



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0038522
(43) 공개일자 2023년03월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7004652
(22) 출원일자(국제) 2021년06월23일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년02월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/038714
(87) 국제공개번호 WO 2022/010652
국제공개일자 2022년01월13일
(30) 우선권주장
63/050,535 2020년07월10일 미국(US)
63/143,720 2021년01월29일 미국(US)

(71) 출원인
인벤티엑스 인코포레이티드
미국 매사추세츠주 02108 보스턴 워싱턴 스트리트
201 스위트 3930 원 보스턴 플레이스
(72) 발명자
브론덕 윌리엄
미국 매사추세츠주 02108 보스턴 워싱턴 스트리트
201
슈발리에 브레트
미국 매사추세츠주 02108 보스턴 워싱턴 스트리트
201
(74) 대리인
(뒷면에 계속)
장훈

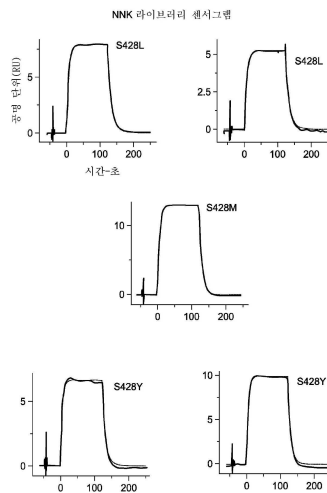
전체 청구항 수 : 총 51 항

(54) 발명의 명칭 고양이에서 치료제의 반감기를 증가시키기 위한 조성물 및 사용 방법

(57) 요약

고양이에서 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들의 반감기를 증가시키기 위한 조성물 및 이의 사용 방법이 제공된다. 조성물은 변이체 고양이 IgG Fc 영역을 포함한다.

대표도



도 1

(52) CPC특허분류

C07K 14/70503 (2013.01)

C07K 2317/52 (2013.01)

C07K 2319/30 (2013.01)

(72) 발명자

호른 위르겐

미국 매사추세츠주 02108 보스턴 워싱턴 스트리트
201

나타라잔 마두수단

미국 매사추세츠주 02108 보스턴 워싱턴 스트리트
201

명세서

청구범위

청구항 1

고양이 IgG Fc 영역 변이체 또는 이의 고양이 FcRn-결합 영역을 포함하는 폴리펩타이드로서, 상기 폴리펩타이드는

- (i) 야생형 고양이 IgG의 252번 아미노산 위치에 상응하는 위치, 여기서 상기 아미노산 치환은 S252W임;
- (ii) 야생형 고양이 IgG의 254번 아미노산 위치에 상응하는 위치, 여기서 상기 아미노산 치환은 S254R 및 S254K로 이루어진 군으로부터 선택됨;
- (iii) 야생형 고양이 IgG의 309번 아미노산 위치에 상응하는 위치, 여기서 상기 아미노산 치환은 L309V 또는 L309Y임;
- (iv) 야생형 고양이 IgG의 311번 아미노산 위치에 상응하는 위치, 여기서 상기 아미노산 치환은 Q311R, Q311V, Q311L 및 Q311K로 이루어진 군으로부터 선택됨;
- (v) 야생형 고양이 IgG의 428번 아미노산 위치에 상응하는 위치, 여기서 상기 아미노산 치환은 S428M, S428Y, S428H 및 S428R로 이루어진 군으로부터 선택됨; 및
- (vi) 야생형 고양이 IgG의 262번, 286번, 289번, 290번, 293번, 301번, 312번, 326번, 334번, 347번, 355번, 377번, 380번, 383번, 389c번, 392번, 426번 및 437번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 위치에 상응하는 하나 이상의 위치;

로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 위치에 아미노산 치환을 포함하되, 상기 아미노산 위치는 EU 넘버링에 기초하고, 상기 폴리펩타이드는 상기 야생형 고양이 IgG의 Fc 도메인과 비교할 때 고양이 FcRn에 대해 증가된 결합 친화도를 갖는, 폴리펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 야생형 고양이 IgG의 252번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 아미노산 치환 S252W를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 야생형 고양이 IgG의 254번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 야생형 고양이 IgG의 254번 위치에 있는 아미노산 치환은 S254R인, 폴리펩타이드.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 야생형 고양이 IgG의 254번 위치에 있는 아미노산 치환은 S254K인, 폴리펩타이드.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 야생형 고양이 IgG의 309번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 야생형 고양이 IgG의 309번 위치에 있는 아미노산 치환은 L309V인, 폴리펩타이드.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 야생형 고양이 IgG의 309번 위치에 있는 아미노산 치환은 L309Y인, 폴리펩타이드.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 야생형 고양이 IgG의 311번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 야생형 고양이 IgG의 311번 위치에 있는 아미노산 치환은 Q311R인, 폴리펩타이드.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 야생형 고양이 IgG의 311번 위치에 있는 아미노산 치환은 Q311V인, 폴리펩타이드.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 야생형 고양이 IgG의 311번 위치에 있는 아미노산 치환은 Q311K인, 폴리펩타이드.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 야생형 고양이 IgG의 311번 위치에 있는 아미노산 치환은 Q311L인, 폴리펩타이드.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 야생형 고양이 IgG의 428번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 야생형 고양이 IgG의 428번 위치에 있는 아미노산 치환은 S428M인, 폴리펩타이드.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 야생형 고양이 IgG의 428번 위치에 있는 아미노산 치환은 S428Y인, 폴리펩타이드.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 야생형 고양이 IgG의 428번 위치에 있는 아미노산 치환은 S428R인, 폴리펩타이드.

청구항 19

제15항에 있어서, 상기 야생형 고양이 IgG의 428번 위치에 있는 아미노산 치환은 S428H인, 폴리펩타이드.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 야생형 고양이 IgG의 262번, 286번, 289번, 290번, 293번, 301번, 312번, 326번, 334번, 347번, 355번, 377번, 380번, 383번, 389c번, 392번, 426번 및 437번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 위치에 상응하는 하나 이상의 위치에 아미노산 치환을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 아미노산 치환은 L262Q, L262E, T286E, T286D, T289K, S290V, S290Y, E293D, E293K, E293H, R301L, D312T, K326D, R334D, Q347L, Q355L, I377V, I377Y, E380D, E380V, E380T, I383L, N389c-R, R392E, S426L, S426H 및 T437L 및 임의의 전술한 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 폴리펩타이드.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 아미노산 치환은 L262Q, L262E, T286E, T286D, T289K, S290V, S290Y, E293D, E293K, E293H, R301L, D312T, K326D, R334D, Q347L, Q355L, I377V, I377Y, E380D, E380V, E380T, I383L, N389c-R, R392E, S426L, S426H 및 T437L로 이루어진 군으로부터 선택되는, 폴리펩타이드.

청구항 23

고양이 IgG Fc 영역 변이체 또는 이의 고양이 FcRn-결합 영역을 포함하는 폴리펩타이드로서, 상기 폴리펩타이드는 2개 이상의 아미노산 치환을 포함하되, 상기 2개 이상의 아미노산 치환은

- (i) 야생형 고양이 IgG의 252번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 있는 아미노산 치환, 여기서 상기 아미노산 치환은 S252W, S252Y, S252F 및 S252R로 이루어진 군으로부터 선택됨;
- (ii) 야생형 고양이 IgG의 254번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 있는 아미노산 치환, 여기서 상기 아미노산 치환은 S254R 및 S254K로 이루어진 군으로부터 선택됨;
- (iii) 야생형 고양이 IgG의 309번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 있는 아미노산 치환, 여기서 상기 아미노산 치환은 L309V, L309Y 및 L309E로 이루어진 군으로부터 선택됨;
- (iv) 야생형 고양이 IgG의 311번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 있는 아미노산 치환, 여기서 상기 아미노산 치환은 Q311R, Q311V, Q311L 및 Q311K로 이루어진 군으로부터 선택됨;
- (v) 야생형 고양이 IgG의 428번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 있는 아미노산 치환, 여기서 상기 아미노산 치환은 S428L, S428M, S428Y, S428H 및 S428R로 이루어진 군으로부터 선택됨;
- (vi) 야생형 고양이 IgG의 262번, 286번, 289번, 290번, 293번, 301번, 312번, 326번, 334번, 347번, 355번, 377번, 380번, 383번, 389c번, 392번, 426번 및 437번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 위치에 상응하는 하나 이상의 위치에 있는 아미노산 치환; 및
- (vii) 야생형 고양이 IgG의 434번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 있는 아미노산 치환, 여기서 상기 아미노산 치환은 S434F, S434W, S434H, S434R 및 S434Y로 이루어진 군으로부터 선택됨;

으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 아미노산 위치는 EU 넘버링에 기초하며, 상기 2개 이상의 아미노산 치환은 상이한 위치에 있고, 상기 폴리펩타이드는 (a) 상기 야생형 고양이 IgG의 Fc 도메인 및 (b) 상기 2개 이상의 아미노산 치환 중 하나만을 포함하는 폴리펩타이드와 비교할 때 고양이 FcRn에 대해 증가된 결합 친화도를 갖는, 폴리펩타이드.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 2개 이상의 아미노산 치환은 야생형 고양이 IgG의 286번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함하되, 상기 아미노산 치환은 T286E 및 T286D로 이루어진 군으로부터 선택되는, 폴리펩타이드.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, 상기 2개 이상의 아미노산 치환은 야생형 고양이 IgG의 289번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함하되, 상기 아미노산 치환은 T289K 및 T289H로 이루어진 군으로부터 선택되는, 폴리펩타이드.

청구항 26

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 2개 이상의 아미노산 치환은 야생형 고양이 IgG의 301번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함하되, 상기 아미노산 치환은 R301L인, 폴리펩타이드.

청구항 27

제23항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 2개 이상의 아미노산 치환은 야생형 고양이 IgG의 334번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함하되, 상기 아미노산 치환은 R334D인, 폴리펩타이드.

청구항 28

제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 2개 이상의 아미노산 치환은 야생형 고양이 IgG의 426번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함하되, 상기 아미노산 치환은 S426L 및 S426H로 이루어진 군으로부터 선택되는, 폴리펩타이드.

청구항 29

제23항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 2개 이상의 아미노산 치환은 야생형 고양이 IgG의 437번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함하되, 상기 아미노산 치환은 T437L인, 폴리펩타이드.

청구항 30

제23항에 있어서, 상기 2개 이상의 아미노산 치환은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 폴리펩타이드:

- (i) Q311R 및/또는 Q311L과 조합된 S252Y;
- (ii) S254R, S254K, L262E, T286D, T286E, T289K, E293D, E293K, L309V, L309E, K326D 및 Q347L 중 하나 이상과 조합된 S434Y;
- (iii) E380D와 조합된 S434F;
- (iv) S252R, T286E, Q311V, Q311K, D312T, I377V, I383L 및 N389cR 중 하나 이상과 조합된 S428L;
- (v) S428L, E380D 및 S434R;
- (vi) S428L, E380T 및 S434R;
- (vii) L262Q와 조합된 S252R;
- (viii) T260E, L309E 및 Q355L;
- (ix) R344D와 조합된 S290V;
- (x) R301L, E380V 및 T437L;
- (xi) S428H와 조합된 T286E;
- (xii) S428R, T437L 및 R301L 중 하나 이상과 조합된 R334D;
- (xiii) T289H 및/또는 S428H와 조합된 S426L;
- (xiv) Q311V, S254R, L309V, T286E 및 E380T 중 하나 이상과 조합된 S428Y; 및
- (xv) T289H와 조합된 S428H.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 1 내지 3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 32

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 야생형 고양이 IgG는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 Fc 도메인을 포함하는 고양이 IgG1a인, 폴리펩타이드.

청구항 33

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 야생형 고양이 IgG는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 Fc 도메인을 포함하는 고양이 IgG1b인, 폴리펩타이드.

청구항 34

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 야생형 고양이 IgG는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 Fc 도메인을 포함하는 고양이 IgG2인, 폴리펩타이드.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 결합 도메인을 추가로 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 결합 도메인은 (i) 면역글로불린 분자의 6개의 상보성 결정 영역(CDR), (ii) 고양이 수용체 단백질의 리간드 결합 도메인, (iii) 나노바디 또는 (iv) 고양이 수용체 단백질의 세포외 도메인을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 37

제35항 또는 제36항에 있어서, 상기 결합 도메인은 NGF, TrKA, ADAMTS, IL-1, IL-2, IL-4, IL-4R, 안지오텐신 유형 1(AT1) 수용체, 안지오텐신 유형 2(AT2) 수용체, IL-5, IL-12, IL-13, IL-31, IL-33, CD3, CD20, CD47, CD52 및 보체 시스템 복합체로 이루어진 군으로부터 선택되는 항원에 특이적으로 결합하는, 폴리펩타이드.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, EPO, CTLA4, LFA3, VEGFR1/VEGFR3, IL-1R, IL-4R, GLP-1 수용체 효능제 및 트롬보포이에틴 결합 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질을 추가로 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 중성 pH보다 산성 pH에서 더 높은 수준으로 고양이 FcRn에 결합하는, 폴리펩타이드.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 pH 7.4보다 pH 5.5에서 더 높은 수준으로 고양이 FcRn에 결합하는, 폴리펩타이드.

청구항 41

제39항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 pH 7.4보다 pH 6.0에서 더 높은 수준으로 고양이 FcRn에 결합하는, 폴리펩타이드.

청구항 42

약제학적 조성물로서, (i) 제1항 내지 제41항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드 및 (ii) 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 43

핵산 또는 핵산들로서, 제1항 내지 제41항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드를 암호화하는, 핵산 또는 핵산들.

청구항 44

발현 벡터 또는 발현 벡터들로서, 제43항의 핵산 또는 핵산들을 포함하는, 발현 벡터 또는 발현 벡터들.

청구항 45

숙주 세포로서, 제43항의 핵산 또는 핵산들 또는 제44항의 발현 벡터 또는 발현 벡터들을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 46

폴리펩타이드를 제조하는 방법으로서,

- (a) 제43항의 핵산 또는 핵산들을 제공하는 단계;
- (b) 숙주 세포 배양물에서 상기 핵산 또는 핵산들을 발현시켜 상기 폴리펩타이드를 생산하는 단계; 및

(c) 숙주 세포 배양물로부터 (b)에서 생산된 상기 폴리펩타이드를 수집하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 약제학적 제형으로서 폴리펩타이드를 제형화하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 48

고양이 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 고양이에서 고양이 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서, 유효량의 제42항의 약제학적 조성물을 포함하는 조성물을 상기 고양이에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 49

고양이 질환 또는 장애의 예방을 필요로 하는 고양이에서 고양이 질환 또는 장애를 예방하는 방법으로서, 유효량의 제42항의 약제학적 조성물을 포함하는 조성물을 상기 고양이에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 50

제48항 또는 제49항에 있어서, 상기 고양이 질환 또는 장애는 알레르기 질환, 만성 통증, 급성 통증, 염증성 질환, 자가면역 질환, 내분비 질환, 위장관 질환, 심혈관 질환, 신장 질환, 생식 관련 장애, 감염성 질환 또는 암인, 방법.

청구항 51

제48항 또는 제49항에 있어서, 상기 고양이 질환 또는 장애는 아토피성 피부염, 알레르기성 피부염, 골관절성 통증, 관절염, 빈혈 또는 비만인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호참조

[0002] 본 출원은 2020년 7월 10일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/050,535호 및 2021년 1월 29일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/143,720에 대한 우선권을 주장하며, 이들 각각의 내용은 그 전문이 참조에 의해 인용된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함하며, 이는 그 전체가 참조에 의해 본 명세서에 인용된다. 상기 ASCII 사본은 2021년 6월 23일에 생성되었으며, 이름은 "47406-0016W01_SL.txt"이고, 크기는 25KB이다.

[0005] 기술 분야

[0006] 본 개시내용은 일반적으로 야생형 대응물(counterpart)에 비해 고양이에서 증가된 반감기를 갖는 폴리펩타이드(예를 들어, 폴리펩타이드-Fc 영역 융합과 같은 융합 폴리펩타이드; 또는 수용체-Fc 융합의 항체 또는 리간드-결합 부분과 같은 결합 분자)에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 항체의 Fc 영역은 라이소솜 경로를 통한 분해로부터 항체를 보호하고 항체 효과기 기능을 매개하는 것을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 많은 기능적 역할을 한다. 치료제로서 고양이 항체의 사용이 증가함에 따라, 최적의 Fab를 선택하는 것뿐만 아니라 목적하는 반감기 및 효과기 기능을 위해 적절한 Fc와 결합하는 데 중점을 두고 있다.

[0008] 고양이에서 사용하기 위한 폴리펩타이드 치료제(예를 들어, 항체)의 반감기를 증가시키는 것과 관련된 당업계의 지침은 거의 없다. 본 개시내용은 고양이에서 폴리펩타이드(예를 들어, 항체)의 혈청 지속성을 개선하는 Fc 영역 변이체를 제공함으로써 해당 결점을 해결한다.

발명의 내용

- [0009] 치료적 폴리펩타이드에 유용한 고양이 Fc(예를 들어, 고양이 IgG Fc 영역 변이체) 또는 이의 고양이 FcRn 결합 단편이 본 명세서에 제공된다. 본 개시내용은 대조군 폴리펩타이드(예를 들어, 야생형 대응물 IgG 고양이 Fc 영역)보다 고양이 FcRn에 대해 증가된 결합을 갖는 폴리펩타이드를 특징으로 한다. 일부 경우에, 이러한 폴리펩타이드는 pH 5.5, pH 6.0 및/또는 pH 6.5에서 대조군 폴리펩타이드보다 고양이 FcRn에 대해 증가된 결합을 갖는다. 일부 경우에, 이러한 폴리펩타이드는, 예를 들어, 중성 pH(예를 들어, pH 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4 또는 7.5)보다 산성 pH(예를 들어, pH 5.5, pH 6.0 또는 pH 6.5)에서 더 높은 수준으로 고양이 FcRn에 결합할 수 있다. 일부 경우에, 이러한 폴리펩타이드는 pH 7.4보다 pH 5.5 및/또는 6.0에서 더 높은 수준으로 고양이 FcRn에 결합한다. 본 개시내용은 부분적으로 야생형 대응물보다 고양이에서 증가된 반감기를 갖는 폴리펩타이드에 관한 것이다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 Fc 영역 또는 이의 고양이 FcRn 결합 영역에 부착되지 않은 이러한 결합 분자의 버전에 비해 증가된 반감기를 갖는 결합 분자(예를 들어, 수용체의 항체 또는 리간드-결합 부분)가 제공된다. 또한, 효소-Fc 영역 융합, 리간드-Fc 영역 융합, 나노바디-Fc 융합 및 펩타이드-Fc 영역 융합이 제공되며, 융합은 야생형 대응물에 비해 증가된 반감기를 갖는다. Fc 영역은 (야생형 고양이 Fc 영역에 비해) 반감기를 증가시키는 치환 또는 치환들을 갖는 것 외에, 예를 들어, 효과기 기능을 증가시키고, 효과기 기능을 감소시키고, 단백질 A에 대한 결합을 증가시키고/시키거나 폴리펩타이드의 이질성을 감소시키는(예를 들어, Fc 영역에서 하나 이상의 번역 후 변형을 제거함으로써) 다른 치환을 포함할 수 있다. 고양이 Fc 영역 서열은 임의의 고양이 항체로부터 유래할 수 있다. 일부 경우에, 고양이 Fc 영역 서열은 고양이 IgG(예를 들어, IgG1a, IgG1b, IgG2)로부터 유래할 수 있다.
- [0010] 본 개시내용은 (1) 단백질의 리간드 또는 에피토프에 특이적으로 결합하는 결합 도메인 또는 이의 단편을 포함 하되, 결합 도메인은 (2) 본 명세서에 개시된 바와 같은 Fc 영역(CH2+CH3 영역) 또는 이의 고양이 FcRn 결합 영역을 포함하는 도메인에 부착되는 재조합 단백질을 특징으로 한다. 일부 경우에, 결합 도메인은 (i) 예를 들어, 고양이 또는 인간/인간화된 항체의 6개의 상보성 결정 영역(CDR); (ii) 나노바디; (iii) 리간드 또는 이의 리간드-결합 단편에 결합하는 가용성 수용체-결합 도메인 및 (iv) 고양이 수용체 단백질의 세포외 도메인을 포함한다.
- [0011] 본 개시내용은 또한 (1) 본 명세서에 기재된 고양이 IgG Fc 영역 변이체를 포함하는 제1 Fc 영역(예를 들어, CH2 영역, CH3 영역, CH2+CH3 영역)을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및 (2) 본 명세서에 기재된 고양이 IgG Fc 영역 변이체를 포함하는 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 제공한다. 제1 및 제2 폴리펩타이드는 제1 및 제2 Fc 영역을 통해 회합될 수 있다. 일부 경우에, 제1 및 제2 Fc 영역의 아미노산 서열은 동일하다. 다른 경우에, 제1 및 제2 Fc 영역의 아미노산 서열은 (예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개의 아미노산만큼) 상이하다. 일부 경우에, Fc 영역 변이체는 고양이 IgG1a 항체 Fc 영역의 변이체이다. 일부 경우에, Fc 영역 변이체는 고양이 IgG1b 항체 Fc 영역의 변이체이다. 일부 경우에, Fc 영역 변이체는 고양이 IgG2 항체 Fc 영역의 변이체이다.
- [0012] 또한, 본 명세서에 개시된 고양이 IgG Fc 영역 변이체 및 폴리펩타이드를 포함하는 융합 분자가 개시된다. 일부 경우에, 고양이 IgG Fc 영역 변이체는 폴리펩타이드(예를 들어, 힌지 영역 또는 링커를 통해)에 공유적으로 부착된다. 일부 경우에, 폴리펩타이드는 고양이 수용체 단백질의 리간드 결합 도메인, 고양이 수용체 단백질의 세포외 도메인 또는 항원-결합 도메인이다. 일부 경우에, 폴리펩타이드는 고양이 IL-13R α1 또는 IL-13R α2, 고양이 EPO, 고양이 CTLA4, 고양이 LFA3, 고양이 VEGFR1/VEGFR3, 고양이 IL-1R, 고양이 GLP-1 수용체 효능제 및 고양이 트롬보포이에틴 결합 펩타이드의 리간드 결합 도메인 또는 세포외 도메인으로부터 선택된다. 일부 경우에, 폴리펩타이드는 scFv, 나노바디 또는 단일 도메인 항체이다. 일부 경우에, IgG Fc 영역 변이체는 고양이 IgG1a 항체 Fc 영역의 변이체이다. 일부 경우에, IgG Fc 영역 변이체는 고양이 IgG1b 항체 Fc 영역의 변이체이다. 일부 경우에, IgG Fc 영역 변이체는 고양이 IgG2 항체 Fc 영역의 변이체이다.
- [0013] 일부 양태에서, 본 개시내용은 고양이 IgG Fc 영역 변이체 또는 이의 고양이 FcRn-결합 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 제공하되, 폴리펩타이드는
- [0014] (i) 야생형 고양이 IgG의 252번 아미노산 위치에 상응하는 위치, 여기서 아미노산 치환은 S252W임;
- [0015] (ii) 야생형 고양이 IgG의 254번 아미노산 위치에 상응하는 위치, 여기서 아미노산 치환은 S254R 및 S254K로 이루어진 군으로부터 선택됨;

- [0016] (iii) 야생형 고양이 IgG의 309번 아미노산 위치에 상응하는 위치, 여기서 아미노산 치환은 L309V 또는 L309Y임;
- [0017] (iv) 야생형 고양이 IgG의 311번 아미노산 위치에 상응하는 위치, 아미노산 치환은 Q311R, Q311V, Q311L 및 Q311K로 이루어진 군으로부터 선택됨;
- [0018] (v) 야생형 고양이 IgG의 428번 아미노산 위치에 상응하는 위치, 여기서 아미노산 치환은 S428M, S428Y, S428H 및 S428R로 이루어진 군으로부터 선택됨; 및
- [0019] (vi) 야생형 고양이 IgG의 262번, 286번, 289번, 290번, 293번, 301번, 312번, 326번, 334번, 347번, 355번, 377번, 380번, 383번, 389c번, 392번, 426번 및 437번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 위치에 상응하는 하나 이상의 위치;
- [0020] 로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치에 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하고, 아미노산 위치는 EU 넘버링에 기초하며, 폴리펩타이드는 야생형 고양이 IgG의 Fc 도메인과 비교할 때 고양이 FcRn에 대해 증가된 결합 친화도를 갖는다.
- [0021] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 야생형 고양이 IgG의 252번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG의 252번 위치에 있는 아미노산 치환은 S252W이다.
- [0022] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 야생형 고양이 IgG의 254번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG의 254번 위치에 있는 아미노산 치환은 S254R이다. 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG의 254번 위치에 있는 아미노산 치환은 S254K이다.
- [0023] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 야생형 고양이 IgG의 309번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG의 309번 위치에 있는 아미노산 치환은 L309V이다. 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG의 309번 위치에 있는 아미노산 치환은 L309Y이다.
- [0024] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 야생형 고양이 IgG의 311번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG의 311번 위치에 있는 아미노산 치환은 Q311R이다. 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG의 311번 위치에 있는 아미노산 치환은 Q311V이다. 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG의 311번 위치에 있는 아미노산 치환은 Q311K이다. 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG의 311번 위치에 있는 아미노산 치환은 Q311L이다.
- [0025] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 야생형 고양이 IgG의 428번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG의 428번 위치에 있는 아미노산 치환은 S428M이다.
- [0026] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 적어도 아미노산 치환 S428Y를 포함한다. 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG의 428번 위치에 있는 아미노산 치환은 S428Y이다. 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG의 428번 위치에 있는 아미노산 치환은 S428R이다. 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG의 428번 위치에 있는 아미노산 치환은 S428H이다.
- [0027] 또 다른 실시형태에서, 폴리펩타이드는 야생형 고양이 IgG의 262번, 286번, 289번, 290번, 293번, 301번, 312번, 326번, 334번, 347번, 355번, 377번, 380번, 383번, 389c번, 392번, 426번 및 437번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 위치에 상응하는 하나 이상의 위치에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 아미노산 치환은 L262Q, L262E, T286E, T286D, T289K, S290V, S290Y, E293D, E293H, E293K, R301L, D312T, K326D, R334D, Q347L, Q355L, I377V, I377Y, E380D, E380V, E380T, I383L, N389c-R, R392E, S426L, S426H 및 T437L 및 임의의 전술한 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 아미노산 치환은 L262Q, L262E, T286E, T286D, T289K, S290V, S290Y, E293D, E293H, E293K, R301L, D312T, K326D, R334D, Q347L, Q355L, I377V, I377Y, E380D, E380V, E380T, I383L, N389c-R, R392E, S426L, S426H 및 T437L로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0028] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 고양이 IgG Fc 영역 변이체 또는 이의 고양이 FcRn-결합 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 제공하되, 폴리펩타이드는 2개 이상의 아미노산 치환을 포함하고, 2개 이상의 아미노산 치환은,
- [0029] (i) 야생형 고양이 IgG의 252번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 있는 아미노산 치환, 여기서 아미노산 치환은 S252W, S252Y, S252F 및 S252R로 이루어진 군으로부터 선택됨;
- [0030] (ii) 야생형 고양이 IgG의 254번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 있는 아미노산 치환, 여기서 아미노산 치환

은 S254R 및 S254K로 이루어진 군으로부터 선택됨;

- [0031] (iii) 야생형 고양이 IgG의 309번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 있는 아미노산 치환, 여기서 아미노산 치환은 L309V, L309Y 및 L309E로 이루어진 군으로부터 선택됨;
- [0032] (iv) 야생형 고양이 IgG의 311번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 있는 아미노산 치환, 여기서 아미노산 치환은 Q311R, Q311V, Q311L 및 Q311K로 이루어진 군으로부터 선택됨;
- [0033] (v) 야생형 고양이 IgG의 428번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 있는 아미노산 치환, 여기서 아미노산 치환은 S428L, S428M, S428Y, S428H 및 S428R로 이루어진 군으로부터 선택됨;
- [0034] (vi) 야생형 고양이 IgG의 262번, 286번, 289번, 290번, 293번, 301번, 312번, 326번, 334번, 347번, 355번, 377번, 380번, 383번, 389c번, 392번, 426번 및 437번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 위치에 상응하는 하나 이상의 위치에 있는 아미노산 치환; 및
- [0035] (vii) 야생형 고양이 IgG의 434번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 있는 아미노산 치환, 여기서 아미노산 치환은 S434F, S434W, S434H, S434R 및 S434Y로 이루어진 군으로부터 선택됨;
- [0036] 으로 이루어진 군으로부터 선택되며; 아미노산 위치는 EU 넘버링에 기초하고, 2개 이상의 아미노산 치환은 상이한 위치에 있으며, 폴리펩타이드는 (a) 야생형 고양이 IgG의 Fc 도메인 및 (b) 2개 이상의 아미노산 치환 중 하나만을 포함하는 폴리펩타이드와 비교할 때 고양이 FcRn에 대해 증가된 결합 친화도를 갖는다.
- [0037] 일부 실시형태에서, 2개 이상의 아미노산 치환은 야생형 고양이 IgG의 286번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 아미노산 치환은 T286E 및 T286D로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0038] 일부 실시형태에서, 2개 이상의 아미노산 치환은 야생형 고양이 IgG의 289번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 아미노산 치환은 T289K 및 T289H로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0039] 일부 실시형태에서, 2개 이상의 아미노산 치환은 야생형 고양이 IgG의 301번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서 아미노산 치환은 R301L이다.
- [0040] 일부 실시형태에서, 2개 이상의 아미노산 치환은 야생형 고양이 IgG의 334번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 아미노산 치환은 R334D이다.
- [0041] 일부 실시형태에서, 2개 이상의 아미노산 치환은 야생형 고양이 IgG의 426번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 아미노산 치환은 S426L 및 S426H로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0042] 일부 실시형태에서, 2개 이상의 아미노산 치환은 야생형 고양이 IgG의 437번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 아미노산 치환은 T437L이다.
- [0043] 일부 실시형태에서, 2개 이상의 아미노산 치환은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:
- [0044] (i) Q311R 및/또는 Q311L과 조합된 S252Y;
- [0045] (ii) S254R, S254K, L262E, T286D, T286E, T289K, E293D, E293K, L309V, L309E, K326D 및 Q347L 중 하나 이상과 조합된 S434Y;
- [0046] (iii) E380D와 조합된 S434F;
- [0047] (iv) S252R, T286E, Q311V, Q311K, D312T, I377V, I383L 및 N389cR 중 하나 이상과 조합된 S428L;
- [0048] (v) S428L, E380D 및 S434R;
- [0049] (vi) S428L, E380T 및 S434R;
- [0050] (vii) L262Q와 조합된 S252R;
- [0051] (viii) T260E, L309E 및 Q355L;
- [0052] (ix) R344D와 조합된 S290V;

- [0053] (x) R301L, E380V 및 T437L;
- [0054] (xi) S428H와 조합된 T286E;
- [0055] (xii) S428R, T437L 및 R301L 중 하나 이상과 조합된 R334D;
- [0056] (xiii) T289H 및/또는 S428H와 조합된 S426L;
- [0057] (xiv) Q311V, S254R, L309V, T286E 및 E380T 중 하나 이상과 조합된 S428Y; 및
- [0058] (xv) T289H와 조합된 S428H.
- [0059] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 서열번호 1 내지 3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0060] 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG는 서열번호 1과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 동일한 아미노산 서열을 갖는 Fc 도메인을 포함하는 고양이 IgG1a, 서열번호 2와 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 동일한 아미노산 서열을 갖는 Fc 도메인을 포함하는 고양이 IgG1b 또는 서열번호 3과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 동일한 아미노산 서열을 갖는 Fc 도메인을 포함하는 고양이 IgG2이다.
- [0061] 다른 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 Fc 도메인을 포함하는 고양이 IgG1a이다. 다른 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 Fc 도메인을 포함하는 고양이 IgG1b이다. 다른 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 Fc 도메인을 포함하는 고양이 IgG2이다.
- [0062] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 결합 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 결합 도메인은 (i) 면역글로불린 분자의 6개의 상보성 결정 영역(CDR); (ii) 고양이 수용체 단백질의 리간드 결합 도메인, (iii) 나노바디 또는 (iv) 고양이 수용체 단백질의 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 결합 도메인은 NGF, TrKA, ADAMTS, IL-1, IL-2, IL-4, IL-4R, 안지오텐신 유형 1(AT1) 수용체, 안지오텐신 유형 2(AT2) 수용체, IL-5, IL-12, IL-13, IL-31, IL-33, CD3, CD20, CD47, CD52 및 보체 시스템 복합체로 이루어진 군으로부터 선택되는 항원에 특이적으로 결합한다.
- [0063] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 EPO, CTLA4, LFA3, VEGFR1/VEGFR3, IL-1R, IL-4R, GLP-1 수용체 효능제 및 트롬보포이에틴 결합 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질을 추가로 포함한다.
- [0064] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 중성 pH보다 산성 pH에서 더 높은 수준으로 고양이 FcRn에 결합한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 pH 7.4보다 pH 5.5에서 더 높은 수준으로 고양이 FcRn에 결합한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 pH 7.4보다 pH 6.0에서 더 높은 수준으로 고양이 FcRn에 결합한다.
- [0065] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 (1) 대조군 폴리펩타이드 또는 대조군 폴리펩타이드들보다 고양이에서 증가된 반감기를 갖되, 대조군 폴리펩타이드 또는 대조군 폴리펩타이드들은 IgG Fc 영역 변이체 대신 상응하는 야생형 고양이 IgG Fc 영역을 갖는 것을 제외하고는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들과 동일하고; 그리고/또는 (2) 대조군 폴리펩타이드보다 고양이 FcRn에 대해 증가된 결합을 가지며; 아미노산 위치는 EU 넘버링을 기반으로 한다.
- [0066] 일부 양태에서, 본 개시내용은 (i) 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드 및 (ii) 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0067] 일부 양태에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 또는 핵산들을 제공한다.
- [0068] 일부 양태에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 핵산 또는 핵산들을 포함하는 발현 벡터 또는 발현 벡터들을 제공한다.
- [0069] 일부 양태에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 핵산 또는 핵산들 또는 본 명세서에 기재된 발현 벡터 또는 발현 벡터들을 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0070] 일부 양태에서, 본 개시내용은 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들을 제조하는 방법을 제공하며, 해당 방법은 다음을 포함한다:
- [0071] (a) 본 명세서에 기재된 핵산 또는 핵산들을 제공하는 단계;

- [0072] (b) 숙주 세포 배양물에서 핵산 또는 핵산들을 발현시켜 폴리펩타이드를 생산하는 단계; 및
- [0073] (c) 숙주 세포 배양물로부터 (b)에서 생산된 폴리펩타이드를 수집하는 단계.
- [0074] 일부 실시형태에서, 방법은 약제학적 제형으로 폴리펩타이드를 제형화하는 단계를 더 포함한다.
- [0075] 일부 양태에서, 본 개시내용은 유효량의 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물을 포함하는 조성물을 고양이에게 투여하는 단계를 포함하는, 고양이 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 고양이에서 고양이 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0076] 일부 양태에서, 본 개시내용은 유효량의 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물을 포함하는 조성물을 고양이에게 투여하는 단계를 포함하는, 고양이 질환 또는 장애의 예방을 필요로 하는 고양이에서 고양이 질환 또는 장애를 예방하는 방법을 제공한다.
- [0077] 일부 실시형태에서, 질환 또는 장애는 알레르기 질환, 만성 통증, 급성 통증, 염증성 질환, 자가면역 질환, 내분비 질환, 위장관 질환, 심혈관 질환, 신장 질환, 생식 관련 장애, 감염성 질환 또는 암이다.
- [0078] 일부 실시형태에서, 질환 또는 장애는 아토피성 피부염, 알레르기성 피부염, 골관절성 통증, 관절염, 빈혈 또는 비만이다.
- [0079] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 등가인 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 예시적인 방법 및 물질이 하기에 기재된다. 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 참고 문헌은 그 전체가 참조에 의해 원용된다. 상충하는 경우, 정의를 포함하여 본 출원이 우선한다. 물질, 방법 및 예는 예시일 뿐이며, 제한하려는 의도가 아니다.
- [0080] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 하기 상세한 설명 및 청구범위로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0081] **도 1**은 NNK 라이브러리로부터의 S428L, S428M, S428Y, S434F, S434W 및 S434H 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 비아코어(Biacore) 센서그램을 도시한다. 각 도면의 밝은 선은 측정된 데이터를 나타내고, 어두운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선을 나타낸다. Y-축: 공명 단위(Resonance Unit: RU); X-축: 시간(초).
- 도 2**는 NNK 라이브러리로부터의 S252W, S252Y 및 S252F 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 비아코어 센서그램을 도시한다. 또한, 야생형(WT)에 대한 비아코어 센서그램을 도시한다. 각 도면의 밝은 선 측정된 데이터를 나타내고, 어두운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선을 나타낸다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).
- 도 3**은 야생형 고양이 IgG1a Fc 영역(서열번호 1) 및 야생형 고양이 IgG1b Fc 영역(서열번호 2)과 추정상의 야생형 고양이 IgG2 Fc 영역(서열번호 3)의 아미노산 서열의 정렬을 보여준다. 힌지 영역은 삼각형 사이에 있다. 화살표는 2개의 중쇄 사이의 이황화 브리지에 관여할 가능성이 있는 힌지 영역의 시스테인 잔기를 나타낸다 (Strietzel *et al.*, 2014, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 158:214-223).
- 도 4**는 EU 넘버링에 기초한 야생형 고양이 IgG1a Fc(서열번호 1) 및 인간 IgG1 Fc 영역의 아미노산 서열의 정렬을 보여준다. 실시예 2에 기재된 파지 라이브러리의 생성에 사용된 55개의 아미노산 위치는 강조 표시되고 밑줄이 그어져 있다.
- 도 5a** 및 **도 5b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S252Y 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Catterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).
- 도 6a** 및 **도 6b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S252Y+Q311R 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Catterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).
- 도 7a** 및 **도 7b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S252Y+Q311K 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Catterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 8a 및 **도 8b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S252Y+Q311V 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 9a 및 **도 9b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S252Y+Q311L 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 10a 및 **도 10b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S434Y 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 11a 및 **도 11b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S434Y+S254R 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 12a 및 **도 12b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S434Y+S254K 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 13a 및 **도 13b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S434Y+L262E 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 14a 및 **도 14b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S434Y+T286D 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 15a 및 **도 15b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S434Y+T286E 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 16a 및 **도 16b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S434Y+T289K 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 17a 및 **도 17b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S434Y+E293D 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 18a 및 **도 18b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S434Y+E293K 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 19a 및 **도 19b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S434Y+L309V 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 20a 및 **도 20b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S434Y+L309E 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한

Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 21a 및 **도 21b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S434Y+K326D 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 22a 및 **도 22b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S434Y+Q347L 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 23a 및 **도 23b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S434Y+S426L 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 24a 및 **도 24b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S434F 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 25a 및 **도 25b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S434F+E380D 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 26a 및 **도 26b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S428L+T286E 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 27a 및 **도 27b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S428L+Q311V 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 28a 및 **도 28b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S428L+Q311K 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 29a 및 **도 29b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S428L+D312T 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 30a 및 **도 30b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S428L+I377V 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 31a 및 **도 31b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S428L+I383L 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 32a 및 **도 32b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S428L+N389cR 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 33a 및 **도 33b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S428L+E380D+S434R 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 34a 및 **도 34b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S428L+E380T+S434R 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 35a 및 **도 35b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 Q311R 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 36a 및 **도 36b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 R392E 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 37a 및 **도 37b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S252R+L262Q 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 38a 및 **도 38b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S252R+A378E 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 39a 및 **도 39b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 T260E+L309E+Q355L 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 40a 및 **도 40b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 T286E+S428R 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 41a 및 **도 41b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S290V+R334D 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 42a 및 **도 42b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 R301L+E380V+T437L 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 43a 및 **도 43b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S428L 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRN과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 44a 및 **도 44b**는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 S428L+S252R 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한

Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRn과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 45a 및 **도 45b**는 야생형 고양이 IgG1a Fc 변이체(서열번호 1)에 대한 Carterra LSA 센서그램 및 pH 6.0과 pH 7.4에서 고양이 FcRn과의 상호작용을 도시한다. 불규칙한 선은 측정된 데이터를 나타내고, 매끄러운 선은 1:1 상호작용 모델을 사용한 피팅된 곡선이다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 46은 항-NGF 단일클론 항체(monoclonal antibody: mAb) 변이체의 혈청 농도를 설명하는 데 사용되는 비선형 혼합 효과(non-linear mixed effect: NLME) 모델링을 사용하여 선형 소실(linear clearance)이 있는 2-구획 약동학(PK) 모델의 흐름도를 도시한다.

도 47은 야생형(WT) 항체 및 항체 변이체 S252W, S428Y, S428Y+L309V, S428Y+Q311V 및 S428Y+S254R(항체/변이체당 2마리 동물로부터의 결과)의 개별적으로 관찰된 혈청 농도를 도시한다.

도 48은 2 mg/kg 항체/변이체의 단일 IV 용량을 투여받은 전형적인 2kg의 고양이에 대한 야생형(WT) 항체 및 항체 변이체 S252W, S428Y, S428Y+L309V, S428Y+Q311V 및 S428Y+S254R의 예측된 혈청 농도 프로파일을 도시한다.

도 49a 내지 **도 49i**는 야생형 고양이 IgG1a 및 고양이 IgG1a 변이체의 결합을 보여주는 비아코어 센서그램을 도시한다. 각 도면에서 밝은 선은 측정된 데이터를 나타내고, 어두운 선은 피팅된 곡선을 나타낸다. Y-축: 공명 단위(RU); X-축: 시간(초).

도 50은 변이체당 2마리의 동물에 대한 야생형 및 Fc 변이체의 개별적으로 관찰된 혈청 농도를 도시한다.

도 51은 야생형(WT) IgG1a Fc 또는 IgG1a Fc 변이체를 보유하는 단일클론 항체의 예측된 혈청 농도 프로파일을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0082] 매우 다양한 고양이 질환의 예방 및 치료를 위한 치료제로서 폴리펩타이드(예를 들어, 항체, 수용체의 리간드-결합 도메인, 효소, 리간드, 펩타이드)의 사용이 증가함에 따라, 특히 폴리펩타이드가 반복적으로 투여되어야 하는 만성 질환의 예방 또는 치료를 위해 연장된 반감기를 갖는 폴리펩타이드를 개발하는 것이 중요하다.

[0083] 따라서, 본 개시내용은 이들 서열을 포함하는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들의 반감기를 향상시키는 돌연변이를 포함하는 고양이 면역글로불린 Fc 영역 또는 이의 고양이 FcRn-결합 영역을 특징으로 한다. 또한, 이들 도메인을 포함하는 폴리펩타이드 및 이의 사용 방법이 개시된다. 이러한 펩타이드는 다양한 치료 및 진단 목적을 위해 사용될 수 있다.

[0084] 값이 범위의 측면에서 기재되는 경우, 설명은 이러한 범위 내의 가능한 모든 하위 범위뿐만 아니라 특정 수치 또는 특정 하위 범위가 명시적으로 언급되는지 여부에 관계없이 이러한 범위 내에 속하는 특정 수치의 개시를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 범위를 포함하여, 예를 들어, pH, 온도, 시간, 농도 및 분자량의 모든 숫자의 표기는 적절하게는 1.0 또는 0.1의 증분으로 또는 대안적으로 +/- 15%, 또는 대안적으로 10%, 또는 대안적으로 5% 또는 대안적으로 2%의 변화로 (+) 또는 (-)로 변하는 근사치이다. 항상 명시적으로 언급되는 것은 아니지만, 모든 숫자 표기 앞에 "약"이라는 용어가 붙음을 이해하여야 한다. 또한, 항상 명시적으로 언급되는 것은 아니지만, 본 명세서에 기재된 시약은 단지 예시일 뿐이며, 이의 동등물이 당업계에 공지되어 있음을 이해하여야 한다.

[0085] 양 또는 농도 등과 같은 측정 가능한 값을 언급할 때, 본 명세서에서 사용되는 용어 "약"은 명시된 양의 20%, 10%, 5%, 1%, 0.5% 또는 심지어 0.1%의 변화를 포함하는 것을 의미한다.

[0086] **고양이 항체**

[0087] 고양이는 전형적으로 IgG1a, IgG1b 및 IgG2로 지칭되는 3개의 IgG 중쇄를 갖는다. 이러한 중쇄는 고양이 IgG의 3개의 상이한 서브클래스를 나타낸다. 이들 중쇄에 대한 아미노산 및 DNA 서열은 문헌[Strietzel *et al.*, 2014, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 158:214-223] 및 GENBANK 데이터베이스로부터 이용 가능하다. 예를 들어, 고양이 IgG1a 중쇄의 아미노산 서열은 GENBANK 등록 번호 BAA32229.1을 갖고, 고양이 IgG1b 중쇄는 GENBANK 등록 번호 BAA32230.1을 갖고, 고양이 IgG2 중쇄는 GENBANK 등록 번호 KF811175.1을 갖는다. 고양이 항체는 또한 카파 및 람다의 두 가지 유형의 경쇄를 포함한다. 이들 경쇄의 DNA 및 아미노산 서열도 또한 GENBANK 데이터베이스로부터 얻을 수 있다. 예를 들어, 고양이 카파 경쇄 아미노산 서열은 등록 번호 AF198257.1을 갖고, 고양이

람다 경쇄는 등록 번호 E07339.1을 갖는다.

[0088] 고양이 Fc 영역의 CH2 영역:

[0089] 개 항체의 CH2 영역은 고양이 IgG 항체의 231번 내지 340번 아미노산(EU 넘버링에 따름)을 포함하거나 또는 이로 이루어진다. CH2 영역은 N-말단 및/또는 C-말단에 1개 내지 6개(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개)의 추가적인 아미노산 또는 결실을 포함할 수 있음을 이해하여야 한다.

[0090] 고양이 IgG1a의 CH2 영역의 아미노산 서열이 아래에 제공된다:

PPEMLGGPSIFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLGPDDSDVQITWFDNTQ
VYTAKTSPREEQFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPIERTI
SKAK (서열번호 4)

[0091]

[0092] 고양이 IgG1b의 CH2 도메인의 아미노산 서열이 아래에 제공된다:

PPEMLGGPSIFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLGPDDSDVQITWFDNTQ
VYTAKTSPREEQFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPIERTI
SKDK (서열번호 5)

[0093]

[0094] 고양이 IgG2의 CH2 도메인의 아미노산 서열이 아래에 제공된다:

VPEIPGAPSVFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLGPDDSNVQITWFDNTE
MHTAKTRPREEQFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSAMER
TISKAK(서열번호 6)

[0095]

[0096] 고양이 Fc 영역의 CH3 영역

[0097] 개 항체의 CH3 영역은 고양이 IgG 항체의 341번 내지 447번 아미노산(EU 넘버링에 따름)을 포함하거나 또는 이로 이루어진다. CH3 영역은 N-말단 및/또는 C-말단에 1개 내지 6개(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개) 추가적인 아미노산 또는 결실을 포함할 수 있음을 이해하여야 한다.

[0098] 고양이 IgG1a의 CH3 도메인의 아미노산 서열이 아래에 제공된다:

GQPHEPQVYVLPQAQEELSRNKVSVTCLIKSFHPPDIAVEWEITGQPEPENNY
RTTPPQLDSDGTYFVYSKLSVDRSHWQRGNTYTCSVSHEALHSHHTQKSLT
QSPGK (서열번호 7)

[0099]

[0100] 고양이 IgG1b의 CH3 도메인의 아미노산 서열이 아래에 제공된다:

GQPHEPQVYVLPQAQEELSRNKVSVTCLIEGFYPSDIAVEWEITGQPEPENN
YRTTPPQLDSDGTYFLYSRLSVDRSRWQRGNTYTCSVSHEALHSHHTQKSL
TQSPGK (서열번호 8)

[0101]

[0102] 고양이 IgG2의 CH3 도메인의 아미노산 서열이 아래에 제공된다:

GQPHEPQVYVLPPTQEELSENKSVSVTCLIKGFHPPDIAVEWEITGQPEPENNY
QTTPPQLDSDGTYFLYSRLSVDRSHWQRGNTYTCSVSHEALHSHHTQKSLT
QSPGK (서열번호 9)

[0103]

[0104] 고양이 Fc 영역의 Fc 영역:

[0105] 고양이 IgG 항체의 Fc 영역은 고양이 IgG 항체의 231번 내지 447번 아미노산(EU 넘버링에 따름)을 포함하거나 또는 이로 이루어진다.

[0106] 고양이 IgG1a의 Fc 도메인의 아미노산 서열이 아래에 제공된다:

PP EMLGGPSIFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLGPDDSDVQITWFVDNTQ
VYTAKTSPREEQFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPIERTI
SKAKGQPHEPQVYVLPPEAQEELSRNKVSVTCLIKSFHPPDIAVEWEITGQPEP
ENNYRTTPPQLDSDGTYFVYSKLSVDRSHWQRGNTYTCSVSHEALHSHHT
QKSLTQSPGK

[0107] (서열번호 1)

[0108] 고양이 IgG1b의 Fc 도메인의 아미노산 서열이 아래에 제공된다:

PP EMLGGPSIFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLGPDDSDVQITWFVDNTQ
VYTAKTSPREEQFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPIERTI
SKDKGQPHEPQVYVLPPEAQEELSRNKVSVTCLIEGFYPSDIAVEWEITGQPEP
ENNYRTTPPQLDSDGTYFLYSRLSVDRSRWQRGNTYTCSVSHEALHSHHTQ
KSLTQSPGK

[0109] (서열번호 2)

[0110] 고양이 IgG2의 Fc 도메인의 아미노산 서열이 아래에 제공된다:

VPEIPGAPSVFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLGPDDSNVQITWFVDNTE
MHTAKTRPREEQFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSAMER
TISKAKGQPHEPQVYVLPPTQEELSENKSVTCLIKGFHPPDIAVEWEITGQP
EPENNYQTTPPQLDSDGTYFLYSRLSVDRSHWQRGNTYTCSVSHEALHSHH
TQKSLTQSPGK (서열번호 3)

[0111]

[0112] 아래 표 1은 EU 넘버링에 기초하여 인간 IgG1, 고양이 IgG1a, 고양이 IgG1b 및 고양이 IgG2의 CH2 및 CH3 도메인의 아미노산 서열을 비교한다:

표 1

EU 번호	CH2 도메인			
	인간 IgG1	고양이 IgG1a	고양이 IgG1b	고양이 IgG2
231	A	P	P	V
232	P	P	P	P
233	E	E	E	E
234	L	M	M	I
235	L	L	L	P
236	G	G	G	G
237	G	G	G	A
238	P	P	P	P
239	S	S	S	S
240	V	I	I	V
241	F	F	F	F
242	L	I	I	I
243	F	F	F	F
244	P	P	P	P
245	P	P	P	P
246	K	K	K	K
247	P	P	P	P
248	K	K	K	K
249	D	D	D	D
250	T	T	T	T
251	L	L	L	L
252	M	S	S	S
253	I	I	I	I
254	S	S	S	S
255	R	R	R	R
256	T	T	T	T
257	P	P	P	P
258	E	E	E	E
259	V	V	V	V
260	T	T	T	T

[0113]

261	C	C	C	C
262	V	L	L	L
263	V	V	V	V
264	V	V	V	V
265	D	D	D	D
266	V	L	L	L
267	S	G	G	G
268	H	P	P	P
269	E	D	D	D
270	D	D	D	D
271	P	S	S	S
272	E	D	D	N
273	V	V	V	V
274	K	Q	Q	Q
275	F	I	I	I
276	N	T	T	T
277	W	W	W	W
278	Y	F	F	F
279	V	V	V	V
280	D	D	D	D
281	G	N	N	N
282	V	T	T	T
283	E	Q	Q	E
284	V	V	V	M
285	H	Y	Y	H
286	N	T	T	T
287	A	A	A	A
288	K	K	K	K
289	T	T	T	T
290	K	S	S	R
291	P	P	P	P
292	R	R	R	R
293	E	E	E	E
294	E	E	E	E
295	Q	Q	Q	Q

[0114]

296	Y	F	F	F
297	N	N	N	N
298	S	S	S	S
299	T	T	T	T
300	Y	Y	Y	Y
301	R	R	R	R
302	V	V	V	V
303	V	V	V	V
304	S	S	S	S
305	V	V	V	V
306	L	L	L	L
307	T	P	P	P
308	V	I	I	I
309	L	L	L	L
310	H	H	H	H
311	Q	Q	Q	Q
312	D	D	D	D
313	W	W	W	W
314	L	L	L	L
315	N	K	K	K
316	G	G	G	G
317	K	K	K	K
318	E	E	E	E
319	Y	F	F	F
320	K	K	K	K
321	C	C	C	C
322	K	K	K	K
323	V	V	V	V
324	S	N	N	N
325	N	S	S	S
326	K	K	K	K
327	A	S	S	S
328	L	L	L	L
329	P	P	P	P
330	A	S	S	S

[0115]

331	P	P	P	A
332	I	I	I	M
333	E	E	E	E
334	K	R	R	R
335	T	T	T	T
336	I	I	I	I
337	S	S	S	S
338	K	K	K	K
339	A	A	D	A
340	K	K	K	K

EU 번호	CH3 도메인			
	인간 IgG1	고양이 IgG1a	고양이 IgG1b	고양이 IgG2
341	G	G	G	G
342	Q	Q	Q	Q
343	P	P	P	P
344	R	H	H	H
345	E	E	E	E
346	P	P	P	P
347	Q	Q	Q	Q
348	V	V	V	V
349	Y	Y	Y	Y
350	T	V	V	V
351	L	L	L	L
352	P	P	P	P
353	P	P	P	P
354	S	A	A	T
355	R	Q	Q	Q
356	D	E	E	E
357	E	E	E	E
358	L	L	L	L
359	T	S	S	S
360	K	R	R	E
361	N	N	N	N

[0116]

362	Q	K	K	K
363	V	V	V	V
364	S	S	S	S
365	L	V	V	V
366	T	T	T	T
367	C	C	C	C
368	L	L	L	L
369	V	I	I	I
370	K	K	E	K
371	G	S	G	G
372	F	F	F	F
373	Y	H	Y	H
374	P	P	P	P
375	S	P	S	P
376	D	D	D	D
377	I	I	I	I
378	A	A	A	A
379	V	V	V	V
380	E	E	E	E
381	W	W	W	W
382	E	E	E	E
383	S	I	I	I
384	N	T	T	T
385	G	G	G	G
386	Q	Q	Q	Q
387	P	P	P	P
388	E	E	E	E
389a	N	P	P	P
389b		E	E	E
389c		N	N	N
390	N	N	N	N
391	Y	Y	Y	Y
392	K	R	R	Q
393	T	T	T	T
394	T	T	T	T

[0117]

395	P	P	P	P
396	P	P	P	P
397	V	Q	Q	Q
398	L	L	L	L
399	D	D	D	D
400	S	S	S	S
401	D	D	D	D
402	G	G	G	G
403	S	T	T	T
404	F	Y	Y	Y
405	F	F	F	F
406	L	V	L	L
407	Y	Y	Y	Y
408	S	S	S	S
409	K	K	R	R
410	L	L	L	L
411	T	S	S	S
412	V	V	V	V
413	D	D	D	D
414	K	R	R	R
415	S	S	S	S
416	R	H	R	H
417	W	W	W	W
418	Q	Q	Q	Q
419	Q	R	R	R
420	G	G	G	G
421	N	N	N	N
422	V	T	T	T
423	F	Y	Y	Y
424	S	T	T	T
425	C	C	C	C
426	S	S	S	S
427	V	V	V	V
428	M	S	S	S
429	H	H	H	H

[0118]

430	E	E	E	E
431	A	A	A	A
432	L	L	L	L
433	H	H	H	H
434	N	S	S	S
435	H	H	H	H
436	Y	H	H	H
437	T	T	T	T
438	Q	Q	Q	Q
439	K	K	K	K
440	S	S	S	S
441	L	L	L	L
442	S	T	T	T
443	L	Q	Q	Q
444	S	S	S	S
445	P	P	P	P
446	G	G	G	G
447	K	K	K	K

[0119]

[0120]

반감기를 개선시키는 고양이 IgG Fc의 치환

[0121]

증가된 혈청 지속성은 치료적 폴리펩타이드에 대한 유익한 특성이다. 본 개시내용은 대조군 폴리펩타이드 또는 대조군 폴리펩타이드들에 비해 고양이에서 이러한 Fc 영역을 포함하는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들의 반감기를 향상시키는 야생형 고양이 IgG1a, IgG1b 및 IgG2 Fc 영역에서의 치환을 특징으로 하되, 대조군 폴리펩타이드 또는 대조군 폴리펩타이드들은 IgG Fc 영역 변이체 대신 상응하는 야생형 고양이 IgG Fc 영역을 갖는 것을 제외하고는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들과 동일하다. 반감기를 증가시키기 위한 치환은 고양이 CH2 영역, 고양이 CH3 영역 중 하나 이상에서 또는 고양이 Fc(예를 들어, CH2+CH3) 영역과 관련하여 이루어질 수 있다.

[0122]

본 개시내용은 고양이 IgG의 Fc 영역 변이체 또는 이의 고양이 FcRn-결합 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 제공 하되, 폴리펩타이드는

[0123]

(i) 야생형 고양이 IgG의 252번 아미노산 위치에 상응하는 위치, 여기서 아미노산 치환은 S252W임;

[0124]

(ii) 야생형 고양이 IgG의 254번 아미노산 위치에 상응하는 위치, 여기서 아미노산 치환은 S254R 및 S254K로 이루어진 군으로부터 선택됨;

[0125]

(iii) 야생형 고양이 IgG의 309번 아미노산 위치에 상응하는 위치, 여기서 아미노산 치환은 L309V 또는 L309Y임;

[0126]

(iv) 야생형 고양이 IgG의 311번 아미노산 위치에 상응하는 위치, 여기서 아미노산 치환은 Q311R, Q311V, Q311L 및 Q311K로 이루어진 군으로부터 선택됨;

[0127]

(v) 야생형 고양이 IgG의 428번 아미노산 위치에 상응하는 위치, 여기서 아미노산 치환은 S428M, S428Y, S428H 및 S428R로 이루어진 군으로부터 선택됨; 및

[0128]

(vi) 야생형 고양이 IgG의 262번, 286번, 289번, 290번, 293번, 301번, 312번, 326번, 334번, 347번, 355번, 377번, 380번, 383번, 389c번, 392번, 426번 및 437번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 위치에 상응하는 하나 이상의 위치;

[0129]

로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 위치에 아미노산 치환을 포함하고, 아미노산 위치는 EU 넘버링에 기초하며, 폴리펩타이드는 야생형 고양이 IgG의 Fc 도메인과 비교할 때 고양이 FcRn에 대해 증가된 결합 친화도를 갖는다.

[0130]

일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 야생형 고양이 IgG의 Fc 도메인과 비교할 때 약 5.0 내지 약 6.5(예를 들어, 약 5.5 또는 약 6.0)의 pH에서 고양이 FcRn에 대해 증가된 결합 친화도를 갖는다.

[0131]

일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 야생형 고양이 IgG의 252번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치

환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG의 252번 아미노산 위치에 있는 아미노산 치환은 S252W이다.

- [0132] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 야생형 고양이 IgG의 254번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG의 254번 위치에 있는 아미노산 치환은 S254R이다. 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG의 254번 위치에 있는 아미노산 치환은 S254K이다.
- [0133] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 아미노산 치환 L309V 또는 L309Y를 포함한다.
- [0134] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 야생형 고양이 IgG의 311번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG의 311번 위치에 있는 아미노산 치환은 Q311R이다. 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG의 311번 위치에 있는 아미노산 치환은 Q311V이다. 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG의 311번 위치에 있는 아미노산 치환은 Q311K이다. 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG의 311번 위치에 있는 아미노산 치환은 Q311L이다.
- [0135] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 야생형 고양이 IgG의 428번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG의 428번 위치에 있는 아미노산 치환은 S428M이다.
- [0136] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 적어도 아미노산 치환 S428Y를 포함한다. 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG의 428번 위치에 있는 아미노산 치환은 S428Y이다. 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG의 428번 위치에 있는 아미노산 치환은 S428R이다. 일부 실시형태에서, 야생형 고양이 IgG의 428번 위치에 있는 아미노산 치환은 S428H이다.
- [0137] 또 다른 실시형태에서, 폴리펩타이드는 야생형 고양이 IgG의 262번, 286번, 289번, 290번, 293번, 301번, 312번, 326번, 334번, 347번, 355번, 377번, 380번, 383번, 389c번, 392번, 426번 및 437번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 위치에 상응하는 하나 이상의 위치에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 아미노산 치환은 L262Q, L262E, T286E, T286D, T289K, S290V, S290Y, E293D, E293H, E293K, R301L, D312T, K326D, R334D, Q347L, Q355L, I377V, I377Y, E380D, E380V, E380T, I383L, N389c-R, R392E, S426L, S426H 및 T437L 및 임의의 전술한 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 아미노산 치환은 L262Q, L262E, T286E, T286D, T289K, S290V, S290Y, E293D, E293H, E293K, R301L, D312T, K326D, R334D, Q347L, Q355L, I377V, I377Y, E380D, E380V, E380T, I383L, N389c-R, R392E, S426L, S426H 및 T437L로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0138] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 고양이 IgG Fc 영역 변이체 또는 이의 고양이 FcRn-결합 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 제공하되, 폴리펩타이드는 2개 이상의 아미노산 치환을 포함하고, 2개 이상의 아미노산 치환은,
- [0139] (i) 야생형 고양이 IgG의 252번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 있는 아미노산 치환, 여기서 아미노산 치환은 S252W, S252Y, S252F 및 S252R로 이루어진 군으로부터 선택됨;
- [0140] (ii) 야생형 고양이 IgG의 254번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 있는 아미노산 치환, 여기서 아미노산 치환은 S254R 및 S254K로 이루어진 군으로부터 선택됨;
- [0141] (iii) 야생형 고양이 IgG의 309번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 있는 아미노산 치환, 여기서 아미노산 치환은 L309V, L309Y 및 L309E로 이루어진 군으로부터 선택됨;
- [0142] (iv) 야생형 고양이 IgG의 311번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 있는 아미노산 치환, 여기서 아미노산 치환은 Q311R, Q311V, Q311L 및 Q311K로 이루어진 군으로부터 선택됨;
- [0143] (v) 야생형 고양이 IgG의 428번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 있는 아미노산 치환, 여기서 아미노산 치환은 S428L, S428M, S428Y, S428H 및 S428R로 이루어진 군으로부터 선택됨;
- [0144] (vi) 야생형 고양이 IgG의 262번, 286번, 289번, 290번, 293번, 301번, 312번, 326번, 334번, 347번, 355번, 377번, 380번, 383번, 389c번, 392번, 426번 및 437번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 위치에 상응하는 하나 이상의 위치에 있는 아미노산 치환; 및
- [0145] (vii) 야생형 고양이 IgG의 434번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 있는 아미노산 치환, 여기서 아미노산 치환은 S434F, S434W, S434H, S434R 및 S434Y로 이루어진 군으로부터 선택됨;
- [0146] 으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 아미노산 위치는 EU 넘버링에 기초하고, 2개 이상의 아미노산 치환은 상이

한 위치에 있으며, 폴리펩타이드는 (a) 야생형 고양이 IgG의 Fc 도메인 및 (b) 2개 이상의 아미노산 치환 중 하나만을 포함하는 폴리펩타이드와 비교할 때 고양이 FcRn에 대해 증가된 결합 친화도를 갖는다.

- [0147] 일부 실시형태에서, 2개 이상의 아미노산 치환은 야생형 고양이 IgG의 286번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함하되, 아미노산 치환은 T286E 및 T286D로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0148] 일부 실시형태에서, 2개 이상의 아미노산 치환은 야생형 고양이 IgG의 289번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함하되, 아미노산 치환은 T289K 및 T289H로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0149] 일부 실시형태에서, 2개 이상의 아미노산 치환은 야생형 고양이 IgG의 301번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함하되, 아미노산 치환은 R301L이다.
- [0150] 일부 실시형태에서, 2개 이상의 아미노산 치환은 야생형 고양이 IgG의 334번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함하되, 아미노산 치환은 R334D이다.
- [0151] 일부 실시형태에서, 2개 이상의 아미노산 치환은 야생형 고양이 IgG의 426번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함하되, 아미노산 치환은 S426L 및 S426H로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0152] 일부 실시형태에서, 2개 이상의 아미노산 치환은 야생형 고양이 IgG의 437번 아미노산 위치에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함하되, 아미노산 치환은 T437L이다.
- [0153] 일부 실시형태에서, 2개 이상의 아미노산 치환은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:
- [0154] (i) Q311R 및/또는 Q311L과 조합된 S252Y;
- [0155] (ii) S254R, S254K, L262E, T286D, T286E, T289K, E293D, E293K, L309V, L309E, K326D 및 Q347L 중 하나 이상과 조합된 S434Y;
- [0156] (iii) S434F 및 E380D;
- [0157] (iv) S252R, T286E, Q311V, Q311K, D312T, I377V, I383L, N389cR 중 하나 이상과 조합된 S428L;
- [0158] (v) S428L, E380D 및 S434R;
- [0159] (vi) S428L, E380T 및 S434R;
- [0160] (vii) L262Q와 조합된 S252R;
- [0161] (viii) T260E, L309E 및 Q355L;
- [0162] (ix) S290V 및 R344D; 및
- [0163] (x) R301L, E380V 및 T437L.
- [0164] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 서열번호 1 내지 3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0165] 일부 경우에, 본 개시내용은 서열번호 4 내지 6 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 고양이 IgG CH2 영역 변이체를 제공한다. 또한, 서열번호 4 내지 6 중 어느 하나로부터 1개 내지 15개(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개 또는 15개)만큼의 아미노산이 다른 아미노산 서열을 포함하는 고양이 IgG CH2 영역 변이체가 제공된다.
- [0166] 다른 경우에, 본 개시내용은 서열번호 7 내지 9 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97% 또는 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 고양이 IgG CH3 영역 변이체를 특징으로 한다. 또한, 서열번호 7 내지 9 중 어느 하나로부터 1개 내지 15개(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개 또는 15개)만큼의 아미노산이 다른 아미노산 서열을 포함하는 고양이 IgG CH3 영역 변이체를 특징으로 한다.
- [0167] 소정의 경우에, 본 개시내용은 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미

노산 서열을 포함하는 고양이 IgG Fc 영역 변이체를 특징으로 한다. 또한, 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나로부터 1개 내지 20개(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개 또는 20개)만큼의 아미노산이 다른 아미노산 서열을 포함하는 고양이 IgG Fc 영역 변이체가 개시된다.

- [0168] 일부 실시형태에서, 고양이 IgG Fc CH2 영역 변이체를 포함하는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들이 제공되며, CH2 영역 변이체는 서열번호 4 내지 6 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0169] 일부 실시형태에서, 고양이 IgG Fc CH3 영역 변이체를 포함하는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들을 특징으로 하되, CH3 영역 변이체는 서열번호 7 내지 9 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0170] 일부 실시형태에서, 고양이 IgG Fc 영역 변이체를 포함하는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들을 특징으로 하되, Fc 영역 변이체는 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0171] 다른 곳에서 언급한 바와 같이, 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 야생형 고양이 IgG의 250번 내지 256번 아미노산 위치, 285번 내지 288번 아미노산 위치; 307번 내지 315번 아미노산 위치; 376번 내지 380번 아미노산 위치; 383번 내지 392번 아미노산 위치; 또는 428번 내지 437번 아미노산 위치에 상응하는 영역에 적어도 하나의 추가적인 아미노산 치환을 추가로 포함하되, 아미노산 위치는 EU 넘버링에 기초하고, 폴리펩타이드는 야생형 고양이 IgG의 Fc 도메인과 비교하여 고양이 FcRn에 대한 증가된 결합을 갖는다.
- [0172] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 아래 표 2에 개시된 것들로부터 선택된 적어도 1개 이상(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개 또는 20개)의 추가적인 아미노산 치환을 포함한다.

표 2

고양이 FcRN 에 대한 고양이 IgG1a Fc 변이체의 결합을 증가시키는 아미노산 치환
(그룹 1 및 그룹 2)의 목록.

EU 넘버링에 의한 위치	야생형 고양이 IgG1a Fc	고양이 IgG1a Fc 변이체 아미노산 치환 (그룹 1)	대안적인 고양이 IgG1a Fc 변이체 아미노산 치환 (그룹 2)
252	S	W	FYMRV
254	S	RK	WYHLFVM
262	L	QE	
286	T	ED	
289	T	K	
290	S	VY	
293	E	DKH	
301	R	L	
309	L	VY	E
311	Q	RVKL	AYF
312	D	T	
326	K	D	
334	R	D	
347	Q	L	
355	Q	L	
377	I	VY	
380	E	DVT	
383	I	L	
389c	N	R	
392	R	E	
426	S	LH	
428	S	RMVH	WL
434	S	RYFWH	A
437	T	L	

[0173]

[0174]

아미노산 치환은 CH2 도메인, CH3 도메인 또는 Fc 도메인의 사슬 중 하나 또는 둘 모두에서 이루어질 수 있다. 일부 경우에, CH2 도메인, CH3 도메인 또는 Fc 도메인의 두 사슬 모두에서 치환은 동일하다. 일부 경우에, CH2 도메인, CH3 도메인 또는 Fc 도메인의 두 사슬 모두에서 치환은 동일하지 않다. 일부 경우에, Fc 영역은 효과기 기능을 증가 또는 감소시키고/시킴거나 제품 이질성을 개선시키는 하나 이상의 추가적인 치환을 포함한다.

[0175]

반감기를 향상시키는 치환과 조합될 수 있는 다른 치환

[0176]

치료적 폴리펩타이드/단백질(예를 들어, 단일클론 항체)의 개발은 목적하는 폴리펩타이드/단백질을 생성하기 위한 복잡한 활성 환경의 조정을 수반하는 복잡한 과정이다. 이는 특이도, 친화도, 기능적 활성, 조작된 세포주에서의 발현 수준, 장기 안정성, 효과기 기능의 제거 또는 향상 및 상업적으로 실행 가능한 제조 및 정제 방법의 개발의 최적화를 포함한다. 본 개시내용은 위의 목적 중 임의의 하나 이상을 용이하게 하는 임의의 추가적인 치환을 포함한다.

[0177]

일부 실시형태에서, 치환은 고양이 Fc 영역의 효과기 기능을 감소시키기 위해 도입된다. 이러한 치환은 당업자에게 친숙할 것이며, 고양이 IgG의 1개 이상(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개)의 위치에 있을 수 있다. 예시적인 예는 WO 2019/035010 A1을 포함한다.

[0178]

일부 실시형태에서, 치환은 단백질 A 크로마토그래피에 의한 정제를 용이하게 하기 위해 단백질 A에 대한 결합을 향상시키기 위해 야생형 고양이 IgG Fc 영역에 도입된다. 이러한 치환은 당업자에게 친숙할 것이며, 고양이 IgG의 1개 이상(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개)의 위치에 있을 수 있다. 예시적인 예는 WO

2019/035010 A1을 포함한다.

- [0179] 일부 실시형태에서, 추가적인 아미노산 치환은 모 폴리펩타이드 또는 야생형 폴리펩타이드와 비교하여 FcRn에 대한 결합 친화도를 변경시키기 위해(예를 들어, FcRn과의 결합 친화도를 증가 또는 감소시키기 위해) 이루어진다.
- [0180] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 고양이 항체의 힌지 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 변형은 반감기를 증가시키기 위해 고양이 항체의 힌지 영역에 대해 이루어질 수 있다.
- [0181] **고양이 IgG Fc 변이체를 포함하는 폴리펩타이드**
- [0182] 본 개시내용은 고양이에서 증가된 반감기를 갖는 것으로부터 이익을 얻을 수 있는 임의의 폴리펩타이드를 포함한다. 반감기를 증가시키기 위해, 이러한 폴리펩타이드는 위에 개시된 Fc 영역 변이체(예를 들어, CH2 영역, CH3 영역, CH2+CH3 영역)를 포함하도록 설계된다.
- [0183] 예시적인 폴리펩타이드는 전체 항체, scFv, 나노바디, 수용체의 리간드-결합 부분, 사이토카인, 성장 인자, 효소 및 펩타이드를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 예를 들어, 위에 개시된 CH3 도메인 변이체는 scFv 나노바디, 수용체의 리간드-결합 부분(예를 들어, 고양이 IL-13R α1 또는 IL-13R α2의 리간드-결합 부분), 사이토카인, 성장 인자, 효소 또는 펩타이드에 부착될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "나노바디", "VHH", "VHH 항체 단편" 및 "단일 도메인 항체"는 전형적으로 자연에서 발견되는 경쇄가 결합되어 있는 낙타과에서 발견되는 유형의 항체의 단일 중쇄의 가변 도메인을 나타내기 위해 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 적합한 나노바디는 당업자에게 친숙할 것이며, 이의 예시적인 예는 낙타, 단봉 낙타, 라마 및 알파카의 나노바디를 포함한다. 대안적으로, 위에 개시된 Fc 영역 변이체는 이러한 폴리펩타이드에 부착될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 고양이 또는 고양이화된 항체는 본 명세서에 개시된 Fc 영역 변이체를 포함하도록 변형된다.
- [0184] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 폴리펩타이드는 항체 힌지 영역을 포함한다. 힌지 영역은 폴리펩타이드의 항원 또는 리간드-결합 도메인과 Fc 영역 변이체 사이에 위치할 수 있다. 일부 경우에, 힌지 영역은 사이토카인, 성장 인자, 효소 또는 펩타이드의 C-말단에 부착되고, 힌지 영역은 Fc 영역 변이체의 N-말단에 부착된다. 예시적인 힌지 영역 서열은 아래에 제공된다.
- [0185] IgG1a: KTDHPPGPKPCDCPKCP(서열번호 10);
- [0186] IgG1b: KTDHPPGPKPCDCPKCP(서열번호 11);
- [0187] IgG2: KTAISTESKTGEGPKCP(서열번호 12);
- [0188] 사용되는 경우, 본 개시내용의 재조합 단백질에서 힌지 영역은 서열번호 10 내지 12 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열에 대해 0개 내지 6개(즉, 0개, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개)의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 본 개시내용의 재조합 단백질에 사용되는 힌지 영역은 서열번호 10 내지 12 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일하다.
- [0189] 본 개시내용의 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들은 결합 도메인을 포함할 수 있다. 결합 도메인은 본 명세서에 기재된 선택된 표적의 단백질, 서브유닛, 도메인, 모티프 및/또는 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들(예를 들어, 융합 폴리펩타이드)은 단백질을 포함할 수 있되, 단백질은 본 명세서에 기재된 치료적 단백질이다. 일부 실시형태에서, 표적(예를 들어, 결합 도메인의 표적에 대한) 또는 치료적 단백질(예를 들어, 융합 폴리펩타이드에 대한)은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다: 17-IA, 4-1BB, 4Dc, 6-케토-PGF1α, 8-아이소-PGF2α, 8-옥소-dG, A1 아데노신 수용체, A33, ACE, ACE-2, 액티빈, 액티빈 A, 액티빈 AB, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 RIA, 액티빈 RIA ALK-2, 액티빈 RIB ALK-4, 액티빈 RIIA, 액티빈 RIIB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAMS, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, 어드레신, aFGF, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, 알파-1-항트립신처리, 알파-V/베타-1 길항제, ANG, Ang, APAF-1, APE, APJ, APP, APRIL, AR, IgE, 안지오텐신 유형 1(AT1) 수용체, 안지오텐신 유형 2(AT2) 수용체, ARC, ART, 아르테민, 항-Id, ASPARTIC, 심방 나트륨이뇨인자, av/b3 인테그린, Ax1, b2M, B7-1, B7-2, B7-H, B-림프구 자극제(BlyS), BACE, BACE-1, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bcl, BCMA, BDNF, b-ECGF, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, BMP, BMP-2 BMP-2a, BMP-3 오스테오게닌, BMP-4 BMP-2b, BMP-5, BMP-6 Vgr-1, BMP-7(OP-1), BMP-8(BMP-8a, OP-2), BMPR, BMPR-IA(ALK-3), BMPR-IB(ALK-6), BRK-2, RPK-1, BMPR-II(BRK-3), BMP, b-NGF, BOK, 봄베신, 뼈 유래 신경영양 인자, BPDE, BPDE-DNA, BTC, 보체 인자 3(C3),

C3a, C4, C5, C5a, C10, CA125, CAD-8, 칼시토닌, cAMP, 암배아 항원(CEA), 암종-관련 항원, 카텡신 A, 카텡신 B, 카텡신 C/DDP1, 카텡신 D, 카텡신 E, 카텡신 H, 카텡신 L, 카텡신 O, 카텡신 S, 카텡신 V, 카텡신 X/Z/P, CBL, CC1, CCK2, CCL, CCL1, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCR, CCR1, CCR10, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27L, CD28, CD29, CD30, CD30L, CD32, CD33(p67 단백질), CD34, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD47, CD49a, CD52, CD54, CD55, CD56, CD61, CD64, CD66e, CD74, CD80(B7-1), CD89, CD95, CD123, CD137, CD138, CD140a, CD146, CD147, CD148, CD152, CD164, CEACAM5, CFTR, cGMP, CINC, 클로스트리디움 보툴리눔 독소, 클로스트리디움 퍼프린겐스 독소, Ckb8-1, CLC, CMV, CMV UL, CNTF, CNTN-1, COX, C-Ret, CRG-2, CT-1, CTACK, CTGF, CTLA-4, CX3CL1, CX3CR1, CXCL, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, 사이토케라틴 종양-관련 항원, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, 붕괴 촉진 인자, des(1-3)-IGF-I(너 IGF-1), Dhh, 디곡신, DNAM-1, Dnase, Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR(ErbB-1), EMA, EMMPRIN, ENA, 엔도텔린 수용체, 엔케팔리네이스, eNOS, Eot, 에오타신1, EpCAM, 에프린 B2/EphB4, EPO, ERCC, E-셀렉틴, ET-1, 인자 IIa, 인자 VII, 인자 VIIc, 인자 IX, 섬유아세포 활성화 단백질(FAP), Fas, FcR1, FEN-1, 페리틴, FGF, FGF-19, FGF-2, FGF3, FGF-8, FGFR, FGFR-3, 피브린, FL, FLIP, F1t-3, F1t-4, 여포 자극 호르몬, 프랙탈카인, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, G250, Gas 6, GCP-2, GCSF, GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-3(Vgr-2), GDF-5(BMP-14, CDMP-1), GDF-6(BMP-13, CDMP-2), GDF-7(BMP-12, CDMP-3), GDF-8(미오스타틴), GDF-9, GDF-15(MIC-1), GDNF, GDNF, GFAP, GFRa-1, GFR-알파1, GFR-알파2, GFR-알파3, GTR, GLP1, GLP2, 글루카곤, Glut 4, 당단백질 IIb/IIIa(GP IIb/IIIa), GM-CSF, gp130, gp72, GRO, GnRH, 성장 호르몬 방출 인자, 합텐(NP-캡 또는 NIP-캡), HB-EGF, HCC, HCMV gB 외피 당단백질, HCMV) gH 외피 당단백질, HCMV UL, 조혈 성장 인자(HGF), Hep B gp120, 헤파라네이스, Her2, Her2/neu(ErbB-2), Her3(ErbB-3), Her4(ErbB-4), 단순 헤르페스 바이러스(HSV) gB 당단백질, HSV gD 당단백질, HGFA, 고분자량 흑색종-관련 항원(HMW-MAA), HIV gp120, HIV IIIB gp120 V3 루프, HLA, HLA-DR, HM1.24, HMPG PEM, HRG, Hrk, 심장의 마이오신, 사이토메갈로바이러스(CMV), 성장 호르몬(GH), HVEM, 1-309, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-3, ICE, ICOS, IFNg, Ig, IgA 수용체, IgE, IGF, IGF 결합 단백질, IGF-1R, IGFBP, IGF-I, IGF-II, IL, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-5R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-18R, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, 인터류킨 수용체 (예를 들어, IL-1R, IL-2R, IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-8R, IL-9R, IL-10R, IL-12R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-21R, IL-22R, IL-23R, IL-25R, IL-31R, IL-33R), 인터페론(INF)-알파, INF-베타, INF-감마, 인히빈, iNOS, 인슐린 A-사슬, 인슐린 B-사슬, 인슐린-유사 성장 인자 1, 인테그린 알파2, 인테그린 알파3, 인테그린 알파4, 인테그린 알파4/베타1, 인테그린 알파4/베타7, 인테그린 알파5(알파V), 인테그린 알파5/베타1, 인테그린 알파5/베타3, 인테그린 알파6, 인테그린 베타1, 인테그린 베타2, 인터페론 감마, IP-10, I-TAC, JE, 칼리크레인 2, 칼리크레인 5, 칼리크레인 6, 칼리크레인 11, 칼리크레인 12, 칼리크레인 14, 칼리크레인 15, 칼리크레인 L1, 칼리크레인 L2, 칼리크레인 L3, 칼리크레인 L4, KC, KDR, 케라틴세포 성장 인자(KGF), 라미닌 5, LAMP, LAP, LAP(TGF-1), 잠복성 TGF-1, 잠복성 TGF-1 bp1, LBP, LDGF, LECT2, 좌선성 루이스-Y 항원, 루이스-Y 관련 항원, LFA-1, LFA-3, Lfo, LIF, LIGHT, 지방단백질, LIX, LKN, Lptn, L-셀렉틴, LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, 폐 계면활성제, 황체형성 호르몬, 림프독소 베타 수용체, Mac-1, MAdCAM, MAG, MAP2, MARC, MCAM, MCAM, MCK-2, MCP, M-CSF, MDC, Mer, 금속LOPROTEASES, MGDF 수용체, MGMT, MHC(HLA-DR), MIF, MIG, MIP, MIP-1-알파, MK, MMAC1, MMP, MMP-1, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-2, MMP-24, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MPIF, Mpo, MSK, MSP, 뮤신(Muc1), MUC18, 필러관-인히비틴 물질, Mug, MuSK, NAIP, NAP, NAV 1.7, NCAD, N-카드헤린, NCA 90, NCAM, NCAM, 네프릴리신, 뉴로트로핀-3, -4 또는 -6, 뉴투린, 신경 성장 인자(NGF), NGFR, NGF-베타, nNOS, NO, NOS, Npn, NRG-3, NT, NTN, OB, OGG1, OPG, OPN, OSM, OX40L, OX40R, p150, p95, PADPr, 부갑상선 호르몬, PARC, PARP, PBR, PBSF, PCAD, P-카드헤린, PCNA, PD1, PDL1, PDGF, PDGF, PDK-1, PECAM, PEM, PF4, PGE, PGF, PG12, PGJ2, PIN, PLA2, 태반 알칼리 포스파테이스(PLAP), P1GF, PLP, PP14, 프로인슐린, 프로렐락신, 단백질 C, PS, PSA, PSCA, 전립선 특이적 막 항원(PSMA), PTEN, PTHrp, Ptk, PTN, R51, RANK, RANKL, RANTES, RANTES, 렐락신 A-사슬, 렐락신 B-사슬, 레닌, 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) F, RSV Fgp, Ret, 류마티스성 인자, RLIP76, RPA2, RSK, S100, SCF/KL, SDF-1, 세린, 혈청 알부민, sFRP-3, Shh, SIGIRR, SK-1, SLAM, SLPI, SMAC, SMDF, SMOH, SOD, SPARC, Stat, STEAP, STEAP-II, TACE, TACI, TAG-72(종양-관련 당단백질-72), TARC, TCA-3, T-세포 수용체(예를 들어, T-세포 수용체 알파/베타),

TdT, TECK, TEM1, TEM5, TEM7, TEM8, TERT, 교환 PLAP-유사 알칼리 포스파테이스, Tfr, TGF, TGF-알파, TGF-베타, TGF-베타 범 특이적, TGF-베타 R1(ALK-5), TGF-베타 R11, TGF-베타 RIIb, TGF-베타 RIII, TGF-베타1, TGF-베타2, TGF-베타3, TGF-베타4, TGF-베타5, 트롬빈, 흥선 Ck-1, 갑상선 자극 호르몬, Tie, TIMP, TIQ, 조직 인자, TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, TNF, TNF-알파, TNF-알파 베타, TNF-베타2, TNFc, TNF-RI, TNF-RII, TNFRSF10A(Trail R1Apo-2, DR4), TNFRSF10B(Trail R2DR5, KILLER, TRICK-2A, TRICK-B), TNFRSF10C(Trail R3DcR1, LIT, TRID), TNFRSF10D(Trail R4 DcR2, TRUND), TNFRSF11A(RANK ODF R, TRANCE R), TNFRSF11B(OPG OCIF, TR1), TNFRSF12(TWEAK R FN14), TNFRSF13B(TACI), TNFRSF13C(BAFF R), TNFRSF14(HVEM ATAR, HveA, LIGHT R, TR2), TNFRSF16(NGFR p75NTR), TNFRSF17(BCMA), TNFRSF18(GITR AITR), TNFRSF19(TROY TAJ, TRADE), TNFRSF19L(RELT), TNFRSF1A(TNF R1CD120a, p55-60), TNFRSF1B(TNF RII CD120b, p75-80), TNFRSF26(TNFRH3), TNFRSF3(LTbR TNF RIII, TNFC R), TNFRSF4(OX40 ACT35, TXGP1 R), TNFRSF5(CD40 p50), TNFRSF6(Fas Apo-1, APT1, CD95), TNFRSF6B(DcR3M68, TR6), TNFRSF7(CD27), TNFRSF8(CD30), TNFRSF9(4-1BB CD137, ILA), TNFRSF21(DR6), TNFRSF22(DCTRAIL R2 TNFRH2), TNFRST23(DCTRAIL R1TNFRH1), TNFRSF25(DR3Apo-3, LARD, TR-3, TRAMP, WSL-1), TNFSF10(Trail Apo-2 리간드, TL2), TNFSF11(Trance/RANK 리간드 ODF, OPG 리간드), TNFSF12(TWEAK Apo-3 리간드, DR3리간드), TNFSF13(APRIL TALL2), TNFSF13B(BAFF BLYS, TALL1, THANK, TNFSF20), TNFSF14(LIGHT HVEM 리간드, LTg), TNFSF15(TL1A/VEGI), TNFSF18(GITR 리간드 AITR 리간드, TL6), TNFSF1A(TNF-a 커넥틴, DIF, TNFSF2), TNFSF1B(TNF-b LTa, TNFSF1), TNFSF3(LTb TNFC, p33), TNFSF4(OX40 리간드 gp34, TXGP1), TNFSF5(CD40 리간드 CD154, gp39, HIGM1, IMD3, TRAP), TNFSF6(Fas 리간드 Apo-1 리간드, APT1 리간드), TNFSF7(CD27 리간드 CD70), TNFSF8(CD30 리간드 CD153), TNFSF9(4-1BB 리간드 CD137 리간드), TP-1, t-PA, Tpo, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANCE, 트랜스페린 수용체, TRF, Trk(예를 들어, TrkA), TROP-2, TSG, TSLP, 종양-관련 항원 CA 125, 종양-관련 항원 발현 루이스 Y 관련 탄수화물, TWEAK, TXB2, Ung, UPAR, uPAR-1, 유로카이네이스, VCAM, VCAM-1, VECAD, VE-카드헤린, VE-카드헤린-2, VEGFR-1(fit-1), VEGF, VEGFR, VEGFR-3(fit-4), VEGI, VIM, 바이러스 항원, VLA, VLA-1, VLA-4, VNR 인테그린, 폰 빌레브란트 인자, WIF-1, WNT1, WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, XCL1, XCL2, XCR1, XCR1, XEDAR, XIAP, XPD 및 호르몬과 성장 인자에 대한 수용체.

[0190] 일부 실시형태에서, 결합 도메인은 고양이에서 ACE, ACE-2, 액티빈, 액티빈 A, 액티빈 AB, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 RIA, 액티빈 RIA ALK-2, 액티빈 RIB ALK-4, 액티빈 RIIA, 액티빈 RIIB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAMS, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, ANG, Ang, 안지오텐신 유형 1(AT1) 수용체, 안지오텐신 유형 2(AT2) 수용체, 심방 나트륨이뇨 인자, av/b3 인테그린, b-ECGF, CD19, CD20, CD30, CD34, CD40, CD40L, CD47, COX, CTLA-4, EGFR(ErbB-1), EPO, 여포 자극 호르몬, GDF-8(미오스타틴), GLP1, GLP2, GnRH, 성장 호르몬 방출 인자, IgE, IL, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-5R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-18R, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, 인터류킨 수용체(예를 들어, IL-1R, IL-2R, IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-8R, IL-9R, IL-10R, IL-12R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-21R, IL-22R, IL-23R, IL-25R, IL-31R, IL-33R), LAP(TGF-1), 잠복성 TGF-1, 잠복성 TGF-1 bp1, LFA-1, 신경 성장 인자(NGF), NGFR, NGF-베타, OX40L, OX40R, PD1, PDL1, TGF, TGF-알파, TGF-베타, TGF-베타 범 특이적, TGF-베타 R1(ALK-5), TGF-베타 R11, TGF-베타 RIIb, TGF-베타 RIII, TGF-베타 1, TGF-베타2, TGF-베타3, TGF-베타4, TGF-베타5, TNF, TNF-알파, TNF-알파 베타, TNF-베타2, TNFc, TNF-RI, TNF-RII, TNFRSF16(NGFR p75NTR), TNFRSF9(4-1BB CD137, ILA), VEGFR-1(fit-1), VEGF, VEGFR 및 VEGFR-3(fit-4)와 같지만 이들로 제한되지 않는 하나 이상의 치료적 표적 또는 항원에 특이적으로 결합한다.

[0191] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들은 단백질을 포함할 수 있되, 단백질은 치료적 단백질, 예를 들어, EPO, CTLA4, LFA3, VEGFR1/VEGFR3, IL-1R, IL-4R, GLP-1 수용체 효능제 또는 트롬보포이에틴 결합 펩타이드이다. 일부 실시형태에서, 치료적 단백질은 ACE, ACE-2, 액티빈, 액티빈 A, 액티빈 AB, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 RIA, 액티빈 RIA ALK-2, 액티빈 RIB ALK-4, 액티빈 RIIA, 액티빈 RIIB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAMS, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, ANG, Ang, 안지오텐신 유형 1(AT1) 수용체, 안지오텐신 유형 2(AT2) 수용체, 심방 나트륨이뇨 인자, av/b3 인테그린, b-ECGF, CD19, CD20, CD30, CD34, CD40, CD40L, CD47, COX, CTLA-4, EGFR(ErbB-1), EPO, 여포 자극 호르몬, GDF-8(미오스타틴), GLP1, GLP2, GnRH, 성장 호르몬 방출 인자, IgE, IL, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-5R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-18R, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, 인터류킨 수용체(예를 들어, IL-1R, IL-2R, IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-8R, IL-9R, IL-10R, IL-12R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-21R, IL-22R, IL-23R, IL-25R, IL-31R, IL-33R), LAP(TGF-1), 잠복성 TGF-1, 잠

복성 TGF-1 bp1, LFA-1, 신경 성장 인자(NGF), NGFR, NGF-베타, OX40L, OX40R, PD1, PDL1, TGF, TGF-알파, TGF-베타, TGF-베타 범 특이적, TGF-베타 R1(ALK-5), TGF-베타 R11, TGF-베타 RIIb, TGF-베타 RIII, TGF-베타 1, TGF-베타2, TGF-베타3, TGF-베타4, TGF-베타5, TNF, TNF-알파, TNF-알파 베타, TNF-베타2, TNFc, TNF-RI, TNF-RII, TNFRSF16(NGFR p75NTR), TNFRSF9(4-1BB CD137, ILA), VEGFR-1(fit-1), VEGF, VEGFR 또는 VEGFR-3(flt-4)이다.

[0192] **약제학적 조성물**

[0193] 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들의 약제학적 또는 멸균 조성물을 제조하기 위해, 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제와 혼합될 수 있다(예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1984)] 참조).

[0194] 치료제 및 진단제의 제형은, 예를 들어, 동결건조된 분말, 슬러리, 수용액 또는 현탁액의 형태로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합함으로써 제조될 수 있다(예를 들어, 문헌[Hardman, et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y.; Avis, et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.] 참조). 일 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들은 소듐 아세테이트 용액(pH 5 내지 6)에 적절한 농도로 희석되고, NaCl 또는 수크로스가 등장성을 위해 첨가된다. 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80과 같은 추가적인 작용제가 안정성을 향상시키기 위해 첨가될 수 있다.

[0195] 단독으로 또는 또 다른 작용제와 조합하여 투여되는 폴리펩타이드 조성물의 독성 및 치료적 효능은, 예를 들어, 결정 LD₅₀(집단의 50%에 치명적인 용량) 및 ED₅₀(집단의 50%에서 치료적으로 유효한 용량)을 결정하기 위해 세포 배양물 또는 실험 동물에서 표준 약제학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 독성 효과와 치료적 효과 사이의 용량 비는 치료 지수(LD₅₀/ED₅₀)이다. 특정 양상에서, 높은 치료 지수를 나타내는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들이 바람직하다. 이러한 세포 배양물 검정 및 동물 연구에서 얻어진 데이터는 고양이에서 사용하기 위한 투여량의 범위를 제형화하는 데 사용될 수 있다. 이러한 화합물의 투여량은 바람직하게는 독성이 거의 없거나 또는 전혀 없는 ED₅₀을 포함하는 다양한 순환 농도 내에 있다. 투여량은 사용되는 투약 형태 및 투여 경로에 따라 이 범위 내에서 변할 수 있다.

[0196] 투여 방식은 다를 수 있다. 적합한 투여 경로는 경구, 직장, 경점막, 장, 비경구; 근육내, 피하, 피내, 골수내, 척추강내, 직접 심실내, 정맥내, 복강내, 비강내, 안구내, 흡입, 취입, 국소, 피부, 경피 또는 동맥내를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들은 주사와 같은 침습적 경로에 의해 투여될 수 있다. 추가의 실시형태에서, 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들은 정맥내로, 피하로, 근육내로, 동맥내로, 종양내로 또는 흡입, 에어로졸 전달에 의해 투여된다.

[0197] 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 또한 주입에 의해 투여될 수 있다. 약제학적 조성물을 투여하는 잘 알려진 이식물 및 모듈 형태의 예는 제어된 속도로 약물을 분배하기 위한 이식형 미세 주입 펌프를 개시하고 있는 미국 특허 제4,487,603호; 정확한 주입 속도로 약물을 전달하기 위한 약물 주입 펌프를 개시하고 있는 미국 특허 제4,447,233호; 연속 약물 전달을 위한 가변 흐름 이식형 주입 기구를 개시하고 있는 미국 특허 제4,447,224호; 다중-챔버 구획을 갖는 삼투성 약물 전달 시스템을 개시하고 있는 미국 특허 제4,439,196호를 포함한다. 이러한 많은 이식물, 전달 시스템 및 모듈은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0198] 대안적으로, 예를 들어, 종종 데포 또는 서방성 제형으로 면역병리를 특징으로 하는 관절염성 관절 또는 병원체-유도성 병변 내로의 항체의 직접 주사를 통해 전신 방식보다는 국부적으로 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들을 투여할 수 있다. 또한, 표적화된 약물 전달 시스템, 예를 들어, 면역병리를 특징으로 하는 관절염성 관절 또는 병원체-유도성 병변을 표적화하는, 예를 들어, 조직-특이적 항체로 코팅된 리포솜으로 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들을 투여할 수 있다. 리포솜은 병든 조직에 대해 표적화되고, 이에 의해 선택적으로 흡수될 것이다.

[0199] 투여 양생법은 제한 없이 치료되는 고양이의 연령, 체중 및 신체적 병태, 치료 항체의 혈청 또는 조직 전환율, 증상의 수준, 치료적 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들의 면역원성 및 생물학적 매트릭스에서 표적 세포의 접

근성을 포함하는 여러 인자에 의존한다. 일부 구현예에서, 투여 양생법은 표적 질환 상태의 개선을 달성하는 동시에 바람직하지 않은 부작용을 최소화하기에 충분한 치료적 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들을 전달한다. 따라서, 전달되는 생물학적 제제의 양은 특정 치료적 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들 및 치료되는 병태의 중증도에 부분적으로 의존한다. 치료 항체의 적절한 용량을 선택하기 위한 지침이 이용 가능하다(예를 들어, 문헌 [Wawrzynczak Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK (1996); Milgrom et al. New Engl. J. Med. 341:1966-1973 (1999); Slamon et al. New Engl. J. Med. 344:783-792 (2001); Beniaminovitz et al. New Engl. J. Med. 342:613-619 (2000); Ghosh et al. New Engl. J. Med. 348:24-32 (2003); Lipsky et al. New Engl. J. Med. 343:1594-1602 (2000)] 참조).

[0200] 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들의 적절한 용량의 결정은, 예를 들어, 치료에 영향을 미치는 것으로 당업계에 알려져 있거나 또는 의심되는 매개변수 또는 인자를 사용하여 당업자에 의해 이루어진다. 일반적으로, 용량은 최적의 용량보다 다소 적은 양으로 시작하고, 이후에 임의의 부정적인 부작용에 대해 목적하는 또는 최적의 효과가 달성될 때까지 적은 증분으로 증가된다. 중요한 진단적 측정은, 예를 들어, 염증의 증상 또는 생성된 염증성 사이토카인의 수준의 측정을 포함한다.

[0201] **핵산, 벡터, 숙주 세포 및 제조 방법**

[0202] 본 개시내용은 또한 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들을 암호화하는 핵산 또는 핵산들, 핵산 또는 핵산들을 포함하는 벡터 또는 벡터들 및 핵산 또는 핵산들 또는 벡터 또는 벡터들을 포함하는 숙주 세포를 포함한다.

[0203] 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들은 세균 또는 진핵생물 세포에서 생산될 수 있다. 예를 들어, Fab의 일부 폴리펩타이드는 세균 세포, 예를 들어, 대장균 세포에서 생산될 수 있다. 폴리펩타이드는 또한 진핵생물 세포, 예컨대, 형질전환된 세포주(예를 들어, CHO, 293E, COS, 293T, Hela)에서 생산될 수 있다. 또한, 폴리펩타이드(예를 들어, scFv의)는 피키아(*Pichia*)(예를 들어, 문헌[Powers et al., J Immunol Methods. 251:123-35 (2001)] 참조), 한세울라(*Hanseula*) 또는 사카로마이세스(*Saccharomyces*)와 같은 효모 세포에서 발현될 수 있다. 관심 항체를 생산하기 위해, 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들이 작제되고, 발현 벡터 또는 발현 벡터들에 도입된 다음, 적합한 숙주 세포에서 발현된다. 발현을 개선시키기 위해, 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 아미노산 서열을 변경하지 않고 (또는 최소한으로 변경 - 예를 들어, 중쇄 또는 경쇄의 C-말단 잔기의 제거) 재코딩될 수 있다. 잠재적인 재코딩을 위한 영역은 번역 개시, 코돈 사용 및 의도하지 않은 mRNA 스플라이싱 가능성과 관련된 영역을 포함한다. 본 명세서에 기재된 Fc 영역 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드들은 당업자에 의해 쉽게 구상될 것이다.

[0204] 표준 분자 생물학 기법을 사용하여 재조합 발현 벡터(들)를 제조하고, 숙주 세포를 형질감염시키고, 형질감염체를 선택하고, 숙주 세포를 배양하고, 폴리펩타이드(예를 들어, 항체)를 회수할 수 있다.

[0205] 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들이 세균 세포(예를 들어, 대장균)에서 발현되는 경우, 발현 벡터는 세균 세포에서 벡터의 증폭을 가능하게 하는 특성을 가져야 한다. 추가적으로, JM109, DH5 α , HB101 또는 XL1-Blue와 같은 대장균이 숙주로서 사용되는 경우, 벡터는 대장균에서 효율적인 발현을 허용할 수 있는 프로모터, 예를 들어, lacZ 프로모터(Ward et al., 341:544-546 (1989)), araB 프로모터(Better et al., *Science*, 240:1041-1043(1988)) 또는 T7 프로모터를 가져야 한다. 이러한 벡터의 예는, 예를 들어, M13-시리즈 벡터, pUC-시리즈 벡터, pBR322, pBluescript, pCR-Script, pGEX-5X-1(파마시아(Pharmacia)), "QIAexpress 시스템"(퀴아젠(QIAGEN)), pEGFP 및 pET(이 발현 벡터가 사용되는 경우, 숙주는 바람직하게는 T7 RNA 폴리머레이스를 발현하는 BL21임)를 포함한다. 발현 벡터는 항체 분비를 위한 신호 서열을 포함할 수 있다. 대장균의 주변질 세포로의 생산을 위해, *pelB* 신호 서열(Lei et al., *J. Bacteriol.*, 169:4379 (1987))이 항체 분비를 위한 신호 서열로 사용될 수 있다. 세균 발현을 위해, 염화칼슘 방법 또는 전기천공 방법을 사용하여 발현 벡터를 세균 세포에 도입할 수 있다.

[0206] 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들이 CHO, COS 및 NIH3T3 세포와 같은 동물 세포에서 발현되는 경우, 발현 벡터는 이러한 세포에서의 발현에 필요한 프로모터, 예를 들어, SV40 프로모터(Mulligan et al., *Nature*, 277:108 (1979))(예를 들어, 초기 유인원 바이러스 40 프로모터), MMLV-LTR 프로모터, EF1 α 프로모터(Mizushima et al., *Nucleic Acids Res.*, 18:5322 (1990)) 또는 CMV 프로모터(예를 들어, 인간 사이토메갈로바이러스 급초기 프로모터)를 포함한다. Fc 영역 변이체를 암호화하는 핵산 서열 이외에, 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 벡터의 복제를 조절하는 서열(예를 들어, 복제 기점) 및 선별 마커 유전자와 같은 추가적인 서열을 보유할 수 있다. 선별 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포의 선택을 용이하게 한다(예를 들어, 미국 특허

제4,399,216호, 제4,634,665호 및 제5,179,017호 참조). 예를 들어, 전형적으로 선별 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포에 G418, 하이그로마이신 또는 메토타렉세이트와 같은 약물에 대한 저항성을 부여한다. 선별 마커가 있는 벡터의 예는 pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV 및 pOP13을 포함한다.

[0207] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들은 포유동물 세포에서 생산된다. 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들을 발현하기 위한 예시적인 포유동물 숙주 세포는 차이나이즈 햄스터 난소(CHO 세포)(예를 들어, 문헌 [Kaufman and Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621]에 기술되어 있는 바와 같은 DHFR 선별 마커와 함께 사용되는 문헌[Urlaub and Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220]에 기술되어 있는 dhfr- CHO 세포를 포함), 인간 배아 신장 293 세포(예를 들어, 293, 293E, 293T), COS 세포, NIH3T3 세포, 림프구성 세포주, 예를 들어, NS0 골수종 세포 및 SP2 세포 및 형질전환 동물, 예를 들어, 형질전환 포유동물로부터의 세포를 포함한다. 예를 들어, 세포는 포유동물 상피 세포이다.

[0208] 항체 발현을 위한 예시적인 시스템에서, 항체의 항체 중쇄 및 항체 경쇄 둘 다를 모두 암호화하는 재조합 발현 벡터는 칼슘 포스페이트-매개성 형질감염에 의해 dhfr- CHO 세포에 도입된다. 재조합 발현 벡터 내에서, 항체 중쇄 및 경쇄 유전자는 각각 높은 수준의 유전자 전사를 유도하기 위해 인핸서/프로모터 조절 요소(예를 들어, CMV 인핸서/AdMLP 프로모터 조절 요소 또는 SV40 인핸서/AdMLP 프로모터 조절 요소와 같은 SV40, CMV, 아데노바이러스 등으로부터 유래된 것)에 작동 가능하게 연결된다. 재조합 발현 벡터는 또한 DHFR 유전자를 운반할 수 있으며, 이는 메토타렉세이트 선택/증폭을 사용하여 벡터로 형질감염된 CHO 세포의 선택을 가능하게 한다. 선택된 형질감염체 숙주 세포는 항체 중쇄 및 경쇄의 발현을 가능하게 하기 위해 배양되고, 항체는 배양 배지로부터 회수된다.

[0209] 치료 방법

[0210] 본 명세서에 개시된 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들은 임의의 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 필요로 하는 고양이에서 임의의 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 데 사용될 수 있다. 본 발명은 반복된 투여가 필요한 만성 병태의 치료에 특히 유용하다. 단백질 치료제의 증가된 반감기 때문에, 투여의 빈도가 낮고/낮거나 감소된 용량 수준이 가능할 수 있다.

[0211] 일부 실시형태에서, 치료 또는 예방되는 질환, 장애, 병태 또는 증상은 알레르기 질환, 만성 통증, 급성 통증, 염증성 질환, 자가면역 질환, 내분비 질환, 위장관 질환, 골격/근골격 질환, 심혈관 질환, 신경 질환, 신장 질환, 대사 질환, 면역학적 질환, 유전(genetic/inherited) 질환, 생식 관련 장애, 감염성 질환 또는 암이다. 소정의 실시형태에서, 치료 또는 예방될 질환 또는 장애는 아토피성 피부염, 알레르기성 피부염, 음식 알레르기, 골관절성 통증, 수술 후 통증, 치통, 암 통증, 관절염, 빈혈, 비만 또는 당뇨병이다.

[0212] 항체는 질환을 치료 또는 예방할 뿐만 아니라 정상적인 생물학적 기능을 조절, 예를 들어, 생식력 또는 행동을 관리하는 데 사용될 수 있다.

[0213] 진단

[0214] 본 명세서에 개시된 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들은 또한 다양한 진단적 목적, 예를 들어, 고양이가 임의의 특정 질환 또는 장애를 갖는지 여부를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들은 결합 도메인을 포함할 수 있다. 결합 도메인은 본 명세서에 기재된 바와 같은 단백질, 서브유닛, 도메인, 모티프 및/또는 에피토프(예를 들어, 암 세포에 대한 마커)에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들은 표지 그룹을 추가로 포함한다. 일반적으로, 표지 그룹은 이들이 검출되는 검정에 따라서 다양한 클래스에 속한다: a) 방사성 또는 무거운 동위원소일 수 있는 동위원소 표지; b) 자성 표지(예를 들어, 자성 입자); c) 산화환원 활성 모이어티; d) 광학 염료; 효소 그룹(예를 들어, 고추냉이 과산화효소, β -갈락토시데이스, 루시페레이스, 알칼리 포스파테이스); e) 바이오티닐화된 그룹; 및 f) 2차 리포터에 의해 인식되는 미리 결정된 폴리펩타이드 에피토프(예를 들어, 류신 지퍼 쌍 서열, 2차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그 등). 일부 실시형태에서, 표지 그룹은 잠재적인 입체 장애를 줄이기 위해 다양한 길이의 스페이서 암을 통해 항체에 커플링된다. 단백질을 표지하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있으며, 본 발명을 수행하는 데 사용될 수 있다.

[0215] 일부 실시형태에서, 표지 그룹은 프로브, 염료(예를 들어, 형광 염료) 또는 방사성 동위원소(예를 들어, ^3H , ^{14}C , ^{22}Na , ^{36}Cl , ^{35}S , ^{33}P 또는 ^{125}I)이다.

[0216] 특정 표지는 또한 발색단, 인광체 및 형광단을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 광학 염료를 포함할 수

있으며, 후자는 다수의 예에서 특이적이다. 형광단은 "소분자" 형광체 또는 단백질성 형광체일 수 있다.

[0217] 형광 표지는 고유의 형광 특성을 통해 검출될 수 있는 임의의 분자일 수 있다. 적합한 형광 표지는 플루오레세인, 로다민, 테트라메틸로다민, 에오신, 에리트로신, 쿠마린, 메틸-쿠마린, 피렌, 말라사이트 그린, 스틸벤, 루시퍼 엘로우, 캐스케이드 블루J, 텍사스 레드, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC 레드 640, Cy 5, Cy 5.5, LC 레드 705, 오레곤 그린, 알렉사-플루오르 염료(알렉사 플루오르 350, 알렉사 플루오르 430, 알렉사 플루오르 488, 알렉사 플루오르 546, 알렉사 플루오르 568, 알렉사 플루오르 594, 알렉사 플루오르 633, 알렉사 플루오르 660, 알렉사 플루오르 680), 캐스케이드 블루, 캐스케이드 엘로우 및 R-피코에리트린 (PE)(몰리클러 프로브스(Molecular Probes), 오리건주 유진 소재), FITC, 로다민 및 텍사스 레드(피어스(Pierce), 일리노이주 록퍼드 소재), Cy5, Cy5.5, Cy7(아머삼 라이프 사이언스(Amersham Life Science), 펜실베이니아주 피츠버그 소재)을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 형광단을 비롯한 적합한 광학 염료는 그 전문이 참조에 의해 인용되어 있는 문헌[Molecular Probes Handbook by Richard P. Haugland]에 기술되어 있다.

[0218] 적합한 단백질성 형광 표지는 또한 GFP의 레닐라(Renilla), 프틸로사르쿠스(Ptilosarcus) 또는 에퀴리아(Aequorea) 종을 포함하는 녹색 형광 단백질(Chalfie et al., 1994, Science 263:802-805), EGFP(클론테크 래보라토리즈, 인크.(Clontech Laboratories, Inc.), Genbank 등록 번호 U55762), 청색 형광 단백질(BFP, 퀴넴 바이오테크놀로지스, 인크.(Quantum Biotechnologies, Inc.), 캐나다 퀘벡주 몬트리올, 메종뉴브 대로 서부 1801번지, 8층 H3H1J9; Stauber, 1998, Biotechniques 24:462-471; Heim et al., 1996, Curr. Biol. 6:178-182), 증강된 황색 형광 단백질(EYFP, 클론테크 래보라토리즈, 인크.), 루시페레이스(Ichiki et al., 1993, J. Immunol. 150:5408-5417), β -갈락토시데이스(Nolan et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2603-2607) 및 레닐라(W092/15673, W095/07463, W098/14605, W098/26277, W099/49019, 미국 특허 제5,292,658호, 제5,418,155호, 제5,683,888호, 제5,741,668호, 제5,777,079호, 제5,804,387호, 제5,874,304호, 제5,876,995호, 제5,925,558호)를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 이 단락에서 위에 인용된 모든 참고문헌은 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 명시적으로 인용된다.

[0219] **검정**

[0220] $Fc\gamma RI$ 및 $Fc\gamma RIII$ 결합:

[0221] $Fc\gamma RI$ 및 $Fc\gamma RIII$ 에 대한 결합은 항체가 ADCC를 매개하는 능력의 척도이다. 항체에 대한 이러한 특성을 평가하기 위해, $Fc\gamma RI$ 및 $Fc\gamma RIII$ 에 대한 항체의 결합을 측정하는 검정이 당업계에 공지된 방법을 사용하여 수행될 수 있다.

[0222] Clq 결합:

[0223] 보체의 제1 성분인 Clq 에 대한 결합은 보체-의존적 세포독성(CDC)을 매개하는 항체의 능력의 척도이다. 항체에 대한 이러한 특성을 평가하기 위해, Clq 에 대한 항체의 결합을 측정하는 검정이 당업계에 공지된 방법을 사용하여 수행될 수 있다.

[0224] 반감기:

[0225] 항체의 반감기를 측정하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Booth et al., MAbs, 10(7):1098-1110 (2018)] 참조. 예로서, 항체(예를 들어, 고양이 항체)의 반감기를 동물 모델(예를 들어, 고양이 모델)에 주사하고, 소정의 기간 동안 혈청 내 항체의 수준을 측정함으로써 측정될 수 있다. 예시적인 동물 모델은 비인간 영장류 모델 및 형질전환 마우스 모델을 포함한다. 형질전환 마우스 모델(예를 들어, Tg32 또는 Tg276 형질전환 마우스)은 마우스 $FcRn$ 알파 사슬에 대해 널(null)일 수 있고, (예를 들어, 구성적 프로모터의 제어하에) 인간 $FcRn$ 알파 이식유전자를 발현할 수 있다. 인간 $FcRn$ 알파 사슬은 기능적 키메라 $FcRn$ 이종이량체를 형성하는 마우스 $\beta 2$ -마이크로글로불린 단백질과 생체내에서 쌍을 이룰 수 있다.

[0226] **실시예**

[0227] **실시예 1: 선택된 위치에서 NNK 포화 돌연변이유발 라이브러리의 생성 및 개별 변이체의 분석**

[0228] 고양이 IgG1a의 CH2 및 CH3 도메인의 야생형(wt) 서열(서열번호 1)을 합성하고, NNK 돌연변이유발을 위한 주형으로서 사용하였다. NNK 포화 돌연변이유발 방법은 목적하는 위치에서 가능한 모든 20개의 아미노산을 생성하는 효과적인 방법이다(Hogrefe et al., Biotechniques. 33: 1158-1165 [2002]). 252번, 428번 및 434번 위치(EU 넘버링)에서 개별 NNK 라이브러리를 생성하였다. 지정된 위치의 NNK(N = A/C/G/T, K = G/T) 프라이머를

QuikChange 부위-지정 돌연변이유발 키트(에질런트)와 함께 사용하였다. PCR 산물을 진스크립트 FASEBA 플라스미드에 서브클로닝하고, 대장균에 형질전환시키고, 변이체의 존재에 대해 서열을 확인하였다. CH3 도메인의 하류는 알부민에 대한 pM 친화성을 갖는 SASA(혈청 알부민에 대한 단일-도메인 항체) 태그(Zhang, J.; Wu, S.; Liu, J. Methods and systems for increasing protein stability. US 특허 제US 2013/0129727 A1호)이다. SASA 항체는 아래 설명된 센서 칩 표면에 대한 Fc의 포획을 가능하게 한다. PelB(펙테이트 라이에이스 B) 신호 펩타이드는 배지로의 Fc 분비를 촉진하기 위해 N-말단에 있다. CH2-CH3 단백질의 발현은 Lac 프로모터에 의해 조절된다. 조건 배지로부터의 상청액을 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance: SPR)을 사용하여 변이체에 대해 pH 6.0에서 고양이 FcRn(GenBank KF773786[IgG 수용체 FcRn 대형 서브유닛 p51] 및 유럽 뉴클레오타이드 아카이브(European Nucleotide Archive) AY829266.1[고양이 베타-2-마이크로글로불린])에 대한 결합에 대해 분석하였다.

[0229] 각 라이브러리로부터의 90개의 개별 형질감염체로부터의 상청액을 아래 설명된 바와 같은 비아코어 방법을 사용하여 pH 6.0에서 고양이 FcRn에 대한 결합에 대해 검정하였다.

[0230] 비아코어 8K를 사용한 SPR 분석을 위해, 소 혈청 알부민(BSA)을 CM5 센서 칩에 고정화하였다. 플로우 셀 1 및 2의 센서 칩 표면을 새로 혼합된 50 mmol/l N-하이드록시석신이미드 및 200 mmol/l 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필) 카보다이이미드 하이드로클로라이드로 420초(10 μ l/분) 동안 활성화하였다. 그 후, 10mM 소듐 아세테이트(pH 4.5)에 희석된 BSA를 플로우 셀 2에 주입하여 접합을 달성하고, 플로우 셀 1은 블랭크로 설정하였다. 아민 커플링 반응 후, 칩 표면의 나머지 활성 커플링 부위를 1mM 에탄올아민 하이드로클로라이드를 420초 동안 주입하여 차단시켰다. 결합 실험을 위한 전개 완충액은 HBS-EP(10mM HEPES, 500mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% Tween 20, pH 5.5)였으며, 이를 25°C에서 전개하였다. 변이체로부터의 상청액을 칩 표면에 주입하고, SASA 태그를 통해 고정화된 BSA에 60초 동안 포획하였다. 200nM의 고양이 FcRn을 120초 동안 주입하고, 전개 완충액으로 120초 동안 해리를 완료하였다. BSA의 고정화 단계에 대한 유속은 10 μ l/분이었고, 결합 및 해리 단계에 대한 유속은 30 μ l/분이었다. 모든 데이터는 비아코어 8K 평가 소프트웨어 버전 1.1을 사용하여 처리하였다. 비아코어 센서 그래프에 대해 도 1 및 도 2 참조.

[0231] 테스트된 변이체는 야생형 고양이 IgG1a Fc(서열번호 1)와 비교할 때 pH 6.0에서 고양이 FcRn에 대해 증가된 결합 친화도를 나타내었다.

[0232] 252번, 428번 및 434번 아미노산 위치에서의 NNK 돌연변이유발은 pH 6.0에서 FcRn에 대한 결합을 증가시키는 돌연변이체를 생성하는 것으로 밝혀졌다. 이들 3개의 위치에서 생성된 모든 90개의 클론의 시퀀스는 다음 6개의 클론, 즉, S252H, S428E, S428C, S428F, S428W 및 S434Y가 생성되지 않았음을 나타낸다. 이들 위치에서 다른 모든 아미노산 치환은 테스트에 어떠한 이점도 없었다. 결과는 아래 표 3에 요약되어 있다.

표 3

IgG 변이체 및 FcRn 결합 동역학

변이체	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
S252W	2.28E+05	5.38E-03	2.35E-08
S252W	2.34E+05	5.45E-03	2.33E-08
S252Y	2.58E+05	2.63E-02	1.02E-07
S252Y	2.57E+05	2.65E-02	1.03E-07
S252F	2.03E+05	9.57E-02	4.70E-07
S252F	2.05E+05	1.01E-01	4.92E-07
S428L	1.62E+05	7.88E-02	4.85E-07
S428L	1.05E+05	8.03E-02	7.63E-07
S428M	1.66E+05	1.00E-01	6.03E-07
S428Y	1.95E+05	1.03E-01	5.28E-07
S428Y	1.87E+05	1.05E-01	5.65E-07
S434F	3.78E+05	1.58E-02	4.17E-08
S434F	3.71E+05	1.61E-02	4.33E-08
S434W	3.14E+05	1.75E-02	5.56E-08
S434W	4.02E+05	2.02E-02	5.02E-08
S434H	2.41E+05	7.61E-02	3.16E-07
S434H	2.00E+05	8.88E-02	4.44E-07
야생형	3.14E+05	3.74E-01	1.19E-06
야생형	1.19E+05	1.95E-01	1.64E-06

[0233]

[0234]

실시예 2: 고양이 IgG1a Fc의 스캐닝 돌연변이 유발

[0235]

파지 디스플레이 라이브러리 접근법을 사용하여 pH 6.0에서 고양이 FcRn에 대한 친화도를 증가시키는 고양이 IgG1a Fc 변이체를 확인하였다. 고양이 IgG1a Fc(Kanai *et al.*, 2000. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 73:53)를 트위스트 바이오사이언스(Twist Bioscience)에서 55개의 상이한 위치에 변이체를 갖도록 합성하였다(도면 4). 돌연변이된 각 위치에서, 8개의 가능한 아미노산이 치환되었다. 이들 아미노산은 아르기닌 및 라이신(양으로 하전된 측쇄), 아스파르트산 및 글루탐산(음으로 하전된 측쇄), 트레오닌 및 글루타민(극성의 하전되지 않은 측쇄) 및 류신 및 발린(소수성 측쇄)이었다. Fc DNA 라이브러리를 Fc 분자당 평균 2개의 변이체를 갖도록 설계하였다. 이 라이브러리의 복잡성은 공식: $nCr = n! / (r! * (n-r)!)$ 를 사용하여 95,040개의 조합이었으며, 여기서 n은 부위의 수를 나타내고, r은 분자당 변이체의 수를 나타낸다. 목적하는 부위-특이적 돌연변이를 갖는 Fc 변이체를 트위스트사의 실리콘계 플랫폼에 돌연변이 유발성 올리고뉴클레오타이드로 프린팅하였다.

[0236]

그런 다음, 올리고뉴클레오타이드를 조립하고 조립 PCR을 사용하여 전장 Fc 유전자 단편 풀을 생성하였다. 그런 다음, 조립된 Fc 유전자 단편 풀을 안티바디 디자인 랩스(Antibody Design Labs)의 pADL-22c 파지미드 벡터의 Sfi 절단-부위로 클로닝하였다. 8×10^{10} 개 변이체의 실험적 다양성을 생성하기 위해 클로닝된 DNA 라이브러리를 전기천공적(electrocompetent) TG1 대장균 세포에 형질전환시켰다. 그런 다음, 파지미드 형질전환된 대장균 세포를 M13K07 헬퍼 파지로 공동 형질감염시켜 단백질-기반 패닝에 사용되는 파지 풀을 생성하였다. 라이브러리를 20mM MES 완충액(pH 6.0), 0.05% tween 20 및 3% 우유에 재현탁시켰다.

[0237]

96개의 무작위 파지 클론을 선택함으로써 라이브러리의 품질을 결정하고, Sanger 방법으로 시퀀싱하였다. 파지당 돌연변이체의 수는 아래 표 4에 나타나 있다.

표 4

파지당 돌연변이체의 수

돌연변이의 수	클론의 수
0	5
1	19
2	44
3	19
4	5
5	1
6	2

[0238]

[0239]

첫 번째 파지 선택을 위해, 단백질 A 포획 단계를 사용하여 단백질 A 결합을 상실한 임의의 Fc 변이체를 제거하였다. 이 선택을 위해, 파지 라이브러리를 단백질 A 비드 상에 포획하고, PBS(pH 7.4)로 세척하였다. 파지를 0.1M 글리신(pH 2.7)으로 용리하고, pH를 1M Tris-HCl(pH 7.5)로 즉시 중화하였다. 중화된 파지를 폴리에틸렌 글리콜/NaCl로 침전시키고 원심분리하였다. 펠릿화된 파지를 20mM MES(pH 6.0), 0.05% tween 20, 3% 우유에 재현탁시켰다.

[0240]

다음 파지 선택은 문헌[Borrok *et al.*, 2015, *J Biol. Chem.*, 290:4282]에 의해 기술된 프로토콜을 기반으로 하였다. 간략하게는, Nunc 96 멀티-웰 플레이트를 뉴트라비딘으로 코팅한 다음, 5% 소 혈청 알부민, PBS(pH 7.4)로 차단하였다. 바이오티닐화된 고양이 FcRn(FCN-F82W3, 아크로바이오시스템즈(Acrobiosystems))을 웰에 PBS(pH 6.0) 중 0.31 mg/ml의 농도로 고정화시켰다. PBS(pH 6.0) 중 파지 라이브러리를 고정화된 고양이 FcRn과 함께 인큐베이션한 다음, PBS(pH 6.0), 0.05% tween 20, 0.3M NaCl로 세척하였다. 파지를 37°C에서 30분 동안 인큐베이션함으로써 PBS(pH 7.4)로 용리시켰다. 용리된 파지를 pH 7.4에서 0.31 µg/ml의 고양이 FcRn으로 고갈시켰다. 결합되지 않은 파지를 TG1 세포에서 증폭시켰다. 각 라운드에 대한 정확한 조건 및 결과는 아래 표 5에 나타나 있다.

표 5

파지 선택을 위한 세척 조건 및 고갈의 수

라운드	1	2	3	4
FcRn (0.3125 µg/ml)로 코팅된 웰의 수	8	6	4	4
세척 횟수	10	15	15	10 + 2x30 분
pH 7.4 에서 FcRn (0.3125 µg/ml)을 이용한 고갈의 수	1	2	3	3
투입물 역가 (ml당 파지)	5.0×10^{11}	7.0×10^{12}	1.8×10^{12}	6.4×10^{12}
산출물 역가 (총 부피당 cfu)	8.4×10^6	6.6×10^5	1.87×10^9	1.54×10^9

[0241]

[0242]

총 768개의 파지 클론을 3차 선택 라운드의 산출물로부터 단리하였고, 768개의 파지 클론을 4차 선택 라운드로

부터 분리하였다. Illumina MiSeq를 사용하여 차세대 시퀀싱에 의해 클론을 시퀀싱하였다.

[0243] 시퀀싱 결과는 252번 위치에 치환된 타이로신, 434번 위치에 치환된 타이로신 또는 페닐알라닌을 포함하는 다수의 클론(하기 표 참조)을 밝혀내었으며, 이는 치환 중 일부가 의도된 8개의 아미노산 치환 이외의 잔기를 포함하고 있음을 나타낸다. 고유한 변이체를 Gearing 등(2016, *J Vet Intern Med*, 30:1129)에 의해 이전에 기술된 가변 도메인을 사용하여 IgG로 재형식화하였다. 미니-프랩 플라스미드 DNA를 ExpiFectamine 293 형질감염제로 Expi293 세포에 형질감염시켰다. IgG 변이체를 단백질 A 크로마토그래피로 조건 배지로부터 정제하고, 43mM 소듐 시트레이트, 130mM 소듐 바이카보네이트(pH 6.0)로 재형식화하였다.

[0244] 고양이 FcRn에 대한 IgG 변이체의 친화도를 결정하기 위해, Carterra 기기를 사용하여 결합 동역학을 결정하였다. 항체(대략 5 mg/ml)를 EDC/NHS 활성화에 의해 HC30M 센서 칩에 아민-커플링시킨 후, 에탄올아민 HCl로 반응을 중지시켰다.

[0245] HBSTE(10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% Tween-20), 0.5% 소 혈청 알부민(pH 6.0)에서 일정 농도(333nM, 111nM, 37nM, 12.3nM, 4.1nM, 1.37nM, 0.45nM)의 고양이 FcRn(FCN-F82W3, 아크로바이오시스템즈)을 센서 칩 위로 흘려 pH 6.0에서의 동역학을 결정하였다. HBSTE 완충액의 pH를 7.4로 조정된 것을 제외하고는 이러한 동일한 전략을 사용하여 pH 7.4에서 고양이 FcRn에 대한 결합 동역학을 결정하였다.

[0246] IgG 변이체의 고양이 FcRn 결합 동역학은 아래 표 6에 나타나 있다.

표 6

IgG Fc 변이체 및 FcRn 결합 동역학

변이체	pH 6.0			pH 7.4		
	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (nM)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (nM)
야생형	4.72E+05	1.10E-01	232.8	결합 없음		
S252Y	9.74E+05	9.50E-03	9.8	약한 결합		
S252Y, Q311R	9.28E+05	6.40E-03	6.9	약한 결합		
S252Y, Q311K	1.39E+06	7.79E-03	5.6	2.39E+06	1.12E-01	46.9
S252Y, Q311V	1.08E+06	4.05E-03	3.8	1.73E+05	5.28E-02	306.0
S252Y, Q311L	7.40E+05	5.16E-03	7.0			
S434Y	1.22E+06	6.29E-03	5.2	결합 없음		
S434Y, S254R	2.76E+06	5.68E-03	2.1	결합 없음		
S434Y, S254K	1.61E+06	5.04E-03	3.1	약한 결합		
S434Y, L262E	1.51E+06	4.98E-03	3.3	약한 결합		
S434Y, T286D	1.28E+06	3.71E-03	2.9	결합 없음		
S434Y, T286E	9.66E+05	3.46E-03	3.6	결합 없음		
S434Y, T289K	1.53E+06	5.59E-03	3.6	약한 결합		
S434Y, E293D	1.57E+06	5.34E-03	3.4	결합 없음		
S434Y, E293K	1.22E+06	5.01E-03	4.1	약한 결합		
S434Y, L309V	2.21E+06	4.00E-03	1.8	약한 결합		
S434Y, L309E	1.13E+06	4.58E-03	4.1	약한 결합		
S434Y, K326D	1.38E+06	5.49E-03	4.0	결합 없음		
S434Y, Q347L	1.98E+06	6.67E-03	3.4	결합 없음		
S434Y, S426L	1.48E+06	4.40E-03	3.0	6.36E+05	1.18E-01	184.9
S434F	1.73E+06	7.18E-03	4.2	약한 결합		
S434F, E380D	1.77E+06	5.83E-03	3.3	결합 없음		
S428L	1.45E+06	2.41E-02	16.7	결합 없음		
S428L, S252R	9.74E+05	8.73E-03	9.0	결합 없음		
S428L, T286E	1.15E+06	9.87E-03	8.6	결합 없음		
S428L, Q311V	9.16E+05	1.07E-02	11.7	결합 없음		
S428L, Q311K	9.58E+05	1.01E-02	10.5	결합 없음		
S428L, D312T	1.01E+06	1.13E-02	11.2	약한 결합		
S428L, I377V	1.69E+06	1.83E-02	10.8	결합 없음		
S428L, I383L	1.63E+06	1.62E-02	9.9	결합 없음		
S428L, N389c-R	1.14E+06	1.09E-02	9.6	결합 없음		
S428L, E380D, S434R	1.22E+06	9.73E-03	8.0	결합 없음		
S428L, E380T, S434R	3.17E+06	1.20E-02	3.8	결합 없음		
Q311R	1.96E+05	1.16E-02	59.2	결합 없음		
R392E	1.33E+06	3.24E-02	24.5	결합 없음		
S252R, L262Q	1.63E+06	7.96E-03	4.9	결합 없음		
S252R, A378E	2.62E+05	9.27E-03	35.3	약한 결합		
T260E, L309E, Q355L	9.83E+05	9.77E-03	9.9	결합 없음		
T286E, S428R	9.39E+05	6.48E-03	6.9	9.17E+06	1.13E-01	12.3
S290V, R334D	9.31E+05	9.97E-03	10.7	결합 없음		
R301L, E380V, T437L	1.15E+06	1.23E-02	10.7	결합 없음		

[0247]

[0248]

실시예 3: 고양이 IgG1a Fc의 스캐닝 돌연변이유발

[0249]

추가적 항-신경 성장 인자(NGF) 고양이 IgG1a 항체 변이체 세트를 이전에 Gearing 등(2016, *J Vet Intern Med*, 30:1129)에 의해 기술된 가변 도메인을 사용하여 트윈스트 바이오사이언스에서 합성하였다. 이들 항체의 Fc 영역에 대한 변형은 Kanai 등(2000, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 73:53)에 의해 기술된 야생형 고양이 IgG1a Fc 도메인의 참조 서열과 비교하여 아래 표 8 및 표 9에 제시되어 있다. 고양이 IgG1a 작제물을 포유동물 발현 벡터에 서브클로닝하고, ExpiFectamine 293 형질감염제로 Expi293 세포에 형질감염시켰다. IgG1a Fc 변이체를 단백질 A 크로마토그래피로 조건 배지로부터 정제하고, 43mM 소듐 시트레이트, 130mM 소듐 바이카보네이트(pH 6.0)로 제형화하였다. 그런 다음, Carterra 기기를 사용하여 고양이 FcRn에 대한 IgG Fc 변이체의 결합 친화도를 결정하였다. 항체 변이체(대략 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 EDC/NHS 활성화에 의해 HC30M 센서 칩에 아민-커플링시킨 후, 에탄올아민 HCl로 반응을 중지시켰다. pH 6.0의 HBSTE(10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% Tween-20), 0.5% 소 혈청 알부민에서 333nM, 111nM, 37nM, 12.3nM, 4.1nM, 1.37nM 또는 0.45nM의 고양이 FcRn(FCN-F82W3, 아크로바이오시스템즈)을 센서 칩에 흘려 pH 6.0에서의 동역학을 결정하였다. HBSTE 완충액의 pH를 7.4로 조정

한 것을 제외하고는 이러한 동일한 전략을 사용하여 pH 7.4에서 고양이 FcRn에 대한 Fc 변이체의 결합 친화도를 결정하였다.

[0250] IgG 변이체의 고양이 FcRn 결합 동역학은 아래 표 7에 나타나 있다.

표 7

IgG Fc 변이체 및 FcRn 결합 동역학 - II

변이체	pH 6.0			pH 7.4		
	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (nM)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (nM)
아생형	4.72E +05	1.10E -01	232.8	결합 없음		
S254K	5.21E +05	5.57E -02	107.1	결합 없음		
T286D	4.00E +05	3.89E -02	97.4	악한 결합		
T286E	4.89E +05	4.57E -02	93.4	결합 없음		
S290Y	6.61E +05	8.49E -02	128.4	결합 없음		
E293H	4.55E +05	6.65E -02	146.0	결합 없음		
R301L	4.57E +05	4.35E -02	95.2	악한 결합		
L309V	3.53E +05	4.50E -02	127.4	결합 없음		
L309E	4.06E +05	4.15E -02	102.1	결합 없음		
L309Y	6.00E +05	1.18E -01	196.4	결합 없음		
Q311V	6.29E +05	5.05E -02	80.4	결합 없음		
Q311L	5.65E +05	4.99E -02	88.2	결합 없음		
K326D	4.28E +05	5.84E -02	136.4	악한 결합		
R334D	4.23E +05	5.61E -02	132.7	악한 결합		
Q347L	5.44E +05	8.53E -02	156.8	결합 없음		
I377Y	8.37E +05	5.14E -02	61.4	결합 없음		
E380T	5.33E +05	6.20E -02	116.2	악한 결합		
N389c-R	5.02E +05	9.44E -02	188.1	결합 없음		
S426H	3.52E +05	6.02E -02	171.2	결합 없음		
S428H	3.89E +05	6.18E -02	159.0	악한 결합		
S428Y	7.18E +05	1.84E -02	25.6	악한 결합		
T286E, S428H	5.98E +05	2.83E -02	47.3	결합 없음		
R334D, S428R	6.03E +05	4.93E -02	81.7	결합 없음		
R334D, T437L	4.57E +05	4.37E -02	95.7	악한 결합		
R334D, R301L	4.60E +05	4.17E -02	90.7	결합 없음		
S426L, T289H	5.42E +05	6.22E -02	114.8	결합 없음		
S426L, S428H	4.45E +05	4.45E -02	100.0	결합 없음		
S428Y, Q311V	8.93E +05	9.77E -03	10.9	악한 결합		
S428Y, S254R	5.52E +05	2.65E -02	48.1	결합 없음		
S428Y, L309V	8.47E +05	1.12E -02	13.2	악한 결합		
S428H, T289H	3.52E +05	5.26E -02	149.3	결합 없음		

[0251]

[0252] 고양이 FcRn에 대한 고양이 IgG1a Fc 변이체의 결합을 증가시키는 것으로 확인된 아미노산 치환의 목록이 아래 표 8에 제공되어 있다:

표 8

고양이 FcRn 에 대한 증가된 결합 친화도를 나타낸 고양이 IgG1a Fc 변이체에 대한 아미노산 치환의 요약

EU 넘버링에 의한 위치	야생형 고양이 IgG1a Fc	고양이 FcRn 에 대한 변이체의 결합을 향상시키는 고양이 IgG1a Fc 변이체 아미노산 치환(야생형에 비해)
252	S	FYWR
254	S	RK
262	L	QE
286	T	ED
289	T	KH
290	S	VY
293	E	DKH
301	R	L
309	L	VEY
311	Q	RVKL
312	D	T
326	K	D
334	R	D
347	Q	L
355	Q	L
377	I	VY
380	E	DVT
383	I	L
389c	N	R
392	R	E
426	S	LH
428	S	RLMYH
434	S	RYFWH
437	T	L

[0253]

[0254] 실시예 4: FcRn 결합이 증가된 고양이 IgG1a Fc 변이체 및 야생형 고양이 IgG1a의 약동학 연구.

[0255] 약동학(PK) 연구를 12마리의 수컷 및 암컷 고양이를 사용하여 완료하였다. 야생형 고양이 IgG1a Fc 도메인을 보유하는 항체를 포함하는 고양이 IgG1a Fc 변이체를 이전에 Gearing 등(2016, *J Vet Intern Med*, 30:1129)에 의해 기술된 바와 같은 항-NGF 가변 도메인을 사용하여 제조하였다.

[0256] 동물을 무작위로 6개의 그룹으로 나누고, 각 그룹에 수컷 및 암컷을 넣었다. 각 동물에게 2mg/kg의 항체를 단일 정맥내 용량으로 투여하였다. 대략 0.5ml의 전혈을 다음 시점에서 수집하였다: 주사 후 0시간(투여 전), 4시간 및 1일, 2일, 4일, 6일, 10일, 14일, 18일, 22일, 30일, 34일, 38일, 42일. 혈청을 전혈로부터 분리하고, 항-NGF 항체에 특이적인 ELISA에 의해 항체의 존재에 대해 검정하였다. 비선형 혼합 효과(NLME) 모델링을 사용하여 선형 소실이 있는 2-구획 약동학(PK) 모델로 6개의 항-NGF 단일클론 항체(mAb) 변이체의 혈청 농도를 기술하였다(도 46). 집단 매개변수는 Monolix Suite 2019R1(Monolix 버전 2019R1, 프랑스 앙토니 소재: 렉소프트 에스에이에스(Lixoft SAS), 2019)에서 구현된 확률적 근사 기댓값 최대화(stochastic approximation of expectation-maximization: SAEM) 알고리즘을 사용하여 추정하였다. 개별 매개변수는 로그-정규 분포를 갖는 랜덤 변수로 모델링하였다. PK 매개변수는 mAb-일반 계수(typical coefficient)($\beta_{BW,C1} = 0.75$, $\beta_{BW,V1} = \beta_{BW,V2} =$

1, $\beta_{BW,Q} = 2/3$)를 사용하여 체중(BW)에 의존하였다. 개별 매개변수 φ_i 에 대한 방정식(Dong *et al.* 2011. *Clin Pharmacokinet*, 50:131)은 다음과 같다:

$$\varphi_i = \varphi_{pop} \left(\frac{BW_i}{BW_{ref}} \right)^{\beta} e^{\eta}$$

여기서, φ_{pop} 은 집단 일반 매개변수이고, η 은 평균이 0이고 표준 편차가 ω 인 무작위 변수이며, BW_i 는 동물 i 의 체중이고, BW_{ref} 는 2kg의 참조 체중이다.

항체 변이체는 하기 방정식에 따라 제거율, 구획간 교환 계수 및 말초 부피에 대한 범주 공변량(categorical covariate)을 사용함으로써 구별하였다:

$$\varphi_i = \varphi_{pop} e^{(\beta\Omega_i)} e^{\eta}$$

여기서, 개별 변이체 공변량이 범주에 있으면 $\Omega_i = 1$ 이고, 그렇지 않으면 $\Omega_i = 0$ 이다. 야생형(WT) mAb 변이체를 참조로 사용하였다.

변이체당 2마리의 동물에 대한 변이체 WT, S252W, S428Y, S428Y+L309V, S428Y+Q311V 및 S428Y+S254R의 개별적으로 관찰된 혈청 농도는 도 47에 도시되어 있다.

추정된 PK 매개변수는 아래 표 9에 주어진다. 2 mg/kg의 단일 IV 용량을 투여받는 전형적인 2kg의 고양이에 대해 야생형(WT) IgG1a Fc 또는 IgG1a Fc 변이체 S252W, S428Y, S428Y+L309V, S428Y+Q311V 및 S428Y+S254R을 보유하는 단일클론 항체의 예측된 혈청 농도 프로파일은 도 48에 도시되어 있다. 이러한 약동학 연구는 2개 이상의 아미노산 위치에서의 치환의 이점을 확인할 뿐만 아니라, 더욱 중요하게는 시험관내에서 향상된 FcRn 결합을 부여하는 고양이 IgG Fc 도메인에 대한 아미노산 변형이 또한 생체내에서 이러한 IgG Fc 변이체의 반감기를 연장시키기에 충분하다는 것을 보여준다.

표 9

2 kg 체중의 고양이에 대한 PK 매개변수 추정치

변이체	Cl (ml/일)	V1 (ml)	Q (ml/일)	V2 (ml)	α -T _{1/2} (시)	β -T _{1/2} (일)
WT	24.61	77.88	35.49	63.79	14.11	4.648
S428Y+L309V	9.423	77.88	23.32	72.65	24.30	12.22
S428Y+Q311V	11.86	77.88	18.16	71.21	29.05	10.22
S428Y+S254R	15.38	77.88	90.85	89.62	7.263	7.929
S252W	13.37	77.88	25.01	52.75	19.04	7.440
S428Y	13.37	77.88	32.44	48.70	14.40	7.002

실시예 5: C1 바이오센서를 사용한 고양이 FcRn에 대한 고양이 IgG1a 변이체의 결합 동역학

여러 고양이 IgG1a 변이체(S252W, L309V, Q311V, S428Y, S428Y+Q311V, S428Y+254R, S428Y+L309V, S428Y+Q311V+T286E, S428Y+Q311V+E380T, S428Y+L309V+T286E 및 S428Y+L309V+E380T)를 pH 5.9에서 고양이 FcRn(GenBank KF773786[고양이 FcRn 대형 서브유닛 p51] 및 유럽 뉴클레오타이드 아카이브 AY829266.1[고양이 베타-2-마이크로글로불린])에 대한 결합 동역학에 대해 평가하였다. EU 넘버링을 사용하여 위치를 확인하였다 (도 4). 이 연구에서, 단일 아미노산 치환 또는 아미노산 치환의 조합을 보유하는 고양이 Fc 변이체를 Gearing DP 등(2016, *J Vet Intern Med*, 30:1129)에 기술되어 있는 가변 도메인을 사용하여 고양이 IgG1a(Kanai *et al.*, 2000, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 73:53)로 합성하였다. 합성된 고양이 IgG1a 변이체 DNA를 포유동물 발현 벡터에 서브클로닝하고, CHO 세포를 일시적으로 형질감염시켰다. 단백질 A 크로마토그래피를 사용하여 조

건 배지를 정제하였다.

[0267] 고양어 FcRn 결합 실험을 위해, 모든 검정은 25℃에서 비아코어 8K+ 시스템에서 완료하였다. 이 일련의 실험에서, 표준 아민 커플링 시약을 사용하여 시리즈 S C1 센서 칩에 항체를 고정화하였다. 200 mmol/ℓ 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필) 카보다이이미드 하이드로클로라이드(EDC)와 50 mmol/ℓ N-하이드록시석신이미드(NHS)의 혼합물을 420초 동안 주입하여 표면을 활성화하였다. 그런 다음, 항체를 10mM 소듐 아세테이트(pH 5.0)에 0.5 μg/ml 내지 2 μg/ml의 농도로 120초 동안 주입하였다. 마지막으로, 1M 에탄올아민을 420초 동안 주입하였다. 전개 완충액은 pH 5.9로 조정된 1X PBS-P+(사이티바(Cytiva), Cat # 28995084)였다.

[0268] pH 5.9에서 고양어 FcRn에 대한 고양어 IgG1a 변이체의 결합 친화도를 평가하기 위해, 1.56nM 내지 2000nM 농도 범위 고양어 FcRn을 선택하고, 단일 주기 모드로 주입하였다. 각 변이체에 대해 테스트된 고양어 FcRn의 농도는 아래 표 10에 나타나 있다.

표 10

각 고양어 IgG1a 변이체에 사용된 고양어 FcRn의 농도

변이체	FcRn의 농도 [nM]
아생형	31.25, 125, 500, 2000
고양어 gG1a-S252W	1.56, 6.25, 25, 100
고양어 gG1a-L309V	31.25, 125, 500, 2000
고양어 gG1a-Q311V	31.25, 125, 500, 2000
고양어 gG1a-S428Y	7.81, 31.25, 125, 500
고양어 gG1a-S428Y-Q311V	7.81, 31.25, 125, 500
고양어 gG1a-S428Y-S254R	7.81, 31.25, 125, 500
고양어 gG1a-S428Y-L309V	7.81, 31.25, 125, 500
고양어 gG1a-S428Y-Q311V-T286E	1.56, 6.25, 25, 100
고양어 gG1a-S428Y-Q311V-E380T	1.56, 6.25, 25, 100
고양어 gG1a-S428Y-L309V-T286E	1.56, 6.25, 25, 100
고양어 gG1a-S428Y-L309V-E380T	1.56, 6.25, 25, 100

[0269]

[0270] 항체당 4가지 농도를 90초 동안 5 μℓ/분으로 주입한 후 180초 동안 해리시켰다. 각 농도 시리즈를 적절한 참조 빼기를 위해 적어도 세 번의 완충액-전용 주기로 이 형식으로 3회 주입하였다. 표면을 30초 동안 1X PBS-P+(pH 7.4)의 2회 주입에 이어 60초 대기 명령(wait command)으로 재생시켰다. 분석 전에 표면을 안정화하기 위해 세 가지 시작 주기를 포함시켰다.

[0271] 데이터는 1:1 동역학 상호작용 모델에 피팅하거나 또는 정상 상태 친화도에 피팅함으로써 Insight 평가 소프트웨어를 사용하여 평가하였다. U-값 및 T-값을 포함한 품질 매트릭(Quality metric)을 사용하여 허용되는 매개변수를 선택하였다. 15 미만의 U-값을 동역학 속도 상수에 대해 허용 가능한 것으로 간주한 반면, 100 초과 T-값을 동역학 속도 상수에 대해 허용 가능한 것으로 간주하였다. 이러한 값을 벗어나는 경우, 정상 상태 친화도 매개변수는 허용 가능한 것으로 간주하였다.

[0272] 고양어 IgG1a 변이체에 대한 동역학 데이터는 아래 표 11에 나타나 있고, 센서그램은 도 49a 내지 도 49l에 도시되어 있다.

표 11

고양이 IgG1a 변이체 및 고양이 FcRn 결합 동역학

변이체	k_a	k_d	K_D	데이터 피팅 방법
야생형			1.06E-06	정상 상태 친화도
고양이IgG1a-S252W	1.06E+06	4.24E-03	4.01E-09	1:1 동역학 상호작용 모델
고양이IgG1a-L309V			4.27E-07	정상 상태 친화도
고양이IgG1a-Q311V			3.34E-07	정상 상태 친화도
고양이IgG1a-S428Y	9.02E+05	6.42E-02	7.18E-08	1:1 동역학 상호작용 모델
고양이IgG1a-S428Y-Q311V	8.27E+05	2.66E-02	3.22E-08	1:1 동역학 상호작용 모델
고양이IgG1a-S428Y-S254R	1.15E+06	9.31E-02	8.12E-08	1:1 동역학 상호작용 모델
고양이IgG1a-S428Y-L309V	8.80E+05	3.10E-02	3.53E-08	1:1 동역학 상호작용 모델
고양이IgG1a-S428Y-Q311V-T286E	1.27E+06	7.78E-03	6.11E-09	1:1 동역학 상호작용 모델
고양이IgG1a-S428Y-Q311V-E380T	1.60E+06	3.22E-02	2.01E-08	1:1 동역학 상호작용 모델
고양이IgG1a-S428Y-L309V-T286E	1.34E+06	7.02E-03	5.26E-09	1:1 동역학 상호작용 모델
고양이IgG1a-S428Y-L309V-E380T	1.63E+06	3.34E-02	2.06E-08	1:1 동역학 상호작용 모델

[0273]

[0274]

실시예 6: 2개 또는 3개의 Fc 치환을 갖는 고양이 IgG1a Fc 변이체 및 야생형 고양이 IgG1a의 약동학 연구

[0275]

약동학(PK) 연구를 14마리의 수컷 및 암컷 고양이를 사용하여 완료하였다. 야생형 고양이 IgG1a Fc 도메인을 보유하는 항체를 포함하는 고양이 IgG1a Fc 변이체를 이전에 Gearing 등(2016, *J Vet Intern Med*, 30:1129)에 의해 기술된 바와 같은 항-NGF 가변 도메인을 사용하여 제조하였다. 이 연구에서 테스트된 고양이 IgG1a 변이체는 다음을 포함하였다: S428Y+L309V, S428Y+Q311V, S428Y+Q311V+T286E, S428Y+L309V+E380T, S428Y+Q311V+E380T, S428Y+L309V+T286E, 야생형.

[0276]

동물을 무작위로 7개의 그룹으로 나누고, 각 그룹에 수컷 및 암컷을 넣었다. 각 동물에게 2mg/kg의 항체의 단일 정맥 용량을 투여하였다. 대략 0.5mL의 전혈을 다음 시점에서 수집하였다: 주사 후 0시간(투여 전), 4시간 및 1일, 2일, 4일, 6일, 10일, 14일, 18일, 22일, 30일, 34일, 38일, 42일. 혈청을 전혈로부터 분리하고, 고양이 항-NGF 항체에 특이적인 ELISA에 의해 항체의 존재에 대해 검정하였다. 비선형 혼합 효과(NLME) 모델링을 사용하여 선형 소실이 있는 2-구획 약동학(PK) 모델로 7개의 항-NGF 단일클론 항체(mAb) 변이체에 대한 혈청 농도를 기술하였다. 집단 매개변수는 Monolix Suite 2019R1(Monolix 버전 2019R1, 프랑스 앙토니 소재: 리소프트 에스에이에스, 2019)에서 구현된 확률적 근사 기댓값 최대화(SAEM) 알고리즘을 사용하여 추정하였다. 실시예 4에 기술된 PK 연구로부터의 S428Y+Q311V, S428Y+L309V 및 야생형의 혈청 농도를 위와 같이 모델링하고, 이들 계산에 포함시켰다. 개별 매개변수는 로그-정규 분포를 갖는 랜덤 변수로 모델링하였다. PK 매개변수는 mAb-일반 계수($\beta_{BW,C1} = 0.75$, $\beta_{BW,V1} = \beta_{BW,V2} = 1$, $\beta_{BW,Q} = 2/3$)를 사용하여 체중(BW)에 의존하였다. 개별 매개변수 φ_i 에 대한 방정식(Dong et al. 2011, *Clin Pharmacokinet*, 50:131)은 다음과 같다:

[0277]

$$\varphi_i = \varphi_{pop} \left(\frac{BW_i}{BW_{ref}} \right)^\beta e^\eta$$

[0278]

여기서, φ_{pop} 은 집단 일반 매개변수이고, η 은 평균이 0이고 표준 편차가 ω 인 무작위 변수이며, BW_i 는 동물의 체중이고, BW_{ref} 는 2kg의 참조 체중이다.

[0279]

항체 변이체는 하기 방정식에 따라 제거율, 구획간 교환 계수 및 말초 부피에 대한 범주 공변량을 사용함으로써 구별하였다:

[0280]

$$\varphi_i = \varphi_{pop} e^{(\beta \Omega_i)} e^\eta$$

[0281]

여기서, 개별 변이체 공변량이 범주에 있으면 $\Omega_i = 1$ 이고, 그렇지 않으면 $\Omega_i = 0$ 이다. 야생형(WT) mAb를 참조로 사용하였다.

[0282]

추정된 PK 매개변수는 아래 표 12에 주어진다.

표 12

2 kg 체중의 고양이에 대한 PK 매개변수 추정치

변이체	Cl (mL/일)	V1 (mL)	Q (mL/일)	V2 (mL)	α $T_{1/2}$ (시)	β $T_{1/2}$ (일)
야생형	22.85	76.46	31.85	55.4	14.6	4.597
S428Y+Q311V+T286E	9.383	76.46	31.85	55.4	15.89	10.28
S428Y+L309V+E380T	10.69	76.46	31.85	55.4	15.77	9.102
S428Y+L309V	10.79	76.46	31.85	55.4	15.76	9.017
S428Y+Q311V	11.46	76.46	31.85	55.4	15.69	8.527
S428Y+Q311V+E380T	11.58	76.46	31.85	55.4	15.68	8.448
S428Y+L309V+T286E	13.32	76.46	31.85	55.4	15.51	7.423

[0283]

[0284]

변이체당 2마리의 동물에 대한 야생형 및 Fc 변이체 S428Y+Q311V, S428Y+Q311V+T286E, S428Y+Q311V+E380T, S428Y+L309V, S428Y+L309V+T286E 및 S428Y+L309V+E380T의 개별적으로 관찰된 혈청 농도는 도 50에 도시되어 있다.

[0285]

2 mg/kg의 단일 IV 용량을 투여받은 전형적인 2kg의 고양이에 대한 야생형(WT) IgG1a Fc 또는 IgG1a Fc 변이체 S428Y+Q311V, S428Y+Q311V+T286E, S428Y+Q311V+E380T, S428Y+L309V, S428Y+L309V+T286E 및 S428Y+L309V+E380T를 보유하는 단일클론 항체의 예측된 혈청 농도 프로파일은 도 51에 도시되어 있다. 이러한 약동학 연구는 2개 이상의 아미노산 위치에서의 치환의 이점을 확인할 뿐만 아니라, 더욱 중요하게는 시험관내에서 향상된 FcRn 결합을 부여하는 고양이 IgG Fc 도메인에 대한 아미노산 변형이 또한 생체내에서 이러한 IgG Fc 변이체의 반감기를 연장시키기에 충분하다는 것을 보여준다.

[0286]

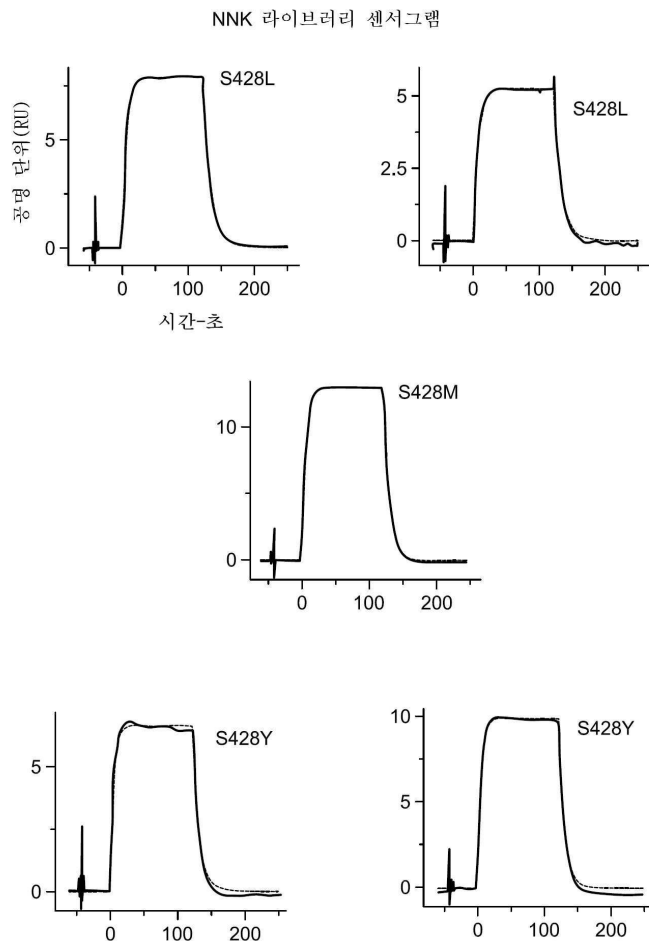
다른 실시형태

[0287]

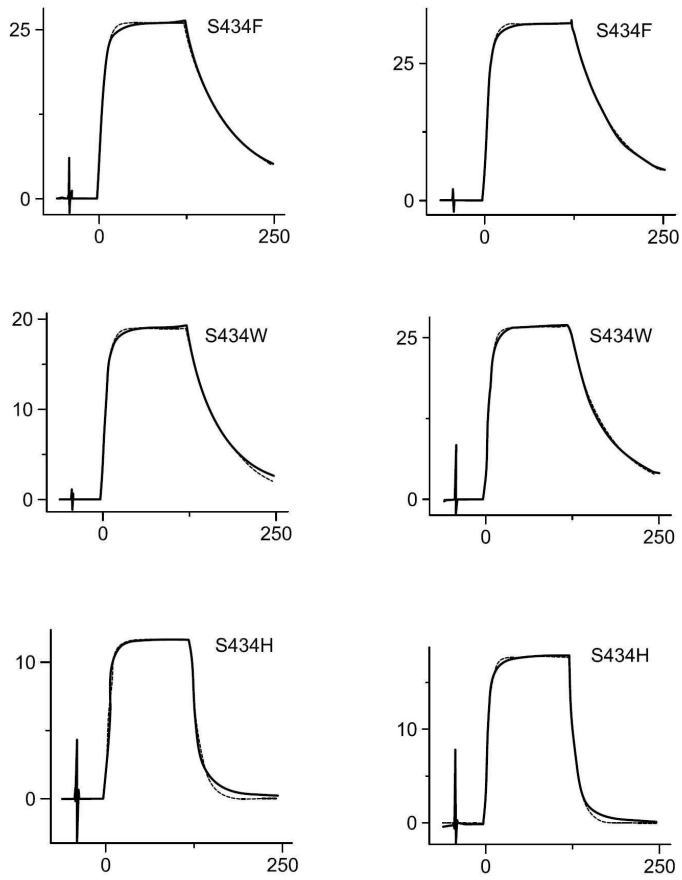
본 발명은 상세한 설명과 함께 설명되었지만, 전술한 설명은 첨부된 청구범위에 의해 정의되는 본 발명의 범위를 예시하기 위한 것으로 제한하기 위한 것이 아니다. 다른 양태, 이점 및 수정은 다음 청구범위 내에 있다.

도면

도면1aa

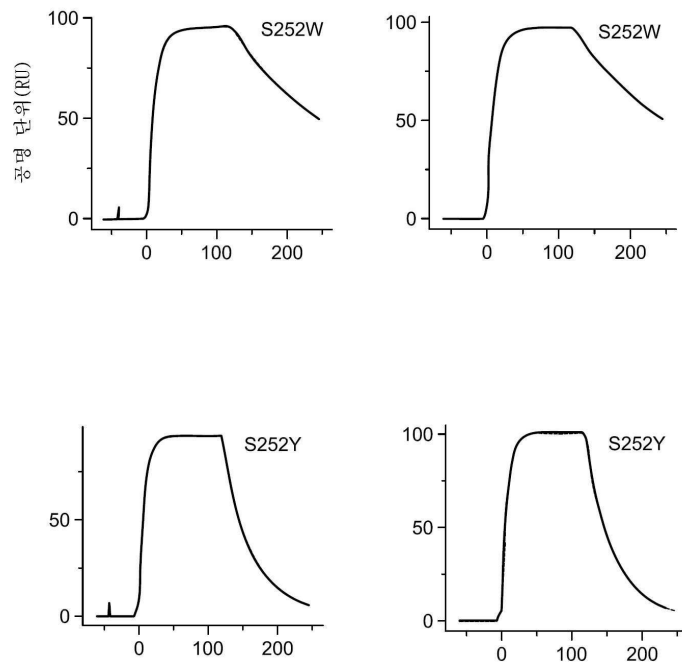


도면1ab

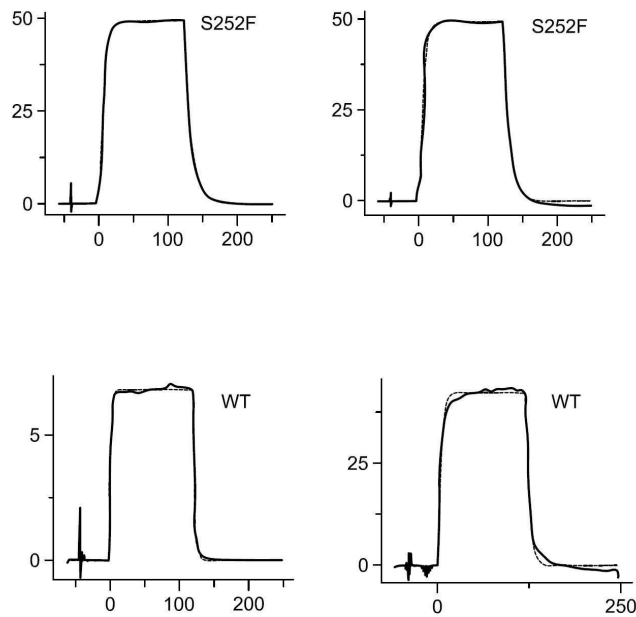


도면2aa

NNK 라이브러리 센서그램



도면2ab



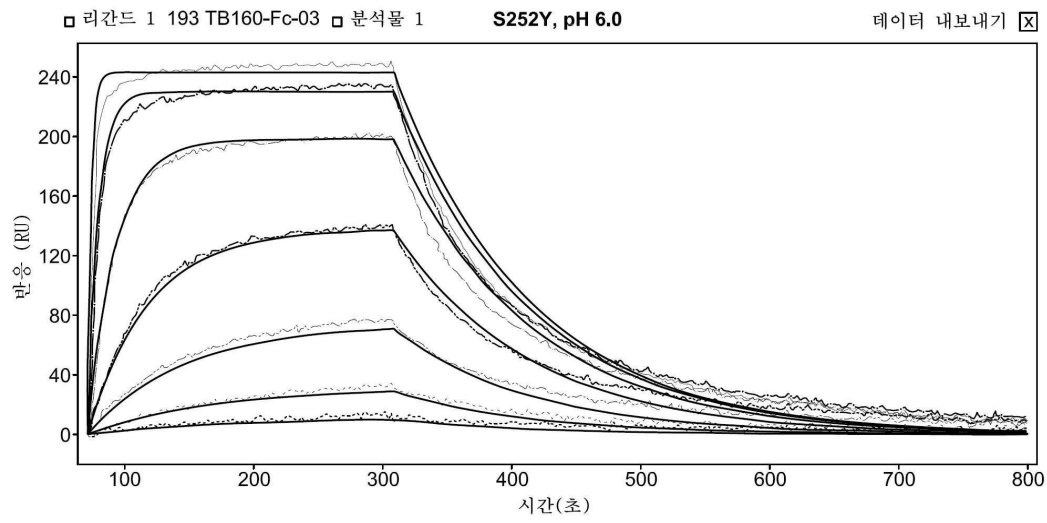
도면3

		1		60
고양이	IgG1a	(1)	ASTTAPSVFPLAPSCGTTSGATVALACLVLYGFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQAS	
고양이	IgG1b	(1)	ASTTAPSVFPLAPSCGTTSGATVALACLVLYGFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQAS	
고양이	IgG2	(1)	ASTTASSVFPLAPSCGTTSGATVALACLVLYGFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQAS	
		61		120
고양이	IgG1a	(61)	GLYSLSSMVTVPSSRWLSDTFTCNVAHPSPNTKVDKTVRKTDHPPGPKPCDCPKCPPPEM	↓ ↓ ↓
고양이	IgG1b	(61)	GLYSLSSMVTVPSSRWLSDTFTCNVAHPSPNTKVDKTVRKTDHPPGPKPCDCPKCPPPEM	
고양이	IgG2	(61)	GLYSLSSMVTVPSSRWLSDTFTCNVAHRPSSTKVDKTVPKTASTIESKTGEGPKCPVPEI	▲
		121		180
고양이	IgG1a	(121)	LGGPSIFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCVLVDLGPDDSDVQITWFVDNTQVYTAKTSPREE	
고양이	IgG1b	(121)	LGGPSIFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCVLVDLGPDDSDVQITWFVDNTQVYTAKTSPREE	
고양이	IgG2	(121)	PGAPSVFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCVLVDLGPDDSDVQITWFVDNTEMHTAKTRPREE	
		181		240
고양이	IgG1a	(181)	QFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPIERTISKAKGQPHEPQVYVLPPEA	
고양이	IgG1b	(181)	QFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPIERTISKDKGQPHEPQVYVLPPEA	
고양이	IgG2	(181)	QFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSAMERTISKAKGQPHEPQVYVLPPT	
		241		300
고양이	IgG1a	(241)	QEELSRNKVSVTCLIKSFHPPDIAVEWEITGQPEPENNYRTTPQLDSGTYFVYSKLSV	
고양이	IgG1b	(241)	QEELSRNKVSVTCLIEGFYPSDIAVEWEITGQPEPENNYRTTPQLDSGTYFLYSRLSV	
고양이	IgG2	(241)	QEELSENKVSVTCLIKGFHPPDIAVEWEITGQPEPENNYQTTPQLDSGTYFLYSRLSV	
		301		335
고양이	IgG1a	(301)	DRSHWQRGNTYTCSVSHEALHSHHTQKSLTQSPGK	
고양이	IgG1b	(301)	DRSRWQRGNTYTCSVSHEALHSHHTQKSLTQSPGK	
고양이	IgG2	(301)	DRSHWQRGNTYTCSVSHEALHSHHTQKSLTQSPGK	

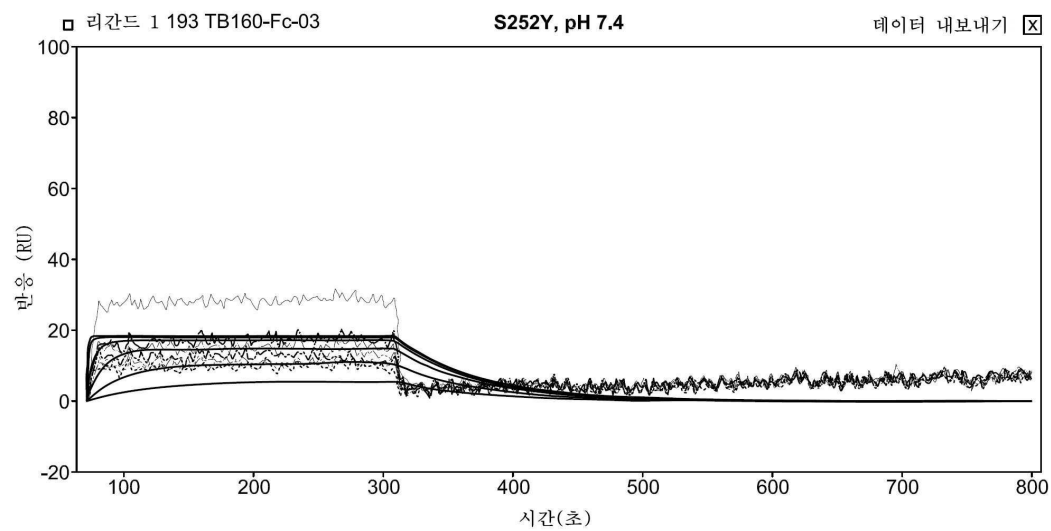
도면4

	240		260		280		300
고양이	IgG1a Fc	IFIFPPKPKD	TLSISRTPEV	ICLVVDLGPD	DSVQITWV	DNTQVYTA	KISPREEQFNST
인간	IgG1 Fc	VLFPPKPKD	TLMISRTPEV	TCVVVDVSHE	DPEVKFNWV	DGVEVHNAKT	KPREEQFNST
							YRVVSVLTVL
	310		330		350		370
고양이	IgG1a Fc	HQDWLKGKEF	KCKVNSKSLP	SPIERTISKA	KGQPHEPQVY	VLPPAQEELS	RNKVSVTCLI
인간	IgG1 Fc	HQDWLNGKEY	KCKVNSKALP	APIEKTISKA	KGQPREPQVY	TLPPSREEMT	KNQVSLTCLV
							KGFYPSDIAV
	380	389a	389b	389c	390	400	420
고양이	IgG1a Fc	EWETGQPEP	ENNYRTTPQLD	SDGTYFVYSK	LSVDRSHWQR	GNTYTCSVSH	EALHSHHT
인간	IgG1 Fc	EWESNGQPEN	NYKTTPPVLD	SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	GNVFSCVMH	EALHNHYT
						430	

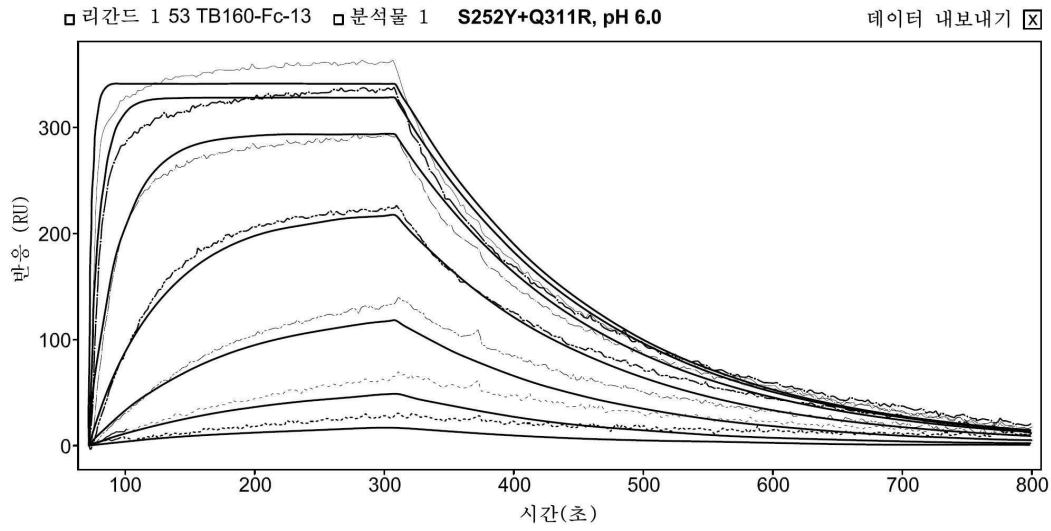
도면5a



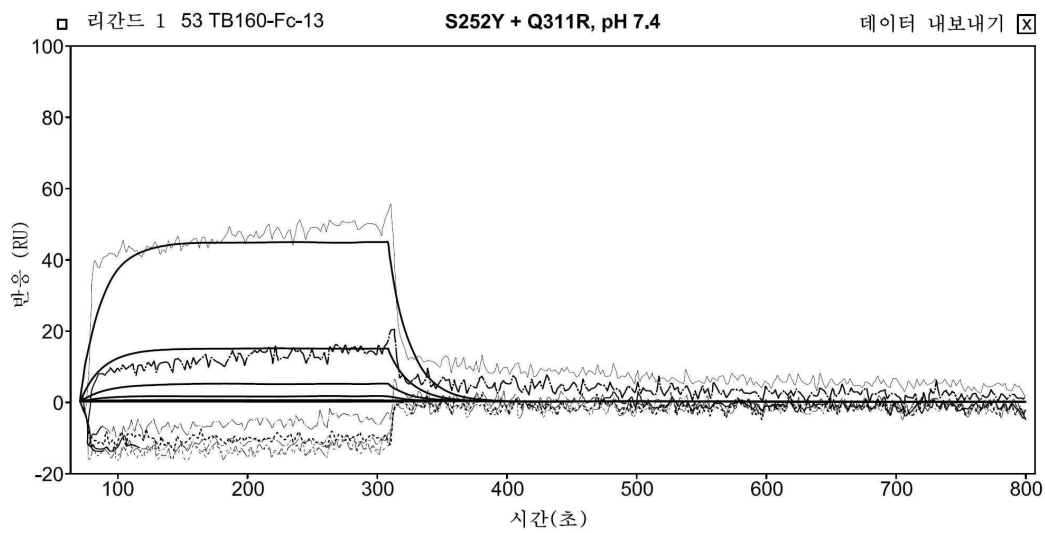
도면5b



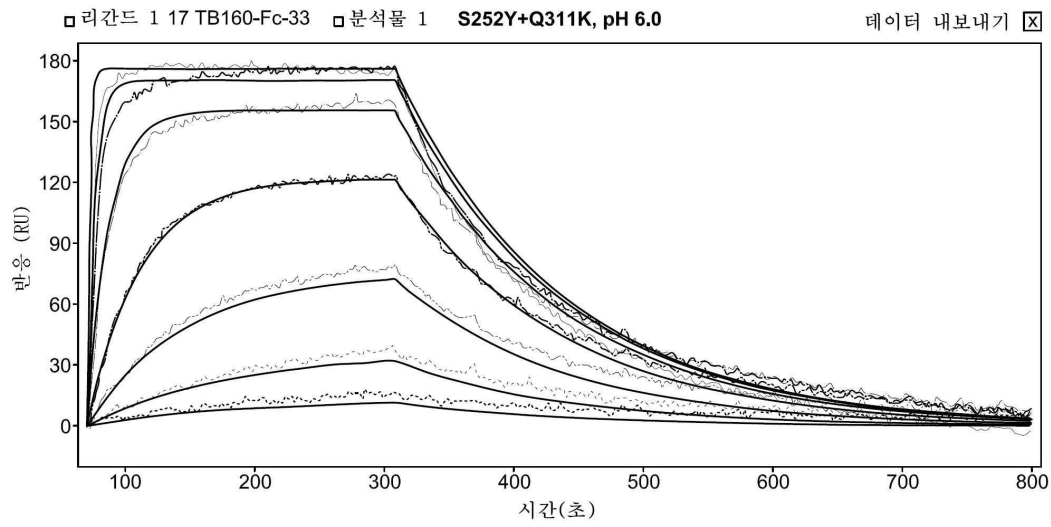
도면6a



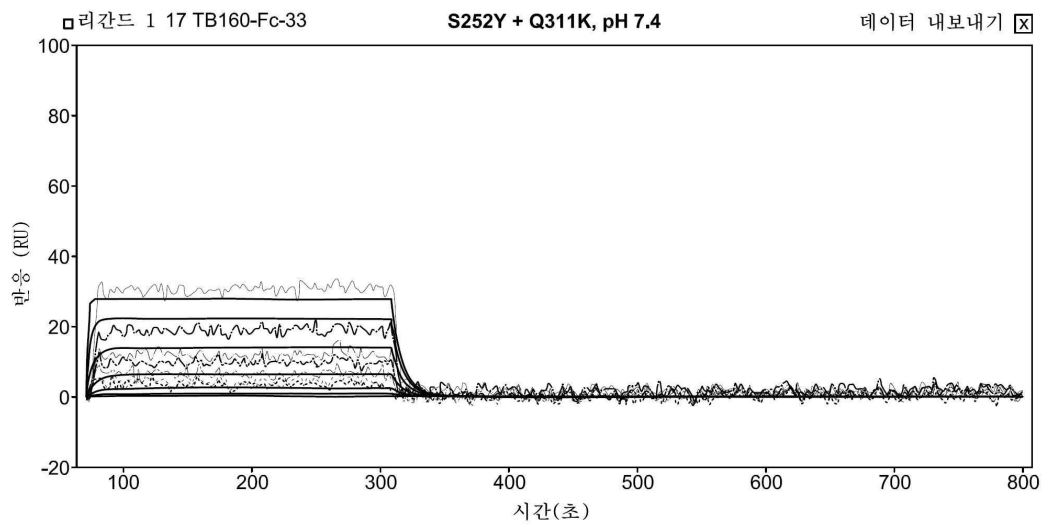
도면6b



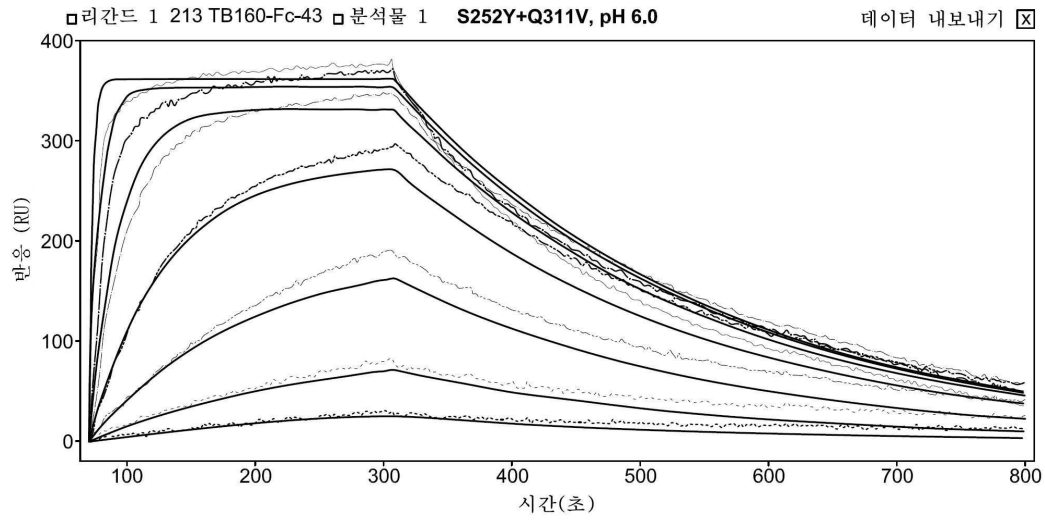
도면7a



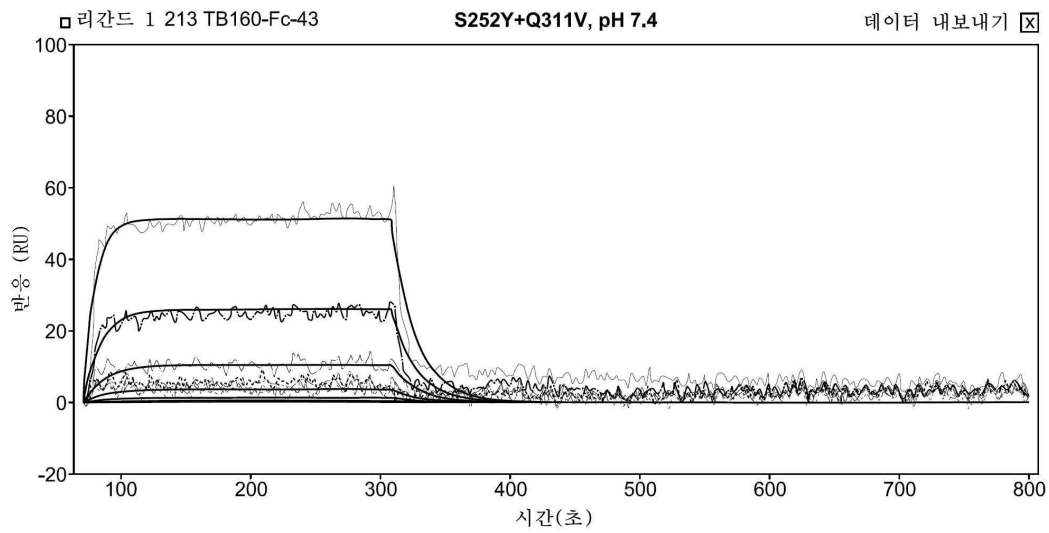
도면7b



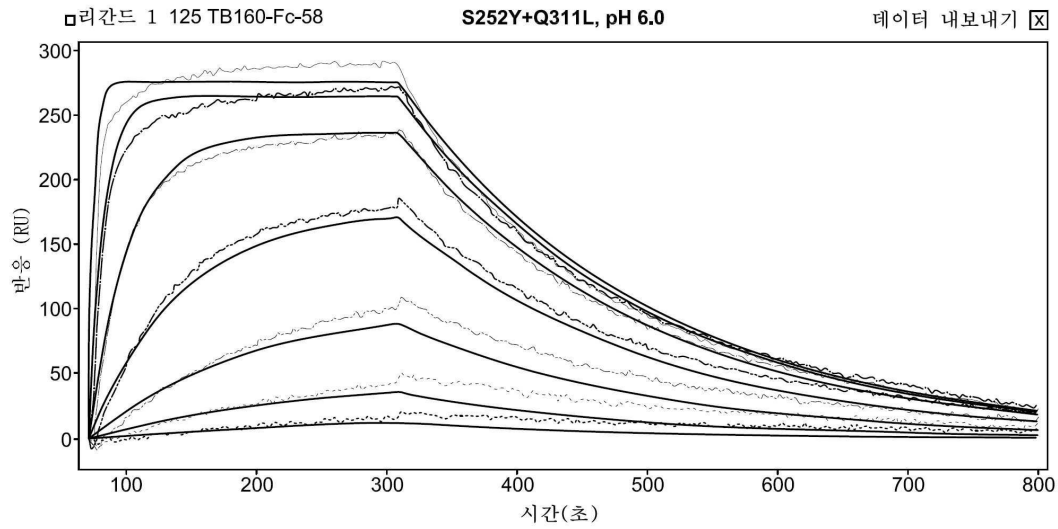
도면8a



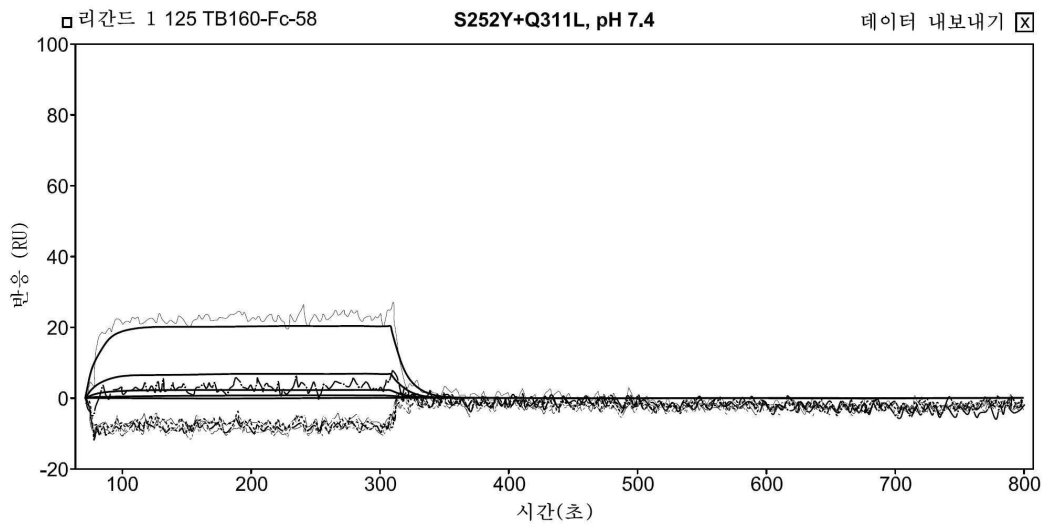
도면8b



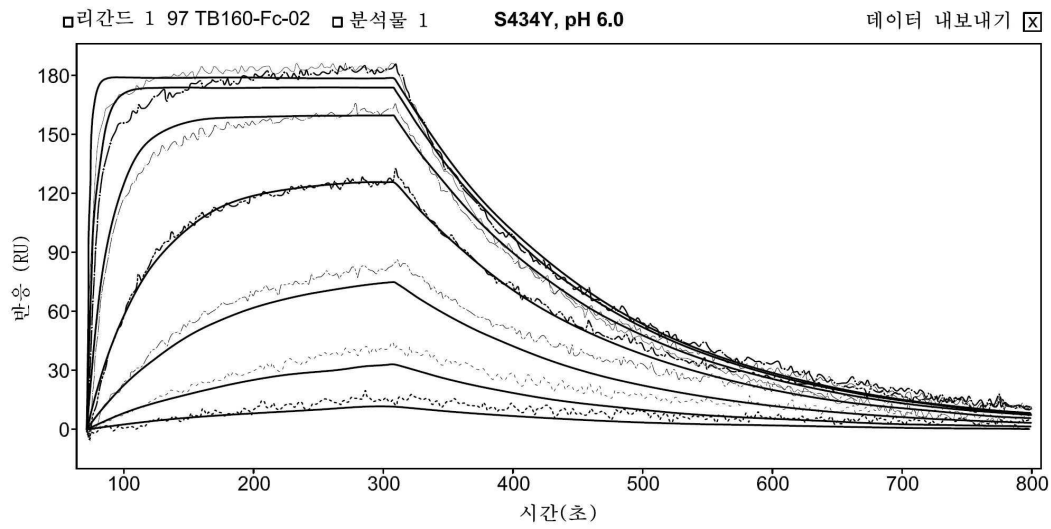
도면9a



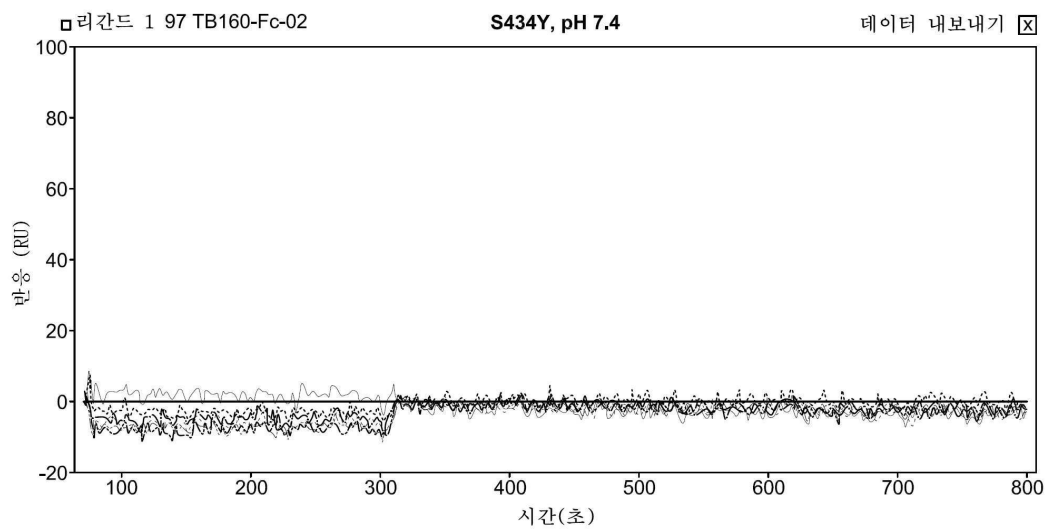
도면9b



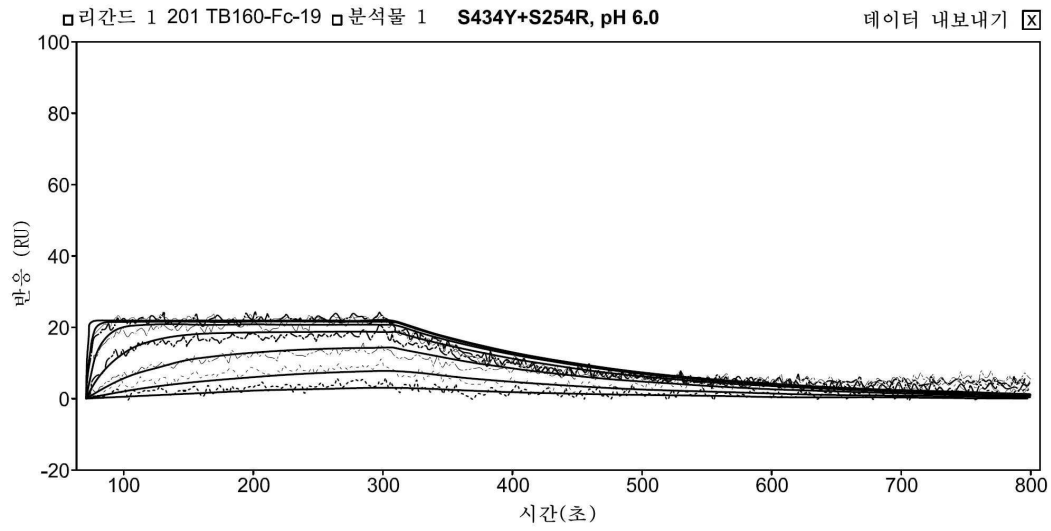
도면10a



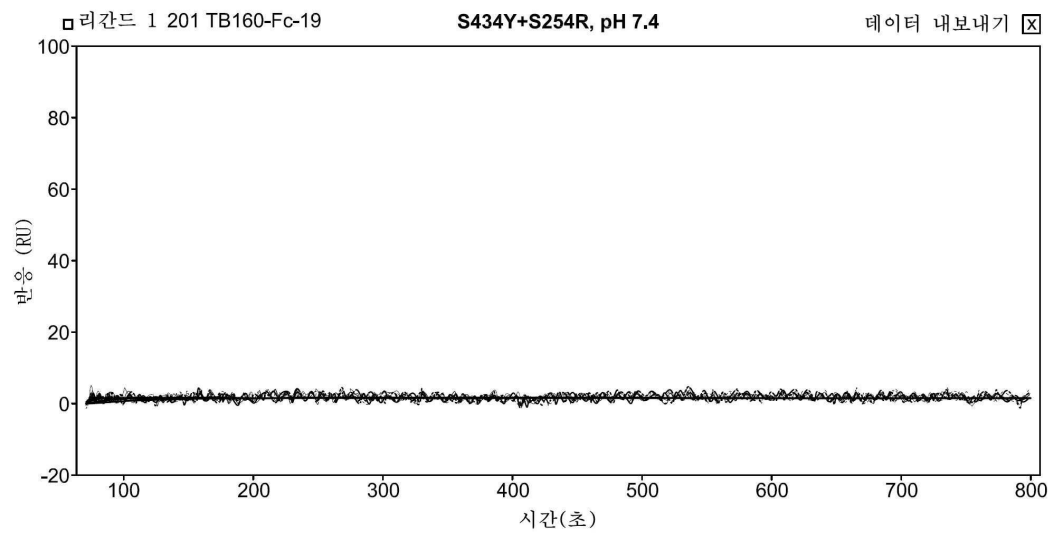
도면10b



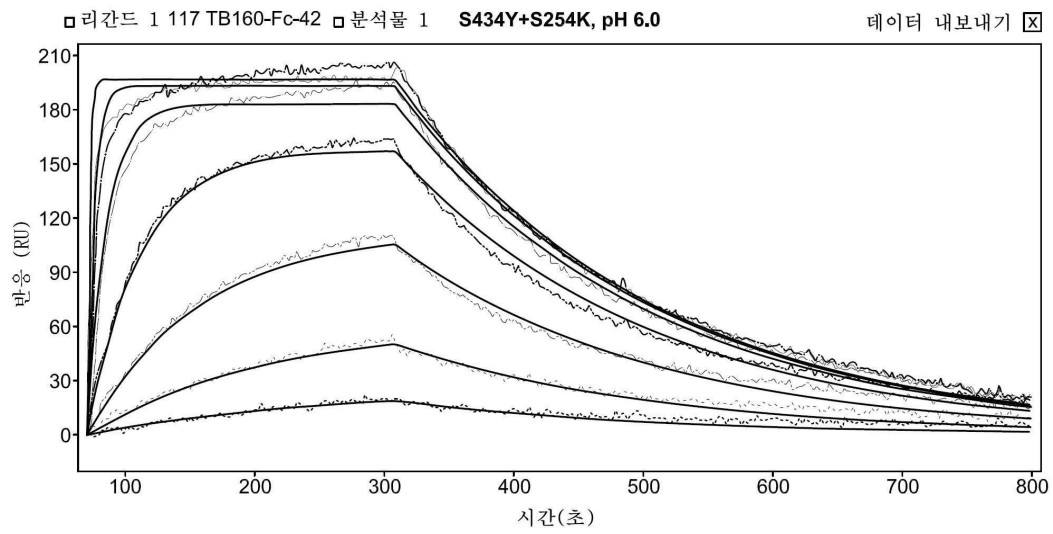
도면11a



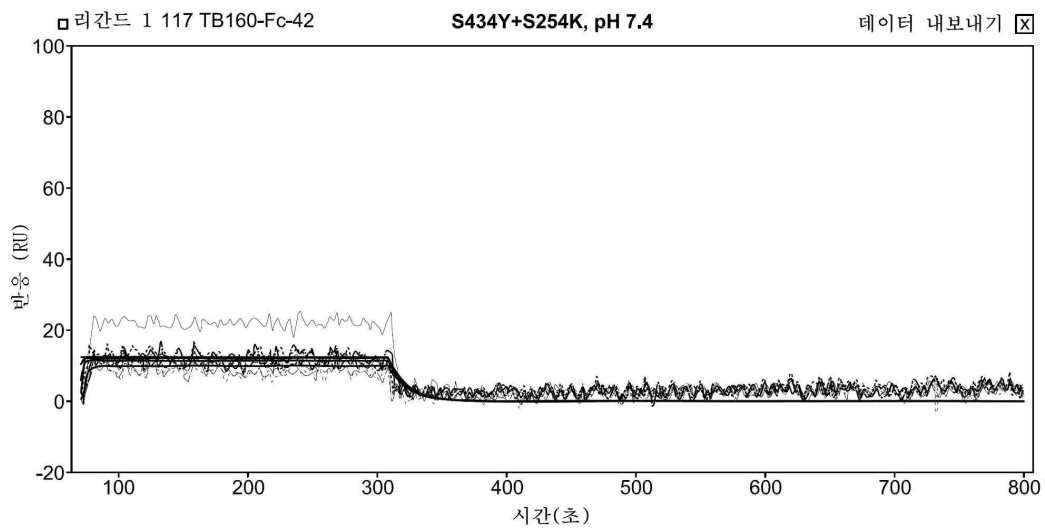
도면11b



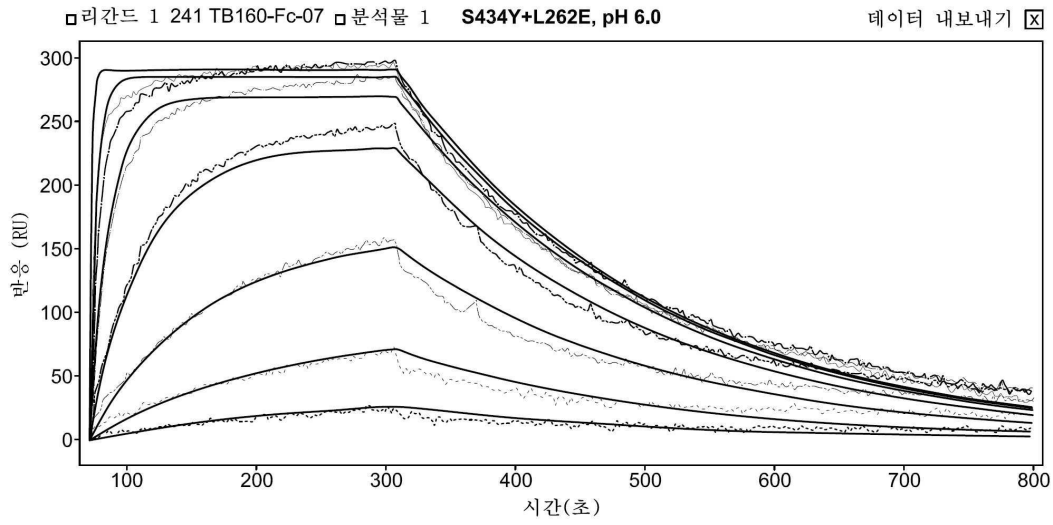
도면12a



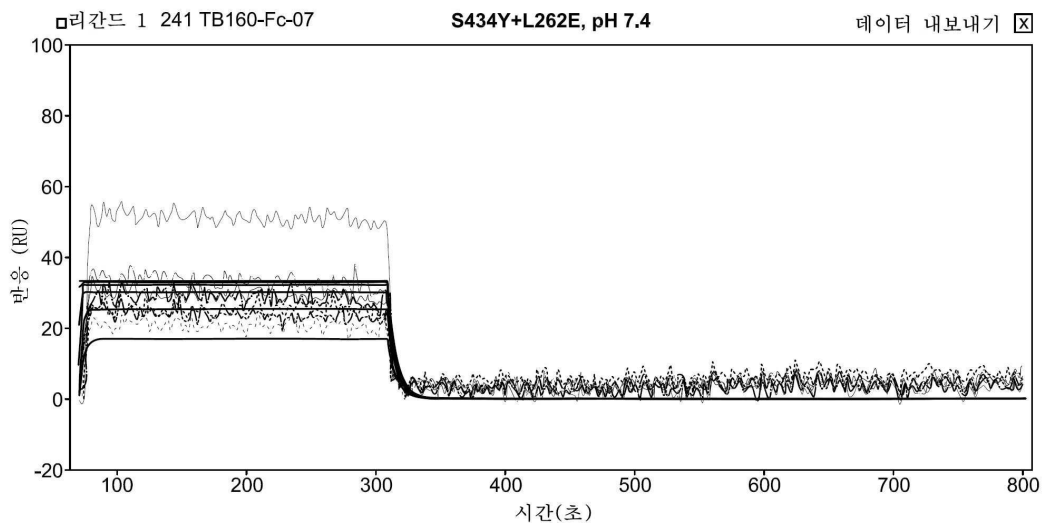
도면12b



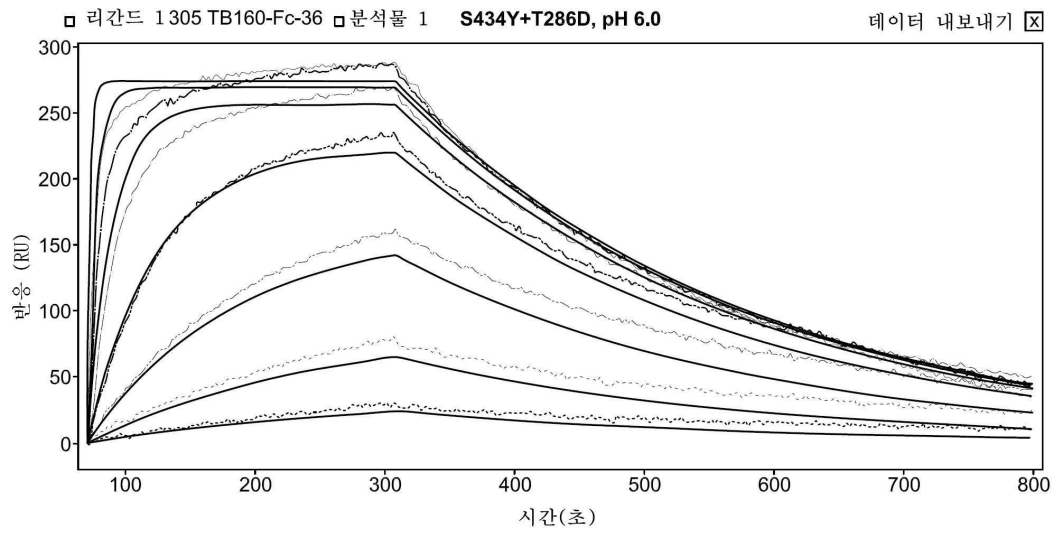
도면13a



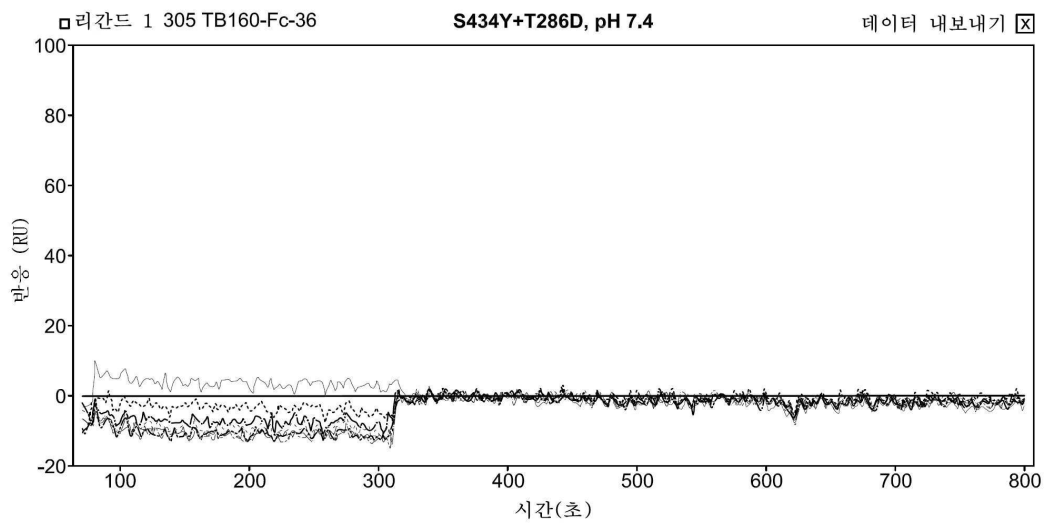
도면13b



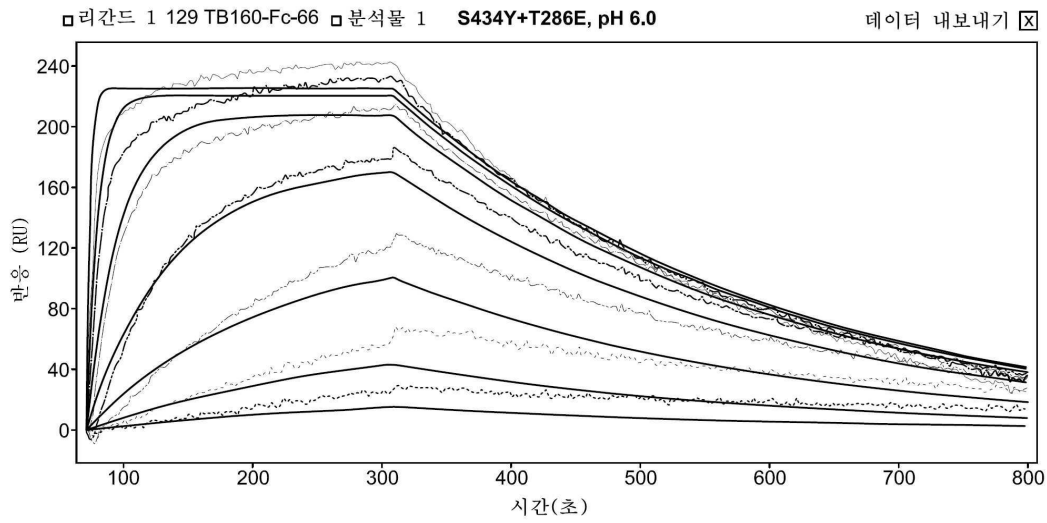
도면14a



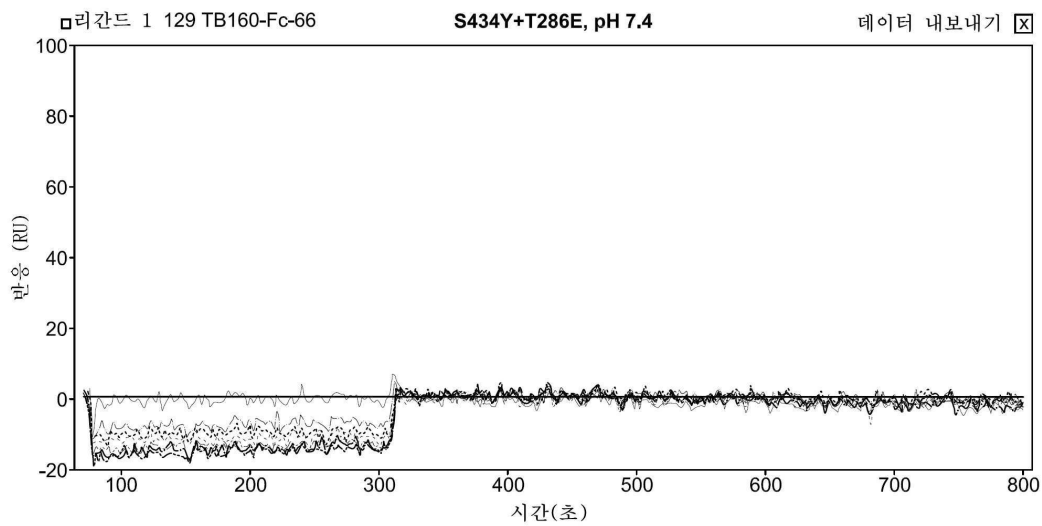
도면14b



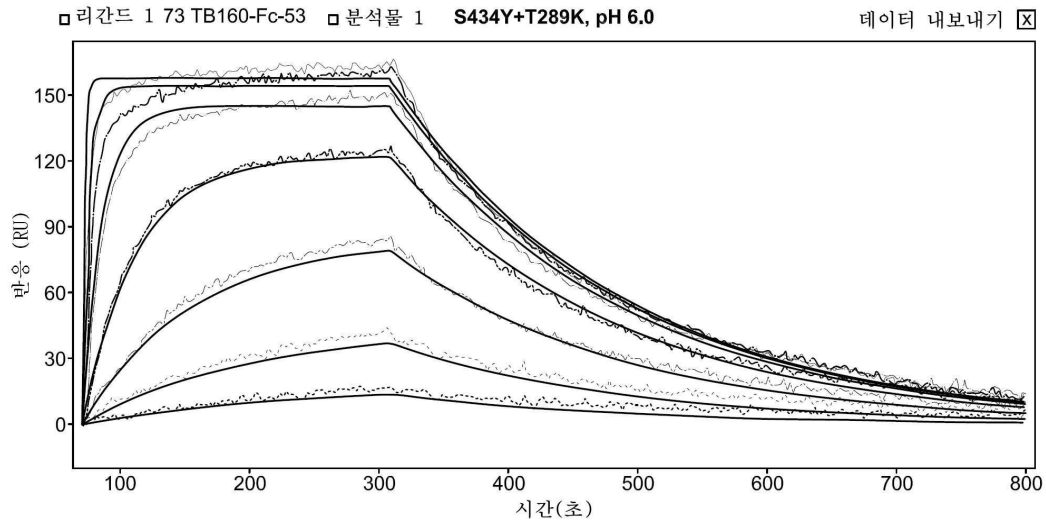
도면15a



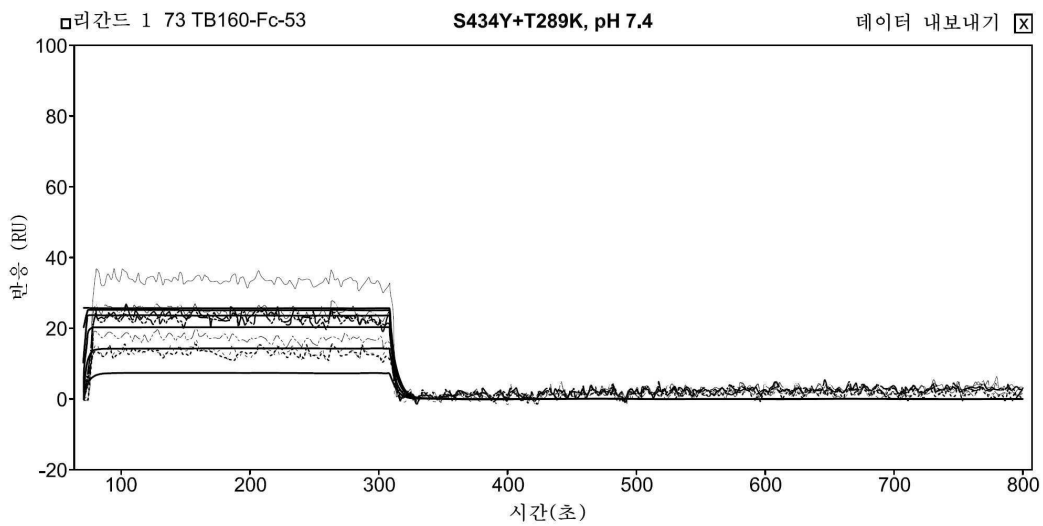
도면15b



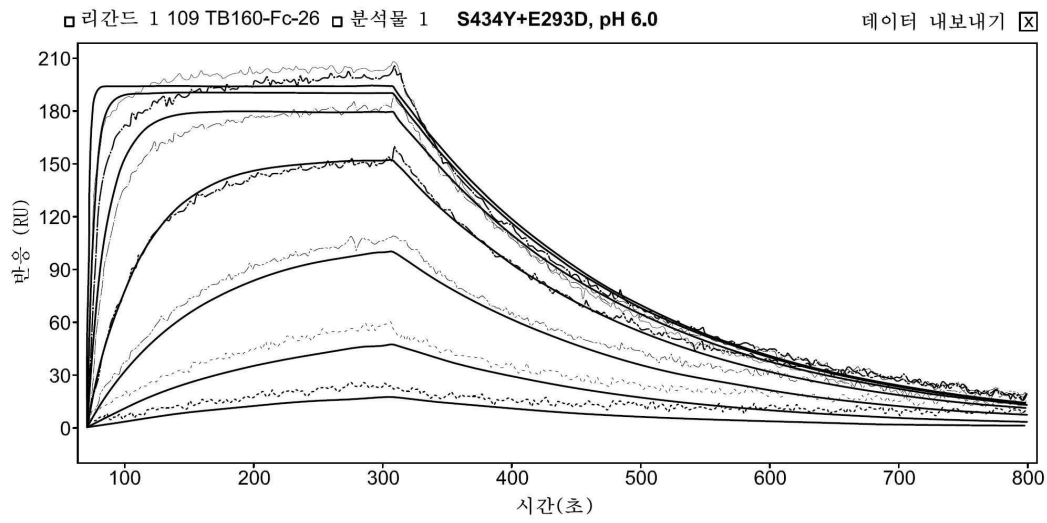
도면16a



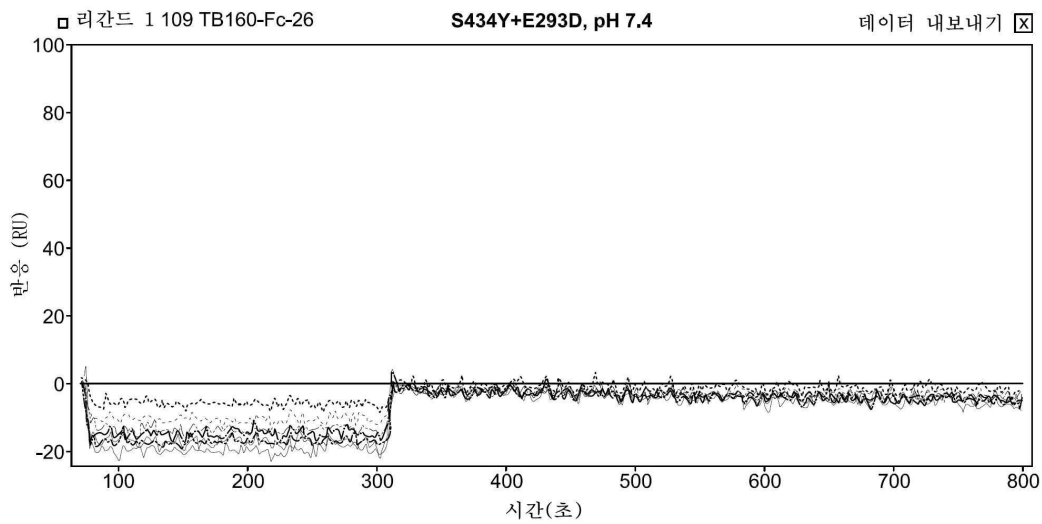
도면16b



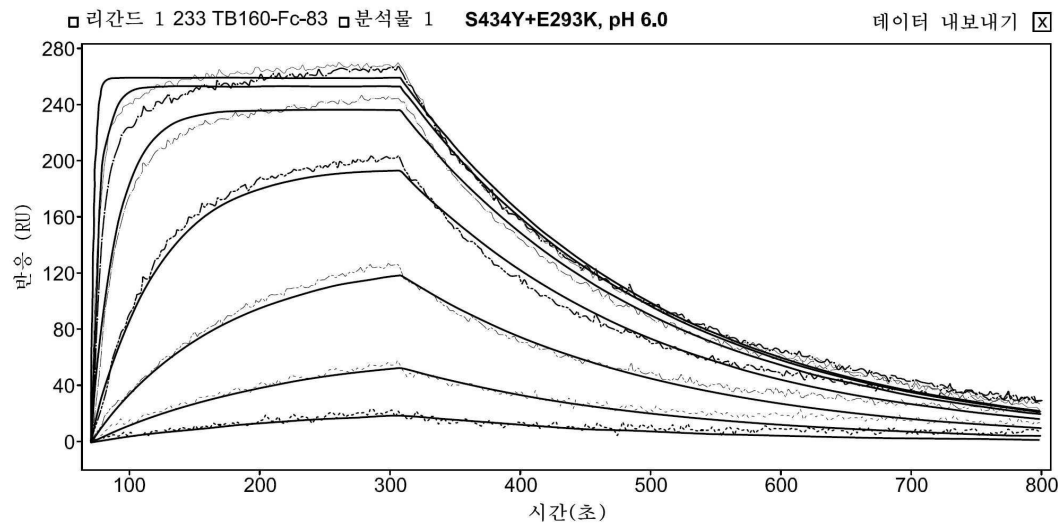
도면17a



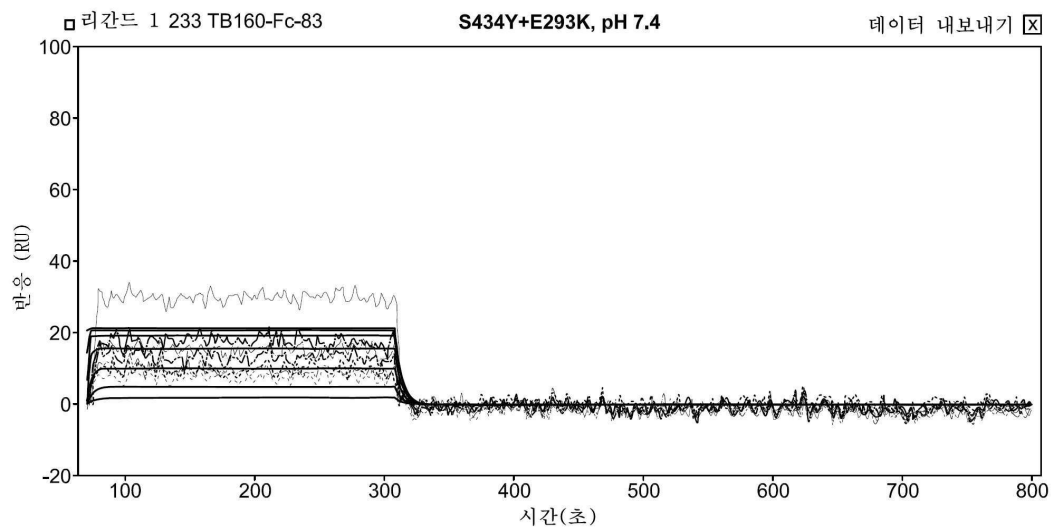
도면17b



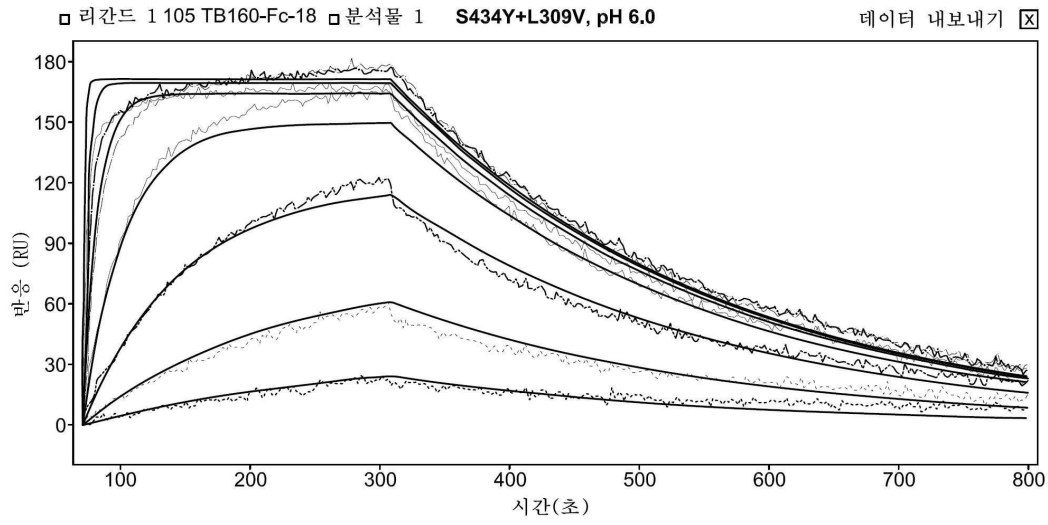
도면18a



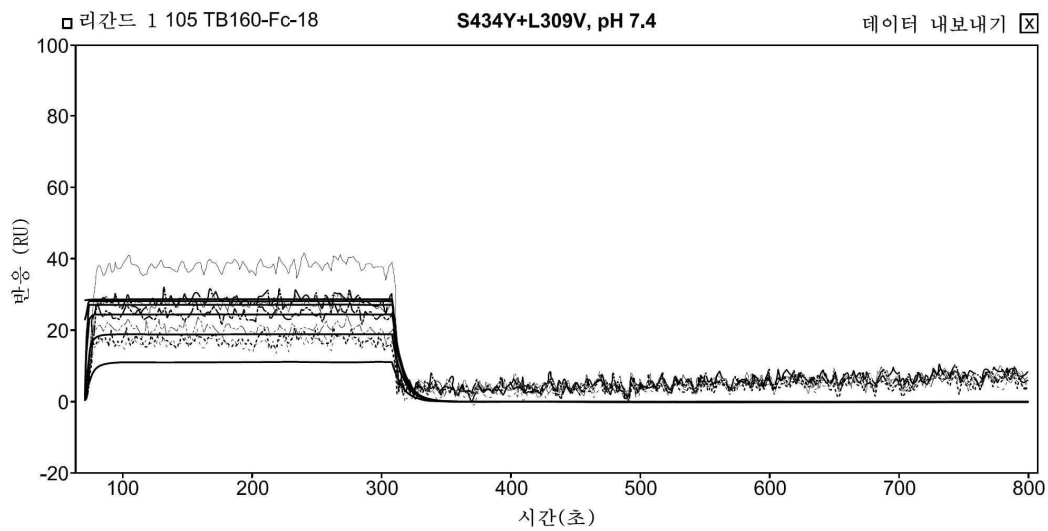
도면18b



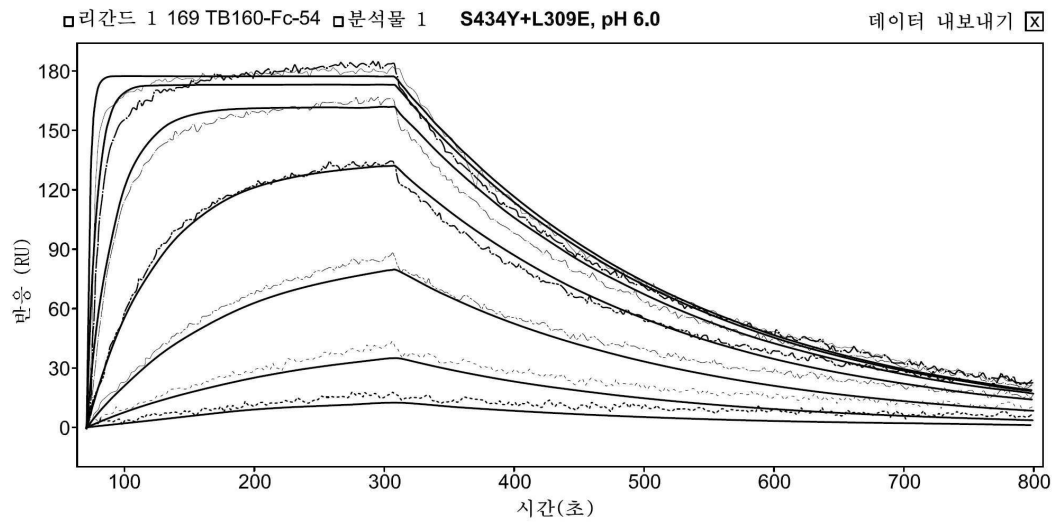
도면19a



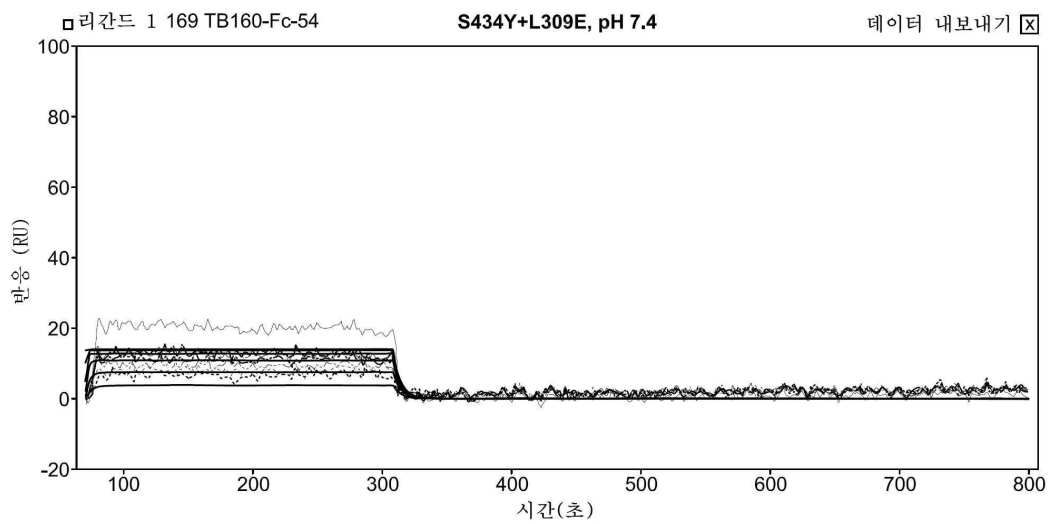
도면19b



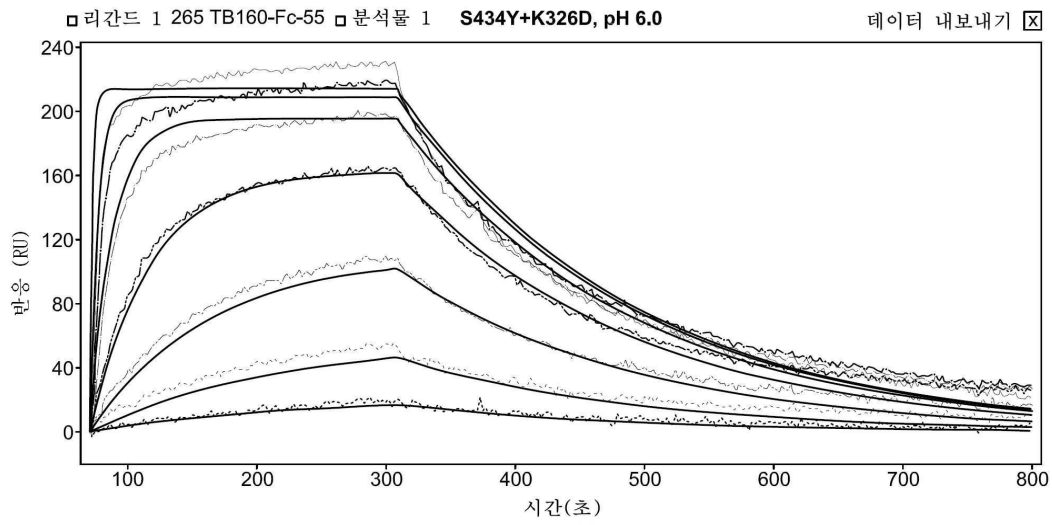
도면20a



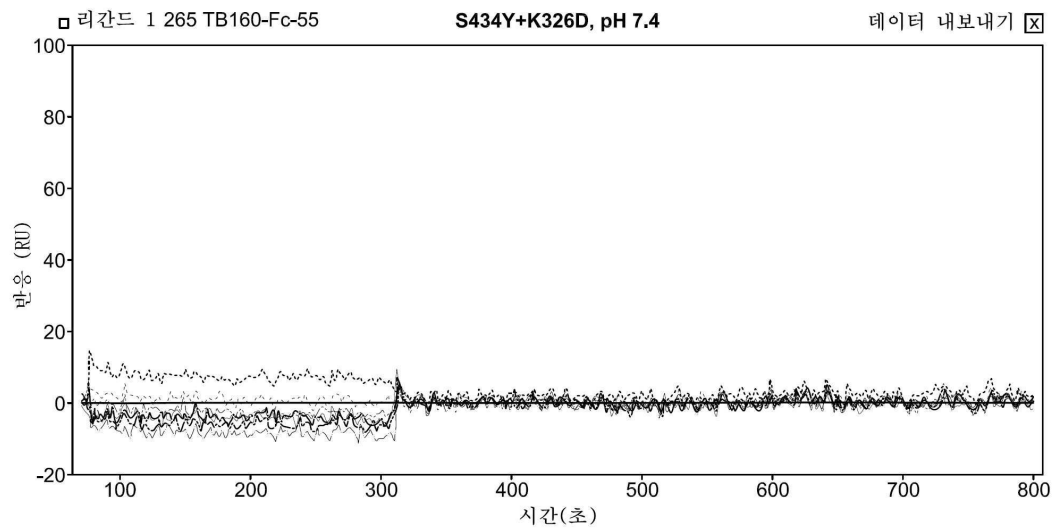
도면20b



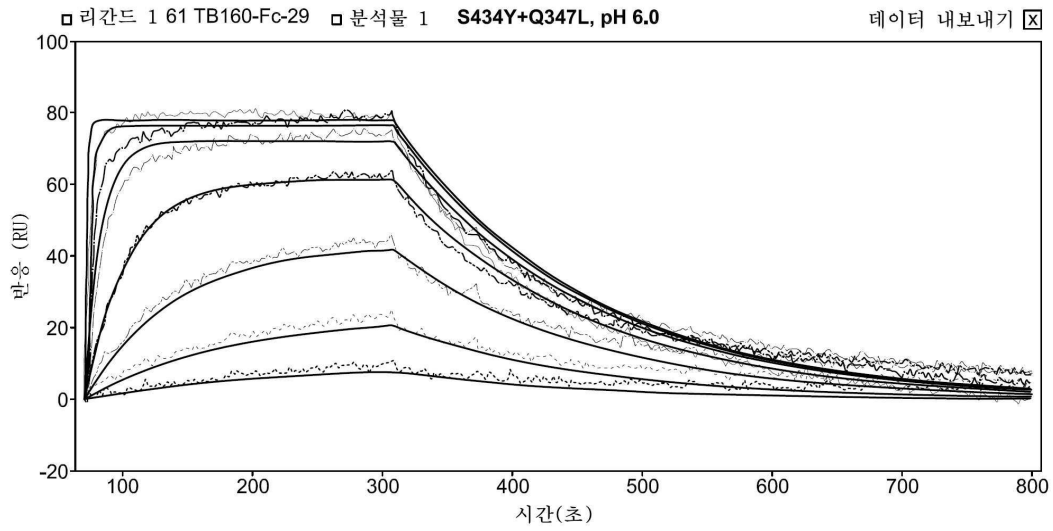
도면21a



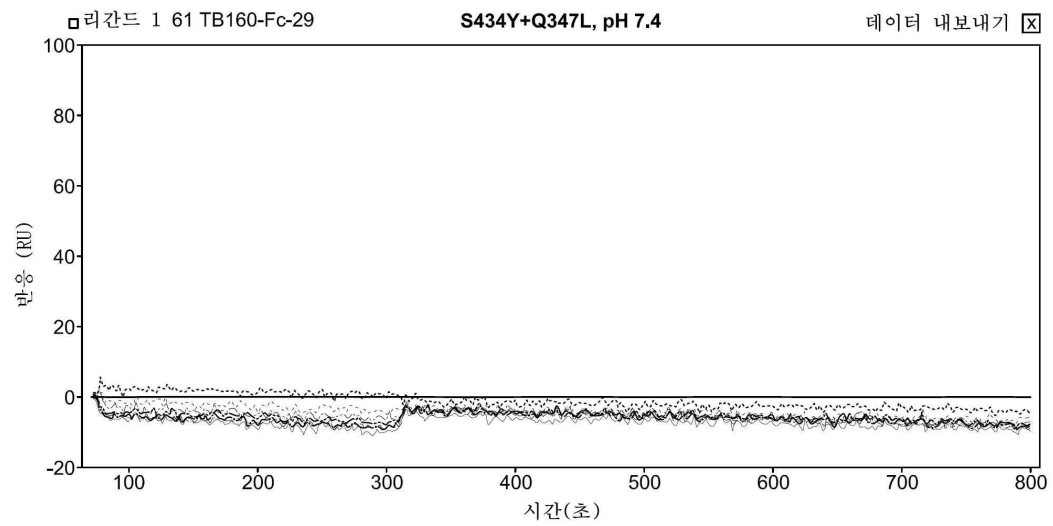
도면21b



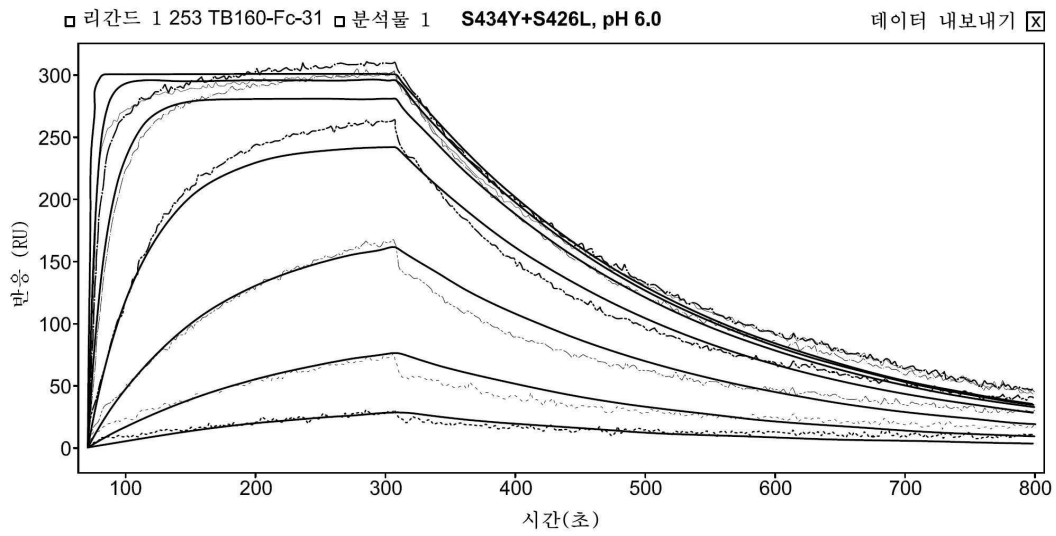
도면22a



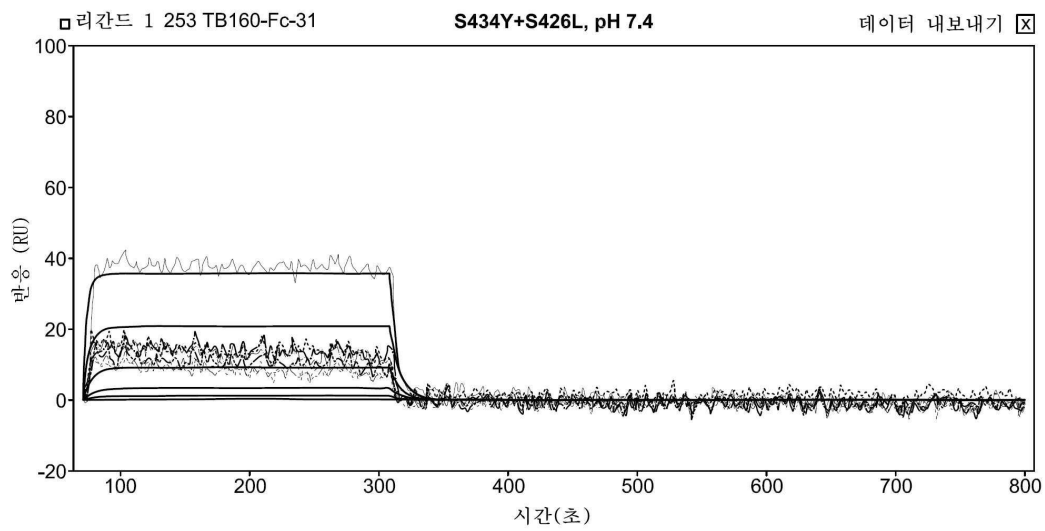
도면22b



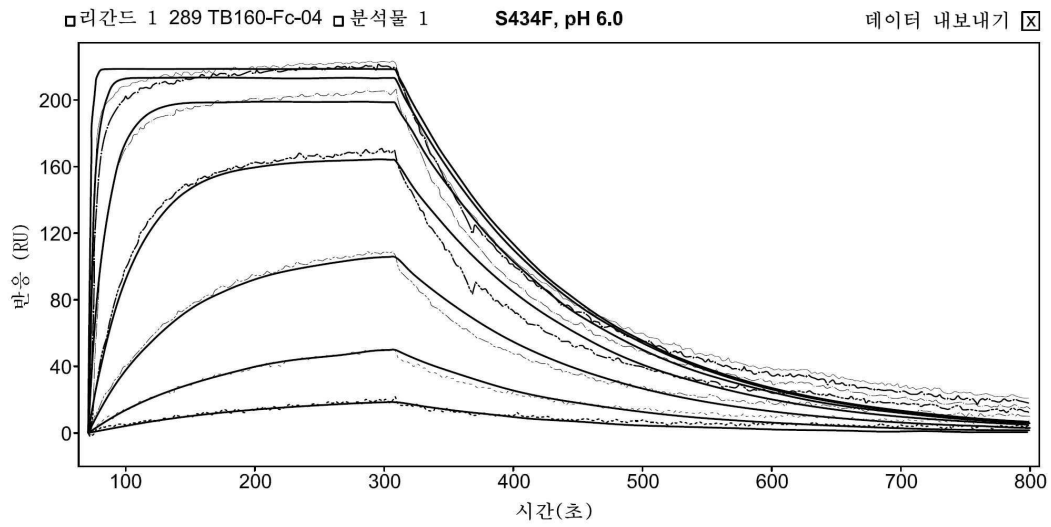
도면23a



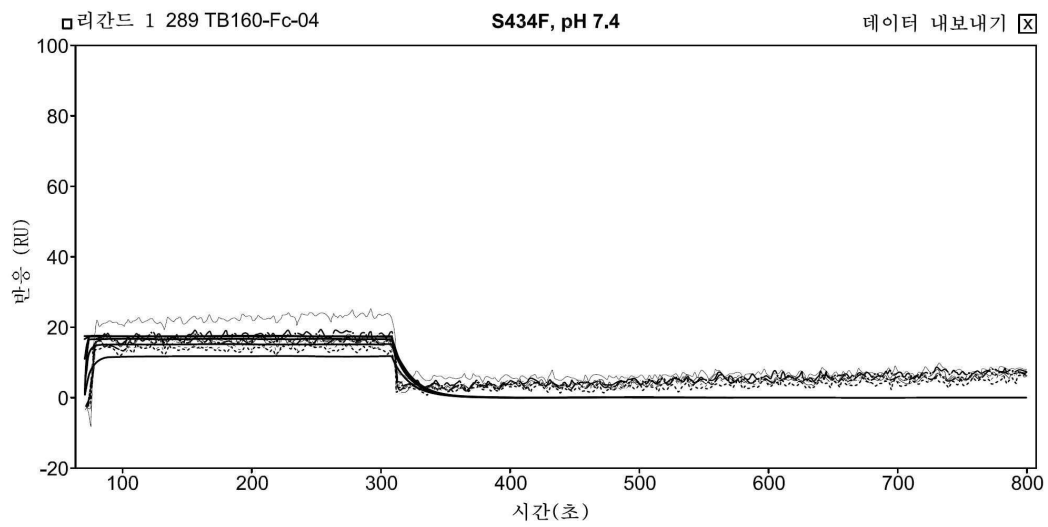
도면23b



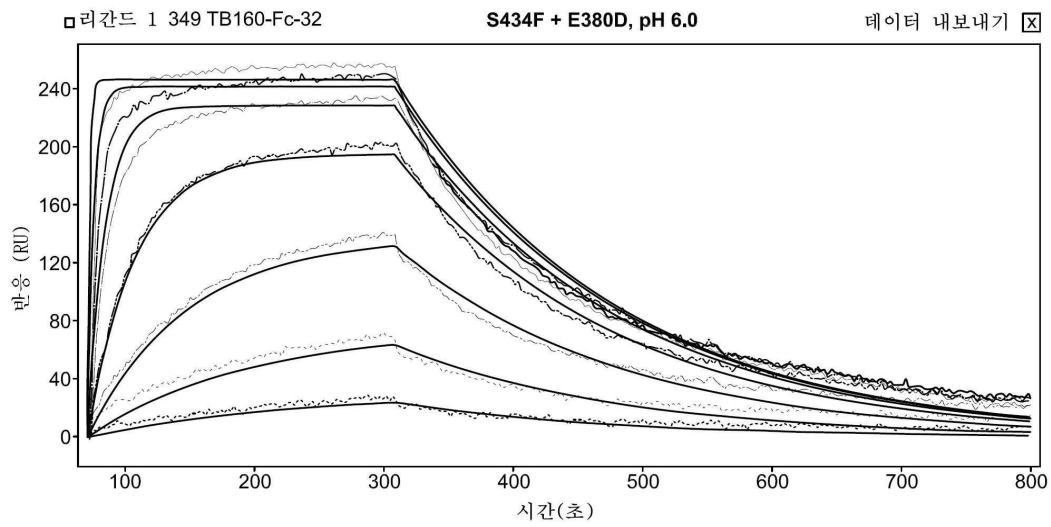
도면24a



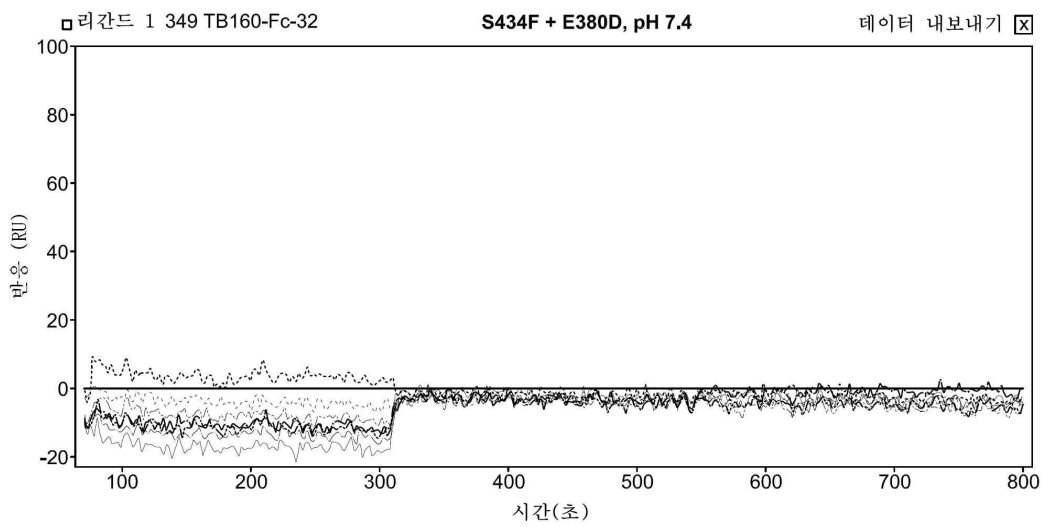
도면24b



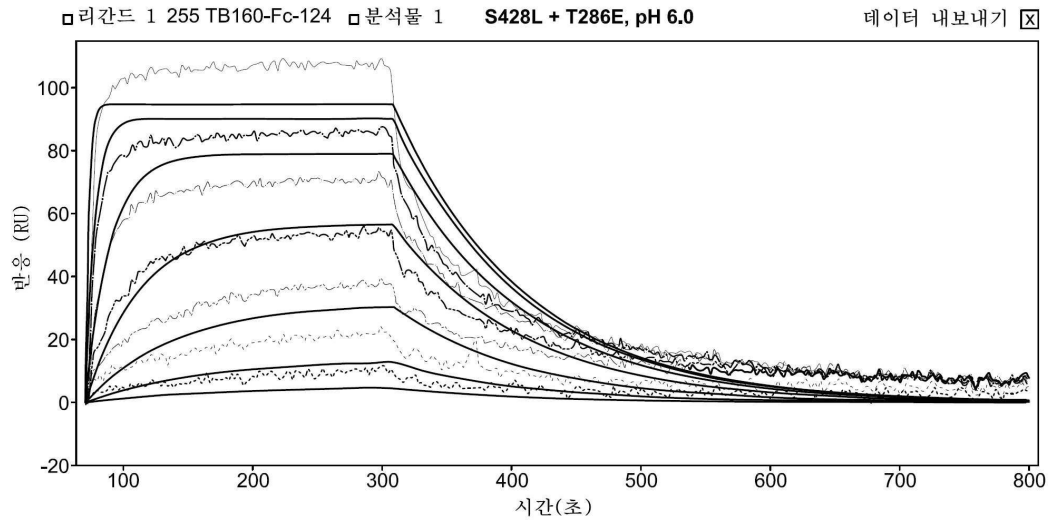
도면25a



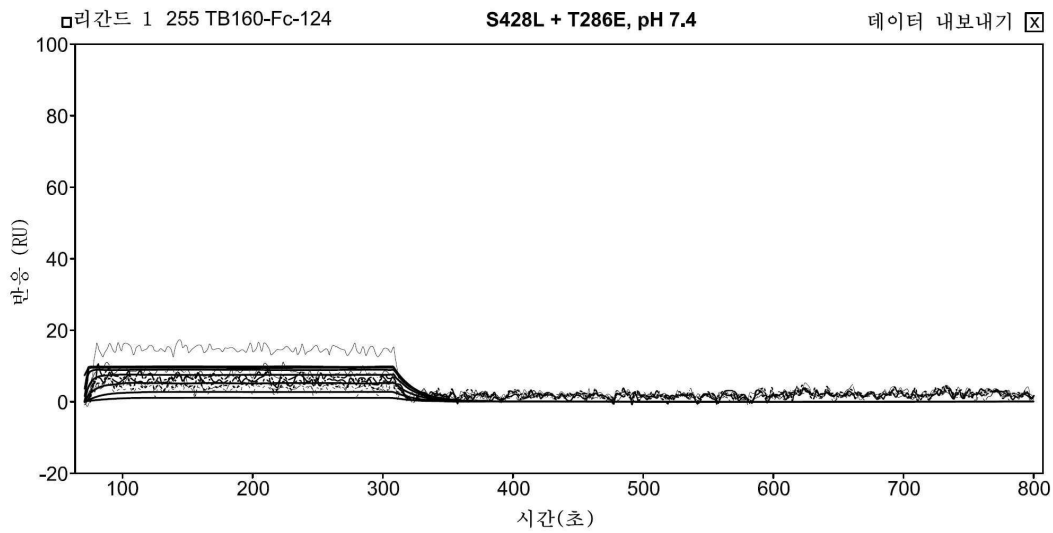
도면25b



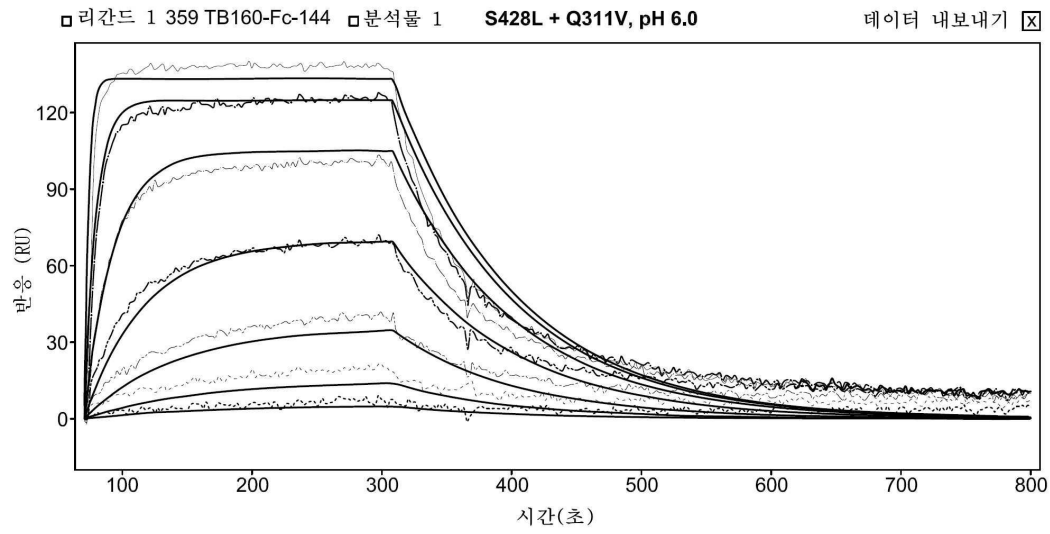
도면26a



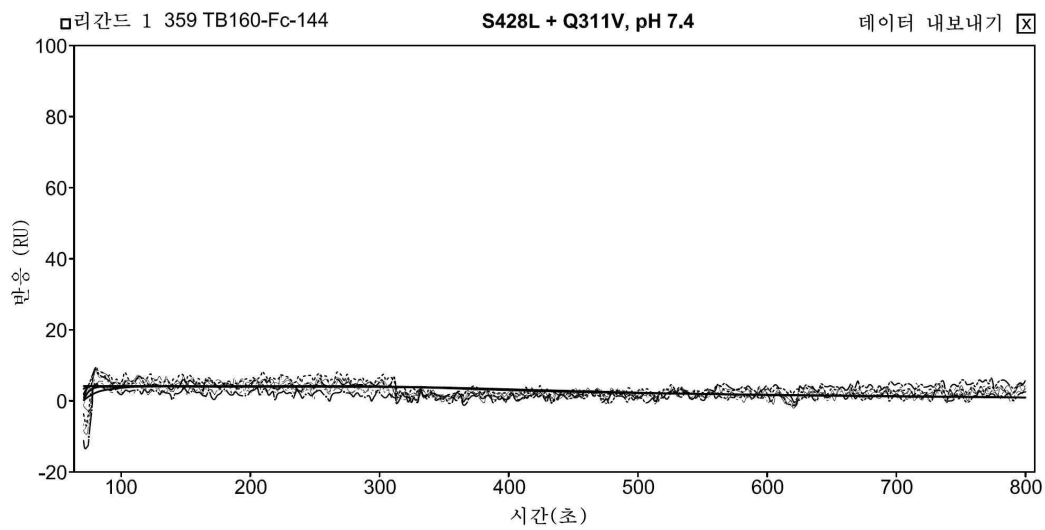
도면26b



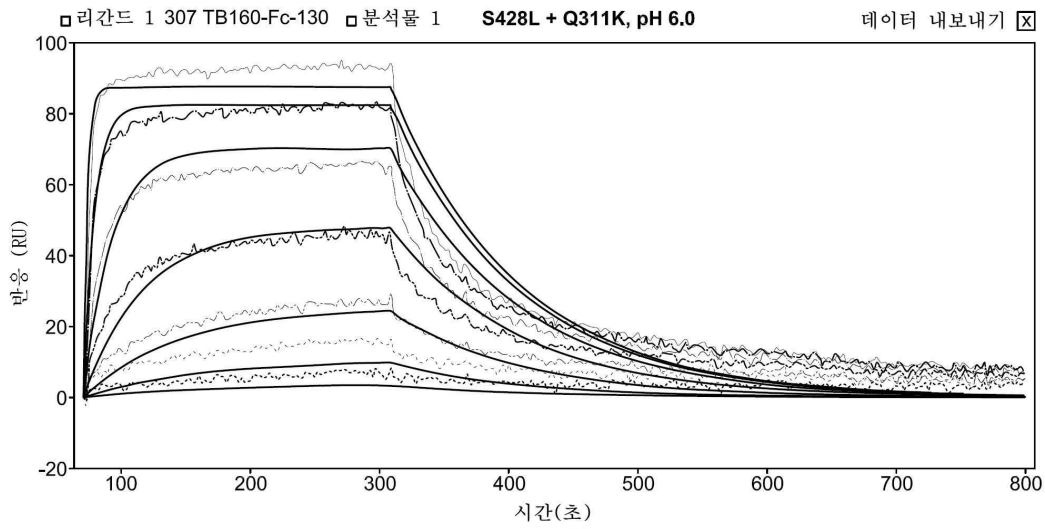
도면27a



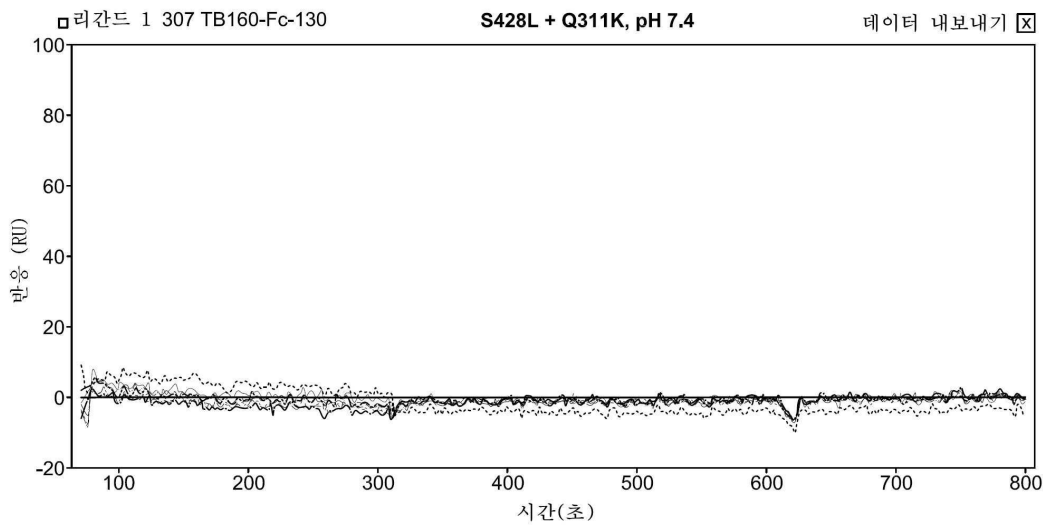
도면27b



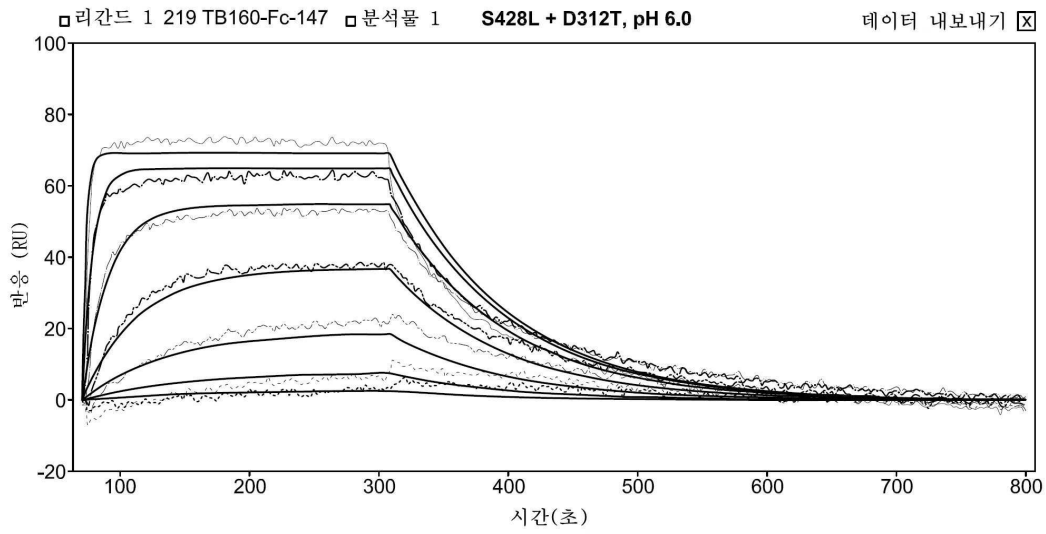
도면28a



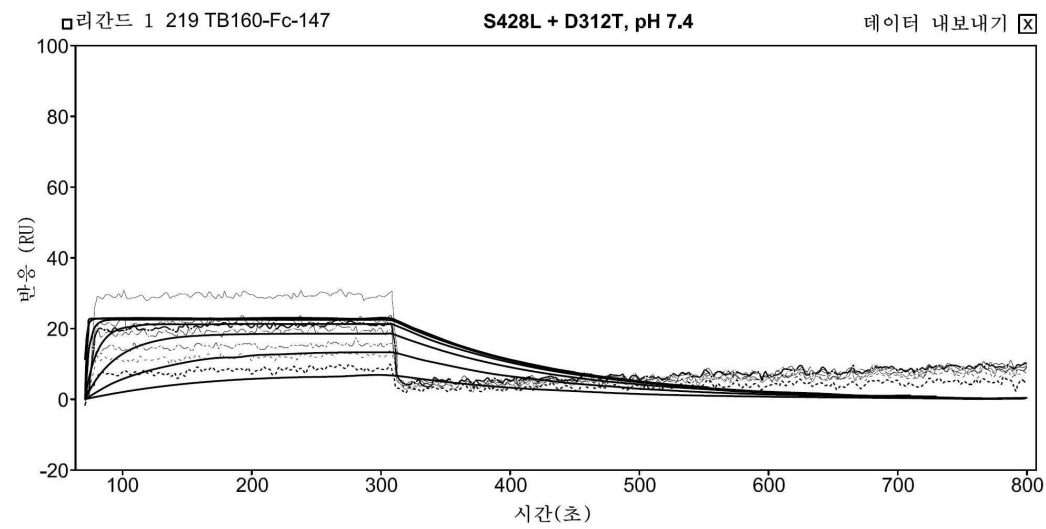
도면28b



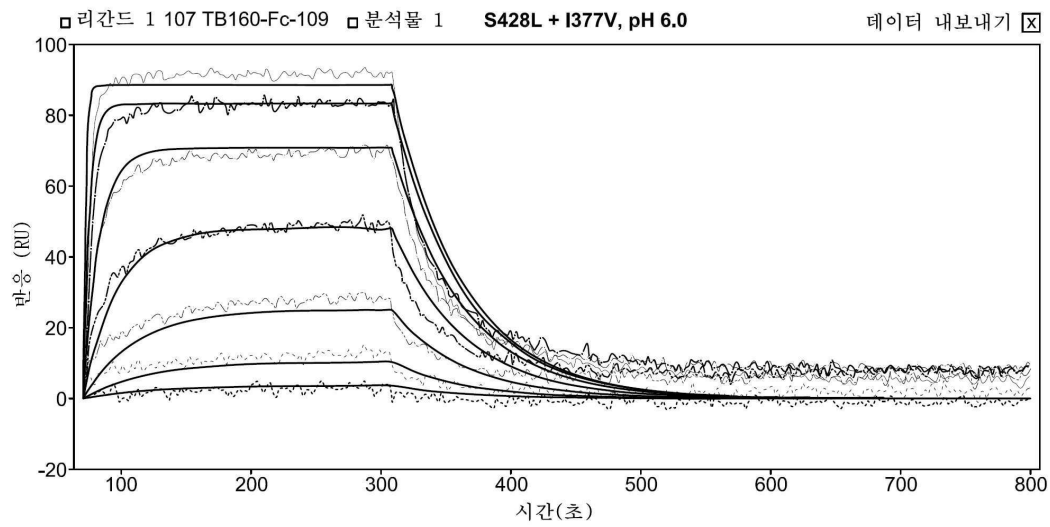
도면29a



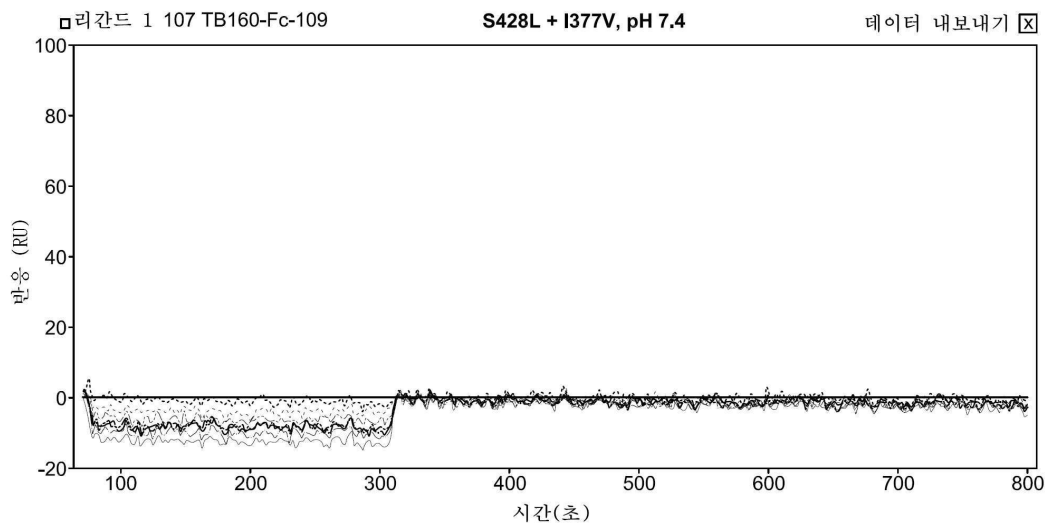
도면29b



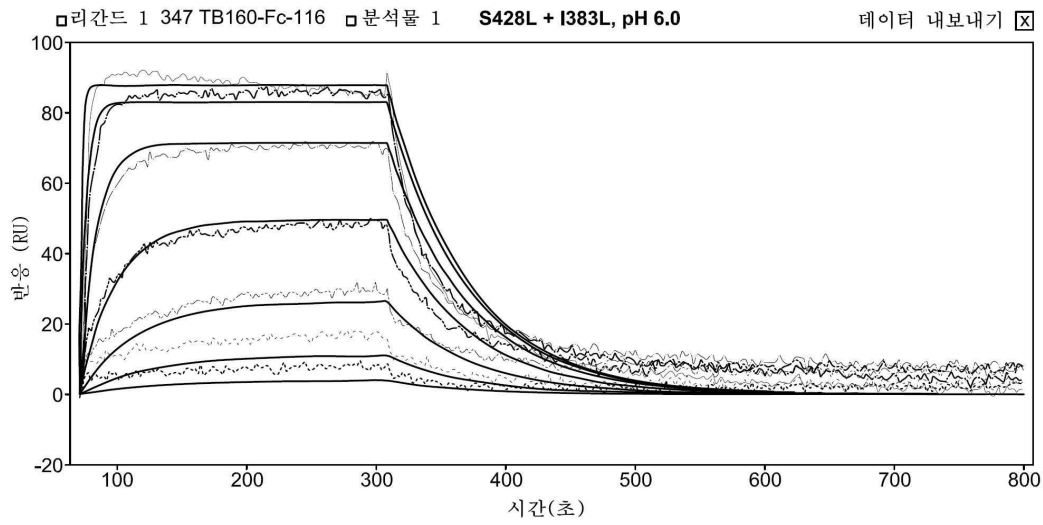
도면30a



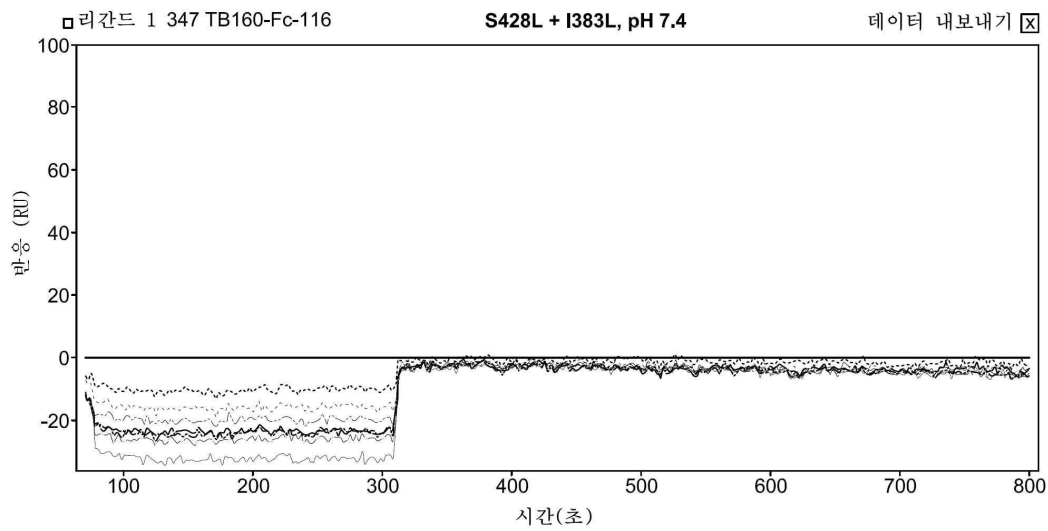
도면30b



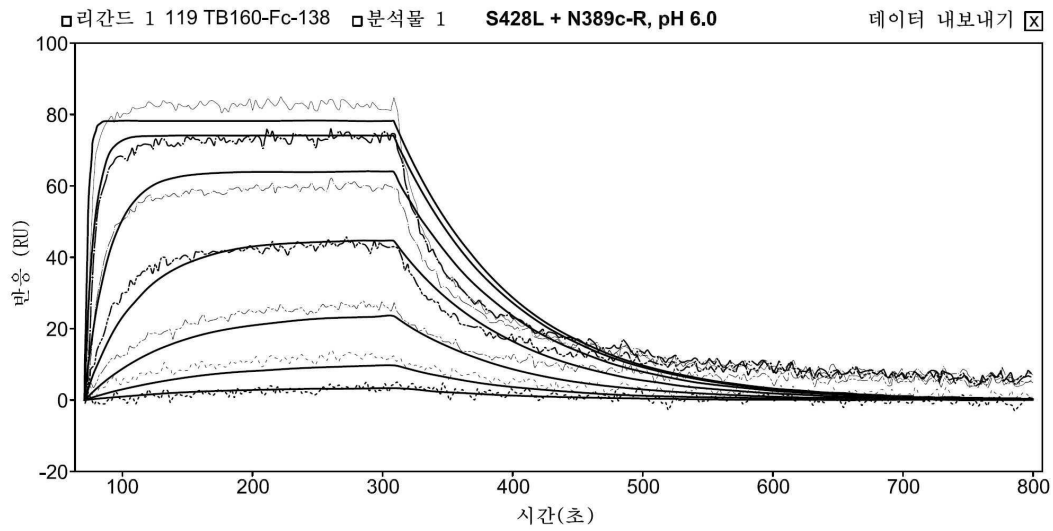
도면31a



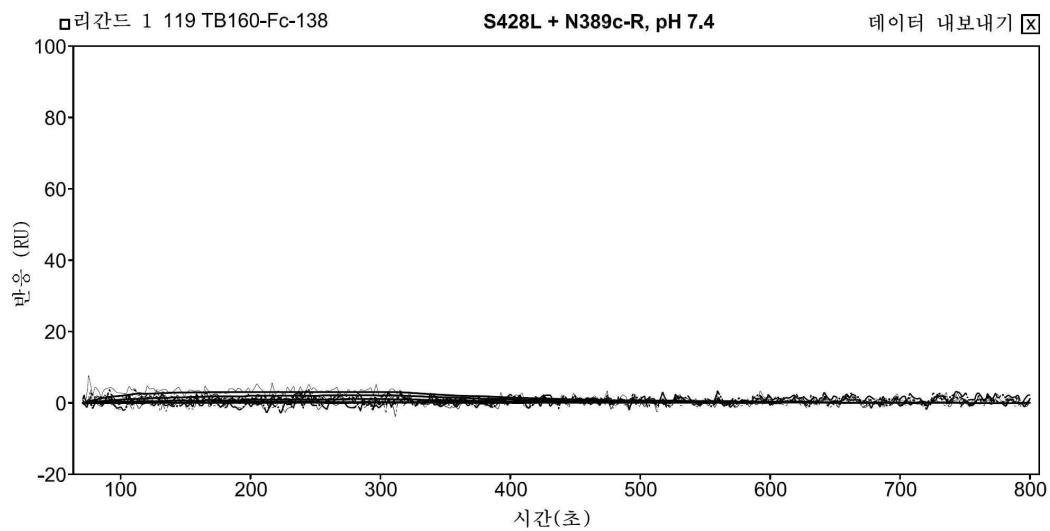
도면31b



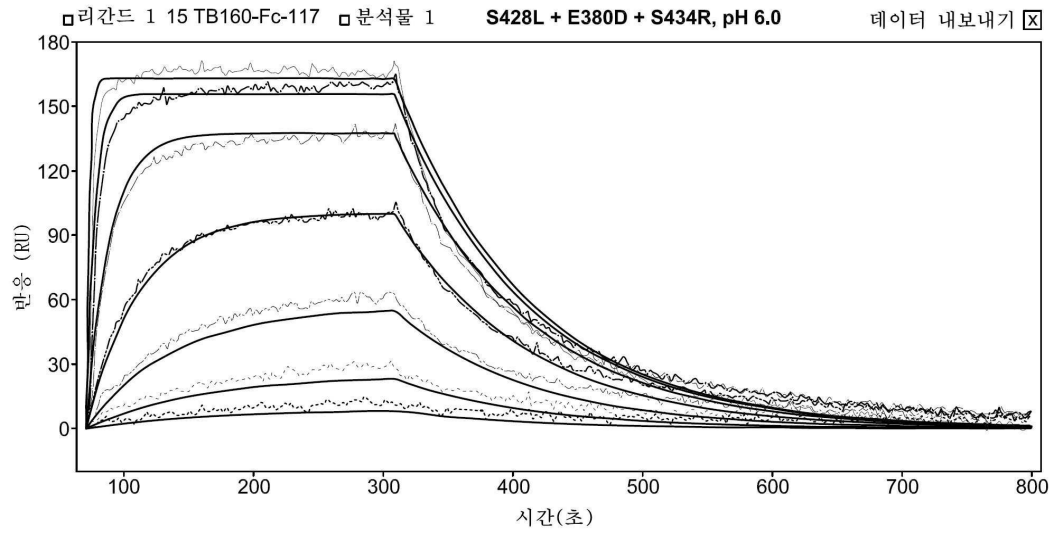
도면32a



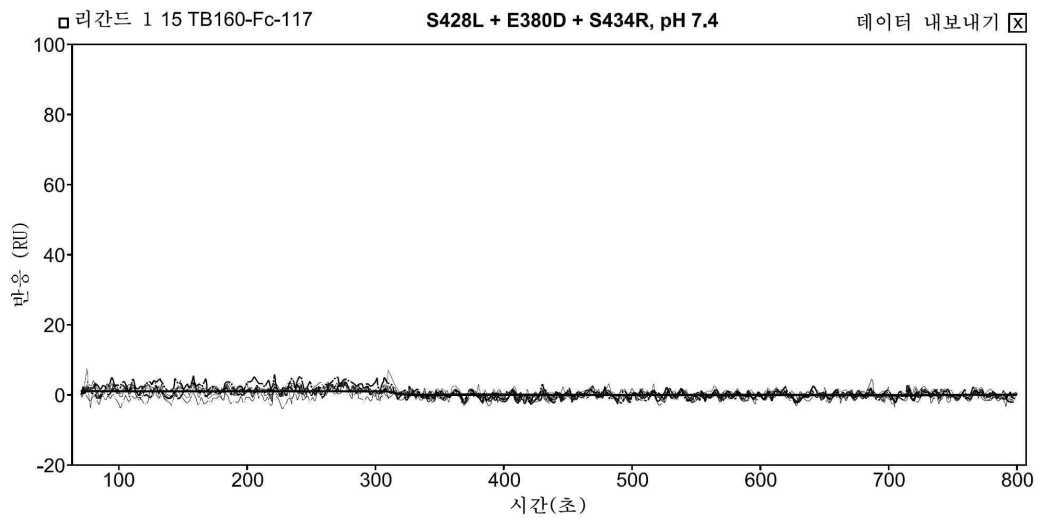
도면32b



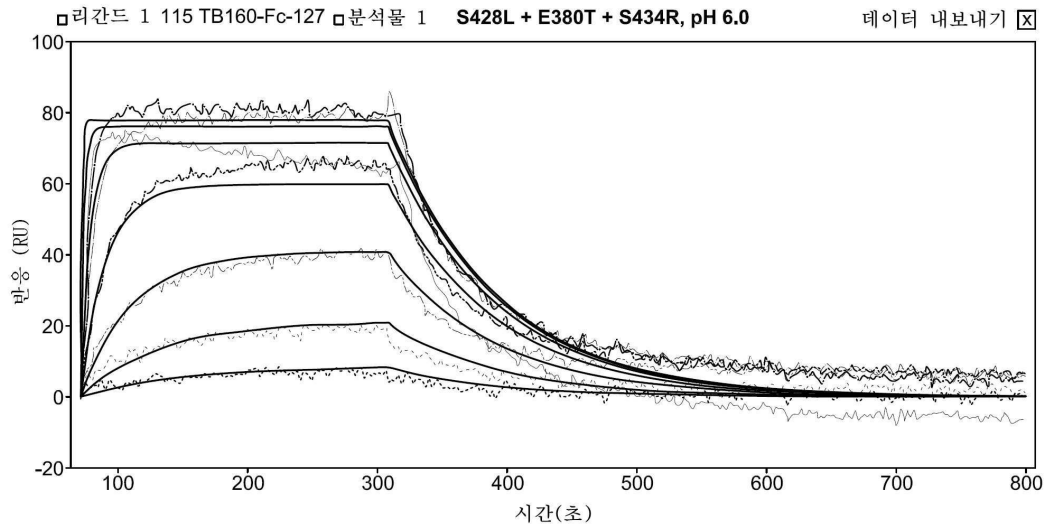
도면33a



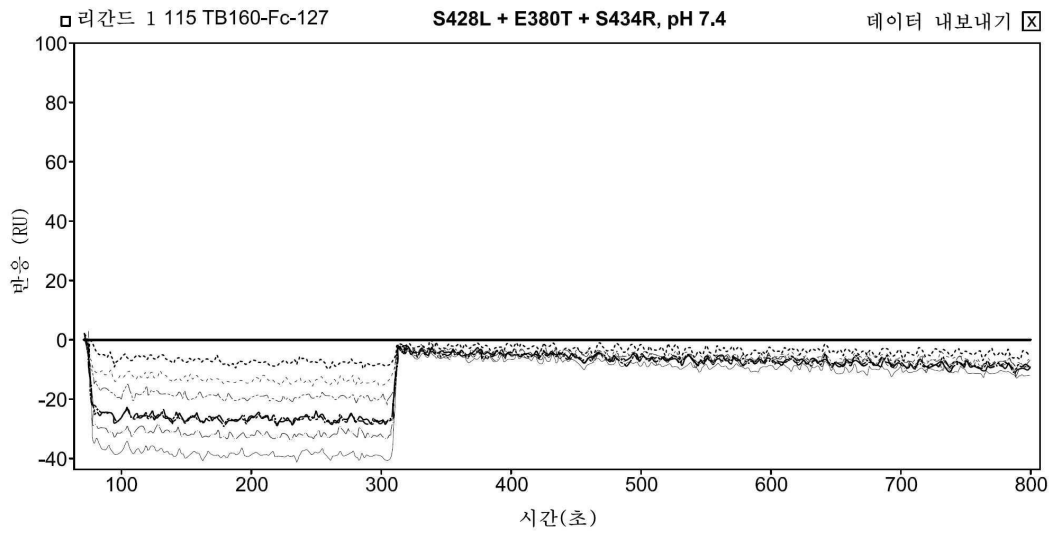
도면33b



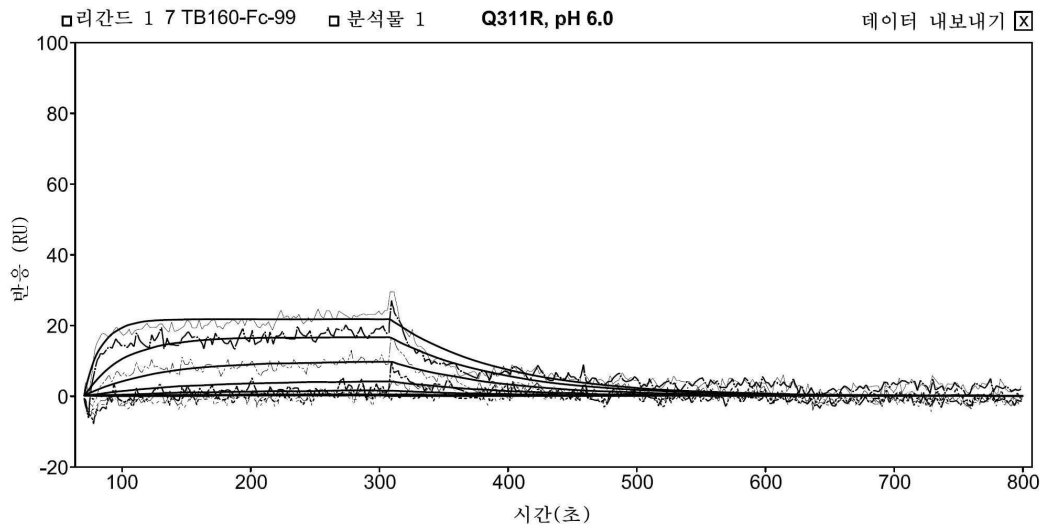
도면34a



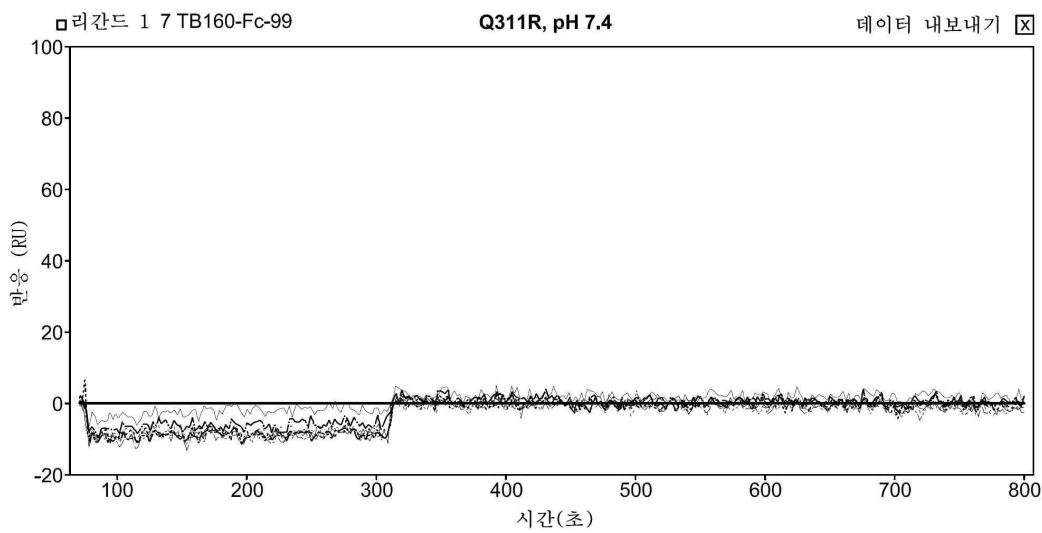
도면34b



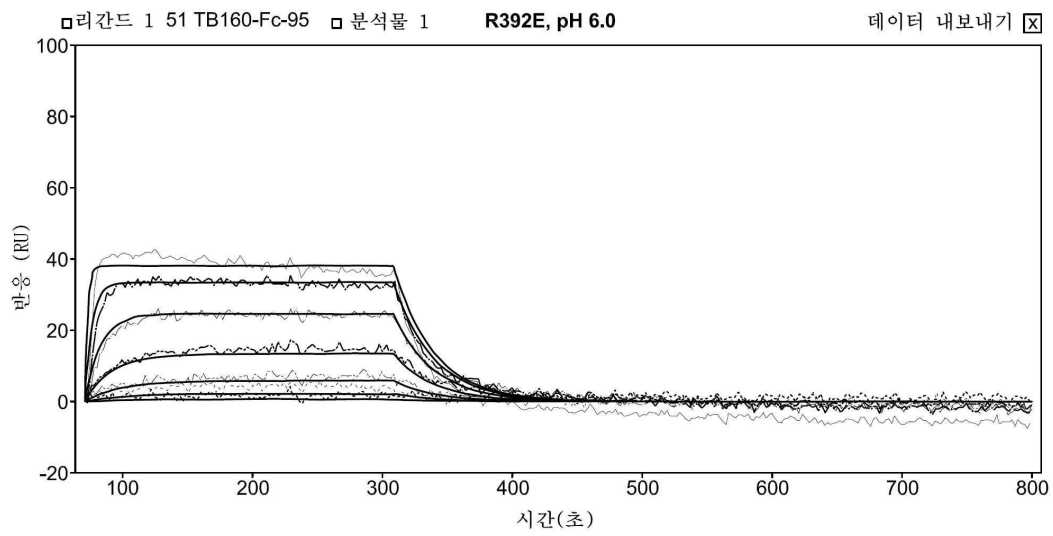
도면35a



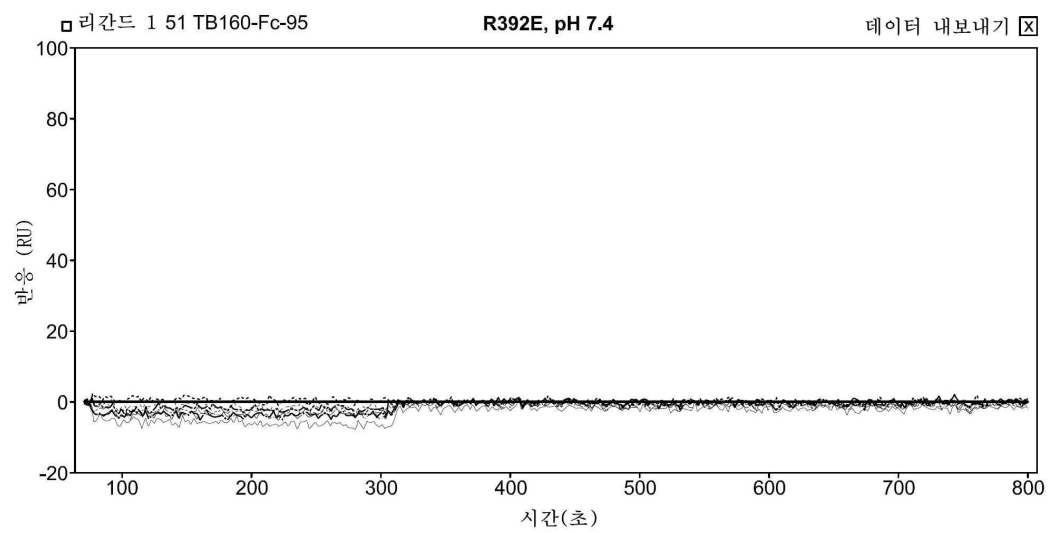
도면35b



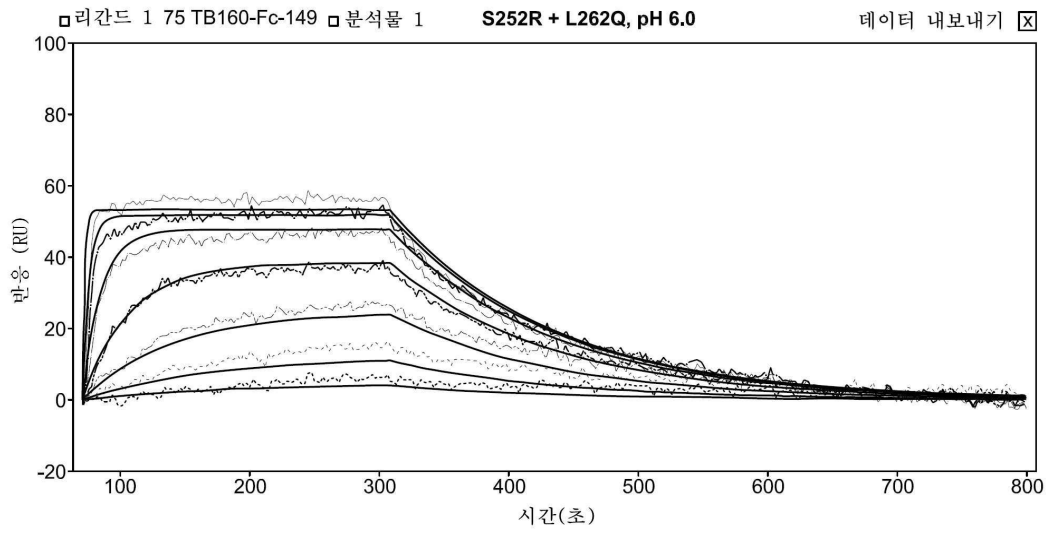
도면36a



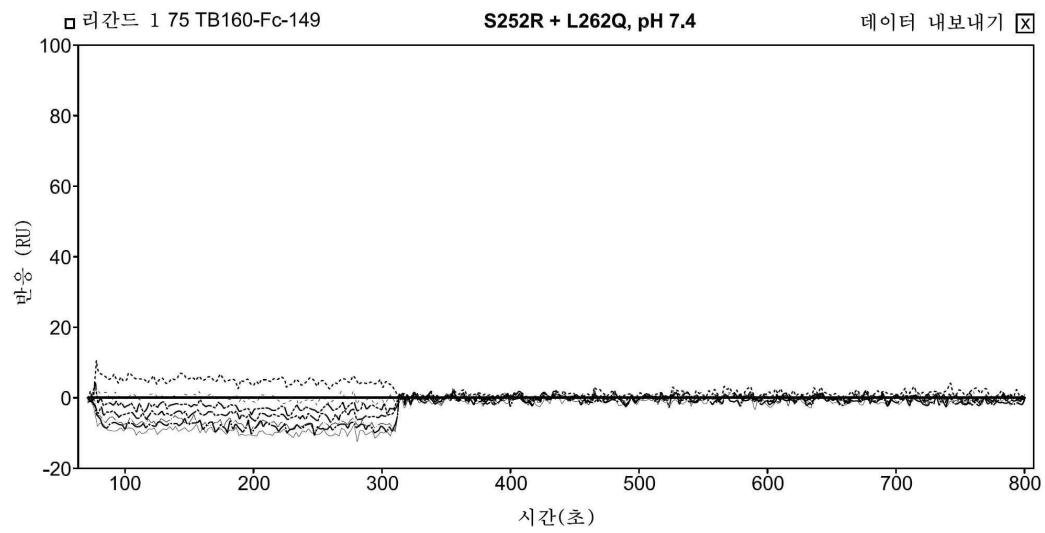
도면36b



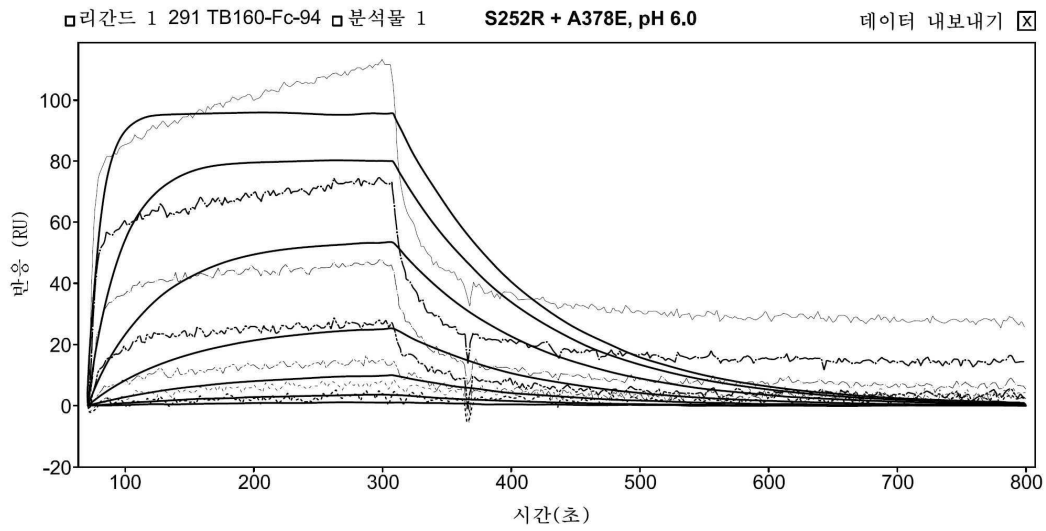
도면37a



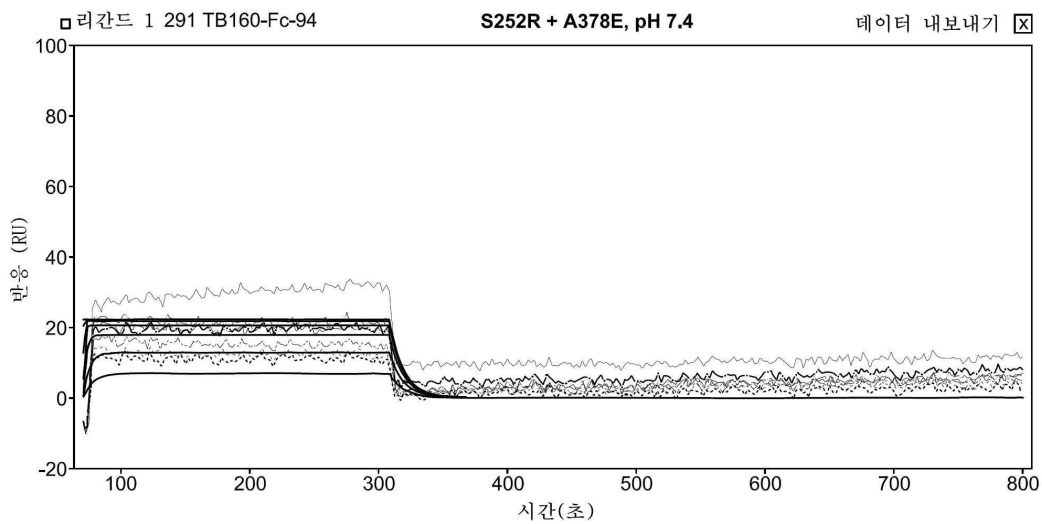
도면37b



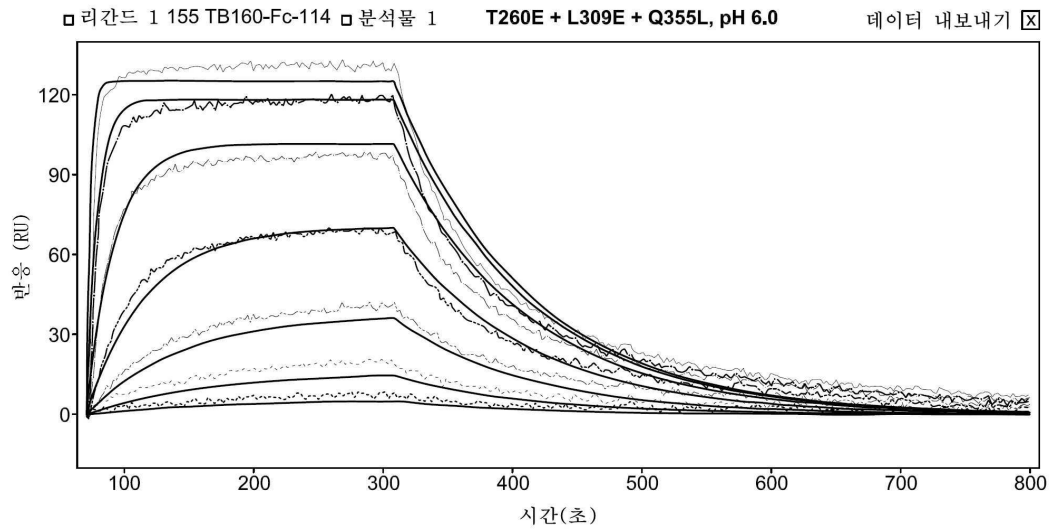
도면38a



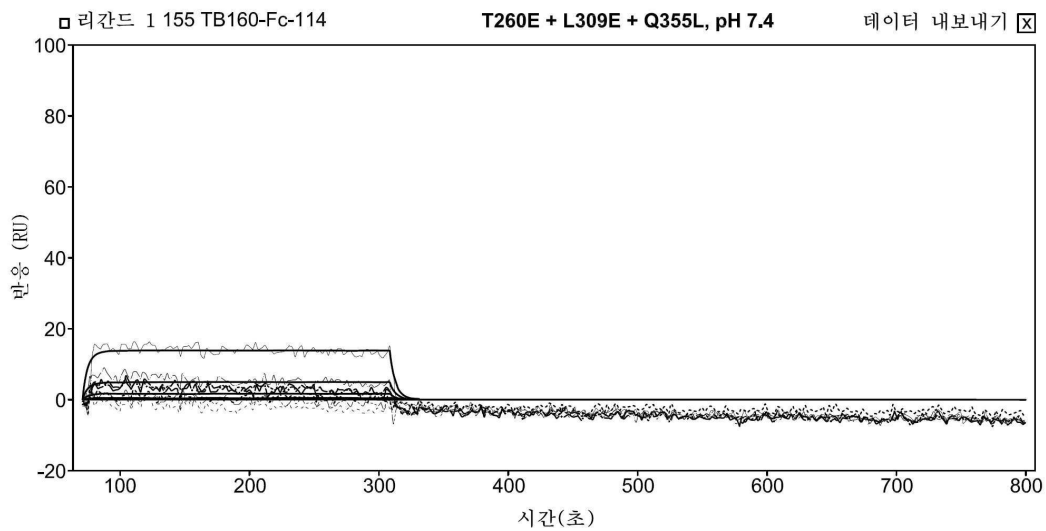
도면38b



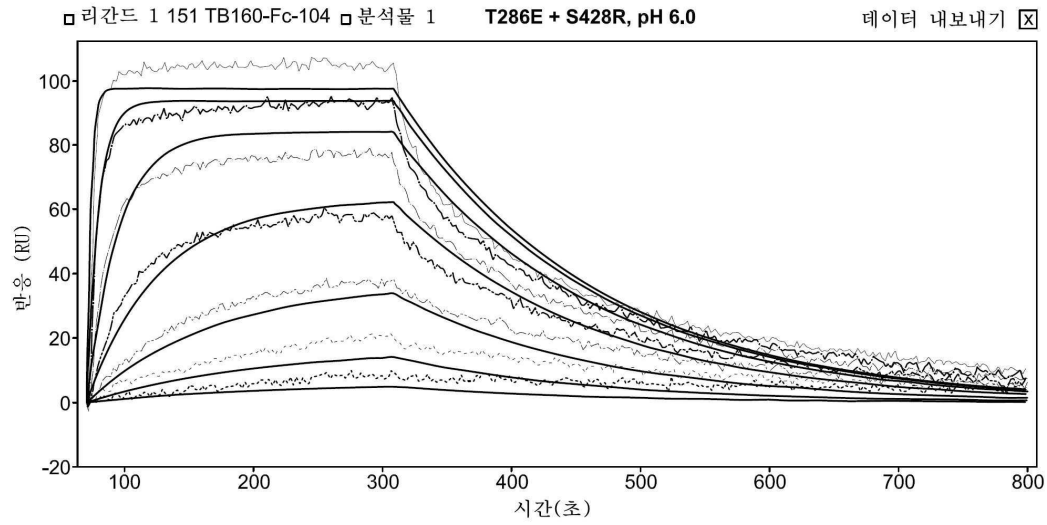
도면39a



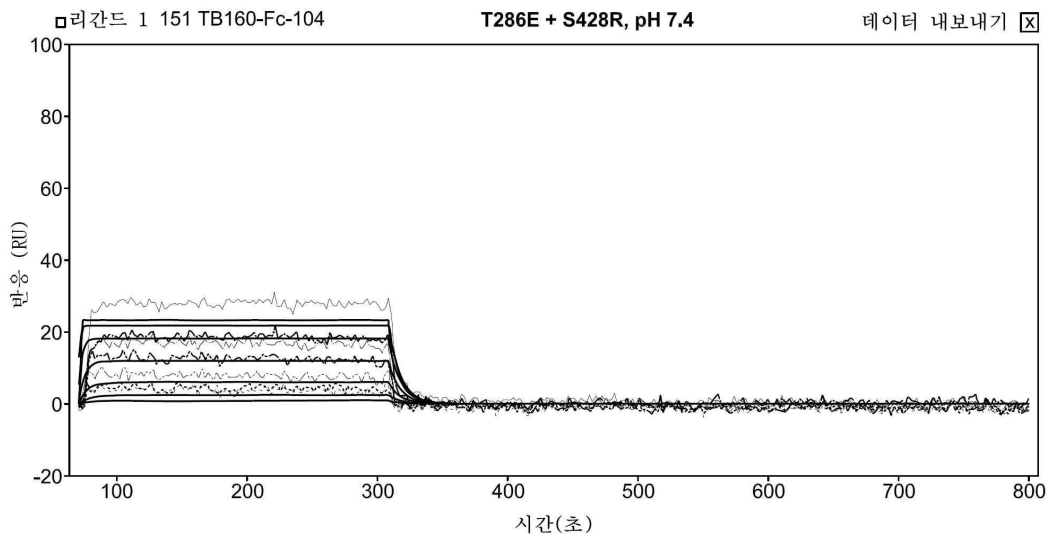
도면39b



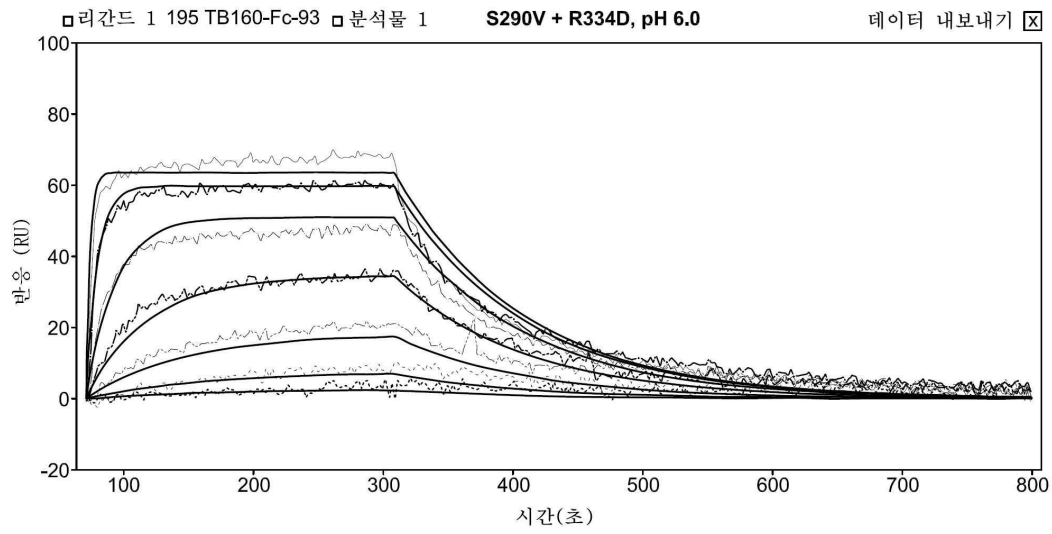
도면40a



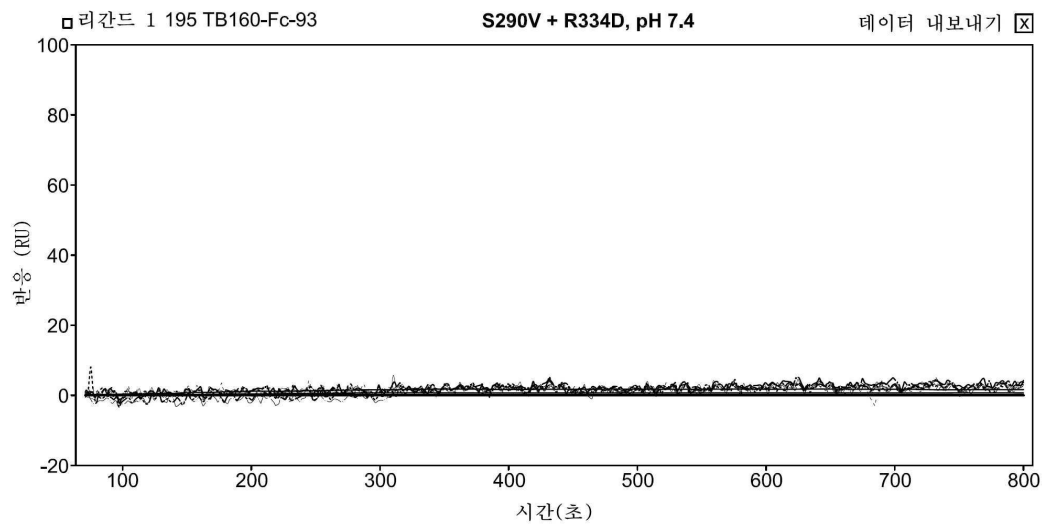
도면40b



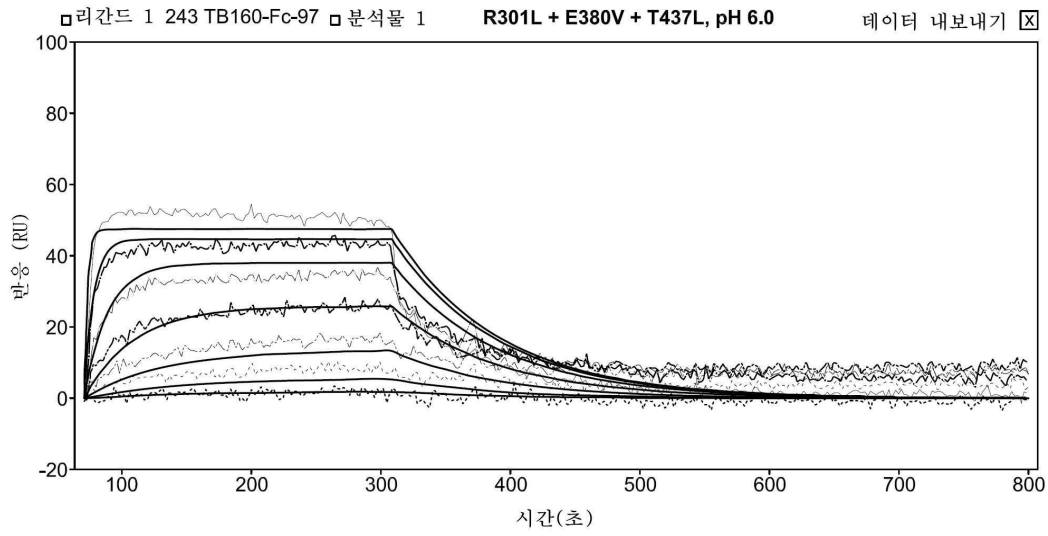
도면41a



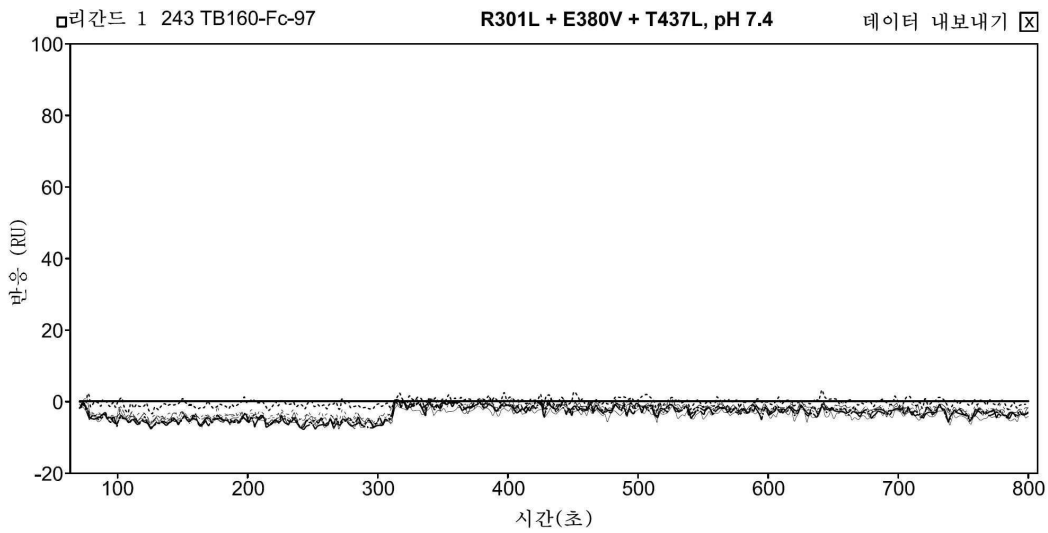
도면41b



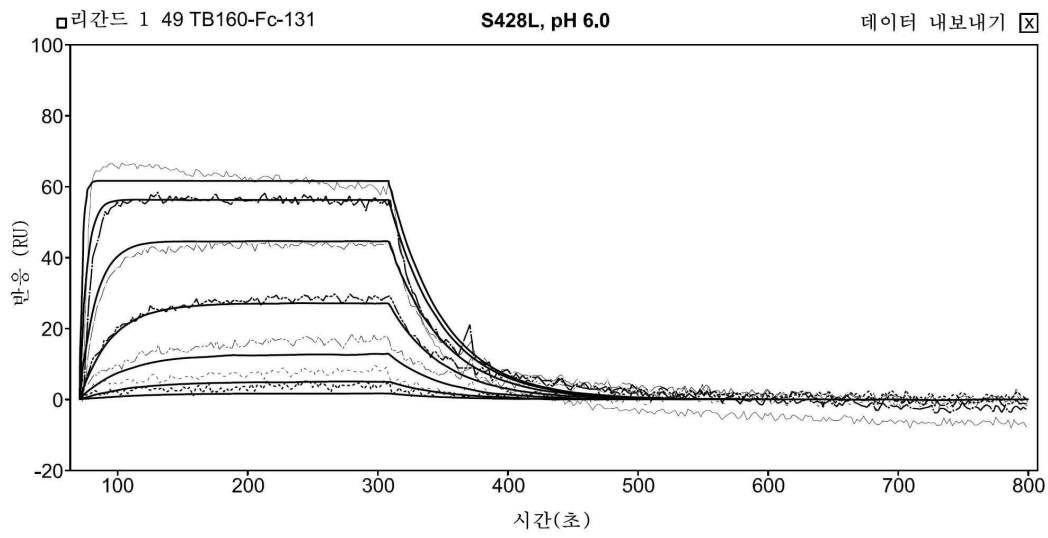
도면42a



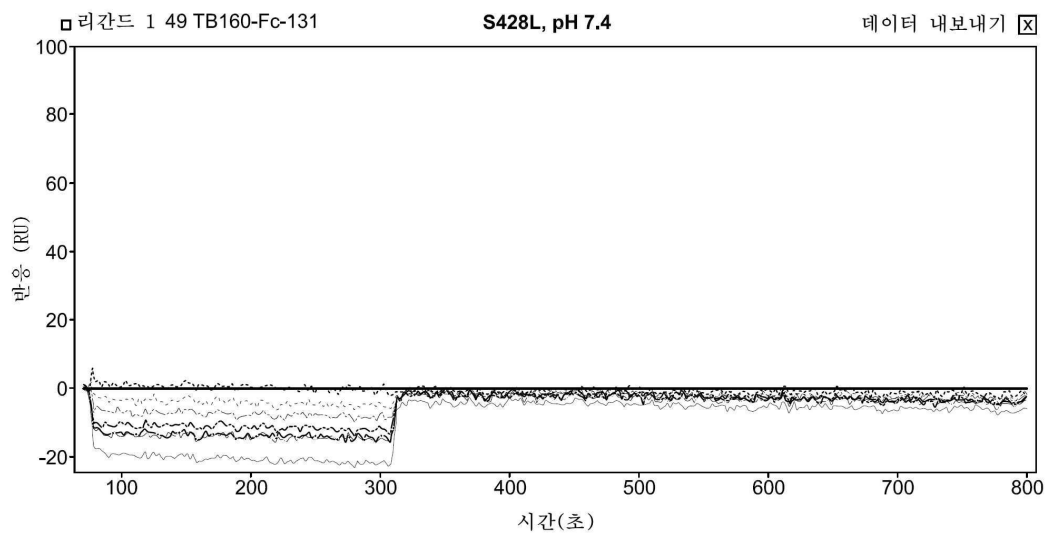
도면42b



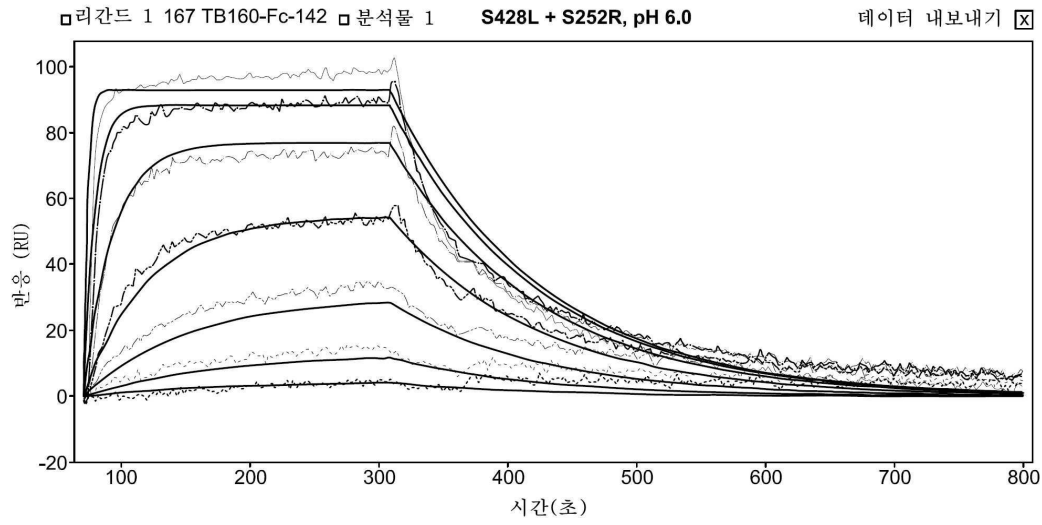
도면43a



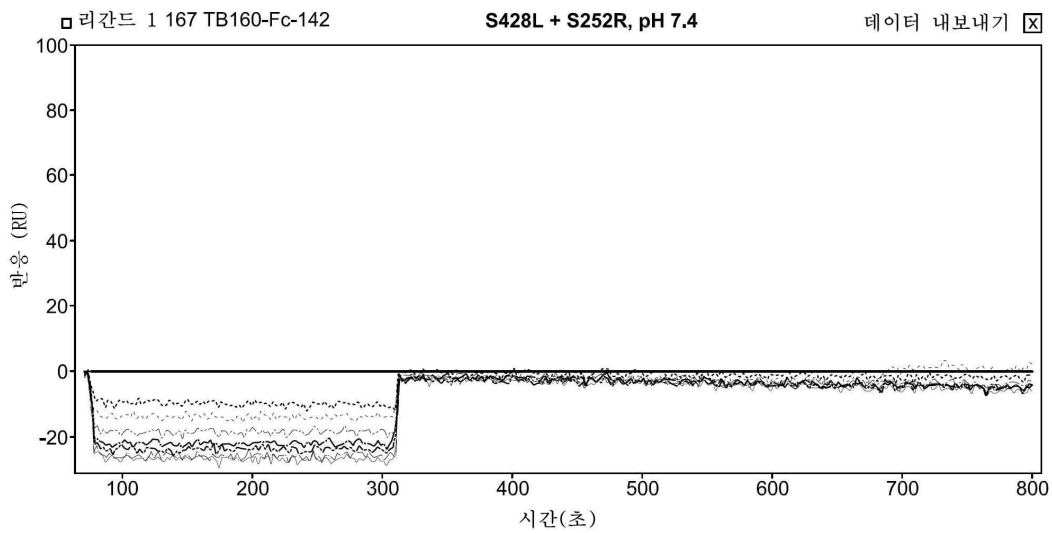
도면43b



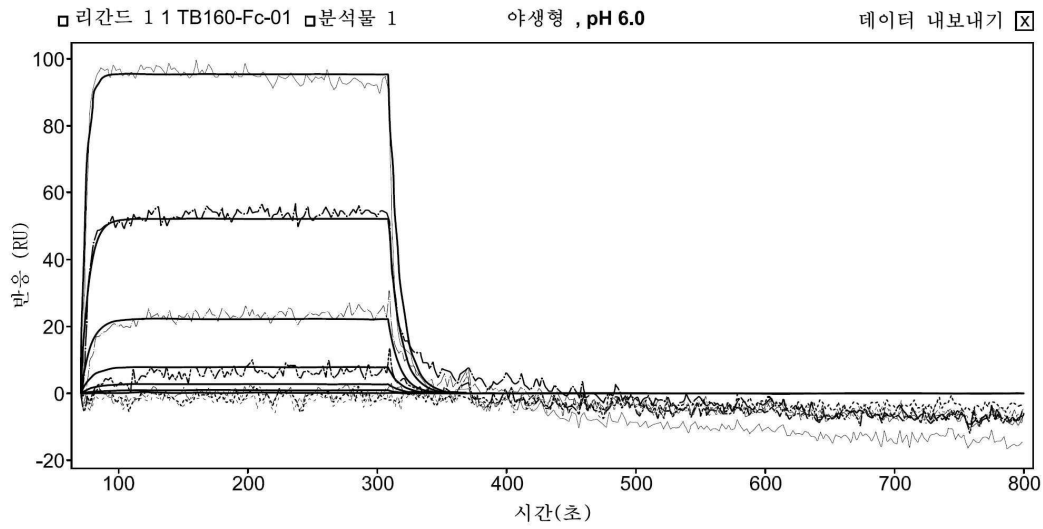
도면44a



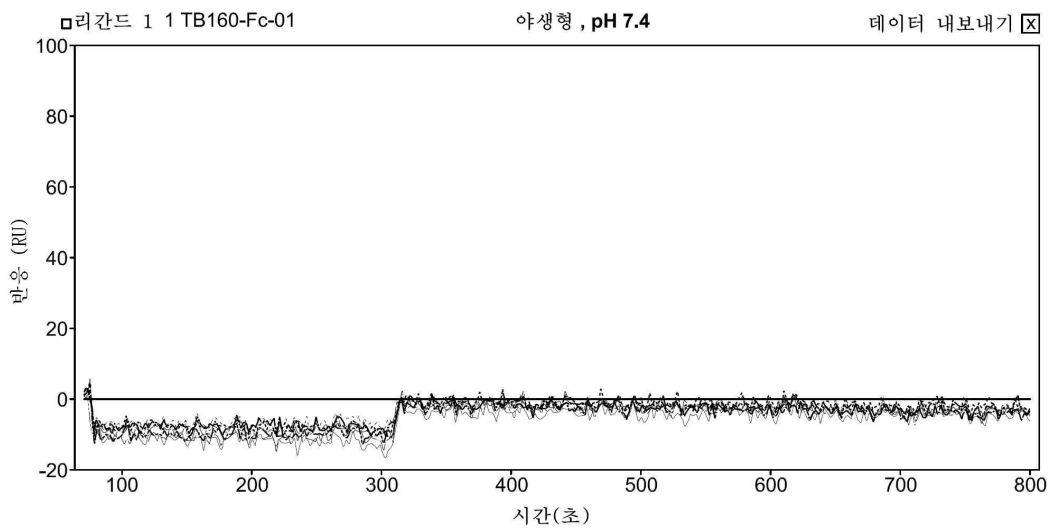
도면44b



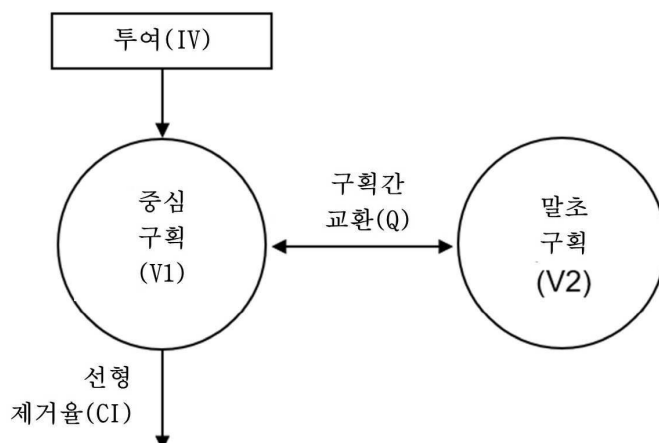
도면45a



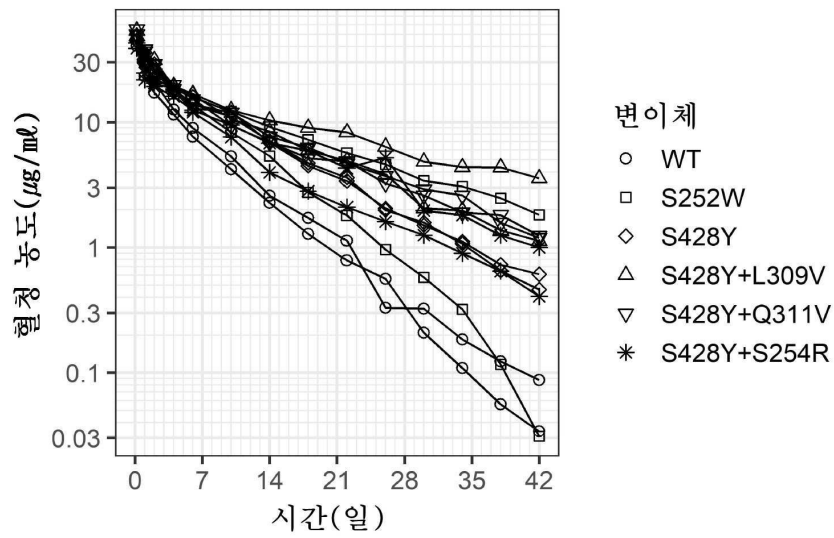
도면45b



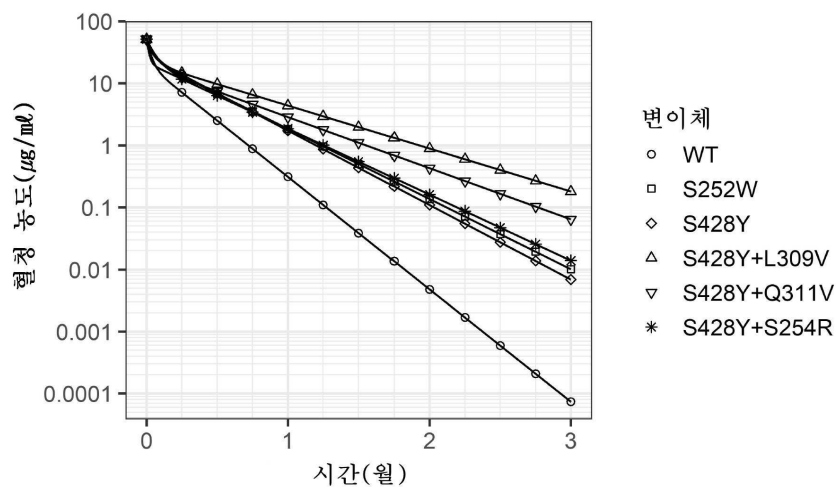
도면46



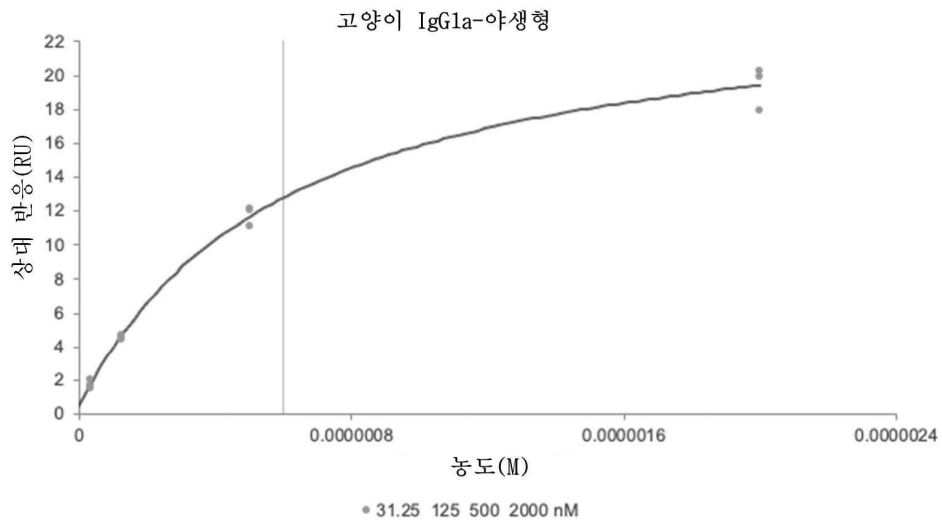
도면47



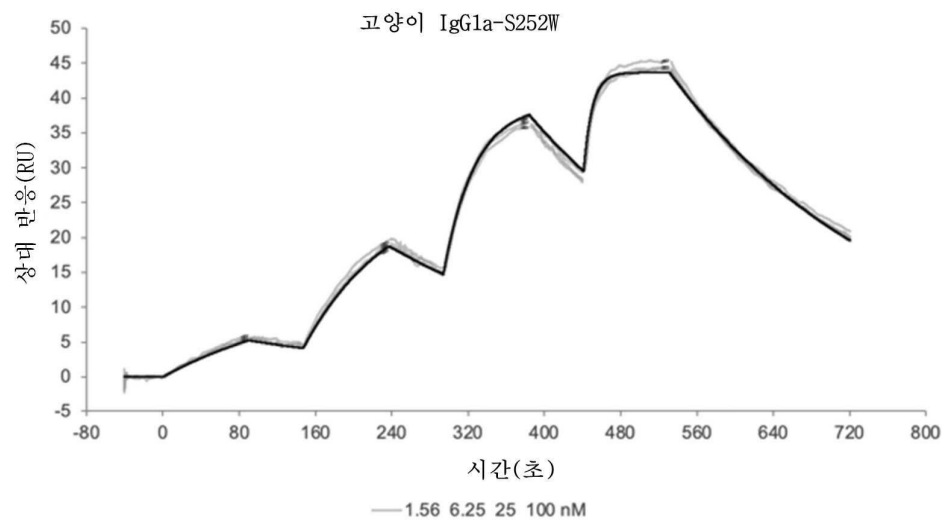
도면48



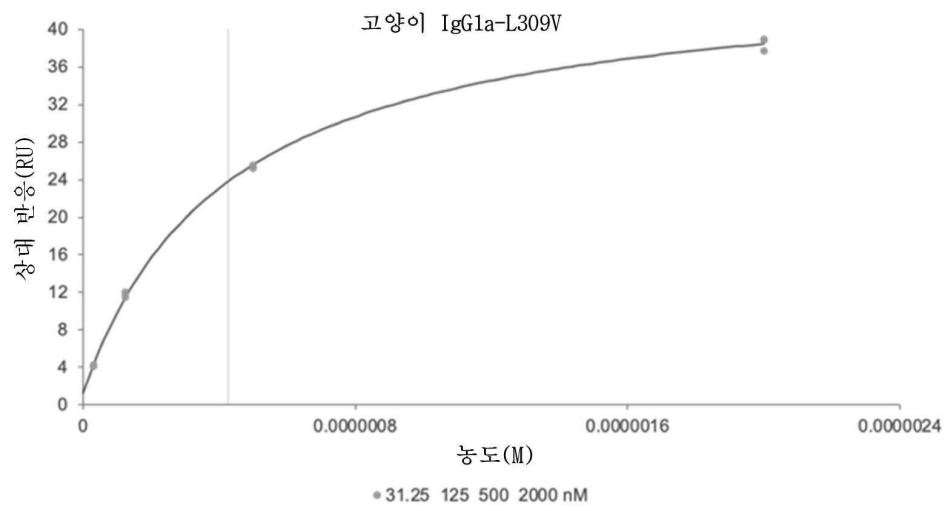
도면49a



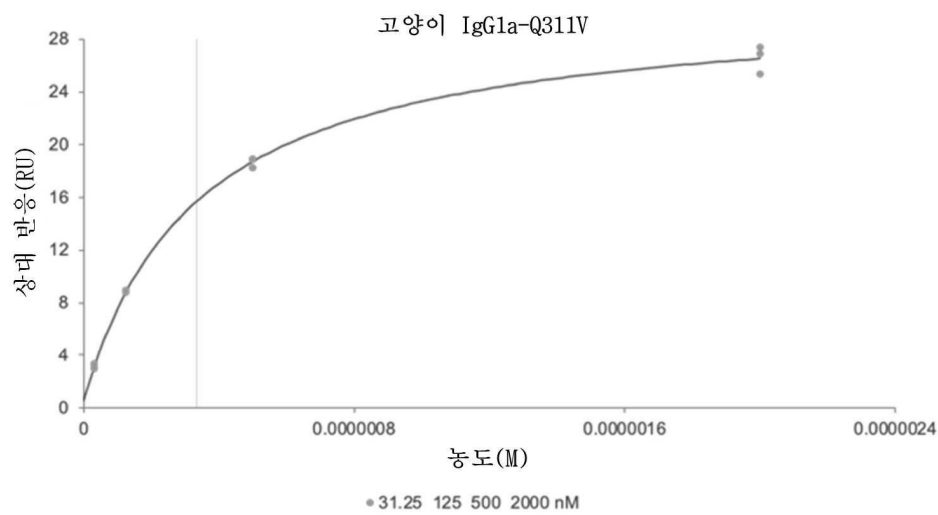
도면49b



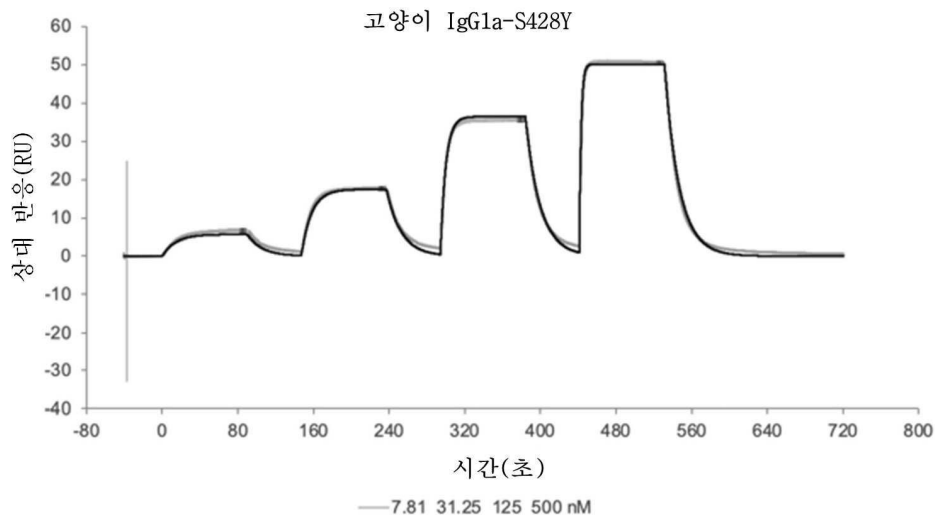
도면49c



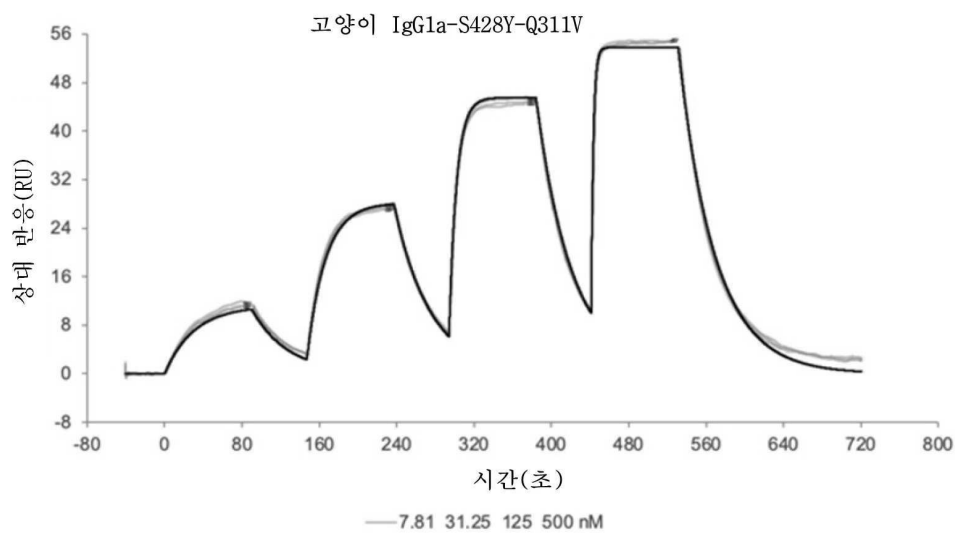
도면49d



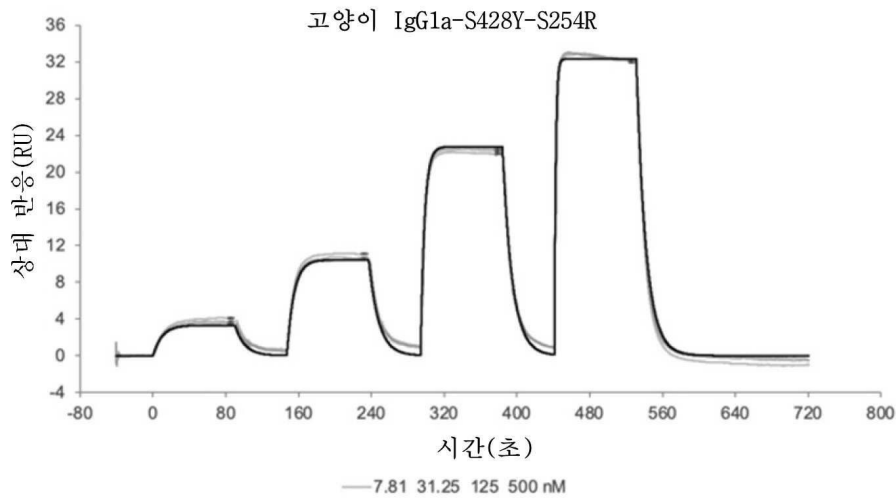
도면49e



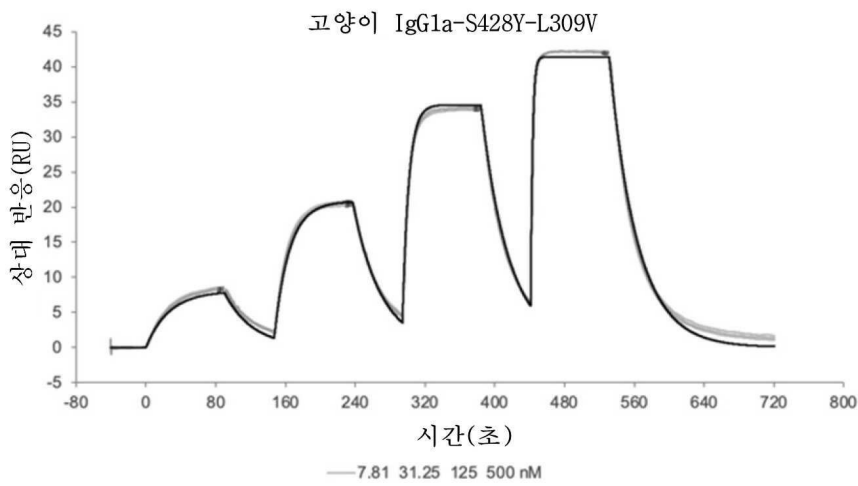
도면49f



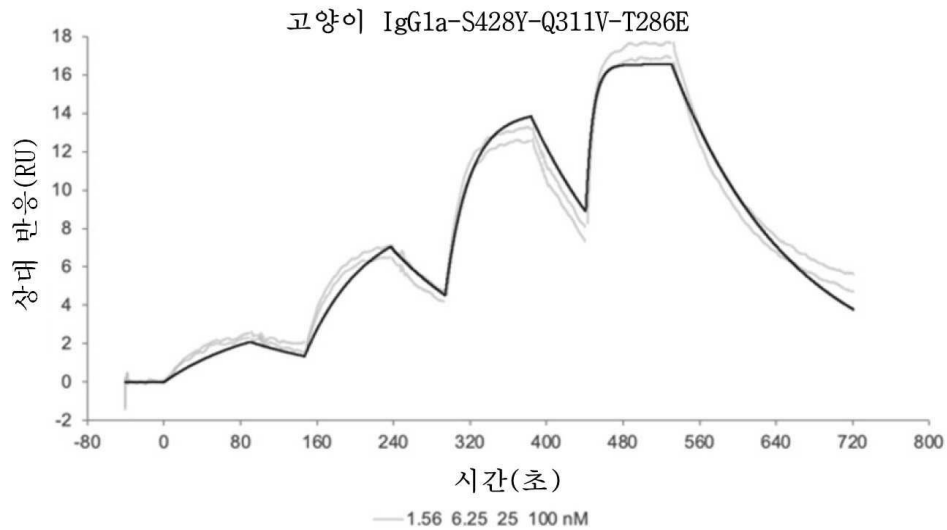
도면49g



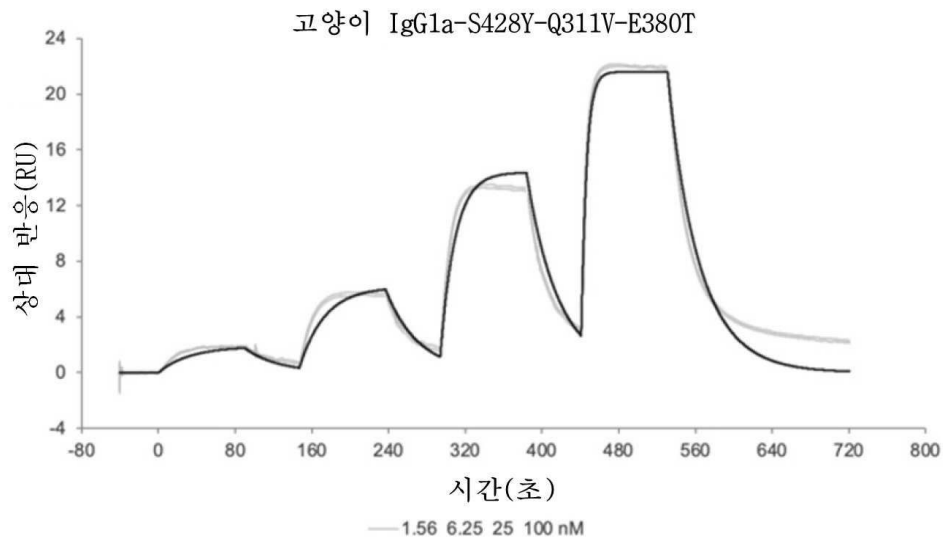
도면49h



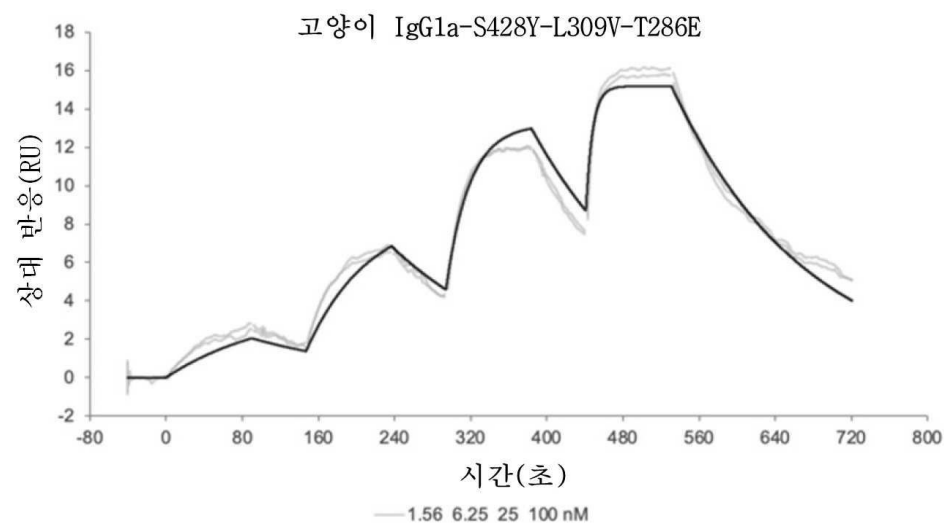
도면49i



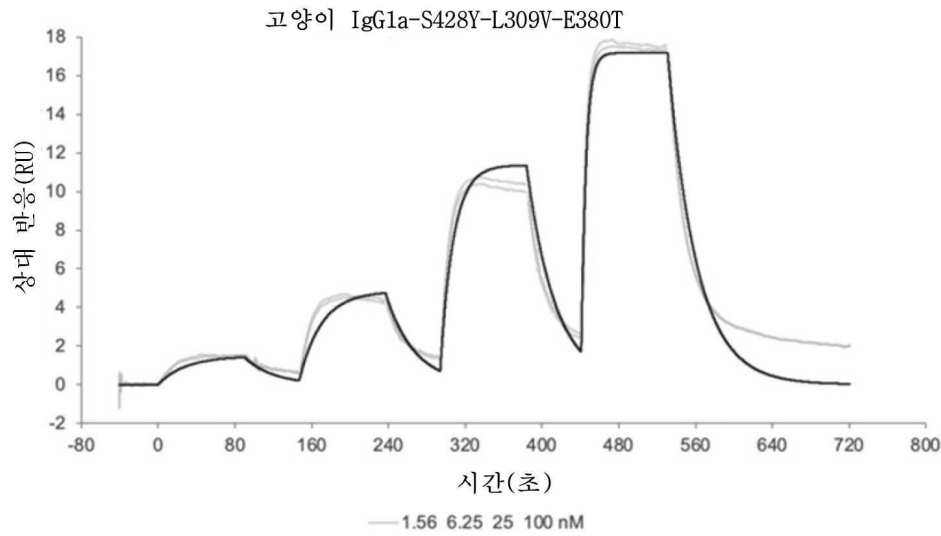
도면49j



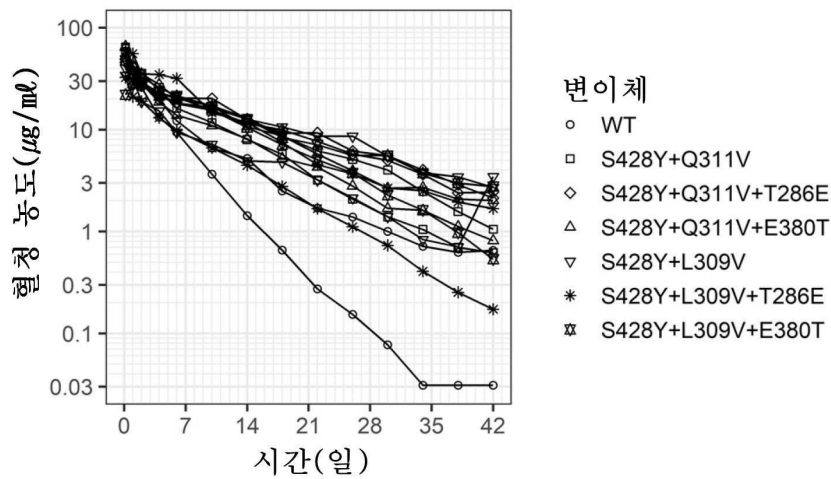
도면49k



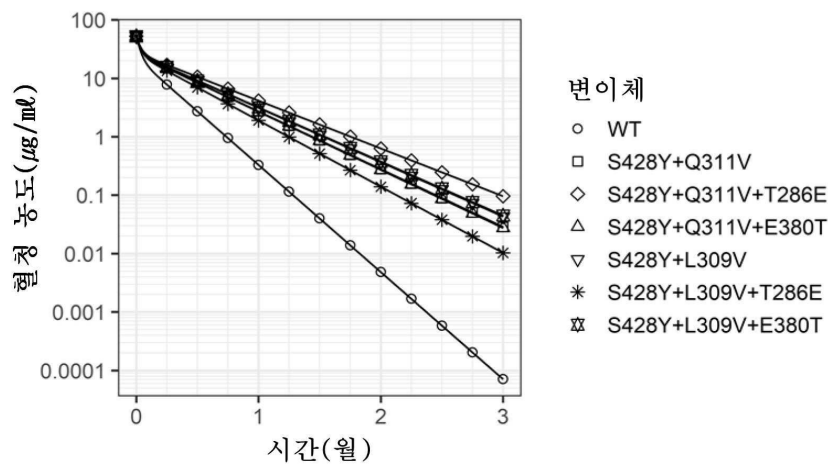
도면49I



도면50



도면51



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> INVETX, INC.

<120> COMPOSITIONS FOR INCREASING HALF-LIFE OF A THERAPEUTIC AGENT IN
FELINES AND METHODS OF USE

<130> WO 2022/010652

<140> PCT/US2021/038714

<141> 2021-06-23

<150> US 63/143,720

<151> 2021-01-29

<150> US 63/050,535

<151> 2020-07-10

<160> 17

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 219

<212> PRT

<213> Felis catus

<400> 1

Pro Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Ile Phe Ile Phe Pro Pro Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Ser Lys

85 90 95

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

100 105 110

Pro His Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Ala Gln Glu Glu Leu
 115 120 125
 Ser Arg Asn Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Ile Lys Ser Phe His Pro
 130 135 140

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

Thr Gln Lys Ser Leu Thr Gln Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 2

<211> 219

<212> PRT

<213> Felis catus

<400> 2

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

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

100 105 110
 Pro His Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Ala Gln Glu Glu Leu
 115 120 125
 Ser Arg Asn Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Ile Glu Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ile Thr Gly Gln Pro Glu Pro Glu
 145 150 155 160
 Asn Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Ser Asp Gly Thr Tyr
 165 170 175

 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Ser Val Asp Arg Ser Arg Trp Gln Arg Gly
 180 185 190
 Asn Thr Tyr Thr Cys Ser Val Ser His Glu Ala Leu His Ser His His
 195 200 205
 Thr Gln Lys Ser Leu Thr Gln Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 3
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Felis catus
 <400> 3
 Val Pro Glu Ile Pro Gly Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

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

 Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Ser Lys

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

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

 Thr Gln Lys Ser Leu Thr Gln Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 4
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Felis catus
 <400> 4
 Pro Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Ile Phe Ile Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Ser Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Leu
 20 25 30
 Val Val Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser Asp Val Gln Ile Thr Trp Phe
 35 40 45

 Val Asp Asn Thr Gln Val Tyr Thr Ala Lys Thr Ser Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Leu His
 65 70 75 80

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

<210> 5

<211> 110

<212> PRT

<213> Felis catus

<400> 5

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

50 55 60

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

<210> 6

<211> 110

<212> PRT

<213> Felis catus

<400> 6

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

Val Val Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser Asn Val Gln Ile Thr Trp Phe
35 40 45

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

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

Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Ser Lys
85 90 95

Ser Leu Pro Ser Ala Met Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

<210> 7

<211> 109

<212> PRT

<213> Felis catus

<400> 7

Gly Gln Pro His Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Ala Gln Glu

1 5 10 15
Glu Leu Ser Arg Asn Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Ile Lys Ser Phe
20 25 30

His Pro Pro Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ile Thr Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Pro Glu Asn Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Ser Asp Gly
50 55 60

Thr Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Arg Ser His Trp Gln

65 70 75 80
Arg Gly Asn Thr Tyr Thr Cys Ser Val Ser His Glu Ala Leu His Ser
85 90 95

His His Thr Gln Lys Ser Leu Thr Gln Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 8

<211> 109

<212> PRT

<213> Felis catus

<400> 8

Gly Gln Pro His Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Ala Gln Glu

1 5 10 15

Glu Leu Ser Arg Asn Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Ile Glu Gly Phe

20 25 30

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

35 40 45

Pro Glu Asn Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Ser Asp Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Gly Asn Thr Tyr Thr Cys Ser Val Ser His Glu Ala Leu His Ser

85 90 95

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

100 105

<210> 9

<211> 109

<212> PRT

<213> Felis catus

<400> 9

Gly Gln Pro His Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Thr Gln Glu

1 5 10 15

Glu Leu Ser Glu Asn Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Ile Lys Gly Phe

20 25 30

His Pro Pro Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ile Thr Gly Gln Pro Glu

35 40 45

Pro Glu Asn Asn Tyr Gln Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Ser Asp Gly

50 55 60

Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Ser Val Asp Arg Ser His Trp Gln

65 70 75 80

Arg Gly Asn Thr Tyr Thr Cys Ser Val Ser His Glu Ala Leu His Ser

85 90 95

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

100 105

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Felis catus

<400> 10

Lys Thr Asp His Pro Pro Gly Pro Lys Pro Cys Asp Cys Pro Lys Cys

1 5 10 15

Pro

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Felis catus

<400> 11

Lys Thr Asp His Pro Pro Gly Pro Lys Pro Cys Asp Cys Pro Lys Cys

1 5 10 15

Pro

<210> 12

<211> 17

<212>

> PRT

<213> Felis catus

<400> 12

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

1 5 10 15

Pro

<210> 13

<211> 335

<212> PRT

<213> Felis catus

<400> 13

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

1 5 10 15

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

50 55 60

Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Leu Ser Asp Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Val Arg Lys Thr Asp His Pro Pro Gly Pro Lys Pro Cys Asp Cys

100 105 110

Pro Lys Cys Pro Pro Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Ile Phe Ile

115 120 125

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Ser Ile Ser Arg Thr Pro Glu

130 135 140

Val Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser Asp Val Gln

145 150 155 160

Ile Thr Trp Phe Val Asp Asn Thr Gln Val Tyr Thr Ala Lys Thr Ser

165 170 175

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

180 185 190

Pro Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys

195 200 205

Val Asn Ser Lys Ser Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys

210 215 220

Ala Lys Gly Gln Pro His Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Ala

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

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

 <210> 14
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> Felis catus
 <400> 14
 Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly

 1 5 10 15
 Thr Thr Ser Gly Ala Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Leu Gly 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 Ala Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Leu Ser Asp Thr

 65 70 75 80
 Phe Thr Cys Asn Val Ala His Pro Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Arg Lys Thr Asp His Pro Pro Gly Pro Lys Pro Cys Asp Cys
 100 105 110

Pro Lys Cys Pro Pro Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Ile Phe Ile

115 120 125

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Ser Ile Ser Arg Thr Pro Glu

130 135 140

Val Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser Asp Val Gln

145 150 155 160

Ile Thr Trp Phe Val Asp Asn Thr Gln Val Tyr Thr Ala Lys Thr Ser

165 170 175

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

180 185 190

Pro Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys

195 200 205

Val Asn Ser Lys Ser Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys

210 215 220

Asp Lys Gly Gln Pro His Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Ala

225 230 235 240

Gln Glu Glu Leu Ser Arg Asn Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Ile Glu

245 250 255

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ile Thr Gly Gln

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Trp Gln Arg Gly Asn Thr Tyr Thr Cys Ser Val Ser His Glu Ala Leu

305 310 315 320

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

325 330 335

<210> 15

<211> 335

<212> PRT

<213> Felis catus

<400> 15

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

1 5 10 15

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

50 55 60

Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Leu Ser Asp Thr

65 70 75 80

Phe Thr Cys Asn Val Ala His Arg Pro Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

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

100 105 110

Pro Lys Cys Pro Val Pro Glu Ile Pro Gly Ala Pro Ser Val Phe Ile

115 120 125

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Ser Ile Ser Arg Thr Pro Glu

130 135 140

Val Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser Asn Val Gln

145 150 155 160

Ile Thr Trp Phe Val Asp Asn Thr Glu Met His Thr Ala Lys Thr Arg

165 170 175

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

180 185 190

Pro Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys

195 200 205

Val Asn Ser Lys Ser Leu Pro Ser Ala Met Glu Arg Thr Ile Ser Lys

210 215 220

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

225 230 235 240

Gln Glu Glu Leu Ser Glu Asn Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Ile Lys

245 250 255

Gly Phe His Pro Pro Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ile Thr Gly Gln

260 265 270

Pro Glu Pro Glu Asn Asn Tyr Gln Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Ser

275 280 285

Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Ser Val Asp Arg Ser His

290 295 300

Trp Gln Arg Gly Asn Thr Tyr Thr Cys Ser Val Ser His Glu Ala Leu

305 310 315 320

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

325 330 335

<210> 16

<211> 200

<212> PRT

<213> Felis catus

<400> 16

Ile Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Ser Ile Ser Arg

1 5 10 15

Thr Pro Glu Val Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser

20 25 30

Asp Val Gln Ile Thr Trp Phe Val Asp Asn Thr Gln Val Tyr Thr Ala

35 40 45

Lys Thr Ser Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

50 55 60

Ser Val Leu Pro Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe

65 70 75 80

Lys Cys Lys Val Asn Ser Lys Ser Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr

85 90 95

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro His Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu

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

 145 150 155 160
 Leu Asp Ser Asp Gly Thr Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp
 165 170 175
 Arg Ser His Trp Gln Arg Gly Asn Thr Tyr Thr Cys Ser Val Ser His
 180 185 190
 Glu Ala Leu His Ser His His Thr
 195 200
 <210> 17
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

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

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

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
115 120 125
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
130 135 140
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
145 150 155 160
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
165 170 175
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
180 185 190
Leu His Asn His Tyr Thr
195