 의해 활성화된다. 준최적 TCR 자극 후 T 세포 상의 GITR과 효능제 항체, 재조합 GITRL 또는 GITRL 형질감염체와의 결합은 CD25를 상향조절하고, IL-2 및 IFN γ 발현을 유도하고, 증식을 증대시킴으로써 T 세포 활성화를 증진시킨다 (문헌 [Knee et al. in Eur J Cancer. 2016 Nov; 67:1-10]에서 검토됨).
- [0973] GITR 바이오어세이 키트 (프로메가, 카탈로그 번호 CS184006)를, 본질적으로 제조업체에 의해 공급된 설명서에 따라 사용하여, 항-GITR 항체 INCAGN01876의 상이한 변이체를 사용하여 GITR 신호전달에 대한 돌연변이 K326W/E333S/E430G의 효과를 시험하였다. 인간 GITR 및 NFAT 반응 요소 하류의 루시페라제 리포터 유전자를 안정하게 발현하는 쏘-앤-유즈 글로리스판스 NF κ B-luc2P/GITR Jurkat 세포는 GITR 활성화시 루시페라제를 발현한다. 25 μ L의 새로 해동된 세포를 96-웰 백색 F-바닥 오프플레이트 (피킨 엘머, 카탈로그 번호 6005299) 내 25 μ L RPMI 1640 배지 (프로메가, 카탈로그 번호 G708A)에서 8% 태아 소 혈청 (J1211)의 존재 하에 밤새 인큐베이션하였다. 다음날, 연속 희석물의 항체를 80 μ L의 최종 부피로 배지 내 세포에 첨가하였다. 세포를 추가 5시간 동안 인큐베이션한 후, 바이오-글로 시약 (프로메가, 카탈로그 번호 CS197704)을 첨가하였다. 주위 온도에서 5-10분 인큐베이션한 후, 엔비전 멀티라벨 플레이트 판독기를 사용하여 발광을 기록하였다. 태아 소 혈청 (FBS, 프로메가 Ref. J121A)을 혈청 공급원으로서 사용하였다. 비-결합 음성 대조군 항체 IgG1-b12는 배경 신호를 규정한다. 야생형 항-GITR 항체 IgG1-GITR-INCAGN01876은 음성 대조군 항체 IgG1-b12의 경우를 약간 상회하는 GITR 반응 수준을 유도하였다 (도 34). 대조적으로, 단지 E430G Fc-Fc-증진 돌연변이만을 함유한 IgG1-GITR-INCAGN01876 변이체는 더 강한 GITR 반응을 유도하였다. C1q 결합-증진 돌연변이 K326W/E333S와 조합된 E430G Fc-Fc-증진 돌연변이를 갖는 IgG1-GITR-INCAGN01876은 IgG1-GITR-INCAGN01876의 효력을 추가로 증진시켰다.
- [0974] 결론적으로, K326W/E333S/E430G 돌연변이는 태아 소 혈청의 존재 하에 항-GITR 항체에 의한 Jurkat 세포 상의 GITR의 활성화를 강화시킨다.
- [0975] 실시예 33: 태아 소 혈청의 존재 하에 상이한 IgG 하위부류의 항-GITR 항체에 의한 Jurkat 세포 상의 GITR의 활성화에 대한 K326W/E333S/E430G 돌연변이의 효과.
- [0976] 태아 소 혈청의 존재 하에 실시예 32에 기재된 바와 같은 GITR 바이오어세이 키트를 사용하여, 항-GITR 항체 36E5의 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 하위부류 변이체를 사용하여 GITR 신호전달에 대한 돌연변이 K326W/E333S/E430G의 효과를 시험하였다. 항체를 111 ng/mL의 최종 농도에서 시험하였다. 야생형 IgG1 항-GITR 항체 IgG1-GITR-36E5는 비-결합 대조군 IgG1-b12와 비교하여 더 낮은 GITR 효능제 반응을 유도하였다 (도 35). E430G Fc-Fc-증진 돌연변이의 도입은 GITR 효능제 반응의 보통의 증가를 유발하였다. C1q 결합-증진 돌연변이 K326W/E333S와 조합된 E430G Fc-Fc-증진 돌연변이를 갖는 IgG1-GITR-36E5 변이체는 항체의 효력을 최대 반응으로 추가로 증진시켰다. IgG2 하위부류 IgG2-GITR-36E5 내 K326W/E333S/E430G의 도입은 보통의 GITR 효능제 반응을 유발하였다. IgG3-GITR-36E5 및 IgG4-GITR-36E5에서, K326W/E333S/E430G 돌연변이의 도입은 WT IgG1 항체의 수준과 유사한, 낮은 GITR 효능제 반응을 유발하였다.

도면

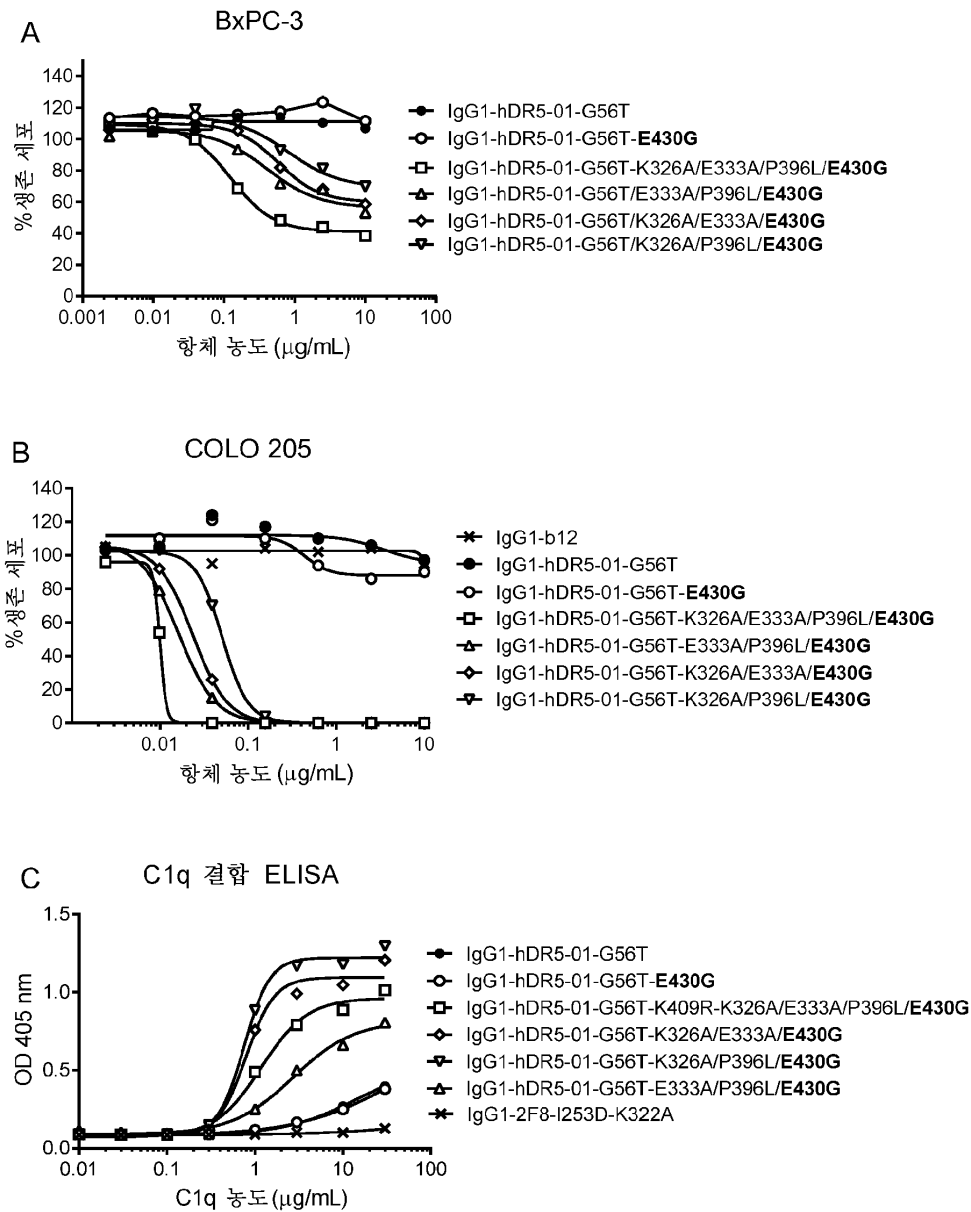
도면1



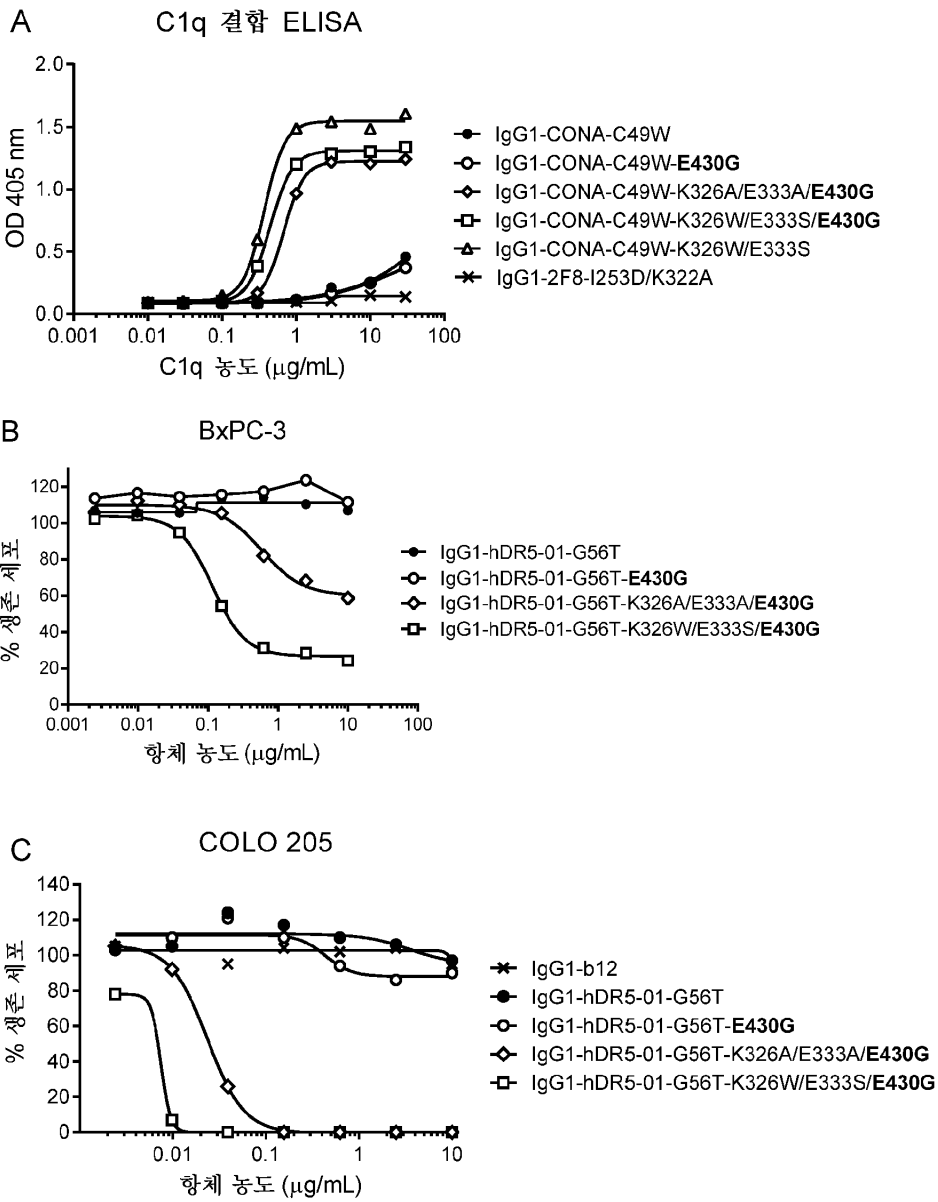
도면2



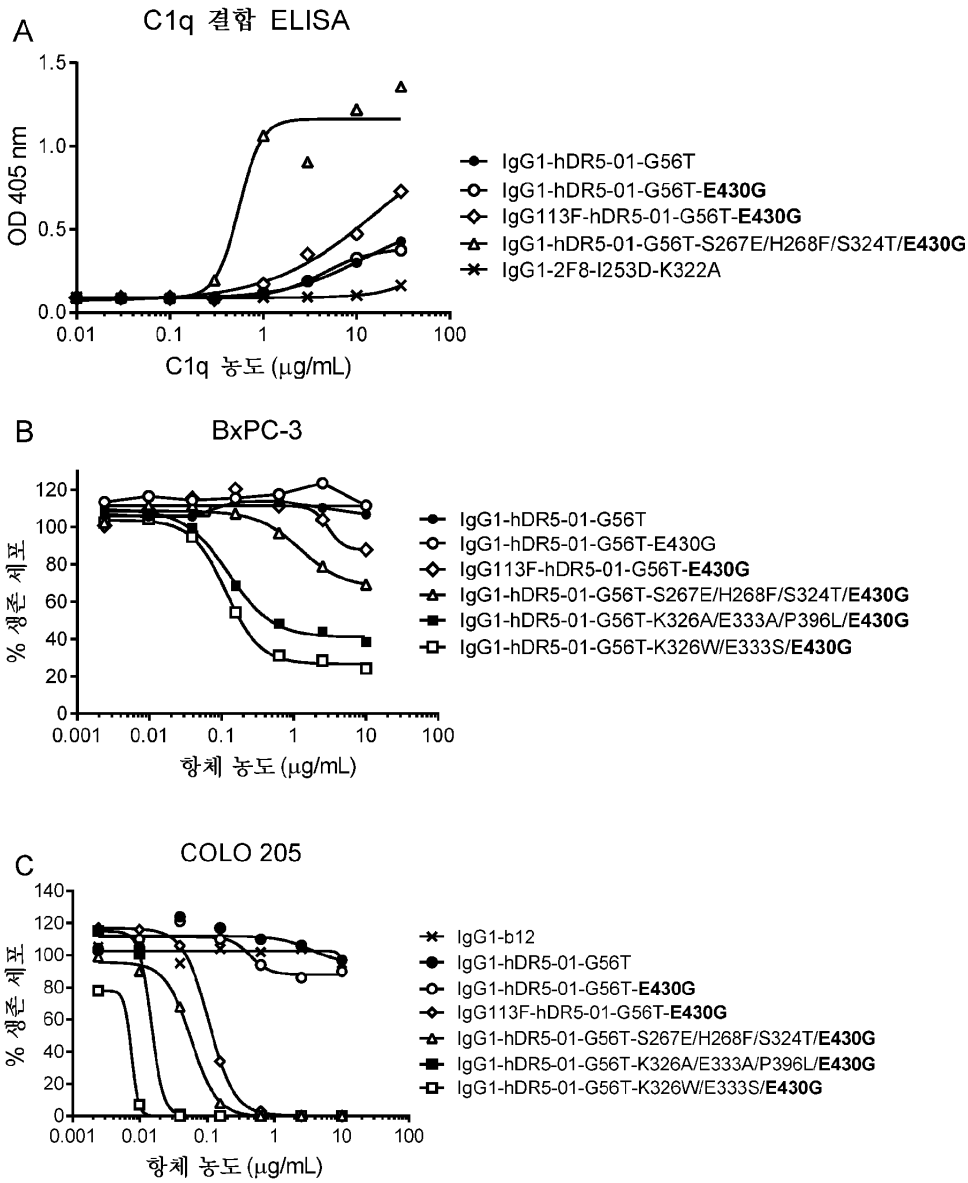
도면3



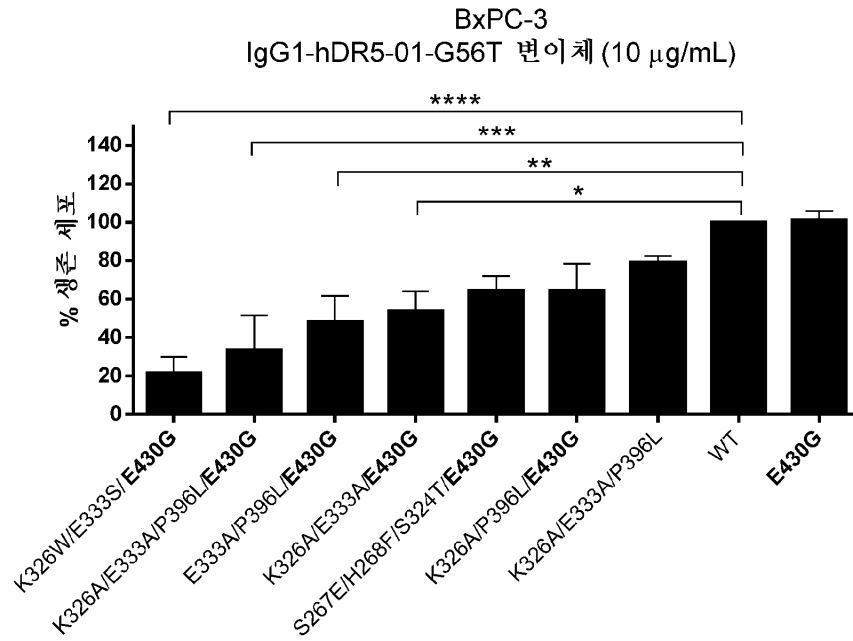
도면4



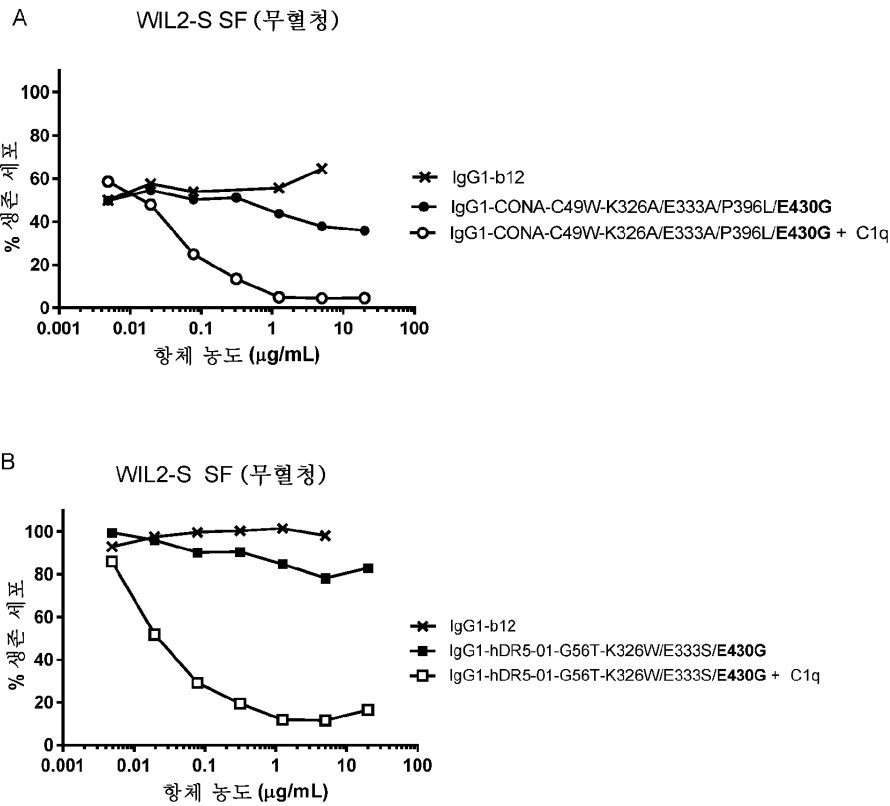
도면5



도면6

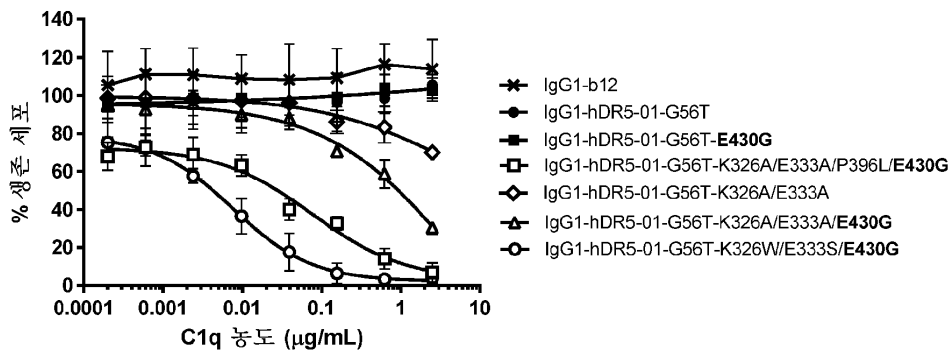


도면7

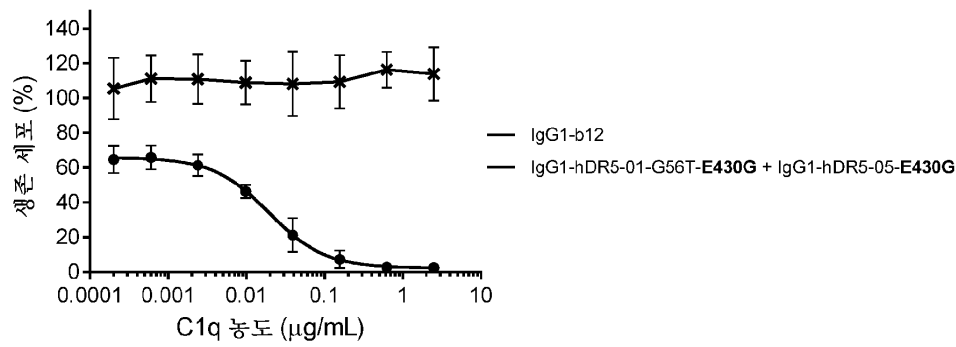


도면8

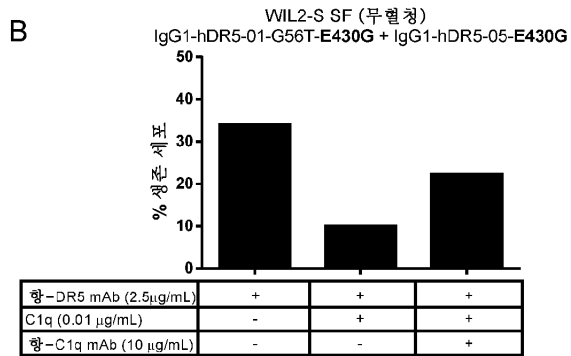
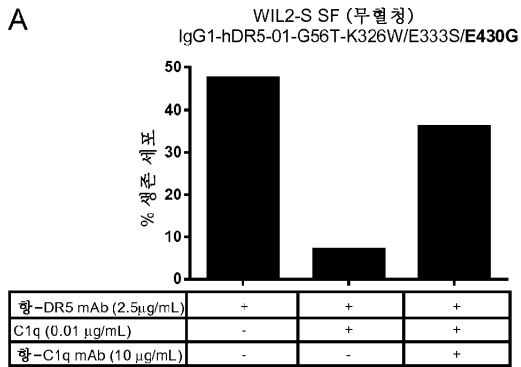
A WIL2-S SF (무혈청)



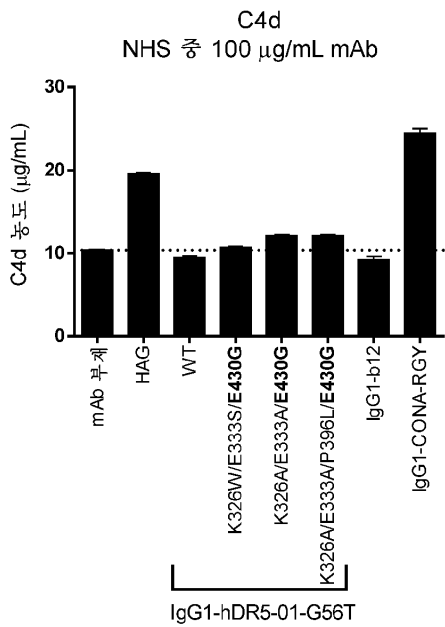
B WIL2-S SF (무혈청)



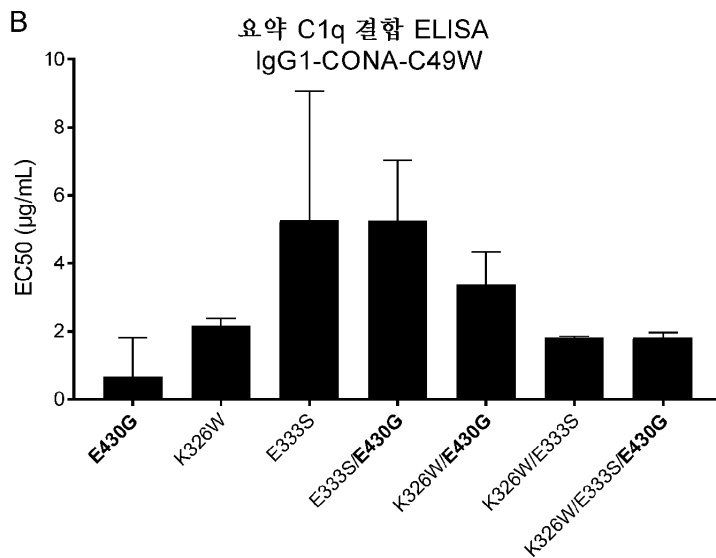
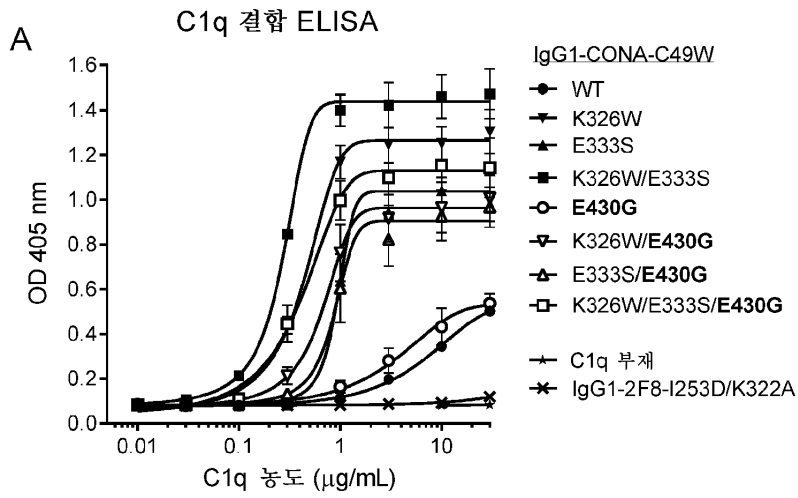
도면9



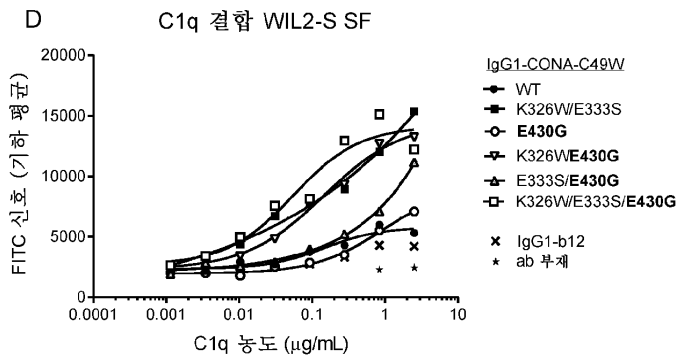
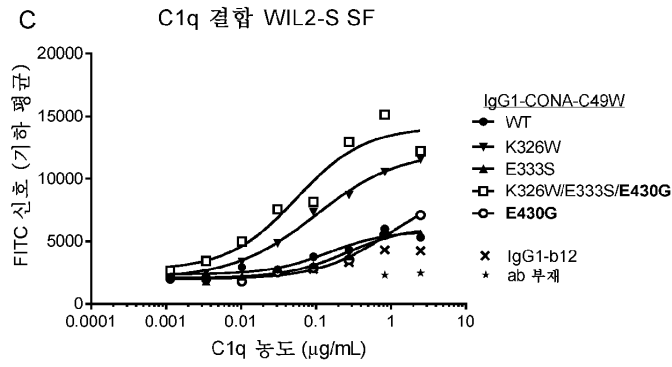
도면10



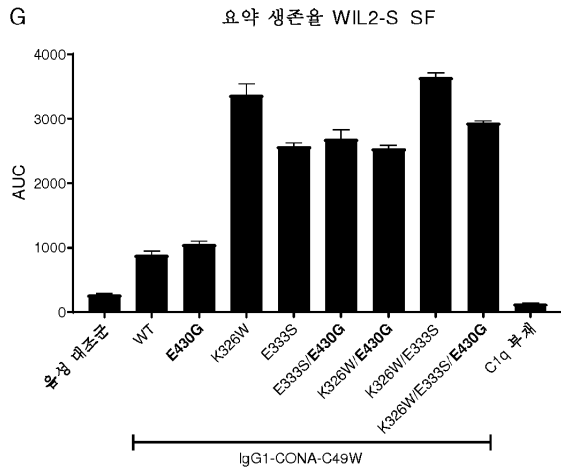
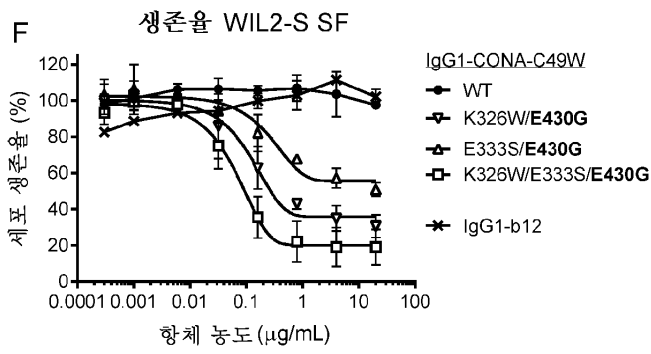
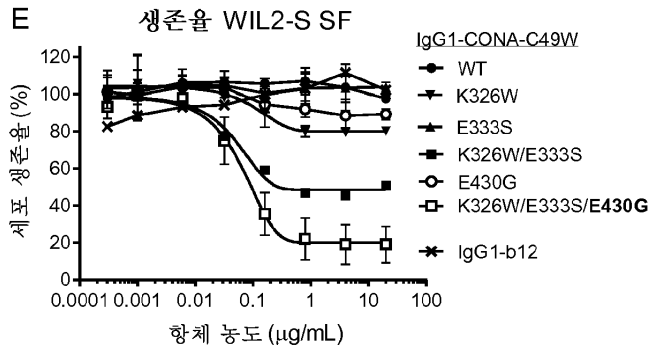
도면11i



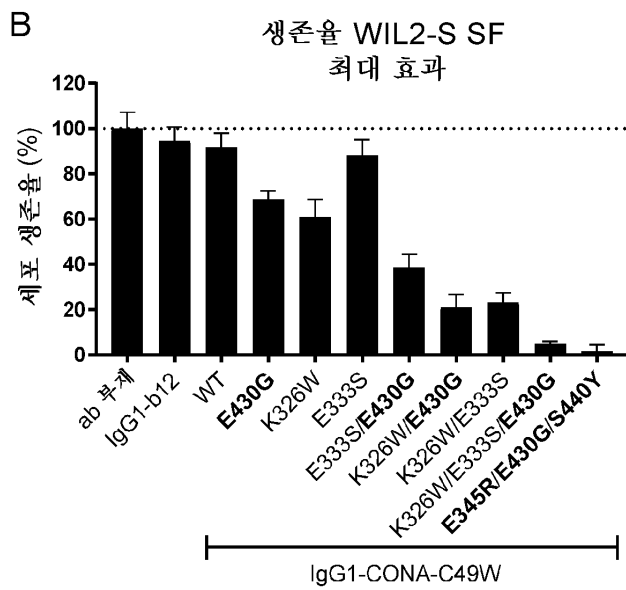
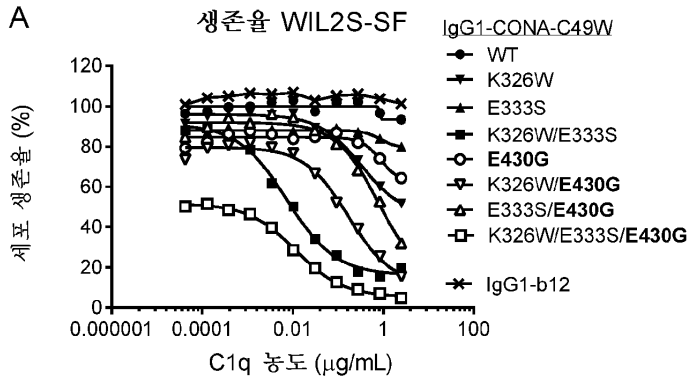
도면11ii



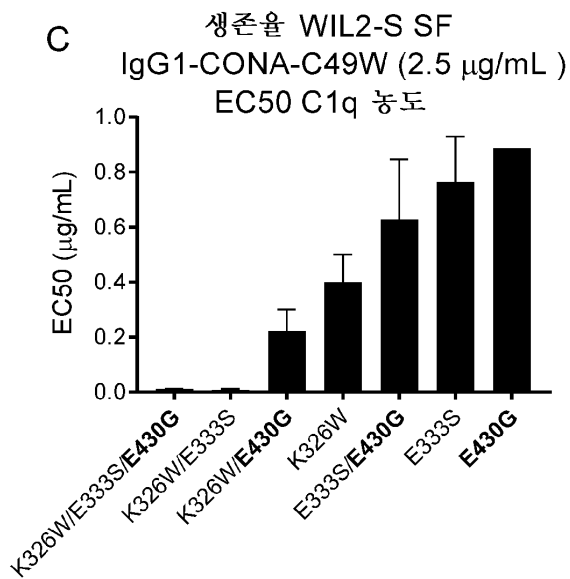
도면11iii



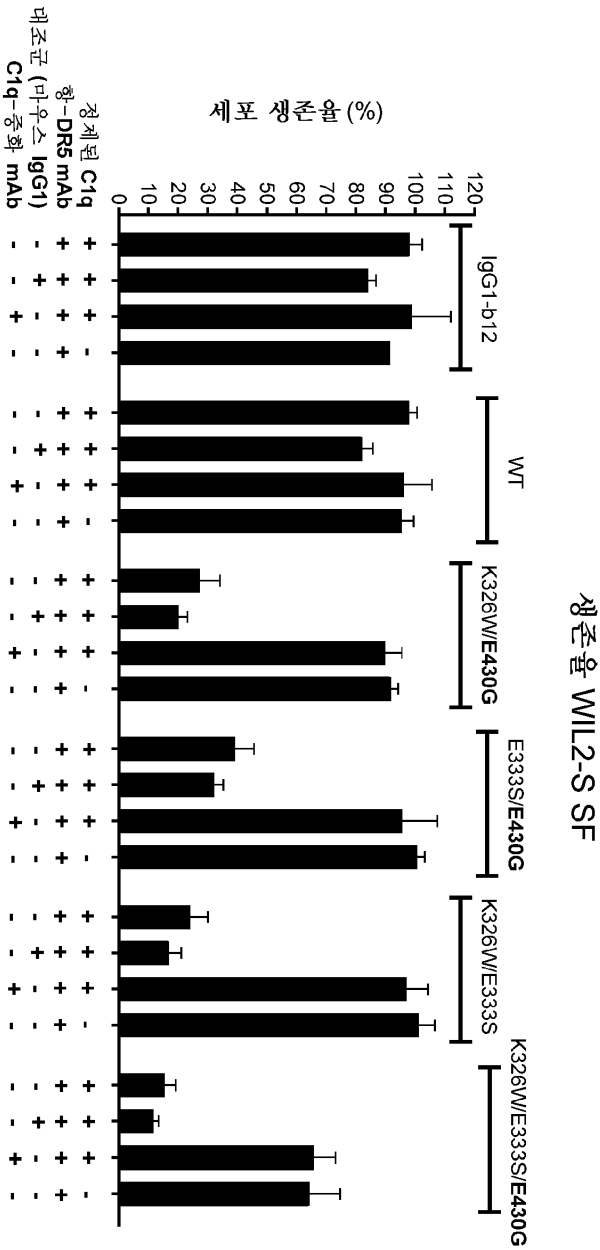
도면12i



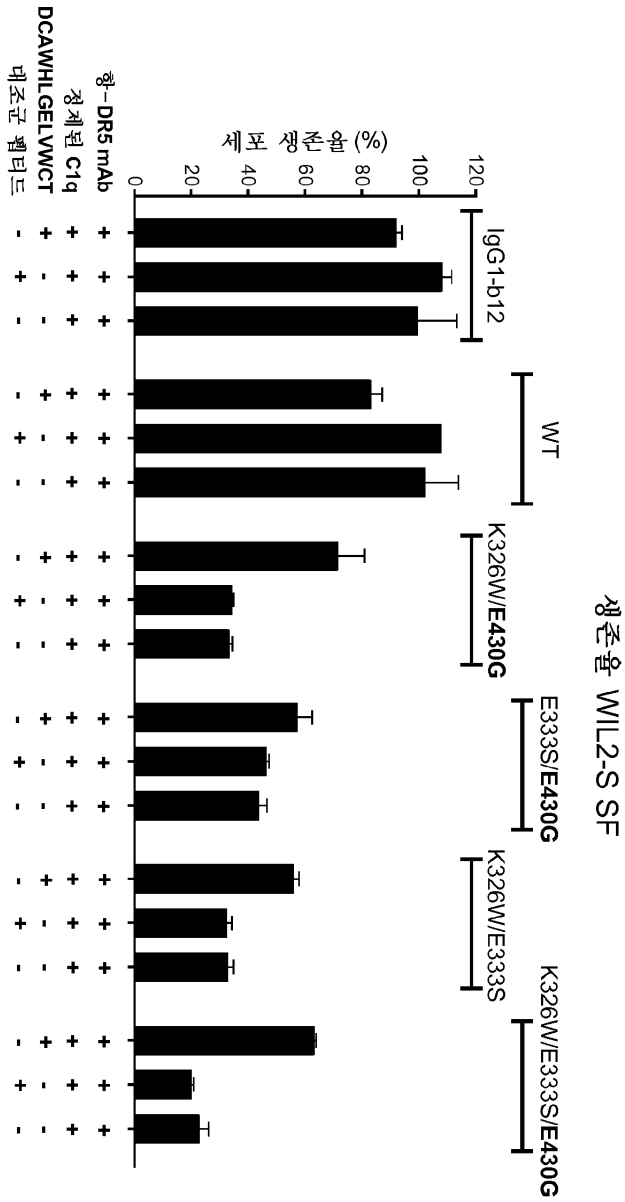
도면12ii



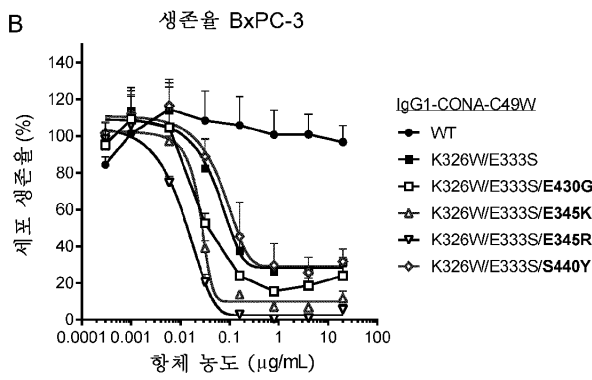
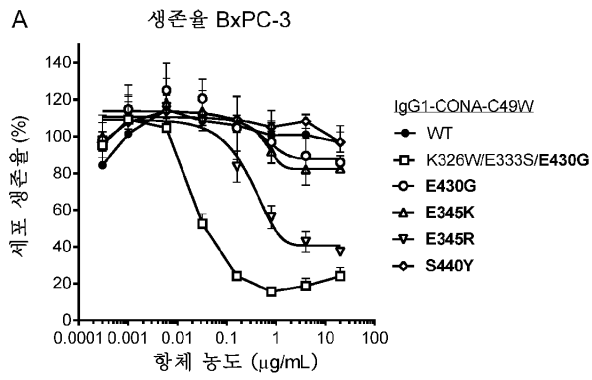
도면13



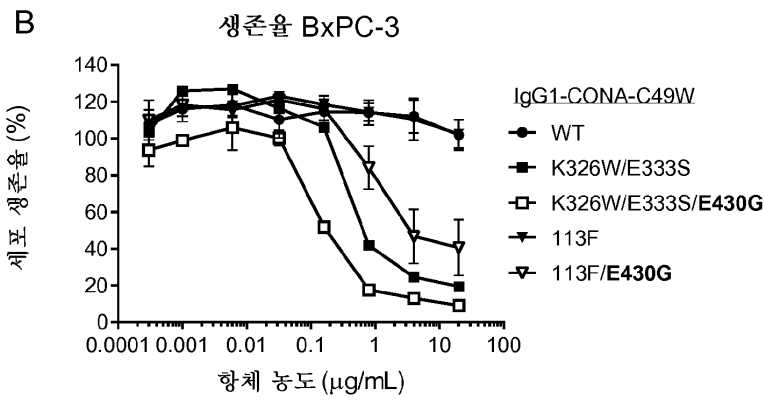
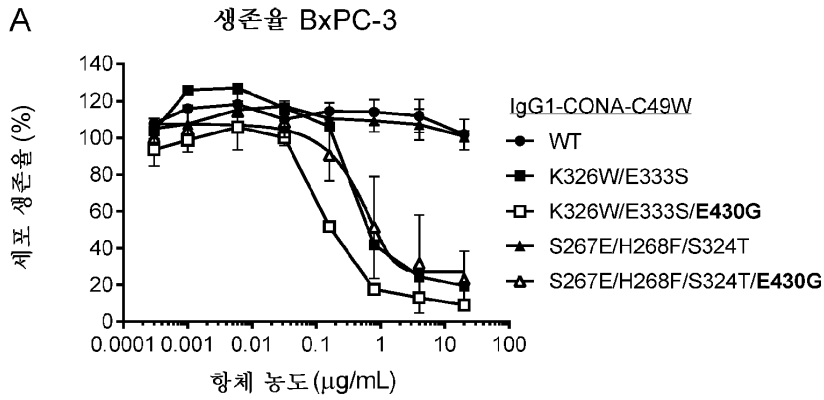
도면14



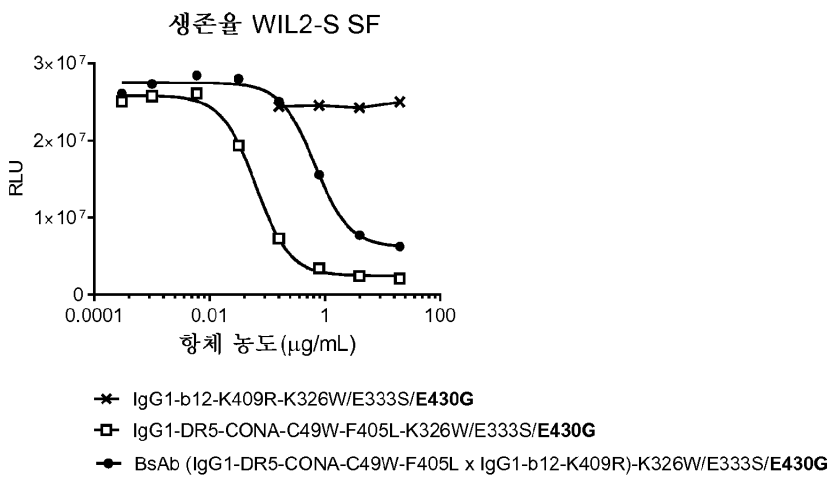
도면15



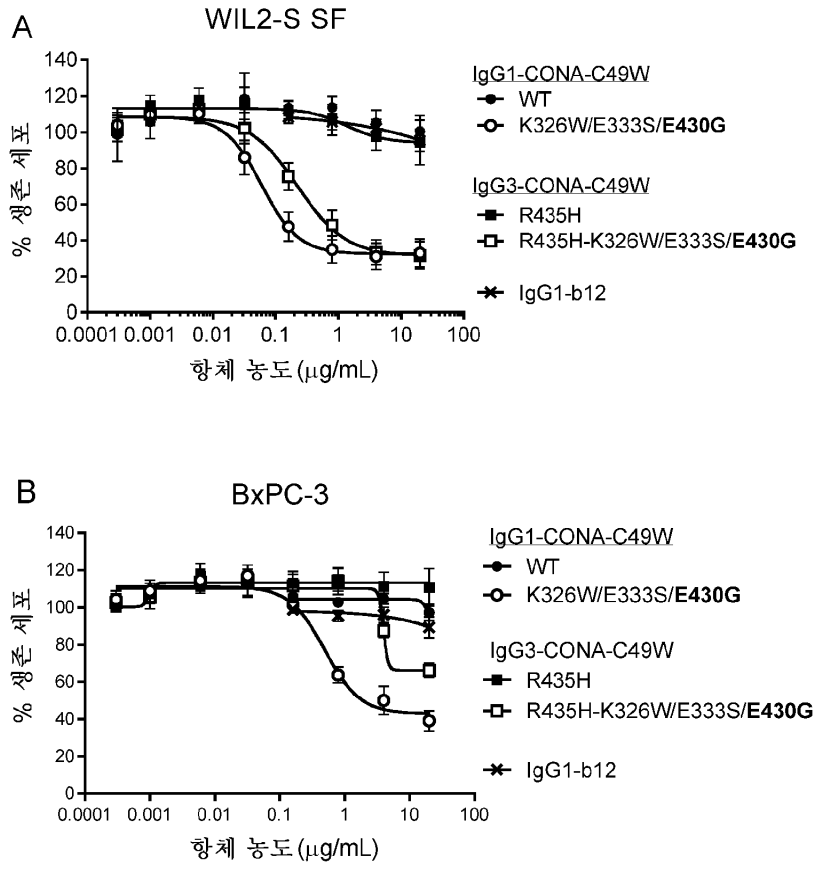
도면16



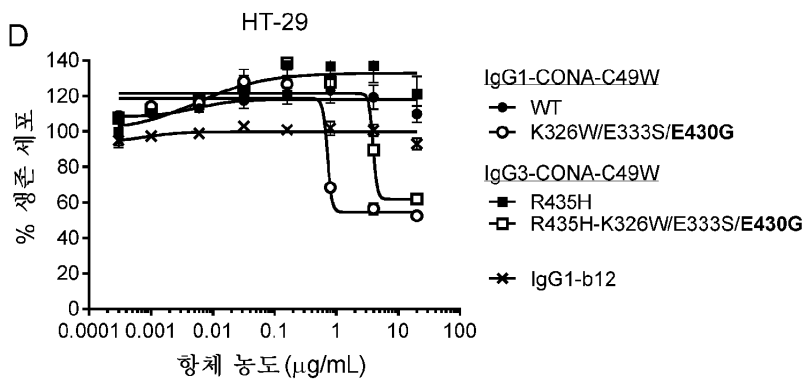
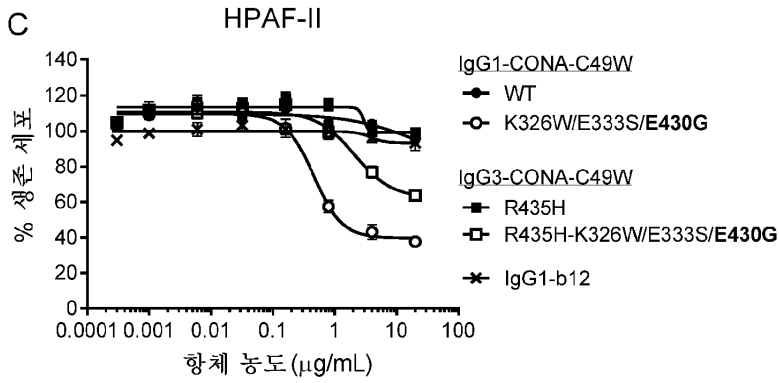
도면17



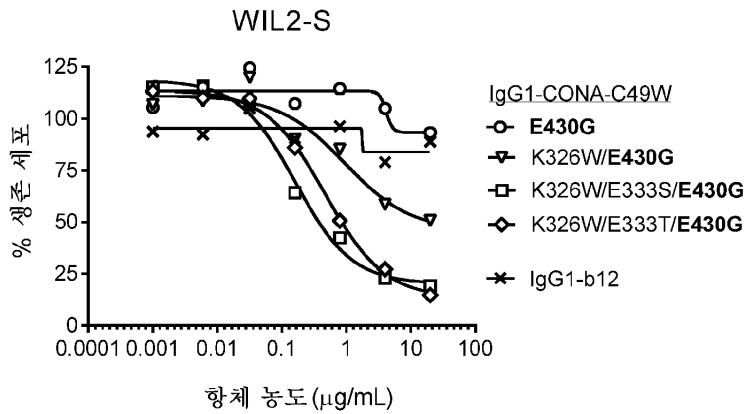
도면18i



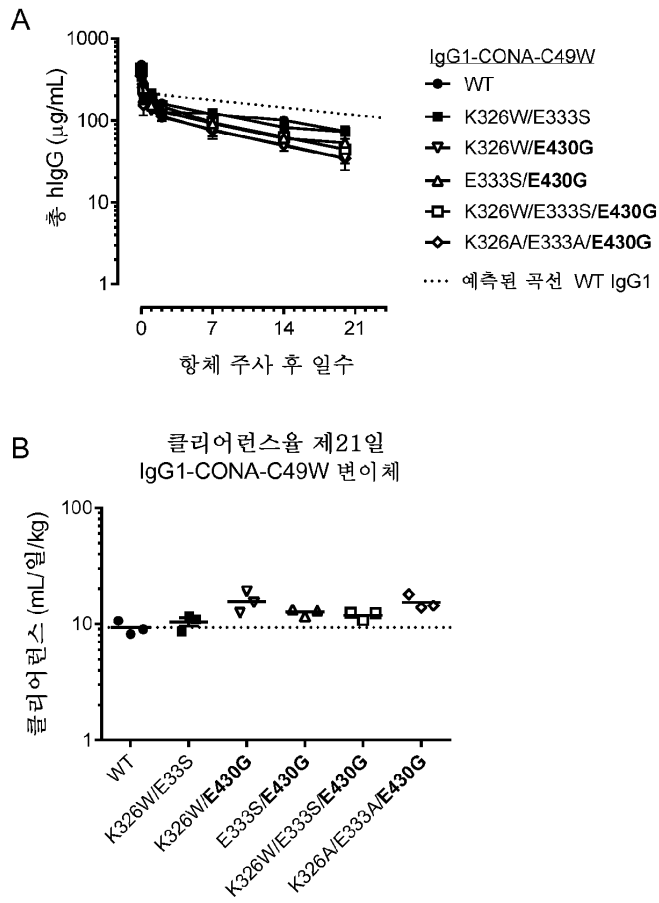
도면18i



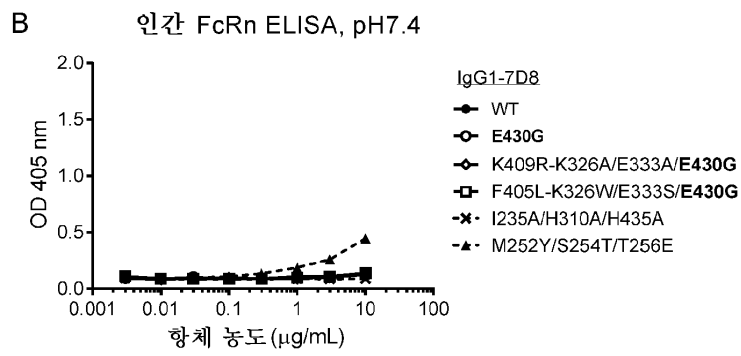
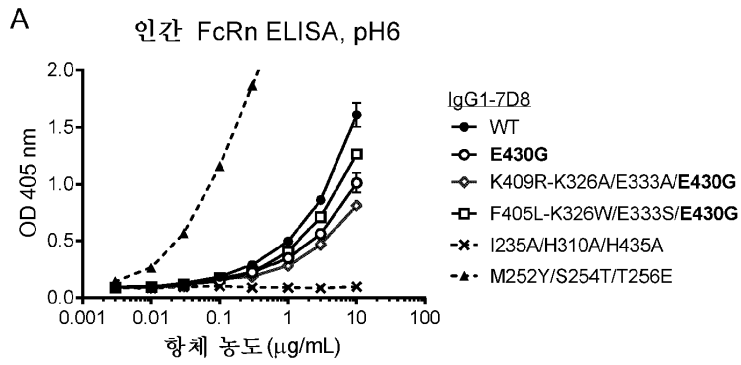
도면19



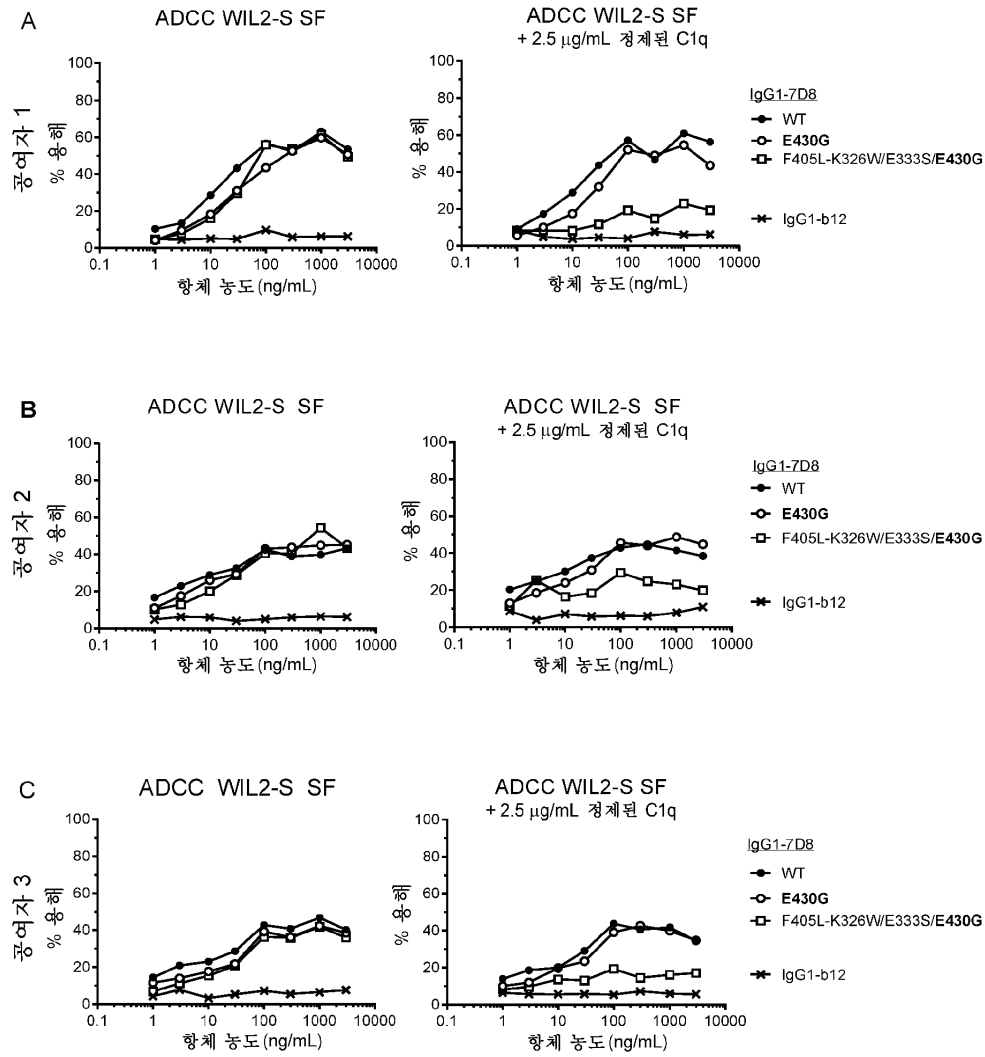
도면20



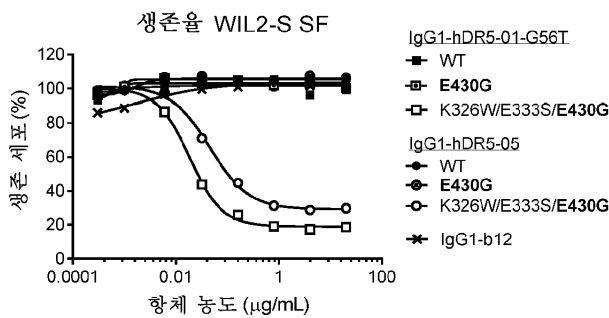
도면21



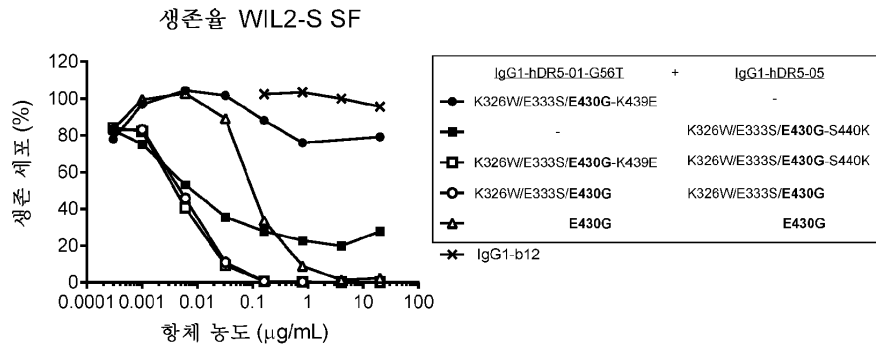
도면22



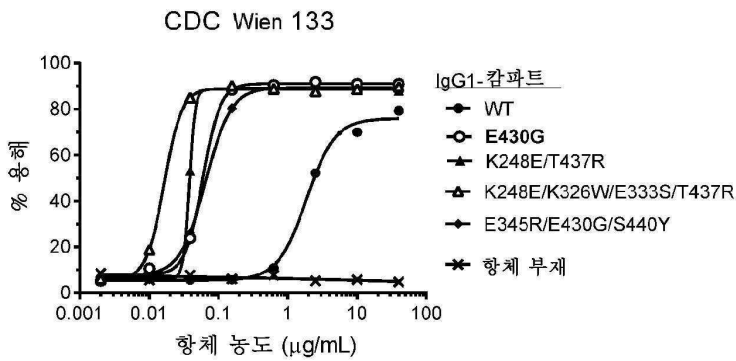
도면23



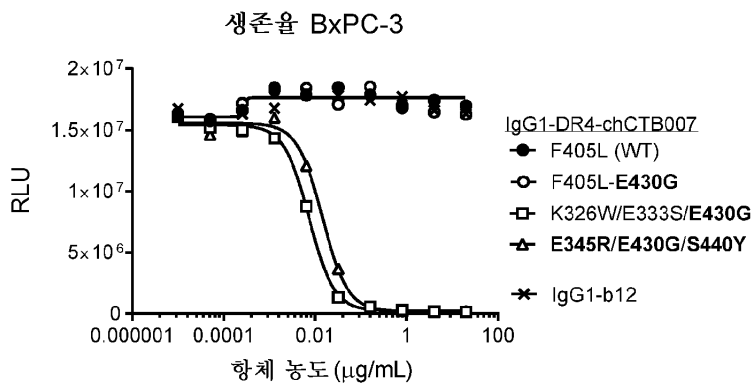
도면24



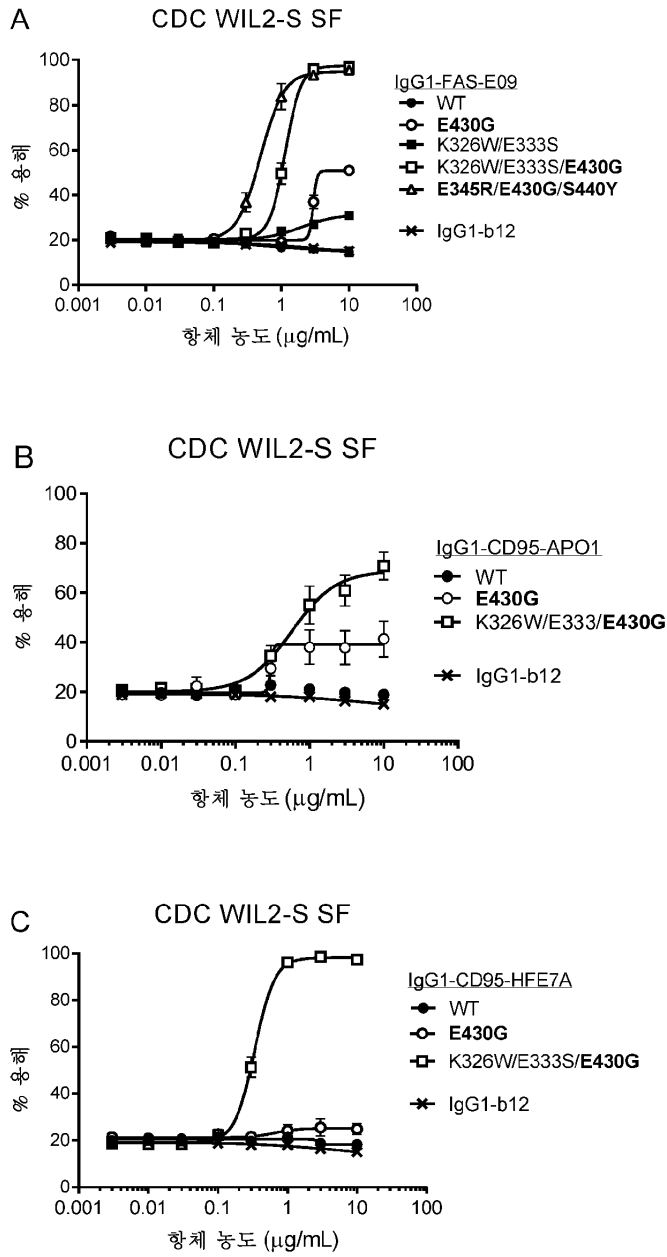
도면25



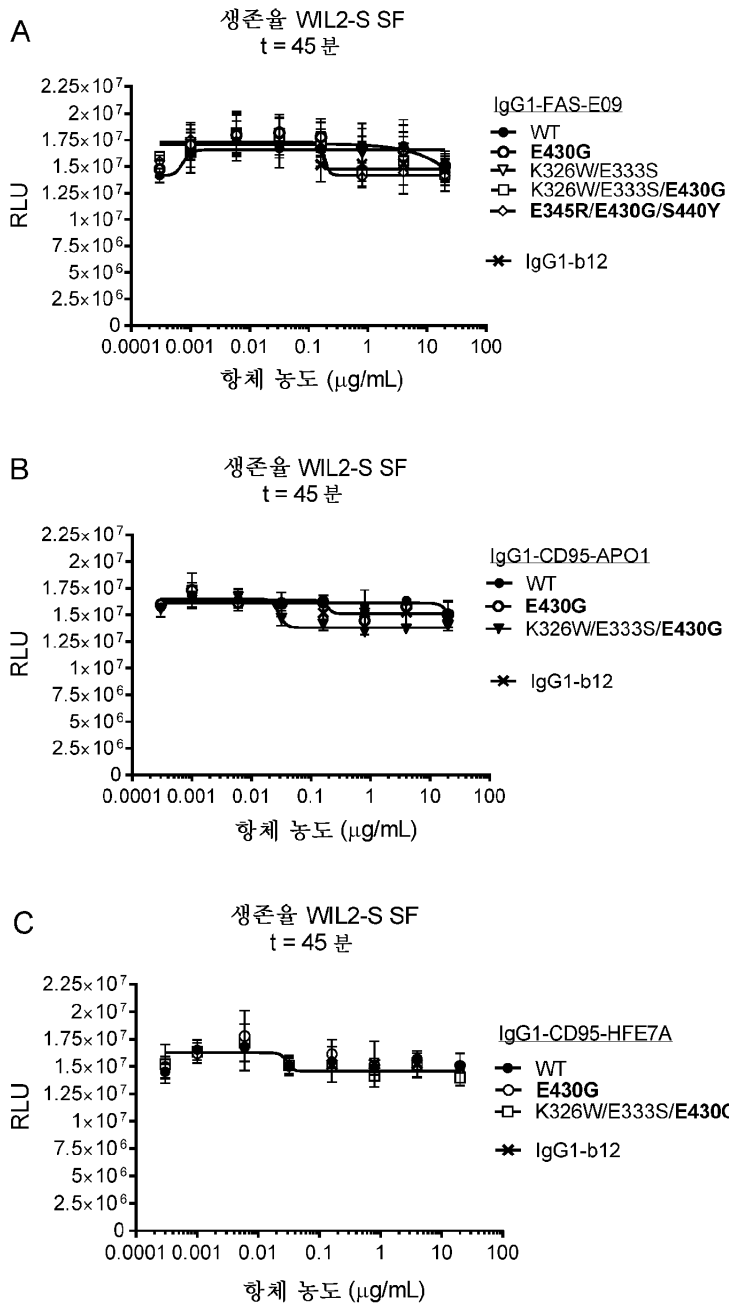
도면26



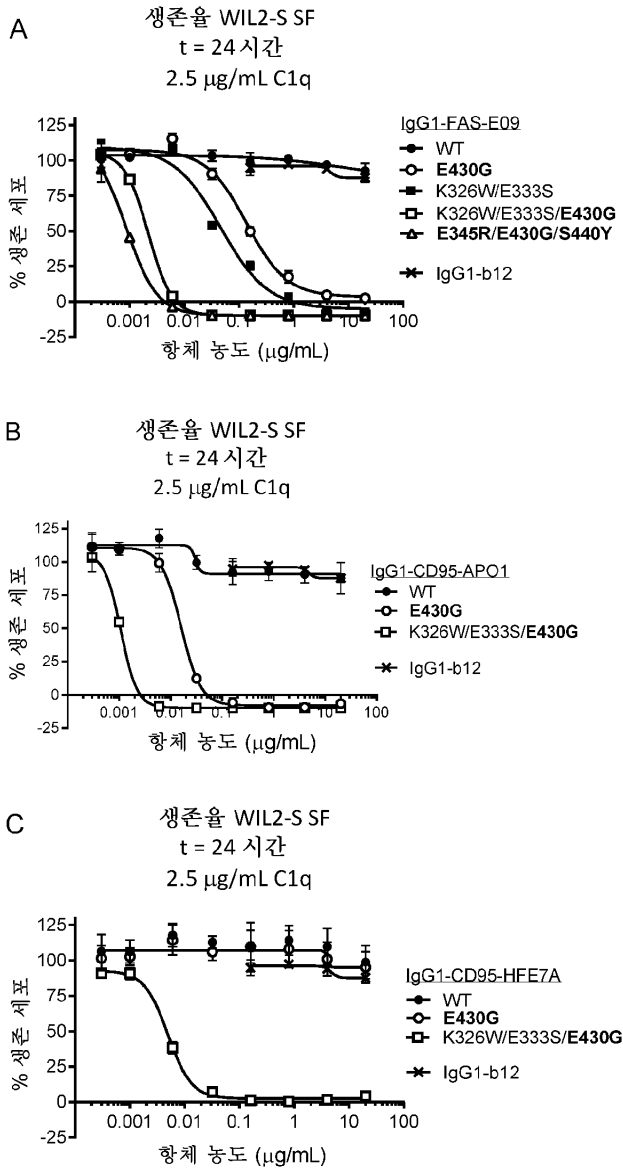
도면27



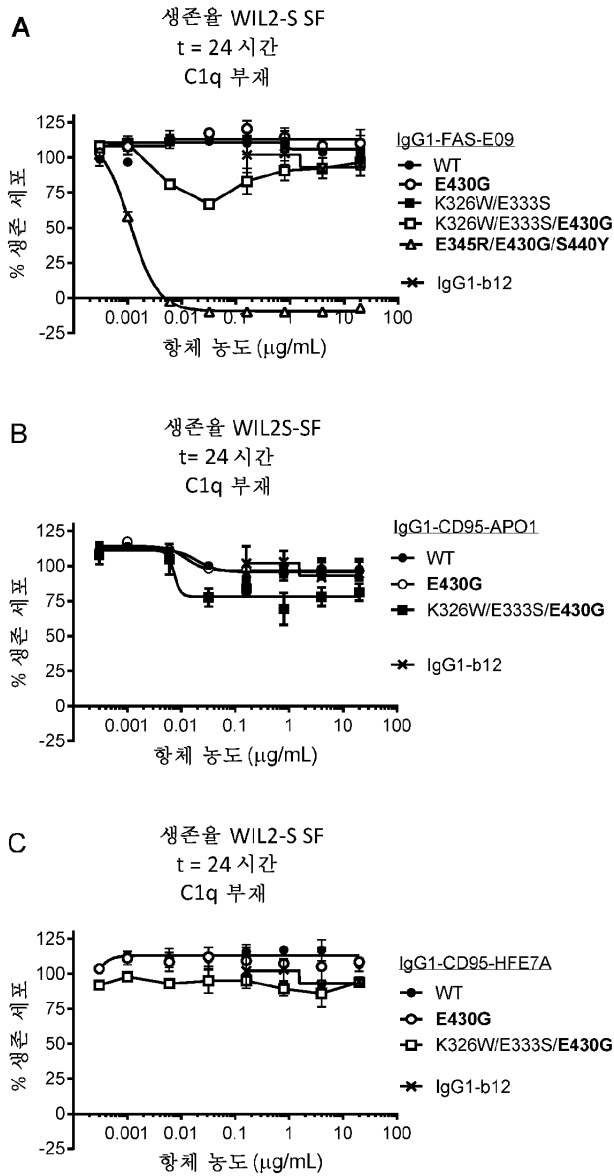
도면28



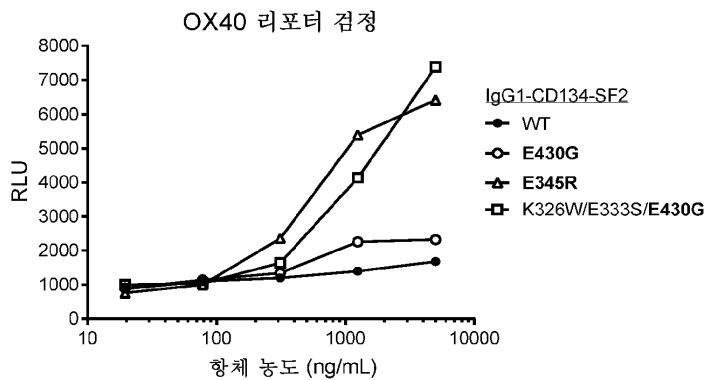
도면29



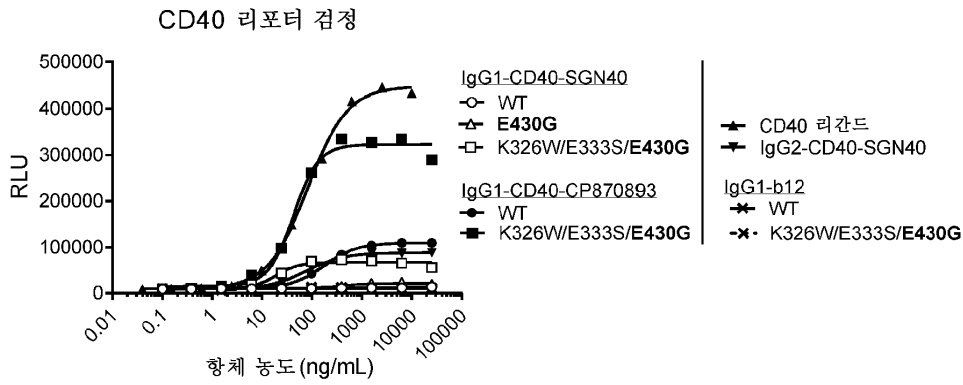
도면30



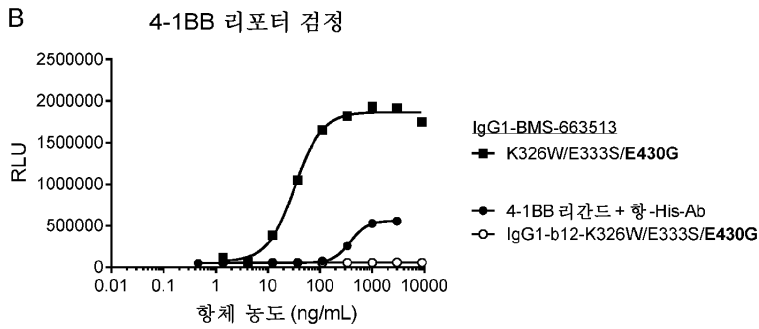
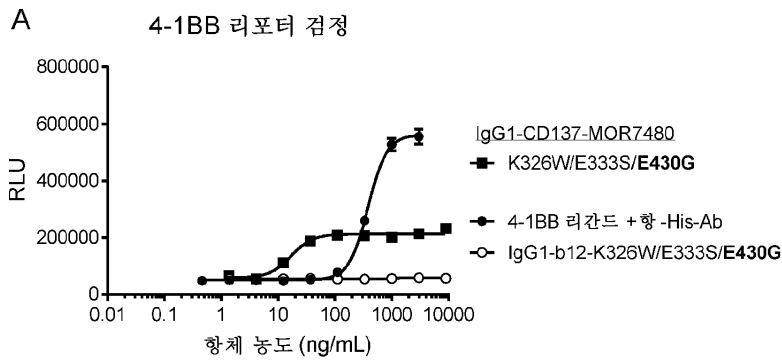
도면31



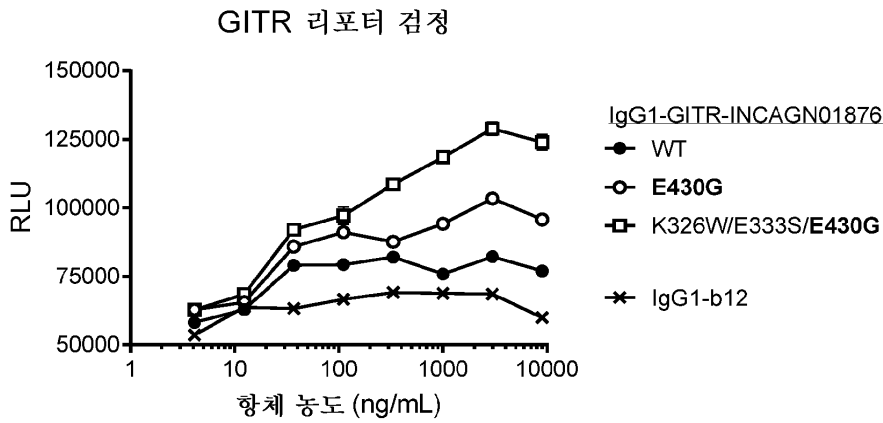
도면32



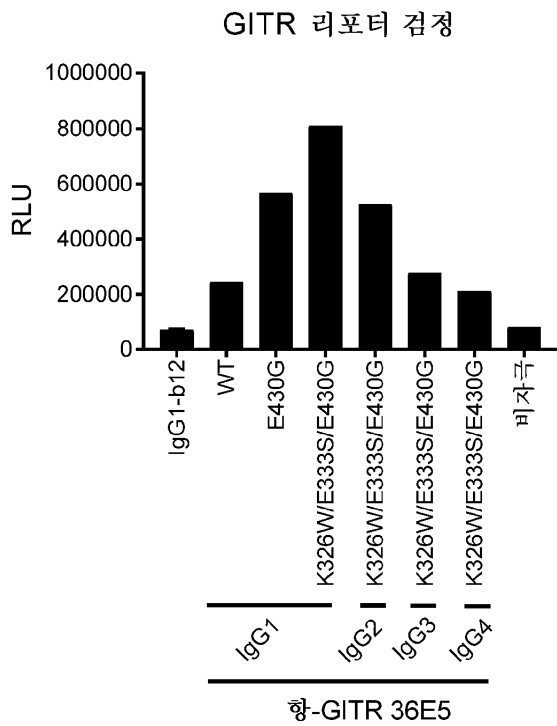
도면33



도면34



도면35



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Genmab B.V.

<120> POLYPEPTIDE VARIANTS AND USES THEREOF

<130> P/0114-WO

<160> 172

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 1

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Phe

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 2

Ile Asp Pro Ala Asn Thr Asn Thr

1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 3

Val Arg Gly Leu Tyr Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 4

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Phe Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Arg Gly Leu Tyr Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 5

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 5

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Phe Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Arg Gly Leu Tyr Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

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

355 360 365

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

370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385 390 395 400

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

405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 6

Gln Ser Ile Ser Asn Asn

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 7

Gln Gln Gly Asn Ser Trp Pro Tyr Thr

1 5

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 8

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

<210> 9

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400>

> 9

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

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

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

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 10

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr His
 1 5

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 11

Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr

1 5

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 12

Ala Arg Trp Gly Thr Asn Val Tyr Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 13

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 13

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Glu Tyr Asp Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Trp Gly Thr Asn Val Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 14

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Glu Tyr Asp Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Trp Gly Thr Asn Val Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195 200 205

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

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 15

Ser Ser Val Ser Tyr Arg Thr Ser

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 16

Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Pro Thr

1 5

<210> 17

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 17

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 18

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 18

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Pro Thr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 19

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Asp Tyr Phe

1 5 10

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 20

Ile His Asn Ser Gly Thr Thr

1 5

<210> 21

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 21

Ala Arg Asp Arg Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 22

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 22

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly

20 25 30

Asp Tyr Phe Trp Ser Trp Ile Arg Gln Leu Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly His Ile His Asn Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Arg Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 23
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 23

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Asp Tyr Phe Trp Ser Trp Ile Arg Gln Leu Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly His Ile His Asn Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Arg Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp

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

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

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 24

Gln Gly Ile Ser Arg Ser Tyr

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 25

Gln Gln Phe Gly Ser Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 26

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 26

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

<210> 27

<211> 323

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 27

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

100 105 110
 Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
 115 120 125
 Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Ser Tyr Leu Ala Trp

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

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

 260 265 270
 Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 275 280 285
 Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 290 295 300
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 305 310 315 320
 Gly Glu Cys

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 28

Gly Phe Thr Phe His Asp Tyr Ala

1 5

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 29

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Ile

1 5

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 30

Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 31

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400

> 31

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe His Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

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

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

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

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

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300

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

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

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

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

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400

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

405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 33
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 33

Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 34

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr
 1 5

<210> 35
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 35

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 37

Gly Phe Thr Phe Ser Tyr His Ala

1 5

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 38

Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr

1 5

<210> 39

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 39

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Ala Gly Ser Phe Tyr Asp Gly Leu Tyr Gly

1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 40

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 40

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr His
 20 25 30

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

Ser Ile Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Asp Tyr Tyr Gly Ala Gly Ser Phe Tyr Asp Gly Leu Tyr Gly Met
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 41

<211> 455

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 41

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr His
 20 25 30

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

Ser Ile Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Asp Tyr Tyr Gly Ala Gly Ser Phe Tyr Asp Gly Leu Tyr Gly Met
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125

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

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

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 210 215 220

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

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

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

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

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

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

305 310 315 320
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 355 360 365
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 42
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 42
 Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 43
 Gln Gln Arg Ser Asp Trp Pro Leu Thr

1 5
 <210> 44
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 44
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 45
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 45
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

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

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 47

Ile Arg Asp Lys Ala Lys Gly Tyr Thr Thr

1 5 10

<210> 48

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 48

Ala Arg Glu Gly His Thr Ala Ala Pro Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 49

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 49

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe

 20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile

 35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asp Lys Ala Lys Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Asn Pro

 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln

65 70 75 80

Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr

 85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Glu Gly His Thr Ala Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly

 100 105 110

Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 50

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 50

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe

20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asp Lys Ala Lys Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Asn Pro

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln

65 70 75 80

Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Glu Gly His Thr Ala Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

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

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

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

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

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

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

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

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

435 440 445

Pro Gly Lys

450

<210> 51

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400

> 51

Gln Asn Ile Asp Lys Tyr

1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 52

Leu Gln His Ile Ser Arg Pro Arg Thr

1 5

<210> 53

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 53

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asp Lys Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

<211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 58

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

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

<210> 59

<211> 455
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 59

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

Ala Val Ile Trp Asp Asp Gly Ser Tyr Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Ile Thr Met Val Arg Gly Val Met Lys Asp Tyr Phe
 100 105 110
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 130 135 140
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 210 215 220
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

290 295 300
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

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

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

 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 60
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 60
 Gln Asp Ile Ser Ser Ala
 1 5
 <210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 61

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 62

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 62

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala

20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 63

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 63

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala

20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 65

Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys

1 5

<210> 66

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 66

Ala Arg Val Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr

1 5 10 15

Tyr Met Asp Val

20

<210> 67

<211> 127

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 67

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn Phe

20 25 30

Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Phe Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys Glu Phe Ser Ala Lys Phe

50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Val Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr

100 105 110

Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser

115 120 125

<210> 68

<211> 457

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 68

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn Phe

20 25 30

Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Phe Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys Glu Phe Ser Ala Lys Phe

50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Val Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr

100 105 110

Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser Ala

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

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

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

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

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

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 73

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 73

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

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

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

 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

 <210> 74
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 74
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

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

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

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

 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 75

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 75

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Pro Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 76

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 76

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Gly Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 77

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 77

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

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

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

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

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 79
 <211> 330
 <212> PRT

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> N/A
 <400> 79
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

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

 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Leu Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 80
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> N/A
 <400> 80
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Leu Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Gly Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 81

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 81

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

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

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

<400> 84

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Leu Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Gly Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 85
 <211> 330
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> N/A
 <400> 85

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 86

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 86

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

 195 200 205

Trp Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ser Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

 210 215 220

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

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

<210> 87

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 87

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Trp Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ser Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Gly Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 88

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 88

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Glu Phe Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Thr Asn
 195 200 205

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

<210> 90

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 90

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 93

Ala Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu

1 5 10 15

<210> 94

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 94

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile

 35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu

 50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

 85 90 95

Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly

 100 105 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

 115 120

<210> 95

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 95

Gln Ser Val Ser Ser Tyr

1 5

<210> 96

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 96

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Ala Leu Thr

1 5 10

<210> 97

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 97

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 98

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 98

Gly Tyr Thr Phe Lys Asp Tyr Thr

1 5

<210> 99

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 99

Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Ser

1 5

<210> 100

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 100

Ala Arg Met Gly Tyr His Gly Pro His Leu Asp Phe Asp Val

1 5 10

<210> 101

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 101

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

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

 20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

 35 40 45

Gly Gly Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Asn Gln Asn Phe

50 55 60

Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr

1 5

<210> 108

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 108

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe

50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 109

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 109

Asn Ile Gly Asp Gln Tyr

1 5

<210> 110

<211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> N/A
 <400> 110
 Asn Ile Gly Asp Gln Tyr
 1 5

<210> 111
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> N/A
 <400> 111
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
 85 90 95
 Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 112
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> N/A

<400> 112

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr

1 5

<210> 113

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 113

Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr

1 5

<210> 114

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 114

Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr

1 5 10 15

Phe Asp Tyr

<210>

115

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 115

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr

100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 116

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 116

Gln Gly Ile Tyr Ser Trp

1 5

<210> 117

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 117

Gln Gln Ala Asn Ile Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 118

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 118

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Tyr Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ile Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 119

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 119

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Tyr

1 5

<210> 120

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 120

Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr

1 5

<210> 121

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 121

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp

1 5

<210> 122

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 122

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 123

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 123

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe

1 5 10

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 124

Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 125

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 125

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Ser Gln Thr

85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 126

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 126

Gly Phe Thr Phe Asn Thr Asn Ala

1 5

<210> 127

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 127

Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr

1 5 10

<210> 128

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 128

Val Thr Asp Gly Tyr Tyr

1 5

<210> 129

<

211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 129

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu

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

Val Ser Ser

115

<210> 130

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 130

Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Gly Thr Ser Leu

1 5 10

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 131

Gln Gln Ser Thr Lys Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 132

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 132

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

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

Gly Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Thr
 85 90 95

Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 133

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 133

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp

1 5

<210> 134

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 134

Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr

1 5

<210> 135

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 135

Ala Arg Asn Arg Asp Tyr Ser Asn Asn Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 136

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 136

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Arg Asn Arg Asp Tyr Ser Asn Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly

 100 105 110

Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

 115 120

<210> 137

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 137

Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr

1 5 10

<210> 138

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 138

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr
 1 5

<210> 139

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 139

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 140

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 140

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr
 1 5

<210> 141

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 141

Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr

1 5

<210> 142

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 142

Ala Tyr Tyr Tyr Val Ser Asn Ala Trp Phe Thr Tyr

1 5 10

<210> 143

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 143

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Tyr Tyr Tyr Val Ser Asn Ala Trp Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 144

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 144

Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

1 5

<210> 145

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 145

Gln His Phe Trp Gly Thr Trp Thr

1 5

<210> 146

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 146

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

 20 25 30

Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val

 35 40 45

Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Trp Thr

 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 147

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 147

Gly Ala Ser Ile Ser Ala Asn Ser Tyr Tyr

1 5 10

<210> 148

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 148

Ile Ala Tyr Arg Gly Asn Ser Asn Ser Gly Ser Thr

1 5 10

<210> 149

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 149

Ala Arg Arg Gln Leu Leu Asp Asp Gly Thr Gly Tyr Gln Trp Ala Ala

1 5 10 15

Phe Asp Val

<210> 150

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 150

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser Ala Asn
 20 25 30
 Ser Tyr Tyr Gly Val Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Gly Ser Ile Ala Tyr Arg Gly Asn Ser Asn Ser Gly Ser Thr
 50 55 60
 Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ala Thr Val Ser Val Asp Thr
 65 70 75 80
 Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Arg Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp
 85 90 95
 Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gln Leu Leu Asp Asp Gly Thr
 100 105 110
 Gly Tyr Gln Trp Ala Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 115 120 125
 Thr Val Ser Ser
 130

<210> 151

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 151

Ser Phe Asn Ile Gly Arg Tyr Pro

1 5

<210> 152

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 152

Ser Thr Trp Asp Asp Thr Leu Lys Gly Trp Val

1 5 10

<210> 153

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 153

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Glu Ala Pro Arg Gln

1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Asn Ser Phe Asn Ile Gly Arg Tyr

20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Tyr Asn Asn Leu Arg Phe Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Arg Asp Leu Leu

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Thr Trp Asp Asp Thr Leu

85 90 95

Lys Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105 110

<210> 154

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 154

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1 5

<210> 155

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 155

Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr

1 5

<210> 156

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 156

Ala Arg Val Gly Gly Tyr Tyr Asp Ser Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 157

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 157

Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Val Gly Gly Tyr Tyr Asp Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ile

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 164

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Val Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Asp Val Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Ile Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ala Arg Leu Ser Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 165

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 165

Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr
 1 5 10

<210> 166

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 166

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 167

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N/A

<400> 167

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Ile Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr His Cys Gln Asn

85 90 95

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

100 105 110

Lys

<210> 168

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 168

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

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

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

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

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

 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325
 <210> 169
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 169
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
 100 105 110
 Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
 115 120 125
 Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
 130 135 140

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

 210 215 220
 Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 225 230 235 240
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 245 250 255
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 260 265 270
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met

 275 280 285
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 290 295 300
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 305 310 315 320
 Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 325 330 335
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile

 340 345 350
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
 355 360 365
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375
 <210> 170

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 170

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

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu
 1 5 10 15

Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro
 20 25 30

Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys
 35 40 45

Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu
 50 55 60

Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys
 65 70 75 80

Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp
 85 90 95

Arg Asp Met