(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0042324
(43) 공개일자 2021년04월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *C07K 16/46* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2866 (2013.01)
C07K 16/468 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7004244
(22) 출원일자(국제) 2019년07월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년02월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/041324
(87) 국제공개번호 WO 2020/014429
국제공개일자 2020년01월16일
(30) 우선권주장
62/696,746 2018년07월11일 미국(US)

(71) 출원인
모멘타 파머슈티컬스 인코포레이티드
미국 메사추세츠 02142 케임브리지 빈니 스트리트 301
(72) 발명자
쿠르타긱 엘마
미국 메사추세츠주 02142 케임브리지 빈니 스트리트 301
루티츠키 로라
미국 메사추세츠주 02142 케임브리지 빈니 스트리트 301
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장훈

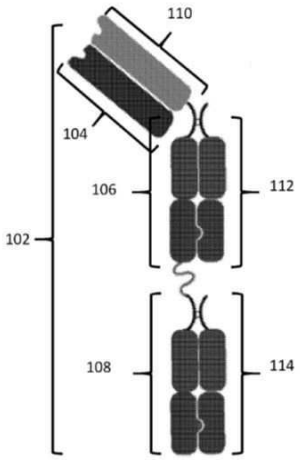
전체 청구항 수 : 총 407 항

(54) 발명의 명칭 **CCR4 표적화 조작된 Fc-항원 결합 도메인 작제물에 관련된 조성물 및 방법**

(57) 요 약

CCR4 결합 도메인 및 2개 이상의 Fc 도메인을 갖는 Fc-항원 결합 작제물이 이러한 작제물을 사용하는 방법으로 기재되어 있다. 이러한 작제물을 구성하는 폴리펩티드가 또한 기재되어 있다. 작제물에 포함되는 Fc 도메인 단량체는 동종이량체화 또는 이종이량체화를 촉진하는 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

대 표 도 - 도1



작제물 1

(52) CPC특허분류
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)
C07K 2317/64 (2013.01)
C07K 2317/732 (2013.01)
C07K 2317/734 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
(72) 발명자
오티즈 다니엘
미국 메사추세츠주 02142 케임브리지 빈니 스트리트 301
란싱 조나단 씨.
미국 메사추세츠주 02142 케임브리지 빈니 스트리트 301
맨닝 안토니
미국 메사추세츠주 02142 케임브리지 빈니 스트리트 301

명 세 서

청구범위

청구항 1

CCR4 결합 도메인 및 링커를 통해 제2 Fc 도메인에 연결된 제1 Fc 도메인을 포함하되, 제1 및 제2 Fc 도메인 각각은 이종이량체화 선택성 모듈 또는 동종이량체화 선택성 모듈을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 2

CCR4 결합 도메인; 링커; 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체; 제2 링커; 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체; 임의의 제3 링커; 및 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 임의의 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 적어도 2개의 Fc 도메인 단량체는 이종이량체화 선택성 모듈 또는 동종이량체화 선택성 모듈을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 3

제2항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 항체 중쇄 가변 도메인을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 4

제2항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 항체 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 5

제2항에 있어서, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체는 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이를 포함하고, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체는 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 6

제2항에 있어서, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체는 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하고, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체는 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 7

제2항에 있어서, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체는 모두 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 8

제2항에 있어서, 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체는 각각 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 9

제2항에 있어서, 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체 모두는 각각 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하고, 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체는 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 10

제2항에 있어서, 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체 모두는 각각 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하고, 제2 IgG1 도메인 단량체는 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 11

제2항에 있어서, 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체 모두는 각각 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하고, 제1 IgG1 도메인 단량체는 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 12

제2항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하는 IgG1 Fc 도메인 단량체는 1개, 2개 또는 3개의 역전하 돌연변이를 추가로 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 13

제2항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이 및 역전하 돌연변이는 CH3 도메인에 있는, 폴리펩티드.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 돌연변이는 EU 위치 G341에서 EU 위치 K447까지의 서열 내에 있는, 폴리펩티드.

청구항 15

제2항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 돌연변이는 단일 아미노산 변화인, 폴리펩티드.

청구항 16

제2항에 있어서, 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 GGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS, GGSGGSGGSGGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS, GGGSGGGSGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG 및 GGGGGGGGGGGGGGGG로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이러한 아미노산 서열로 이루어지는, 폴리펩티드.

청구항 17

제2항에 있어서, 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 글리신 스페이서인, 폴리펩티드.

청구항 18

제2항에 있어서, 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 독립적으로 4 내지 30개, 4 내지 20개, 8 내지 30개, 8 내지 20개, 12 내지 20개 또는 12 내지 30개의 글리신 잔기로 이루어지는, 폴리펩티드.

청구항 19

제2항에 있어서, 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 20개의 글리신 잔기로 이루어지는, 폴리펩티드.

청구항 20

제2항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체 중 적어도 하나는 EU 위치 I253에서 단일 아미노산 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 21

제20항에 있어서, EU 위치 I253에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 독립적으로, I253A, I253C, I253D, I253E, I253F, I253G, I253H, I253I, I253K, I253L, I253M, I253N, I253P, I253Q, I253R, I253S, I253T, I253V, I253W 및 I253Y로 이루어진 군으로부터 선택되는, 폴리펩티드.

청구항 22

제21항에 있어서, 위치 I253에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 I253A인, 폴리펩티드.

청구항 23

제2항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체 중 적어도 하나는 EU 위치 R292에서 단일 아미노산 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 24

제23항에 있어서, EU 위치 R292에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 독립적으로, R292D, R292E, R292L, R292P, R292Q, R292R, R292T 및 R292Y로 이루어진 군으로부터 선택되는, 폴리펩티드.

청구항 25

제24항에 있어서, 위치 R292에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 R292P인, 폴리펩티드.

청구항 26

제2항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 힌지는 독립적으로, EPKSCDKTHTCPPCPAPELL 및 DKTHTCPPCPAPELL로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이러한 아미노산 서열로 이루어지는, 폴리펩티드.

청구항 27

제26항에 있어서, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체의 힌지 부분은 아미노산 서열 DKTHTCPPCPAPELL을 갖는, 폴리펩티드.

청구항 28

제26항에 있어서, 제1 Fc 도메인 단량체의 힌지 부분은 아미노산 서열 EPKSCDKTHTCPPCPAPEL을 갖는, 폴리펩티드.

청구항 29

제26항에 있어서, 제1 Fc 도메인 단량체의 힌지 부분은 아미노산 서열 EPKSCDKTHTCPPCPAPEL을 가지며, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체의 힌지 부분은 아미노산 서열 DKTHTCPPCPAPELL을 갖는, 폴리펩티드.

청구항 30

제2항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH2 도메인은 독립적으로, 2개 이하의 단일 아미노산 결실 또는 치환을 갖는 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 31

제2항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH2 도메인은 동일하고, 2개 이하의 단일 아미노산 결실 또는 치환을 갖는 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 32

제2항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH2 도메인은 동일하고, 2개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 33

제2항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH2 도메인은 동일하고, 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS

KAK를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 34

제2항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 10개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 35

제2항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 8개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 36

제2항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 6개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 37

제2항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 5개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 38

제30항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 아미노산 치환은 T366Y, T366W, T394W, T394Y, F405W, F405A, Y407A, S354C, Y349T, T394F, K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R, D356K 및 D356R로 이루어진 군으로부터 선택되는, 폴리펩티드.

청구항 39

제2항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체는 각각 독립적으로, 최대 10개의 단일 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 40

제39항에 있어서, 단일 아미노산 치환 중 최대 6개는 CH3 도메인 내의 역전하 돌연변이이거나 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이인, 폴리펩티드.

청구항 41

제39항에 있어서, 단일 아미노산 치환은 EU 위치 G341에서 EU 위치 K447까지의 서열 내에 있는, 폴리펩티드.

청구항 42

제2항에 있어서, 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이 중 적어도 하나는 T366Y, T366W, T394W, T394Y, F405W, S354C, Y349T 및 T394F로 이루어진 군으로부터 선택되는, 폴리펩티드.

청구항 43

제5항, 제6항 및 제9항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이는 K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R, D356K 및 D356R로부터 선택되는, 폴리펩티드.

청구항 44

제2항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 scFv인, 폴리펩티드.

청구항 45

제2항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 VH 도메인 및 CH1 도메인을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 46

제43항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 VL 도메인을 추가로 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 47

제45항에 있어서, VH 도메인은 표 1에 기재된 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열의 세트를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 48

제45항에 있어서, VH 도메인은 표 2에 기재된 항체의 서열을 포함하는 VH 도메인의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 49

제45항에 있어서, VH 도메인은 표 2에 기재된 항체의 VH 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하고, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열을 제외한 VH 서열은 표 2에 기재된 항체의 VH 서열과 적어도 95% 또는 98% 동일한, 폴리펩티드.

청구항 50

제45항에 있어서, VH 도메인은 표 2에 기재된 항체의 VH 서열을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 51

제45항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 표 1에 기재된 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열의 세트를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 52

제45항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 VH 및 VL 서열의 세트로부터의 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 53

제45항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 VH 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및 표 2에 기재된 항체의 VL 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하되, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 제외한 VH 및 VL 도메인 서열은 표 2에 기재된 항체의 VH 및 VL 서열과 적어도 95% 또는 98% 동일한, 폴리펩티드.

청구항 54

제45항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 VH 및 VL 서열의 세트를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 55

제2항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 IgG CL 항체 불변 도메인 및 IgG CH1 항체 불변 도메인을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 56

제2항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 VH 도메인 및 CH1 도메인을 포함하고, VL 도메

인 및 CL 도메인을 포함하는 폴리펩티드에 결합하여 Fab를 형성할 수 있는, 폴리펩티드.

청구항 57

제1 또는 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체의 힌지 내 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합에 의해 연결된 제2항 내지 제56항 중 어느 항의 폴리펩티드의 2개의 카피를 포함하는 폴리펩티드 복합체.

청구항 58

힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드에 연결된 제2항 내지 제56항 중 어느 한 항의 폴리펩티드를 포함하되, 상기 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드는 상기 폴리펩티드의 제1, 제2 또는 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체의 힌지 도메인 및 제2 폴리펩티드의 힌지 도메인 내의 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합에 의해 연결되는, 폴리펩티드 복합체.

청구항 59

제58항에 있어서, 제2 폴리펩티드 단량체는 유전자 조작 함몰부를 형성하는 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드 복합체.

청구항 60

제59항에 있어서, 유전자 조작 함몰부를 형성하는 돌연변이는 Y407T, Y407A, F405A, T394S, T394W/Y407A, T366W/T394S, T366S/L368A/Y407V/Y349C, S364H/F405A로 이루어진 군으로부터 선택되는, 폴리펩티드 복합체.

청구항 61

제58항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 폴리펩티드는 최대 10개의 단일 아미노산 치환을 갖는 서열번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩티드 복합체.

청구항 62

CCR4 결합 도메인; 링커; 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체; 제2 링커; 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체; 임의의 제3 링커; 및 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 임의의 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 적어도 하나의 Fc 도메인 단량체는 1개, 2개 또는 3개의 역전하 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 63

제62항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 항체 중쇄 가변 도메인을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 64

제62항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 항체 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 65

제62항에 있어서, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A에서 선택된 2개가 한 세트인 역전하 돌연변이 또는 표 4B에서 선택된 4개가 한 세트인 역전하 돌연변이를 포함하고, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 66

제62항에 있어서, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하고, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 2개가 한 세트인 역전하 돌연변이 또는 표 4B에서 선택된 4개가 한 세트인 역전하 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 67

제62항에 있어서, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체와 제2 IgG 불변 도메인 단량체는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 68

제62항에 있어서, 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체는 각각 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 69

제62항에 있어서, 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체 모두는 각각 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하고, 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A에서 선택된 2개가 한 세트인 역전하 돌연변이 또는 표 4B에서 선택된 4개가 한 세트인 역전하 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 70

제62항에 있어서, 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체 모두는 각각 표 4A 또는 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하고, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A에서 선택된 2개가 한 세트인 역전하 돌연변이 또는 표 4B에서 선택된 4개가 한 세트인 역전하 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 71

제62항에 있어서, 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체 모두는 각각 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하고, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A에서 선택된 2개가 한 세트인 역전하 돌연변이 또는 표 4B에서 선택된 4개가 한 세트인 역전하 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 72

제62항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하는 IgG1 Fc 도메인 단량체는 동일한 CH3 도메인을 갖는, 폴리펩티드.

청구항 73

제62항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이는 CH3 도메인에 있는, 폴리펩티드.

청구항 74

제73항에 있어서, 상기 돌연변이는 EU 위치 G341에서 EU 위치 K447까지의 서열 내에 있는, 폴리펩티드.

청구항 75

제62항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 돌연변이는 각각 단일 아미노산 변화인, 폴리펩티드.

청구항 76

제72항에 있어서, 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS, GGSGGSGGSGGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS, GGGSGGGSGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG 및 GGGGGGGGGGGGGGGG로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이러한 아미노산 서열로 이루어지는, 폴리펩티드.

청구항 77

제62항에 있어서, 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 글리신 스페이서인, 폴리펩티드.

청구항 78

제62항에 있어서, 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 독립적으로 4 내지 30개, 4 내지 20개, 8 내지 30개, 8 내지 20개, 12 내지 20개 또는 12 내지 30개의 글리신 잔기로 이루어지는, 폴리펩티드.

청구항 79

제62항에 있어서, 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 20개의 글리신 잔기로 이루어지는, 폴리펩티드.

청구항 80

제62항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체 중 적어도 하나는 EU 위치 I253에서 단일 아미노산 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 81

제80항에 있어서, EU 위치 I253에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 독립적으로, I253A, I253C, I253D, I253E, I253F, I253G, I253H, I253I, I253K, I253L, I253M, I253N, I253P, I253Q, I253R, I253S, I253T, I253V, I253W 및 I253Y로 이루어진 군으로부터 선택되는, 폴리펩티드.

청구항 82

제81항에 있어서, 위치 I253에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 I253A인, 폴리펩티드.

청구항 83

제62항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체 중 적어도 하나는 EU 위치 R292에서 단일 아미노산 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 84

제83항에 있어서, EU 위치 R292에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 독립적으로, R292D, R292E, R292L, R292P, R292Q, R292R, R292T 및 R292Y로 이루어진 군으로부터 선택되는, 폴리펩티드.

청구항 85

제84항에 있어서, 위치 R292에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 R292P인, 폴리펩티드.

청구항 86

제62항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 힌지는 독립적으로, EPKSCDKTHTCPPCPAPELL 및 DKTHTCPPCPAPELL로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이러한 아미노산 서열로 이루어지는, 폴리펩티드.

청구항 87

제86항에 있어서, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체의 힌지 부분은 아미노산 서열 DKTHTCPPCPAPELL을 갖는, 폴리펩티드.

청구항 88

제86항에 있어서, 제1 Fc 도메인 단량체의 힌지 부분은 아미노산 서열 EPKSCDKTHTCPPCPAPEL을 갖는, 폴리펩티드.

청구항 89

제86항에 있어서, 제1 Fc 도메인 단량체의 힌지 부분은 아미노산 서열 EPKSCDKTHTCPPCPAPEL을 가지며, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체의 힌지 부분은 아미노산 서열 DKTHTCPPCPAPELL을 갖는, 폴리펩티드.

청구항 90

제62항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH2 도메인은 독립적으로, 2개 이하의 단일 아미노산 결실 또는 치환을 갖는 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 91

제62항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH2 도메인은 동일하고, 2개 이하의 단일 아미노산 결실 또는 치환을 갖는 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 92

제62항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH2 도메인은 동일하고, 2개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 93

제62항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH2 도메인은 동일하고, 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 94

제62항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 10개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 95

제62항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 8개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 96

제62항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 6개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 97

제62항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 5개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 98

제90항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 아미노산 치환은 T366Y, T366W, T394W, T394Y, F405W, F405A, Y407A, S354C, Y349T, T394F, K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K,

E357R, D356K 및 D356R로 이루어진 군으로부터 선택되는, 폴리펩티드.

청구항 99

제62항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체는 각각 독립적으로, 최대 10개의 단일 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 100

제99항에 있어서, 단일 아미노산 치환 중 최대 6개는 CH3 도메인 내의 역전하 돌연변이인, 폴리펩티드.

청구항 101

제99항에 있어서, 단일 아미노산 치환은 EU 위치 G341에서 EU 위치 K447까지의 서열 내에 있는, 폴리펩티드.

청구항 102

제62항에 있어서, 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이 중 적어도 하나는 T366Y, T366W, T394W, T394Y, F405W, S354C, Y349T 및 T394F로 이루어진 군으로부터 선택되는, 폴리펩티드.

청구항 103

제65항, 제66항 및 제69항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이는 K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R, D356K 및 D356R로부터 선택되는, 폴리펩티드.

청구항 104

제62항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 scFv인, 폴리펩티드.

청구항 105

제62항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 VH 도메인 및 CH1 도메인을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 106

제103항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 VL 도메인을 추가로 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 107

제105항에 있어서, VH 도메인은 표 1에 기재된 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열의 세트를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 108

제105항에 있어서, VH 도메인은 표 2에 기재된 항체의 서열을 포함하는 VH 도메인의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 109

제105항에 있어서, VH 도메인은 표 2에 기재된 항체의 VH 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하고, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열을 제외한 VH 서열은 표 2에 기재된 항체의 VH 서열과 적어도 95% 또는 98% 동일한, 폴리펩티드.

청구항 110

제105항에 있어서, VH 도메인은 표 2에 기재된 항체의 VH 서열을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 111

제105항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 표 1에 기재된 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열의 세트를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 112

제105항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 VH 및 VL 서열의 세트로부터의 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 113

제105항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 VH 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및 표 2에 기재된 항체의 VL 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하되, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 제외한 VH 및 VL 도메인 서열은 표 2에 기재된 항체의 VH 및 VL 서열과 적어도 95% 또는 98% 동일한, 폴리펩티드.

청구항 114

제105항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 VH 및 VL 서열의 세트를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 115

제62항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 IgG CL 항체 불변 도메인 및 IgG CH1 항체 불변 도메인을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 116

제62항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 VH 도메인 및 CH1 도메인을 포함하고, VL 도메인 및 CL 도메인을 포함하는 폴리펩티드에 결합하여 Fab를 형성할 수 있는, 폴리펩티드.

청구항 117

제1 또는 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체의 힌지 내 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합에 의해 연결된 제2항 내지 제56항 중 어느 항의 폴리펩티드의 2개의 카피를 포함하는 폴리펩티드 복합체.

청구항 118

힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드에 연결된 제62항 내지 제116항 중 어느 한 항의 폴리펩티드를 포함하되, 상기 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드는 상기 폴리펩티드의 제1, 제2 또는 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체의 힌지 도메인 및 제2 폴리펩티드의 힌지 도메인 내의 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합에 의해 연결되는, 폴리펩티드 복합체.

청구항 119

제118항에 있어서, 제2 폴리펩티드 단량체는 1개, 2개 또는 3개의 역전하 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드 복합체.

청구항 120

제119항에 있어서, 제2 폴리펩티드 단량체는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 돌연변이를 포함하며, 폴리펩티드 내의 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 돌연변이에 상보적인, 폴리펩티드 복합체.

청구항 121

제118항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 폴리펩티드는 최대 10개의 단일 아미노산 치환을 갖는 서열번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩티드 복합체.

청구항 122

힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체; 제2 링커; 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체; 임의의 제3 링커; 및 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 임의의 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 적어도 하나의 Fc 도메인 단량체는

유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 123

제122항에 있어서, 제1 IgG1 단량체의 아미노 말단에 CH1 도메인 및 항체 중쇄 가변 도메인을 추가로 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 124

제122항에 있어서, 제1 IgG1 단량체의 아미노 말단에 scFv를 추가로 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 125

제122항에 있어서, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체는 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이를 포함하고, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체는 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 126

제122항에 있어서, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체는 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하고, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체는 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 127

제122항에 있어서, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체는 모두 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 128

제2항에 있어서, 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체는 각각 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 129

제122항에 있어서, 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체 모두는 각각 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하고, 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체는 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 130

제122항에 있어서, 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체 모두는 각각 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하고, 제2 IgG1 도메인 단량체는 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 131

제122항에 있어서, 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체 모두는 각각 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하고, 제1 IgG1 도메인 단량체는 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 132

제122항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하는 IgG1 Fc 도메인 단량체는 1개, 2개 또는 3개의 역전하 돌연변이를 추가로 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 133

제122항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이 및 역전하 돌연변이는 CH3 도메인에 있는, 폴리펩티드.

청구항 134

힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체; 제2 링커; 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체; 임의의 제3 링커; 및 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 임의의 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 적어도 하나의 Fc 도메인 단량체는 1개, 2개 또는 3개의 역전하 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 135

제134항에 있어서, 제1 IgG1 단량체의 아미노 말단에 CH1 도메인 및 항체 중쇄 가변 도메인을 추가로 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 136

제134항에 있어서, 제1 IgG1 단량체의 아미노 말단에 scFv를 추가로 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 137

제134항에 있어서, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A에서 선택된 2개가 한 세트인 역전하 돌연변이 또는 표 6에서 선택된 4개가 한 세트인 역전하 돌연변이를 포함하고, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 138

제134항에 있어서, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하고, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A에서 선택된 2개가 한 세트인 역전하 돌연변이 또는 표 4B에서 선택된 4개가 한 세트인 역전하 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 139

제134항에 있어서, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체와 제2 IgG 불변 도메인 단량체는 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 140

제134항에 있어서, 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체는 각각 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 141

제134항에 있어서, 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체 모두는 각각 표 4A 또는 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하고, 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A에서 선택된 2개가 한 세트인 역전하 돌연변이 또는 표 4B에서 선택된 4개가 한 세트인 역전하 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 142

제134항에 있어서, 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체 모두는 각각 표 4A 또는 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하고, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A에서 선택된 2개가 한 세트인 역전하 돌연변이 또는 표 4B에서 선택된 4개가 한 세트인 역전하 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 143

제134항에 있어서, 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체 모두는 각각 표 4A 또는 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하고, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A에서 선택된 2개가 한 세트인 역전하 돌연변이 또는 표 4B에서 선택된 4개가 한 세트인 역전하 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 144

제134항 내지 제143항 중 어느 한 항에 있어서, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하는 IgG1 Fc 도메인 단량체는 동일한 CH3 도메인을 갖는, 폴리펩티드.

청구항 145

제134항 내지 제143항 중 어느 한 항에 있어서, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이는 CH3 도메인에 있는, 폴리펩티드.

청구항 146

제122항 내지 145항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 돌연변이는 EU 위치 G341에서 EU 위치 K447까지의 서열 내에 있는, 폴리펩티드.

청구항 147

제122항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 돌연변이는 각각 단일 아미노산 변화인, 폴리펩티드.

청구항 148

제122항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 GGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS, GGSGGSGGSGGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS, GGGSGGGSGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG 및 GGGGGGGGGGGGGGGG로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이러한 아미노산 서열로 이루어지는, 폴리펩티드.

청구항 149

제122항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 독립적으로 4 내지 30, 4 내지 20, 8 내지 30, 8 내지 20, 12 내지 20 또는 12 내지 30개의 글리신 잔기로 이루어지는, 폴리펩티드.

청구항 150

제122항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 20개의 글리신 잔기로 이루어지는, 폴리펩티드.

청구항 151

제122항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체 중 적어도 하나는 EU 위치 I253에서 단일 아미노산 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 152

제151항에 있어서, EU 위치 I253에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 독립적으로, I253A, I253C, I253D, I253E, I253F, I253G, I253H, I253I, I253K, I253L, I253M, I253N, I253P, I253Q, I253R, I253S, I253T, I253V, I253W 및 I253Y로 이루어진 군으로부터 선택되는, 폴리펩티드.

청구항 153

제152항에 있어서, 위치 I253에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 I253A인, 폴리펩티드.

청구항 154

제122항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체 중 적어도 하나는 EU 위치 R292에서 단일 아미노산 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 155

제154항에 있어서, EU 위치 R292에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 독립적으로 R292D, R292E, R292L, R292P, R292Q, R292R, R292T 및 R292Y로 이루어진 군으로부터 선택되는, 폴리펩티드.

청구항 156

제155항에 있어서, 위치 R292에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 R292P인, 폴리펩티드.

청구항 157

제122항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 힌지는 독립적으로, EPKSCDKTHTCPPCPAPELL 및 DKTHTCPPCPAPELL로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이러한 아미노산 서열로 이루어지는, 폴리펩티드.

청구항 158

제122항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체의 힌지 부분은 아미노산 서열 DKTHTCPPCPAPELL을 갖는, 폴리펩티드.

청구항 159

제122항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 Fc 도메인 단량체의 힌지 부분은 아미노산 서열 EPKSCDKTHTCPPCPAPEL을 갖는, 폴리펩티드.

청구항 160

제122항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 Fc 도메인 단량체의 힌지 부분은 아미노산 서열 EPKSCDKTHTCPPCPAPEL을 가지며, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체의 힌지 부분은 아미노산 서열 DKTHTCPPCPAPELL을 갖는, 폴리펩티드.

청구항 161

제122항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH2 도메인은 독립적으로, 2개 이하의 단일 아미노산 결실 또는 치환을 갖는 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 162

제122항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH2 도메인은 동일하고, 2개 이하의 단일 아미노산 결실 또는 치환을 갖는 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 163

(내용 없음)

청구항 164

(내용 없음)

청구항 165

제122항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH2 도메인은 동일하고, 2개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 166

제122항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH2 도메인은 동일하고, 아미노산 서열
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 167

제122항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 10개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 168

제122항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 8개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 169

제122항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 6개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 170

제122항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 5개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 171

제122항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 아미노산 치환은 T366Y, T366W, T394W, T394Y, F405W, S354C, Y349T, T394F, K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R, D356K 및 D356R로 이루어진 군으로부터 선택되는, 폴리펩티드.

청구항 172

제122항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체는 각각 독립적으로, 최대 10개의 단일 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 173

제99항에 있어서, 단일 아미노산 치환 중 최대 6개는 CH3 도메인 내의 역전하 돌연변이인, 폴리펩티드.

청구항 174

제173항에 있어서, 단일 아미노산 치환은 EU 위치 G341에서 EU 위치 K447까지의 서열 내에 있는, 폴리펩티드.

청구항 175

제122항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이 중 적어도 하나는 T366Y, T366W, T394W, T394Y, F405W, S354C, Y349T 및 T394F로 이루어진 군으로부터 선택되는, 폴리펩티드.

청구항 176

제122항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이는 K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R, D356K 및 D356R로부터 선택되는, 폴리펩티드.

청구항 177

(내용 없음)

청구항 178

제123항, 제124항, 제135항 및 제136항 중 어느 한 항에 있어서, VH 도메인 또는 ScFv는 표 1에 기재된 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열의 세트를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 179

제123항, 제124항, 제135항 및 제136항 중 어느 한 항에 있어서, VH 도메인 또는 ScFv는 표 2에 기재된 항체의 서열을 포함하는 VH 도메인의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 180

제123항, 제124항, 제135항 및 제136항 중 어느 한 항에 있어서, VH 도메인 또는 ScFv는 표 2에 기재된 항체의 VH 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하고, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열을 제외한 VH 서열은 표 2에 기재된 항체의 VH 서열과 적어도 95% 또는 98% 동일한, 폴리펩티드.

청구항 181

제123항, 제124항, 제135항 및 제136항 중 어느 한 항에 있어서, VH 도메인 또는 ScFv는 표 2에 기재된 항체의 VH 서열을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 182

제123항, 제124항, 제135항 및 제136항 중 어느 한 항에 있어서, VH 도메인 또는 ScFv는 표 1에 기재된 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열의 세트를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 183

제123항, 제124항, 제135항 및 제136항 중 어느 한 항에 있어서, VH 도메인 또는 ScFv는 표 2에 기재된 항체의 VH 및 VL 서열의 세트로부터의 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 184

제123항, 제124항, 제135항 및 제136항 중 어느 한 항에 있어서, VH 도메인 또는 ScFv는 표 2에 기재된 항체의 VH 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및 표 2에 기재된 항체의 VL 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하고, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 제외한 VH 및 VL 도메인 서열은 표 2에 기재된 항체의 VH 및 VL 서열과 적어도 95% 또는 98% 동일한, 폴리펩티드.

청구항 185

제123항, 제124항, 제135항 및 제136항 중 어느 한 항에 있어서, VH 도메인 또는 ScFv는 표 2에 기재된 항체의 VH 및 VL 서열의 세트를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 186

제122항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, IgG CL 항체 불변 도메인 및 IgG CH1 항체 불변 도메인을 추가로 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 187

제2항 내지 제187항 중 어느 한 항의 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자.

청구항 188

제187항의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 189

제187항의 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포.

청구항 190

제188항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 191

제2항 내지 제187항 중 어느 한 항의 폴리펩티드의 제조 방법으로서, 상기 폴리펩티드를 발현하는 조건 하에서 제189항 또는 제190항의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 192

제189항에 있어서, 항체 VL 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 추가로 포함하는 숙주 세포.

청구항 193

제190항에 있어서, 항체 VL 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 추가로 포함하는 숙주 세포.

청구항 194

제189항에 있어서, 항체 VL 도메인 및 항체 CL 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 추가로 포함하는 숙주 세포.

청구항 195

제190항에 있어서, 항체 VL 도메인 및 항체 CL 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 추가로 포함하는 숙주 세포.

청구항 196

제189항에 있어서, 10개 이하의 단일 아미노산 돌연변이를 갖는 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 추가로 포함하는 숙주 세포.

청구항 197

제190항에 있어서, 10개 이하의 단일 아미노산 돌연변이를 갖는 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 추가로 포함하는 숙주 세포.

청구항 198

(내용 없음)

청구항 199

제196항 또는 제197항에 있어서, IgG1 Fc 도메인 단량체는 CH3 도메인에서 10개, 8개, 6개 또는 4개 이하의 단일 아미노산 돌연변이를 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 200

제2항 내지 제186항 중 어느 한 항의 폴리펩티드를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 201

제200항에 있어서, 상기 폴리펩티드의 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 2% 미만은 Fc 도메인 단량체 상에 적어도 하나의 푸코스 변형을 갖는, 약학적 조성물.

청구항 202

제1항에 있어서, Fc-항원 결합 도메인 작제물은

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드; 및

d) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 또는 제3 폴리펩티드에 연결된 항원 결합 도메인을 포함하되,

제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 203

제1항 또는 제202항에 있어서, 단일 Fc-항원 결합 도메인 작제물은 항체인, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 204

Fc-항원 결합 도메인 작제물의 실질적으로 균질한 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 조성물은

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 또는 제3 폴리펩티드에 연결된 항원 결합 도메인을 포함하되,

제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하는, 조성물.

청구항 205

제204항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드 또는 제3 폴리펩티드에 연결되거나, 제2 폴리펩티드와 제3 폴리펩티드에 연결되는, 조성물.

청구항 206

제204항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 및 제3 폴리펩티드에 연결되는, 조성물.

청구항 207

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드; 및

d) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 또는 제3 폴리펩티드에 연결된 항원 결합 도메인을 포함하되,

제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 단일 Fc 도메인 및 CCR4 결합 도메인을 갖는 작제물에 의해 나타나지 않는 생물학적 활성을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 208

제207항에 있어서, 생물학적 활성은 Fc 수용체 매개 효과기 기능인, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 209

제208항에 있어서, Fc 수용체 매개 효과기 기능은 ADCC 및 ADCP 및/또는 CDC 활성인, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 210

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 스페이서를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 또는 제3 폴리펩티드에 연결된 항원 결합 도메인을 포함하되,

제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 211

제202항, 제207항 또는 제210항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드 또는 제3 폴리펩티드에 연결되거나, 제2 폴리펩티드 및 제3 폴리펩티드에 연결되는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 212

제202항, 제207항 또는 제210항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 및 제3 폴리펩티드에 연결되는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 213

제1항 및 제202항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 Fab인, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 214

제202항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 제1, 제2 또는 제3 폴리펩티드의 아미노산 서열의 일부인, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 215

제214항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 scFv인, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 216

제202항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 V_H 도메인 및 C_H1 도메인을 포함하고, V_H 및 C_H1 도메인은 제1, 제2 또는 제3 폴리펩티드의 아미노산 서열의 일부인, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 217

제216항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 V_L 도메인을 추가로 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 218

제217항에 있어서, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 V_L 도메인을 포함하는 제4 폴리펩티드를 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 219

제216항에 있어서, V_H 도메인은 표 1에 기재된 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열의 세트를 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 220

제216항에 있어서, V_H 도메인은 표 2에 기재된 항체의 서열을 포함하는 VH 도메인의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 221

제216항에 있어서, V_H 도메인은 표 2에 기재된 항체의 V_H 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하고, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열을 제외한 V_H 서열은 표 2에 기재된 항체의 V_H 서열과 적어도 95% 동일한, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 222

제216항에 있어서, V_H 도메인은 표 2에 기재된 항체의 V_H 서열을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 223

제1항 및 제202항 내지 제215항 중 어느 한 항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 표 1에 기재된 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열의 세트를 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 224

제1항 및 제202항 내지 제215항 중 어느 한 항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 V_H 및 V_L 서열의 세트로부터 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 225

제1항 및 제202항 내지 제215항 중 어느 한 항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 V_H 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 V_H 도메인, 및 표 2에 기재된 항체의 V_L 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 V_L 도메인을 포함하고, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 제외한 V_H 및 V_L 도메인 서열은 표 2에 기재된 항체의 V_H 및 V_L 서열과 적어도 95% 동일한, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 226

제1항 및 제202항 내지 제215항 중 어느 한 항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 V_H 및 V_L

서열을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 227

제1항 및 제202항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, IgG C_L 항체 불변 도메인 및 IgG C_H1 항체 불변 도메인을 추가로 포함하되, IgG C_H1 항체 불변 도메인은 링커를 통해 제1 폴리펩티드 또는 제2 폴리펩티드의 N-말단에 부착되는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 228

제202항 내지 제227항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 229

제202항 내지 제228항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 230

제202항 내지 제228항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 폴리펩티드 및 제3 폴리펩티드는 동일한 아미노산 서열을 갖는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 231

제228항 또는 제229항에 있어서, 이량체화 선택성 모듈은 Fc 도메인 단량체 중 하나의 C_H3 도메인에 유전자 조작 함몰부를 포함하며, Fc 도메인 단량체 중 다른 하나의 C_H3 도메인에 유전자 조작 돌출부를 포함하되, 유전자 조작 함몰부와 유전자 조작 돌출부는 Fc 도메인 단량체의 돌출부-함몰부 쌍을 형성하도록 위치되는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 232

제231항에 있어서, 유전자 조작 돌출부는 S354C, T366W, T366Y, T394W, T394F 및 F405W로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 변형을 포함하고, 유전자 조작 함몰부는 Y349C, T366S, L368A, Y407V, Y407T, Y407A, F405A 및 T394S로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 변형을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 233

제228항 또는 제229항에 있어서, Fc 도메인 단량체 중 하나는 Y407V 및 Y349C를 포함하고, Fc 도메인 단량체 중 다른 하나는 T366W 및 S354C를 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 234

제228항 또는 제229항에 있어서, 이량체화 선택성 모듈은 도메인 단량체 중 하나의 C_H3 도메인에 음전하 아미노산을 포함하고, Fc 도메인 단량체 중 다른 하나의 C_H3 도메인에 양전하 아미노산을 포함하되, 음전하 아미노산 및 양전하 아미노산은 Fc 도메인의 형성을 촉진하도록 위치되는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 235

제234항에 있어서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 D399K 및 K409D 또는 K409E를 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 236

제234항에 있어서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 K392D 및 D399K를 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 237

제234항에 있어서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 E357K 및 K370E를 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 238

제234항에 있어서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 D356K 및 K439D를 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 239

제234항에 있어서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 K392E 및 D399K를 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 240

제234항에 있어서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 E357K 및 K370D를 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 241

제234항에 있어서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 D356K 및 K439E를 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 242

제234항에 있어서, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 S354C 및 T366W를 포함하고, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V를 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 243

제234항에 있어서, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 S354C 및 T366W를 포함하고, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V를 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 244

제234항에 있어서, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 E357K 또는 E357R을 포함하고, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 K370D 또는 K370E를 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 245

제234항에 있어서, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 K370D 또는 K370E를 포함하고, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 E357K 또는 357R을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 246

제234항에 있어서, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 K409D 또는 K409E를 포함하고, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 D399K 또는 D399R을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 247

제234항에 있어서, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 D399K 또는 D399R을 포함하고, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 K409D 또는 K409E를 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 248

제1항 및 제202항 내지 제247항 중 어느 한 항에 있어서, Fc-항원 결합 도메인 작제물 내의 하나 이상의 링커는 결합인, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 249

제1항 및 제202항 내지 제247항 중 어느 한 항에 있어서, Fc-항원 결합 도메인 작제물 내의 하나 이상의 링커는 스페이서인, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 250

제249항에 있어서, 스페이서는 서열 GGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS, GGSGGSGGSGGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS, GGGSGGGSGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG 또는 GGGGGGGGGGGGGGGG를 갖는 폴리펩티드를 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 251

제249항에 있어서, 스페이서는 글리신 스페이서인, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 252

제251항에 있어서, 스페이서는 4 내지 30개, 8 내지 30개 또는 12 내지 30개의 글리신 잔기로 이루어지는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 253

제252항에 있어서, 스페이서는 20개의 글리신 잔기로 이루어지는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 254

제1항 및 제202항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, CCR4 결합 도메인은 링커에 의해 Fc 도메인 단량체에 연결되는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 255

제254항에 있어서, 링커는 스페이서인, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 256

제1항 및 제202항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인의 적어도 하나는 위치 I253에서 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 257

제256항에 있어서, 위치 I253에서의 아미노산 변형은 독립적으로, I253A, I253C, I253D, I253E, I253F, I253G, I253H, I253I, I253K, I253L, I253M, I253N, I253P, I253Q, I253R, I253S, I253T, I253V, I253W 및 I253Y로 이루어진 군으로부터 선택되는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 258

제257항에 있어서, 위치 I253에서의 각각의 아미노산 변형은 I253A인, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 259

제1항 및 제202항 내지 제258항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인의 적어도 하나는 위치 R292에서 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 260

제259항에 있어서, 위치 R292에서의 각각의 아미노산 변형은 독립적으로, R292D, R292E, R292L, R292P, R292Q, R292R, R292T 및 R292Y로 이루어진 군으로부터 선택되는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 261

제260항에 있어서, 위치 R292에서의 각각의 아미노산 변형은 R292P인, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 262

제1항 및 제202항 내지 제261항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체 중 하나 이상은 IgG 힌지 도메인, IgG C_H2 항체 불변 도메인 및 IgG C_H3 항체 불변 도메인을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 263

제262항에 있어서, Fc 도메인 단량체는 각각 IgG 힌지 도메인, IgG C_H2 항체 불변 도메인 및 IgG C_H3 항체 불변 도메인을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 264

제262항 또는 제263항에 있어서, IgG는 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군에서 선택되는 아형인, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 265

제1항 및 제202항 내지 제264항 중 어느 한 항에 있어서, 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리펩티드 각각에서 N-말단 Asp는 Gln으로 돌연변이된, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 266

제1항 및 제202항 내지 제265항 중 어느 한 항에 있어서, 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리펩티드 중 하나 이상에는 C-말단 라이신이 결여되어 있는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 267

제266항에 있어서, 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리펩티드의 각각에는 C-말단 라이신이 결여되어 있는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 268

제1항 및 제202항 내지 제267항 중 어느 한 항에 있어서, 링커에 의해 하나 이상의 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 연결되는 알부민-결합 펩티드를 추가로 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 269

Fc-항원 결합 도메인 작제물의 집단을 포함하는 세포 배양 배지로서, Fc-항원 결합 도메인 작제물의 적어도 50 몰%는

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드; 및

d) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 또는 제3 폴리펩티드에 연결된 항원 결합 도메인을 포함하되,

제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하는, 세포 배양 배지.

청구항 270

제269항에 있어서, Fc-항원 결합 도메인 작제물의 적어도 75 몰%는 제1 Fc 도메인, 제2 Fc 도메인 및 CCR4 결합 도메인을 포함하는, 세포 배양 배지.

청구항 271

Fc-항원 결합 도메인 작제물의 집단을 포함하는 세포 배양 배지로서, Fc-항원 결합 도메인 작제물의 적어도 50 몰%는 구조적으로 동일하고, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 적어도 0.1 mg/L의 농도로 배양 배지에 존재하는, 세포 배양 배지.

청구항 272

제271항에 있어서, Fc-항원 결합 도메인 작제물의 적어도 75 몰%는 구조적으로 동일한, 세포 배양 배지.

청구항 273

제269항 내지 제272항 중 어느 한 항에 있어서, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 적어도 10 mg/L의 농도로 배양 배지에 존재하는, 세포 배양 배지.

청구항 274

제269항 내지 제273항 중 어느 한 항에 있어서, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 적어도 100 mg/L의 농도로 배양 배지에 존재하는, 세포 배양 배지.

청구항 275

Fc-항원 결합 도메인 작제물의 제조 방법으로서, 상기 방법은

a) 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 숙주 세포는

(1) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

(2) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드; (3) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드; 및 (4) 항원 결합 도메인을 발현하되, 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, CCR4 결합 도메인은 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 또는 제3 폴리펩티드와 연결되어 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 형성하고, 세포 배양 상청액에 있는 Fc-항원 결합 도메인 작제물의 적어도 50 몰%는 구조적으로 동일한, 단계 및

b) 세포 배양 상청액으로부터 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 정제하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 276

Fc-항원 결합 도메인 작제물의 실질적으로 균질한 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 조성물은

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제1 폴리펩티드에 연결된 제1 항원 결합 도메인; 및

e) 제2 폴리펩티드 및/또는 제3 폴리펩티드에 연결된 제2 항원 결합 도메인을 포함하되,

제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제1 및 제2 항원 결합 도메인은 상이한 항원과 결합하는, 조성물.

청구항 277

제276항에 있어서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제2 폴리펩티드와 제3 폴리펩티드는 상이한 아미노산 서열을 갖는, 조성물.

청구항 278

제277항에 있어서, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 E357K 및 K370D를 포함하고, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 K370D 및 E357K를 포함하는, 조성물.

청구항 279

Fc-항원 결합 도메인 작제물의 실질적으로 균질한 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 조성물은

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제1 폴리펩티드에 연결된 제1 항원 결합 도메인;

e) 제2 폴리펩티드에 연결된 제2 항원 결합 도메인; 및

f) 제3 폴리펩티드에 연결된 제3 항원 결합 도메인을 포함하되,

제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제1, 제2 및 제3 항원 결합 도메인은 상이한 항원과 결합하는, 조성물.

청구항 280

제279항에 있어서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제2 폴리펩티드와 제3 폴리펩티드는 상이한 아미노산 서열을 갖는, 조성물.

청구항 281

제280항에 있어서, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 E357K 및 K370D를 포함하고, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 K370D 및 E357K를 포함하는, 조성물.

청구항 282

Fc-항원 결합 도메인 작제물의 실질적으로 균질한 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 조성물은

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) iv) 제3 Fc 도메인 단량체,

v) 제4 Fc 도메인 단량체 및

vi) 제3 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드; 및

e) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드 또는 제4 폴리펩티드에 연결되는 항원 결합 도메인을 포함하되,

제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제4 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하는, 조성물.

청구항 283

제282항에 있어서, 제1 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체는 각각 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제4 및 제6 Fc 도메인 단량체는 각각 제4 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 284

Fc-항원 결합 도메인 작제물의 실질적으로 균질한 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 조성물은

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) iv) 제3 Fc 도메인 단량체,

v) 제4 Fc 도메인 단량체 및

vi) 제3 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드; 및

e) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드 또는 제4 폴리펩티드에 연결되는 항원 결합 도메인을 포함하되,

제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제1 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제3 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하는, 조성물.

청구항 285

제284항에 있어서, 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제1 및 제5 Fc 도메인 단량체는 각각 제1 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제3 및 제6 Fc 도메인 단량체는 각각 제3 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 286

Fc-항원 결합 도메인 작제물의 실질적으로 균질한 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 조성물은

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체,

iii) 제3 Fc 도메인 단량체,

iv) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 링커 및

v) 제2 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) vi) 제4 Fc 도메인 단량체,

vii) 제5 Fc 도메인 단량체,

viii) 제6 Fc 도메인 단량체,

ix) 제4 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제3 링커 및

x) 제5 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제4 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드;

e) 제9 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제5 폴리펩티드;

f) 제10 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제6 폴리펩티드; 및

g) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드, 제4 폴리펩티드, 제5 폴리펩티드 또는 제6 폴리펩티드에 연결되는 항원 결합 도메인을 포함하되,

제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제1 Fc 도메인 단량체와 제7 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제4 Fc 도메인 단량체와 제8 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제3 Fc 도메인 단량체와 제9 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제4 Fc 도메인을 형성하며, 제6 Fc 도메인 단량체와 제10 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제5 Fc 도메인을 형성하는, 조성물.

청구항 287

제286항에 있어서, 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체는 각각 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제1 및 제7 Fc 도메인 단량체는 각각 제1 Fc 도메인 단량체와 제7 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제4 및 제8 Fc 도메인 단량체는 각각 제4 Fc 도메인 단량체와 제8 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제3 및 제9 Fc 도메인 단량체는 각각 제3 Fc 도메인 단량체와 제9 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제6 및 제10 Fc 도메인 단량체는 각각 제6 Fc 도메인 단량체와 제10 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 288

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제1 폴리펩티드에 연결된 제1 항원 결합 도메인; 및

e) 제2 폴리펩티드 및/또는 제3 폴리펩티드에 연결된 제2 항원 결합 도메인을 포함하되,

제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제1 및 제2 항원 결합 도메인은 상이한 항원과 결합하고, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 단일 Fc 도메인 및 CCR4 결합 도메인을 갖는 작제물에 비해 항체 의존성 세포독성(ADCC) 검정, 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP), 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC) 검정에서 강화된 효과기 기능을 갖는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 289

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제1 폴리펩티드에 연결된 제1 항원 결합 도메인; 및

e) 제2 폴리펩티드 및/또는 제3 폴리펩티드에 연결된 제2 항원 결합 도메인을 포함하되,

제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제1 및 제2 항원 결합 도메인은 상이한 항원과 결합하고, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 단일 Fc 도메인 및 CCR4 결합 도메인을 갖는 작제물에 의해 나타나지 않는 생물학적 활성을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 290

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 스페이서를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제1 폴리펩티드에 연결된 제1 항원 결합 도메인; 및

e) 제2 폴리펩티드 및/또는 제3 폴리펩티드에 연결된 제2 항원 결합 도메인을 포함하되,

제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제1 및 제2 항원 결합 도메인은 상이한 항원과 결합하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 291

Fc-항원 결합 도메인 작제물의 집단을 포함하는 세포 배양 배지로서, Fc-항원 결합 도메인 작제물의 적어도 50 몰%는

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제1 폴리펩티드에 연결된 제1 항원 결합 도메인; 및

e) 제2 폴리펩티드 및/또는 제3 폴리펩티드에 연결된 제2 항원 결합 도메인을 포함하되,

제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제1 및 제2 항원 결합 도메인은 상이한 항원과 결합하는, 세포 배양 배지.

청구항 292

Fc-항원 결합 도메인 작제물의 제조 방법으로서, 상기 방법은

a) 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 숙주 세포는

(1) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

(2) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드; (3) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드; (4) 제1 폴리펩티드에 연결되는 제1 항원 결합 도메인; 및 (5) 제2 폴리펩티드 및/또는 제3 폴리펩티드에 연결되는 제2 항원 결합 도메인을 발현하되, 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, CCR4 결합 도메인은 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 또는 제3 폴리펩티드와 연결되어 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 형성하고, 제1 및 제2 항원 결합 도메인은 상이한 항원과 결합하며, 세포 배양 상청액에 있는 Fc-항원 결합 도메인 작제물의 적어도 50 몰%는 구조적으로 동일한, 단계 및

b) 세포 배양 상청액으로부터 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 정제하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 293

제288항, 제289항, 제290항, 제291항 또는 제292항에 있어서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제2 폴리펩티드 및 제3 폴리펩티드는 상이한 아미노산 서열을 갖는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 294

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제1 폴리펩티드에 연결된 제1 항원 결합 도메인;

e) 제2 폴리펩티드에 연결된 제2 항원 결합 도메인; 및

f) 제3 폴리펩티드에 연결된 제3 항원 결합 도메인을 포함하되,

제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제1, 제2 및 제3 항원 결합 도메인은 상이한 항원과 결합하고, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 단일 Fc 도메인 및 CCR4 결합 도메인을 갖는 작제물에 비해 항체 의존성 세포독성(ADCC) 검정, 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP) 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC) 검정에서 강화된 효과기 기능을 갖는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 295

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제1 폴리펩티드에 연결된 제1 항원 결합 도메인;

e) 제2 폴리펩티드에 연결된 제2 항원 결합 도메인; 및

f) 제3 폴리펩티드에 연결된 제3 항원 결합 도메인을 포함하되,

제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제1, 제2 및 제3 항원 결합 도메인은 상이한 항원과 결합하고, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 단일 Fc 도메인 및 CCR4 결합 도메인을 갖는 작제물에 의해 나타나지 않는 생물학적 활성을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 296

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 스페이서를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제1 폴리펩티드에 연결된 제1 항원 결합 도메인;

e) 제2 폴리펩티드에 연결된 제2 항원 결합 도메인; 및

f) 제3 폴리펩티드에 연결된 제3 항원 결합 도메인을 포함하되,

제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제1, 제2 및 제3 항원 결합 도메인은 상이한 항원과 결합하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 297

Fc-항원 결합 도메인 작제물의 집단을 포함하는 세포 배양 배지로서, Fc-항원 결합 도메인 작제물의 적어도 50 몰%는

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제1 폴리펩티드에 연결된 제1 항원 결합 도메인;

e) 제2 폴리펩티드에 연결된 제2 항원 결합 도메인; 및

f) 제3 폴리펩티드에 연결된 제3 항원 결합 도메인을 포함하되,

제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제1, 제2 및 제3 항원 결합 도메인은 상이한 항원과 결합하는, 세포 배양 배지.

청구항 298

Fc-항원 결합 도메인 작제물의 제조 방법으로서, 상기 방법은

a) 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 숙주 세포는

(1) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

(2) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드; (3) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드; (4) 제1 폴리펩티드에 연결되는 제1 항원 결합 도메인; (5) 제2 폴리펩티드에 연결되는 제2 항원 결합 도메인; 및 (6) 제3 폴리펩티드에 연결되는 제3 항원 결합 도메인을 발현하되, 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하며, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하고, CCR4 결합 도메인은 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 또는 제3 폴리펩티드에 연결되어 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 형성하며, 제1 및 제2 항원 결합 도메인은 상이한 항원과 결합하고, 세포 배양 상청액에 있는 Fc-항원 결합 도메인 작제물의 적어도 50 몰%는 구조적으로 동일한, 단계 및

b) 세포 배양 상청액으로부터 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 정제하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 299

제294항, 제295항, 제296항, 제297항 또는 제298항에 있어서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제2 폴리펩티드와 제3 폴리펩티드는 상이한 아미노산 서열을 갖는, 조성물.

청구항 300

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) iv) 제3 Fc 도메인 단량체,

v) 제4 Fc 도메인 단량체 및

vi) 제3 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드; 및

e) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드 또는 제4 폴리펩티드에 연결되는 항원 결합 도메인을 포함하되,

제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제4 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 단일 Fc 도메인 및 CCR4 결합 도메인을 갖는 작제물에 비해 항체 의존성 세포독성(ADCC) 검정, 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP) 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC) 검정에서 강화된 효과기 기능을 갖는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 301

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) iv) 제3 Fc 도메인 단량체,

v) 제4 Fc 도메인 단량체 및

vi) 제3 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드; 및

e) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드 또는 제4 폴리펩티드에 연결되는 항원 결합 도메인을 포함하되,

제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제4 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 단일 Fc 도메인 및 CCR4 결합 도메인을 갖는 작제물에 의해 나타나지 않는 생물학적 활성을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 302

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 스페이서를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) iv) 제3 Fc 도메인 단량체,

v) 제4 Fc 도메인 단량체 및

vi) 제3 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 스페이서를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드; 및

e) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드 또는 제4 폴리펩티드에 연결되는 항원 결합 도메인을 포함하되,

제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제4 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 303

Fc-항원 결합 도메인 작제물의 집단을 포함하는 세포 배양 배지로서, Fc-항원 결합 도메인 작제물의 적어도 50 몰%는

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) iv) 제3 Fc 도메인 단량체,

v) 제4 Fc 도메인 단량체 및

vi) 제3 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드; 및

e) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드 또는 제4 폴리펩티드에 연결되는 항원 결합 도메인을 포함하되,

제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제4 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하는, 세포 배양 배지.

청구항 304

Fc-항원 결합 도메인 작제물의 제조 방법으로서, 상기 방법은

a) 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 숙주 세포는

(1) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

(2) iv) 제3 Fc 도메인 단량체,

v) 제4 Fc 도메인 단량체 및

vi) 제3 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

(3) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

(4) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드; 및

(5) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드 또는 제4 폴리펩티드에 연결되는 항원 결합 도메인을 발현하되,

제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하며, 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하고, 제4 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하며, 세포 배양 상청액에 있는 Fc-항원 결합 도메인 작제물의 적어도 50 몰%는 구조적으로 동일한, 단계 및

b) 세포 배양 상청액으로부터 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 정제하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 305

제300항, 제301항, 제302항, 제303항 또는 제304항에 있어서, 제1 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체는 각각 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제4 및 제6 Fc 도메인 단량체는 각각 제4 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 306

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) iv) 제3 Fc 도메인 단량체,

v) 제4 Fc 도메인 단량체 및

vi) 제3 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드; 및

e) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드 또는 제4 폴리펩티드에 연결되는 항원 결합 도메인을 포함하되,

제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제1 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제3 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 단일 Fc 도메인 및 CCR4 결합 도메인을 갖는 작제물에 비해 항체 의존성 세포독성(ADCC) 검정, 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP) 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC) 검정에서 강화된 효과기 기능을 갖는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 307

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) iv) 제3 Fc 도메인 단량체,

v) 제4 Fc 도메인 단량체 및

vi) 제3 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드; 및

e) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드 또는 제4 폴리펩티드에 연결되는 항원 결합 도메인을 포함하되,

제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제1 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제3 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 단일 Fc 도메인 및 CCR4 결합 도메인을 갖는 작제물에 의해 나타나지 않는 생물학적 활성을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 308

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 스페이서를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) iv) 제3 Fc 도메인 단량체,

v) 제4 Fc 도메인 단량체 및

vi) 제3 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 스페이서를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드; 및

e) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드 또는 제4 폴리펩티드에 연결되는 항원 결합 도메인을 포함하되,

제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제1 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제3 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 309

Fc-항원 결합 도메인 작제물의 집단을 포함하는 세포 배양 배지로서, Fc-항원 결합 도메인 작제물의 적어도 50 몰%는

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) iv) 제3 Fc 도메인 단량체,

v) 제4 Fc 도메인 단량체 및

vi) 제3 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드; 및

e) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드 또는 제4 폴리펩티드에 연결되는 항원 결합 도메인을 포함하되,

제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제1 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제3 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하는, 세포 배양 배지.

청구항 310

Fc-항원 결합 도메인 작제물의 제조 방법으로서, 상기 방법은

a) 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 숙주 세포는

(1) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및

iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

(2) iv) 제3 Fc 도메인 단량체,

v) 제4 Fc 도메인 단량체 및

vi) 제3 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

(3) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

(4) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드; 및

(5) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드 또는 제4 폴리펩티드에 연결되는 항원 결합 도메인을 발현하되,

제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하며, 제1 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하고, 제3 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하며, 세포 배양 상청액에 있는 Fc-항원 결합 도메인 작제물의 적어도 50 몰%는 구조적으로 동일한, 단계 및

b) 세포 배양 상청액으로부터 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 정제하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 311

제306항, 제307항, 제308항, 제309항 또는 제310항에 있어서, 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제1 및 제5 Fc 도메인 단량체는 각각 제1 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제3 및 제6 Fc 도메인 단량체는 각각 제3 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 312

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체,

iii) 제3 Fc 도메인 단량체,

iv) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 링커 및

v) 제2 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) vii) 제4 Fc 도메인 단량체,

vii) 제5 Fc 도메인 단량체,

viii) 제6 Fc 도메인 단량체,

ix) 제4 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제3 링커; 및

x) 제5 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제4 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드;

e) 제9 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제5 폴리펩티드;

f) 제10 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제6 폴리펩티드; 및

g) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드, 제4 폴리펩티드, 제5 폴리펩티드 또는 제6 폴리펩티드에 연결되는 항원 결합 도메인을 포함하되,

제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제1 Fc 도메인 단량체와 제7 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제4 Fc 도메인 단량체와 제8 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제3 Fc 도메인 단량체와 제9 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제4 Fc 도메인을 형성하며, 제6 Fc 도메인 단량체와 제10 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제5 Fc 도메인을 형성하고, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 단일 Fc 도메인 및 CCR4 결합 도메인을 갖는 작제물에 비해 항체 의존성 세포독성(ADCC) 검정, 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP) 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC) 검정에서 강화된 효과기 기능을 갖는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 313

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체,

iii) 제3 Fc 도메인 단량체,

iv) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 링커 및

v) 제2 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) vi) 제4 Fc 도메인 단량체,

vii) 제5 Fc 도메인 단량체,

viii) 제6 Fc 도메인 단량체,

ix) 제4 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제3 링커; 및

x) 제5 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제4 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드;

e) 제9 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제5 폴리펩티드;

f) 제10 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제6 폴리펩티드; 및

g) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드, 제4 폴리펩티드, 제5 폴리펩티드 또는 제6 폴리펩티드에 연결되는 항원 결합 도메인을 포함하되,

제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제1 Fc 도메인 단량체와 제7 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제4 Fc 도메인 단량체와 제8 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제3 Fc 도메인 단량체와 제9 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제4 Fc 도메인을 형성하며, 제6 Fc 도메인 단량체와 제10 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제5 Fc 도메인을 형성하고, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 단일 Fc 도메인 및 CCR4 결합 도메인을 갖는 작제물에 의해 나타나지 않는 생물학적 활성을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 314

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체,

iii) 제3 Fc 도메인 단량체,

iv) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 스페이서; 및

v) 제2 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 스페이서를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) vi) 제4 Fc 도메인 단량체,

vii) 제5 Fc 도메인 단량체,

viii) 제6 Fc 도메인 단량체,

ix) 제4 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제3 스페이서; 및

x) 제5 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제4 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드;

e) 제9 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제5 폴리펩티드;

f) 제10 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제6 폴리펩티드; 및

g) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드, 제4 폴리펩티드, 제5 폴리펩티드 또는 제6 폴리펩티드에 연결되는 항원 결합 도메인을 포함하되,

제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제1 Fc 도메인 단량체와 제7 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제4 Fc 도메인 단량체와 제8 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제3 Fc 도메인 단량체와 제9 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제4 Fc 도메인을 형성하며, 제6 Fc 도메인 단량체와 제10 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제5 Fc 도메인을 형성하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 315

Fc-항원 결합 도메인 작제물의 집단을 포함하는 세포 배양 배지로서, Fc-항원 결합 도메인 작제물의 적어도 50 몰%는

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체,

iii) 제3 Fc 도메인 단량체,

iv) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 스페이서; 및

v) 제2 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 스페이서를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) vi) 제4 Fc 도메인 단량체,

vii) 제5 Fc 도메인 단량체,

viii) 제6 Fc 도메인 단량체,

ix) 제4 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제3 스페이서; 및

x) 제5 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제4 스페이서를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드;

e) 제9 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제5 폴리펩티드;

f) 제10 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제6 폴리펩티드; 및

g) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드, 제4 폴리펩티드, 제5 폴리펩티드 또는 제6 폴리펩티드에 연결되는 항원 결합 도메인을 포함하되,

제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제1 Fc 도메인 단량체와 제7 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제4 Fc 도메인 단량체와 제8 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제3 Fc 도메인 단량체와 제9 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제4 Fc 도메인을 형성하며, 제6 Fc 도메인 단량체와 제10 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제5 Fc 도메인을 형성하는, 세포 배양 배지.

청구항 316

Fc-항원 결합 도메인 작제물의 제조 방법으로서, 상기 방법은

a) 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 숙주 세포는

(1) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체,

iii) 제3 Fc 도메인 단량체,

iv) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 스페이서; 및

v) 제2 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 스페이서를 포함하는 제1 폴리펩티드;

(2) vi) 제4 Fc 도메인 단량체,

vii) 제5 Fc 도메인 단량체,

viii) 제6 Fc 도메인 단량체,

ix) 제4 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제3 스페이서; 및

x) 제5 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제4 스페이서를 포함하는 제2 폴리펩티드;

(3) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

(4) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드;

(5) 제9 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제5 폴리펩티드;

(6) 제10 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제6 폴리펩티드; 및

(7) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드, 제4 폴리펩티드, 제5 폴리펩티드 또는 제6 폴리펩티드에 연결되는 항원 결합 도메인을 발현하되,

제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제1 Fc 도메인 단량체와 제7 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제4 Fc 도메인 단량체와 제8 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제3 Fc 도메인 단량체와 제9 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제4 Fc 도메인을 형성하며, 제6 Fc 도메인 단량체와 제10 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제5 Fc 도메인을 형성하고, 세포 배양 상청액에 있는 Fc-항원 결합 도메인 작제물의 적어도 50 몰%는 구조적으로 동일한, 단계 및

b) 세포 배양 상청액으로부터 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 정제하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 317

제312항, 제313항, 제314항, 제315항 또는 제316항에 있어서, 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체는 각각 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제1 및 제7 Fc 도메인 단량체는 각각 제1 Fc 도메인 단량체와 제7 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제4 및 제8 Fc 도메인 단량체는 각각 제4 Fc 도메인 단량체와 제8 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제3 및 제9 Fc 도메인 단량체는 각각 제3 Fc 도메인 단량체와 제9 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제6 및 제10 Fc 도메인 단량체는 각각 제6 Fc 도메인 단량체와 제10 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 318

전술한 청구항 중 어느 한 항의 작제물을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법으로서, 상기 암은 CCR4를 발현하는, 방법.

청구항 319

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체

iii) 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인 및

iv) 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) i) 제3 Fc 도메인 단량체,

ii) 제4 Fc 도메인 단량체,

iii) 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인 및

iv) 제3 및 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩타이드;

e) 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제5 폴리펩티드; 및

f) 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제6 폴리펩티드를 포함하되,

제1 및 제3 Fc 도메인 단량체는 함께 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체는 함께 제2 Fc

도메인을 형성하며, 제4 및 제6 Fc 도메인 단량체는 함께 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인과 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제1 Fab를 형성하며, 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인과 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제2 Fab를 형성하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 320

제319항에 있어서, 제1 및 제2 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 321

제319항에 있어서, 제3 및 제4 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 322

제319항에 있어서, 제5 및 제6 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 323

제319항에 있어서, 제1 및 제2 폴리펩티드는 서열이 동일하고, 제3 및 제4 폴리펩티드는 서열이 동일하며, 제5 및 제6 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 324

제319항 내지 제323항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체 각각의 CH3 도메인은 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 325

제319항 내지 제323항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체 각각의 CH3 도메인은 인간 IgG1의 아미노산 서열과 비교하여, 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 326

제319항 내지 제323항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체는 각각 독립적으로, 최대 10개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 327

제324항 내지 제326항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 아미노산 치환은 CH3 도메인에만 있는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 328

제319항 내지 제323항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제3 Fc 도메인 단량체는 제1 및 제3 Fc 도메인 단량체 사이의 동종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 329

제319항 내지 제323항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체는 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하며, 제4 및 제6 Fc 도메인 단량체는 제4 및 제6 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 330

제328항에 있어서, 동종이량체화를 촉진하는 치환은 표 4A 및 표 4B의 치환으로부터 선택되는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 331

제329항에 있어서, 이종이량체화를 촉진하는 치환은 표 3의 치환으로부터 선택되는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 332

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체

iii) 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인 및

iv) 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) i) 제3 Fc 도메인 단량체,

ii) 제4 Fc 도메인 단량체

iii) 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인 및

iv) 제3 및 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제5 Fc 도메인 단량체와 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제3 폴리펩티드; 및

f) 제6 Fc 도메인 단량체와 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제4 폴리펩티드를 포함하되,

제1 및 제3 Fc 도메인 단량체는 함께 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체는 함께 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제4 및 제6 Fc 도메인 단량체는 함께 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인과 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제1 Fab를 형성하며, 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인과 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제2 Fab를 형성하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 333

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체,

iii) 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인 및

iv) 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) i) 제3 Fc 도메인 단량체,

ii) 제4 Fc 도메인 단량체,

iii) 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인 및

iv) 제3 및 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩타이드;

e) 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제5 폴리펩티드; 및

f) 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제6 폴리펩티드를 포함하되,

제1 및 제5 Fc 도메인 단량체는 함께 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제3 및 제6 Fc 도메인 단량체는 함께 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체는 함께 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인과 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제1 Fab를 형성하며, 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인과 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제2 Fab를 형성하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 334

제333항에 있어서, 제1 및 제2 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 335

제333항에 있어서, 제3 및 제4 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 336

제333항에 있어서, 제5 및 제6 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 337

제333항에 있어서, 제1 및 제2 폴리펩티드는 서열이 동일하고, 제3 및 제4 폴리펩티드는 서열이 동일하며, 제5 및 제6 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 338

제333항 내지 제337항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체 각각의 CH3 도메인은 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 339

제333항 내지 제337항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체 각각의 CH3 도메인은 인간 IgG1의 아미노산 서열과 비교하여, 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 340

제333항 내지 제337항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체는 각각 독립적으로, 최대 10개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 341

제333항 내지 제337항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 아미노산 치환은 CH3 도메인에만 있는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 342

제333항 내지 제337항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체는 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체 사이의 동종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 343

제333항 내지 제337항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제5 Fc 도메인 단량체는 제1 및 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하며, 제3 및 제6 Fc 도메인 단량체는 제4 및 제6 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 344

제342항에 있어서, 동종이량체화를 촉진하는 치환은 표 4A 및 표 4B의 치환으로부터 선택되는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 345

제343항에 있어서, 이종이량체화를 촉진하는 치환은 표 3의 치환으로부터 선택되는, Fc-항원 결합 도메인 작제

물.

청구항 346

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체,

iii) 제3 Fc 도메인 단량체,

iv) 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인,

v) 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커 및

vi) 제2 및 제3 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) i) 제4 Fc 도메인 단량체,

ii) 제5 Fc 도메인 단량체,

iii) 제6 Fc 도메인 단량체,

iv) 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인,

v) 제4 및 제5 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커 및

vi) 제5 및 제6 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드;

e) 제9 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제5 폴리펩티드;

f) 제10 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제6 폴리펩티드;

g) 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제7 폴리펩티드; 및

h) 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제8 폴리펩티드를 포함하되,

제1 및 제7 Fc 도메인 단량체는 함께 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제4 및 제8 Fc 도메인 단량체는 함께 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제2 및 제5 Fc 단량체는 함께 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제3 및 제9 Fc 도메인 단량체는 함께 제4 Fc 도메인을 형성하며, 제6 및 제10 Fc 단량체는 함께 제5 Fc 도메인을 형성하고, 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인 및 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제1 Fab를 형성하며; 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인 및 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제2 Fab를 형성하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 347

제346항에 있어서, 제1 및 제2 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 348

제346항에 있어서, 제3 및 제4 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 349

제346항에 있어서, 제5 및 제6 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 350

제346항에 있어서, 제7 및 제8 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 351

제346항에 있어서, 제1 및 제2 폴리펩티드는 서열이 동일하고, 제3 및 제4 폴리펩티드는 서열이 동일하며, 제5

및 제6 폴리펩티드는 서열이 동일하고, 제7 및 제8 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 352

제346항 내지 제351항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체 각각의 CH3 도메인은 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 353

제346항 내지 제351항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체 각각의 CH3 도메인은 인간 IgG1의 아미노산 서열과 비교하여, 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 354

제346항 내지 제351항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체는 각각 독립적으로, 최대 10개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 355

제346항 내지 제351항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 아미노산 치환은 CH3 도메인에만 있는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 356

제346항 내지 제351항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체는 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 동종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 357

제346항 내지 제351항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제7 Fc 도메인 단량체는 제1 및 제7 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하고, 제4 및 제8 Fc 도메인 단량체는 제4 및 제8 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하며, 제3 및 제9 Fc 도메인 단량체는 제3 및 제9 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하고, 제6 및 제10 Fc 도메인 단량체는 제6 및 제10 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 358

제357항에 있어서, 동종이량체화를 촉진하는 치환은 표 4A 및 표 4B의 치환으로부터 선택되는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 359

제358항에 있어서, 이종이량체화를 촉진하는 치환은 표 3의 치환으로부터 선택되는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 360

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체,

iii) 제3 Fc 도메인 단량체,

iv) 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인,

v) 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커 및

vi) 제2 및 제3 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) i) 제4 Fc 도메인 단량체,

ii) 제5 Fc 도메인 단량체,

iii) 제6 Fc 도메인 단량체,

iv) 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인,

v) 제4 및 제5 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커 및

vi) 제5 및 제6 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드;

e) 제9 Fc 도메인 단량체와 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제5 폴리펩티드; 및

f) 제10 Fc 도메인 단량체 및 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제6 폴리펩티드를 포함하되,

제1 및 제7 Fc 도메인 단량체는 함께 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제4 및 제8 Fc 도메인 단량체는 함께 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제2 및 제5 Fc 단량체는 함께 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제3 및 제9 Fc 도메인 단량체는 함께 제4 Fc 도메인을 형성하며, 제6 및 제10 Fc 단량체는 함께 제5 Fc 도메인을 형성하고, 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인 및 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제1 Fab를 형성하며; 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인 및 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제2 Fab를 형성하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 361

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체,

iii) 제3 Fc 도메인 단량체,

iv) 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인,

v) 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커 및

vi) 제2 및 제3 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) i) 제4 Fc 도메인 단량체,

ii) 제5 Fc 도메인 단량체,

iii) 제6 Fc 도메인 단량체,

iv) 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인,

v) 제4 및 제5 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커 및

vi) 제5 및 제6 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드;

e) 제9 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제5 폴리펩티드;

f) 제10 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제6 폴리펩티드;

g) 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제7 폴리펩티드; 및

h) 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제8 폴리펩티드를 포함하되,

제1 및 제4 Fc 도메인 단량체는 함께 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 및 제7 Fc 도메인 단량체는 함께 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제5 및 제8 Fc 단량체는 함께 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제3 및 제9 Fc 도메인 단량체는 함께 제4 Fc 도메인을 형성하며, 제6 및 제10 Fc 단량체는 함께 제5 Fc 도메인을 형성하고, 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인 및 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제1 Fab를 형성하며; 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인 및 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제2 Fab를 형성하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 362

제361항에 있어서, 제1 및 제2 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 363

제361항에 있어서, 제3 및 제4 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 364

제361항에 있어서, 제5 및 제6 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 365

제361항에 있어서, 제7 및 제8 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 366

제361항에 있어서, 제1 및 제2 폴리펩티드는 서열이 동일하고, 제3 및 제4 폴리펩티드는 서열이 동일하며, 제5 및 제6 폴리펩티드는 서열이 동일하고, 제7 및 제8 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 367

제361항 내지 제366항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체 각각의 CH3 도메인은 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 368

제361항 내지 제366항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체 각각의 CH3 도메인은 인간 IgG1의 아미노산 서열과 비교하여, 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 369

제361항 내지 제366항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체는 각각 독립적으로, 최대 10개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 370

제361항 내지 제366항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 아미노산 치환은 CH3 도메인에만 있는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 371

제361항 내지 제366항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제4 Fc 도메인 단량체는 제1 및 제4 Fc 도메인 단량체 사이의 동종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 372

제361항 내지 제366항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 및 제7 Fc 도메인 단량체는 제2 및 제7 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포

함하고, 제5 및 제8 Fc 도메인 단량체는 제5 및 제8 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하며, 제3 및 제9 Fc 도메인 단량체는 제3 및 제9 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하고, 제6 및 제10 Fc 도메인 단량체는 제6 및 제10 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 373

제371항에 있어서, 동종이량체화를 촉진하는 치환은 표 4A 및 표 4B의 치환으로부터 선택되는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 374

제372항에 있어서, 이종이량체화를 촉진하는 치환은 표 3의 치환으로부터 선택되는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 375

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체,

iii) 제3 Fc 도메인 단량체,

iv) 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인,

v) 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커 및

vi) 제2 및 제3 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) i) 제4 Fc 도메인 단량체,

ii) 제5 Fc 도메인 단량체,

iii) 제6 Fc 도메인 단량체,

iv) 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인,

v) 제4 및 제5 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커 및

vi) 제5 및 제6 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드;

e) 제9 Fc 도메인 단량체와 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제5 폴리펩티드; 및

f) 제10 Fc 도메인 단량체 및 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제6 폴리펩티드를 포함하되,

제1 및 제4 Fc 도메인 단량체는 함께 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 및 제7 Fc 도메인 단량체는 함께 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제5 및 제8 Fc 단량체는 함께 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제3 및 제9 Fc 도메인 단량체는 함께 제4 Fc 도메인을 형성하며, 제6 및 제10 Fc 단량체는 함께 제5 Fc 도메인을 형성하고, 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인 및 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제1 Fab를 형성하며; 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인 및 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제2 Fab를 형성하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 376

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체,

iii) 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b)

i) 제3 Fc 도메인 단량체,

ii) 제4 Fc 도메인 단량체

iv) 제3 및 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제5 Fc 도메인 단량체와 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인을 포함하는 제3 폴리펩티드;

d) 제6 Fc 도메인 단량체와 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인을 포함하는 제4 폴리펩티드;

e) 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제5 폴리펩티드; 및

f) 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제6 폴리펩티드를 포함하되,

제1 및 제5 Fc 도메인 단량체는 함께 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제3 및 제6 Fc 도메인 단량체는 함께 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체는 함께 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인과 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제1 Fab를 형성하며, 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인과 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제2 Fab를 형성하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 377

제202항에 있어서, 제1 및 제2 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 378

제202항에 있어서, 제3 및 제4 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 379

제202항에 있어서, 제5 및 제6 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 380

제202항에 있어서, 제1 및 제2 폴리펩티드는 서열이 동일하고, 제3 및 제4 폴리펩티드는 서열이 동일하며, 제5 및 제6 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 381

제376항 내지 제380항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체 각각의 CH3 도메인은 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 382

제376항 내지 제380항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체 각각의 CH3 도메인은 인간 IgG1의 아미노산 서열과 비교하여, 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 383

제376항 내지 제380항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체는 각각 독립적으로, 최대 10개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 384

제376항 내지 제380항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 아미노산 치환은 CH3 도메인에만 있는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 385

제376항 내지 제380항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체는 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체 사이의 동종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 386

제376항 내지 제380항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제5 Fc 도메인 단량체는 제1 및 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하며, 제3 및 제6 Fc 도메인 단량체는 제3 및 제6 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 387

제385항에 있어서, 동종이량체화를 촉진하는 치환은 표 4A 및 표 4B의 치환으로부터 선택되는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 388

제386항에 있어서, 이종이량체화를 촉진하는 치환은 표 3의 치환으로부터 선택되는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 389

Fc-항원 결합 도메인 작제물로서,

a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

ii) 제2 Fc 도메인 단량체,

iii) 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인 및

iv) 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

b) i) 제3 Fc 도메인 단량체,

ii) 제4 Fc 도메인 단량체,

iii) 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인 및

iv) 제3 및 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

c) 제5 Fc 도메인 단량체와 제3 CCR4 중쇄 결합 도메인을 포함하는 제3 폴리펩티드;

f) 제6 Fc 도메인 단량체와 제4 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제4 폴리펩티드;

e) 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제5 폴리펩티드;

f) 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제6 폴리펩티드;

g) 제3 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제7 폴리펩티드; 및

h) 제4 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제8 폴리펩티드를 포함하되,

제1 및 제5 Fc 도메인 단량체는 함께 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제3 및 제6 Fc 도메인 단량체는 함께 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제2 및 제4 Fc 단량체는 함께 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인 및 제3 CCR4 중쇄 결합 도메인은 함께 제1 Fab를 형성하며, 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인 및 제4 CCR4 중쇄 결합 도메인은 함께 제2 Fab를 형성하고, 제3 CCR4 경쇄 결합 도메인 및 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인은 함께 제3 Fab를 형성하며; 제4 CCR4 경쇄 결합 도메인 및 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인은 함께 제2 Fab를 형성하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 390

제389항에 있어서, 제1 및 제2 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 391

제389항에 있어서, 제3 및 제4 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 392

제389항에 있어서, 제5, 제6, 제7 및 제8 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 393

제389항에 있어서, 제1 및 제2 폴리펩티드는 서열이 동일하고, 제3 및 제4 폴리펩티드는 서열이 동일하며, 제5, 제6, 제7 및 제8 폴리펩티드는 서열이 동일한, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 394

제389항 내지 제393항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체 각각의 CH3 도메인은 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 395

제389항 내지 제393항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체 각각의 CH3 도메인은 인간 IgG1의 아미노산 서열과 비교하여, 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 396

제389항 내지 제393항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체는 각각 독립적으로, 최대 10개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 397

제389항 내지 제393항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 아미노산 치환은 CH3 도메인에만 있는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 398

제389항 내지 제393항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체는 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체 사이의 동종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 399

제389항 내지 제393항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제5 Fc 도메인 단량체는 제1 및 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하며, 제3 및 제6 Fc 도메인 단량체는 제3 및 제6 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하는, Fc 항원 도메인 작제물.

청구항 400

제398항에 있어서, 동종이량체화를 촉진하는 치환은 표 4A 및 표 4B의 치환으로부터 선택되는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 401

제399항에 있어서, 이종이량체화를 촉진하는 치환은 표 3의 치환으로부터 선택되는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 402

제319항 내지 제401항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 링커는 GGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS, GGSGGSGGSGGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS, GGGSGGGSGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG 및 GGGGGGGGGGGGGGGG로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이러한 아미노산 서열로 이루어지는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 403

제319항 내지 제401항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체 중 적어도 하나는 EU 위치 I253에서 치환을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 404

제403항에 있어서, EU 위치 I253에서의 아미노산 치환은 각각 I253A, I253C, I253D, I253E, I253F, I253G, I253H, I253I, I253K, I253L, I253M, I253N, I253P, I253Q, I253R, I253S, I253T, I253V, I253W 및 I253Y로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 405

제319항 내지 제401항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체 중 적어도 하나는 EU 위치 R292에서 치환을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 406

제45항에 있어서, EU 위치 R292에서의 아미노산 치환은 각각 R292D, R292E, R292L, R292P, R292Q, R292R, R292T 및 R292Y로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

[청구항 405]

제319항 내지 제401항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인 단량체 중 적어도 하나는 T366Y, T366W, T394W, T394Y, F405W, F405A, Y407A, S354C, Y349T, T394F, K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R, D356K 및 D356R로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

청구항 407

제319항 내지 제401항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 Fc 도메인 단량체의 힌지는 독립적으로, EPKSCDKTHTCPPCPAPELL 및 DKTHTCPPCPAPELL로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 이러한 아미노산 서열로 이루어지는, Fc-항원 결합 도메인 작제물.

발명의 설명

기 술 분 야

배 경 기 술

[0001] CC 케모카인 수용체 4(CCR4)는 조절 T 세포 및 Th2 세포 상에서 발현되며, 위암, 유방암, 결장암 및 폐암을 포함하는 혈액 악성종양과 고형 종양 모두에서 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 포텔리지오®(모가물리주맙)은 재발성 또는 불응성 성인 T-세포 백혈병/림프종 치료에 사용되는 CCR4를 표적으로 하는 인간화 항체이다.

발명의 내용

[0002] 본 발명은 CCR4 결합 도메인을 적어도 2개의 Fc 도메인과 결합하여 고유의 생물학적 활성을 갖는 새로운 치료제

를 생성하기 위한 조성물 및 방법을 특징으로 한다.

[0003] 일부 경우에, 본 발명은 CCR4 결합 도메인을 적어도 2개의 Fc 도메인과 결합하여 신규 치료제를 생성하는 것을 고려한다. 일부 경우에, 본 발명은 CCR4를 표적으로 하는 단일 Fc-도메인의 CCR4 결합 도메인을 함유하는 치료제, 예를 들어, 공지의 치료제 CCR4 항체를 적어도 2개의 Fc 도메인과 결합하여 단일 Fc-도메인 CCR4 항체보다 큰 생물학적 활성을 갖는 신규 치료제를 생성하는 것을 고려한다. 이러한 작제물 생성하기 위해, 본 발명은 적어도 2개의, 예를 들어, 다중의 Fc 도메인을 갖는 작제물을 조립하기 위한 다양한 방법을 제공하며, 이들의 동종이량체화 및 이종이량체화를 제어하여, 제한된 수의 폴리펩티드로부터 개별 크기의 분자를 조립하기 위한 것이다. 이들 작제물의 특성은 실질적으로 균질한 약학 조성물의 효율적인 생성을 가능하게 한다. 약학 조성물에서의 이러한 균질성은 약학 조성물의 안전성, 효능, 균일성 및 신뢰성을 보장하기 위해 바람직하다.

[0004] 제1 양태에서, 본 발명은 강화된 효과기 기능을 포함하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 특징으로 하며, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 CCR4 결합 도메인, 및 링커에 의해 제2 Fc 도메인에 연결된 제1 Fc 도메인을 포함하고, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 단일 Fc 도메인 및 CCR4 결합 도메인을 갖는 작제물에 비해 항체 의존성 세포독성(ADCC) 분석, 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP) 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC) 분석에서 강화된 효과기 기능을 갖는다.

[0005] 제2 양태에서, 본 발명은 CCR4 결합 도메인, 및 링커에 의해 제2 Fc 도메인에 연결된 제1 Fc 도메인을 포함하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물의 실질적으로 균질한 집단을 포함하는 조성물을 특징으로 한다.

[0006] 제3 양태에서, 본 발명은 CCR4 결합 도메인, 및 링커에 의해 제2 Fc 도메인에 연결된 제1 Fc 도메인을 포함하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 특징으로 하며, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 단일 Fc 도메인 및 CCR4 결합 도메인을 갖는 작제물에 의해 나타나지 않는 생물학적 활성을 포함한다.

[0007] 제4 양태에서, 본 발명은 a) i) 제1 Fc 도메인 단량체, ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및 iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드; b) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드; c) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드; 및 d) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 또는 제3 폴리펩티드에 연결된 CCR4 결합 도메인을 포함하되, 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하며, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물의 실질적으로 균질한 집단을 포함하는 조성물을 특징으로 한다.

[0008] 제4 양태의 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드 또는 제3 폴리펩티드에, 또는 제2 폴리펩티드 및 제3 폴리펩티드에 연결되거나, 또는 CCR4 결합 도메인은 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 및 제3 폴리펩티드에 연결된다.

[0009] 제5 양태에서, 본 발명은 강화된 효과기 기능을 포함하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 특징으로 하며, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 a) i) 제1 Fc 도메인 단량체, ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및 iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드; b) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드; c) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드; 및 d) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 또는 제3 폴리펩티드에 연결된 CCR4 결합 도메인을 포함하고; 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하며, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하고, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 단일 Fc 도메인 및 CCR4 결합 도메인을 갖는 작제물에 비해 항체 의존성 세포독성(ADCC) 분석, 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP) 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC) 분석에서 강화된 효과기 기능을 갖는다.

[0010] 제5 양태의 일부 구현예에서, 단일 Fc 도메인 작제물은 항체이다.

[0011] 제6 양태에서, 본 발명은 a) i) 제1 Fc 도메인 단량체, ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및 iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드; b) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드; c) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드; 및 d) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 또는 제3 폴리펩티드에 연결된 CCR4 결합 도메인을 포함하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 특징으로 하며, 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 단일 Fc 도메인 및 CCR4 결합 도메인을 갖는 작제물에 의해 나타나지 않는 생물학적 활성을 포함한다.

[0012] 제6 양태의 일부 구현예에서, 생물학적 활성은 Fc 수용체 매개 효과기 기능, 예컨대 ADCC, ADCP 및/또는 CDC 활

성(예를 들어, ADCC 및 ADCP 활성, ADCC 및 CDC 활성, ADCP 및 CDC 활성, 또는 ADCC, ADCP 및 CDC 활성)이다.

[0013] 제7 양태에서, 본 발명은 a) i) 제1 Fc 도메인 단량체, ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및 iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 스페이서를 포함하는 제1 폴리펩티드; b) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드; c) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드; 및 d) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 또는 제3 폴리펩티드에 연결된 CCR4 결합 도메인을 포함하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 특징으로 하며; 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성한다.

[0014] 본 발명의 제5, 제6, 및 제7 양태의 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드 또는 제3 폴리펩티드에, 또는 제2 폴리펩티드 및 제3 폴리펩티드에 연결되거나, 또는 CCR4 결합 도메인은 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 및 제3 폴리펩티드에 연결된다.

[0015] 본 발명의 제1, 제2, 제3 및 제4 양태의 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 Fab 또는 Fab의 V_H이다.

[0016] 본 발명의 제4, 제5, 제6 및 제7 양태의 일부 구현예에서, 결합 도메인은 제1, 제2 또는 제3 폴리펩티드의 아미노산 서열의 일부이고, 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 scFv이다.

[0017] 본 발명의 제4, 제5, 제6 및 제7 양태의 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 V_H 도메인 및 C_H1 도메인을 포함하되, V_H 및 C_H1 도메인은 제1, 제2 또는 제3 폴리펩티드의 아미노산 서열의 일부이다. 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 V_L 도메인을 추가로 포함하되, 일부 구현예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 V_L 도메인을 포함하는 제4 폴리펩티드를 포함한다.일부 구현예에서, V_H 도메인은 표 1에 기재된 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열의 세트를 포함하거나, V_H 도메인은 표 2에 기재된 항체의 서열을 포함하는 V_H 도메인의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하거나, VH 도메인은 표 2에 기재된 항체의 V_H 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하되, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열을 제외한 V_H 서열은 표 2에 기재된 항체의 V_H 서열과 적어도 95% 동일하거나, 적어도 97% 동일하거나, 적어도 99% 동일하거나, 적어도 99.5% 동일하거나, 또는 VH 도메인은 표 2에 기재된 항체의 VH 서열을 포함한다.

[0018] 본 발명의 제4, 제5, 제6 및 제7 양태의 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 표 1에 기재된 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열의 세트를 포함하며, CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 V_H 및 V_L 서열의 세트로부터의 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 포함하고, CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 V_H 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 V_H 도메인, 및 표 2에 기재된 항체의 V_L 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 V_L 도메인을 포함하며, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 제외한 V_H 및 V_L 도메인 서열은 표 2에 기재된 항체의 V_H 및 V_L 서열과 적어도 95% 동일하거나, 적어도 97% 동일하거나, 적어도 99% 동일하거나 또는 적어도 99.5% 동일하거나, 또는 CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 V_H 및 V_L 서열의 세트를 포함한다.

[0019] 본 발명의 제4, 제5, 제6 및 제7 양태의 일부 구현예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 IgG C_L 항체 불변 도메인 및 IgG C_H1 항체 불변 도메인을 추가로 포함하되, IgG C_H1 항체 불변 도메인은 링커를 통해 제1 폴리펩티드 또는 제2 폴리펩티드의 N-말단에 부착된다.

[0020] 본 발명의 제4, 제5, 제6 및 제7 양태의 일부 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다.

[0021] 본 발명의 제4, 제5, 제6 및 제7 양태의 일부 구현예에서, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다.

[0022] 본 발명의 제4, 제5, 제6 및 제7 양태의 일부 구현예에서, 이량체화 선택성 모듈은 Fc 도메인 단량체 중 하나의 C_H3 도메인에 유전자 조작 함몰부 및 Fc 도메인 단량체 중 다른 하나의 C_H3 도메인에 유전자 조작 돌출부를 포함하되, 유전자 조작 함몰부 및 유전자 조작 돌출부는 Fc 도메인 단량체의 돌출부-함몰부 쌍을 형성하도록 위치된

다. 일부 구현예에서, 유전자 조작 돌출부는 S354C, T366W, T366Y, T394W, T394F 및 F405W로부터 선택되는 적어도 하나의 변형을 포함하고, 유전자 조작 함몰부는 Y349C, T366S, L368A, Y407V, Y407T, Y407A, F405A 및 T394S로부터 선택되는 적어도 하나의 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체의 하나는 Y407V 및 Y349C를 포함하며, Fc 도메인 단량체의 다른 하나는 T366W 및 S354C를 포함한다.

[0023] 본 발명의 제4, 제5, 제6 및 제7 양태의 일부 구현예에서, 이량체화 선택성 모듈은 도메인 단량체의 하나의 C_H3 도메인에 음전하 아미노산 및 Fc 도메인 단량체의 다른 하나의 C_H3 도메인에 양전하 아미노산을 포함하되, 음전하 아미노산과 양전하 아미노산은 Fc 도메인의 형성을 촉진하도록 위치된다. 일부 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 D399K 및 K409D 또는 K409E를 포함하고, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 K392D 및 D399K를 포함하며, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 E357K 및 K370E를 포함하고, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 D356K 및 K439D를 포함하며, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 K392E 및 D399K를 포함하고, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 E357K 및 K370D를 포함하며, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 D356K 및 K439E를 포함하고, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 S354C 및 T366W를 포함하며, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V를 포함하거나, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 S354C 및 T366W를 포함하며, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V를 포함하거나, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 E357K 또는 E357R을 포함하며, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 K370D 또는 K370E를 포함하거나, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 K370D 또는 K370E를 포함하며, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 E357K 또는 357R을 포함하거나, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 K409D 또는 K409E를 포함하며, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 D399K 또는 D399R을 포함하거나, 또는 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 D399K 또는 D399R을 포함하며, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 K409D 또는 K409E를 포함한다.

[0024] 본 발명의 제4, 제5, 제6 및 제7 양태의 일부 구현예에서, 제2 폴리펩티드 및 제3 폴리펩티드는 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0025] 본 발명의 제4, 제5, 제6 및 제7 양태의 일부 구현예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물 내의 하나 이상의 링커는 결합이다.

[0026] 본 발명의 제4, 제5, 제6 및 제7 양태의 일부 구현예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물 내의 하나 이상의 링커는 스페이서이다. 일부 구현예에서, 스페이서는 다음 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다: GGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS, GGSGGSGGSGGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS, GGGSGGGSGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG 또는 GGGGGGGGGGGGGGGG. 일부 구현예에서, 스페이서는 글리신 스페이서, 예를 들어, 4 내지 30개, 8 내지 30개 또는 12 내지 30개의 글리신 잔기로 이루어진 것, 예컨대 20개의 글리신 잔기로 이루어진 스페이서이다.

[0027] 본 발명의 제4, 제5, 제6 및 제7 양태의 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 링커에 의해 Fc 도메인 단량체에 연결된다. 일부 구현예에서, 링커는 스페이서이다.

[0028] 본 발명의 제4, 제5, 제6 및 제7 양태의 일부 구현예에서, Fc 도메인 중 적어도 하나는 위치 I253에서 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 위치 I253에서의 각각의 아미노산 변형은 I253A, I253C, I253D, I253E, I253F, I253G, I253H, I253I, I253K, I253L, I253M, I253N, I253P, I253Q, I253R, I253S, I253T, I253V, I253W 및 I253Y로부터 독립적으로 선택된다. 일부 구현예에서, 위치 I253에서의 각각의 아미노산 변형은 I253A이다.

[0029] 본 발명의 제4, 제5, 제6 및 제7 양태의 일부 구현예에서, Fc 도메인 중 적어도 하나는 위치 R292에서 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 위치 R292에서의 각각의 아미노산 변형은 R292D, R292E, R292L, R292P, R292Q, R292R, R292T 및 R292Y로부터 독립적으로 선택된다. 일부 구현예에서, 위치 R292에서의 각각의 아미노산 변형은 R292P이다.

[0030] 본 발명의 제4, 제5, 제6 및 제7 양태의 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체 중 하나 이상은 IgG 힌지 도메인, IgG C_H2 항체 불변 도메인 및 IgG C_H3 항체 불변 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체는 각각

IgG 힌지 도메인, IgG C_H2 항체 불변 도메인 및 IgG C_H3 항체 불변 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, IgG는 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된 아형이다.

[0031] 본 발명의 제4, 제5, 제6 및 제7 양태의 일부 구현예에서, 제4, 제5, 제6 및 제7 폴리펩티드 각각에서의 N-말단 Asp는 Gln으로 돌연변이된다.

[0032] 본 발명의 제4, 제5, 제6 및 제7 양태의 일부 구현예에서, 제4, 제5, 제6 및 제7 폴리펩티드 중 하나 이상에는 C-말단 리신이 결여되어 있다. 일부 구현예에서, 제4, 제5, 제6 및 제7 폴리펩티드 각각에는 C-말단 리신이 결여되어 있다.

[0033] 본 발명의 제4, 제5, 제6 및 제7 양태의 일부 구현예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 링커에 의해 하나 이상의 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 연결된 알부민-결합 펩티드를 추가로 포함한다.

[0034] 제8 양태에서, 본 발명은 Fc-항원 결합 도메인 작제물의 집단을 포함하는 세포 배양 배지를 특징으로 하며, Fc-항원 결합 도메인 작제물의 적어도 50 몰%는 구조적으로 동일하며, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 적어도 0.1 mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 75 mg/L 또는 100 mg/L의 농도로 배양 배지에 존재한다.

[0035] 본 발명의 제8 양태의 일부 구현예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물의 적어도 75 몰%, 적어도 85 몰% 또는 적어도 95 몰%는 구조적으로 동일하다.

[0036] 제9 양태에서, 본 발명은 Fc-항원 결합 도메인 작제물의 집단을 포함하는 세포 배양 배지를 특징으로 하며, Fc-항원 결합 도메인 작제물의 적어도 50 몰%는 a) i) 제1 Fc 도메인 단량체, ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및 iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드; b) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드; c) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드; 및 d) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 또는 제3 폴리펩티드에 연결된 CCR4 결합 도메인을 포함하되, 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성한다.

[0037] 본 발명의 제9 양태의 일부 구현예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물의 적어도 75 몰%, 적어도 85 몰% 또는 적어도 95 몰%는 제1 Fc 도메인, 제2 Fc 도메인 및 CCR4 결합 도메인을 포함한다.

[0038] 제10 양태에서, 본 발명은 a) (1) i) 제1 Fc 도메인 단량체, ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및 iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드; (2) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드; (3) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드; 및 (4) CCR4 결합 도메인을 발현하는 숙주 세포를 배양하는 단계(여기서, 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하며, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하고; CCR4 결합 도메인은 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 또는 제3 폴리펩티드에 연결되어, Fc-항원 결합 도메인 작제물을 형성하며; 세포 배양 상청액 중의 Fc-항원 결합 도메인 작제물의 적어도 50 몰%는 구조적으로 동일함), 및 b) 세포 배양 상청액으로부터 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 정제하는 단계를 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물의 제조 방법을 특징으로 한다.

[0039] 본 발명의 제9 및 제10 양태의 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드 또는 제3 폴리펩티드에, 또는 제2 폴리펩티드 및 제3 폴리펩티드에 연결되거나, 또는 CCR4 결합 도메인은 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 및 제3 폴리펩티드에 연결된다.

[0040] 본 발명의 제9 및 제10 양태의 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 Fab 또는 V_H이다.

[0041] 본 발명의 제9 및 제10 양태의 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 제1, 제2 또는 제3 폴리펩티드의 아미노산 서열의 일부이고, 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 scFv이다.

[0042] 본 발명의 제9 및 제10 양태의 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 V_H 도메인 및 C_H1 도메인을 포함하며, V_H 및 C_H1 도메인은 제1, 제2 또는 제3 폴리펩티드의 아미노산 서열의 일부이다. 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 V_L 도메인을 추가로 포함하고, 일부 구현예에서, Fc 항원 결합 도메인 작제물은 V_L 도메인을 포함하는 제4 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, V_H 도메인은 표 1에 기재된 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열의 세트를 포함하거나, V_H 도메인은 표 2에 기재된 항체의 서열을 포함하는 VH 도메인의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하거나, V_H 도메인은 표 2에 기재된 항체의 V_H 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하되, CDR-H1, CDR-H2

및 CDR-H3 서열을 제외한 V_H 서열은 표 2에 기재된 항체의 V_H 서열과 적어도 95% 동일하거나, 적어도 97% 동일하거나, 적어도 99% 동일하거나, 적어도 99.5% 동일하거나, 또는 V_H 도메인은 표 2에 기재된 항체의 V_H 서열을 포함한다.

[0043] 본 발명의 제9 및 제10 양태의 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 표 1에 기재된 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열의 세트를 포함하며, CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 V_H 및 V_L 서열의 세트로부터의 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 포함하고, CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 V_H 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 V_H 도메인, 및 표 2에 기재된 항체의 V_L 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 V_L 도메인을 포함하며, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 제외한 V_H 및 V_L 도메인 서열은 표 2에 기재된 항체의 V_H 및 V_L 서열과 적어도 95% 동일하거나, 적어도 97% 동일하거나, 적어도 99% 동일하거나 또는 적어도 99.5% 동일하거나, 또는 CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 V_H 및 V_L 서열의 세트를 포함한다.

[0044] 본 발명의 제9 및 제10 양태의 일부 구현예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 IgG C_L 항체 불변 도메인 및 IgG C_H1 항체 불변 도메인을 추가로 포함하되, IgG C_H1 항체 불변 도메인은 링커를 통해 제1 폴리펩티드 또는 제2 폴리펩티드의 N-말단에 부착된다.

[0045] 본 발명의 제9 및 제10 양태의 일부 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다.

[0046] 본 발명의 제9 및 제10 양태의 일부 구현예에서, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다.

[0047] 본 발명의 제9 및 제10 양태의 일부 구현예에서, 이량체화 선택성 모듈은 Fc 도메인 단량체 중 하나의 C_H3 도메인에 유전자 조작 함몰부 및 Fc 도메인 단량체 중 다른 하나의 C_H3 도메인에 유전자 조작 돌출부를 포함하되, 유전자 조작 함몰부 및 유전자 조작 돌출부는 Fc 도메인 단량체의 돌출부-함몰부 쌍을 형성하도록 위치된다. 일부 구현예에서, 유전자 조작 돌출부는 S354C, T366W, T366Y, T394W, T394F 및 F405W로부터 선택되는 적어도 하나의 변형을 포함하고, 유전자 조작 함몰부는 Y349C, T366S, L368A, Y407V, Y407T, Y407A, F405A 및 T394S로부터 선택되는 적어도 하나의 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체 중 하나는 Y407V와 Y349C를 포함하고, Fc 도메인 단량체 중 다른 하나는 T366W와 S354C를 포함한다.

[0048] 본 발명의 제9 및 제10 양태의 일부 구현예에서, 이량체화 선택성 모듈은 도메인 단량체의 하나의 C_H3 도메인에 음전하 아미노산 및 Fc 도메인 단량체의 다른 하나의 C_H3 도메인에 양전하 아미노산을 포함하되, 음전하 아미노산과 양전하 아미노산은 Fc 도메인의 형성을 촉진하도록 위치된다. 일부 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 D399K 및 K409D 또는 K409E를 포함하고, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 K392D 및 D399K를 포함하며, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 E357K 및 K370E를 포함하고, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 D356K 및 K439D를 포함하며, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 K392E 및 D399K를 포함하고, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 E357K 및 K370D를 포함하며, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 D356K 및 K439E를 포함하고, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 S354C 및 T366W를 포함하며, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V를 포함하거나, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 S354C 및 T366W를 포함하고, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V를 포함하거나, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 E357K 또는 E357R를 포함하고, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 K370D 또는 K370E를 포함하거나, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 K370D 또는 K370E를 포함하고, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 E357K 또는 357R을 포함하거나, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 K409D 또는 K409E를 포함하고, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 D399K 또는 D399R을 포함하거나, 또는 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 D399K 또는 D399R을 포함하고, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 K409D 또는 K409E를 포함한다.

[0049] 본 발명의 제9 및 제10 양태의 일부 구현예에서, 제2 폴리펩티드 및 제3 폴리펩티드는 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0050] 본 발명의 제9 및 제10 양태의 일부 구현예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물 내의 하나 이상의 링커는 결합이다.

[0051] 본 발명의 제9 및 제10 양태의 일부 구현예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물 내의 하나 이상의 링커는 스페이서이다. 일부 구현예에서, 스페이서는 서열 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS, GGSGGSGGSGGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS, GGGSGGGSGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG, 또는 GGGGGGGGGGGGGGGG를 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 스페이서는 글리신 스페이서, 예를 들어, 4 내지 30, 8 내지 30 또는 12 내지 30개의 글리신 잔기로 이루어진 것, 예컨대 20개의 글리신 잔기로 이루어진 스페이서이다.

[0052] 본 발명의 제9 및 제10 양태의 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 링커에 의해 Fc 도메인 단량체에 연결된다. 일부 구현예에서, 링커는 스페이서이다.

[0053] 본 발명의 제9 및 제10 양태의 일부 구현예에서, 적어도 하나의 Fc 도메인은 위치 I253에서 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 위치 I253에서의 각각의 아미노산 변형은 독립적으로 I253A, I253C, I253D, I253E, I253F, I253G, I253H, I253I, I253K, I253L, I253M, I253N, I253P, I253Q, I253R, I253S, I253T, I253V, I253W 및 I253Y로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 위치 I253에서의 각각의 아미노산 변형은 I253A이다.

[0054] 본 발명의 제9 및 제10 양태의 일부 구현예에서, 적어도 하나의 Fc 도메인은 위치 R292에서 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 위치 R292에서의 각각의 아미노산 변형은 독립적으로 R292D, R292E, R292L, R292P, R292Q, R292R, R292T 및 R292Y로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 위치 R292에서의 각각의 아미노산 변형은 R292P이다.

[0055] 본 발명의 제9 및 제10 양태의 일부 구현예에서, 하나 이상의 Fc 도메인 단량체는 IgG 힌지 도메인, IgG C_H2 항체 불변 도메인 및 IgG C_H3 항체 불변 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 각각의 Fc 도메인 단량체는 IgG 힌지 도메인, IgG C_H2 항체 불변 도메인 및 IgG C_H3 항체 불변 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, IgG는 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군으로부터 선택되는 아형을 갖는다.

[0056] 본 발명의 제9 및 제10 양태의 일부 구현예에서, 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리펩티드 각각의 N-말단 Asp는 Gln으로 돌연변이된다.

[0057] 본 발명의 제9 및 제10 양태의 일부 구현예에서, 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리펩티드 중 하나 이상에는 C-말단 라이신이 결여되어 있다. 일부 구현예에서, 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리펩티드 각각에는 C-말단 라이신이 결여되어 있다.

[0058] 본 발명의 제9 및 제10 양태의 일부 구현예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 링커에 의해 하나 이상의 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 연결된 알부민-결합 펩티드를 추가로 포함한다.

[0059] 본 발명의 제11 양태의 일부 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제2 폴리펩티드와 제3 폴리펩티드는 상이한 아미노산 서열을 갖는다.

[0060] 본 발명의 제11 양태의 일부 구현예에서, 제1 CCR4 결합 도메인은 제1 폴리펩티드에 연결되고, 제2 CCR4 결합 도메인은 제2 폴리펩티드 및 제3 폴리펩티드에 연결된다.

[0061] 본 발명의 제11 양태의 일부 구현예에서 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 E357K 및 K370D를 포함하며, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 K370D 및 E357K를 포함한다.

[0062] 본 발명의 제12 양태의 일부 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하

는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제2 폴리펩티드와 제3 폴리펩티드는 상이한 아미노산 서열을 갖는다.

[0063] 본 발명의 제12 양태의 일부 구현예에서, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 D399K 및 K409D를 포함하며, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 E357K 및 K370D를 포함한다.

[0064] 본 발명의 제11 및 제12 양태의 일부 구현예에서, 제1 또는 CCR4 결합 도메인은 Fab 또는 V_H 도메인이다. 본 발명의 제11 및 제12 양태의 일부 구현예에서, 제1 및 제2 CCR4 결합 도메인은 Fab이다. 본 발명의 제9 양태의 일부 구현예에서, 제1, 제2 및 제3 CCR4 결합 도메인은 Fab 또는 V_H 도메인이다.

[0065] 본 발명의 제11 및 제12 양태의 일부 구현예에서, 제1 또는 제2 CCR4 결합 도메인은 scFv이다. 본 발명의 제11 및 제12 양태의 일부 구현예에서, 제1 및 제2 CCR4 결합 도메인은 scFv이다. 본 발명의 제9 양태의 일부 구현예에서, 제1, 제2 및 제3 CCR4 결합 도메인은 scFv이다.

[0066] 본 발명의 제11 양태의 일부 구현예에서, 제1 또는 제2 CCR4 도메인은 V_H 도메인 및 C_H1 도메인을 포함하며, V_H 및 C_H1 도메인은 제1, 제2 또는 제3 폴리펩티드의 아미노산 서열의 일부이다. 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 V_L 도메인을 추가로 포함하고, 일부 구현예에서, Fc 항원 결합 도메인 작제물은 V_L 도메인을 포함하는 제4 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, V_H 도메인은 표 1에 기재된 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열의 세트를 포함하거나, V_H 도메인은 표 2에 기재된 항체의 서열을 포함하는 VH 도메인의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하거나, V_H 도메인은 표 2에 기재된 항체의 V_H 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하되, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열을 제외한 V_H 서열은 표 2에 기재된 항체의 V_H 서열과 적어도 95% 동일하거나, 적어도 97% 동일하거나, 적어도 99% 동일하거나, 적어도 99.5% 동일하거나, 또는 V_H 도메인은 표 2에 기재된 항체의 V_H 서열을 포함한다.

[0067] 본 발명의 제12 양태의 일부 구현예에서, 제1, 제2 또는 제3 CCR4 결합 도메인은 V_H 도메인 및 C_H1 도메인을 포함하며, V_H 및 C_H1 도메인은 제1, 제2 또는 제3 폴리펩티드의 아미노산 서열의 일부이다. 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 V_L 도메인을 추가로 포함하고, 일부 구현예에서, Fc 항원 결합 도메인 작제물은 V_L 도메인을 포함하는 제4 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, V_H 도메인은 표 1에 기재된 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열의 세트를 포함하거나, V_H 도메인은 표 2에 기재된 항체의 서열을 포함하는 VH 도메인의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하거나, V_H 도메인은 표 2에 기재된 항체의 V_H 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하되, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열을 제외한 V_H 서열은 표 2에 기재된 항체의 V_H 서열과 적어도 95% 동일하거나, 적어도 97% 동일하거나, 적어도 99% 동일하거나, 적어도 99.5% 동일하거나, 또는 V_H 도메인은 표 2에 기재된 항체의 V_H 서열을 포함한다.

[0068] 본 발명의 제11 양태의 일부 구현예에서, 제1 또는 제2 CCR4 결합 도메인은 표 1에 기재된 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열의 세트를 포함하며, CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 V_H 및 V_L 서열의 세트로부터의 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 포함하고, CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 V_H 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 V_H 도메인, 및 표 2에 기재된 항체의 V_L 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 V_L 도메인을 포함하며, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 제외한 V_H 및 V_L 도메인 서열은 표 2에 기재된 항체의 V_H 및 V_L 서열과 적어도 95% 동일하거나, 적어도 97% 동일하거나, 적어도 99% 동일하거나 또는 적어도 99.5% 동일하거나, 또는 CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 V_H 및 V_L 서열의 세트를 포함한다.

[0069] 본 발명의 제12 양태의 일부 구현예에서, 제1, 제2 또는 제3 CCR4 결합 도메인은 표 1에 기재된 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열의 세트를 포함하며, CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 V_H 및 V_L 서열의 세트로부터의 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 포함하고, CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 V_H 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 V_H 도메인, 및 표 2에 기재된

항체의 V_L 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 V_L 도메인을 포함하며, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 제외한 V_H 및 V_L 도메인 서열은 표 2에 기재된 항체의 V_H 및 V_L 서열과 적어도 95% 동일하거나, 적어도 97% 동일하거나, 적어도 99% 동일하거나 또는 적어도 99.5% 동일하거나, 또는 CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 V_H 및 V_L 서열의 세트를 포함한다.

[0070] 본 발명의 제11 및 제12 양태의 일부 구현예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 IgG C_L 항체 불변 도메인 및 IgG C_H1 항체 불변 도메인을 추가로 포함하되, IgG C_H1 항체 불변 도메인은 링커를 통해 제1 폴리펩티드 또는 제2 폴리펩티드의 N-말단에 부착된다.

[0071] 본 발명의 제11 및 제12 양태의 일부 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다.

[0072] 본 발명의 제11 및 제12 양태의 일부 구현예에서, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다.

[0073] 본 발명의 제11 및 제12 양태의 일부 구현예에서, 이량체화 선택성 모듈은 Fc 도메인 단량체 중 하나의 C_H3 도메인에 유전자 조작 함몰부 및 Fc 도메인 단량체 중 다른 하나의 C_H3 도메인에 유전자 조작 돌출부를 포함하되, 유전자 조작 함몰부 및 유전자 조작 돌출부는 Fc 도메인 단량체의 돌출부-함몰부 쌍을 형성하도록 위치된다. 일부 구현예에서, 유전자 조작된 돌출부는 S354C, T366W, T366Y, T394W, T394F 및 F405W로부터 선택된 적어도 하나의 변형을 포함하고, 유전자 조작된 함몰부는 Y349C, T366S, L368A, Y407V, Y407T, Y407A, F405A 및 T394S로부터 선택된 적어도 하나의 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체 중 하나는 Y407V와 Y349C를 포함하고, Fc 도메인 단량체 중 다른 하나는 T366W와 S354C를 포함한다.

[0074] 본 발명의 제11 및 제12 양태의 일부 구현예에서, 이량체화 선택성 모듈은 도메인 단량체의 하나의 C_H3 도메인에 음전하 아미노산 및 Fc 도메인 단량체의 다른 하나의 C_H3 도메인에 양전하 아미노산을 포함하되, 음전하 아미노산과 양전하 아미노산은 Fc 도메인의 형성을 촉진하도록 위치된다. 일부 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 D399K 및 K409D 또는 K409E를 포함하고, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 K392D 및 D399K를 포함하며, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 E357K 및 K370E를 포함하고, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 D356K 및 K439D를 포함하며, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 K392E 및 D399K를 포함하고, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 E357K 및 K370D를 포함하며, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 D356K 및 K439E를 포함하고, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 S354C 및 T366W를 포함하며, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V를 포함하거나, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 S354C 및 T366W를 포함하며, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V를 포함하거나, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 E357K 또는 E357R을 포함하며, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 K370D 또는 K370E를 포함하거나, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 K370D 또는 K370E를 포함하며, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 E357K 또는 357R을 포함하거나, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 K409D 또는 K409E를 포함하며, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 D399K 또는 D399R을 포함하거나, 또는 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 D399K 또는 D399R을 포함하며, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 K409D 또는 K409E를 포함한다.

[0075] 본 발명의 제11 및 제12 양태의 일부 구현예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물 내의 하나 이상의 링커는 결합이다.

[0076] 본 발명의 제11 및 제12 양태의 일부 구현예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물 내의 하나 이상의 링커는 스페이서이다. 일부 구현예에서, 스페이서는 다음 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다: GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS, GGSGGSGGSGGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS, GGGSGGGSGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG 또는 GGGGGGGGGGGGGGGG. 일부 구현예에서, 스페이서는 글리신 스페이서, 예를 들어, 4 내지 30개, 8 내지 30개 또는 12 내지 30개의 글리신 잔기로 이루어진 것, 예컨대 20개의 글리신 잔기로 이루어진 스페이서이다.

[0077] 본 발명의 제11 및 제12 양태의 일부 구현예에서, 하나 이상의 CCR4 결합 도메인은 링커에 의해 Fc 도메인 단량체에 연결된다. 일부 구현예에서, 링커는 스페이서이다.

[0078] 본 발명의 제11 및 제12 양태의 일부 구현예에서, 적어도 하나의 Fc 도메인은 위치 I253에서 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 위치 I253에서의 각각의 아미노산 변형은 I253A, I253C, I253D, I253E, I253F, I253G, I253H, I253I, I253K, I253L, I253M, I253N, I253P, I253Q, I253R, I253S, I253T, I253V, I253W 및 I253Y로부터 독립적으로 선택된다. 일부 구현예에서, 위치 I253에서의 각각의 아미노산 변형은 I253A이다.

[0079] 본 발명의 제11 및 제12 양태의 일부 구현예에서, 적어도 하나의 Fc 도메인은 위치 R292에서 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 위치 R292에서의 각각의 아미노산 변형은 R292D, R292E, R292L, R292P, R292Q, R292R, R292T 및 R292Y로부터 독립적으로 선택된다. 일부 구현예에서, 위치 R292에서의 각각의 아미노산 변형은 R292P이다.

[0080] 본 발명의 제11 및 제12 양태의 일부 구현예에서, 하나 이상의 Fc 도메인 단량체는 IgG 힌지 도메인, IgG C_H2 항체 불변 도메인 및 IgG C_H3 항체 불변 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 각각의 Fc 도메인 단량체는 IgG 힌지 도메인, IgG CH_2 항체 불변 도메인 및 IgG CH_3 항체 불변 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, IgG는 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된 아형이다.

[0081] 본 발명의 제11 및 제12 양태의 일부 구현예에서, 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리펩티드 각각의 N-말단 Asp는 Gln으로 돌연변이된다.

[0082] 본 발명의 제11 및 제12 양태의 일부 구현예에서, 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리펩티드 중 하나 이상에는 C-말단 라이신이 결여되어 있다. 일부 구현예에서, 제1, 제2, 제3, 및 제4 폴리펩타이드 각각에는 C-말단 라이신이 결여되어 있다.

[0083] 본 발명의 제11 및 제12 양태의 일부 구현예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 링커에 의해 하나 이상의 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 연결된 알부민-결합 펩티드를 추가로 포함한다.

[0084] 제13 양태에서, 본 발명은 a) i) 제1 Fc 도메인 단량체, ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및 iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제3 Fc 도메인 단량체, ii) 제4 Fc 도메인 단량체 및 iv) 제3 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드; 및 c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드; d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드; 및 d) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드 또는 제4 폴리펩티드에 연결된 CCR4 결합 도메인을 포함하되, 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제4 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물의 실질적으로 균질한 집단을 포함하는 조성물을 특징으로 한다.

[0085] 본 발명의 제13 양태의 일부 구현예에서, 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체는 각각 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체는 각각 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제4 및 제6 Fc 도메인 단량체는 각각 제4 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다.

[0086] 제14 양태에서, 본 발명은 a) i) 제1 Fc 도메인 단량체, ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및 iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제3 Fc 도메인 단량체, ii) 제4 Fc 도메인 단량체 및 iv) 제3 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드; 및 c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드; d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드; 및 e) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드 또는 제4 폴리펩티드에 연결된 CCR4 결합 도메인을 포함하되, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제1 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제3 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물의 실질적으로 균질한 집단을 포함하는 조성물을 특징으로 한다.

[0087] 본 발명의 제14 양태의 일부 구현예에서, 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc

도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제1 및 제5 Fc 도메인 단량체는 각각 제1 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제3 및 제6 Fc 도메인 단량체는 각각 제3 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다.

[0088] 제15 양태에서, 본 발명은 a) i) 제1 Fc 도메인 단량체, ii) 제2 Fc 도메인 단량체, iii) 제3 Fc 도메인 단량체, iv) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 링커; 및 v) 제2 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드; b) i) 제4 Fc 도메인 단량체, ii) 제5 Fc 도메인 단량체, iii) 제6 Fc 도메인 단량체, iv) 제4 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제3 링커; 및 v) 제5 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제4 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드; c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드; d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드; e) 제9 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제5 폴리펩티드; f) 제10 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제6 폴리펩티드; 및 g) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드, 제4 폴리펩티드, 제5 폴리펩티드 또는 제6 폴리펩티드에 연결된 CCR4 결합 도메인을 포함하되, 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하며, 제1 Fc 도메인 단량체와 제7 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하고, 제4 Fc 도메인 단량체와 제8 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하며, 제3 Fc 도메인 단량체와 제9 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제4 Fc 도메인을 형성하고, 제6 Fc 도메인 단량체와 제10 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제5 Fc 도메인을 형성하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물의 실질적으로 균질한 집단을 포함하는 조성물을 특징으로 한다.

[0089] 본 개시의 제15 양태의 일부 구현예에서, 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체는 각각 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제1 및 제7 Fc 도메인 단량체는 각각 제1 Fc 도메인 단량체와 제7 Fc 도메인 단량체 사이의 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제4 및 제8 Fc 도메인 단량체는 각각 제4 Fc 도메인 단량체와 제8 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제4 및 제8 Fc 도메인 단량체는 각각 제4 Fc 도메인 단량체와 제8 Fc 도메인 단량체 사이의 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제3 및 제9 Fc 도메인 단량체는 각각 제3 Fc 도메인 단량체와 제9 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제6 및 제10 Fc 도메인 단량체는 각각 제6 Fc 도메인 단량체와 제10 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다.

[0090] 본 발명의 제13, 제14 및 제15 양태의 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 Fab 또는 V_H 도메인이다.

[0091] 본 발명의 제13, 제14 및 제15 양태의 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 하나 이상의 폴리펩티드의 아미노산 서열의 일부이고, 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 scFv이다.

[0092] 본 발명의 제13, 제14 및 제15 양태의 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 V_H 도메인 및 C_H1 도메인을 포함하고, V_H 및 C_H1 도메인은 제1, 제2 또는 제3 폴리펩티드의 아미노산 서열의 일부이다. 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 V_L 도메인을 추가로 포함하고, 일부 구현예에서, Fc 항원 결합 도메인 작제물은 V_L 도메인을 포함하는 제4 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, V_H 도메인은 표 1에 제시된 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열의 세트를 포함하거나, V_H 도메인은 표 2에 제시된 항체의 서열을 포함하는 V_H 도메인의 CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3을 포함하거나, V_H 도메인은 표 2에 제시된 항체의 V_H 서열의 CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3을 포함하거나, CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3 서열을 제외한 V_H 서열은 표 2에 제시된 항체의 V_H 서열과 적어도 95% 동일하거나, 적어도 97% 동일하거나, 적어도 99% 동일하거나, 적어도 99.5% 동일하거나, V_H 도메인은 표 2에 제시된 항체의 V_H 서열을 포함한다.

[0093] 본 발명의 제13, 제14 및 제15 양태의 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 표 1에 제시된 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열의 세트를 포함하거나, CCR4 결합 도메인은 표 2에 제시된 항체의 V_H 및 V_L 서열의 세트로부터의 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 포함하거나, CCR4 결합 도메인은 표 2에 제시된 항체의 V_H 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 V_H 도메인 및 표 2에 제시된 항체의 V_L 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 V_L 도메인을 포함하되, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1,

CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 제외한 V_H 및 V_L 도메인 서열은 표 2에 제시된 항체의 V_H 및 V_L 서열과 적어도 95% 동일하거나, 적어도 97% 동일하거나, 적어도 99% 동일하거나, 적어도 99.5% 동일하거나, CCR4 결합 도메인은 표 2에 제시된 항체의 V_H 및 V_L 서열의 세트를 포함한다.

[0094] 본 발명의 제13, 제14 및 제15 양태의 일부 구현예에서, Fc 항원 결합 도메인 작제물은 IgG C_L 항체 불변 도메인 및 IgG C_H1 항체 불변 도메인을 추가로 포함하고, IgG C_H1 항체 불변 도메인은 링커에 의해 제1 폴리펩티드 또는 제2 폴리펩티드의 N-말단에 부착된다.

[0095] 본 발명의 제13, 제14 및 제15 양태의 일부 구현예에서, 이량체화 선택도 모듈은 Fc 도메인 단량체 중 하나의 C_H3 도메인에 유전자 조작된 함몰부 및 Fc 도메인 단량체 중 다른 하나의 C_H3 도메인에 유전자 조작된 돌출부를 포함하되, 유전자 조작 함몰부와 유전자 조작 돌출부는 Fc 도메인 단량체의 돌출부-함몰부 쌍을 형성하도록 위치된다. 일부 구현예에서, 유전자 조작된 돌출부는 S354C, T366W, T366Y, T394W, T394F 및 F405W로부터 선택된 적어도 하나의 변형을 포함하고, 유전자 조작된 함몰부는 Y349C, T366S, L368A, Y407V, Y407T, Y407A, F405A 및 T394S로부터 선택된 적어도 하나의 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체 중 하나는 Y407V와 Y349C를 포함하고, Fc 도메인 단량체 중 다른 하나는 T366W와 S354C를 포함한다.

[0096] 본 발명의 제13, 제14 및 제15 양태의 일부 구현예에서, 이량체화 선택도 모듈은 도메인 단량체 중 하나의 C_H3 도메인 내로 음-하전된 아미노산 및 Fc 도메인 단량체 중 다른 하나의 C_H3 도메인 내로 양-하전된 아미노산을 포함하고, 음-하전된 아미노산 및 양-하전된 아미노산은 Fc 도메인의 형성을 촉진하도록 위치된다. 일부 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 D399K 및 K409D 또는 K409E를 포함하고, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 K392D 및 D399K를 포함하며, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 E357K 및 K370E를 포함하고, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 D356K 및 K439D를 포함하며, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 K392E 및 D399K를 포함하고, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 E357K 및 K370D를 포함하며, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 D356K 및 K439E를 포함하고, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 S354C 및 T366W를 포함하며, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V를 포함하거나, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 S354C 및 T366W를 포함하며, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V를 포함하거나, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 E357K 또는 E357R을 포함하며, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 K370D 또는 K370E를 포함하거나, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 K370D 또는 K370E를 포함하며, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 E357K 또는 357R을 포함하거나, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 K409D 또는 K409E를 포함하며, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 D399K 또는 D399R을 포함하거나, 또는 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 각각 D399K 또는 D399R을 포함하며, 제3 및 제4 폴리펩티드는 각각 K409D 또는 K409E를 포함한다.

[0097] 본 발명의 제13, 제14 및 제15 양태의 일부 구현예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물 내의 하나 이상의 링커는 결합이다.

[0098] 본 발명의 제13, 제14 및 제15 양태의 일부 구현예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물 내의 하나 이상의 링커는 스페이서이다. 일부 구현예에서, 스페이서는 다음 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다: GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS, GGSGGSGGSGGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS, GGGSGGGSGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG 또는 GGGGGGGGGGGGGGGG. 일부 구현예에서, 스페이서는 글리신 스페이서, 예를 들어, 4 내지 30개, 8 내지 30개 또는 12 내지 30개의 글리신 잔기로 이루어진 것, 예컨대 20개의 글리신 잔기로 이루어진 스페이서이다.

[0099] 본 발명의 제13, 제14 및 제15 양태의 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 링커에 의해 Fc 도메인 단량체에 연결된다. 일부 구현예에서, 링커는 스페이서이다.

[0100] 본 발명의 제13, 제14 및 제15 양태의 일부 구현예에서, Fc 도메인 중 적어도 하나는 위치 I253에서 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 위치 I253에서의 각각의 아미노산 변형은 I253A, I253C,

I253D, I253E, I253F, I253G, I253H, I253I, I253K, I253L, I253M, I253N, I253P, I253Q, I253R, I253S, I253T, I253V, I253W 및 I253Y로부터 독립적으로 선택된다. 일부 구현예에서, 위치 I253에서의 각각의 아미노산 변형은 I253A이다.

[0101] 본 발명의 제13, 제14 및 제15 양태의 일부 구현예에서, Fc 도메인 중 적어도 하나는 위치 R292에서 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 위치 R292에서의 각각의 아미노산 변형은 R292D, R292E, R292L, R292P, R292Q, R292R, R292T 및 R292Y로부터 독립적으로 선택된다. 일부 구현예에서, 위치 R292에서의 각각의 아미노산 변형은 R292P이다.

[0102] 본 발명의 제13, 제14 및 제15 양태의 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체 중 하나 이상은 IgG 힌지 도메인, IgG C_H2 항체 불변 도메인 및 IgG C_H3 항체 불변 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체는 각각 IgG 힌지 도메인, IgG C_H2 항체 불변 도메인 및 IgG C_H3 항체 불변 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, IgG는 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된 아형이다.

[0103] 본 발명의 제13, 제14 및 제15 양태의 일부 구현예에서, 각각의 폴리펩타이드에서 N-말단 Asp는 Gln으로 돌연변이된다.

[0104] 본 발명의 제13, 제14 및 제15 양태의 일부 구현예에서, 하나 이상의 폴리펩티드에는 C-말단 라이신이 결여되어 있다. 일부 구현예에서, 각각의 폴리펩타이드에는 C-말단 라이신이 결여되어 있다.

[0105] 본 발명의 제13, 제14 및 제15 양태의 일부 구현예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 링커에 의해 하나 이상의 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 연결된 알부민-결합 펩티드를 추가로 포함한다.

[0106] 제16 양태에서, 본 발명은 a) i) 제1 Fc 도메인 단량체, ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및 iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드; b) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드; c) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드; 및 d) 제1 폴리펩티드에 연결된 제1 CCR4 결합 도메인; 및 e) 제2 폴리펩티드 및/또는 제3 폴리펩티드에 연결된 제2 CCR4 결합 도메인을 포함하되, 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제1 및 제2 CCR4 결합 도메인은 상이한 항원을 결합하고, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 단일 Fc 도메인 및 CCR4 결합 도메인을 갖는 작제물에 비해 항체 의존성 세포독성(ADCC) 분석, 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP) 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC) 분석에서 강화된 효과기 기능을 갖는, Fc-항원 결합 도메인 작제물을 특징으로 한다.

[0107] 제26 양태에서, 본 발명은 a) i) 제1 Fc 도메인 단량체, ii) 제2 Fc 도메인 단량체, 및 iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 b) iv) 제3 Fc 도메인 단량체, v) 제4 Fc 도메인 단량체, 및 vi) 제3 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드; 및 c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드; d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드; 및 d) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드 또는 제4 폴리펩티드에 연결된 CCR4 결합 도메인을 포함하되, 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제4 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 단일 Fc 도메인 및 CCR4 결합 도메인을 갖는 작제물에 비해 항체 의존성 세포독성(ADCC) 분석, 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP) 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC) 분석에서 강화된 효과기 기능을 갖는, Fc-항원 결합 도메인 작제물을 특징으로 한다.

[0108] 제27 양태에서, 본 발명은 a) i) 제1 Fc 도메인 단량체, ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및 iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 b) iv) 제3 Fc 도메인 단량체, v) 제4 Fc 도메인 단량체 및 vi) 제3 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드; 및 c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드; d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드; 및 e) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드 또는 제4 폴리펩티드에 연결된 CCR4 결합 도메인을 포함하되, 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제4 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 단일 Fc 도메인과 CCR4 결합 도메인을 갖는 작제물에 의해 나타나지 않는 생물학적 활성을 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물을 특징으로 한다.

[0109] 제28 양태에서, 본 발명은 a) i) 제1 Fc 도메인 단량체, ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및 iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 b) iv) 제3 Fc 도메인 단량체, v) 제4 Fc 도메인 단량체 및 vi) 제3 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드; 및 c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드; d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드; 및 e) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드 또는 제4 폴리펩티드에 연결된 CCR4 결합 도메인을 포함하되, 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제4 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물을 특징으로 한다.

[0110] 제29 양태에서, 본 발명은 Fc-항원 결합 도메인 작제물의 집단을 포함하는 세포 배양 배지를 특징으로 하며, Fc-항원 결합 도메인 작제물의 적어도 50 몰%는 a) i) 제1 Fc 도메인 단량체, ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및 iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제1 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 b) iv) 제3 Fc 도메인 단량체, v) 제4 Fc 도메인 단량체 및 vi) 제3 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드; 및 c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드; d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드; 및 e) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드 또는 제4 폴리펩티드를 연결하는 CCR4 결합 도메인을 포함하되, 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제4 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성한다.

[0111] 제30 양태에서, 본 발명은 a) (1) i) 제1 Fc 도메인 단량체, ii) 제2 Fc 도메인 단량체 및 iii) 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드; (2) iv) 제3 Fc 도메인 단량체, v) 제4 Fc 도메인 단량체 및 vi) 제3 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 제2 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드; 및 (3) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드; (4) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드; 및 (5) 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 제3 폴리펩티드 또는 제4 폴리펩티드를 연결하는 CCR4 결합 도메인을 발현하는 숙주 세포를 배양하는 단계(여기서, 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하며, 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하고, 제4 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하며, 세포 배양 상청액 중의 Fc-항원 결합 도메인 작제물의 적어도 50 몰%는 구조적으로 동일함), 및 b) 세포 배양 상청액으로부터 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 정제하는 단계를 포함하는, Fc-항원 결합 도메인 작제물의 제조 방법을 특징으로 한다.

[0112] 본 발명의 제26, 제27, 제28, 제29 및 제30 양태의 일부 구현예에서, 제1 및 제3 Fc 도메인 단량체는 각각 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체는 각각 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제4 및 제6 Fc 도메인 단량체는 각각 제4 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다.

[0113] 본 발명의 모든 양태의 일부 구현예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 감소된 푸코실화를 갖는다. 따라서, 일부 구현예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물을 포함하는 조성물 중 Fc-도메인 단량체의 40%, 30%, 20%, 15%, 10% 또는 5% 미만은 푸코실화된다.

[0114] 본 발명의 모든 양태의 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체는 CH3 도메인에 최대 10개(9개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개)의 단일 아미노산 변화를 갖는 도 53a(서열 번호 43)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0115] 본 발명의 모든 양태의 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체는 CH3 도메인에 최대 10개(9개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개)의 단일 아미노산 변화를 갖는 도 53b(서열 번호 45)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0116] 본 발명의 모든 양태의 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체는 CH3 도메인에 최대 10개(9개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개)의 단일 아미노산 변화를 갖는 도 53c(서열 번호 47)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0117] 본 발명의 모든 양태의 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체는 CH3 도메인에 최대 10개(9개, 8개, 7개, 6개,

5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개)의 단일 아미노산 변화를 갖는 도 53d(서열 번호 42)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0118] 본 발명의 모든 양태의 일부 구현예에서, 예를 들어, Fc 도메인 단량체가 폴리펩티드의 카복시-말단에 있을 경우, Fc 도메인 단량체는 K447을 포함하지 않는다. 다른 구현예에서, 예를 들어, Fc 도메인 단량체가 폴리펩티드의 카복시-말단에 있지 않을 경우, Fc 도메인 단량체는 K447을 포함한다.

[0119] 본 발명의 모든 양태의 일부 구현예에서, 예를 들어, Fc 도메인 단량체가 링커에 대해 아미노 말단인 경우, Fc 도메인 단량체는 E216에서 C220까지의 힌지 부분을 포함하지 않지만, D221에서 L235까지의 힌지 부분을 포함한다. 다른 구현예에서, 예를 들어, Fc 도메인 단량체가 CH1 도메인에 대해 카복시-말단인 경우, Fc 도메인 단량체는 E216에서 L235까지의 힌지 부분을 포함한다. 본 발명의 모든 양태의 일부 구현예에서, 힌지 도메인, 예를 들어 폴리펩티드의 아미노 말단에 있는 힌지 도메인은 EU 위치 221에서 Asp에서 Gln으로의 돌연변이를 갖는다.

[0120] 전술한 바와 같이, 본 발명의 Fc-항원 결합 도메인 작제물은 2개 이상의 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하는 폴리펩티드로부터 조립되며, 이러한 폴리펩티드는 본 발명의 양태이다.

[0121] 제41 양태에서, 본 발명은 CCR4 결합 도메인; 링커; 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체; 제2 링커; 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체; 임의의 제3 링커; 및 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 임의의 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 적어도 하나의 Fc 도메인 단량체는 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드를 특징으로 한다.

[0122] 제41 양태의 다양한 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 항체 중쇄 가변 도메인을 포함하고; CCR4 결합 도메인은 항체 경쇄 가변 도메인을 포함하며; 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체는 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이를 포함하고, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체는 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하며, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체는 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하고, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체는 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이를 포함하며; 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체와 제2 IgG 불변 도메인 단량체 둘 모두는 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하고; 폴리펩티드는 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체는 각각 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하며; 폴리펩티드는 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체와 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체 두 둘 모두는 각각 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하며, 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체는 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이를 포함하고; 폴리펩티드는 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체와 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체 둘 모두는 각각 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하며, 제2 IgG1 도메인 단량체는 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이를 포함하며; 폴리펩티드는 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체와 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체 둘 모두는 각각 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하고, 제1 IgG1 도메인 단량체는 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이를 포함한다.

[0123] 제41 양태의 다양한 구현예에서: 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하는 IgG1 Fc 도메인 단량체는 1개, 2개 또는 3개의 역전하 돌연변이를 추가로 포함하고; 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이 및 역전하 돌연변이는 CH3 도메인에 있으며; 돌연변이는 EU 위치 G341에서 EU 위치 K447까지의 서열 내에 있고; 돌연변이는 단일 아미노산 변화이며; 제2 링커 및 임의의 제3 링커는: GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS, GGSGGSGGSGGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS, GGGSGGGSGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG 및 GGGGGGGGGGGGGGGG로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이러한 아미노산 서열로 이루어지고; 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 글리신 스페이서이며; 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 독립적으로 4 내지 30, 4 내지 20, 8 내지 30, 8 내지 20, 12 내지 20 또는 12 내지 30개의 글리신 잔기로 이루어지고; 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 20개의 글리신 잔기로 이루어지며; Fc 도메인 단량체 중 적어도 하나는 EU 위치 I253에서 단일 아미노산 돌연변이를 포함하고, EU 위치 I253에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 독립적으로, I253A, I253C, I253D, I253E, I253F, I253G, I253H, I253I, I253K, I253L, I253M, I253N, I253P, I253Q, I253R, I253S, I253T, I253V, I253W 및 I253Y로 이루어진 군으로부터 선택되며; 위치 I253에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 I253A이고; Fc 도메인 단량체 중 적어도 하나는 EU 위치 R292에서 단일 아미노산 돌연변이를

포함하며; EU 위치 R292에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 독립적으로, R292D, R292E, R292L, R292P, R292Q, R292R, R292T 및 R292Y로 이루어진 군으로부터 선택되고; 위치 R292에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 R292P이며; 각각의 Fc 도메인 단량체는 독립적으로, EPKSCDKTHTCPPCPAPELL 및 DKTHTCPPCPAPELL로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이러한 아미노산 서열로 이루어지고; 제2 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체의 힌지 부분은 아미노산 서열 DKTHTCPPCPAPELL을 가지며; 제1 Fc 도메인 단량체의 힌지 부분은 아미노산 서열 EPKSCDKTHTCPPCPAPEL을 가지고; 제1 Fc 도메인 단량체의 힌지 부분은 아미노산 서열 EPKSCDKTHTCPPCPAPEL을 가지며, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체의 힌지 부분은 아미노산 서열 DKTHTCPPCPAPELL을 가지며; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH2 도메인은 독립적으로, 2개 이하의 단일 아미노산 결실 또는 치환을 갖는 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하고; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH2 도메인은 동일하며, 2개 이하의 단일 아미노산 결실 또는 치환을 갖는 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하고; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH2 도메인은 동일하며, 2개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하고; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH2 도메인은 동일하며, 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하고; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 10개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG를 포함하고; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 8개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG를 포함하고; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 6개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG를 포함하며; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 5개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG를 포함하고; 단일 아미노산 치환은 T366Y, T366W, T394W, T394Y, F405W, F405A, Y407A, S354C, Y349T, T394F, K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R, D356K 및 D356R로 이루어진 군에서 선택되며; 각각의 Fc 도메인 단량체는 독립적으로, 최대 10개의 단일 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하고; 단일 아미노산 치환 중 최대 6개는 CH3 도메인 내의 역전하 돌연변이이거나 또는 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이이며; 단일 아미노산 치환은 EU 위치 G341에서 EU 위치 K447까지의 서열 내에 있고; 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이 중 적어도 하나는 T366Y, T366W, T394W, T394Y, F405W, S354C, Y349T 및 T394F로 이루어진 군으로부터 선택되며; 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이는 K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R, D356K 및 D356R로부터 선택되고; CCR4 결합 도메인은 scFv이며; CCR4 결합 도메인은 VH 도메인 및 CH1 도메인을 포함하고; CCR4 결합 도메인은 VL 도메인을 추가로 포함하며; VH 도메인은 표 1에 기재된 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열의 세트를 포함하고; VH 도메인은 표 2에 기재된 항체의 서열을 포함하는 VH 도메인의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하며; VH 도메인은 표 2에 기재된 항체의 VH 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하고, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열을 제외한 VH 서열은 표 2에 기재된 항체의 VH 서열과 적어도 95% 또는 98% 동일하며; VH 도메인은 표 2에 기재된 항체의 VH 서열을 포함하고; CCR4 결합 도메인은 표 1에 기재된 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열의 세트를 포함하며; CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 VH 및 VL 서열의 세트로부터의 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 포함하고; CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 VH 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및 표 2에 기재된 항체의 VL 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하되, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 제외한 VH 및 VL 도메인 서열은 표 2에 기재된 항체의 VH 및 VL 서열과 적어도 95% 또는 98% 동일하며; CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 VH 및 VL 서열의 세트를 포함하고; CCR4 결합 도메인은 IgG CL 항체 불변 도메인 및 IgG CH1 항체 불변 도메인을 포함하며; CCR4 결합 도메인은 VH 도메인 및 CH1

도메인을 포함하고, VL 도메인 및 CL 도메인을 포함하는 폴리펩티드에 결합하여 Fab를 형성할 수 있다.

[0124] 제1 또는 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체의 힌지 내의 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합에 의해 연결된 상술한 폴리펩티드의 2개의 카피를 포함하는 폴리펩티드 복합체가 또한 기재되어 있다.

[0125] 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드에 연결된 상술한 폴리펩티드를 포함하되, 상기 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드는 상기 폴리펩티드의 제1, 제2 또는 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체의 힌지 도메인 및 제2 폴리펩티드의 힌지 도메인 내의 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합에 의해 연결되는, 폴리펩티드 복합체가 또한 기재되어 있다.

[0126] 복합체의 다양한 구현예에서: 제2 폴리펩티드 단량체는 유전자 조작 함몰부를 형성하는 돌연변이를 포함하며; 유전자 조작 함몰부를 형성하는 돌연변이는 Y407T, Y407A, F405A, T394S, T394W/Y407A, T366W/T394S, T366S/L368A/Y407V/Y349C, S364H/F405A로 이루어진 군으로부터 선택되고; 제2 폴리펩티드는 최대 10개의 단일 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함한다.

[0127] 제42 양태에서, 본 발명은 CCR4 결합 도메인; 링커; 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체; 제2 링커; 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체; 임의의 제3 링커; 및 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 임의의 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 적어도 하나의 Fc 도메인 단량체는 1개, 2개 또는 3개의 역전하 돌연변이를 포함하는 폴리펩티드를 특징으로 한다.

[0128] 제42 양태의 다양한 구현예에서: CCR4 결합 도메인은 항체 중쇄 가변 도메인을 포함하고; CCR4 결합 도메인은 항체 경쇄 가변 도메인을 포함하며; 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 2개가 한 세트인 역전하 돌연변이 또는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 4개가 한 세트인 역전하 돌연변이의 세트를 포함하고, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하며; 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하고, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 2개가 한 세트인 역전하 돌연변이 또는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 4개가 한 세트인 역전하 돌연변이를 포함하며; 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 상기 제2 IgG 불변 도메인 단량체는 모두 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하고; 폴리펩티드는 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 추가로 포함하되, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체는 각각 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하며; 폴리펩티드는 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체 둘 모두는 각각, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하고, 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 2개가 한 세트인 역전하 돌연변이 또는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 4개가 한 세트인 역전하 돌연변이를 포함하며; 폴리펩티드는 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체 둘 모두는 각각, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하고, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 2개가 한 세트인 역전하 돌연변이 또는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 4개가 한 세트인 역전하 돌연변이를 포함하며; 폴리펩티드는 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체 둘 모두는 각각, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하고, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 2개가 한 세트인 역전하 돌연변이 또는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 4개가 한 세트인 역전하 돌연변이를 포함하며; 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하는 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체는 동일한 CH3 도메인을 가지고; 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이는 CH3 도메인에 있으며; 돌연변이는 EU 위치 G341에서 EU 위치 K447까지의 서열 내에 있고; 돌연변이는 단일 아미노산 변화이며; 돌연변이는 EU 위치 G341에서 EU 위치 K446까지의 서열 내에 있고; 돌연변이는 단일 아미노산 변화이며; 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS, GGSGGSGGSGGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS, GGGSGGGSGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG 및 GGGGGGGGGGGGGGGG로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이러한 아미노산 서열로 이루어지고; 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 글리신 스페이서이며; 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 독립적으로 4 내지 30, 4 내지 20, 8 내지 30, 8 내지 20, 12 내지 20 또는 12 내지 30개의 글리신 잔

기로 이루어지고; 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 20개의 글리신 잔기로 이루어지며; Fc 도메인 단량체 중 적어도 하나는 EU 위치 I253에서 단일 아미노산 돌연변이를 포함하고, EU 위치 I253에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 독립적으로, I253A, I253C, I253D, I253E, I253F, I253G, I253H, I253I, I253K, I253L, I253M, I253N, I253P, I253Q, I253R, I253S, I253T, I253V, I253W 및 I253Y로 이루어진 군으로부터 선택되며; 위치 I253에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 I253A이고; Fc 도메인 단량체 중 적어도 하나는 EU 위치 R292에서 단일 아미노산 돌연변이를 포함하며; EU 위치 R292에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 독립적으로, R292D, R292E, R292L, R292P, R292Q, R292R, R292T 및 R292Y로 이루어진 군으로부터 선택되고; 위치 R292에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 R292P이며; 각각의 Fc 도메인 단량체는 독립적으로, EPKSCDKTHTCPPCPAPELL 및 DKTHTCPPCPAPELL로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이러한 아미노산 서열로 이루어지고; 제2 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체의 힌지 부분은 아미노산 서열 DKTHTCPPCPAPELL을 가지며; 제1 Fc 도메인 단량체의 힌지 부분은 아미노산 서열 EPKSCDKTHTCPPCPAPEL을 가지고; 제1 Fc 도메인 단량체의 힌지 부분은 아미노산 서열 EPKSCDKTHTCPPCPAPEL을 가지며, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체의 힌지 부분은 아미노산 서열 DKTHTCPPCPAPELL을 가지며; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH2 도메인은 독립적으로, 2개 이하의 단일 아미노산 결실 또는 치환을 갖는 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하고; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH2 도메인은 동일하며, 2개 이하의 단일 아미노산 결실 또는 치환을 갖는 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하고; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH2 도메인은 동일하며, 2개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하고; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH2 도메인은 동일하며, 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하고; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 10개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG를 포함하며; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 8개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG를 포함하고; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 6개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG를 포함하며; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 5개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG를 포함하고; 단일 아미노산 치환은 T366Y, T366W, T394W, T394Y, F405W, F405A, Y407A, S354C, Y349T, T394F, K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R, D356K 및 D356R로 이루어진 군으로부터 선택되며; Fc 도메인 단량체는 각각 독립적으로, 최대 10개의 단일 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하고; 단일 아미노산 치환 중 최대 6개는 CH3 도메인에 있는 역전하 돌연변이이거나 또는 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이이며; 단일 아미노산 치환은 EU 위치 G341에서 EU 위치 K447까지의 서열 내에 있고; 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이 중 적어도 하나는 T366Y, T366W, T394W, T394Y, F405W, S354C, Y349T 및 T394F로 이루어진 군으로부터 선택되며; 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이는 K409D, K409E, K392D. K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R, D356K 및 D356R로부터 선택되고; CCR4 결합 도메인은 scFv이며; CCR4 결합 도메인은 VH 도메인 및 CH1 도메인을 포함하고; CCR4 결합 도메인은 VL 도메인을 추가로 포함하며; VH 도메인은 표 1에 기재된 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열의 세트를 포함하고; VH 도메인은 표 2에 기재된 항체의 서열을 포함하는 VH 도메인의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하며; VH 도메인은 표 2에 기재된 항체의 VH 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하고, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열을 제외한 VH 서열은 표 2에 기재된 항체의 VH 서열과 적어도 95% 또는 98% 동일하며; VH 도메인은 표 2에 기재된 항체의 VH 서열을 포함하고; CCR4 결합 도메인은 표 1에 기재된 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열의 세트를 포함하며; CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 VH 및 VL 서열의 세트로부터의 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 포함하고; CCR4 결합 도메인

은 표 2에 기재된 항체의 VH 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및 표 2에 기재된 항체의 VL 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하되, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 제외한 VH 및 VL 도메인 서열은 표 2에 기재된 항체의 VH 및 VL 서열과 적어도 95% 또는 98% 동일하며; CCR4 결합 도메인은 표 2에 기재된 항체의 VH 및 VL 서열의 세트를 포함하고; CCR4 결합 도메인은 IgG CL 항체 불변 도메인 및 IgG CH1 항체 불변 도메인을 포함하며; CCR4 결합 도메인은 VH 도메인 및 CH1 도메인을 포함하고, VL 도메인 및 CL 도메인을 포함하는 폴리펩티드에 결합하여 Fab를 형성할 수 있다.

[0129] 제1 또는 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체의 힌지 내의 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합에 의해 연결된 상술한 폴리펩티드 중 어느 하나의 2개의 카피를 포함하는 폴리펩티드 복합체가 또한 기재되어 있다.

[0130] 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드에 연결된 상술한 폴리펩티드를 포함하되, 상기 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드는 상기 폴리펩티드의 제1, 제2 또는 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체의 힌지 도메인 및 제2 폴리펩티드의 힌지 도메인 내의 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합에 의해 연결되는, 폴리펩티드 복합체가 또한 기재되어 있다. 다양한 구현예에서: 제2 폴리펩티드 단량체는 1개, 2개 또는 3개의 역전하 돌연변이를 포함하고; 제2 폴리펩티드 단량체는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 돌연변이를 포함하며, 폴리펩티드 내의 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 돌연변이에 상보적이고; 제2 폴리펩티드는 최대 10개의 단일 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함한다.

[0131] 제43 양태에서, 본 발명은 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체; 제2 링커; 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체; 임의의 제3 링커; 및 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 임의의 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 적어도 하나의 Fc 도메인 단량체는 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드를 특징으로 한다.

[0132] 제43 양태의 다양한 구현예에서: 폴리펩티드는 제1 IgG1 단량체의 아미노 말단에 CH1 도메인 및 항체 중쇄 가변 도메인 또는 제1 IgG1 단량체의 아미노 말단에 scFv를 추가로 포함하며; 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체는 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이를 포함하고, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체는 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하며; 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체는 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하고, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체는 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이를 포함하며; 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체와 제2 IgG1 Fc 불변 도메인 단량체는 모두 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하고; 폴리펩티드는 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체는 각각 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하며; 폴리펩티드는 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체와 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체 모두는 각각 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하고, 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체는 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이를 포함하며; 폴리펩티드는 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체와 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체 모두는 각각 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하고, 제2 IgG1 도메인 단량체는 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이를 포함하며; 폴리펩티드는 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체와 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체 모두는 각각 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하고, 제1 IgG1 도메인 단량체는 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이를 포함한다.

[0133] 제43 양태의 다양한 구현예에서, 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이를 포함하는 IgG1 Fc 도메인 단량체는 1개, 2개 또는 3개의 역전하 돌연변이를 추가로 포함하고; 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이 및 역전하 돌연변이는 CH3 도메인에 있으며, 상기 돌연변이는 EU 위치 G341에서 EU 위치 K447까지의 서열 내에 있고, 돌연변이는 단일 아미노산 변화이며, 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 GGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS, GGSGGSGGSGGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS, GGGSGGGSGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG 및 GGGGGGGGGGGGGGGG로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 이러한 아미노산 서열로 이루어지고, 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 글리신 스페이서이며, 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 독립적으로 4 내지 30개, 4 내지 20개, 8 내지 30개, 8 내지 20개, 12 내지 20개 또는 12 내지 30개의 글리신 잔기로 이루어지고, 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 20개의 글리신 잔기로 이루어지며, Fc 도메인 단량체 중 적어도 하나는 EU 위치 I253에서 단일 아미노산 돌연변이를 포함하고, EU 위치 I253에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 독립적으로, I253A, I253C, I253D, I253E, I253F, I253G, I253H, I253I, I253K, I253L, I253M, I253N, I253P,

I253Q, I253R, I253S, I253T, I253V, I253W, 및 I253Y로 이루어진 군에서 선택되며, 위치 I253에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 I253A이고, Fc 도메인 단량체 중 적어도 하나는 EU 위치 R292에서 단일 아미노산 돌연변이를 포함하며, EU 위치 R292에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 독립적으로 R292D, R292E, R292L, R292P, R292Q, R292R, R292T, 및 R292Y로 이루어진 군에서 선택되고, 위치 R292에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 R292P이며, 각각의 Fc 도메인 단량체는 독립적으로, EPKSCDKTHTCPPCPAPELL 및 DKTHTCPPCPAPELL로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이러한 아미노산 서열로 이루어지고, 제1 Fc 도메인 단량체의 힌지 부분은 아미노산 서열 EPKSCDKTHTCPPCPAPEL을 가지고, 제2 Fc 도메인 단량체의 힌지 부분은 아미노산 서열 DKTHTCPPCPAPELL을 갖고, Fc 도메인 단량체 각각의 CH2 도메인은 독립적으로 2개 이하의 단일 아미노산 결실 또는 치환을 갖는 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하고; 각각의 Fc 도메인의 CH2 도메인은 동일하며, 2개 이하의 단일 아미노산 결실 또는 치환을 갖는 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하고; 각각의 Fc 도메인의 CH2 도메인은 동일하며, 2개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하고; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH2 도메인은 동일하며, 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하고; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 10개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG를 포함하며; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 8개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG를 포함하고; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 6개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG를 포함하며; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 5개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG를 포함하고; 단일 아미노산 치환은 T366Y, T366W, T394W, T394Y, F405W, F405A, Y407A, S354C, Y349T, T394F, K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R, D356K 및 D356R로 이루어진 군에서 선택되며; Fc 도메인 단량체는 각각 독립적으로 최대 10개의 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하고; 단일 아미노산 치환 중 최대 6개는 CH3 도메인에 있는 역전하 돌연변이이거나 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이이며; 단일 아미노산 치환은 EU 위치 G341에서 EU 위치 K447까지의 서열 내에 있고, 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이 중 적어도 하나는 T366Y, T366W, T394W, T394Y, F405W, S354C, Y349T 및 T394F로 이루어진 군에서 선택되며; 2개 또는 4개의 역전하 돌연변이는 K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R, D356K 및 D356R로부터 선택된다.

[0134] 제44 양태에서, 본 발명은 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체; 제2 링커; 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체; 임의의 제3 링커; 및 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 임의의 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 적어도 하나의 Fc 도메인 단량체는 1개, 2개 또는 3개의 역전하 돌연변이를 포함하는 폴리펩티드를 특징으로 한다.

[0135] 제44 양태의 다양한 구현예에서: 폴리펩티드는 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체의 아미노 말단에 CH1 도메인 및 항체 중쇄 가변 도메인 또는 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체의 아미노 말단에 scFv를 추가로 포함하며; 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 2개가 한 세트인 역전하 돌연변이 또는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 4개가 한 세트인 역전하 돌연변이를 포함하고, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하며; 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하고, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 2개가 한 세트인 역전하 돌연변이 또는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 4개가 한 세트인 역전하 돌연변이를 포함하며; 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체와 제2 IgG 불변 도메인 단량체는 모두 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2

개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하고; 폴리펩티드는 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 추가로 포함하되, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체는 각각 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하며; 폴리펩티드는 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체와 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체 둘 모두는 각각, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하고, 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 2개가 한 세트인 역전하 돌연변이 또는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 4개가 한 세트인 역전하 돌연변이를 포함하며; 폴리펩티드는 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체와 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체 둘 모두는 각각, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하고, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 2개가 한 세트인 역전하 돌연변이 또는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 4개가 한 세트인 역전하 돌연변이를 포함하며; 폴리펩티드는 제3 링커 및 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하되, 제2 IgG1 Fc 도메인 단량체와 제3 IgG1 Fc 도메인 단량체 둘 모두는 각각, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하고, 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 2개가 한 세트인 역전하 돌연변이 또는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 4개가 한 세트인 역전하 돌연변이를 포함하며; 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이를 포함하는 제1 IgG1 Fc 도메인 단량체는 동일한 CH3 도메인을 가지고; 표 4A 및 표 4B에서 선택된 1개, 2개 또는 3개의 역전하 아미노산 돌연변이는 CH3 도메인에 있으며; 돌연변이는 EU 위치 G341에서 EU 위치 K447까지의 서열 내에 있고; 돌연변이는 각각 단일 아미노산 변화이며; 돌연변이는 EU 위치 G341에서 EU 위치 K446까지의 서열 내에 있고; 돌연변이는 단일 아미노산 변화이며; 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS, GGSGGSGGSGGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS, GGGSGGGSGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG 및 GGGGGGGGGGGGGGGG로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 이러한 아미노산 서열로 이루어지고, 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 글리신 스페이서이며, 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 독립적으로 4 내지 30개, 4 내지 20개, 8 내지 30개, 8 내지 20개, 12 내지 20개 또는 12 내지 30개의 글리신 잔기로 이루어지고, 제2 링커 및 임의의 제3 링커는 20개의 글리신 잔기로 이루어지며, Fc 도메인 단량체 중 적어도 하나는 EU 위치 I253에서 단일 아미노산 돌연변이를 포함하고, EU 위치 I253에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 독립적으로, I253A, I253C, I253D, I253E, I253F, I253G, I253H, I253I, I253K, I253L, I253M, I253N, I253P, I253Q, I253R, I253S, I253T, I253V, I253W 및 I253Y로 이루어진 군에서 선택되고, 위치 I253에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 I253A이며, Fc 도메인 단량체 중 적어도 하나는 EU 위치 R292에서 단일 아미노산 돌연변이를 포함하고, EU 위치 R292에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 독립적으로 R292D, R292E, R292L, R292P, R292Q, R292R, R292T 및 R292Y로 이루어진 군에서 선택되며, 위치 R292에서의 각각의 아미노산 돌연변이는 R292P이고, 각각의 Fc 도메인 단량체는 독립적으로, EPKSCDKTHTCPPCPAPELL 및 DKTHTCPPCPAPELL로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이러한 아미노산 서열로 이루어지며, 제1 Fc 도메인 단량체의 힌지 부분은 아미노산 서열 EPKSCDKTHTCPPCPAPEL을 갖고, 제2 Fc 도메인 단량체의 힌지 부분은 아미노산 서열 DKTHTCPPCPAPELL을 가지며, Fc 도메인 단량체 각각의 CH2 도메인은 독립적으로 2개 이하의 단일 아미노산 결실 또는 치환을 갖는 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하고; 각각의 Fc 도메인의 CH2 도메인은 동일하며, 2개 이하의 단일 아미노산 결실 또는 치환을 갖는 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하고; 각각의 Fc 도메인의 CH2 도메인은 동일하며, 2개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하고; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH2 도메인은 동일하며, 아미노산 서열 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK를 포함하고; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 10개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG를 포함하며; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 8개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG를 포함하고; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 6개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG를 포함하고; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 독립적으로, 5개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG를 포함하고; 단일 아미노산 치환은 T366Y, T366W, T394W, T394Y, F405W, F405A, Y407A, S354C, Y349T, T394F, K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R, D356K 및 D356R로 이루어진 군으로부터 선택되며; Fc 도메인 단량체는 각각 독립적으로, 최대 10개의 단일 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하고; 단일 아미노산 치환 중 최대 6개는 CH3 도메인에 있는 역전하 돌연변이이거나 또는 유전자 조작 돌출부를 형성하는 돌연변이이며; 단일 아미노산 치환은 EU 위치 G341에서 EU 위치 K447까지의 서열 내에 있고; VH 도메인 또는 scFv는 표 1에 기재된 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열의 세트를 포함하고; VH 도메인 또는 scFv는 표 2에 기재된 항체의 서열을 포함하는 VH 도메인의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하며; VH 도메인 또는 scFv는 표 2에 기재된 항체의 VH 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하고, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열을 제외한 VH 서열은 표 2에 기재된 항체의 VH 서열과 적어도 95% 또는 98% 동일하며; VH 도메인 또는 scFv는 표 2에 기재된 항체의 VH 서열을 포함하고; VH 도메인 또는 scFv는 표 1에 기재된 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열의 세트를 포함하며; VH 도메인 또는 scFv는 표 2에 기재된 항체의 VH 및 VL 서열의 세트로부터의 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 포함하고; VH 도메인 또는 scFv는 표 2에 기재된 항체의 VH 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및 표 2에 기재된 항체의 VL 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하되, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 제외한 VH 및 VL 도메인 서열은 표 2에 기재된 항체의 VH 및 VL 서열과 적어도 95% 또는 98% 동일하며; VH 도메인 또는 scFv는 표 2에 기재된 항체의 VH 및 VL 서열의 세트를 포함한다.

[0136] 제41, 제42, 제43 및 제44 양태의 전술한 폴리펩티드의 어느 하나를 암호화하는 핵산 분자가 또한 기재되어 있다.

[0137] 전술한 폴리펩티드 중 어느 하나를 암호화하는 핵산을 포함하는 발현 벡터; 핵산 또는 발현 벡터를 함유하는 숙주 세포; 항체 VL 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자(예를 들어, 항체 VL 도메인 및 항체 CL 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자)를 추가로 함유하는 숙주 세포; 항체 VL 도메인 및 항체 CL 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 추가로 함유하는 숙주 세포; 10개 이하의 단일 아미노산 돌연변이를 갖는 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 추가로 함유하는 숙주 세포; 10개 이하의 단일 아미노산 돌연변이를 갖는 IgG1 Fc 도메인 단량체를 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 추가로 함유하는 숙주 세포가 또한 기재되어 있다. 다양한 구현예에서, IgG1 Fc 도메인 단량체는 CH3 도메인에 10개, 8개, 6개 또는 4개 이하의 단일 아미노산 돌연변이를 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함한다.

[0138] 본원에 기재된 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 복합체 중 어느 하나를 포함하는 약학 조성물이 또한 기재되어 있다. 다양한 구현예에서, 폴리펩티드의 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 2% 미만은 적어도 하나의 푸코스를 갖는다.

[0139] 본 발명의 제41, 제42, 제43 및 제44 양태의 폴리펩티드는 본원에 기재된 다양한 Fc-항원 결합 도메인 작제물의 성분으로서 유용하다. 따라서, 제1 내지 제40 양태 중 어느 하나의 폴리펩티드, 예를 들어, CCR4 결합 도메인을 포함할 수 있는 것들은 본 발명의 제41, 제42, 제43 및 제44 양태 중 어느 하나의 폴리펩티드를 포함하거나, 이러한 폴리펩티드로 이루어질 수 있다.

[0140] 본 발명의 모든 양태에서 사용하기 위한 다른 유용한 폴리펩티드는 (예를 들어, Y407T Y407A, F405A, T394S, T394W:Y407T, T394S:Y407A, T366W:T394S, F405T, T366S:L368A:Y407V:Y349C, S364H:F405A로부터 선택되는) 1개, 2개 또는 3개의 함몰부를 형성하는 돌연변이를 갖는 (예를 들어, 8개, 6개 5개, 4개 또는 3개 이하의 단일 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진) Fc 도메인 단량체를 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 이러한 폴리펩티드는 선택적으로 표 4A 및 표 4B로부터의 1개, 2개 또는 3개의 역전하 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0141] 본 발명의 모든 양태에서, Fc 도메인 단량체의 일부 또는 전부(예를 들어, 10개, 8개, 6개 또는 4개 이하의 단

일 아미노산 치환을(예를 들어, CH3 도메인에서만) 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 도메인 단량체)는 다른 아미노산 치환 또는 변형에 더하여 E345K 및 E430G 아미노산 치환 중 하나 또는 둘 모두를 가질 수 있다. E345K 및 E430G 아미노산 치환은 Fc 도메인 다량체화를 증가시킬 수 있다.

[0142] Fc-항원 결합 도메인 작제물이 또한 본원에 기재되어 있으며, 상기 Fc-항원 결합 도메인 작제물은

[0143] a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

[0144] ii) 제2 Fc 도메인 단량체,

[0145] iii) 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인, 및

[0146] iv) 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 하기를 포함하는 제1 폴리펩티드;

[0147] b) i) 제3 Fc 도메인 단량체,

[0148] ii) 제4 Fc 도메인 단량체,

[0149] iii) 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인 및

[0150] iv) 제3 및 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

[0151] c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

[0152] d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩타이드;

[0153] e) 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제5 폴리펩티드; 및

[0154] f) 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제6 폴리펩티드를 포함하되,

[0155] 제1 및 제3 Fc 도메인 단량체는 함께 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체는 함께 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제4 및 제6 Fc 도메인 단량체는 함께 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인과 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제1 Fab를 형성하며, 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인과 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제2 Fab를 형성한다.

[0156] 다양한 구현예에서: 제1 및 제2 폴리펩티드는 서열이 동일하고; 제3 및 제4 폴리펩티드는 서열이 동일하며; 제5 및 제6 폴리펩티드는 서열이 동일하고; 제1 및 제2 폴리펩티드는 서열이 동일하며, 제3 및 제4 폴리펩티드는 서열이 동일하고, 제5 및 제6 폴리펩티드는 서열이 동일하며; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하고; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 인간 IgG1의 아미노산 서열과 비교하여, 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하며; Fc 도메인 단량체는 각각 독립적으로, 최대 10개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하고; 단일 아미노산 치환은 CH3 도메인에만 있으며; 제1 및 제3 Fc 도메인 단량체는 제1 및 제3 Fc 도메인 단량체 사이의 동종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하고; 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체는 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하며, 제4 및 제6 Fc 도메인 단량체는 제4 및 제6 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하고; 동종이량체화를 촉진하는 치환은 표 4A 및 표 4B의 치환으로부터 선택되며; 이종이량체화를 촉진하는 치환은 표 3의 치환으로부터 선택된다.

[0157] Fc-항원 결합 도메인 작제물이 또한 기재되어 있으며, 상기 Fc-항원 결합 도메인 작제물은

[0158] a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

[0159] ii) 제2 Fc 도메인 단량체,

[0160] iii) 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인, 및

[0161] iv) 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

[0162] b) i) 제3 Fc 도메인 단량체,

[0163] ii) 제4 Fc 도메인 단량체,

[0164] iii) 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인 및

[0165] iv) 제3 및 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

[0166] c) 제5 Fc 도메인 단량체와 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제3 폴리펩티드; 및

[0167] d) 제6 Fc 도메인 단량체와 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제4 폴리펩티드를 포함하되;

[0168] 제1 및 제3 Fc 도메인 단량체는 함께 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체는 함께 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제4 및 제6 Fc 도메인 단량체는 함께 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인과 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제1 Fab를 형성하며, 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인과 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제2 Fab를 형성한다.

[0169] Fc-항원 결합 도메인 작제물이 또한 기재되어 있으며, 상기 Fc-항원 결합 도메인 작제물은

[0170] a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

[0171] ii) 제2 Fc 도메인 단량체,

[0172] iii) 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인, 및

[0173] iv) 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

[0174] b) i) 제3 Fc 도메인 단량체,

[0175] ii) 제4 Fc 도메인 단량체,

[0176] iii) 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인 및

[0177] iv) 제3 및 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

[0178] c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

[0179] d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩타이드;

[0180] e) 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제5 폴리펩티드; 및

[0181] f) 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제6 폴리펩티드를 포함하되,

[0182] 제1 및 제5 Fc 도메인 단량체는 함께 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제3 및 제6 Fc 도메인 단량체는 함께 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체는 함께 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인과 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제1 Fab를 형성하며, 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인과 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제2 Fab를 형성한다.

[0183] 다양한 구현예에서: 제1 및 제2 폴리펩티드는 서열이 동일하고; 제3 및 제4 폴리펩티드는 서열이 동일하며; 제5 및 제6 폴리펩티드는 서열이 동일하고; 제1 및 제2 폴리펩티드는 서열이 동일하며, 제3 및 제4 폴리펩티드는 서열이 동일하고, 제5 및 제6 폴리펩티드는 서열이 동일하며; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하고; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 인간 IgG1의 아미노산 서열과 비교하여, 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하며; Fc 도메인 단량체는 각각 독립적으로, 최대 10개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하고; 단일 아미노산 치환은 CH3 도메인에만 있으며; 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체는 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체 사이의 동종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하고; 제1 및 제5 Fc 도메인 단량체는 제1 및 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하며, 제3 및 제6 Fc 도메인 단량체는 제3 및 제6 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하고; 동종이량체화를 촉진하는 치환은 표 4A 및 표 4B의 치환으로부터 선택되며; 이종이량체화를 촉진하는 치환은 표 3의 치환으로부터 선택된다.

[0184] Fc-항원 결합 도메인 작제물이 또한 기재되어 있으며, 상기 Fc-항원 결합 도메인 작제물은

[0185] a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

[0186] ii) 제2 Fc 도메인 단량체,

[0187] iii) 제3 Fc 도메인 단량체,

[0188] iv) 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인,

[0189] v) 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커 및

[0190] vi) 제2 및 제3 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

[0191] b) i) 제4 Fc 도메인 단량체,

[0192] ii) 제5 Fc 도메인 단량체,

[0193] iii) 제6 Fc 도메인 단량체,

[0194] iv) 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인,

[0195] v) 제4 및 제5 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커 및

[0196] vi) 제5 및 제6 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

[0197] c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

[0198] d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드;

[0199] e) 제9 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제5 폴리펩티드;

[0200] f) 제10 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제6 폴리펩티드;

[0201] g) 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제7 폴리펩티드; 및

[0202] h) 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제8 폴리펩티드를 포함하되,

[0203] 제1 및 제7 Fc 도메인 단량체는 함께 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제4 및 제8 Fc 도메인 단량체는 함께 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제2 및 제5 Fc 단량체는 함께 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제3 및 제9 Fc 도메인 단량체는 함께 제4 Fc 도메인을 형성하며, 제6 및 제10 Fc 단량체는 함께 제5 Fc 도메인을 형성하고, 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인 및 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제1 Fab를 형성하며; 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인 및 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제2 Fab를 형성한다.

[0204] 다양한 구현예에서: 제1 및 제2 폴리펩티드는 서열이 동일하고; 제3 및 제4 폴리펩티드는 서열이 동일하며; 제5 및 제6 폴리펩티드는 서열이 동일하고; 제7 및 제8 폴리펩티드는 서열이 동일하며; 제1 및 제2 폴리펩티드는 서열이 동일하고, 제3 및 제4 폴리펩티드는 서열이 동일하며, 제5 및 제6 폴리펩티드는 서열이 동일하고; 제7 및 제8 폴리펩티드는 서열이 동일하며; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하고; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 인간 IgG1의 아미노산 서열과 비교하여, 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하며; Fc 도메인 단량체는 독립적으로, 최대 10개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하고; 단일 아미노산 치환은 CH3 도메인에만 있으며; 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체는 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 동종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하고; 제1 및 제7 Fc 도메인 단량체는 제1 및 제7 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하며, 제4 및 제8 Fc 도메인 단량체는 제4 및 제8 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하고; 제3 및 제9 Fc 도메인 단량체는 제3 및 제9 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하며; 제6 및 제10 Fc 도메인 단량체는 제6 및 제10 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하고; 동종이량체화를 촉진하는 치환은 표 4A 및 표 4B의 치환으로부터 선택되며; 이종이량체화를 촉진하는 치환은 표 3의 치환으로부터 선택된다.

[0205] Fc-항원 결합 도메인 작제물이 또한 기재되어 있으며, 상기 Fc-항원 결합 도메인 작제물은

[0206] a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

[0207] ii) 제2 Fc 도메인 단량체,

[0208] iii) 제3 Fc 도메인 단량체,

[0209] iv) 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인,

[0210] v) 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커 및

[0211] vi) 제2 및 제3 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

[0212] b) i) 제4 Fc 도메인 단량체,

[0213] ii) 제5 Fc 도메인 단량체,

[0214] iii) 제6 Fc 도메인 단량체,

[0215] iv) 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인,

[0216] v) 제4 및 제5 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커 및

[0217] vi) 제5 및 제6 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

[0218] c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

[0219] d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드;

[0220] e) 제9 Fc 도메인 단량체와 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제5 폴리펩티드; 및

[0221] f) 제10 Fc 도메인 단량체 및 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제6 폴리펩티드를 포함하되,

[0222] 제1 및 제7 Fc 도메인 단량체는 함께 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제4 및 제8 Fc 도메인 단량체는 함께 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제2 및 제5 Fc 단량체는 함께 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제3 및 제9 Fc 도메인 단량체는 함께 제4 Fc 도메인을 형성하며, 제6 및 제10 Fc 단량체는 함께 제5 Fc 도메인을 형성하고, 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인 및 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제1 Fab를 형성하며; 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인 및 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제2 Fab를 형성한다.

[0223] Fc-항원 결합 도메인 작제물이 또한 기재되어 있으며, 상기 Fc-항원 결합 도메인 작제물은

[0224] a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

[0225] ii) 제2 Fc 도메인 단량체,

[0226] iii) 제3 Fc 도메인 단량체,

[0227] iv) 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인,

[0228] v) 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커 및

[0229] vi) 제2 및 제3 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

[0230] b) i) 제4 Fc 도메인 단량체,

[0231] ii) 제5 Fc 도메인 단량체,

[0232] iii) 제6 Fc 도메인 단량체,

[0233] iv) 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인,

[0234] v) 제4 및 제5 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커 및

[0235] vi) 제5 및 제6 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

[0236] c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

[0237] d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드;

[0238] e) 제9 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제5 폴리펩티드;

[0239] f) 제10 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제6 폴리펩티드;

[0240] g) 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제7 폴리펩티드; 및

[0241] h) 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제8 폴리펩티드를 포함하되,

[0242] 제1 및 제4 Fc 도메인 단량체는 함께 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 및 제7 Fc 도메인 단량체는 함께 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제5 및 제8 Fc 단량체는 함께 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제3 및 제9 Fc 도메인 단량체는 함께 제4 Fc 도메인을 형성하며, 제6 및 제10 Fc 단량체는 함께 제5 Fc 도메인을 형성하고, 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인 및 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제1 Fab를 형성하며; 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인 및 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제2 Fab를 형성한다.

[0243] 다양한 구현예에서: 제1 및 제2 폴리펩티드는 서열이 동일하고; 제3 및 제4 폴리펩티드는 서열이 동일하며; 제5 및 제6 폴리펩티드는 서열이 동일하고; 제7 및 제8 폴리펩티드는 서열이 동일하며; 제1 및 제2 폴리펩티드는 서열이 동일하고, 제3 및 제4 폴리펩티드는 서열이 동일하며, 제5 및 제6 폴리펩티드는 서열이 동일하고, 제7 및 제8 폴리펩티드는 서열이 동일하며; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하고; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 인간 IgG1의 아미노산 서열과 비교하여, 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하며; Fc 도메인 단량체는 각각 독립적으로, 최대 10개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하고; 단일 아미노산 치환은 CH3 도메인에만 있으며; 제1 및 제4 Fc 도메인 단량체는 제1 및 제4 Fc 도메인 단량체 사이의 동종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하고; 제2 및 제7 Fc 도메인 단량체는 제2 및 제7 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하며; 제5 및 제8 Fc 도메인 단량체는 제5 및 제8 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하고; 제3 및 제9 Fc 도메인 단량체는 제3 및 제9 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하며; 제6 및 제10 Fc 도메인 단량체는 제6 및 제10 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하고; 동종이량체화를 촉진하는 치환은 표 4A 및 표 4B의 치환으로부터 선택되며; 이종이량체화를 촉진하는 치환은 표 3의 치환으로부터 선택된다.

[0244] Fc-항원 결합 도메인 작제물이 또한 기재되어 있으며, 상기 Fc-항원 결합 도메인 작제물은

[0245] a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

[0246] ii) 제2 Fc 도메인 단량체,

[0247] iii) 제3 Fc 도메인 단량체,

[0248] iv) 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인,

[0249] v) 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커 및

[0250] vi) 제2 및 제3 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

[0251] b) i) 제4 Fc 도메인 단량체,

[0252] ii) 제5 Fc 도메인 단량체,

[0253] iii) 제6 Fc 도메인 단량체,

[0254] iv) 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인,

[0255] v) 제4 및 제5 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커 및

[0256] vi) 제5 및 제6 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

[0257] c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드;

[0258] d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드;

[0259] e) 제9 Fc 도메인 단량체와 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제5 폴리펩티드; 및

[0260] f) 제10 Fc 도메인 단량체 및 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제6 폴리펩티드를 포함하되,

[0261] 제1 및 제4 Fc 도메인 단량체는 함께 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 및 제7 Fc 도메인 단량체는 함께 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제5 및 제8 Fc 단량체는 함께 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제3 및 제9 Fc 도메인 단량체는 함께 제4 Fc 도메인을 형성하며, 제6 및 제10 Fc 단량체는 함께 제5 Fc 도메인을 형성하고, 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인 및 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제1 Fab를 형성하며; 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인 및 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제2 Fab를 형성한다.

[0262] Fc-항원 결합 도메인 작제물이 또한 기재되어 있으며, 상기 Fc-항원 결합 도메인 작제물은

[0263] a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

[0264] ii) 제2 Fc 도메인 단량체,

[0265] iii) 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

[0266] b) i) 제3 Fc 도메인 단량체,

[0267] ii) 제4 Fc 도메인 단량체,

[0268] iv) 제3 및 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

[0269] c) 제5 Fc 도메인 단량체와 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인을 포함하는 제3 폴리펩티드;

[0270] d) 제6 Fc 도메인 단량체와 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인을 포함하는 제4 폴리펩티드;

[0271] e) 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제5 폴리펩티드; 및

[0272] f) 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제6 폴리펩티드를 포함하되,

[0273] 제1 및 제5 Fc 도메인 단량체는 함께 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제3 및 제6 Fc 도메인 단량체는 함께 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체는 함께 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인과 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제1 Fab를 형성하며, 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인과 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인은 함께 제2 Fab를 형성한다.

[0274] 다양한 구현예에서: 제1 및 제2 폴리펩티드는 서열이 동일하고; 제3 및 제4 폴리펩티드는 서열이 동일하며; 제5 및 제6 폴리펩티드는 서열이 동일하고; 제1 및 제2 폴리펩티드는 서열이 동일하며, 제3 및 제4 폴리펩티드는 서열이 동일하고, 제5 및 제6 폴리펩티드는 서열이 동일하며; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하고; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 인간 IgG1의 아미노산 서열과 비교하여, 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하며; Fc 도메인 단량체는 각각 독립적으로, 최대 10개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하고; 단일 아미노산 치환은 CH3 도메인에만 있으며; 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체는 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체 사이의 동종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하고; 제1 및 제5 Fc 도메인 단량체는 제1 및 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하며, 제3 및 제6 Fc 도메인 단량체는 제3 및 제6 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하고; 동종이량체화를 촉진하는 치환은 표 4A 및 표 4B의 치환으로부터 선택되며; 이종이량체화를 촉진하는 치환은 표 3의 치환으로부터 선택된다.

[0275] Fc-항원 결합 도메인 작제물이 또한 기재되어 있으며, 상기 Fc-항원 결합 도메인 작제물은

[0276] a) i) 제1 Fc 도메인 단량체,

[0277] ii) 제2 Fc 도메인 단량체,

[0278] iii) 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인 및

[0279] iv) 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제1 폴리펩티드;

[0280] b) i) 제3 Fc 도메인 단량체,

[0281] ii) 제4 Fc 도메인 단량체,

[0282] iii) 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인 및

[0283] iv) 제3 및 제4 Fc 도메인 단량체를 연결하는 링커를 포함하는 제2 폴리펩티드;

[0284] c) 제5 Fc 도메인 단량체와 제3 CCR4 중쇄 결합 도메인을 포함하는 제3 폴리펩티드;

[0285] f) 제6 Fc 도메인 단량체와 제4 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제4 폴리펩티드;

[0286] e) 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제5 폴리펩티드;

[0287] f) 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제6 폴리펩티드;

[0288] g) 제3 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제7 폴리펩티드; 및

[0289] h) 제4 CCR4 경쇄 결합 도메인을 포함하는 제8 폴리펩티드를 포함하되,

[0290] 제1 및 제5 Fc 도메인 단량체는 함께 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제3 및 제6 Fc 도메인 단량체는 함께 제2 Fc 도메인을 형성하며, 제2 및 제4 Fc 단량체는 함께 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제1 CCR4 경쇄 결합 도메인 및 제3 CCR4 중쇄 결합 도메인은 함께 제1 Fab를 형성하며, 제2 CCR4 경쇄 결합 도메인 및 제4 CCR4 중쇄 결합 도메인은 함께 제2 Fab를 형성하고, 제3 CCR4 경쇄 결합 도메인 및 제1 CCR4 중쇄 결합 도메인은 함께 제3 Fab를 형성하며; 제4 CCR4 경쇄 결합 도메인 및 제2 CCR4 중쇄 결합 도메인은 함께 제2 Fab를 형성한다.

[0291] 다양한 구현예에서: 제1 및 제2 폴리펩티드는 서열이 동일하고; 제3 및 제4 폴리펩티드는 서열이 동일하며; 제5, 제6, 제7 및 제8 폴리펩티드는 서열이 동일하고; 제1 및 제2 폴리펩티드는 서열이 동일하며, 제3 및 제4 폴리펩티드는 서열이 동일하고, 제5, 제6, 제7 및 제8 폴리펩티드는 서열이 동일하며; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하고; 각각의 Fc 도메인 단량체의 CH3 도메인은 인간 IgG1의 아미노산 서열과 비교하여, 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하며; Fc 도메인 단량체는 각각 독립적으로, 최대 10개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 42, 43, 45 및 47 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하고; 단일 아미노산 치환은 CH3 도메인에만 있으며; 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체는 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체 사이의 동종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하고; 제1 및 제5 Fc 도메인 단량체는 제1 및 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하며, 제3 및 제6 Fc 도메인 단량체는 제3 및 제6 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 촉진하는 최대 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 단일 아미노산 치환을 포함하고; 동종이량체화를 촉진하는 치환은 표 4A 및 표 4B의 치환으로부터 선택되며; 이종이량체화를 촉진하는 치환은 표 3의 치환으로부터 선택된다.

[0292] 다양한 구현예에서: 각각의 링커는GGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS, GGSGGSGGSGGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS, GGGSGGGSGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG 및 GGGGGGGGGGGGGGGG로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이러한 아미노산 서열로 이루어지고; Fc 도메인 단량체 중 적어도 하나는 EU 위치 I253에서 치환을 포함하며; EU 위치 I253에서의 각각의 아미노산 치환은 독립적으로, I253A, I253C, I253D, I253E, I253F, I253G, I253H, I253I, I253K, I253L, I253M, I253N, I253P, I253Q, I253R, I253S, I253T, I253V, I253W 및 I253Y로 이루어진 군으로부터 선택되고; Fc 도메인 단량체 중 적어도 하나는 EU 위치 R292에서 치환을 포함하며; EU 위치 R292에서의 각각의 아미노산 치환은 독립적으로, R292D, R292E, R292L, R292P, R292Q, R292R, R292T 및 R292Y로 이루어진 군으로부터 선택되고; Fc 도메인 단량체 중 적어도 하나는 EU 위치 R292에서의 치환은 T366Y, T366W, T394W, T394Y, F405W, F405A, Y407A, S354C, Y349T, T394F, K409D, K409E, K392D, K392E, K370D, K370E, D399K, D399R, E357K, E357R, D356K 및 D356R로 이루어진 군으로부터 선택되며; 각각의 Fc 도메인 단량체의 힌지는 독립적으로, EPKSCDKTHTCPPCPAPELL 및 DKTHTCPPCPAPELL로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 이러한 아미노산 서열로 이루어진다.

[0293] 정의:

[0294] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "Fc 도메인 단량체"는 적어도 힌지 도메인 및 제2 및 제3 항체 불변 도메인

(C_H2 및 C_H3) 또는 이의 기능성 단편(예를 들어, 적어도 힌지 도메인 또는 이의 기능성 단편, CH2 도메인 또는 이의 기능성 단편, 및 CH3 도메인 또는 이의 기능성 단편)(예를 들어, (i) 다른 Fc 도메인 단량체와 이량체화되어 Fc 도메인을 형성할 수 있고, (ii) Fc 수용체에 결합될 수 있는 단편)을 포함하는 폴리펩티드 사슬을 지칭한다. 바람직한 Fc 도메인 단량체는 아미노 말단에서 카복시 말단까지 IgG1 힌지, IgG1 CH2 도메인 및 IgG1 CH3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 따라서, Fc 도메인 단량체, 예컨대 인간 IgG1 Fc 도메인 단량체는 E316에서 G446 또는 K447까지, P317에서 G446 또는 K447까지, K318에서 G446 또는 K447까지, K318에서 G446 또는 K447까지, S319에서 G446 또는 K447까지, C320에서 G446 또는 K447까지, D321에서 G446 또는 K447까지, K322에서 G446 또는 K447까지, T323에서 G446 또는 K447까지, K323에서 G446 또는 K447까지, H324에서 G446 또는 K447까지, T325에서 G446 또는 K447까지, 또는 C326에서 G446 또는 K447까지 확장될 수 있다. Fc 도메인 단량체는 IgG, IgE, IgM, IgA 또는 IgD(예컨대, IgG)를 포함하는 임의의 면역글로불린 항체 동형일 수 있다. 추가로, Fc 도메인 단량체는 IgG 아형(예컨대, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 또는 IgG4)(예컨대, 인간 IgG1)일 수 있다. 인간 IgG1 Fc 도메인 단량체는 본원에 기재된 실시예에 사용된다. 인간 IgG1의 전체 힌지 도메인은 EU 넘버링 E316에서 P230 또는 L235까지 확장되고, CH2 도메인은 A231 또는 G236에서 K340까지 확장되고, CH3 도메인은 G341에서 K447까지 확장된다. 힌지 도메인의 마지막 아미노산의 위치에 대한 다른 견해가 있다. 이는 P230 또는 L235이다. 본원의 많은 예에서, CH3 도메인은 K347을 포함하지 않는다. 따라서, CH3 도메인은 G341에서 G446까지일 수 있다. 본원의 많은 예에서, 힌지 도메인은 E216 내지 L235를 포함할 수 있다. 이는, 예를 들어 힌지가 CH1 도메인 또는 CCR4 결합 도메인에 대한 카복시 말단인 경우에 해당된다. 일부 경우에, 예를 들어 힌지가 폴리펩티드의 아미노 말단에 있는 경우, EU 넘버링 221의 Asp는 Gln으로 돌연변이된다. Fc 도메인 단량체는 항원-인식 영역, 예컨대 가변 도메인 또는 상보성 결정 영역(CDR)으로 작용할 수 있는 면역글로불린의 어떤 부분도 포함하지 않는다. Fc 도메인 단량체는 Fc 도메인과 Fc 수용체 간의 상호작용을 변경하는 야생형(예컨대, 인간) Fc 도메인 단량체 서열로부터의 10개만큼의 변화(예컨대, 1~10개, 1~8개, 1~6개, 1~4개의 아미노산 치환, 첨가 또는 결실)를 함유할 수 있다. Fc 도메인 단량체는 Fc 도메인 단량체 간의 상호작용을 변경하는 야생형 Fc 도메인 단량체 서열로부터의 10개만큼의 변화(예컨대, 단일 아미노산 변화)(예컨대, 1~10개, 1~8개, 1~6개, 1~4개의 아미노산 치환, 첨가 또는 결실)를 함유할 수 있다. 특정 구현예에서, 인간 IgG1 CH3 서열 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG와 비교하여 CH3 도메인에는 최대 10개, 8개, 6개 또는 5개의 단일 아미노산 치환이 있다. 적합한 변화의 예는 당업계에 공지되어 있다.

[0295] 본원에서 사용된 바와 같은, 용어 "Fc 도메인"은 Fc 수용체에 결합할 수 있는 2개의 Fc 도메인 단량체의 이량체를 지칭한다. 야생형 Fc 도메인에서, 2개의 Fc 도메인 단량체는 2개의 C_H3 항체 불변 도메인 사이의 상호작용뿐만 아니라 2개의 이량체화 Fc 도메인 단량체의 힌지 도메인 사이에 형성되는 하나 이상의 이황화 결합에 의해 이량체화된다.

[0296] 본 발명에서, "Fc-항원 결합 도메인 작제물"이란 용어는 본원에 기재된 바와 같은 적어도 2개의 Fc 도메인을 형성하고 적어도 하나의 "항원 결합 도메인"을 포함하는 회합된 폴리펩티드 사슬을 지칭한다. 본원에 기재된 Fc-항원 결합 도메인 작제물은 동일하거나 상이한 서열을 갖는 Fc 도메인 단량체를 포함할 수 있다. 예를 들어, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 3개의 Fc 도메인을 가질 수 있고, 이 중 2개는 IgG1 또는 IgG1-유래 Fc 도메인 단량체를 포함하고, 세 번째 것은 IgG2 또는 IgG2-유래 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 또 다른 예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물은 3개의 Fc 도메인을 가질 수 있고, 그 중 2개는 "돌출부-함몰부 쌍"을 포함하고, 세 번째는 "돌출부-함몰부 쌍"을 포함하지 않는다. Fc 도메인은 Fc 수용체, 예컨대 FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, FcγRIIIb 또는 FcγRIV에 결합하는 최소 구조를 형성한다.

[0297] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항원 결합 도메인"은 표적 분자에 특이적으로 결합할 수 있는 펩티드, 폴리펩티드 또는 회합된 폴리펩티드를 지칭한다. 일부 구현예에서, "항원 결합 도메인"은 항체에 의해 결합된 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 최소 서열이다. 표면 플라스몬 공명(SPR) 또는 당업계에 공지된 다양한 면역검정, 예를 들어 웨스턴 블롯 또는 ELISA를 사용하여 항원에 대한 항체 특이성을 평가할 수 있다. 일부 구현예에서, "항원 결합 도메인"은 항체의 가변 도메인 또는 상보성 결정 영역(CDR), 예를 들어, 표 1에 기재된 항체의 하나 이상의 CDR, 표 2에 기재된 항체의 하나 이상의 CDR, 또는 표 2에 기재된 항체의 VH 및/또는 VL 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은, 선택적으로 VL 도메인과 함께, VH 도메인 및 CH1 도메인을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 항원 (예를 들어, CCR4) 결합 도메인은 항체의 Fab 단편 또는 scFv이다. 그러므로, CCR4 결합 도메인은 VH 도메인 및 CH1 도메인을 포함하거나 이로 이루어지는 "CCR4 중쇄 결합 도메인", 및 VL 도메인 및 C_L 도메인을 포함하거나 이로 이루어지는 "CCR4 경쇄 결합 도메인"을 포함할 수 있다. CCR4 결

합 도메인은 또한 피브로넥틴 기반 결합 단백질(예를 들어, 피브로넥틴 III형 도메인(FN3) 모노바디)과 같은 표적에 특이적으로 결합하는 합성 유전자 조작 펩티드일 수 있다.

[0298] 본원에 사용된 용어 "상보성 결정 영역"(CDR)은 CCR4 결합에 필요한 항체 가변 도메인의 아미노산 잔기를 지칭한다. 각각의 가변 도메인은 전형적으로 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3, 및 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3으로 동정되는 3개의 CDR 영역을 갖는다. 각각의 상보성 결정 영역은 Kabat에 의해 정의된 "상보성 결정 영역"으로부터의 아미노산 잔기(즉, 경쇄 가변 도메인에서 약 잔기 24~34(CDR-L1), 50~56(CDR-L2) 및 89~97(CDR-L3) 및 중쇄 가변 도메인에서 31~35(CDR-H1), 50~65(CDR-H2) 및 95~102(CDR-H3); 문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1991)]) 및/또는 "초가변 루프"(즉, 경쇄 가변 도메인에서 약 잔기 26~32(CDR-L1), 50~52(CDR-L2) 및 91~96(CDR-L3), 및 중쇄 가변 도메인에서 26~32(CDR-H1), 53~55(CDR-H2) 및 96~101(CDR-H3); 문헌[Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917(1987)])로부터의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 상보성 결정 영역은 Kabat에 따라 정의된 CDR 영역 및 초가변 루프 둘 모두로부터의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0299] "프레임워크 영역"(이하 FR)은 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다. 각각의 가변 도메인은 전형적으로 FR1, FR2, FR3 및 FR4로서 식별되는 4개의 FR을 갖는다. CDR이 Kabat에 따라 정의된 경우, 경쇄 FR 잔기는 약 잔기 1~23(LCFR1), 35~49(LCFR2), 57~88(LCFR3) 및 98~107(LCFR4)에 위치되며, 중쇄 FR 잔기는 중쇄 잔기의 약 잔기 1~30(HCFR1), 36~49(HCFR2), 66-94(HCFR3) 및 103~113(HCFR4)에 위치한다. CDR이 초가변 루프로부터의 아미노산 잔기를 포함하는 경우, 경쇄 FR 잔기는 경쇄의 약 잔기 1~25(LCFR1), 33~49(LCFR2), 53~90(LCFR3) 및 97~107(LCFR4)에 위치하며, 중쇄 FR 잔기는 중쇄 잔기의 약 잔기 1~25(HCFR1), 33~52(HCFR2), 56프95(HCFR3) 및 102~113(HCFR4)에 위치한다. 일부 경우에, CDR이 Kabat에 의해 정의된 것과 같은 CDR 및 초가변 루프의 것들 둘 다의 아미노산을 포함하는 경우, FR 잔기는 그에 따라 조정되게 된다.

[0300] "Fv" 단편은 완전 항원 인식 및 결합 부위를 함유하는 항체 단편이다. 이러한 영역은 밀접 회합된 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 구성되며, 이는, 예를 들어, scFv에서 본질적으로 공유 결합일 수 있다. 이 구성에서 각각의 가변 도메인의 3개의 CDR은 상호작용하여 V_H-V_L 이량체의 표면 상의 CCR4 결합 부위를 정의한다.

[0301] "Fab" 단편은 경쇄의 가변 및 불변 도메인 및 중쇄의 가변 도메인 및 제1 불변 도메인(C_H1)을 함유한다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 일반적으로 힌지 시스테인에 의해 카복시 말단 근처에 공유 결합된 한 쌍의 Fab 단편을 포함한다.

[0302] "단일-사슬 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 단일 폴리펩티드 사슬에 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함한다. 일반적으로, scFv 폴리펩티드는 V_H 및 V_L 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함하며, 이는 scFv가 CCR4 결합을 위한 원하는 구조를 형성할 수 있게 한다.

[0303] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항체 불변 도메인"은 항체의 불변 영역 도메인(예를 들어, C_L 항체 불변 도메인, C_H1 항체 불변 도메인, C_H2 항체 불변 도메인 또는 C_H3 항체 불변 도메인)에 상응하는 폴리펩티드를 지칭한다.

[0304] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "촉진한다"는 다른 별개의 Fc 도메인 단량체보다 서로 간에 결합 친화도가 더 높은 2개의 Fc 도메인 단량체로부터 Fc 도메인의 형성을 장려하는 것과 같이 조장하거나 장려하게 하는 것을 의미한다. 본원에 기재된 바와 같이, 결합하여 Fc 도메인을 형성하는 2개의 Fc 도메인 단량체는 그들 각자의 C_H3 항체 불변 도메인의 계면에서 양립성 아미노산 변형(예를 들어, 유전자 조작 돌출부 및 유전자 조작 함몰부 및/또는 정전기 스티어링 돌연변이)을 가질 수 있다. 양립성 아미노산 변형은 이러한 아미노산 변형이 결여되거나 비양립성 아미노산 변형을 갖는 다른 Fc 도메인 단량체와 비교하여 이러한 Fc 도메인 단량체의 서로 간의 선택적 상호작용을 촉진하거나 장려한다. 이는 2개의 상호작용하는 CH_3 항체 불변 도메인의 계면에서의 아미노산 변형으로 인해, 아미노산 변형이 결여된 다른 Fc 도메인 단량체보다 서로를 향해 더 높은 친화도를 갖는 Fc 도메인 단량체 때문에 발생한다.

[0305] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "이량체화 선택성 모듈"은 2개의 Fc 도메인 단량체 간의 장려되는 페어링을 용이하게 하는 Fc 도메인 단량체의 서열을 지칭한다. "상보적" 이량체화 선택성 모듈은 2개의 Fc 도메인 단량체의 서로 간의 선택적 상호작용을 촉진하거나 장려하는 이량체화 선택성 모듈이다. 상보적 이량체화 선택성 모듈은 동일하거나 상이한 서열을 가질 수 있다. 예시적인 상보적 이량체화 선택성 모듈이 본원에 기재되어 있다.

[0306] 본원에서 사용된 바와 같은, 용어 "유전자 조작 함몰부"는 원래의 아미노산 잔기보다 더 작은 측쇄 체적을 갖는 상이한 아미노산 잔기를 가진 CH^3 항체 불변 도메인에 있는 원래의 아미노산 잔기 중 적어도 하나의 치환을 지칭하며, 따라서 CH_3 항체 불변 도메인에 3차원 함몰부를 생성한다. "원래의 아미노산 잔기"라는 용어는 야생형 CH_3 항체 불변 도메인의 유전 암호에 의해 암호화된 자연 발생 아미노산 잔기를 지칭한다.

[0307] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "유전자 조작 돌출부"는 원래의 아미노산 잔기보다 더 큰 측쇄 체적을 갖는 상이한 아미노산 잔기를 가진 CH_3 항체 불변 도메인에 있는 원래의 아미노산 잔기 중 적어도 하나의 치환을 지칭하며, 따라서 CH_3 항체 불변 도메인에 3차원 돌출부를 생성한다. "원래의 아미노산 잔기"라는 용어는 야생형 CH_3 항체 불변 도메인의 유전 암호에 의해 암호화된 자연 발생 아미노산 잔기를 지칭한다.

[0308] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "돌출부-함몰부 쌍"은 2개의 Fc 도메인 단량체를 포함하는 Fc 도메인을 설명하되, 제1 Fc 도메인 단량체는 이의 CH_3 항체 불변 도메인에 유전자 조작 함몰부를 포함하는 반면, 제2 Fc 도메인 단량체는 이의 CH_3 항체 불변 도메인에 유전자 조작 돌출부를 포함한다. 돌출부-함몰부 쌍에서, 제1 Fc 도메인 단량체의 CH_3 항체 불변 도메인에 있는 유전자 조작 돌출부는 CH_3 항체 불변 도메인간 계면에서 이량체의 정상 회합을 유의미하게 교란시키지 않으면서 제2 Fc 도메인 단량체의 CH_3 항체 불변 도메인의 유전자 조작 함몰부와 상호작용하도록 위치된다.

[0309] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "이종이량체 Fc 도메인"은 2개의 Fc 도메인 단량체의 이종이량체화에 의해 형성되는 Fc 도메인을 지칭하되, 2개의 Fc 도메인 단량체는 이들 2개의 Fc 도메인 단량체의 유리한 형성을 촉진하는 상이한 역전하 돌연변이(예를 들어, 표 4A 및 표 4B의 돌연변이 참조)를 함유한다. 3개의 Fc 도메인, 즉 1개의 카복실 말단 "줄기" Fc 도메인 및 2개의 아미노 말단 "분지" Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물에서, 아미노 말단 "분지" Fc 도메인 각각은 이종이량체 Fc 도메인("분지 이종이량체 Fc 도메인"이라고도 함)일 수 있다.

[0310] Fc-항원 결합 도메인 작제물의 집단과 관련하여 본원에 사용된 용어 "구조적으로 동일한"은 동일한 비율과 구성의 동일한 폴리펩티드 서열의 조립인 작제물을 지칭하며, 글리코실화와 같은 번역후 변형을 지칭하지 않는다.

[0311] 본원에 사용된 용어 "동종이량체 Fc 도메인"은 2개의 Fc 도메인 단량체가 동일한 역전하 돌연변이(예를 들어, 표 5 및 표 6의 돌연변이 참조)를 함유하는, 2개의 Fc 도메인 단량체의 동종이량체화에 의해 형성되는 Fc 도메인을 지칭한다. 3개의 Fc 도메인, 즉 1개의 카복실 말단 "줄기" Fc 도메인 및 2개의 아미노 말단 "분지" Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물에서, 카복시 말단 "줄기" Fc 도메인은 동종이량체 Fc 도메인("줄기 동종이량체 Fc 도메인"이라고도 함)일 수 있다.

[0312] 본원에 사용된 용어 "이종이량체화 선택성 모듈"은 양립성 이종이량체화 선택성 모듈을 갖는 2개의 Fc 도메인 단량체의 유리한 이종이량체화를 촉진하기 위해 Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인에서 이루어질 수 있는 유전자 조작 돌출부, 유전자 조작 함몰부, 및 특정 역전하 아미노산 치환을 지칭한다. 이종이량체화 선택성 모듈을 함유하는 Fc 도메인 단량체는 결합하여 이종이량체 Fc 도메인을 형성할 수 있다. 이종이량체화 선택성 모듈의 예는 표 3 및 표 4에 도시되어 있다.

[0313] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "동종이량체화 선택성 모듈"은 동종이량체 Fc 도메인을 형성하도록 Fc 도메인 단량체의 동종이량체화를 촉진하는 CH_3 도메인 사이의 계면에서 하전 잔기의 고리 내의 적어도 2개의 위치의 Fc 도메인 단량체의 역전하 돌연변이를 지칭한다. 동종이량체화 선택성 모듈의 예는 표 4 및 표 5에 도시되어 있다.

[0314] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "연결된(joined)"은 화학적 접합, 재조합 수단 및 화학 결합(예컨대, 이황화 결합 및 아미드 결합)을 포함하는 수단에 의한 둘 이상의 요소, 성분, 또는 단백질 도메인(예컨대, 폴리펩티드)의 조합 또는 부착을 설명하기 위해 사용된다. 예를 들어, 2개의 단일 폴리펩티드는 화학적 접합, 화학 결합, 펩티드 링커 또는 공유 결합의 임의의 다른 수단을 통해 연결되어 하나의 연속 단백질 구조를 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 CCR4 결합 도메인 및 Fc 도메인 단량체 모두를 암호화하는 인접한 핵산 서열로부터 발현됨으로써 Fc 도메인 단량체에 연결된다. 다른 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 펩티드 링커를 통해 Fc 도메인 단량체에 연결되며, 펩티드 링커의 N-말단은 화학 결합, 예를 들어, 펩티드 결합을 통해 CCR4 결합 도메인의 C-말단에 연결되고, 펩티드 링커의 C-말단은 화학 결합, 예를 들어 펩티드 결합을 통해 Fc 도메인 단량체의 N-말단에 연결된다.

[0315] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "회합된(associated)"은 폴리펩티드(또는 하나의 단일 폴리펩티드 내의 서열)가 본원에 기재된 Fc-항원 결합 도메인 작제물(예를 들어, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc-항원 결합 도메인 작제물)을 형성하도록 위치되게 하는 폴리펩티드(또는 하나의 단일 폴리펩티드 내의 서열) 사이의 상호작용, 예를 들어 수소 결합, 소수성 상호작용 또는 이온성 상호작용을 기재하는 데 사용된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 4개의 폴리펩티드, 예를 들어 2개의 Fc 도메인 단량체를 각각 포함하는 2개의 폴리펩티드 및 하나의 Fc 도메인 단량체를 각각 포함하는 2개의 폴리펩티드는 회합되어 (예를 들어, 도 50 및 도 51에 도시된 바와 같은) 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물을 형성한다. 4개의 폴리펩티드는 이들 각자의 Fc 도메인 단량체를 통해 회합할 수 있다. 폴리펩티드 사이의 회합은 공유 상호작용을 포함하지 않는다.

[0316] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "링커"는 2개의 요소, 예를 들어 단백질 도메인 사이의 연결을 지칭한다. 링커는 공유 결합 또는 스페이서일 수 있다. "결합"이라는 용어는 화학 결합, 예컨대, 아미드 결합 또는 이황화 결합, 또는 화학 반응에 의해 생성된 임의의 종류의 결합, 예컨대, 화학적 접합을 지칭한다. "스페이서"라는 용어는 2개의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 도메인 사이에 공간 및/또는 가요성을 제공하기 위해 2개의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 도메인 사이에 발생하는 모이어티(예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 중합체) 또는 아미노산 서열(예를 들어, 3~200개의 아미노산, 3~150개의 아미노산 또는 3~100개의 아미노산 서열)을 지칭한다. 아미노산 스페이서는 (예를 들어, 폴리펩티드 골격을 통해 이격된 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 도메인에 연결된) 폴리펩티드의 1차 서열의 부분이다. 예를 들어, Fc 도메인을 형성하는 2개의 힌지 영역 또는 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 이황화 결합의 형성은 링커로 간주되지 않는다.

[0317] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "글리신 스페이서"는 2개의 Fc 도메인 단량체를 직렬로 결합시키는 글리신만을 함유하는 링커를 지칭한다. 글리신 스페이서는 적어도 4, 8 또는 12개의 글리신(예를 들어, 4~30, 8~30 또는 12~30개의 글리신; 예를 들어, 12~30개, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 글리신)을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 글리신 스페이서는 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG(서열 번호 27)의 서열을 갖는다.

[0318] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "알부민-결합 펩티드"는 혈청 알부민에 대한 친화도를 가지며, 이에 결합하도록 기능하는 12 내지 16개의 아미노산으로 이루어진 아미노산 서열을 지칭한다. 알부민-결합 펩티드는 상이한 기원, 예를 들어 인간, 마우스 또는 쥐의 것일 수 있다. 본 개시 내용의 일부 구현예에서, 알부민-결합 펩티드는 Fc 도메인 단량체의 C-말단에 융합되어 Fc-항원 결합 도메인 작제물의 혈청 반감기를 증가시킨다. 알부민-결합 펩티드는 직접 또는 링커를 통해, Fc 도메인 단량체의 N-말단 또는 C-말단에 융합될 수 있다.

[0319] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "정제 펩티드"는 폴리펩티드의 정제, 단리 또는 동정에 사용될 수 있는 임의의 길이의 펩티드를 지칭한다. 정제 펩티드는, 예를 들어 세포 용해 혼합물로부터 폴리펩티드를 정제하고/하거나 폴리펩티드를 단리하는 것을 돕기 위해 폴리펩티드에 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 정제 펩티드는 정제 펩티드에 특이적 친화도를 갖는 다른 모이어티에 결합한다. 일부 구현예에서, 정제 펩티드에 특이적으로 결합하는 이러한 모이어티는 매트릭스, 수지 또는 아가로스 비드와 같은 고형 지지체에 부착된다. Fc-항원 결합 도메인 작제물에 연결될 수 있는 정제 펩티드의 예는 본원에서 추가로 상세하게 기재된다.

[0320] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "다량체"는 본원에 기재된 적어도 2개의 회합된 Fc 작제물 또는 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 포함하는 분자를 지칭한다.

[0321] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "폴리뉴클레오티드"는 올리고뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드, 및 이의 단편 또는 일부를 지칭하며, 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있고 센스 가닥 또는 안티-센스 가닥을 나타낼 수 있는 게놈 기원 또는 합성 기원의 DNA 또는 RNA를 지칭한다. 단일 폴리뉴클레오티드는 단일 폴리펩티드로 번역된다.

[0322] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "폴리펩티드"는 단량체가 아미드 결합을 통해 서로 연결되는 아미노산 잔기인 단일 중합체를 말한다. 폴리펩티드는 자연 발생, 재조합 또는 합성에 의해 생성된 임의의 아미노산 서열을 포함하도록 의도된다.

[0323] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "아미노산 위치"는 단백질 또는 단백질 도메인에서 아미노산의 위치 번호를 지칭한다. 아미노산 위치는 표시된 경우 (예를 들어, CDR 및 FR 영역) Kabat 넘버링 시스템(Kabat 등의 문헌 [*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, Md., ed 5, 1991])을 사용하여 넘버링되며, 그렇지 않으면 EU 넘버링이 사용된다.

[0324] 도 24a 내지 도 24d는 EU 넘버링 시스템을 사용하여 넘버링된 인간 IgG1 Fc 도메인을 도시한다.

[0325] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "아미노산 변형"은 기준 서열(예를 들어, 야생형, 비돌연변이 또는 비변형 Fc 서열)과 비교하여, 약물동력학(PK) 및/또는 약물력학(PD) 특성, 혈청 반감기, 효과기 기능(예를 들어, 세포 용해(예를 들어, 항체 의존성 세포-매개 독성(ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포독성 활성(CDC)), 식균작용(예를 들어, 항체 의존성 세포성 식균작용(ADCP) 및/또는 보체 의존성 세포성 세포독성(CDCC)), 면역 활성 및 T-세포 활성), Fc 리포터에(예를 들어, Fc-감마 수용체(FcγR)(예를 들어, FcγRI(CD64), FcγRIIA(CD32), FcγRIIB(CD32), FcγRIIIA(CD16a) 및/또는 FcγRIIIB(CD16b)), Fc-알파 리포터(FcαR), Fc-엡실론 수용체(FcεR) 및/또는 신생아의 Fc 수용체(FcRn)에) 대한 친화도, 보체 연쇄반응(compliment cascade)(예를 들어, C1q)에 관여하는 단백질에 대한 친화도, 번역후 변형(예를 들어, 글리코실화, 시알산화), 응집 특성(예를 들어, 이량체(예를 들어, 동종이량체 및/또는 이종이량체) 및/또는 다량체를 형성하는 능력) 및 (예를 들어, C_H1 및 C_L 사이의 상호작용을 변경하고, 안정성을 변경하고/하거나 온도 및/또는 pH에 대한 감수성을 변경하는) Fc 작제물의 생물물리학적 특성에 영향을 끼칠 수 있고, 면역성 질환 및 염증성 질환의 치료 효능 개선을 촉진시킬 수 있는 Fc 도메인 폴리펩티드 서열의 변경을 지칭한다. 아미노산 변형은 아미노산 치환, 결실 및/또는 삽입을 포함한다. 일부 구현예에서, 아미노산 변형은 단일 아미노산의 변형이다. 다른 구현예에서, 아미노산 변형은 다수의(예컨대, 하나 초과의) 아미노산의 변형이다. 아미노산 변형은 아미노산 치환, 결실 및/또는 삽입의 조합을 포함할 수 있다. 아미노산 변형의 기술에는 Fc 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 점 돌연변이(예를 들어, 단일 뉴클레오티드를 다른 것과 교환하는 것)와 같은 유전적(즉, DNA 및 RNA) 변경, 삽입 및 결실(예를 들어, 하나 이상의 뉴클레오티드의 첨가 및/또는 제거)이 포함된다.

[0326] 특정 구현예에서, Fc 작제물 또는 Fc-항원 결합 도메인 작제물 내의 적어도 하나의(예를 들어, 1, 2 또는 3개) Fc 도메인 단량체는 아미노산 변형(예를 들어, 치환)을 포함한다. 일부 경우에, 적어도 하나의 Fc 도메인 단량체는 하나 이상의(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 20개 이하) 아미노산 변형들(예를 들어, 치환들)을 포함한다.

[0327] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "퍼센트(%) 동일성"은, 필요한 경우, 최대 % 동일성을 달성하기 위해 서열을 정렬하고 갭(gap)을 도입한(즉, 갭은 최적의 정렬을 위해 후보 및 참조 서열 중 하나 또는 둘 모두에 도입될 수 있으며, 비상동 서열은 비교를 위해 무시할 수 있음) 후에 기준 서열, 예를 들어, 야생형 Fc 도메인 단량체의 서열의 아미노산(또는 핵산) 잔기와 동일한 후보 서열, 예를 들어 본원에 기재된 Fc-항원 결합 도메인 작제물의 Fc 도메인 단량체의 서열의 아미노산(또는 핵산) 잔기의 백분율을 지칭한다. % 동일성을 결정하기 위한 정렬은 당업계의 기술 내에 있는 다양한 방법, 예를 들어 BLAST, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 달성될 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여, 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 일부 구현예에서, 주어진 기준 서열에 대한, 이에 대해 또는 이와 비교하여 주어진 후보 서열의 % 아미노산(또는 핵산) 서열 동일성(이는 특정 % 아미노산(또는 핵산)을 갖거나 포함하는 주어진 후보 서열로 대안적으로 표현될 수 있음)은 다음과 같이 계산된다:

[0328] 100 x (A/B의 분수)

[0329] 여기서, A는 후보 서열 및 기준 서열의 정렬에서 동일한 것으로 점수가 부여된 아미노산(또는 핵산) 잔기의 수이고, B는 기준 서열에 있는 아미노산(또는 핵산) 잔기의 총 수이다. 후보 서열의 길이가 기준 서열의 길이와 동일하지 않은 일부 구현예에서, 기준 서열에 대한 후보 서열의 % 아미노산(또는 핵산) 서열 동일성은 후보 서열에 대한 기준 서열의 % 아미노산(또는 핵산) 서열 동일성과 동일하지 않을 것이다.

[0330] 특정 구현예에서, 후보 서열과 비교하여 정렬된 기준 서열은 후보 서열의 전체 길이 또는 후보 서열의 인접한 아미노산(또는 핵산) 잔기의 선택된 부분에 걸쳐서 후보 서열이 50% 내지 100%의 동일성(예컨대, 50% 내지 100%, 60% 내지 100%, 70% 내지 100%, 80% 내지 100%, 90% 내지 100%, 92% 내지 100%, 95% 내지 100%, 97% 내지 100%, 99% 내지 100%, 또는 99.5% 내지 100%의 동일성)을 보임을 나타낼 수 있다. 비교를 위해 정렬된 후보 서열의 길이는 기준 서열 길이의 적어도 30%, 예컨대, 적어도 40%, 예컨대, 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%이다. 후보 서열에서의 위치를 기준 서열에서의 상응하는 위치와 동일한 아미노산(또는 핵산) 잔기가 차지할 때, 분자는 해당 위치에서 동일하다.

[0331] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 Fc 작제물 내의 Fc 도메인 단량체(예를 들어, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc-항원 결합 도메인 작제물)는 야생형 Fc 도메인 단량체의 서열(예를 들어, 서열번호 42)에 적어도 95% 동일한(예를 들어, 적어도 97%, 99% 또는 99.5% 동일한) 서열을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 Fc 작제물 내의 Fc 도메인 단량체(예를 들어, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc-항원 결합 도메인 작제물)는 서열번호 44, 46, 48

및 50~53 중 어느 하나의 서열에 적어도 95% 동일한(예를 들어, 적어도 97%, 99% 또는 99.5% 동일한) 서열을 가질 수 있다. 특정 구현예에서, Fc 작제물 내의 Fc 도메인 단량체는 서열번호 48, 52 및 53의 서열에 적어도 95% 동일한(예를 들어, 적어도 97%, 99% 또는 99.5% 동일한) 서열을 가질 수 있다.

[0332] 일부 구현예에서, 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 스페이서는 본원에 추가로 기재된 서열번호 1~36(예를 들어, 서열번호 17, 18, 26 및 27) 중 어느 하나의 서열에 적어도 75% 동일한(적어도 75%, 77%, 79%, 81%, 83%, 85%, 87%, 89%, 91%, 93%, 95%, 97%, 99%, 99.5% 또는 100% 동일한) 서열을 가질 수 있다.

[0333] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "숙주 세포"는 필요한 이의 상응하는 핵산으로부터 단백질을 발현하는 데 필요한 세포 성분, 예를 들어, 세포 기관을 포함하는 비히클(vehicle)을 지칭한다. 핵산은 전형적으로 당업계에 공지된 종래 기술(형질전환, 형질감염, 전기 천공법, 인산칼슘 침전, 직접 미세현미주입(direct microinjection) 등)에 의해 숙주 세포에 도입될 수 있는 핵산 벡터에 포함된다. 숙주 세포는 원핵 세포(예를 들어, 세균 세포) 또는 진핵 세포(예를 들어, CHO 세포와 같은 포유류 세포)일 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 숙주 세포를 사용하여 원하는 도메인을 암호화하는 하나 이상의 폴리펩티드를 발현하며, 이는 이어서 결합하여 원하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 형성할 수 있다.

[0334] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "약학적 조성물"은 유효 성분뿐만 아니라 유효 성분을 투여 방법에 적합하게 만들 수 있는 하나 이상의 부형제 및 희석제를 함유하는 의약 또는 약학 제형을 지칭한다. 본 개시 내용의 약학적 조성물은 Fc-항원 결합 도메인 작제물과 양립 가능한, 약학적으로 허용 가능한 성분을 포함한다. 일반적으로, 약학적 조성물은 정맥내 또는 피하 투여를 위한 수성 형태이다.

[0335] 본원에서 사용된 바와 같이, 폴리펩티드 또는 Fc 작제물의 "실질적으로 균질한 집단"은, 비환원 SDS 겔 전기영동 또는 크기 배제 크로마토그래피로 결정시, 조성물(예를 들어, 세포 배양 배지 또는 약학적 조성물) 내 폴리펩티드 또는 Fc 작제물의 적어도 50%가 동일한 수의 Fc 도메인을 갖는 것이다. 폴리펩티드 또는 Fc 작제물의 실질적으로 균질한 집단은 정제 전에, 또는 단백질 A 또는 단백질 G 정제 후에, 또는 임의의 Fab 또는 Fc-특이적 친화도 크로마토그래피 후에만 수득될 수 있다. 다양한 구현예에서, 조성물에서의 폴리펩티드 또는 Fc 작제물의 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 또는 85%는 동일한 수의 Fc 도메인을 갖는다. 다른 구현예에서, 조성물에서의 폴리펩티드 또는 Fc 작제물의 최대 85%, 90%, 92% 또는 95%는 동일한 수의 Fc 도메인을 갖는다.

[0336] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "약학적으로 허용 가능한 담체"는 약학적 조성물 중의 부형제 또는 희석제를 지칭한다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 제형의 다른 성분과 양립 가능해야 하고 피투여자에게 해롭지 않아야 한다. 본 발명에서, 약학적으로 허용 가능한 담체는 Fc-항원 결합 도메인 작제물에 적절한 약학적 안정성을 제공해야 한다. 담체의 특성은 투여 방식에 따라 다르다. 예를 들어, 경구 투여에서는 고형 담체가 바람직하고, 정맥내 투여에서는 수용액 담체(예를 들어, WFI 및/또는 완충액)가 일반적으로 사용된다.

[0337] 본원에서 사용된 "치료 유효량"은 대상 또는 환자에서 원하는 생물학적 효과를 유도하거나 본원에 기재된 질병 또는 장애를 갖는 환자를 치료하는 데 효과적인 약학적 투여량과 같은 양을 지칭한다. 또한 본원에서 "치료 유효량"은 1회 투여량으로 또는 임의의 용량 또는 경로로 섭취되거나 단독으로 또는 다른 치료제와 병용하여 섭취되어 원하는 치료 효과를 제공하는 양으로 해석될 수 있음이 이해되어야 한다.

[0338] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 단편 및 용어 부분은 상호 교환 가능하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0339] 도 1은 2개의 Fc 도메인 및 CCR4 결합 도메인을 함유하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물(작제물 1)을 도시한다. 각각의 Fc 도메인은 2개의 Fc 도메인 단량체의 이량체이다. Fc 도메인 단량체(106 및 108) 중 2개는 이의 C_H3 항체 불변 도메인에 돌출부를 함유하는 반면, Fc 도메인 단량체(112 및 114)의 다른 2개는 이의 C_H3 항체 불변 도메인에 병렬 위치에 함몰부를 함유한다. 이 작제물은 3개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드로 형성된다. 제1 폴리펩티드(102)는 N-말단 상에 V_H 도메인(110)을 함유하는 CCR4 결합 도메인에 직렬로 스페이서에 의해 연결된 2개의 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(106 및 108)를 함유한다. V_L 함유 도메인(104)은 V_H 도메인에 연결된다. 각각의 제2 및 제3 폴리펩티드(112 및 114)는 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체를 함유한다.

도 2는 3개의 Fc 도메인 및 CCR4 결합 도메인을 함유하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물(작제물 2)을 도시한다. 이 작제물은 4개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드로 형성된다. 제1 폴리펩티드(202)는 N-말단 상에 V_H 도메인(212)을 함유하는 CCR4 결합 도메인에 직렬로 스페이서에 의해 연결된 3개의 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체

(206, 208 및 210)를 함유한다. V_L 함유 도메인(204)은 V_H 도메인에 연결된다. 제2, 제3 및 제4 폴리펩티드(214, 216 및 218) 각각은 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체를 함유한다.

도 3은 2개의 Fc 도메인 및 2개의 CCR4 결합 도메인을 함유하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물(작제물 3)을 도시한다. 이 작제물은 3개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드로 형성된다. 제1 폴리펩티드(302)는 직렬로 스페이서에 의해 연결된 2개의 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(304 및 306)을 함유한다. 제2 및 제3 폴리펩티드(320 및 322) 각각은 N-말단에 V_H 도메인(316 및 318)을 함유하는 CCR4 결합 도메인에 직렬로 연결된 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체(310 및 314)를 함유한다. V_L 함유 도메인(308 및 312)은 각각의 V_H 도메인에 연결된다.

도 4는 3개의 Fc 도메인 및 3개의 CCR4 결합 도메인을 함유하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물(작제물 4)을 도시한다. 이 작제물은 4개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드로 형성된다. 제1 폴리펩티드(402)는 직렬로 스페이서에 의해 연결된 3개의 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(404, 406 및 408)을 함유한다. 제2, 제3 및 제4 폴리펩티드(428, 430 및 432) 각각은 N-말단에 V_H 도메인(422, 416 및 410)을 함유하는 CCR4 결합 도메인에 직렬로 연결된 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체(426, 420 및 414)를 함유한다. V_L 함유 도메인(424, 418 및 412)은 각각의 V_H 도메인에 연결된다.

도 5는 2개의 Fc 도메인 및 3개의 CCR4 결합 도메인을 함유하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물(작제물 5)을 도시한다. 이 작제물은 3개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드로 형성된다. 제1 폴리펩티드(502)는 N-말단 상에 V_H 도메인(510)을 함유하는 CCR4 결합 도메인에 직렬로 스페이서에 의해 연결된 2개의 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(508 및 506)를 함유한다. 제2 및 제3 폴리펩티드(524 및 526) 각각은 N-말단에 V_H 도메인(512 및 518)을 함유하는 CCR4 결합 도메인에 직렬로 연결된 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체(516 및 522)를 함유한다. V_L 함유 도메인(504, 514 및 520)은 각각의 V_H 도메인에 연결된다.

도 6은 3개의 Fc 도메인 및 4개의 CCR4 결합 도메인을 함유하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물(작제물 6)을 도시한다. 이 작제물은 4개의 Fc 단량체 함유 폴리펩티드로 형성된다. 제1 폴리펩티드(602)는 N-말단 상에 V_H 도메인(612)을 함유하는 CCR4 결합 도메인에 직렬로 스페이서에 의해 연결된 3개의 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(606, 608 및 610)를 함유한다. 제2, 제3 및 제4 폴리펩티드(632, 634 및 636) 각각은 N-말단에 V_H 도메인(616, 622 및 628)을 함유하는 CCR4 결합 도메인에 직렬로 연결된 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체(618, 624 및 630)를 함유한다. V_L 함유 도메인(604, 616, 622 및 628)은 각각의 V_H 도메인에 연결된다.

도 7은 3개의 Fc 도메인 및 2개의 CCR4 결합 도메인을 함유하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물(작제물 7)을 도시한다. 본 Fc-항원 결합 도메인 작제물은 2개의 Fc 도메인 단량체(706 및 718)의 이량체를 함유하되, Fc 도메인 단량체 둘 모두는 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 유리한 정전기적 상호작용을 촉진하는 WT 서열과 상이한 하전 아미노산을 이의 C_H3-C_H3 계면에 함유한다. 이 작제물은 4개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드로 형성된다. 2개의 폴리펩티드(702 및 724)는 WT 서열과 다른 하전 아미노산을 C_H3-C_H3 계면에서 함유하는 Fc 도메인 단량체(706 및 718) 및 N-말단 상에 V_H 도메인을 함유하는 CCR4 결합 도메인(712 및 714)에 직렬로 스페이서에 의해 연결된 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(710 및 720)를 포함한다. 제3 및 제4 폴리펩티드(708 및 722)는 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체를 각각 함유한다. V_L 함유 도메인(704 및 716)은 각각의 V_H 도메인에 연결된다.

도 8은 3개의 Fc 도메인 및 2개의 CCR4 결합 도메인을 함유하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물(작제물 8)을 도시한다. 이 작제물은 4개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드로 형성된다. 2개의 폴리펩티드(802 및 828)는 WT 서열과 다른 하전 아미노산을 C_H3-C_H3 계면에서 함유하는 Fc 도메인 단량체(810 및 816)에 직렬로 스페이서에 의해 연결된 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(814 및 820)를 각각 함유한다. 제3 및 제4 폴리펩티드(804 및 826) 각각은 N-말단에 V_H 도메인(812 및 818)을 함유하는 CCR4 결합 도메인에 직렬로 연결된 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체(808 및 824)를 함유한다. V_L 함유 도메인(806 및 822)은 각각의 V_H 도메인에 연결된다.

도 9는 3개의 Fc 도메인 및 4개의 CCR4 결합 도메인을 함유하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물(작제물 9)을 도시한다. 이 작제물은 4개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드로 형성된다. 2개의 폴리펩티드(902 및 936)는 WT 서열과 다른 하전 아미노산을 C_H3-C_H3 계면에서 함유하는 Fc 도메인 단량체(910 및 924) 및 N-말단에 V_H 도메인

을 함유하는 CCR4 결합 도메인(908 및 920)에 직렬로 스페이서에 의해 연결된 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(918 및 928)를 각각 함유한다. 제3 및 제4 폴리펩티드(904 및 934)는 N-말단에 V_H 도메인을 함유하는 CCR4 결합 도메인(912 및 926)에 직렬로 연결된 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체(916 및 932)를 함유한다. V_L 함유 도메인(906, 914, 922 및 930)은 각각의 V_H 도메인에 연결된다.

도 10은 5개의 Fc 도메인 및 2개의 CCR4 결합 도메인을 함유하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물(작제물 10)을 도시한다. 이 작제물은 6개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드로 형성된다. 2개의 폴리펩티드(1002 및 1032)는 다른 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(1014 및 1028), WT 서열과 다른 하전 아미노산을 C_H3-C_H3 계면에서 함유하는 Fc 도메인 단량체(1008 및 1022) 및 N-말단에 V_H 도메인을 함유하는 CCR4 결합 도메인(1006 및 1018)에 직렬로 스페이서에 의해 연결된 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(1016 및 1030)를 함유한다. 제3, 제4, 제5 및 제6 폴리펩티드(1012, 1010, 1026 및 1024)는 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체를 각각 함유한다. V_L 함유 도메인(1004 및 1020)은 각각의 V_H 도메인에 연결된다.

도 11은 5개의 Fc 도메인 및 4개의 CCR4 결합 도메인을 함유하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물(작제물 11)을 도시한다. 이 작제물은 6개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드로 형성된다. 2개의 폴리펩티드(1102 및 1148)는 다른 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(1120 및 1130) 및 WT 서열과 다른 하전 아미노산을 C_H3-C_H3 계면에서 함유하는 Fc 도메인 단량체(1124 및 1126)에 직렬로 스페이서에 의해 연결된 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(1118 및 1132)를 함유한다. 제3, 제4, 제5 및 제6 폴리펩티드(1106, 1104, 1144 및 1146)는 N-말단에 V_H 도메인을 함유하는 CCR4 결합 도메인(1112, 1122, 1138 및 1128)에 직렬로 연결된 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체(1116, 1110, 1134 및 1140)를 각각 함유한다. V_L 함유 도메인(1108, 1114, 1135 및 1142)은 각각의 V_H 도메인에 연결된다.

도 12는 5개의 Fc 도메인 및 6개의 CCR4 결합 도메인을 함유하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물(작제물 12)을 도시한다. 이 작제물은 6개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드로 형성된다. 2개의 폴리펩티드(1202 및 1256)는 다른 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(1226 및 1228), WT 서열과 다른 하전 아미노산을 C_H3-C_H3 계면에서 함유하는 Fc 도메인 단량체(1210 및 1244) 및 N-말단에 V_H 도메인을 함유하는 CCR4 결합 도메인(1250 및 1248)에 직렬로 스페이서에 의해 연결된 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(1224 및 1230)를 함유한다. 제3, 제4, 제5 및 제6 폴리펩티드(1206, 1204, 1254 및 1252)는 N-말단에 V_H 도메인을 함유하는 CCR4 결합 도메인(1218, 1212, 1236 및 1242)에 직렬로 연결된 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체(1222, 1216, 1232 및 1238)를 각각 함유한다. V_L 함유 도메인(1208, 1214, 1220, 1234, 1240 및 1246)은 각각의 V_H 도메인에 연결된다.

도 13은 3개의 Fc 도메인 및 2개의 CCR4 결합 도메인을 함유하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물(작제물 13)을 도시한다. 이 작제물은 4개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드로 형성된다. 2개의 폴리펩티드(1302 및 1324)는 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(1312 및 1316) 및 N-말단에 V_H 도메인을 함유하는 CCR4 항원 결합 도메인(1310 및 1314)에 직렬로 스페이서에 의해 연결된 WT 서열과 다른 하전 아미노산을 C_H3-C_H3 계면에서 함유하는 Fc 도메인 단량체(1308 및 1318)를 함유한다. 제3 및 제4 폴리펩티드(1306 및 1320)는 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체를 각각 함유한다. V_L 함유 도메인(1304 및 1322)은 각각의 V_H 도메인에 연결된다.

도 14는 3개의 Fc 도메인 및 2개의 CCR4 결합 도메인을 함유하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물(작제물 14)을 도시한다. 이 작제물은 4개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드로 형성된다. 2개의 폴리펩티드(1404 및 1426)는 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(1414 및 1418)에 직렬로 스페이서에 의해 연결된 WT 서열과 다른 하전 아미노산을 C_H3-C_H3 계면에서 함유하는 Fc 도메인 단량체(1308 및 1318)를 함유한다. 제3 및 제4 폴리펩티드(1402 및 1428)는 N-말단에 V_H 도메인을 함유하는 CCR4 결합 도메인(1408 및 1416)에 직렬로 연결된 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체(1410 및 1422)를 함유한다. V_L 함유 도메인(1406 및 1424)은 각각의 V_H 도메인에 연결된다.

도 15는 3개의 Fc 도메인 및 4개의 CCR4 결합 도메인을 함유하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물(작제물 15)을 도시한다. 이 작제물은 4개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드로 형성된다. 2개의 폴리펩티드(1502 및 1536)는 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(1518 및 1522) 및 N-말단에 V_H 도메인을 함유하는 CCR4 결합 도메인(1514 및

1532)에 직렬로 스페이서에 의해 연결된 WT 서열과 다른 하전 아미노산을 C_H3-C_H3 계면에서 함유하는 Fc 도메인 단량체(1512 및 1524)를 함유한다. 제3 및 제4 폴리펩티드(1504 및 1534)는 N-말단에 V_H 도메인을 함유하는 CCR4 결합 도메인(1508 및 1530)에 직렬로 연결된 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체(1510 및 1526)를 함유한다. V_L 함유 도메인(1506, 1516, 1520 및 1528)은 각각의 V_H 도메인에 연결된다.

도 16은 5개의 Fc 도메인 및 2개의 CCR4 결합 도메인을 함유하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물(작제물 16)을 도시한다. 이 작제물은 6개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드로 형성된다. 2개의 폴리펩티드(1602 및 1632)는 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(1612 및 1622), 제2 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(1614 및 1620) 및 N-말단에 V_H 도메인을 함유하는 CCR4 결합 도메인(1616 및 1618)에 직렬로 스페이서에 의해 연결된 WT 서열과 다른 하전 아미노산을 C_H3-C_H3 계면에서 함유하는 Fc 도메인 단량체(1610 및 1624)를 함유한다. 제3, 제4, 제5 및 제6 폴리펩티드(1608, 1606, 1626 및 1628)는 함몰부-함유 Fc 도메인을 각각 함유한다. V_L 함유 도메인(1604 및 1630)은 각각의 V_H 도메인에 연결된다.

도 17은 5개의 Fc 도메인 및 4개의 CCR4 결합 도메인을 함유하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물(작제물 17)을 도시한다. 이 작제물은 6개의 Fc 도메인 함유 폴리펩티드로 형성된다. 2개의 폴리펩티드(1702 및 1748)는 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(1720 및 1730) 및 N-말단에 제2 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(1722 및 1728)에 직렬로 스페이서에 의해 연결된 WT 서열과 다른 하전 아미노산을 C_H3-C_H3 계면에서 함유하는 Fc 도메인 단량체(1718 및 1732)를 함유한다. 제3, 제4, 제5 및 제6 폴리펩티드(1706, 1704, 1746 및 1744)는 N-말단에 V_H 도메인을 함유하는 CCR4 결합 도메인(1712, 1724, 1738 및 1726)에 직렬로 연결된 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체(1716, 1710, 1734 및 1740)를 함유한다. V_L 함유 도메인1708, 1714, 1736 및 1742)은 각각의 V_H 도메인에 연결된다.

도 18은 5개의 Fc 도메인 및 6개의 CCR4 결합 도메인을 함유하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물(작제물 18)을 도시한다. 이 작제물은 6개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드로 형성된다. 2개의 폴리펩티드(1802 및 1856)는 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(1820 및 1836), 제2 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(1822 및 1834) 및 N-말단에 V_H 도메인을 함유하는 CCR4 결합 도메인(1826 및 1830)에 직렬로 스페이서에 의해 연결된 WT 서열과 다른 하전 아미노산을 C_H3-C_H3 계면에서 함유하는 Fc 도메인 단량체(1818 및 1838)를 함유한다. 제3, 제4, 제5 및 제6 폴리펩티드(1806, 1804, 1854 및 1852)는 N-말단에 V_H 도메인을 함유하는 CCR4 결합 도메인(1812, 1828, 1844 및 1850)에 직렬로 연결된 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체(1816, 1810, 1840 및 1846)를 각각 함유한다. V_L 함유 도메인(1808, 1814, 1824, 1832, 1842, 및 1848)은 각각의 V_H 도메인에 연결된다.

도 19는 5개의 Fc 도메인 및 2개의 CCR4 결합 도메인을 함유하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물(작제물 19)을 도시한다. 이 작제물은 6개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드로 형성된다. 2개의 폴리펩티드(1902 및 1932)는 WT 서열과 다른 하전 아미노산을 C_H3-C_H3 계면에서 포함하는 Fc 도메인 단량체(1908 및 1926), 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(1916 및 1918) 및 N-말단에 V_H 도메인을 함유하는 CCR4 결합 도메인(1914 및 1920)에 직렬로 스페이서에 의해 연결된 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(1912 및 1930)를 함유한다. 제3 및 제4 폴리펩티드(1910 및 1928는)는 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체를 함유하고, 제5 및 제6 폴리펩티드(1906 및 1924)는 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체를 함유한다. V_L 함유 도메인(1904 및 1922)은 각각의 V_H 도메인에 연결된다.

도 20은 5개의 Fc 도메인 및 4개의 CCR4 결합 도메인을 함유하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물(작제물 20)을 도시한다. 이 작제물은 6개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드로 형성된다. 2개의 폴리펩티드(2002 및 2048)는 WT 서열과 다른 하전 아미노산을 C_H3-C_H3 계면에서 함유하는 Fc 도메인 단량체(2012 및 2030) 및 N-말단에 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(2040 및 2038)에 직렬로 스페이서에 의해 연결된 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(2020 및 2022)를 함유한다. 제3, 제4, 제5 및 제6 폴리펩티드(2006, 2004, 2046 및 2044)는 N-말단에 V_H 도메인을 함유하는 CCR4 결합 도메인(2014, 2042, 2028 및 2036)에 직렬로 연결된 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체(2018. 2010, 2024 및 2032)를 각각 함유한다. V_L 함유 도메인(2008, 2016, 2026 및 2034)은 각각의 V_H 도메인에 연결된다.

도 21은 5개의 Fc 도메인 및 6개의 CCR4 결합 도메인을 함유하는 Fc-항원 결합 도메인 작제물(작제물 21)을 도

시한다. 이 작제물은 6개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드로 형성된다. 2개의 폴리펩티드(2102 및 2156)는 WT 서열과 다른 하전 아미노산을 C_H3-C_H3 계면에서 포함하는 Fc 도메인 단량체(2112 및 2130), 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(2144 및 2142) 및 N-말단에 V_H 도메인을 함유하는 CCR4 결합 도메인(2148 및 2138)에 직렬로 스페이서에 의해 연결된 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(2120 및 2122)를 함유한다. 제3, 제4, 제5 및 제6 폴리펩티드(2106, 2104, 2154 및 2152는 N-말단에 V_H 도메인을 함유하는 CCR4 결합 도메인(2114, 2150, 2128 및 2136)에 직렬로 연결된 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체(2118, 2110, 2124 및 2132)를 각각 함유한다. V_L 함유 도메인(2108, 2116, 2126, 2134, 2140 및 2146)은 각각의 V_H 도메인에 연결된다.

도 22는 B 세포를 표적으로 하는 다양한 항-CD20 작제물을 사용한 CDC, ADCP 및 ADCC 분석의 결과를 보여주는 3개의 그래프이다. 첫 번째 그래프는 S3Y Fc-항원 결합 도메인 작제물이 CDC를 매개할 수 있음을 보여준다. 중간 그래프는 SAI 및 S3Y Fc-항원 결합 도메인 작제물 둘 모두가 ADCP FcγRIIa 리포터 분석에서 100 배 초과의 강화된 효능을 나타냄을 보여준다. 세 번째 그래프는 SAI 및 S3Y Fc-항원 결합 도메인 작제물이 푸코실화 mAb에 비해 강화된 ADCC 활성을 탈푸코실화 mAb와 유사한 활성을 나타냄을 보여준다.

도 23a 내지 도 23c는 CCR4 결합 도메인이 Fc 작제물의 Fc 도메인에 연결될 수 있는 3개의 예시적인 방법의 개략도이다. 패널 A는 CCR4 결합 도메인의 중쇄 성분은 Fc 사슬의 융합 단백질로 발현될 수 있고, 경쇄 성분은 별도의 폴리펩티드로 발현될 수 있음을 보여준다. 패널 B는 Fc 장쇄의 융합 단백질로 발현된 scFv를 보여준다. 패널 C는 별도로 발현되고 외적으로 첨가되어, 화학 결합으로 Fc-항원 결합 도메인 작제물에 연결되는 중쇄 및 경쇄 성분을 보여준다.

도 24a는 인간 IgG1의 아미노산 서열(서열 번호 43)을 EU 넘버링과 함께 도시한다. 힌지 영역은 이중 밑줄이 표시되어 있고, CH2 도메인은 밑줄이 표시되어 있지 않고, CH3 영역은 밑줄이 표시되어 있다.

도 24b는 인간 IgG1의 아미노산 서열(서열 번호 45)을 EU 넘버링과 함께 도시한다. E216에서 C220까지가 없는 힌지 영역은 이중 밑줄이 표시되어 있고, CH2 도메인은 밑줄이 표시되어 있지 않고, CH3 영역은 밑줄이 표시되어 있고 K447이 없다.

도 24c는 인간 IgG1의 아미노산 서열(서열 번호 47)을 EU 넘버링과 함께 도시한다. 힌지 영역은 이중 밑줄이 표시되어 있고, CH2 도메인은 밑줄이 표시되어 있지 않고, CH3 영역은 밑줄이 표시되어 있고 447K가 없다.

도 24d는 인간 IgG1의 아미노산 서열(서열 번호 42)을 EU 넘버링과 함께 도시한다. E216에서 C220까지가 없는 힌지 영역은 이중 밑줄이 표시되어 있고, CH2 도메인은 밑줄이 표시되어 있지 않고, CH3 영역은 밑줄이 표시되어 있다.

도 25는 항-CCR4 작제물을 사용한 ADCC 분석의 결과를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0340] 많은 치료 항체는 항체 의존성 세포독성(ADCC), 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP), 및 보체 의존성 세포독성(CDC)과 같은 Fc 도메인의 효과기 기능을 통해 선천적 면역계의 요소를 보충함으로써 작용한다. 일부 경우에, 본 발명은 고유 생물학적 활성을 갖는 신규 치료 작제물을 생성하기 위해 치료제, 예를 들어, 공지의 치료 항체를 함유하는 공지의 단일 Fc 도메인의 CCR4 결합 도메인을 적어도 2개의 Fc 도메인과 조합하는 것을 고려한다. 일부 경우에, 본원에 개시된 신규 치료제는 공지의 Fc-도메인 함유 치료제, 예를 들어, 공지의 치료 항체보다 큰 생물학적 활성을 갖는다. 적어도 2개의 Fc 도메인의 존재는 효과기 기능을 강화하고, ADCP 및/또는 CDC와 조합된 ADCC와 같은 다중 효과기 기능을 활성화하여, 치료 분자의 효능을 증가시킬 수 있다. 일관된 생물학적 기능을 갖는 생성물을 생성하기 위해, Fc 도메인의 수를 제어하는 것이 중요하다. 본 발명은 제한된 수의 폴리펩티드 사슬로부터 별개의 크기의 분자를 조립하기 위해, Fc 도메인을 암호화하는 펩티드의 동종이량체화 및 이종이량체화를 제어하기 위한 Fc 유전자 조작 수단의 세트를 특징으로 한다. 국제 공개 번호 WO/2015/168643호, WO2017/151971호, WO 2017/205436호 및 WO 2017/205434호는 2개 이상의 Fc 도메인을 조립하기 위한 Fc 유전자 조작 수단 및 방법을 개시하며, 이는 전문이 본원에 참조로 포함된다. 유전자 조작 수단은 제조 결과를 상당히 개선시키는 구조적 특징(예를 들어, 글리신 링커)을 포함한다. 이들 작제물의 특성은 실질적으로 균질한 약학적 조성물의 효율적인 생성을 가능하게 한다. 약학적 조성물에서의 이러한 균질성은 약학적 조성물의 안전성, 효능, 균일성 및 신뢰성을 보장하기 위해 바람직하다. 약학적 조성물에서의 이러한 균질성의 정도가 높으면 또한 원치 않는 물질(예컨대, 분해 산물 및/또는 응집 산물 또는 다량체)에 의해 야기되는 약학적 생성물의 잠재

적인 응집 또는 분해를 최소화할 뿐만 아니라 원치 않는 물질에 의해 야기되는 비표적 및 부작용을 제한한다.

[0341] 본원에 자세히 기재된 바와 같이, 2개의 Fc 도메인 단량체를 직렬로 연결하기 위한 글리신 잔기만을 포함하는 스페이서의 사용, 말단 라이신 잔기가 제거된 갖는 폴리펩티드 서열의 사용 및 이종이량체화 선택성 모듈:(i) 상이한 역전하 돌연변이를 갖는 이종이량체화 선택성 모듈 및 (ii) 유전자 조작 함몰부 및 돌출부를 갖는 이종이량체화 선택성 모듈의 두 세트의 사용을 포함하는 접근법을 사용하여 Fc-항원 결합 도메인 작제물의 Fc 도메인 성분을 유전자 조작하여 조성물의 균질성이 개선되었다.

[0342] 링커에 의해 분리된 다수의 Fc 서열을 함유하는 하나의 긴 펩티드 사슬과 단일 Fc 서열을 함유하는 단쇄의 다수의 카피(Fc-항원 결합 도메인 작제물 1~6; 도 1~도 6)를 사용하여, Fc 도메인이 직렬로 연결된 일련의 Fc-항원 결합 도메인 작제물이 설계되었다. 더 작거나 더 큰 복합체를 최소로 형성하면서, 조립을 원하는 직렬 구성으로 보장하기 위해 이종이량체화 돌연변이를 각각의 Fc 서열에 도입하였다. 임의의 수의 Fc 도메인이 이러한 방식으로 직렬로 연결되어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 Fc 도메인을 갖는 작제물을 생성할 수 있다. N Fc 도메인을 갖는 펩티드의 경우, 이러한 작제물은 CCR4 결합 도메인이 각각 긴 펩티드 사슬, 짧은 펩티드 사슬, 또는 둘 모두에 도입되는지 여부에 따라 1 내지 N+1개의 CCR4 결합 도메인을 사용하여 제조될 수 있다.

[0343] Fc-항원 결합 도메인 작제물 1~6(도 1~도 6)에서, Fc 도메인은 Fc 도메인 사이에 단일 분지점으로 연결되었다. 이러한 작제물은 링커에 의해 분리된 다수의 Fc 서열을 함유하는 긴 펩티드 사슬의 2개의 카피를 포함하며, 여기서 분지형 Fc 서열은 동종이량체화 돌연변이를 함유하고, 비분지형 Fc 도메인은 이종이량체화 돌연변이를 함유한다. 장쇄에서 이종이량체화 돌연변이에 상보적인 돌연변이를 갖는 단일 Fc 서열을 포함하는 단쇄의 다수의 카피를 사용하여 다량체 Fc 스캐폴드를 완성한다. 이종이량체화 Fc 도메인은 분지형 Fc 도메인의 C-말단(예를 들어, Fc-항원 결합 도메인 작제물 7~12; 도 7~도 12), N-말단(예를 들어, Fc-항원 결합 도메인 작제물 13~18; 도 13~도 18) 또는 양 말단(예를 들어, Fc-항원 결합 도메인 작제물 19~21; 도 19~도 21)에 연결될 수 있다. 직렬로 다수의 Fc 도메인은 분지형 Fc 도메인의 어느 하나의 말단에 연결될 수 있다. CCR4 결합 도메인은 긴 펩티드 사슬에 도입되어, 조립된 단백질 분자 당 2개의 CCR4 결합 도메인을 생성할 수 있다. 대안적으로, CCR4 결합 도메인은 짧은 펩티드 사슬에 도입되어, 조립된 단백질 분자 당 N-1개의 CCR4 결합 도메인을 생성할 수 있으며, 여기서 N은 조립된 단백질 분자 내의 Fc 도메인의 수이다. CCR4 결합 도메인이 짧은 펩티드 사슬 및 긴 펩티드 사슬 모두에 도입되면, 생성된 조립된 단백질 분자는 N+1개의 CCR4 결합 도메인을 함유한다.

[0344] 단일클론 항체(mAbs) 및 Fc 도메인을 위한 과거의 유전자 조작 노력에는 FcγRIIIa에 대한 결합을 강화하고, 이에 따라 항체 의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 반응을 강화하기 위해 Fc 도메인에서 돌연변이를 만드는 것, 및 FcγRIIIa에 대한 결합을 강화하고, 이에 따라 ADCC 반응을 강화하는 Fc 도메인의 탈푸코실화가 포함되었다.

[0345] FcγRIIIa에 대한 결합 또는 Fc 도메인의 탈푸코실화를 강화하기 위해 Fc 도메인 내에 돌연변이를 갖는 항체와 비교하여, 본 개시 내용에 개시된 Fc-항원 결합 도메인 작제물은 예기치 않게 Fcγ 수용체의 여러 부류에 대한 더 강한 결합 및 다중 세포독성 경로의 강화된 활성을 특징으로 한다. 본 발명의 Fc-항원 결합 도메인 작제물은 이들의 상응하는 푸코실화 및 탈푸코실화 모 단일클론 항체와 비교하여 FcγRIIa 및 FcγRIIIa 둘 모두에 대한 결합을 강화할 수 있다(실시예 46 참조). 추가로, 본 발명의 Fc-항원 결합 도메인 작제물은 예기치 않게 ADCC 경로 반응을 강화하는 것 외에도 보체 의존성 세포독성(CDC) 경로 및/또는 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP) 경로를 매개하는 능력을 특징으로 한다(실시예 47 참조).

[0346] **I. Fc 도메인 단량체**

[0347] Fc 도메인 단량체는 힌지 도메인, CH_2 항체 불변 도메인 및 CH_3 항체 불변 도메인(예를 들어, 임의의 아미노산 치환을 갖는 인간 IgG1 힌지, CH_2 항체 불변 도메인 및 CH_3 항체 불변 도메인)의 적어도 일부를 포함한다. Fc 도메인 단량체는 면역글로불린 항체 동형 IgG, IgE, IgM, IgA 또는 IgD일 수 있다. Fc 도메인 단량체는 또한 임의의 면역글로불린 항체 동형(예를 들어, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 또는 IgG4)일 수 있다. 또한, Fc 도메인 단량체는, 예를 들어 IgG1로부터의 힌지 및 CH_2를 갖거나, IgA로부터의 CH_3를 갖거나, IgG1로부터의 힌지 및 CH_2를 갖지만 IgG3로부터의 CH_3를 갖는 혼성체일 수 있다. Fc 도메인 단량체의 이량체는 백혈구의 표면에 위치한 수용체인 Fc 수용체, 예를 들어, FcγRIIIa에 결합할 수 있는 (본원에서 추가로 정의된) Fc 도메인이다. 본 명세서에서, Fc 도메인 단량체의 CH_3 항체 불변 도메인은 서로의 회합을 촉진하기 위해 CH_3-CH_3 항체 불변 도메인의 계면에 아미노산 치환을 함유할 수 있다. 다른 구현예에서, Fc 도메인 단량체는 N-말단 또는 C-말단에 부착된 추가 모이어티, 예를 들어, 알부민-결합 펩티드 또는 정제 펩티드를 포함한다. 본 명세서에서, Fc 도메인 단량체

는 임의의 유형의 항체 가변 영역, 예를 들어, V_H, V_L, 상보성 결정 영역(CDR) 또는 초가변 영역(HVR)을 함유하지 않는다.

[0348] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 Fc-항원 결합 도메인 작제물 내의 Fc 도메인 단량체(예를 들어, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc-항원 결합 도메인 작제물)는 서열번호 42의 서열에 적어도 95% 동일한(예를 들어, 적어도 97%, 99% 또는 99.5% 동일한) 서열을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 Fc-항원 결합 도메인 내의 Fc 도메인 단량체(예를 들어, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc-항원 결합 도메인 작제물)는 서열번호 44, 46, 48 및 50~53 중 어느 하나의 서열에 적어도 95% 동일한(예를 들어, 적어도 97%, 99% 또는 99.5% 동일한) 서열을 가질 수 있다. 특정 구현예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물 내의 Fc 도메인 단량체는 서열번호 48, 52, 및 53 중 어느 하나의 서열과 적어도 95% 동일한 (적어도 97%, 99% 또는 99.5% 동일한) 서열을 가질 수 있다.

[0349] 서열 번호 42

[0350] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0351] 서열 번호 44

[0352] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0353] 서열 번호 46

[0354] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0355] 서열 번호 48

[0356] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0357] 서열 번호 50

[0358] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0359] 서열 번호 51

[0360] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0361] 서열 번호 52

[0362] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0363] 서열 번호 53

[0364] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0365] **II. Fc 도메인**

[0366] 본원에 정의된 바와 같이, Fc 도메인은 CH_3 항체 불변 도메인 사이의 상호작용으로 이량체화된 2개의 Fc 도메인 단량체를 포함한다. Fc 도메인은 Fc 수용체, 예를 들어, Fc-감마 수용체(즉, Fcγ 수용체(FcγR)), Fc-알파 수용체(즉, Fcα 수용체(FcαR)), Fc-엡실론 수용체(즉, Fcε 수용체 (FcεR)) 및/또는 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 결합하는 최소 구조를 형성한다. 일부 구현예에서, 본 개시 내용의 Fc 도메인은 Fcγ 수용체(예를 들어, FcγRI(CD64), FcγRIIa(CD32), FcγRIIb(CD32), FcγRIIIa(CD16a), FcγRIIIb(CD16b)) 및/또는 FcγRIV 및/또는 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 결합한다.

[0367] **III. CCR4 결합 도메인**

[0368] 항원 결합 도메인은 표적 분자에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함한다. CCR4 결합 도메인은 항체의 CCR4 결합 도메인을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 항체의 단편 또는 항체-작제물, 예를 들어, 표적 항원에 결합하는 항체의 최소 부분일 수 있다. 또한, CCR4 결합 도메인은 피브로넥틴 기반 결합 단백질(예를 들어, FN3 모노바디)과 같은 표적에 특이적으로 결합하는 합성 유전자 조작 펩티드일 수 있다.

[0369] 단편 항원-결합(Fab) 단편은 표적 항원에 결합하는 항체 상의 영역이다. 이는 중쇄 및 경쇄 각각의 하나의 불변 도메인 및 하나의 가변 도메인을 구성한다. Fab 단편은 V_H, V_L, C_H1 및 C_L 도메인을 포함한다. 가변 도메인 V_H 및 V_L은 각각 단량체의 아미노 말단에 3개의 상보성 결정 영역(CDR)의 세트를 함유한다. Fab 단편은 면역글로불린 항체 동형 IgG, IgE, IgM, IgA 또는 IgD일 수 있다. 또한, Fab 단편 단량체는 임의의 면역글로불린 항체 동형(예를 들어, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 또는 IgG4)일 수 있다. 일부 구현예에서, Fab 단편은 프로테아제 처리(예를 들어, 펩신) 후에 면역글로불린의 제2 동일 Fab 단편에 공유 결합으로 부착되어 $F(ab')_2$ 단편을 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, Fab는, 예를 들어, 도메인 사이의 링커와 융합된 가변 및 불변 도메인 모두를 포함하는 단일 폴리펩티드로 발현될 수 있다.

[0370] 일부 구현예에서, Fab 단편의 일부만이 CCR4 결합 도메인으로 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, Fab의 경쇄 성분(V_L + C_L)만이 사용될 수 있거나, Fab의 중쇄 성분(V_H + C_H)만이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, Fab 가변 영역의 V_H 및 V_L 사슬의 융합 단백질인 단일-사슬 가변 단편(scFv)이 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 직렬 Fd 세그먼트 쌍(V_H-C_H1-V_H-C_H1)을 포함하고, 상보적 경쇄 폴리펩티드와 함께 CCR4 결합 영역 쌍을 형성하는 선형 항체가 사용될 수 있다.

[0371] 일부 구현예에서, 본 발명의 CCR4 결합 도메인은 표 1에 열거된 표적 또는 항원에 대해, 열거된 표적 또는 항원에 대한 표 1에 열거된 CDR 서열 중 1, 2, 3, 4, 5개 또는 6개 모두를 포함하며, 이는 하기 표 1에 추가로 상세히 제공된다.

표 1

[0372]

CDR 서열						
항체명	**CDR1-IMGT (중쇄)**	**CDR2-IMGT (중쇄)**	**CDR3-IMGT (중쇄)**	**CDR1-IMGT (경쇄)**	**CDR2-IMGT (경쇄)**	**CDR3-IMGT (경쇄)**
모가물리주맙	GFIFSNYG (SEQ ID NO: xxx)	ISSASTYS (SEQ ID NO: xxx)	GRHSDGNFAFGY (SEQ ID NO: xxx)	RNIVHINGDTY (SEQ ID NO: xxx)	KVS	FQGSLLPWT (SEQ ID NO: xxx)

표 2

[0373]

VH 및 VL 서열		
항체명	**VH**	**VL**
모가물리주맙		

[0374] Fc-항원 결합 도메인 작제물 1의 CCR4 결합 도메인(도 1의 110/104)은 표 1에 열거된 항체 중 어느 하나의 3개

의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0375] Fc-항원 결합 도메인 작제물 2의 CCR4 결합 도메인(도 2의 212/204)은 표 1에 열거된 항체 중 어느 하나의 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0376] Fc-항원 결합 도메인 작제물 3의 CCR4 결합 도메인(도 3의 308/316 및 312/318) 각각은 표 1에 열거된 항체 중 어느 하나의 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0377] Fc-항원 결합 도메인 작제물 4의 CCR4 결합 도메인(도 4의 410/412, 416/418 및 422/424) 각각은 표 1에 열거된 항체 중 어느 하나의 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0378] Fc-항원 결합 도메인 작제물 5의 CCR4 결합 도메인(도 5의 510/504, 512/514 및 518/520) 각각은 표 1에 열거된 항체 중 어느 하나의 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0379] Fc-항원 결합 도메인 작제물 6의 CCR4 결합 도메인(도 6의 612/604, 614/616, 620/622 및 626/628) 각각은 표 1에 열거된 항체 중 어느 하나의 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0380] Fc-항원 결합 도메인 작제물 7의 CCR4 결합 도메인(도 7의 712/714 및 714/716) 각각은 표 1에 열거된 항체 중 어느 하나의 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0381] Fc-항원 결합 도메인 작제물 8의 CCR4 결합 도메인(도 8의 812/806 및 818/822) 각각은 표 1에 열거된 항체 중 어느 하나의 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0382] Fc-항원 결합 도메인 작제물 9의 CCR4 결합 도메인(도 9의 908/906, 920/922, 912/914 및 926/930) 각각은 표 1에 열거된 항체 중 어느 하나의 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0383] Fc-항원 결합 도메인 작제물 10의 CCR4 결합 도메인(도 10의 1006/1004 및 1018/1020) 각각은 표 1에 열거된 항체 중 어느 하나의 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0384] Fc-항원 결합 도메인 작제물 11의 CCR4 결합 도메인(도 11의 1112/1114, 1122/1108, 1128/1142 및 1138/1136) 각각은 표 1에 열거된 항체 중 어느 하나의 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0385] Fc-항원 결합 도메인 작제물 12의 CCR4 결합 도메인(도 12의 1218/1220, 1212/1214, 1250/1208, 1248/1246, 1242/1240 및 1236/1234) 각각은 표 1에 열거된 항체 중 어느 하나의 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0386] Fc-항원 결합 도메인 작제물 13의 CCR4 결합 도메인(도 13의 1310/1304 및 1314/1322) 각각은 표 1에 열거된 항체 중 어느 하나의 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0387] Fc-항원 결합 도메인 작제물 14의 CCR4 결합 도메인(도 14의 1408/1406 및 1416/1424) 각각은 표 1에 열거된 항체 중 어느 하나의 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0388] Fc-항원 결합 도메인 작제물 15의 CCR4 결합 도메인(도 15의 1508/1506, 1514/1516, 1532/1520 및 1530/1528) 각각은 표 1에 열거된 항체 중 어느 하나의 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0389] Fc-항원 결합 도메인 작제물 16의 CCR4 결합 도메인(도 16의 1616/1604 및 1618/1630) 각각은 표 1에 열거된 항체 중 어느 하나의 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0390] Fc-항원 결합 도메인 작제물 17의 CCR4 결합 도메인(도 17의 1712/1714, 1724/1708, 1726/1742 및 1738/1736) 각각은 표 1에 열거된 항체 중 어느 하나의 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0391] Fc-항원 결합 도메인 작제물 18의 CCR4 결합 도메인(도 18의 1812/1814, 1828/1808, 1826/1824, 1830/1832, 1850/1848 및 1844/1842) 각각은 표 1에 열거된 항체 중 어느 하나의 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0392] Fc-항원 결합 도메인 작제물 19의 CCR4 결합 도메인(도 19의 1914/1904 및 1920/1922) 각각은 표 1에 열거된 항체 중 어느 하나의 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0393] Fc-항원 결합 도메인 작제물 20의 CCR4 결합 도메인(도 20의 2014/2016, 2042/2008, 2036/2034 및 2028/2026) 각각은 표 1에 열거된 항체 중 어느 하나의 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0394] Fc-항원 결합 도메인 작제물 21의 CCR4 결합 도메인(도 21의 2114/2116, 2150/2108, 2148/2146, 2138/2140,

2136/2134 및 2128/2126) 각각은 표 1에 열거된 항체 중 어느 하나의 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0395] **IV. 이량체화 선택성 모듈**

[0396] 본 개시 내용에서, 이량체화 선택성 모듈은 Fc 도메인을 형성하는 2개의 Fc 도메인 단량체의 선호되는 페어링을 용이하게 하는 Fc 도메인 단량체 내의 성분 또는 선택 아미노산을 포함한다. 구체적으로, 이량체화 선택성 모듈은 2개의 Fc 도메인 단량체의 상호작용하는 CH_3 항체 불변 도메인의 계면에 위치된 아미노산 치환을 포함하는 Fc 도메인 단량체의 CH_3 항체 불변 도메인 쌍의 일부이다. 이량체화 선택성 모듈에서, 아미노산 치환은 이들 치환을 위해 선택된 아미노산의 양립성의 결과로서 2개의 CH_3 항체 불변 도메인의 단량체화를 유리하게 한다. 선호되는 Fc 도메인의 최종 형성은 이량체화 선택성 모듈이 결여되거나 이량체화 선택성 모듈 내의 비양립성 아미노산 치환을 갖는 Fc 도메인 단량체로부터 형성되는 다른 Fc 도메인에 대해 선택적이다. 이러한 유형의 아미노산 치환은 QuikChange® 돌연변이 유발과 같이 당업계에 잘 알려진 통상적인 분자 클로닝 기술을 사용하여 이루어질 수 있다.

[0397] 일부 구현예에서, 이량체화 선택성 모듈은 CH_3 항체 불변 도메인의 (본원에서 추가로 기재된 "홀"의) 유전자 조작 함몰부를 포함한다. 다른 구현예에서, 이량체화 선택성 모듈은 CH_3 항체 불변 도메인의 (본원에서 추가로 기재된 "노브"의) 유전자 조작 돌출부를 포함한다. Fc 도메인을 선택적으로 형성하기 위해, 양립성 이량체화 선택성 모듈을 갖는 2개의 Fc 도메인 단량체, 예컨대, 유전자 조작 함몰부를 함유하는 하나의 CH_3 항체 불변 도메인 및 유전자 조작 돌출부를 함유하는 다른 하나의 CH_3 항체 불변 도메인은 결합하여 Fc 도메인 단량체의 돌출부-함몰부(또는 "노브 및 홀") 쌍을 형성한다. 유전자 조작 돌출부 및 유전자 조작 함몰부는 양립성 이종이량체화 선택성 모듈을 갖는 2개의 Fc 도메인 단량체의 유리한 이종이량체화를 촉진하기 위해 Fc 도메인 단량체의 CH_3 항체 불변 도메인에서 이루어질 수 있는 이종이량체화 선택성 모듈의 예이다. 적합한 돌연변이가 표 3에 열거된다.

[0398] 다른 구현예에서, 양전하 아미노산 치환을 함유하는 이량체화 선택성 모듈을 갖는 Fc 도메인 단량체 및 음전하 아미노산 치환을 함유하는 이량체화 선택성 모듈을 갖는 Fc 도메인 단량체는 (본원에서 추가로 기재된) 하전 아미노산의 유리한 정전기 스티어링을 통해 선택적으로 결합하여 Fc 도메인을 형성할 수 있으며, 상기 Fc 도메인 단량체를 사용하여 이량체화가 달성된다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체는 다음의 양전하 및 음전하 아미노산 치환 중 하나를 포함할 수 있다: K392D, K392E, D399K, K409D, K409E, K439D 및 K439E. 일 실시예에서, 양전하 아미노산 치환, 예를 들어, D356K 또는 E357K를 함유하는 Fc 도메인 단량체와 음전하 아미노산 치환, 예를 들어, K370D 또는 K370E를 함유하는 Fc 도메인 단량체는 하전 아미노산의 유리한 정전기 스티어링을 통해 선택적으로 결합하여 Fc 도메인을 형성할 수 있다. 또 다른 실시예에서, E357K를 함유하는 Fc 도메인 단량체와 K370D를 함유하는 Fc 도메인 단량체는 하전 아미노산의 유리한 정전기 스티어링을 통해 선택적으로 결합하여 Fc 도메인을 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, 역전하 아미노산 치환은 이종이량체화 선택성 모듈로 사용될 수 있는데, 상이하지만 양립성인 역전하 아미노산 치환을 함유하는 2개의 Fc 도메인 단량체는 결합하여 이종이량체 Fc 도메인을 형성한다. 이종이량체화를 촉진하기 위한 다양한 역전하 이량체화 선택성 모듈이 표 3에 열거된다.

[0399] 노브 앤드 홀 돌연변이 및 정전기 스티어링 돌연변이 외에, 이종이량체화를 촉진하기 위해 사용될 수 있는 추가의 유형의 돌연변이가 존재한다. 이러한 돌연변이가 또한 표 3에 열거된다.

[0400] 다른 구현예에서, 2개의 Fc 도메인 단량체는 CH_3 도메인 사이의 계면에서 하전된 잔기의 고리 내의 적어도 2개의 위치에 동일한 역전하 돌연변이를 함유하는 동종이량체화 선택성 모듈을 포함한다. 동종이량체화 선택성 모듈은 Fc 도메인 단량체의 동종이량체화를 촉진하여 동종이량체 Fc 도메인을 형성하는 역전하 아미노산 치환이다. 2개의 Fc 도메인 단량체 잔기의 둘 이상의 상보적인 쌍의 두 구성원의 전하를 서로 바꿈으로써, 돌연변이된 Fc 도메인 단량체는 동일한 돌연변이 서열의 Fc 도메인 단량체에 상보적으로 남아있지만, 이들 돌연변이가 없는 Fc 도메인 단량체에 더 낮은 상보성을 갖는다. 일 구현예에서, Fc 도메인은 이중 돌연변이 K409D/D399K, K392D/D399K, E357K/K370E, D356K/K439D, K409E/D399K, K392E/D399K, E357K/K370D 또는 D356K/K439E를 포함하는 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 또 다른 구현예에서, Fc 도메인은 임의의 쌍의 이중 돌연변이, 예를 들어 K409D/D399K/E357K/K370E를 결합하는 4중 돌연변이를 포함하는 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 동종이량체화를 촉진하는 다양한 선택성 모듈이 표 4A 및 표 4B에 열거된다.

[0401] 추가의 구현예에서, (i) 적어도 하나의 역전하 돌연변이 및 (ii) 적어도 하나의 유전자 조작 함몰부 또는 적어도 하나의 유전자 조작 돌출부를 함유하는 Fc 도메인 단량체는 (i) 적어도 하나의 역전하 돌연변이 및 (ii) 적어도 하나의 유전자 조작 돌출부 또는 적어도 하나의 유전자 조작 함몰부를 함유하는 또 다른 Fc 도메인 단량체와 선택적으로 결합하여 Fc 도메인을 형성할 수 있다. 예를 들어, 역전하 돌연변이 K370D 및 유전자 조작 함몰부 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V를 함유하는 Fc 도메인 단량체와 역전하 돌연변이 E357K 및 유전자 조작 돌출부 S354C 및 T366W를 함유하는 또 다른 Fc 도메인 단량체는 선택적으로 결합하여 Fc 도메인을 형성할 수 있다.

[0402] 이러한 Fc 도메인의 형성은 CH_3 항체 불변 도메인의 양립성 아미노산 치환에 의해 촉진된다. 비양립성 아미노산 치환을 함유하는 2개의 이량체화 선택성 모듈, 예를 들어, 둘 모두가 CH_3-CH_3 계면에서 유전자 조작 함몰부를 함유하는 것, 둘 모두가 유전자 조작 돌출부를 함유하는 것, 또는 둘 모두가 동일한 하전 아미노산을 함유하는 것은 이종이량체 Fc 도메인의 형성을 촉진하지 않을 것이다.

[0403] 또한, 정의된 Fc 도메인 단량체를 갖는 Fc 도메인의 형성을 촉진하는 데 사용된 다른 방법은 류신 지퍼의 단량체 α-나선을 Fc 도메인 단량체 각각에 C-말단 융합하여 이종이량체의 형성을 가능하게 하는 LUZ-Y 접근법(미국 특허 출원 공개 제WO2011034605호)뿐 아니라, 각각이 IgA 및 IgG CH_3 서열의 교차하는 세그먼트를 포함하는 이종이량체 Fc 도메인 단량체를 갖는 Fc 도메인을 생성하는 SEED(strand-exchange engineered domain) 바디 접근법(문헌[Davis et al., *Protein Eng Des Sel*. 23:195-202, 2010])을 제한 없이 포함한다.

[0404] **V. 유전자 조작 함몰부 및 유전자 조작 돌출부**

[0405] 유전자 조작 함몰부 및 유전자 조작 돌출부(또는 "노브-홀" 전략)는 Carter 및 동료 연구자들에 의해 설명된다(문헌[Ridgway et al., *Protein Eng.* 9:617-612, 1996]; 문헌[Atwell et al., *J Mol Biol.* 270:26-35, 1997]; 문헌[Merchant et al., *Nat Biotechnol.* 16:677-681, 1998]). 노브-홀의 상호작용은 이종이량체 형성을 유리하게 하는 반면, 노브-노브 및 홀-홀 상호작용은 입체적 충돌 및 유리한 상호작용의 결실로 인해 동종이량체 형성을 저해한다. "노브-홀" 기술은 미국 특허 번호 제5,731,168호에도 개시되어 있다.

[0406] 본 개시 내용에서, 유전자 조작 함몰부 및 유전자 조작 돌출부는 본원에 기재된 Fc-항원 결합 도메인 작제물의 제조에 사용된다. 유전자 조작 함몰부는 단백질의 원래의 아미노산이 측쇄 부피가 더 작은 상이한 아미노산으로 대체될 때 생성되는 빈 공간이다. 유전자 조작 돌출부는 단백질의 원래의 아미노산이 측쇄 부피가 더 큰 상이한 아미노산으로 대체될 때 생성되는 돌출이다. 구체적으로, 대체된 아미노산은 Fc 도메인 단량체의 CH_3 항체 불변 도메인에 있고 2개의 Fc 도메인 단량체의 이량체화에 관여한다. 일부 구현예에서, 하나의 CH_3 항체 불변 도메인의 유전자 조작 함몰부는 또 다른 CH_3 항체 불변 도메인의 유전자 조작 돌출부를 수용하도록 생성되어, CH_3 항체 불변 도메인 둘 모두는 2개의 Fc 도메인 단량체의 이량체화를 촉진하거나 유리하게 하는 (상술한) 이량체화 선택성 모듈(예컨대, 이종이량체화 선택성 모듈)로서 작용한다. 다른 구현예에서, 하나의 CH_3 항체 불변 도메인의 유전자 조작 함몰부는 또 다른 CH_3 항체 불변 도메인의 원래의 아미노산을 더 잘 수용하도록 생성된다. 또 다른 구현예에서, 하나의 CH_3 항체 불변 도메인의 유전자 조작 돌출부는 또 다른 CH_3 항체 불변 도메인의 원래의 아미노산과 추가 상호작용을 형성하도록 생성된다.

[0407] 유전자 조작 함몰부는 타이로신 또는 트립토판과 같은 더 큰 측쇄를 함유하는 아미노산을 알라닌, 발린 또는 트레오닌과 같은 더 작은 측쇄를 함유하는 아미노산으로 대체함으로써 구성될 수 있다. 구체적으로, (상기에 추가로 기재된) 일부 이량체화 선택성 모듈(예컨대, 이종이량체화 선택성 모듈)은 CH_3 항체 불변 도메인에 Y407V 돌연변이와 같은 유전자 조작 함몰부를 함유한다. 유사하게, 유전자 조작 돌출부는 더 작은 측쇄를 함유하는 아미노산을 더 큰 측쇄를 함유하는 아미노산으로 대체함으로써 구성될 수 있다. 구체적으로, (상기에 추가로 기술된) 일부 이량체화 선택성 모듈(예컨대, 이종이량체화 선택성 모듈)은 CH_3 항체 불변 도메인에 T366W 돌연변이와 같은 유전자 조작 돌출부를 함유한다. 본 개시 내용에서, 유전자 조작 함몰부 및 유전자 조작 돌출부는 또한 이종이량체 형성을 강화하기 위해 CH_3 도메인 사이의 이황화 결합 유전자 조작과 결합된다. 일 실시예에서, 유전자 조작 함몰부 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V를 함유하는 Fc 도메인 단량체는 유전자 조작 돌출부 S354C 및 T366W를 함유하는 또 다른 Fc 도메인 단량체와 선택적으로 결합하여 Fc 도메인을 형성할 수 있다. 또 다른 실시예에서, Y349C가 첨가된 유전자 조작 함몰부를 함유하는 Fc 도메인 단량체와 S354C가 첨가된 유전자 조작 돌출부를 함유하는 Fc 도메인 단량체는 선택적으로 결합하여 Fc 도메인을 형성할 수 있다. 다른 유전자 조작 함몰부 및 유전자 조작 돌출부, 이황화 결합 유전자 조작 또는 구조 계산(혼합 HA-TF)과 함께 표 3에 제한 없이

포함된다.

[0408] 상이한 아미노산 잔기를 갖는 CH_3 항체 불변 도메인의 원래의 아미노산 잔기를 대체하는 것은 원래의 아미노산 잔기를 암호화하는 핵산을 변경함으로써 달성될 수 있다. 대체될 수 있는 원래의 아미노산 잔기 수의 상한은 계면에서의 충분한 상호작용이 여전히 유지되는 한, CH_3 항체 불변 도메인의 계면에서 있는 총 잔기의 수이다.

[0409] *유전자 조작 함몰부 및 유전자 조작 돌출부와 정전기 스티어링의 조합*

[0410] 전기 스티어링을 노브-홀 기술과 조합하여, 예를 들어, 2개의 상이한 폴리펩티드의 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화를 유리하게 할 수 있다. 이후에 보다 자세히 설명되는 정전기 스티어링은 보다 고차 단백질 분자의 형성을 조절하기 위해 펩티드, 단백질 도메인 및 단백질의 반대로 하전된 아미노산 사이의 유리한 정전기 상호작용을 이용하는 것이다. 전기 스티어링을 사용하여 동종이량체화 또는 이종이량체화를 촉진할 수 있으며, 후자는 노브-홀 기술과 유용하게 조합될 수 있다. 이종이량체화의 경우, 상이하지만 양립성인 돌연변이는 이종이량체화되는 각각의 Fc 도메인 단량체에 도입된다. 따라서, Fc 도메인 단량체는 다음의 양전하 및 음전하 아미노산 치환 중 하나를 포함하도록 변형될 수 있다: D356K, D356R, E357K, E357R, K370D, K370E, K392D, K392E, D399K, K409D, K409E, K439D 및 K439E. 예를 들어, 하나의 Fc 도메인 단량체, 예를 들어, 함몰부(Y349C, T366S, L368A 및 Y407V)를 갖는 Fc 도메인 단량체는 K370D 돌연변이를 또한 포함하며, 다른 Fc 도메인 단량체, 예를 들어, 돌출부(S354C 및 T366W)를 갖는 Fc 도메인 단량체는 E357K를 포함할 수 있다.

[0411] 보다 일반적으로, 임의의 함몰부 돌연변이(또는 돌연변이 조합): Y407T, Y407A, F405A, Y407T, T394S, T394W:Y407A, T366W:T394S, T366S:L368A:Y407V:Y349C 및 S3364H:F405가 표 3의 정전기 스티어링 돌연변이와 조합될 수 있고, 임의의 돌출부 돌연변이(또는 돌연변이 조합): T366Y, T366W, T394W, F405W, T366Y:F405A, T366W:Y407A, T366W:S354C 및 Y349T:T394F가 표 3의 정전기 스티어링 돌연변이와 조합될 수 있다.

[0412] **VI. 정전기 스티어링**

[0413] 정전기 스티어링은 보다 고차 단백질 분자의 형성을 조절하기 위해 펩티드, 단백질 도메인 및 단백질의 반대로 하전된 아미노산 사이의 유리한 정전기 상호작용을 이용하는 것이다. 이중-특이적 항체의 생성에서 이종이량체 형성을 위하여 동종이량체의 형성을 감소시키는 항체 도메인의 상호작용을 변경하는 정전기 스티어링 효과를 이용하는 방법은 미국 특허 출원 공개 제2014-0024111호에 개시되어 있다.

[0414] 본 개시 내용에서, 정전기 스티어링은 Fc 도메인 단량체의 이량체화 및 Fc-항원 결합 도메인 작제물의 형성을 제어하는 데 사용된다. 특히, 정전기 스티어링을 사용하는 Fc 도메인 단량체의 이량체화를 제어하기 위하여, CH_3-CH_3 계면을 구성하는 하나 이상의 아미노산 잔기는 양전하 또는 음전하 아미노산 잔기로 대체되어 도입된 특정 하전 아미노산에 따라 상호작용은 정전기적으로 유리하거나 불리하게 된다. 일부 구현예에서, 계면의 양전하 아미노산, 예를 들어 라이신, 아르기닌 또는 히스티딘은 음전하 아미노산, 예를 들어 아스파르트산 또는 글루탐산으로 대체된다. 다른 구현예에서, 계면의 음전하 아미노산은 양전하 아미노산으로 대체된다. 하전 아미노산은 상호작용하는 CH_3 항체 불변 도메인 중 하나 또는 둘 모두에 도입될 수 있다. 하전 아미노산을 상호작용하는 CH_3 항체 불변 도메인에 도입함으로써, 하전 아미노산 사이의 상호작용으로 인한 정전기 스티어링 효과에 의해 제어되는 Fc 도메인 단량체의 이량체를 선택적으로 형성할 수 있는 (상기에서 추가로 기재되는) 이량체화 선택성 모듈이 생성된다.

[0415] 일부 구현예에서, 정전기 스티어링 효과에 의해 제어되어 Fc 도메인 단량체의 이량체를 선택적으로 형성할 수 있는 역전하를 포함하는 이량체화 선택성 모듈을 생성하기 위해, 2개의 Fc 도메인 단량체는 이종이량체화 또는 동종이량체화를 통해 선택적으로 형성될 수 있다.

[0416] *이종이량체화 of Fc 도메인 단량체*

[0417] Fc 도메인 단량체의 이종이량체화는 표 3에 제한 없이 포함된 전하 잔기 쌍과 같은 2개의 Fc 도메인 단량체에 상이하지만 양립성인 돌연변이를 도입함으로써 촉진될 수 있다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체는 다음의 양전하 및 음전하 아미노산 치환 중 하나를 포함할 수 있다: D356K, D356R, E357K, E357R, K370D, K370E, K392D, K392E, D399K, K409D, K409E, K439D 및 K439E. 일 실시예에서, 양전하 아미노산 치환, 예를 들어, D356K 또는 E357K를 함유하는 Fc 도메인 단량체와 음전하 아미노산 치환, 예를 들어, K370D 또는 K370E를 함유하는 Fc 도메인 단량체는 하전 아미노산의 유리한 정전기 스티어링을 통해 선택적으로 결합하여 Fc 도메인을 형성할 수 있다. 또 다른 실시예에서, E357K를 함유하는 Fc 도메인 단량체와 K370D를 함유하는 Fc 도메인 단량체

는 하전 아미노산의 유리한 정전기 스티어링을 통해 선택적으로 결합하여 Fc 도메인을 형성할 수 있다.

[0418] 예를 들어, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc-항원 결합 도메인 작제물에서, 3개의 Fc 도메인 중 2개는 정전기 스티어링 효과에 의해 촉진되어 2개의 Fc 도메인 단량체의 이종이량체화에 의해 형성될 수 있다. "이종이량체 Fc 도메인"은 2개의 Fc 도메인 단량체의 이종이량체화에 의해 형성되는 Fc 도메인을 지칭하되, 2개의 Fc 도메인 단량체는 이들 2개의 Fc 도메인 단량체의 유리한 형성을 촉진하는 상이한 역전하 돌연변이(이종이량체화 선택성 모듈)(예를 들어, 표 4A 및 표 4B의 돌연변이 참조)를 함유한다. 3개의 Fc 도메인(하나의 카복시 말단 "줄기" Fc 도메인 및 2개의 아미노 말단 "분지" Fc 도메인)을 갖는 Fc-항원 결합 도메인 작제물에서, 아미노 말단 "분지" Fc 도메인 각각은 이종이량체 Fc 도메인("분지 이종이량체 Fc 도메인"이라고도 불림)(예컨대, 도 1의 Fc 도메인 단량체(106 및 114) 또는 Fc 도메인 단량체(112 및 116)에 의해 형성된 이종이량체 Fc 도메인; 도 2의 Fc 도메인 단량체(206 및 214) 또는 Fc 도메인 단량체(212 및 216)에 의해 형성된 이종이량체 Fc 도메인)일 수 있다. 분지 이종이량체 Fc 도메인은 E357K를 함유하는 Fc 도메인 단량체 및 K370D를 함유하는 또 다른 Fc 도메인 단량체에 의해 형성될 수 있다.

표 3

Fc 이종이량체화 방법			
방법	**돌연변이 (사슬 A)**	**돌연변이 (사슬 B)**	**참조 문헌**
노브-인투-홀 (Y-T)	Y407T	T336Y	미국 특허 # 8,216,805
노브-인투-홀	Y407A	T336W	미국 특허 # 8,216,805
노브-인투-홀	F405A	T394W	미국 특허 # 8,216,805
노브-인투-홀	Y407T	T366Y	미국 특허 # 8,216,805
노브-인투-홀	T394S	F405W	미국 특허 # 8,216,805
노브-인투-홀	T394W, Y407T	T366Y, F406A	미국 특허 # 8,216,805
노브-인투-홀	T394S, Y407A	T366W, F405W	미국 특허 # 8,216,805
노브-인투-홀	T366W, T394S	F405W, T407A	미국 특허 # 8,216,805
노브-인투-홀	S354C, T366W	Y349C, T366S, L368A, Y407V	
노브-홀 (CW-CSAV)	Y349C, T366S, L368A, Y407V	S354C, T366W	Zeidler 등의, J immunol. 163: 1246-52, 1999
HA-TF	S364H, F405A	Y349T, T394F	WO2011028952
정전기 스티어링	K409D	D399K	US 2014/0024111
정전기 스티어링	K409D	D399R	US 2014/0024111
정전기 스티어링	K409E	D399K	US 2014/0024111
정전기 스티어링	K409E	D399R	US 2014/0024111
정전기 스티어링	K392D	D399K	US 2014/0024111
정전기 스티어링	K392D	D399R	US 2014/0024111
정전기 스티어링	K392E	D399K	US 2014/0024111
정전기 스티어링	K392E	D399R	US 2014/0024111

[0419]

정전기 스티어링 (DD-KK)	K392D, K409D	E356K, D399K	Gunasekaran et al., *J Biol Chem.* 285: 19637-46, 2010
정전기 스티어링	K370E, K409D, K439E	E356K, E357K, D399K	WO 2006/106905
노브-인투-홀 + 정전기 스티어링	S354C, E357K, T366W	Y349C, T366S, L368A, K370D, Y407V	WO 2015/168643
VYAV-VLLW	T350V, L351Y, F405A, Y407V	T350V, T366L, K392L, T394W	Von Kreudenstein et al, MAbs, 5:646-54, 2013
EEE-RRR	D221E, P228E, L368E	D221R, P228R, K409R	Strop et al, J Mol Biol, 420:204-19, 2012
EW-RVT	K360E, K409W	Q347R, D399V, F405T	Choi et al, Mol Cancer Ther, 12:2748-59, 2013
EW-RVTs-s	K360E, K409W, Y349C	Q347R, D399V, F405T, S354C	Choi et al, Mol Immunol, 65:377-83, 2015
전하 도입 (DK)	L351D	T366K	De Nardis, J Biol Chem, 292:14706-17, 2017
전하 도입 (DEKK)	L351D, L368E	L351K, T366K	De Nardis, J Biol Chem, 292:14706-17, 2017
L-R	F405L	K409R	Labrijn et al, Proc Natl Acad Sci USA, 110:5145-50, 2013
	IgG/A 키메라	IgG/A 키메라	Davis et al, Protein Eng Des Sel, 23:195-202, 2010
	S364K, T366V, K370T, K392Y, F405S, Y407V, K409W, T411N	Q347E, Y349A, L351F, S364T, T366V, K370T, T394D, V397L, D399E, F405A, Y407S, K409R, T411R	Skegro et al, J Biol Chem, 292:9745-59, 2017
	S364K, T366V, K370T, K392Y, K409W, T411N	F405A, Y407S	Skegro et al, J Biol Chem, 292:9745-59, 2017
	Q347A, S364K, T366V, K370T, K392Y, F405S, Y407V, K409W, T411N	Q347E, Y349A, L351F, S364T, T366V, K370T, T394D, V397L, D399E, F405A, Y407S, K409R, T411R	Skegro et al, J Biol Chem, 292:9745-59, 2017

[0420]

BEAT (A/B - T)	S364K, T366V, K370T, K392Y, F405S, Y407V, K409W, T411N	Q347E, Y349A, L351F, S364T, T366V, K370T, T394D, V397L, D399E, F405A, Y407S, K409R	Skegro et al, J Biol Chem, 292:9745-59, 2017
DMA-RRVV	K360D, D399M, Y407A	E345R, Q347R, T366V, K409V	Leaver-Fay et al, Structure, 24:641-51, 2016
SYMV-GDQA	Y349S, K370Y, T366M, K409V	E356G, E357D, S364Q, Y407A	Leaver-Fay et al, Structure, 24:641-51, 2016
정전기 스티어링	K370D	E357K	
정전기 스티어링	K370D	E357R	
정전기 스티어링	K370E	E357K	
정전기 스티어링	K370E	E357R	
정전기 스티어링	K370D	D356K	
정전기 스티어링	K370D	D356R	
정전기 스티어링	K370E	D356K	
정전기 스티어링	K370E	D356R	

[0421]

[0422] *주: 모든 잔기는 EU 넘버링 체계에 따라 넘버링됨(Edelm 등의 문헌[Proc Natl Acad Sci USA, 63:78-85, 1969])*

[0423] *Fc 도메인 단량체의 동종이량체화*

[0424] Fc 도메인 단량체의 동종이량체화는 동일한 정전기 스티어링 돌연변이(동종이량체화 선택성 모듈)를 Fc 도메인 단량체 둘 모두에 대칭 방식으로 도입함으로써 촉진될 수 있다. 일부 구현예에서, 2개의 Fc 도메인 단량체는 CH_3 도메인 사이의 계면에서 하전된 잔기의 고리 내의 적어도 2개의 위치에 동일한 역전하 돌연변이를 함유하는 동종이량체화 선택성 모듈을 포함한다. 2개의 Fc 도메인 단량체에서 2개 이상의 상보적인 잔기 쌍의 두 구성원의 전하를 역전시킴으로써, 돌연변이된 Fc 도메인 단량체는 동일한 돌연변이된 서열의 Fc 도메인 단량체에 대한 상보성을 유지하지만, 이러한 돌연변이가 없는 Fc 도메인 단량체에 대해 더 낮은 상보성을 갖는다. Fc 도메인 단량체 내에 도입되어 이의 동종이량체화를 촉진할 수 있는 정전기 스티어링 돌연변이는 표 4A 및 표 4B에 제한 없이 나타나 있다. 일 구현예에서, Fc 도메인은 이중 역전하 돌연변이(표 4A 및 표 4B), 예를 들어, K409D/D399K를 각각 포함하는 2개의 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 또 다른 구현예에서, Fc 도메인은 사중 역전하 돌연변이(표 4A 및 표 4B), 예를 들어, K409D/D399K/K370D/E357K를 각각 포함하는 2개의 Fc 도메인 단량체를 포함한다.

[0425] 예를 들어, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc-항원 결합 도메인 작제물에서, 3개의 Fc 도메인 중 1개는 정전기 스티어링 효과에 의해 촉진되어 2개의 Fc 도메인 단량체의 동종이량체화에 의해 형성될 수 있다. "동종이량체 Fc 도메인"은 2개의 Fc 도메인 단량체의 동종이량체화에 의해 형성되는 Fc 도메인을 지칭하되, 2개의 Fc 도메인 단량체는 동일한 역전하 돌연변이(예를 들어, 표 4A 및 표 4B의 돌연변이 참조)를 함유한다. 3개의 Fc 도메인(하나의 카복실 말단 "줄기" Fc 도메인 및 2개의 아미노 말단 "분지" Fc 도메인)을 갖는 Fc-항원 결합 도메인 작제물에서, 카복시 말단 "줄기" Fc 도메인은 동종이량체 Fc 도메인(또한 "줄기 동종이량체 Fc 도메인"으로도 불림)일 수 있다. 줄기 동종이량체 Fc 도메인은, 각각 이중 돌연변이 K409D/D399K를 함유하는 2개의 Fc 도메인 단량체에 의해 형성될 수 있다.

[0426] [표 4a]

Fc 동종이량체화 방법 - 각 사슬에 2개의 돌연변이

방법	돌연변이 (사슬 A 및 B)	참조 문헌
야생형	없음	미국 특허 # 8,216,805
정전기 스티어링 (KD)	D399K/K409D	Gunasekaran et al., J Biol Chem. 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
정전기 스티어링	D399K/K409E	Gunasekaran et al., J Biol Chem. 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
정전기 스티어링	E357K/ K370D	Gunasekaran et al., J Biol Chem. 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
정전기 스티어링	E357K/ K370E	Gunasekaran et al., J Biol Chem. 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
정전기 스티어링	D356K/K439D	Gunasekaran et al., J Biol Chem. 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
정전기 스티어링	D356K/K439E	Gunasekaran et al., J Biol Chem. 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
정전기 스티어링	K392D/D399K	Gunasekaran et al., J Biol Chem. 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
정전기 스티어링	K392E/D399K	Gunasekaran et al., J Biol Chem. 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
정전기 스티어링	K409D/D399R	
정전기 스티어링	K409E/D399R	
정전기 스티어링	K392D/D399R	

[0427]

[0428] [표 4b]

Fc 동종이량체화 방법 - 각 사슬에 4개의 돌연변이	
동종이량체 Fc 도메인의 2개의 Fc 도메인 단량체 각각의 C_H3 항체 불변 도메인의 역전하 돌연변이(들)	동종이량체 Fc 도메인의 2개의 Fc 도메인 단량체 각각의 C_H3 항체 불변 도메인의 역전하 돌연변이(들)
K409D/D399K/K370D/E357K	K392D/D399K/K370D/E357K
K409D/D399K/K370D/E357R	K392D/D399K/K370D/E357R
K409D/D399K/K370E/E357K	K392D/D399K/K370E/E357K
K409D/D399K/K370E/E357R	K392D/D399K/K370E/E357R
K409D/D399K/K370D/D356K	K392D/D399K/K370D/D356K
K409D/D399K/K370D/D356R	K392D/D399K/K370D/D356R
K409D/D399K/K370E/D356K	K392D/D399K/K370E/D356K
K409D/D399K/K370E/D356R	K392D/D399K/K370E/D356R
K409D/D399R/K370D/E357K	K392D/D399R/K370D/E357K
K409D/D399R/K370D/E357R	K392D/D399R/K370D/E357R
K409D/D399R/K370E/E357K	K392D/D399R/K370E/E357K
K409D/D399R/K370E/E357R	K392D/D399R/K370E/E357R
K409D/D399R/K370D/D356K	K392D/D399R/K370D/D356K
K409D/D399R/K370D/D356R	K392D/D399R/K370D/D356R
K409D/D399R/K370E/D356K	K392D/D399R/K370E/D356K
K409D/D399R/K370E/D356R	K392D/D399R/K370E/D356R
K409E/D399K/K370D/E357K	K392E/D399K/K370D/E357K
K409E/D399K/K370D/E357R	K392E/D399K/K370D/E357R
K409E/D399K/K370E/E357K	K392E/D399K/K370E/E357K
K409E/D399K/K370E/E357R	K392E/D399K/K370E/E357R
K409E/D399K/K370D/D356K	K392E/D399K/K370D/D356K
K409E/D399K/K370D/D356R	K392E/D399K/K370D/D356R
K409E/D399K/K370E/D356K	K392E/D399K/K370E/D356K
K409E/D399K/K370E/D356R	K392E/D399K/K370E/D356R
K409E/D399R/K370D/E357K	K392E/D399R/K370D/E357K
K409E/D399R/K370D/E357R	K392E/D399R/K370D/E357R
K409E/D399R/K370E/E357K	K392E/D399R/K370E/E357K
K409E/D399R/K370E/E357R	K392E/D399R/K370E/E357R
K409E/D399R/K370D/D356K	K392E/D399R/K370D/D356K
K409E/D399R/K370D/D356R	K392E/D399R/K370D/D356R
K409E/D399R/K370E/D356K	K392E/D399R/K370E/D356K
K409E/D399R/K370E/D356R	K392E/D399R/K370E/D356R

[0429]

[0430] **VII. 링커**

[0431] 본 발명에서, 링커는 폴리펩티드 또는 단백질 도메인 및/또는 회합된 비단백질 모이어티 간의 결합 또는 연결을 기술하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 링커는 적어도 2개의 Fc 도메인 단량체 간의 결합 또는 연결이고, 이 경우 링커는 제1 Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인의 C-말단을 제2 Fc 도메인 단량체의 힌지 도메인의 N-말단에 연결하여, 2개의 Fc 도메인 단량체가 직렬로 서로 연결된다. 다른 구현예에서, 링커는 Fc 도메인 단량체와 이에 부착되는 임의의 다른 단백질 도메인 사이의 결합이다. 예를 들어, 링커는 Fc 도메인 단량체의 CH_3 항체 불변 도메인의 C-말단을 알부민-결합 펩티드의 N-말단에 부착시킬 수 있다.

[0432] 링커는 펩티드 결합과 같은 단순 공유 결합, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 중합체와 같은 합성 중합체이거나, 화학적 접합과 같이 화학 반응으로 생성된 임의의 종류의 결합일 수 있다. 링커가 펩티드 결합인 경우, 하나의 단백질 도메인의 C-말단의 카복실산 기는 펩티드 결합을 형성하는 축합 반응에서 또 다른 단백질 도메인의 N-말단에서 아미노 기와 반응할 수 있다. 구체적으로, 펩티드 결합은 당업계에 잘 알려진 통상의 유기 화학 반응을 통한 합성 수단으로 형성될 수 있거나, 숙주 세포에서의 천연 생성에 의해 형성될 수 있으며, 두 단백질 모두의 DNA 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열, 예컨대, 직렬 연결의 2개의 Fc 도메인 단량체는 필수 분자 기구, 예컨대, 숙주 세포의 DNA 중합효소 및 리보솜에 의해 두 단백질 모두를 암호화하는 인접 폴리펩티드로 직접 전사 및 번역될 수 있다.

[0433] 링커가 합성 중합체, 예컨대 PEG 중합체인 경우, 중합체는 각 말단에서 반응성 화학 작용기로 작용화되어, 두

단백질의 연결 말단에서 말단 아미노산과 반응할 수 있다.

[0434] (상술한 펩티드 결합을 제외하고) 링커가 화학 반응으로 만들어지는 경우, 화학 작용기, 예컨대 아민, 카복실산, 에스테르, 아지드, 또는 당업계에서 통상 사용되는 기타 작용기는 하나의 단백질의 C-말단 및 또 다른 단백질의 N-말단에 각각 합성되어 부착될 수 있다. 이어서, 두 작용기는 화학 결합을 형성하는 합성 화학 수단을 통해 반응하여, 2개의 단백질을 함께 연결할 수 있다. 이러한 화학적 접합 절차는 당업자에게 통상적인 것이다.

[0435] *스페이서*

[0436] 본 개시 내용에서, 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 링커는 3~200개의 아미노산(예를 들어, 3~200개, 3~180개, 3~160개, 3~140개, 3~120개, 3~100개, 3~90개, 3~80개, 3~70개, 3~60개, 3~50개, 3~45개, 3~40개, 3~35개, 3~30개, 3~25개, 3~20개, 3~15개, 3~10개, 3~9개, 3~8개, 3~7개, 3~6개, 3~5개, 3~4개, 4~200개, 5~200개, 6~200개, 7~200개, 8~200개, 9~200개, 10~200개, 15~200개, 20~200개, 25~200개, 30~200개, 35~200개, 40~200개, 45~200개, 50~200개, 60~200개, 70~200개, 80~200개, 90~200개, 100~200개, 120~200개, 140~200개, 160~200개 또는 180~200개의 아미노산)을 포함하는 아미노산 스페이서일 수 있다. 일부 구현예에서, 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 링커는 적어도 12개의 아미노산, 예컨대 12~200개의 아미노산(예를 들어, 12~200개, 12~180개, 12~160개, 12~140개, 12~120개, 12~100개, 12~90개, 12~80개, 12~70개, 12~60개, 12~50개, 12~40개, 12~30개, 12~20개, 12~19개, 12~18개, 12~17개, 12~16개, 12~15개, 12~14개, 또는 12~13개의 아미노산) (예컨대, 14~200개, 16~200개, 18~200개, 20~200개, 30~200개, 40~200개, 50~200개, 60~200개, 70~200개, 80~200개, 90~200개, 100~200개, 120~200개, 140~200개, 160~200개, 180~200개 또는 190~200개의 아미노산)을 함유하는 아미노산 스페이서이다. 일부 구현예에서, 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 링커는 12~30개의 아미노산(예를 들어, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 아미노산)을 함유하는 아미노산 스페이서이다. 적합한 펩티드 스페이서는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, 글리신 및 세린과 같은 가요성 아미노산 잔기를 함유하는 펩티드 링커를 포함한다. 특정 구현예에서, 스페이서는 모티프, 예컨대 GS, GGS, GGGGS(서열 번호 1), GGSG(서열 번호 2) 또는 SGGG(서열 번호 3)의 다중 모티프 또는 반복 모티프를 함유할 수 있다. 특정 구현예에서, 스페이서는 GS, 예컨대, GS, GSGS(서열 번호 4), GSGSGS(서열 번호 5), GSGSGSGS(서열 번호 6), GSGSGSGSGS(서열 번호 7), 또는 GSGSGSGSGSGS(서열 번호 8)의 모티프를 포함하는 2 내지 12개의 아미노산을 함유할 수 있다. 특정 다른 구현예에서, 스페이서는 GGS, 예컨대, GGS, GGSGGS(서열 번호 9), GGSGGSGGS(서열 번호 10) 및 GGSGGSGGSGGS(서열 번호 11)의 모티프를 포함하는 3 내지 12개의 아미노산을 함유할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 스페이서는 GGSG(서열번호 2), 예컨대, GGSGGGSG(서열번호 12), GGSGGGSGGGSG(서열번호 13), GGSGGGSGGGSGGGSG(서열번호 14) 또는 GGSGGGSGGGSGGGSGGGSG(서열번호 15)의 모티프를 포함하는 4 내지 20개의 아미노산을 함유할 수 있다. 다른 구현예에서, 스페이서는 GGGGS(서열번호 1), 예컨대, GGGGSGGGGS(서열번호 16) 또는GGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 17)의 모티프를 함유할 수 있다. 특정 구현예에서, 스페이서는 SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG(서열번호 18)이다.

[0437] 일부 구현예에서, 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 스페이서는 글리신 잔기만, 예컨대, 적어도 4개의 글리신 잔기(예컨대, 4~200개, 4~180개, 4~160개, 4~140개, 4~40개, 4~100개, 4~90개, 4~80개, 4~70개, 4~60개, 4~50개, 4~40개, 4~30개, 4~20개, 4~19개, 4~18개, 4~17개, 4~16개, 4~15개, 4~14개, 4~13개, 4~12개, 4~11개, 4~10개, 4~9개, 4~8개, 4~7개, 4~6개 또는 4~5개의 글리신 잔기) (예컨대, 4~200개, 6~200개, 8~200개, 10~200개, 12~200개, 14~200개, 16~200개, 18~200개, 20~200개, 30~200개, 40~200개, 50~200개, 60~200개, 70~200개, 80~200개, 90~200개, 100~200개, 120~200개, 140~200개, 160~200개, 180~200개 또는 190~200개의 글리신 잔기)를 함유한다. 특정 구현예에서, 스페이서는 4~30개의 글리신 잔기(예컨대, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 글리신 잔기)를 갖는다. 일부 구현예에서, 글리신 잔기만 함유하는 스페이서는 글리코실화되지 않을 수 있거나(예컨대, O-연결 글리코실화(O-linked glycosylation), O-글리코실화라고도 지칭됨), 예컨대 하나 이상의 세린 잔기(예컨대, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG(서열번호 18))를 함유하는 스페이서와 비교하여 글리코실화 수준이 감소(예컨대, O-글리코실화 수준의 감소)(예컨대, 자일로스, 만노스, 시알산, 푸코스(Fuc) 및/또는 갈락토스(Gal)(예컨대, 자일로스)와 같은 글리칸을 갖는 O-글리코실화 수준의 감소)될 수 있다.

[0438] 일부 구현예에서, 글리신 잔기만 함유하는 스페이서는 O-글리코실화(예컨대, O-자일로실화)되지 않을 수 있거나, 예를 들어 하나 이상의 세린 잔기(예컨대, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG(서열번호 18))를 함유하는 스페이서와 비교하여 O-글리코실화 수준이 감소될 수 있다(예컨대, O-자일로실화 수준의 감소).

[0439] 일부 구현예에서, 글리신 잔기만 함유하는 스페이서는 단백질 분해를 겪지 않을 수 있거나 예컨대, 하나 이상의 세린 잔기(예컨대, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG(서열번호 18))를 함유하는 스페이서와 비교하여 단백질 분해율이 감소될 수 있다.

[0440] 특정 구현예에서, 스페이서는 GGGG(서열 번호 19), 예컨대, GGGGGGGG(서열 번호 20), GGGGGGGGGGGG(서열 번호 21), GGGGGGGGGGGGGGGG(서열 번호 22), 또는 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG(서열 번호 23)의 모티프를 함유할 수 있다. 특정 구현예에서, 스페이서는 GGGGG(서열번호 24), 예컨대, GGGGGGGGGG(서열번호 25) 또는GGGGGGGGGGGGGGGG(서열번호 26)의 모티프를 함유할 수 있다. 특정 구현예에서, 스페이서는 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG(서열 번호 27)이다.

[0441] 다른 구현예에서, 스페이서는 글리신 및 세린 외의 아미노산, 예를 들어 GENLYFQSGG(서열번호 28), SACYCELS(서열번호 29), RSIAT(서열번호 30), RPACKIPNDLKQKVMNH(서열번호 31), GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG(서열번호 32), AAANSSIDLISVPVDSR(서열번호 33), 또는 GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS(서열번호 34)를 또한 함유할 수 있다.

[0442] 본 발명의 특정 구현예에서, 12- 또는 20-아미노산 펩티드 스페이서는 2개의 Fc 도메인 단량체를 직렬로 연결하는 데 사용되며, 12- 및 20-아미노산 펩티드 스페이서는 각각 서열 GGGSGGGSGGGS(서열 번호 35) 및 SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG(서열 번호 18)로 이루어진다. 다른 구현예에서, 서열 GGSGGGSGGGSGGGSGGS(서열번호 36)로 이루어진 18-아미노산 펩티드 스페이서가 사용될 수 있다.

[0443] 일부 구현예에서, 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 스페이서는 상술한 서열번호 1~36 중 어느 하나의 서열에 적어도 75% 동일한(적어도 77%, 79%, 81%, 83%, 85%, 87%, 89%, 91%, 93%, 95%, 97%, 99% 또는 99.5% 동일한) 서열을 가질 수 있다. 특정 구현예에서, 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 스페이서는 상술한 서열번호 17, 18, 26 및 27 중 어느 하나의 서열에 적어도 80% 동일한(적어도 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95%, 97%, 99% 또는 99.5% 동일한) 서열을 가질 수 있다. 특정 구현예에서, 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 스페이서는 상술한 서열번호 18 또는 27 중 어느 하나의 서열에 적어도 80% 동일한(적어도 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95%, 97%, 99% 또는 99.5% 동일한) 서열을 가질 수 있다.

[0444] 특정 구현예에서, Fc 도메인 단량체의 힌지의 아미노 말단과 동일한 폴리펩티드에 있는 Fc 단량체의 카복시 말단 사이의 링커(즉, 제1 Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인의 C-말단을 제2 Fc 도메인 단량체의 힌지 도메인의 N-말단에 연결하여, 2개의 Fc 도메인 단량체가 서로 직렬이 되도록 연결하는 링커)는 공유 결합이 아닌 3개 이상의 아미노산(예를 들어, 3~200개의 아미노산(예를 들어, 3~200, 3~180, 3~160, 3~140, 3~120, 3~100, 3~90, 3~80, 3~70, 3~60, 3~50, 3~45, 3~40, 3~35, 3~30, 3~25, 3~20, 3~15, 3~10, 3~9, 3~8, 3~7, 3~6, 3~5, 3~4, 4~200, 5~200, 6~200, 7~200, 8~200, 9~200, 10~200, 15~200, 20~200, 25~200, 30~200, 35~200, 40~200, 45~200, 50~200, 60~200, 70~200, 80~200, 90~200, 100~200, 120~200, 140~200, 160~200 또는 180~200개의 아미노산)을 갖는 스페이서, 또는 적어도 12개의 아미노산, 예컨대 12~200개의 아미노산(예를 들어, 12~200, 12~180, 12~160, 12~140, 12~120, 12~100, 12~90, 12~80, 12~70, 12~60, 12~50, 12~40, 12~30, 12~20, 12~19, 12~18, 12~17, 12~16, 12~15, 12~14 또는 12~13개의 아미노산)(예를 들어, 14~200, 16~200, 18~200, 20~200, 30~200, 40~200, 50~200, 60~200, 70~200, 80~200, 90~200, 100~200, 120~200, 140~200, 160~200, 180~200 또는 190~200개의 아미노산))을 함유하는 아미노산 스페이서이다.

[0445] 스페이서는 또한 Fc 도메인 단량체의 힌지 도메인의 N-말단과 CCR4 결합 도메인(예를 들어, CCR4 중쇄 결합 도메인의 CH1 도메인 또는 CCR4 경쇄 결합 도메인의 CL 도메인)의 카복시 말단 사이에 존재하여 3개 이상의 아미노산(예를 들어, 3~200 아미노산(예를 들어, 3~200개의 아미노산(예를 들어, 3~200, 3~180, 3~160, 3~140, 3~120, 3~100, 3~90, 3~80, 3~70, 3~60, 3~50, 3~45, 3~40, 3~35, 3~30, 3~25, 3~20, 3~15, 3~10, 3~9, 3~8, 3~7, 3~6, 3~5, 3~4, 4~200, 5~200, 6~200, 7~200, 8~200, 9~200, 10~200, 15~200, 20~200, 25~200, 30~200, 35~200, 40~200, 45~200, 50~200, 60~200, 70~200, 80~200, 90~200, 100~200, 120~200, 140~200, 160~200 또는 180~200개의 아미노산)을 갖는 스페이서, 또는 적어도 12개의 아미노산, 예컨대 12~200개의 아미노산(예를 들어, 12~200, 12~180, 12~160, 12~140, 12~120, 12~100, 12~90, 12~80, 12~70, 12~60, 12~50, 12~40, 12~30, 12~20, 12~19, 12~18, 12~17, 12~16, 12~15, 12~14 또는 12~13개의 아미노산)(예를 들어, 14~200, 16~200, 18~200, 20~200, 30~200, 40~200, 50~200, 60~200, 70~200, 80~200, 90~200, 100~200, 120~200, 140~200, 160~200, 180~200 또는 190~200개의 아미노산))을 함유하는 아미노산 스페이서에 의해 도메인은 연결할 수 있다.

[0446] **VIII. 혈청 단백질-결합 펩티드**

[0447] 혈청 단백질 펩티드에 대한 결합은 단백질 의약품의 약동학을 개선할 수 있으며, 특히 본원에 기재된 Fc-항원 결합 도메인 작제물은 혈청 단백질-결합 펩티드와 융합될 수 있다.

[0448] 일례로, 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용될 수 있는 알부민-결합 펩티드는 당업계에 일반적으로 알려져 있다. 일 구현예에서, 알부민 결합 펩티드는 서열 DICLPRWGCLW(서열번호 37)을 포함한다. 일부 구현예에서, 알부민 결합 펩티드는 서열번호 37의 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 80%, 90% 또는 100% 동일한) 서열을 갖는다.

[0449] 본 개시에서, 알부민-결합 펩티드는 Fc-항원 결합 도메인 작제물에 있는 특정 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 부착될 수 있다. 일 구현예에서, 알부민-결합 펩티드는 CCR4 결합 도메인을 함유하는 Fc 작제물에 있는 하나 이상의 폴리펩티드의 C-말단에 부착될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 알부민-결합 펩티드는 CCR4 결합 도메인을 함유하는 Fc 작제물에 있는 직렬로 연결된 2개의 Fc 도메인 단량체를 암호화하는 폴리펩티드의 C-말단에 융합될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 알부민-결합 펩티드는 직렬로 연결된 2개의 Fc 도메인 단량체를 암호화하는 폴리펩티드 내의 제2 Fc 도메인 단량체에 연결되는 Fc 도메인 단량체의 C-말단(예컨대, 도 1의 Fc 도메인 단량체 114 및 116과 도 2의 Fc 도메인 단량체 214 및 216)에 부착될 수 있다. 알부민-결합 펩티드는 Fc-항원 결합 도메인 작제물에 유전적으로 융합될 수 있거나, 또는 Fc-항원 결합 도메인 작제물에 화학적 수단, 예컨대, 화학적 접합을 통해 부착될 수 있다. 원하는 경우, 스페이서는 Fc-항원 결합 도메인 작제물과 알부민-결합 펩티드 사이에 삽입될 수 있다. 이론에 구속되지 않고, 본 개시 내용의 Fc-항원 결합 도메인 작제물에 알부민-결합 펩티드를 포함시키면 혈청 알부민에 대한 이의 결합을 통해 치료 단백질을 장기간 유지할 수 있을 것으로 예상된다.

[0450] **IX. Fc-항원 결합 도메인 작제물**

[0451] 일반적으로, 본 발명은 2~10개의 Fc 도메인 및 하나 이상의 부착된 CCR4 결합 도메인을 갖는 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 특징으로 한다. 이들은 Fc 수용체, 예컨대, FcγRIIIa에 대한 단일 야생형 Fc 도메인보다 더 큰 결합 친화도 및/또는 결합성을 가질 수 있다. 본 개시 내용은 Fc 도메인의 2개의 Fc 도메인 단량체가 서로 선택적으로 이량체를 형성하여, 원치 않는 다량체 또는 응집의 형성을 방지하도록 2개의 상호작용하는 C_H3 항체 불변 도메인의 계면에서 아미노산을 유전자 조작하는 방법을 개시한다. Fc-항원 결합 도메인 작제물은 짝수의 Fc 도메인 단량체를 포함하며, 각각의 Fc 도메인 단량체 쌍은 Fc 도메인을 형성한다. Fc-항원 결합 도메인 작제물은 4개의 Fc 도메인 단량체의 이량체 및 1개의 CCR4 결합 도메인으로 형성된 최소 2개의 작용성 Fc 도메인을 포함한다. CCR4 결합 도메인은, 예를 들어, 링커, 스페이서, 펩티드 결합, 화학 결합 또는 화학 모이어티를 사용하여 Fc 도메인에 연결될 수 있다.

[0452] Fc-항원 결합 도메인 작제물은 다양한 방식으로 조립될 수 있다. Fc-항원 결합 도메인 작제물은 비대칭 직렬 Fc 도메인으로부터 조립될 수 있다(도 1~도 6). Fc-항원 결합 도메인 작제물은 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 조립될 수 있으며, 분지점은 N-말단 Fc 도메인에 있다(도 7~도 12). Fc-항원 결합 도메인 작제물은 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 조립될 수 있으며, 분지점은 C-말단 Fc 도메인에 있다(도 13~도 18). Fc-항원 결합 도메인 작제물은 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 조립될 수 있으며, 분지점은 N-말단 또는 C-말단 Fc 도메인에 있다(도 19~도 21).

[0453] CCR4 결합 도메인은 다양한 방식으로 Fc-항원 결합 도메인 작제물에 연결될 수 있다. CCR4 결합 도메인은 Fc 사슬의 융합 단백질로 발현될 수 있다. CCR4 결합 Fab의 중쇄 성분은 Fc 사슬의 융합 단백질로 발현될 수 있고, 경쇄 성분은 별도의 폴리펩티드로 발현될 수 있다(도 50, 패널 A). 일부 구현예에서, scFv는 CCR4 결합 도메인으로 사용된다. scFv는 Fc 장쇄의 융합 단백질로 발현될 수 있다(도 50, 패널 B). 일부 구현예에서, 중쇄 및 경쇄 성분은 개별적으로 발현되고 Fc-항원 결합 도메인 작제물에 외인성으로 첨가된다. 일부 구현예에서, CCR4 결합 도메인은 개별적으로 발현되어, 나중에 화학 결합으로 Fc-항원 결합 도메인 작제물에 연결된다(도 50, 패널 C).

[0454] 일부 구현예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물의 하나 이상의 Fc 폴리펩티드에는 C-말단 라이신 잔기가 결여되어 있다. 일부 구현예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물의 모든 Fc 폴리펩티드에는 C-말단 라이신 잔기가 결여되어 있다. 일부 구현예에서, Fc-항원 결합 도메인 작제물의 하나 이상의 Fc 폴리펩티드에서의 C-말단 라이신의 부재는 Fc-항원 결합 도메인 작제물(예를 들어, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc-항원 결합 도메인 작제물)의 집단, 예컨대 적어도 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 균질한 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc-항원 결합 도메인 작제물의 집단의 균질성을 개선할 수 있다.

[0455] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 Fc-항원 결합 도메인 작제물의 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 또는 제6 폴리펩티드 중 하나 이상(예를 들어, 도 1의 폴리펩티드 102, 112, 및 114, 도 2의 202, 214, 216 및 218, 도 3의 302, 320 및 322, 도 4의 402, 428, 430 및 432, 도 5의 502, 524 및 526, 도 6의 602, 632, 634 및 636, 도 7의 702, 708, 722 및 724, 도 8의 802, 804, 826 및 828, 도 9의 902, 904, 934 및 936, 도 10의 1002, 1010, 1012, 1024, 1026 및 도 11의 1032, 1102, 1104, 1106, 1144, 1146 및 1148, 도 12의 1202, 1204, 1206, 1252, 1254 및 1256, 도 13의 1302, 1306 1320 및 1324, 도 14의 1402, 1404, 1426, 및 1428, 도 15의 1502, 1504, 1534 및 1536, 도 16의 1602, 1606, 1608, 1626, 1628 및 1632, 도 17의 1702, 1704, 1706, 1744, 1746 및 1748, 도 18의 1802, 1804, 1806, 1852, 1854 및 1856, 도 19의 1902, 1906, 1910, 1924, 1928 및 1932, 도 20의 2002, 2004, 2006, 2044, 2046 및 2048, 도 21의 2102, 2104, 2106, 2152, 2154 및 2156)의 N-말단 Asp는 Gln으로 돌연변이될 수 있다.

[0456] 본원의 실시예에 기재된 예시적인 Fc-항원 결합 도메인 작제물의 경우, Fc-항원 결합 도메인 작제물 1~21은 노브 및 홀 서브유닛에 각각 E357K 및 K370D 전하 쌍을 함유할 수 있다.

[0457] 본원에 기재된 예시적인 Fc-항원 결합 도메인 작제물(예를 들어 Fc-항원 결합 도메인 작제물 1~21) 중 어느 하나는 단일 Fc 도메인 및 CCR4 결합 도메인을 갖는 작제물에 비해 항체 의존성 세포독성(ADCC) 분석, 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP) 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC) 분석에서 강화된 효과기 기능을 가질 수 있고, 단일 Fc 도메인 및 CCR4 결합 도메인을 갖는 작제물에 의해 나타나지 않는 생물학적 활성을 포함할 수 있다.

[0458] **X. 숙주 세포 및 단백질 생산**

[0459] 본 개시 내용에서, 숙주 세포는 본원에 기재된 폴리펩티드 및 작제물을 이의 상응하는 핵산으로부터 발현하는 데 필요한 필수 세포 성분, 예컨대, 세포 기관을 포함하는 비히클을 지칭한다. 핵산은 당업계에 공지된 종래 기술(형질전환, 형질감염, 전기 천공법, 인산칼슘 침전, 직접 미세현미주입 등)에 의해 숙주 세포에 도입될 수 있는 핵산 벡터에 포함된다. 숙주 세포는 포유류, 세균, 진균 또는 곤충 기원 중 하나일 수 있다. 포유류 숙주 세포는 CHO(또는 CHO-유래 세포주, 예컨대, CHO-K1, CHO-DXB11 CHO-DG44), 쥐 숙주 세포(예컨대, NS0, Sp2/0), VERY, HEK (예컨대, HEK293), BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, CRL7030 및 HsS78Bst 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 단백질 작제물의 발현을 조절하거나, 원하는 특정 방식으로 단백질 산물을 변형하고 처리하는 숙주 세포가 또한 선택될 수 있다. 상이한 숙주 세포는 단백질 산물의 번역후 처리 및 변형을 위한 특징과 특정 매커니즘을 갖는다. 발현된 단백질의 올바른 변형 및 처리를 보장하기 위해 적절한 세포주 또는 숙주 시스템이 선택될 수 있다.

[0460] 상응하는 DNA 플라스미드 작제물에서 단백질 산물의 발현 및 분비를 위해, 숙주 세포는 프로모터, 인핸서, 서열, 전사 종결자, 폴리아데닐화 부위 및 선별 마커를 포함하여, 당업계에 알려진 적절한 발현 조절 요소에 의해 조절된 DNA로 형질 감염되거나 형질 전환될 수 있다. 치료 단백질의 발현 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, Paulina Balbas, Argelia Lorence (eds.)의 문헌[*재조합 Gene Expression: Reviews and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Humana Press; 2nd ed. 2004 edition (July 20, 2004)]; Vladimir Voynov 및 Justin A. Caravella (eds.)의 문헌[*Therapeutic Proteins: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)* Humana Press; 2nd ed. 2012 edition (June 28, 2012]을 참조한다.

[0461] **XI. 탈푸코실화**

[0462] 각 Fc 단량체는 Asn 297에 N-글리코실화 부위를 포함한다. 글리칸은 주어진 Fc 단량체에서 다수의 상이한 형태로 존재할 수 있다. 본원에 기재된 항원-결합 Fc 작제물 또는 항체 함유 조성물에서, 글리칸은 꽤 이종성일 수 있으며, 존재하는 글리칸의 성질은, 무엇보다도, 항체 또는 항원-결합 Fc 작제물을 생산하기 위해 사용되는 세포 유형, 세포의 성장 조건(성장 배지 포함) 및 생산후 정제에 따라 달라질 수 있다. 다양한 경우에, 본원에 기재된 작제물 또는 폴리펩티드 복합체 또는 폴리펩티드를 함유하는 조성물은 적어도 어느 정도까지는 탈푸코실화된다. 예를 들어, 조성물에 존재하는 글리칸(예를 들어, Fc 글리칸)의 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95%에는 푸코스 잔기가 결여되어 있다. 따라서, 5%~60%, 5%~50%, 5%~40%, 10%~50%, 10%~50%, 10%~40%, 20%~50% 또는 20%~40%의 글리칸에는 푸코스 잔기가 결여되어 있다. 적어도 어느 정도 탈푸코실화된 조성물은 1,3,4-Tri-O-아세틸-2-데옥시-2-플루오로-L-푸코스 억제제의 존재하에 항체를 생산하는 세포를 배양하여 생산될 수 있다. 본원에 기재된 작제물 및 폴리펩티드의 상대적으로 탈푸코실화된 형태는 FUT8의 발현이 감소되거나 없는 세포에서의 발현(예를 들어, FUT8을 녹아웃하거나 또는 RNAi(siRNA, miRNA 또는 shRNA)을 사용한 발현의 감소에 의해) 및 베타-1,4-만노실-당단백질 4-베타-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제(GnT-III)를 과발현하는 세포에서의 발현을 포함하는 다양한 다른 방법을 사용하여 생산

될 수 있다.

[0463] **XIII. 약학적 조성물/제제**

[0464] 본 개시 내용은 본원에 기재된 하나 이상의 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 일 구현예에서, 약학적 조성물은 구조가 동일하거나 실질적으로 균질한 Fc-항원 결합 도메인 작제물의 실질적으로 균질한 집단을 포함한다. 다양한 실시예에서, 약학적 조성물은 Fc-항원 결합 도메인 작제물 1~42 중 어느 하나의 실질적으로 균질한 집단을 포함한다.

[0465] 본 개시 내용의 치료 단백질 작제물, 예컨대, 본원에 기재된 Fc-항원 결합 도메인 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc-항원 결합 도메인 작제물)은 약학적 조성물에 혼입될 수 있다. 치료 단백질을 포함하는 약학적 조성물은 당업자에게 공지된 방법으로 제형화될 수 있다. 약학적 조성물은 물 또는 또 다른 약학적으로 허용 가능한 액체에 멸균 용액 또는 현탁액을 포함하는 주사 가능한 제형의 형태로 비경구 투여될 수 있다. 예를 들어, 약학적 조성물은 주사용 멸균수(WFI), 생리 식염수, 유화제, 현탁제, 계면활성제, 안정화제, 희석제, 결합제, 부형제와 같은 약학적으로 허용 가능한 비히클 또는 매질과 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 적합하게 배합한 다음, 일반적으로 허용되는 제약 관행에서 필요한 단위 용량 형태로 혼합함으로써 제형화될 수 있다. 약제(pharmaceutical preparation)에 포함된 유효 성분의 양은 지정된 범위 내에서 제공되는 적합한 용량이다.

[0466] 주사용 멸균 조성물은 비히클로서 주사용 증류수를 사용하여 통상적인 제약 관행에 따라 제형화될 수 있다. 예를 들어, 생리 식염수 또는 글루코스 및 D-소비톨, D-만노스, D-만니톨 및 염화나트륨과 같은 기타 보충제를 함유하는 등장액은 선택적으로 통상 당업계에 공지되어 있는 적합한 안정화제, 예를 들어, 에탄올과 같은 알코올 및 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 다가알코올, 및 폴리소르베이트 80™, HCO-50과 같은 비이온성 계면활성제 등과 조합하여 주사용 수용액으로 사용될 수 있다. 치료 단백질 산물을 위한 제형화 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예컨대, Banga (ed.)의 문헌[*Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing and Delivery Systems* (2d ed.) Taylor & Francis Group, CRC Press (2006)] 참조.

[0467] **XIV. 치료 방법 및 투여량**

[0468] 작제물을 사용하여 암, 예를 들어, 혈액학적 악성종양 및 고형 종양을 치료할 수 있다. 치료할 수 있는 암으로는 재발성 또는 불응성 성인 T 세포 백혈병/림프종이 있다. 성인T-세포 백혈병-림프종, 피부 T-세포 림프종, 말초 T-세포 림프종, 균상식육종, 세자리 증후군, 난소암, 교모세포종, 간세포 암종, 유방암, 위선암

[0469] 약학적 조성물은 투약 제형과 양립 가능한 방식으로 및 증상을 개선하거나 치료하는 치료 유효량과 같은 양으로 투여된다. 약학적 조성물은 다양한 투약 형태, 예컨대, 정맥내 투약 형태, 피하 투약 형태, 섭취 가능 용액, 약물 방출 캡슐 등과 같은 경구 투약 형태로 투여된다. 개별 대상에 대한 적절한 투여량은 치료 목적, 투여 경로 및 환자의 상태에 따라 다르다. 일반적으로, 재조합 단백질은 1~200 mg/kg, 예컨대, 1~100 mg/kg, 예컨대, 20~100 mg/kg으로 투여된다. 따라서, 최적의 치료 유효량을 얻기 위해 의료 제공자는 필요에 따라 투여량을 조정하고 적정하며 투여 경로를 수정해야 할 것이다.

[0470] 인간을 치료하는 것 외에도, 작제물을 사용하여 개와 고양이 같은 반려 동물뿐만 아니라 다른 수의학 대상을 치료할 수 있다.

[0471] **XV. 보체 의존성 세포독성(CDC)**

[0472] 본 개시 내용에 기재된 Fc-항원 결합 도메인 작제물은 다양한 Fc 수용체 매개 효과기 기능을 활성화할 수 있다. 항체와 식세포가 외부 병원체를 제거하는 능력을 강화하는 선천적 면역계의 일부인 보체 의존성 세포독성(CDC) 시스템은 면역계의 구성 요소이다. 다음의 3가지 생화학적 경로가 보체 시스템을 활성화한다: 고전적인 보체 경로, 대체 보체 경로, 및 렉틴 경로(이들 모두는 신호 전달 캐스케이드(signaling cascades) 및 복잡한 활성화의 세트를 수반함).

[0473] 고전적인 보체 경에서, IgG 또는 IgM는 보체 활성화를 유발한다. C1q 단백질은 항원에 결합한 후 이러한 항체에 결합하여 C1 복합체를 형성한다. 이러한 복합체는 C1 에스테라제를 생성하는데, 이는C4 및 C2 단백질을 C4a 및 C4b, 및 C2a 및 C2b로 절단하여 활성화한다. 이어서, C2a 및 C4b 단편은 C3 전환효소로 불리는 단백질 복합체를 형성하며, 이는 C3을 C3a 및 C3b로 절단하여, 신호 증폭 및 막 공격 복합체의 형성을 유도한다.

[0474] 본 발명의 Fc-항원 결합 도메인 작제물은 면역계에 의한 CDC 활성을 강화할 수 있다.

[0475] CDC는 Raji 세포(ATCC)를 연속 희석된 항체, Fc-항원 결합 도메인 작제물, 또는 IVIg로 코팅하는 비색 분석법을

사용하여 평가될 수 있다. 인간 혈청 보체(Quidel)를 25% v/v로 모든 웰에 첨가하고, 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션할 수 있다. WST-1 세포 증식 시약(Roche Applied Science)을 첨가한 후 세포를 37℃에서 12시간 동안 인큐베이션할 수 있다. 플레이트를 2분간 진탕기에 놓고, 450 nm에서 흡광도를 측정할 수 있다.

[0476] **XVI. 항체 의존성 세포-매개 세포독성(ADCC)**

[0477] 본 개시 내용의 Fc-항원 결합 도메인 작제물은 또한 면역계에 의해 항체 의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 활성을 강화할 수 있다. ADCC는 항체가 외부 병원체의 표면 항원과 결합하여 그들을 사멸의 표적으로 하는 적응 면역 시스템의 일부이다. ADCC 항체에 의한 자연 살해(NK) 세포의 활성화를 수반한다. NK 세포는 항체, 예컨대 IgG 및 IgM의 Fc 부분에 결합하는 Fc 수용체를 발현한다. 항체가 병원체에 감염된 표적 세포의 표면에 결합되면 이후에 NK 세포와 결합하여 이를 활성화한다. NK 세포는 IFN-γ와 같은 사이토카인과 퍼포린 및 그랜자임과 같은 단백질을 방출한다. 퍼포린은 칼슘의 존재 하에 올리고머화되는 기공 형성 세포용해소이다. 그랜자임은 표적 세포에서 프로그래밍된 세포 사멸을 유도하는 세린 프로테아제이다. NK 세포 외에, 대식세포, 호중구 및 호산구도 ADCC를 매개할 수 있다.

[0478] ADCC를 발광 분석을 사용하여 평가할 수 있다. 인간 1차 NK 효과기 세포(Hemacare)를 해동하고 37℃에서 하룻밤 동안 $5x10^5$개의/mL의 림프구 성장 배지-3(Lonza)에 정치시켰다. 다음날, 인간 림프아구성 세포주 Raji 표적 세포(ATCC CCL-86)를 회수하고, 분석 배지(페놀 레드 무함유 RPMI, 10% FBSΔ, GlutaMAX™)에 재현탁하고, 다양한 농도의 목적 프로브 각각의 존재 하에 37℃에서 30분 동안 플레이팅한다. 이어서, 정치시킨 NK 세포를 회수하고, 분석 배지에 재현탁하고, 항-CD20 코팅된 Raji 세포를 함유하는 플레이트에 첨가한다. 플레이트를 효과기-대-표적 세포의 최종 비율이 5:1($5x10^4$개의 NK 세포: $1x10^4$개의 Raji)가 되도록 37℃에서 6시간 동안 인큐베이션한다.

[0479] CytoTox-Glo™ 세포독성 분석 키트(Promega)를 사용하여 ADCC 활성을 결정한다. CytoTox-Glo™ 분석은 발광성 펩티드 기질을 사용하여, 막 무결성을 상실한 세포, 예를 들어 용해된 Raji 세포에 의해 방출된 죽은 세포 프로테아제 활성을 측정한다. 6시간 배양한 후, 준비한 시약(기질)을 플레이트의 각 웰에 첨가하고, 실온에서 15분 동안 오비탈 플레이트 진탕기에 넣었다. 발광을 PHERAstar F5 플레이트 판독기(BMG Labtech)를 사용하여 측정한다. 백그라운드를 제거하기 위해 대조 조건(NK 세포 + Raji만 해당)의 판독치를 시험 조건에서 뺀 후 데이터를 분석한다.

[0480] **XV. 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP)**

[0481] 본 개시 내용의 Fc-항원 결합 도메인 작제물은 또한 면역계에 의해 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP) 활성을 강화할 수 있다. 항체 옵소닌작용으로도 알려진 ADCP는 병원체가 식세포에 의해 섭취되어 제거되도록 표시되는 과정이다. 식세포는 유해한 외래 병원체와 죽거나 죽어가는 세포를 섭취하여 신체를 보호하는 세포이다. 이 과정은 병원체-관련 분자 패턴(PAMPS)에 의해 활성화되어 NF-κB 활성화로 이어진다. 이어서, C3b 및 항체와 같은 옵소닌은 표적 병원체에 부착할 수 있다. 표적이 옵소닌에 코팅되면 Fc 도메인은 Fc 수용체를 통해 식세포를 유인한다. 이어서, 식세포가 세포를 삼키고, 물질을 섭취한 식세포는 리소좀과 융합된다. 이어서, 후속하는 파골리소좀은 세포성 물질을 단백질 분해로 소화시킨다.

[0482] ADCP는 생물발광 분석을 사용하여 평가할 수 있다. 항체 의존성 세포-매개 식균작용(ADCP)은 치료 항체의 중요한 작용 매커니즘이다. ADCP는 FcγRIIa(CD32a), FcγRI(CD64) 및 FcγRIIIa(CD16a)를 통해 단핵구, 대식세포, 호중구 및 수지상 세포에 의해 매개될 수 있다. 3가지 수용체는 모두 항체 인식, 면역 수용체 클러스터링 및 ADCP를 유발하는 신호전달에 참여할 수 있지만, 차단 연구는 FcγRIIa가 이러한 과정에 관여하는 주요 Fcγ 수용체임을 시사한다.

[0483] FcγRIIa-H ADCP 수용체 Bioassay는 FcγRIIa에 특이적으로 결합하여 이를 활성화하는 Fc 도메인을 사용하여 항체 및 다른 생물 제제의 효능과 안정성을 측정하는 데 사용할 수 있는 생물발광 세포 기반 분석이다. 이러한 분석은 아미노산 131에 히스티딘(H)을 함유하는 고친화도 인간 FcγRIIa-H 변이체를 발현하는 유전자 조작 Jurkat T 세포주 및 NFAT-반응 요소(NFAT-RE)에 의해 유도되는 루시페라제 리포터로 구성된다.

[0484] 표적 세포 및 관련 항체와 공배양하는 경우, FcγRIIa-H 효과기 세포는 항체의 Fc 도메인에 결합하여 FcγRIIa 신호전달 및 NFAT-RE 매개 루시퍼라제 활성을 유발한다. 생물발광 신호는 루시퍼라제 분석과 표준 발광 측정기를 사용하여 검출되고 정량화된다.

[0485] **실시예**

[0486] 하기 실시예는 본원에 청구된 방법 및 화합물을 수행하고, 제조하고, 평가하는 방법의 완전한 개시 및 설명을 당업자에게 제공하기 위해 기재되며, 본 개시 내용의 온전히 예시를 위한 것으로, 본 발명자들이 개시 내용으로 간주하는 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0487] **실시예 1. CCR4 결합 도메인을 갖는 Fc-항원 결합 도메인 작제물 7의 설계 및 정제**

[0488] *단백질 발현*

[0489] Fc-항원 결합 도메인 작제물은 폴딩 효율을 증가시키고, 원치 않는 고분자량의 올리고머 및 다량체를 생성할 수 있는 서브유닛의 제어되지 않은 결합을 최소화하며, 실질적으로 균질한(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 98% or 99% 균질한) 제약적 용도를 위한 조성물을 생성하도록 설계된다. 이러한 목표를 고려하여, 분지점이 N-말단 Fc 도메인에 있는 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 형성된 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조하였다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 7(CCR4) 각각은 2개의 별개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드(항-CCR4 Fc 장쇄(서열 번호 ZZ1)의 2개의 카피, 및 Fc 단쇄(서열 번호 ZZ2)의 2개의 카피) 및 항-CCR4 경쇄 폴리펩티드(서열 번호 49)의 2개의 카피를 포함한다. Fc 장쇄는 전하-돌연변이된(K409D/D399K 돌연변이) Fc 도메인 단량체(동종이량체화를 촉진하기 위해) 및 N-말단에서의 항-CCR4 VH 및 CH1 도메인(EU 위치 1~220)과 함께 직렬로 E357K 전하 돌연변이 및 S354C 및 T366W 돌출부-형성 돌연변이(이종이량체화를 촉진하기 위해)를 갖는 Fc 도메인 단량체를 함유한다(작제물 7(CCR4)). Fc 단쇄는 K370D 전하 돌연변이 및 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V 함몰부-형성 돌연변이(이종이량체화를 촉진하기 위한)를 Fc 도메인 단량체를 함유한다. 항-CCR4 경쇄는 또한 scFv의 일부로서 Fc 장쇄의 N-말단에 융합되도록 발현될 수 있다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하였고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝하였다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입하였다. 표 4A 및 표 4B의 아미노산 서열을 3개의 별개의 플라스미드(경쇄(항-CCR4)를 암호화하는 하나의 플라스미드, Fc 장쇄(항-CCR4)를 암호화하는 하나의 플라스미드 및 Fc 단쇄를 암호화하는 하나의 플라스미드)에 의해 암호화하였다.

표 5

작제물 7(CCR4) 서열			
작제물	경쇄	Fc 장쇄 (항-CCR4 VH 및 CH1 포함)	Fc 단쇄
작제물 7 S3I (CCR4)	서열 번호 DVLMTQSPLSLPVTPGEPASIS CRSSRNIVHINGDTYLEWYLQK PGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCFQGSLLPWTFGQGTKVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	서열 번호 EVQLVESGGDLVQPGRSLRLSC AASGFIFSNYGMSWVRQAPGKG LEWVATISSASTYSYYPDSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRV EDTALYYCGRHSDGNFAFGYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGG GGGGGGGDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	서열 번호 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVDGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG

[0490]

[0491] 발현된 단백질을 Poros MabCapture A(LifeTechnologies) 컬럼을 사용하는 단백질 A-기반 친화 컬럼크로마토그래피에 의해 세포 배양 상청액으로부터 정제하였다. 포획된 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 인산염 완충 식염수로 세정하고(저염 세정) pH 3, 100 mM 글리신으로 용리하였다. 용출액을 1 M TRIS(pH 7.4)의 첨가로 빠르게 중화하였고, 0.2 μm 필터로 멸균 여과한다. 단백질을 Poros XS 수지(Applied Biosciences)를 사용하여 이온 교환 크로마토그래피에 의해 추가로 분획하였다. 컬럼을 50 mM MES, pH 6(완충액 A)로 사전 평형화하고 샘플을 용출 완충액으로서 50 mM MES, 400 mM 염화나트륨, pH 6(완충액 B)을 사용하여 단계 구배로 용리한다. 이온 교환 후에, 표적 분획을 접선 유동 여과 시스템 상에서 10 kDa 컷오프 폴리에테르설폰(PES) 막 카트리지를 사용하여 PBS로 완충액 교환한다. 샘플을 대략 30 mg/mL로 농축하였고 0.2 μm 필터로 멸균 여과하였다.

[0492] *비환원 황산도데실나트륨-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)*

[0493] 샘플을 95℃에서 10분간 Laemmli 샘플 완충액(4% SDS, Bio-Rad)에서 변성시켰다. Criterion TGX 무착색(stain-free) 겔(4~15% 폴리아크릴아미드, Bio-Rad)상에 샘플을 흘렸다. 단백질 밴드를 UV 조사 또는 쿠마시 블루(Coommassie blue) 염색으로 시각화하였다. ChemiDoc MP Imaging System(Bio-Rad)으로 겔을 이미지화하였다. Imagelab 4.0.1 소프트웨어(Bio-Rad)를 사용하여 밴드의 정량화를 수행한다.

[0494] **실시예 2. CCR4 결합 도메인을 갖는 Fc-항원 결합 도메인 작제물 13의 설계 및 정제**

[0495] 단백질 발현

[0496] 분지점이 C-말단 Fc 도메인에 있는 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 형성된 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조하였다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 13(CCR4) 각각은 2개의 별개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드(항-CCR4 Fc 장쇄(서열 번호 ZZ중 어느 하나)의 2개의 카피, 및 Fc 단쇄(서열 번호 ZZ)의 2개의 카피) 및 항-CCR4 경쇄 폴리펩티드(서열 번호 ZZ)의 2개의 카피를 포함한다. Fc 장쇄는 E357K 전하 돌연변이 및 S354C 및 T366W 돌출부-형성 돌연변이(이종이량체화를 촉진하기 위해)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 항-CCR4 VH 및 CH1 도메인(EU 위치 1~220)와 직렬로 전하-돌연변이된(K409D/D399K 돌연변이) Fc 도메인 단량체(동종이량체화를 촉진하기 위해)를 함유한다(작제물 13(CCR4)). Fc 단쇄는 K370D 전하 돌연변이 및 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V 함몰부-형성 돌연변이(이종이량체화를 촉진하기 위한)를 Fc 도메인 단량체를 함유한다. 항-CCR4 경쇄 및 항-CCR4 VH 및 CH1은 모가물리주맙으로부터 취득하였다. CCR4 경쇄는 또한 scFv의 일부로서 Fc 장쇄의 N-말단에 융합되도록 발현될 수 있다. 작제물 13의 다른 버전은 항-CCR4 중쇄로 제조될 수 있으며, 여기서 각각의 버전은 Fc 장쇄 폴리펩티드 내의 Fc 도메인 단량체 사이에 상이한 크기의 글리신 스페이서(G4, G10, G15 또는 G20 링커)를 갖는다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 다음의 작제물 각각에 대한 아미노산 서열을 3개의 별개의 플라스미드(경쇄(항-CCR4)를 암호화하는 하나의 플라스미드, Fc 장쇄(항-CCR4)를 암호화하는 하나의 플라스미드 및 Fc 단쇄를 암호화하는 하나의 플라스미드)에 의해 암호화하였다.

표 6

작제물 13 (CCR4) 서열			
작제물	경쇄	Fc 장쇄 (항-CCR4 VH 및 CH1)	Fc 단쇄
작제물 13 (CCR4), G_{20} 링커	서열 번호 DVLMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSRNIVHINGDTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSLLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGDLVQPGRSLRLSCAASGFIFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVATISSASTYSYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRVEDTALYYCGRHSDGNFAFGYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0497]

[0498] 발현된 단백질을 Poros MabCapture A 컬럼을 사용하여 단백질 A-기반 친화성 컬럼 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상청액으로부터 정제한다. 포획된 SIF-Body 작제물을 로딩 후 인산염 완충 식염수(PBS, pH 7.0)로 세정하고, 추가 공정 관련 불순물을 제거하기 위해 중간 세정 완충액 50 mM 구연산염 완충액(pH 5.5)으로 추가 세정한다. 결합된 SIF-Body 물질을 pH 3의 100 mM 글리신으로 용리하고, pH 7.4의 1 M TRIS를 첨가하여 용리액을 신속하게 중화한 후, 원심분리하고, 0.2 μm 필터를 통해 멸균 여과한다.

[0499] Poros XS 수지를 사용하여 이온 교환 크로마토그래피에 의해 단백질을 추가로 분별한다. pH 6의 50 mM MES(완충액 A)로 컬럼을 사전 평형화하고, 로딩을 위해 샘플을 평형화 완충액에 (1:3으로) 희석한다. 용리 완충액으로서 50 mM MES(100% A)에서 pH 6의 400 mM 염화나트륨(100% B)까지의 12~15 CV 선형 구배를 사용하여 샘플을 용리한다. 용리 동안 수집된 모든 분획은 분석용 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로 분석하고, 표적 분획을 풀링하여 정제된 SIF-Body 재료를 생성한다.

[0500] 이온 교환 후, 풀링된 물질을 접선 유동 여과 시스템에서 30 kDa 컷오프 폴리에테르 설폰(PES) 막 카트리지를 사용하여 1X-PBS 완충액으로 완충액 교환한다. 샘플을 약 10~15 mg/mL로 농축하고, 0.2 μm 필터를 통해 멸균 여과한다.

[0501] 분석용 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 포스트 단백질 A, 풀링된 이온-교환 분획 및 최종 정제된 재료에 대한 순도를 평가한다. 정제된 재료를 1X-PBS를 사용하여 1 mg/ml로 희석하고, 분석 컬럼으로 Zenix SEC-300(4.6 x 300 mm, 3 μm, 300 Å, Sepax, Cat. #213300-4630)을 사용하여 UV & FLD 검출기를 포함하는 Agilent 1200 시스템 상에서 분석하였다. 컬럼을 분석 전에 1시간 동안 0.3 ml/min로 0.05% w/v 아지드화나트륨 완충액으로 100 mM 인산나트륨, 200 mM 아르기닌, 300 mM 염화나트륨 pH=6.7로 평형화한다. 주입량 약 10~15 ul, 컬럼 온도: 300C, 280 nm에서 UV 검출 및 280 mm에서 여기 및 330 nm에서 방출을 갖는 FLD(총 실행 시간:15분).

[0502] 내독소 수준은 Charles Rivers Labs의 Endosafe®-PTS 내독소 테스트 시스템을 사용하여 측정된다. 프로브를 정제하기 전에, AKTA 정제 시스템 및 컬럼의 내독소 수준을 세정 및 평형화 후 확인하여 내독소 오염이 없음을 확인한다. 프로브는 전형적으로 각 정제 단계가 끝날 때 0.22 μm 필터를 통해 여과되어, 입자와 박테리아를 걸러낸 다음 내독소에 대해 확인한다. 완충액과 프로브는 LAL 시약 물(Charles River Labs, cat. # W130)로 10X 내지 20X 사이로 희석되고 Charles River Labs Endosafe®-PTS 카트리지(0.005 EU/ml, cat. # PTS20005F 또는 0.01 EU/ml, cat. # PTS2001F) 중 하나를 사용하여 시험한다.

[0503] **실시예 3. Fc-항원 결합 도메인 작제물 1의 설계 및 정제**

[0504] 비대칭 직렬 Fc 도메인으로부터 형성된 비분지형 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조한다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 1(도 1)은 2개의 별개 Fc 단량체 함유 폴리펩티드(Fc 장쇄 및 Fc 단쇄의 2개의 카피) 및 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. Fc 장쇄는 직렬 연결된 2개의 Fc 도메인 단량체(각각은 표 3에서 선택된 적어도 하나의 돌출부-형성 돌연변이(예컨대, S354C 및 T366W 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 돌출부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)(이종이량체화를 촉진하기 위해)를 가짐), 및 N-말단에 CCR4 결합 도메인을 포함한다. CCR4 결합 도메인은 (예를 들어, scFv를 형성하기 위해) Fc 장쇄와 동일한 아미노산 서열의 일부로서 발현될 수 있다. Fc 단쇄는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 함몰부-형성 돌연변이(예컨대, Y349C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 함몰부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)(이종이량체화를 촉진하기 위해)를 갖는 Fc 도메인 단량체를 포함한다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 짧은 Fc 사슬 및 긴 Fc 사슬에 대한 아미노산 서열은 2개의 개별 플라스미드에 의해 암호화된다. 본 실시예에서 및 Fc- 항원 결합 도메인 작제물 2~42에 대한 하기 실시예 각각에서, 세포는 항체 가변 경쇄를 발현하는 제3 플라스미드를 함유할 수 있다.

[0505] 발현된 단백질을 Poros MabCapture A(LifeTechnologies) 컬럼을 사용하는 단백질 A-기반 친화 컬럼 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상청액에서부터 정제한다. 포획된 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 인산염 완충 식염수로 세정하고(저염 세정) pH 3, 100 mM 글리신으로 용리한다. 용리액을 1 M TRIS(pH 7.4)의 첨가로 빠르게 중화하였고, 0.2 μm 필터로 멸균 여과한다. 단백질을 Poros XS 수지(Applied Biosciences)를 사용하여 이온 교환 크로마토그래피에 의해 추가로 분획화한다. 컬럼을 50 mM MES, pH 6(완충액 A)로 사전 평형화하고 샘플을 용리 완충액으로서 50 mM MES, 400 mM 염화나트륨, pH 6(완충액 B)을 사용하여 단계 구배로 용리한다. 이온 교환 후에, 표적 분획을 접선 유동 여과 시스템 상에서 10 kDa 컷오프 폴리에테르설폰(PES) 막 카트리지를 사용하여 PBS로 완충액 교환한다. 샘플을 약 30 mg/mL로 농축하고, 0.2 μm 필터를 통해 멸균 여과한다.

[0506] 샘플을 95℃에서 10분간 Laemmli 샘플 완충액(4% SDS, Bio-Rad)에서 변성시킨다. Criterion TGX 무착색(stain-free) 겔(4~15% 폴리아크릴아미드, Bio-Rad)상에 샘플을 흘린다. 단백질 밴드를 UV 조사 또는 쿠마시 블루(Coommassie blue) 염색으로 시각화한다. ChemiDoc MP Imaging System(Bio-Rad)으로 겔을 이미지화한다.

Imagelab 4.0.1 소프트웨어(Bio-Rad)를 사용하여 밴드의 정량화를 수행한다.

[0507] **실시예 4. Fc-항원 결합 도메인 작제물 2의 설계 및 정제**

[0508] 비대칭 직렬 Fc 도메인으로부터 형성된 비분지형 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조한다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 2(도 2)는 2개의 별개 Fc 단량체 함유 폴리펩티드(Fc 장쇄 및 Fc 단쇄의 3개의 카피) 및 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. Fc 장쇄는 N-말단에 CCR4 결합 도메인과 직렬 연결된 3개의 Fc 도메인 단량체를 함유하며, 여기서 각각의 Fc 도메인 단량체는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 돌출부-형성 돌연변이(예컨대, S354C 및 T366W 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 돌출부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 갖는다. Fc 단쇄는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 함몰부-형성 돌연변이(예컨대, Y349C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 함몰부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체를 함유한다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 짧은 Fc 사슬 및 긴 Fc 사슬에 대한 아미노산 서열은 2개의 개별 플라스미드에 의해 암호화된다. 발현된 단백질은 실시예 3에서와 같이 정제된다.

[0509] **실시예 5. Fc-항원 결합 도메인 작제물 3의 설계 및 정제**

[0510] 직렬 Fc 도메인으로부터 형성된 비분지형 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조한다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 3(도 3)은 2개의 별개 Fc 단량체 함유 폴리펩티드(Fc 장쇄 및 Fc 단쇄의 2개의 카피) 및 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. Fc 장쇄는 직렬로 2개의 Fc 도메인 단량체를 함유하며, 여기서 각각의 Fc 도메인 단량체는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 돌출부-형성 돌연변이(예컨대, S354C 및 T366W 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 돌출부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 갖는다. Fc 단쇄는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 함몰부-형성 돌연변이(예컨대, Y349C, T366S, L368A, 및 Y407V 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 함몰부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 CCR4 결합 도메인을 함유한다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 짧은 Fc 사슬 및 긴 Fc 사슬에 대한 아미노산 서열은 2개의 개별 플라스미드에 의해 암호화된다. 발현된 단백질은 실시예 3에서와 같이 정제된다.

[0511] **실시예 6. Fc-항원 결합 도메인 작제물 4의 설계 및 정제**

[0512] 직렬 Fc 도메인으로부터 형성된 비분지형 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조한다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 4(도 4)는 2개의 별개 Fc 단량체 함유 폴리펩티드(Fc 장쇄 및 Fc 단쇄의 3개의 카피) 및 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. Fc 장쇄는 직렬로 3개의 Fc 도메인 단량체를 함유하며, 여기서 각각의 Fc 도메인 단량체는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 돌출부-형성 돌연변이(예컨대, S354C 및 T366W 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 돌출부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 갖는다. Fc 단쇄는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 함몰부-형성 돌연변이(예컨대, Y349C, T366S, L368A, 및 Y407V 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 함몰부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 CCR4 결합 도메인을 함유한다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 짧은 Fc 사슬 및 긴 Fc 사슬에 대한 아미노산 서열은 2개의 개별 플라스미드에 의해 암호화된다. 발현된 단백질은 실시예 3에서와 같이 정제된다.

[0513] **실시예 7. Fc-항원 결합 도메인 작제물 5의 설계 및 정제**

[0514] 직렬 Fc 도메인으로부터 형성된 비분지형 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조한다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 5(도 5)는 2개의 별개 Fc 단량체 함유 폴리펩티드(Fc 장쇄 및 Fc 단쇄의 2개의 카피) 및 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. Fc 장쇄는 N-말단에 CCR4 결합 도메인과 직렬 연결된 2개의 Fc 도메인 단량체를 함유하며, 여기서 각각의 Fc 도메인 단량체는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 돌출부-형성 돌연변이(예컨대, S354C 및 T366W 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 돌출부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 갖는다. Fc 단쇄는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 함몰부-형성 돌연변이(예컨대, Y349C, T366S, L368A, 및 Y407V 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 함몰부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 CCR4 결합 도메인을 함유한다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다.

DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. Fc 단쇄 및 Fc 단쇄에 대한 아미노산 서열은 2개의 개별 플라스미드에 의해 암호화된다. 발현된 단백질은 실시예 3에서와 같이 정제된다.

[0515] **실시예 8. Fc-항원 결합 도메인 작제물 6의 설계 및 정제**

[0516] 직렬 Fc 도메인으로부터 형성된 비분지형 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조한다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 6(도 6)은 2개의 별개 Fc 단량체 함유 폴리펩티드(Fc 장쇄 및 Fc 단쇄의 3개의 카피) 및 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. Fc 장쇄는 N-말단에 CCR4 결합 도메인과 직렬 연결된 3개의 Fc 도메인 단량체를 함유하며, 여기서 각각의 Fc 도메인 단량체는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 돌출부-형성 돌연변이(예컨대, S354C 및 T366W 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 돌출부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 갖는다. Fc 단쇄는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 함몰부-형성 돌연변이(예컨대, Y349C, T366S, L368A, 및 Y407V 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 함몰부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 CCR4 결합 도메인을 함유한다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 짧은 Fc 사슬 및 긴 Fc 사슬에 대한 아미노산 서열은 2개의 개별 플라스미드에 의해 암호화된다. 발현된 단백질은 실시예 3에서와 같이 정제된다.

[0517] **실시예 9. Fc-항원 결합 도메인 작제물 7의 설계 및 정제**

[0518] 분지점이 N-말단 Fc 도메인에 있는 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 형성된 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조하였다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 7(도 7)은 2개의 별개 Fc 단량체 함유 폴리펩티드(Fc 장쇄의 2개의 카피 및 Fc 단쇄의 2개의 카피) 및 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. Fc 장쇄는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 역전하 돌연변이(예컨대, K409D/D399K 돌연변이)를 갖는 Fc 도메인 단량체와 직렬 연결된, 표 3에서 선택된 적어도 하나의 돌출부-형성 돌연변이(예컨대, S354C 및 T366W 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 돌출부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 CCR4 결합 도메인을 포함한다. Fc 단쇄는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 함몰부-형성 돌연변이(예컨대, Y349C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 함몰부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체를 함유한다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 짧은 Fc 사슬 및 긴 Fc 사슬에 대한 아미노산 서열은 2개의 개별 플라스미드에 의해 암호화된다. 발현된 단백질은 실시예 3에서와 같이 정제된다.

[0519] **실시예 10. Fc-항원 결합 도메인 작제물 8의 설계 및 정제**

[0520] 분지점이 N-말단 Fc 도메인에 있는 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 형성된 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조하였다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 8(도 8)은 2개의 별개 Fc 단량체 함유 폴리펩티드(Fc 장쇄의 2개의 카피 및 Fc 단쇄의 2개의 카피) 및 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. Fc 장쇄는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 역전하 돌연변이(예컨대, K409D/D399K 돌연변이)를 갖는 Fc 도메인 단량체와 직렬 연결된, 표 3에서 선택된 적어도 하나의 돌출부-형성 돌연변이(예컨대, S354C 및 T366W 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 돌출부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 갖는 Fc 도메인 단량체를 포함한다. Fc 단쇄는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 함몰부-형성 돌연변이(예컨대, Y349C, T366S, L368A, 및 Y407V 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 함몰부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 CCR4 결합 도메인을 포함한다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 짧은 Fc 사슬 및 긴 Fc 사슬에 대한 아미노산 서열은 2개의 개별 플라스미드에 의해 암호화된다. 발현된 단백질은 실시예 3에서와 같이 정제된다.

[0521] **실시예 11. Fc-항원 결합 도메인 작제물 9의 설계 및 정제**

[0522] 분지점이 N-말단 Fc 도메인에 있는 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 형성된 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조하였다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 9(도 9)는 2개의 별개 Fc 단량체 함유 폴리펩티드(Fc 장쇄의 2개의 카피 및 Fc 단쇄의 2개의 카피) 및 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. Fc 장쇄는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 역전하 돌연변이(예컨대, K409D/D399K 돌연변이)를 갖는 Fc 도메인 단량체와 직렬 연결된, 표 3에서 선택된 적어도 하나의

돌출부-형성 돌연변이(예컨대, S354C 및 T366W 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 돌출부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 CCR4 결합 도메인을 포함한다. Fc 단쇄는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 함몰부-형성 돌연변이(예컨대, Y349C, T366S, L368A, 및 Y407V 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 함몰부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 CCR4 결합 도메인을 포함한다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 짧은 Fc 사슬 및 긴 Fc 사슬에 대한 아미노산 서열은 2개의 개별 플라스미드에 의해 암호화된다. 발현된 단백질은 실시예 3에서와 같이 정제된다.

[0523] **실시예 12. Fc-항원 결합 도메인 작제물 10의 설계 및 정제**

[0524] 분지점이 N-말단 Fc 도메인에 있는 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 형성된 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조하였다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 10(도 10)은 2개의 별개 Fc 단량체 함유 폴리펩티드(Fc 장쇄의 2개의 카피 및 Fc 단쇄의 4개의 카피) 및 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. Fc 장쇄는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 역전하 돌연변이(예컨대, K409D/D399K 돌연변이)를 갖는 Fc 도메인 단량체와 직렬 연결된, 표 3에서 선택된 적어도 하나의 돌출부-형성 돌연변이(예컨대, S354C 및 T366W 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 돌출부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 각각 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 CCR4 결합 도메인을 포함한다. Fc 단쇄는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 함몰부-형성 돌연변이(예컨대, Y349C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 함몰부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체를 함유한다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 짧은 Fc 사슬 및 긴 Fc 사슬에 대한 아미노산 서열은 2개의 개별 플라스미드에 의해 암호화된다. 발현된 단백질은 실시예 3에서와 같이 정제된다.

[0525] **실시예 13. Fc-항원 결합 도메인 작제물 11의 설계 및 정제**

[0526] 분지점이 N-말단 Fc 도메인에 있는 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 형성된 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조하였다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 11(도 11)은 2개의 별개 Fc 단량체 함유 폴리펩티드(Fc 장쇄의 2개의 카피 및 Fc 단쇄의 4개의 카피) 및 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. Fc 장쇄는 N-말단에서 표 4A 및 표 4B에서 선택된 역전하 돌연변이(예컨대, K409D/D399K 돌연변이)를 갖는 Fc 도메인 단량체와 직렬 연결된, 표 3에서 선택된 적어도 하나의 돌출부-형성 돌연변이(예컨대, S354C 및 T366W 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 돌출부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 각각 갖는 Fc 도메인 단량체를 포함한다. Fc 단쇄는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 함몰부-형성 돌연변이(예컨대, Y349C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 함몰부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 항원 결합 도메인을 포함한다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 짧은 Fc 사슬 및 긴 Fc 사슬에 대한 아미노산 서열은 2개의 개별 플라스미드에 의해 암호화된다. 발현된 단백질은 실시예 3에서와 같이 정제된다.

[0527] **실시예 14. Fc-항원 결합 도메인 작제물 12의 설계 및 정제**

[0528] 분지점이 N-말단 Fc 도메인에 있는 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 형성된 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조하였다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 12(도 12)는 2개의 별개 Fc 단량체 함유 폴리펩티드(Fc 장쇄의 2개의 카피 및 Fc 단쇄의 4개의 카피) 및 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. Fc 장쇄는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 역전하 돌연변이(예컨대, K409D/D399K 돌연변이)를 갖는 Fc 도메인 단량체와 직렬 연결된, 표 3에서 선택된 적어도 하나의 돌출부-형성 돌연변이(예컨대, S354C 및 T366W 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 돌출부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 각각 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 CCR4 결합 도메인을 포함한다. Fc 단쇄는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 함몰부-형성 돌연변이(예컨대, Y349C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 함몰부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 항원 결합 도메인을 포함한다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유

류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 짧은 Fc 사슬 및 긴 Fc 사슬에 대한 아미노산 서열은 2개의 개별 플라스미드에 의해 암호화된다. 발현된 단백질은 실시예 3에서와 같이 정제된다.

[0529] **실시예 15. Fc-항원 결합 도메인 작제물 13의 설계 및 정제**

[0530] 분지점이 C-말단 Fc 도메인에 있는 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 형성된 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조하였다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 13(도 13)은 2개의 별개 Fc 단량체 함유 폴리펩티드(Fc 장쇄의 2개의 카피 및 Fc 단쇄의 2개의 카피) 및 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. Fc 장쇄는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 돌출부-형성 돌연변이(예컨대, S354C 및 T366W 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 돌출부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 갖는 Fc 도메인 단량체와 직렬 연결된, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 역전하 돌연변이(예컨대, K409D/D399K 돌연변이)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 CCR4 결합 도메인을 포함한다. Fc 단쇄는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 함몰부-형성 돌연변이(예컨대, Y349C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 함몰부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체를 함유한다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 짧은 Fc 사슬 및 긴 Fc 사슬에 대한 아미노산 서열은 2개의 개별 플라스미드에 의해 암호화된다. 발현된 단백질은 실시예 3에서와 같이 정제된다.

[0531] **실시예 16. Fc-항원 결합 도메인 작제물 14의 설계 및 정제**

[0532] 분지점이 C-말단 Fc 도메인에 있는 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 형성된 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조하였다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 14(도 14)는 2개의 별개 Fc 단량체 함유 폴리펩티드(Fc 장쇄의 2개의 카피 및 Fc 단쇄의 2개의 카피) 및 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. Fc 장쇄는 N-말단에서 표 3에서 선택된 적어도 하나의 돌출부-형성 돌연변이(예컨대, S354C 및 T366W 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 돌출부 및, 선택적으로, 표 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 갖는 Fc 도메인 단량체와 직렬 연결된, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 역전하 돌연변이(예컨대, K409D/D399K 돌연변이)를 갖는 Fc 도메인 단량체를 포함한다. Fc 단쇄는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 함몰부-형성 돌연변이(예컨대, Y349C, T366S, L368A, 및 Y407V 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 함몰부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 CCR4 결합 도메인을 포함한다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 짧은 Fc 사슬 및 긴 Fc 사슬에 대한 아미노산 서열은 2개의 개별 플라스미드에 의해 암호화된다. 발현된 단백질은 실시예 3에서와 같이 정제된다.

[0533] **실시예 17. Fc-항원 결합 도메인 작제물 15의 설계 및 정제**

[0534] 분지점이 C-말단 Fc 도메인에 있는 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 형성된 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조하였다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 15(도 15)는 2개의 별개 Fc 단량체 함유 폴리펩티드(Fc 장쇄의 2개의 카피 및 Fc 단쇄의 2개의 카피) 및 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. Fc 장쇄는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 돌출부-형성 돌연변이(예컨대, S354C 및 T366W 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 돌출부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 갖는 Fc 도메인 단량체와 직렬 연결된, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 역전하 돌연변이(예컨대, K409D/D399K 돌연변이)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 CCR4 결합 도메인을 포함한다. Fc 단쇄는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 함몰부-형성 돌연변이(예컨대, Y349C, T366S, L368A, 및 Y407V 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 함몰부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 CCR4 결합 도메인을 포함한다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 짧은 Fc 사슬 및 긴 Fc 사슬에 대한 아미노산 서열은 2개의 개별 플라스미드에 의해 암호화된다. 발현된 단백질은 실시예 3에서와 같이 정제된다.

[0535] **실시예 18. Fc-항원 결합 도메인 작제물 16의 설계 및 정제**

[0536] 분지점이 C-말단 Fc 도메인에 있는 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 형성된 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조하였다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 16(도 16)은 2개의 별개 Fc 단량체 함유 폴리펩티드(Fc 장쇄의 2개의 카

피 및 Fc 단쇄의 4개의 카피) 및 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. Fc 장쇄는 각각이 표 3에서 선택된 적어도 하나의 돌출부-형성 돌연변이(예컨대, S354C 및 T366W 돌연변이)를 도입하여 만들어진 2개의 유전자 조작 돌출부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 갖는 Fc 도메인 단량체와 직렬 연결된, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 역전하 돌연변이(예컨대, K409D/D399K 돌연변이)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 CCR4 결합 도메인을 포함한다. Fc 단쇄는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 함몰부-형성 돌연변이(예컨대, Y349C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 함몰부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체를 함유한다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 짧은 Fc 사슬 및 긴 Fc 사슬에 대한 아미노산 서열은 2개의 개별 플라스미드에 의해 암호화된다. 발현된 단백질은 실시예 3에서와 같이 정제된다.

[0537] **실시예 19. Fc-항원 결합 도메인 작제물 17의 설계 및 정제**

[0538] 분지점이 C-말단 Fc 도메인에 있는 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 형성된 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조하였다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 17(도 17)은 2개의 별개 Fc 단량체 함유 폴리펩티드(Fc 장쇄의 2개의 카피 및 Fc 단쇄의 4개의 카피) 및 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. Fc 장쇄는 N-말단에서 각각이 표 3에서 선택된 적어도 하나의 돌출부-형성 돌연변이(예컨대, S354C 및 T366W 돌연변이)를 도입하여 만들어진 2개의 유전자 조작 돌출부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 갖는 Fc 도메인 단량체와 직렬 연결된, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 역전하 돌연변이(예컨대, K409D/D399K 돌연변이)를 갖는 Fc 도메인 단량체를 포함한다. Fc 단쇄는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 함몰부-형성 돌연변이(예컨대, Y349C, T366S, L368A, 및 Y407V 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 함몰부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 CCR4 결합 도메인을 포함한다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 짧은 Fc 사슬 및 긴 Fc 사슬에 대한 아미노산 서열은 2개의 개별 플라스미드에 의해 암호화된다. 발현된 단백질은 실시예 3에서와 같이 정제된다.

[0539] **실시예 20. Fc-항원 결합 도메인 작제물 18의 설계 및 정제**

[0540] 분지점이 C-말단 Fc 도메인에 있는 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 형성된 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조하였다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 18(도 18)은 2개의 별개 Fc 단량체 함유 폴리펩티드(Fc 장쇄의 2개의 카피 및 Fc 단쇄의 4개의 카피) 및 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. Fc 장쇄는 각각이 표 3에서 선택된 적어도 하나의 돌출부-형성 돌연변이(예컨대, S354C 및 T366W 돌연변이)를 도입하여 만들어진 2개의 유전자 조작 돌출부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 갖는 Fc 도메인 단량체와 직렬 연결된, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 역전하 돌연변이(예컨대, K409D/D399K 돌연변이)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 CCR4 결합 도메인을 포함한다. Fc 단쇄는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 함몰부-형성 돌연변이(예컨대, Y349C, T366S, L368A, 및 Y407V 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 함몰부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 CCR4 결합 도메인을 포함한다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 짧은 Fc 사슬 및 긴 Fc 사슬에 대한 아미노산 서열은 2개의 개별 플라스미드에 의해 암호화된다. 발현된 단백질은 실시예 3에서와 같이 정제된다.

[0541] **실시예 21. Fc-항원 결합 도메인 작제물 19의 설계 및 정제**

[0542] 분지점이 N-말단 또는 C-말단 Fc 도메인에 없는 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 형성된 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조하였다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 19(도 19)는 2개의 별개 Fc 단량체 함유 폴리펩티드(Fc 장쇄의 2개의 카피 및 Fc 단쇄의 4개의 카피) 및 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. Fc 장쇄는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 역전하 돌연변이(예컨대, K409D/D399K 돌연변이)를 갖는 Fc 도메인 단량체와 직렬 연결된, 표 3에서 선택된 적어도 하나의 돌출부-형성 돌연변이(예컨대, S354C 및 T366W 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 돌출부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 표 3에서 선택된 적어도 하나의 돌출부-형성 돌연변이(예컨대, S354C 및 T366W 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 돌출부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이

(예컨대, E357K)를 갖는 다른 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 CCR4 결합 도메인을 포함한다. Fc 단쇄는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 함몰부-형성 돌연변이(예컨대, Y349C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 함몰부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체를 함유한다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 짧은 Fc 사슬 및 긴 Fc 사슬에 대한 아미노산 서열은 2개의 개별 플라스미드에 의해 암호화된다. 발현된 단백질은 실시예 3에서와 같이 정제된다.

[0543] **실시예 22. Fc-항원 결합 도메인 작제물 20의 설계 및 정제**

[0544] 분지점이 C-말단 Fc 도메인에 있는 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 형성된 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조하였다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 20(도 20)은 2개의 별개 Fc 단량체 함유 폴리펩티드(Fc 장쇄의 2개의 카피 및 Fc 단쇄의 4개의 카피) 및 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. Fc 장쇄는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 역전하 돌연변이(예컨대, K409D/D399K 돌연변이)를 갖는 Fc 도메인 단량체와 직렬 연결된, 표 3에서 선택된 적어도 하나의 돌출부-형성 돌연변이(예컨대, S354C 및 T366W 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 돌출부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 표 3에서 선택된 적어도 하나의 돌출부-형성 돌연변이(예컨대, S354C 및 T366W 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 돌출부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 갖는 다른 Fc 도메인 단량체를 N-말단에 포함한다. Fc 단쇄는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 함몰부-형성 돌연변이(예컨대, Y349C, T366S, L368A, 및 Y407V 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 함몰부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 ***N-말단에서*** CCR4 결합 도메인을 포함한다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 짧은 Fc 사슬 및 긴 Fc 사슬에 대한 아미노산 서열은 2개의 개별 플라스미드에 의해 암호화된다. 발현된 단백질은 실시예 3에서와 같이 정제된다.

[0545] **실시예 23. Fc-항원 결합 도메인 작제물 21의 설계 및 정제**

[0546] 분지점이 C-말단 Fc 도메인에 있는 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 형성된 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조하였다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 21(도 21)은 2개의 별개 Fc 단량체 함유 폴리펩티드(Fc 장쇄의 2개의 카피 및 Fc 단쇄의 4개의 카피) 및 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. Fc 장쇄는 표 4A 및 표 4B에서 선택된 역전하 돌연변이(예컨대, K409D/D399K 돌연변이)를 갖는 Fc 도메인 단량체와 직렬 연결된, 표 3에서 선택된 적어도 하나의 돌출부-형성 돌연변이(예컨대, S354C 및 T366W 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 돌출부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 표 3에서 선택된 적어도 하나의 돌출부-형성 돌연변이(예컨대, S354C 및 T366W 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 돌출부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 갖는 다른 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 CCR4 결합 도메인을 포함한다. Fc 단쇄는 표 3에서 선택된 적어도 하나의 함몰부-형성 돌연변이(예컨대, Y349C, T366S, L368A, 및 Y407V 돌연변이)를 도입하여 만들어진 유전자 조작 함몰부 및, 선택적으로, 표 4A 및 표 4B에서 선택된 하나 이상의 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 CCR4 결합 도메인을 포함한다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 짧은 Fc 사슬 및 긴 Fc 사슬에 대한 아미노산 서열은 2개의 개별 플라스미드에 의해 암호화된다. 발현된 단백질은 실시예 3에서와 같이 정제된다.

[0547] **실시예 24. Fc-항원 결합 도메인 작제물에 의한 CDC, ADCP 및 ADCC 활성화**

[0548] 세 가지 분석을 사용하여 모 mAb 및 다양한 Fc-항원 결합 도메인 작제물에 의한 CDC, ADCP 및 ADCC 경로의 활성화를 시험한다. Gazyva(오비누투주맙)으로부터의 CDR, 항-CD20 단일클론 항체를 함유하는 4개의 작제물을 생성하였다. 푸코실화 및 탈푸코실화 mAb를, S3Y(작제물 13의 구조, 도 13 실시예 2에 기재된 바와 같음,) 및 SAI(작제물 7의 구조, 도 7, 실시예 1에 기재된 바와 같음) Fc-항원 결합 도메인 작제물을 제조하였다. A CDC 분석을 다음과 같이 수행하였다:

[0549] 1. 항-CD20 CDC 분석에 사용된 표적 세포는 Raji 림프아구성 인간 B 세포주이다(ATCC CCL-86). Raji 세포를 원심분리에 의해 현탁액 배양액으로부터 제거하여, 6 x 10^5개의 세포/ml로 X-VIVO 15 배지에 재현탁하였다.

[0550] 2. Raji 세포를 웰당 100 μl(6 x 10^4개의 세포/웰)의 부피로 96 웰 평평한 바닥 분석 플레이트로 옮겼다.

[0551] 3. 항-CD20 단일 클론 항체(mAb) 및 SIF 바디 각각을 X-VIVO 15 배지에서 3.33 μM로 희석하였다. 이어서, 1.5 ml의 폴리프로필렌 튜브에서 항-CD20 mAb 및 SIF 바디 각각으로 일련의 1:3 희석을 수행하여 11 포인트의 연속 희석을 생성하였다.

[0552] 4. 항-CD20 mAb 및 SIF 바디의 각 희석액을 50 μl/웰로 분석 플레이트의 적절한 웰로 옮겼다.

[0553] 5. 항-CD20 mAb 및 SIF 바디를 옮긴 직후, 50 μl의 정상 인간 혈청 보체를 분석 플레이트의 각 웰로 옮겼다.

[0554] 6. 분석 플레이트를 37℃ 및 5% CO_2에서 2시간 동안 인큐베이션하였다.

[0555] 7. 2시간 인큐베이션한 후, 20 μl의 WST-1 증식 시약을 분석 플레이트의 각 웰에 첨가하였다.

[0556] 8. 플레이트를 37℃, 5% CO_2 인큐베이터로 14시간 동안 다시 넣었다.

[0557] 9. 14시간 배양한 후, 플레이트를 플레이트 진탕기에서 1분 동안 진탕하고, 웰의 흡광도를 분광광도계를 사용하여 600 nm 보정으로 450 nm에서 즉시 결정하였다.

[0558] 표적 세포가 Raji(도 47, 왼쪽 패널)인 CDC 분석에서, S3Y(작제물 13(CD20)) 작제물은 세포독성을 매개할 수 있는 반면, 다른 작제물은 그렇지 못하다.

[0559] ADCP 분석을 다음과 같이 수행하였다:

[0560] FcγRIIa-H ADCP 수용체 Bioassay, Complete Kit(Promega Cat.# G9901)는 FcγRIIa에 특이적으로 결합하여 이를 활성화하는 Fc 도메인을 사용하여 항체 및 다른 생물 제제의 효능과 안정성을 측정하는 데 사용할 수 있는 생물발광 세포 기반 분석이다. 이러한 분석은 아미노산 131에 히스티딘(H)과 NFAT-반응 요소(NFAT-RE)에 의해 유도되는 루시페라제 리포터를 함유하는 고친화도 인간 FcgRIIa-H 변이체를 발현하는 유전자 조작된 Jurkat T 세포주로 구성된다. 표적 세포 및 관련 항체와 공배양하는 경우, FcγRIIa-H 효과기 세포는 항체의 Fc 도메인에 결합하여 FcγRIIa 신호전달 및 NFAT-RE 매개 루시퍼라제 활성을 유발한다. 생물발광 신호는 Bio-Glo™ 루시퍼라제 분석 시스템과 표준 발광 측정기를 사용하여 검출되고 정량화된다. 도 47의 중간 패널에 나타낸 농도로, 증가하는 농도의 항-CD20 Ab 및 작제물 7(CD20) 또는 작제물 13(CD20)을 Raji(CD20+) 표적 세포 및 Fc와 함께 인큐베이션하고, 증가하는 농도의 항-CD20 Ab 및 작제물을 Raji(CD20+) 표적 세포 및 FcγRIIa-H 효과기 세포(2:1 E:T 비; 약 35,000개의 효과기:15,000개의 표적 세포)와 함께 인큐베이션하였다. 인큐베이션을 37℃에서 6시간 동안 진행하였다(Bio-Glo™). 시약을 첨가하고, PHERAstar FS 기기에서 발광을 측정하였다. 도 47의 중간 패널에 나타낸 농도로 GraphPad Prism 소프트웨어 RIIa-H 효과기 세포(2:1 E:T 비; 약 35,000개의 효과기:15,000개의 표적 세포)를 사용하여 데이터를 4PL 곡선에 피팅하였다. 인큐베이션을 37℃에서 6시간 동안 진행하였다(Bio-Glo™). 시약을 첨가하고, PHERAstar FS 기기에서 발광을 측정하였다. GraphPad Prism 소프트웨어(도 47의 중간 패널)를 사용하여 데이터를 4PL 곡선에 피팅하였다. SAI(작제물 7(CD20)) 및 S3Y(작제물 13(CD20)) 작제물은 모두 mAb에 비해 100배 초과의 강화된 효능을 나타냈다.

[0561] ADCC 분석을 다음과 같이 수행하였다:

[0562] 인간 1차 NK 효과기 세포(Hemacare)를 해동하고 37℃에서 하룻밤 동안 5x105/mL의 림프구 성장 배지-3(Lonza)에 정치시켰다. 다음날, 인간 림프아구성 세포주 Raji 표적 세포(ATCC CCL-86)를 회수하고, 분석 배지(페놀 레드 무함유 RPMI, 10% FBSΔ, GlutaMAX™)에 재현탁하고, 다양한 농도의 목적 프로브 각각의 존재 하에 37℃에서 30분 동안 플레이팅한다. 이어서, 정치시킨 NK 세포를 회수하고, 분석 배지에 재현탁하고, 항-CD20 코팅된 Raji 세포를 함유하는 플레이트에 첨가하였다. 플레이트를 효과기-대-표적 세포의 최종 비율이 5:1(5x104 NK 세포: 1x104 Raji)가 되도록 37℃에서 6시간 동안 인큐베이션하였다.

[0563] CytoTox-Glo™ 세포독성 분석 키트(Promega)를 사용하여 ADCC 활성을 결정하였다. CytoTox-Glo™ 분석은 발광성 펩티드 기질을 사용하여, 막 무결성을 상실한 세포, 예를 들어 용해된 Raji 세포에 의해 방출된 죽은 세포 프로테아제 활성을 측정한다. 6시간 배양한 후, 준비한 시약(기질)을 플레이트의 각 웰에 첨가하고, 실온에서 15분 동안 오비탈 플레이트 진탕기에 넣었다. 발광을 PHERAstar F5 플레이트 판독기(BMG Labtech)를 사용하여 측정하였다. 백그라운드를 제거하기 위해 대조 조건(NK 세포 + Raji만 해당)의 판독치를 시험 조건에서 뺀 후 데이터를 분석하였다. (도 47, 오른쪽 패널). SAI(작제물 7(CD20)) 및 S3Y(작제물 13(CD20)) 작제물은 모두 푸코실화 mAb에 비해 강화된 세포독성을 보이며, 탈푸코실화 mAb에 비해 유사한 세포독성을 보였다.

[0564] **실시예 25. Fc-항원 결합 도메인 작제물을 특성화하는 데 사용된 실험적 검정**

[0565] *펩티드 및 글리코펩티드 액체 크로마토그래피-MS/MS*

[0566] 단백질을 6M 구아니딘(Sigma)에서 1 μg/μL로 희석하였다. 디티오트레이톨(DTT)을 10 mM의 농도로 첨가하여 65℃에서 30분 동안 변성 조건 하에 이황화 결합을 감소시켰다. 얼음에서 냉각한 후, 샘플을 암실에서 1시간 동안 30 mM 요오드아세트아미드(IAM)와 함께 인큐베이션하여 유리 티올을 알킬화(카바미도메틸화)하였다. 이어서, 단백질을 10-kDa 멤브레인을 통해 25 mM 중탄산암모늄 완충액(pH 7.8)으로 투석하여 IAM, DTT, 및 구아니딘을 제거하였다. 단백질을 Barocycler(NEP 2320; Pressure Biosciences, Inc.)에서 트립신으로 분해하였다. 압력은 37℃에서 20,000 psi와 대기압 사이에서 1시간 동안 총 30 사이클 순환시켰다. Ultimate 3000(Dionex) 크로마토그래피 시스템 및 Q-Exactive(Thermo Fisher Scientific) 질량 분석기에서 펩티드의 LC-MS/MS 분석을 수행하였다. 물 중의 0.1% FA 및 아세토니트릴 중의 0.1% FA를 이동상으로 사용하여 BEH PepMap(Waters) 컬럼에서 단백질을 분리하였다. 단독 자일로실화 링커 펩티드를 ± 1.5 Da 사중극 단리폭(quadrupole isolation width)으로 이중 하전 이온(z=2) m/z 842.5에 기초하여 표적화하였다.

[0567] *원형 질량 분석(Intact Mass Spectrometry)*

[0568] 단백질을 78.98% 물, 20% 아세토니트릴, 1% 폼산 (FA), 및 0.02% 트리플루오로아세트산으로 이루어지는 전개 완충액(running buffer)에서 2 μg/μL의 농도로 희석하였다. 컬럼의 전체 길이가 700 mm인 2개의 Zenix-C SEC-300(Sepax Technologies, Newark, DE) 2.1 X 350 mm 상에서 직렬로 크기 배제 크로마토그래피 분리를 수행하였다. 전술한 전개 완충액을 사용하여 80 μL/분의 유속으로 SEC 컬럼에서 단백질을 용리하였다. QSTAR Elite(Applied Biosystems) Q-ToF 질량 분석기를 양이온 모드(positive mode)에서 작동시켜 질량 스펙트럼을 획득하였다. Bayesian 피크 디콘볼루션(deconvolution)을 사용하여 크로마토그래피 피크의 전체 폭에 걸친 스펙트럼을 합침으로써 개별 크기 분획하의 중성 질량을 디콘볼루팅하였다.

[0569] *모세관 전기영동-도데실 황산나트륨(CE-SDS) 분석*

[0570] 샘플을 1 mg/mL로 희석하고 HT Protein Express 변성 완충액(PerkinElmer)과 혼합하였다. 혼합물을 40℃에서 20분간 인큐베이션하였다. 샘플을 70 μL의 물로 희석하고 96-웰 플레이트로 옮겼다. HT Protein Express LabChip(PerkinElmer)이 장착된 Caliper GXII 기기(PerkinElmer)로 샘플을 분석하였다. 형광 강도를 사용하여 각각의 크기 변형의 상대 존재비를 산출하였다.

[0571] *비환원 SDS-PAGE*

[0572] 샘플을 95℃에서 10분간 Laemmli 샘플 완충액(4% SDS, Bio-Rad)에서 변성시켰다. Criterion TGX 무착색(stain-free) 겔(4~15% 폴리아크릴아미드, Bio-Rad)상에 샘플을 흘렸다. 단백질 밴드를 UV 조사 또는 쿠마시 블루 염색으로 시각화하였다. ChemiDoc MP Imaging System(Bio-Rad)으로 겔을 이미지화하였다. Imagelab 4.0.1 소프트웨어(Bio-Rad)를 사용하여 밴드의 정량화를 수행한다.

[0573] *보체 의존성 세포독성(CDC)*

[0574] Raji 세포(ATCC)를 연속 희석된 리툭시맙, Fc 작제물 4 또는 IVIg로 코팅하는 비색 분석법으로 CDC를 평가하였다. 인간 혈청 보체(Quidel)를 25% v/v로 모든 웰에 첨가하였고 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. WST-1 세포 증식 시약(Roche Applied Science)을 첨가한 후 세포를 37℃에서 12시간 동안 배양하였다. 플레이트를 2분간 진탕기에 두었고, 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

[0575] **실시예 26. CCR4 결합 도메인을 갖는 Fc-항원 결합 도메인 작제물 4의 설계 및 정제**

[0576] *단백질 발현*

[0577] 직렬 Fc 도메인으로부터 형성된 비분지형 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조한다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 4(CCR4) 각각은 2개의 별개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드(Fc 장쇄(서열 번호 66), 항-CCR4 Fc 사슬(서열 번호 68)의 3개의 카피), 및 항-CCR4 경쇄 폴리펩티드(서열 번호 49)의 3개의 카피를 포함한다. Fc 장쇄는 직렬로 3개의 Fc 도메인 단량체를 함유하며, 각각의 Fc 도메인 단량체는 E357K 전하 돌연변이, 및 S354C 및 T366W 돌출부-형성 돌연변이(이종이량체화를 촉진하기 위해)를 갖는다. Fc 단쇄는 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V 함몰부-형성 돌연변이(이종이량체화를 촉진하기 위해) 및 K370D 전하 돌연변이를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서의 항-CCR4 VH와 CH1 도메인(EU 위치 1~220)(작제물 4(CCR4))을 함유한다. CCR4 경쇄는 또한 scFv의 일부로서 Fc 단쇄의 N-말단에 융합되도록 발현될 수 있다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해

최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 표 7의 각 작제물에 대한 다음의 아미노산 서열을 3개의 별개의 플라스미드(경쇄(항-CCR4)를 암호화하는 하나의 플라스미드, Fc 장쇄를 암호화하는 하나의 플라스미드 및 Fc 단쇄(항-CCR4)를 암호화하는 하나의 플라스미드)에 의해 암호화된다:

표 7

작제물 4 (CCR4) 서열			
작제물	경쇄	Fc 장쇄	Fc 단쇄 (항-CCR4 VH 및 CH1 포함)
작제물 4 (CCR4)	서열 번호 DVLMTQSPLSLPVTPGEPASIS CRSSRNIVHINGDTYLEWYLQK PGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCFQGSLLPWTFGQGTKVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	서열 번호 66 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGKGGGGGGGGGGGGGG GGGGGDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDKLTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG	서열 번호 68 EVQLVESGGDLVQPGRSLRLSC AASGFIFSNYGMSWVRQAPGKG LEWVATISSASTYSYYPDSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRV EDTALYYCGRHSDGNFAFGYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVDGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[0578]

[0579] 발현된 단백질을 Poros MabCapture A(Life Technologies) 컬럼을 사용하는 단백질 A-기반 친화 컬럼 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상청액에서부터 정제한다. 포획된 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 인산염 완충 식염수로 세정하고(저염 세정) pH 3, 100 mM 글리신으로 용리한다. 용리액을 1 M TRIS(pH 7.4)의 첨가로 빠르게 중화하였고, 0.2 μm 필터로 멸균 여과한다. 단백질을 Poros XS 수지(Applied Biosciences)를 사용하여 이온 교환 크로마토그래피에 의해 추가로 분획화한다. 컬럼을 50 mM MES, pH 6(완충액 A)로 사전 평형화하고 샘플을 용리 완충액으로서 50 mM MES, 400 mM 염화나트륨, pH 6(완충액 B)을 사용하여 단계 구배로 용리한다. 이온 교환 후에, 표적 분획을 접선 유동 여과 시스템 상에서 10 kDa 컷오프 폴리에테르설폰(PES) 막 카트리지를 사용하여 PBS로 완충액 교환한다. 샘플을 약 30 mg/mL로 농축하고, 0.2 μm 필터를 통해 멸균 여과한다.

[0580] **실시예 27. CCR4 결합 도메인을 갖는 Fc-항원 결합 도메인 작제물 8의 설계 및 정제**

[0581] *단백질 발현*

[0582] 분지점이 N-말단 Fc 도메인에 있는 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 형성된 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제

조하였다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 8(CCR4) 각각은 2개의 별개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드(Fc 장쇄(서열 번호 69)의 2개의 카피 및 항-CCR4 Fc 단쇄(서열 번호 68)의 2개의 카피) 및 항-CCR4 경쇄 폴리펩티드(서열 번호 49)의 카피를 포함한다. Fc 장쇄는 (동종이량체화를 촉진하기 위한) 역전하 돌연변이 K409D 및 D399K를 갖는 Fc 도메인 단량체와 직렬로 연결된 (이종이량체화를 촉진하기 위한) S354C 및 T366W 돌출부-형성 돌연변이 및 E357K 전하 돌연변이를 갖는 Fc 도메인 단량체를 함유한다. Fc 단쇄는 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V 함몰부-형성 돌연변이(이종이량체화를 촉진하기 위해) 및 K370D 전하 돌연변이를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서의 항-CCR4 VH와 CH1 도메인(EU 위치 1~220)(작제물 8(CCR4))을 함유한다. CCR4 경쇄는 또한 scFv의 일부로서 Fc 단쇄의 N-말단에 융합되도록 발현될 수 있다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 표 8의 각 작제물에 대한 다음의 아미노산 서열을 3개의 별개의 플라스미드(경쇄(항-CCR4)를 암호화하는 하나의 플라스미드, Fc 장쇄를 암호화하는 하나의 플라스미드 및 Fc 단쇄(항-CCR4)를 암호화하는 하나의 플라스미드)에 의해 암호화된다:

표 8

작제물 8 (CCR4) 서열			
작제물	경쇄	Fc 장쇄	Fc 단쇄 (항-CCR4 VH 및 CH1 포함)
작제물 8 (CCR4)	서열 번호 DVLMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSRNIVHINGDTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSLLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	서열 번호 69 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	서열 번호 68 **EVQLVESGGDLVQPGRSLRLSCAASGFIFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVATISSASTYSYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRVEDTALYYCGRHSDGNFAFGYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0583]

[0584] 발현된 단백질을 Poros MabCapture A(LifeTechnologies) 컬럼을 사용하는 단백질 A-기반 친화 컬럼 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상청액에서부터 정제한다. 포획된 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 인산염 완충 식염수로 세정하고(저염 세정) pH 3, 100 mM 글리신으로 용리한다. 용리액을 1 M TRIS(pH 7.4)의 첨가로 빠르게 중화하였고, 0.2 μm 필터로 멸균 여과한다. 단백질을 Poros XS 수지(Applied Biosciences)를 사용하여 이온 교환 크로마토그래피에 의해 추가로 분획화한다. 컬럼을 50 mM MES, pH 6(완충액 A)로 사전 평형화하고 샘플을 용리 완충액으로서 50 mM MES, 400 mM 염화나트륨, pH 6(완충액 B)을 사용하여 단계 구배로 용리한다. 이온 교환 후에, 표적 분획을 접선 유동 여과 시스템 상에서 10 kDa 컷오프 폴리에테르설폰(PES) 막 카트리지를 사용하여 PBS로 완충액 교환한다. 샘플을 약 30 mg/mL로 농축하고, 0.2 μm 필터를 통해 멸균 여과한다.

[0585] **실시예 28. CCR4 결합 도메인을 갖는 Fc-항원 결합 도메인 작제물 9의 설계 및 정제**

[0586] *단백질 발현*

[0587] 분지점이 N-말단 Fc 도메인에 있는 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 형성된 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제

조하였다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 9(CCR4)는 2개의 별개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드(항-CCR4 Fc 장쇄(서열 번호 54)의 2개의 카피 및 항-CCR4 Fc 단쇄(서열 번호 68)의 2개의 카피) 및 항-CCR4 경쇄 폴리펩티드(서열 번호 49)의 카피를 포함한다. Fc 장쇄는 역전하 돌연변이 K409D 및 D399K를 갖는 Fc 도메인 단량체(동종이량체화를 촉진하기 위해) 및 N-말단에서의 항-CCR4 VH 및 CH1 도메인(EU 위치 1~220)과 함께 직렬로 E357K 전하 돌연변이 및 S354C 및 T366W 돌출부-형성 돌연변이(이종이량체화를 촉진하기 위해)를 갖는 Fc 도메인 단량체를 함유한다(작제물 9(CCR4)). Fc 단쇄는 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V 함몰부-형성 돌연변이(이종이량체화를 촉진하기 위해) 및 K370D 전하 돌연변이를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서의 항-CCR4 중쇄를 함유한다(작제물 9(CCR4)). CCR4 경쇄는 또한 scFv의 일부로서 Fc 장쇄 및/또는 Fc 단쇄의 N-말단에 융합되도록 발현될 수 있다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 표 9의 각 작제물에 대한 다음의 아미노산 서열을 3개의 별개의 플라스미드(경쇄(항-CCR4)를 암호화하는 하나의 플라스미드, Fc 장쇄(항-CCR4)를 암호화하는 하나의 플라스미드 및 Fc 단쇄(항-CCR4)를 암호화하는 하나의 플라스미드)에 의해 암호화된다:

표 9

작제물 9 (CCR4) 서열			
작제물	경쇄	Fc 장쇄 (항-CCR4 VH 및 CH1 포함)	Fc 단쇄 (항-CCR4 VH 및 CH1 포함)
작제물 9 (CCR4)	서열 번호 49 DVLMTQSPLSLPVTPGEPASIS CRSSRNIVHINGDTYLEWYLQK PGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCFQGSLLPWTFGQGTKVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	서열 번호 54 **EVQLVESGGDLVQPGRSLRLSC** **AASGFIFSNYGMSWVRQAPGKG** **LEWVATISSASTYSYYPDSVKG** **RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRV** **EDTALYYCGRHSDGNFAFGYWG** **QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP** **SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE** **PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL** **QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ** **TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK** **SC**DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGGGGGGGGGGG GGGGGGGDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	서열 번호 68 **EVQLVESGGDLVQPGRSLRLSC** **AASGFIFSNYGMSWVRQAPGKG** **LEWVATISSASTYSYYPDSVKG** **RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRV** **EDTALYYCGRHSDGNFAFGYWG** **QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP** **SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE** **PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL** **QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ** **TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK** **SC**DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVDGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[0588]

[0589] 발현된 단백질을 Poros MabCapture A(LifeTechnologies) 컬럼을 사용하는 단백질 A-기반 친화 컬럼 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상청액에서부터 정제한다. 포획된 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 인산염 완충 식염수로 세정하고(저염 세정) pH 3, 100 mM 글리신으로 용리한다. 용리액을 1 M TRIS(pH 7.4)의 첨가로 빠르게 중화하였

고, 0.2 μm 필터로 멸균 여과한다. 단백질을 Poros XS 수지(Applied Biosciences)를 사용하여 이온 교환 크로마토그래피에 의해 추가로 분획화한다. 컬럼을 50 mM MES, pH 6(완충액 A)로 사전 평형화하고 샘플을 용리 완충액으로서 50 mM MES, 400 mM 염화나트륨, pH 6(완충액 B)을 사용하여 단계 구배로 용리한다. 이온 교환 후에, 표적 분획을 접선 유동 여과 시스템 상에서 10 kDa 컷오프 폴리에테르설폰(PES) 막 카트리지를 사용하여 PBS로 완충액 교환한다. 샘플을 약 30 mg/mL로 농축하고, 0.2 μm 필터를 통해 멸균 여과한다.

[0590] **실시예 29. CCR4 결합 도메인을 갖는 Fc-항원 결합 도메인 작제물 10의 설계 및 정제**

[0591] *단백질 발현*

[0592] 분지점이 N-말단 Fc 도메인에 있는 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 형성된 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조하였다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 10(CCR4) 각각은 2개의 별개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드(항-CCR4 Fc 장쇄(서열 번호 71)의 2개의 카피 및 Fc 단쇄(서열 번호 63)의 4개의 카피) 및 항-CCR4 경쇄 폴리펩티드(서열 번호 49)의 카피를 각각 포함한다. Fc 장쇄는 역전하 돌연변이 K409D 및 D399K를 갖는 Fc 도메인 단량체(동종이량체화를 촉진하기 위해) 및 N-말단에서의 항-CCR4 VH 및 CH1 도메인(EU 위치 1~220)과 함께 직렬로 E357K 전하 돌연변이 및 S354C 및 T366W 돌출부-형성 돌연변이(이종이량체화를 촉진하기 위해)를 각각 갖는 Fc 도메인 단량체를 직렬로 함유한다(작제물 10(CCR4)). Fc 단쇄는 K370D 전하 돌연변이 및 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V 함몰부-형성 돌연변이(이종이량체화를 촉진하기 위한)를 Fc 도메인 단량체를 함유한다. 항-CCR4 경쇄는 또한 scFv의 일부로서 Fc 장쇄의 N-말단에 융합되도록 발현될 수 있다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 표 10의 각 작제물에 대한 다음의 아미노산 서열을 3개의 별개의 플라스미드(경쇄(항-CCR4)를 암호화하는 하나의 플라스미드, Fc 장쇄(항-CCR4)를 암호화하는 하나의 플라스미드 및 Fc 단쇄를 암호화하는 하나의 플라스미드)에 의해 암호화된다:

표 10

작제물 10 (CCR4) 서열			
작제물	경쇄	Fc 장쇄 (항-CCR4 VH 및 CH1)	Fc 단쇄
작제물 10 (CCR4)	서열 번호 DVLMTQSPLSLPVTPGEPASIS CRSSRNIVHINGDTYLEWYLQK PGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCFQGSLLPWTFGQGTKVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	서열 번호 71 **EVQLVESGGDLVQPGRSLRLSC** **AASGFIFSNYGMSWVRQAPGKG** **LEWVATISSASTYSYYPDSVKG** **RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRV** **EDTALYYCGRHSDGNFAFGYWG** **QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP** **SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE** **PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL** **QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ** **TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK** **SC**DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGGGGGGGGGGG GGGGGGGDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGG GGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	서열 번호 63 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVDGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG

[0593]

[0594] 발현된 단백질을 Poros MabCapture A(LifeTechnologies) 컬럼을 사용하는 단백질 A-기반 친화 컬럼 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상청액에서부터 정제한다. 포획된 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 인산염 완충 식염수로 세정하고(저염 세정) pH 3, 100 mM 글리신으로 용리한다. 용리액을 1 M TRIS(pH 7.4)의 첨가로 빠르게 중화하였고, 0.2 μm 필터로 멸균 여과한다. 단백질을 Poros XS 수지(Applied Biosciences)를 사용하여 이온 교환 크로마토그래피에 의해 추가로 분획화한다. 컬럼을 50 mM MES, pH 6(완충액 A)로 사전 평형화하고 샘플을 용리 완충액으로서 50 mM MES, 400 mM 염화나트륨, pH 6(완충액 B)을 사용하여 단계 구배로 용리한다. 이온 교환 후에, 표적 분획을 접선 유동 여과 시스템 상에서 10 kDa 컷오프 폴리에테르설폰(PES) 막 카트리지를 사용하여 PBS로 완충액 교환한다. 샘플을 약 30 mg/mL로 농축하고, 0.2 μm 필터를 통해 멸균 여과한다.

[0595] **실시예 30. CCR4 결합 도메인을 갖는 Fc-항원 결합 도메인 작제물 16의 설계 및 정제**

[0596] *단백질 발현*

[0597] 분지점이 C-말단 Fc 도메인에 있는 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 형성된 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조하였다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 16(CCR4) 각각은 2개의 별개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드(항-CCR4 Fc 장쇄(서열 번호 73)의 2개의 카피 및 Fc 단쇄(서열 번호 63)의 4개의 카피) 및 항-CCR4 경쇄 폴리펩티드(서열 번호 49)의 3개의 카피를 각각 포함한다. Fc 장쇄는 각각 E357K 전하 돌연변이 및 S354C 및 T366W 돌출부-형성 돌연변이(이종이량체화를 촉진하기 위해)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서 항-CCR4 VH 및 CH1 도메인(EU 위치 1~220)와 직렬로 연결된 역전하 돌연변이 K409D 및 D399K(동종이량체화를 촉진하기 위해)를 갖는 Fc 도메인 단량체를 함유한다(작제물 10(CCR4)). Fc 단쇄는 K370D 전하 돌연변이 및 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V 함몰부-형성 돌연변이(이종이량체화를 촉진하기 위한)를 Fc 도메인 단량체를 함유한다. 항-CCR4 경쇄는 또한 scFv의 일부로서 Fc 장쇄의 N-말단에 융합되도록 발현될 수 있다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 표 11의 각 작제물에 대한 다음의 아미노산 서열을 3개의 별개의 플라스미드(경쇄(항-CCR4)를 암호화하는 하나의 플라스미드, Fc 장쇄(항-CCR4)를 암호화하는 하나의 플라스미드 및 Fc 단쇄를 암호화하는 하나의 플라스미드)에 의해 암호화된다:

표 11

작제물 16 (CCR4) 서열			
작제물	경쇄	Fc 장쇄 (항-CCR4 VH 및 CH1 포함)	Fc 단쇄
작제물 16 (CCR4)	서열 번호 DVLMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSRNIVHINGDTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSLLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	서열 번호 73 **EVQLVESGGDLVQPGRSLRLSCAASGFIFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVATISSASTYSYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRVEDTALYYCGRHSDGNFAFGYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	서열 번호 63 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0598]

[0599] 발현된 단백질을 Poros MabCapture A(LifeTechnologies) 컬럼을 사용하는 단백질 A-기반 친화 컬럼 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상청액에서부터 정제한다. 포획된 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 인산염 완충 식염수로 세정하고(저염 세정) pH 3, 100 mM 글리신으로 용리한다. 용리액을 1 M TRIS(pH 7.4)의 첨가로 빠르게 중화하였고, 0.2 μm 필터로 멸균 여과한다. 단백질을 Poros XS 수지(Applied Biosciences)를 사용하여 이온 교환 크로마토그래피에 의해 추가로 분획화한다. 컬럼을 50 mM MES, pH 6(완충액 A)로 사전 평형화하고 샘플을 용리 완충액으로서 50 mM MES, 400 mM 염화나트륨, pH 6(완충액 B)을 사용하여 단계 구배로 용리한다. 이온 교환 후에, 표적 분획을 접선 유동 여과 시스템 상에서 10 kDa 컷오프 폴리에테르설폰(PES) 막 카트리지를 사용하여 PBS로 완충액 교환한다. 샘플을 약 30 mg/mL로 농축하고, 0.2 μm 필터를 통해 멸균 여과한다.

[0600] **실시예 31. CCR4 결합 도메인을 갖는 Fc-항원 결합 도메인 작제물 19의 설계 및 정제**

[0601] *단백질 발현*

[0602] 분지점이 N-말단 또는 C-말단 Fc 도메인에 없는 단일 분지형 Fc 도메인으로부터 형성된 작제물을 하기 기재된 바와 같이 제조하였다. Fc-항원 결합 도메인 작제물 19(CCR4)는 2개의 별개의 Fc 도메인 단량체 함유 폴리펩티드(항-CCR4 Fc 장쇄(서열 번호 75)의 2개의 카피 및 Fc 단쇄(서열 번호 63)의 4개의 카피) 및 항-CCR4 경쇄 폴리펩티드(서열 번호 49)의 카피를 각각 포함한다. Fc 장쇄는 E357K 전하 돌연변이 및 S354C 및 T366W 돌출부-형성 돌연변이를 갖는 Fc 도메인 단량체(이종이량체화를 촉진하기 위해)와 함께 직렬로 연결된, 역전하 돌연변이 K409D 및 D399K를 갖는 Fc 도메인 단량체(동종이량체화를 촉진하기 위해)와 함께 직렬로 연결된 E357K 전하 돌연변이 및 S354C 및 T366W 돌출부-형성 돌연변이(이종이량체화를 촉진하기 위해)를 갖는 Fc 도메인 단량체, 및 N-말단에서의 항-CCR4 VH 및 CH1 도메인(EU 위치 1~220)을 함유한다(작제물 19(CCR4)). Fc 단쇄는 K370D 전하 돌연변이 및 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V 함몰부-형성 돌연변이(이종이량체화를 촉진하기 위한)를 Fc 도메인 단량체를 함유한다. 항-CCR4 경쇄는 또한 scFv의 일부로서 Fc 장쇄의 N-말단에 융합되도록 발현될 수 있다. DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝한다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입한다. 표 12의 각 작제물에 대한 다음의 아미노산 서열을 3개의 별개의 플라스미드(경쇄(항-CCR4)를 암호화하는 하나의 플라스미드, Fc 장쇄(항-CCR4)를 암호화하는 하나의 플라스미드 및 Fc 단쇄를 암호화하는 하나의 플라스미드)에 의해 암호화된다:

표 12

작제물 19 (CCR4) 서열			
작제물	경쇄	Fc 장쇄 (항-CCR4 VH 및 CH1 포함)	Fc 단쇄
작제물 19 (CCR4)	서열 번호	서열 번호 75	서열 번호 63
	DVLMTQSPLSLPVTPGEPASIS CRSSRNIVHINGDTYLEWYLQK PGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCFQGSLLPWTFGQGTKVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	**EVQLVESGGDLVQPGRSLRLSC AASGFIFSNYGMSWVRQAPGKG LEWVATISSASTYSYYPDSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRV EDTALYYCGRHSDGNFAFGYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SC**DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGG GGGGGGDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGGKGGGGGGG GGGGGGGGGGGGDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDKLTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVDGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG

[0603]

[0604] 발현된 단백질을 Poros MabCapture A(LifeTechnologies) 컬럼을 사용하는 단백질 A-기반 친화 컬럼 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상청액에서부터 정제한다. 포획된 Fc-항원 결합 도메인 작제물을 인산염 완충 식염수로 세정하고(저염 세정) pH 3, 100 mM 글리신으로 용리한다. 용리액을 1 M TRIS(pH 7.4)의 첨가로 빠르게 중화하였고, 0.2 μm 필터로 멸균 여과한다. 단백질을 Poros XS 수지(Applied Biosciences)를 사용하여 이온 교환 크로마토그래피에 의해 추가로 분획화한다. 컬럼을 50 mM MES, pH 6(완충액 A)로 사전 평형화하고 샘플을 용리 완충액으로서 50 mM MES, 400 mM 염화나트륨, pH 6(완충액 B)을 사용하여 단계 구배로 용리한다. 이온 교환 후에, 표적 분획을 접선 유동 여과 시스템 상에서 10 kDa 컷오프 폴리에테르설폰(PES) 막 카트리지를 사용하여 PBS로 완충액 교환한다. 샘플을 약 30 mg/mL로 농축하고, 0.2 μm 필터를 통해 멸균 여과한다.

[0605] **실시예 32. 항-CCR4 Fc 작제물에 의한 항체 의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 활성화**

[0606] CCRF-CEM 세포(ATCC)를 표적 세포로 사용하여, 10% 열-불활성화된 FBS(Hyclone)를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 50 ㎕의 세포($100x10^3$개의 세포/ml)를 10% 초저 IgG FBS를 함유하는 페놀 레드 무함유 RPMI에 재현탁하고, 흰색 편평한 바닥의 96-웰 플레이트에 접종하였다. 항-CCR4 작제물을 6 nM에서 3배 희석하고, 분석

에 필요한 최종 농도의 11배 농도로 제조하였다. 10 ㎕의 각 작제물 희석액을 표적 세포에 첨가하고, 효과기 세포를 첨가하기 전에 RT에서 적어도 15분 동안 인큐베이션하였다. 효과기 세포로 동결보존된 NK 세포(Hemacare)를 사용하고, 조직 배양-처리된 플라스크(Falcon)에서 AIM-V 배지에서 24시간 동안 정치시켰다. 웰당 25000개의 효과기 세포를 첨가하여, 5:1의 효과기:표적(E:T) 비율을 얻었다. 플레이트를 37℃에서 5시간 동안 인큐베이션한 다음, 50 μL의 CytoTox Glo 시약(Promega)을 첨가한 후 37℃에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 발광을 PHERAstar FS(BMG Labtech)를 사용하여 판독하였다. 결과를 도 25 및 표 13에 나타내었다.

표 13

ADCC를 유도하는 항-CCR4 Fc 작제물의 효능

작제물 번호[1]	n	EC50 (nM)		
		범위	평균	SD
작제물 13 (항-CCR4), G_{20} 링커	1	17165 내지 125449	1.062	+/- 6176.5

[0607]

[0608] **실시예 33: 작제물의 Fc 도메인은 항체의 Fc 도메인의 Fc 감마 수용체에 대한 유사한 결합을 유지한다**

[0609] 항-CD20 및 항-CCR4 작제물을 사용하여 동종이량체화 돌연변이, 이종이량체화 돌연변이, 폴리펩티드 링커 및 Fab 도메인의 다양한 조합이 Fc 감마 수용체에 대한 결합에 영향을 미치는지 여부를 평가하였다. 표면 플라스몬 공명(SPR)을 사용하여 CD64(Fc 감마 수용체 I)와의 1:1 결합을 평가하였다. 작제물을 칩 표면에 포획하고, 가용성 수용체에 대한 결합은 1:1 결합을 보장하기 위해 측정하였다. 이러한 형식에서, 결합 원자가는 Fc 기능의 변경에 대해 가장 민감한 판독치이며; 운동 및 평형 상수는 Fc 도메인의 서브세트의 변경에 민감하지 않다.

[0610] *세포 배양*

[0611] DNA 서열을 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화하였고 pcDNA3.4 포유류 발현 벡터에 클로닝하였다. DNA 플라스미드 작제물을 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에 리포좀을 통해 형질주입하였다. 항체는 2개의 상이한 플라스미드로부터 발현되었는데, 하나는 중쇄를 암호화하고 다른 하나는 경쇄를 암호화한다. SIF-바디는 3개의 별개의 플라스미드로부터 발현되었는데, 대부분의 경우에, 하나의 플라스미드는 항체 경쇄를 암호화하고, 하나의 플라스미드는 아미노-말단 Fc에 부착된 CH1-VH FAB 부분을 함유하는 Fc 장쇄를 암호화하며, 제3 플라스미드는 Fc 단쇄를 암호화한다. 예외는 S3A 및 S3W Sif-바디었다. S3W의 경우, 하나의 플라스미드는 항체 경쇄를 암호화하고, 제2 플라스미드는 2개의 Fc 도메인을 함유하는 장쇄를 암호화하며, 제3 플라스미드는 CH1-VH FAB 부분을 함유하는 단일 Fc 사슬을 암호화하였다. S3A의 경우, 하나의 플라스미드는 항체 경쇄를 암호화하고, 제2 플라스미드는 아미노-말단 Fc에 부착된 CH1-VH FAB 부분을 함유하는 Fc 장쇄를 암호화하며, 하나의 플라스미드는 CH1-VH FAB 부분을 또한 함유하는 Fc 단쇄를 암호화하였다.

[0612] *단백질 정제*

[0613] 발현된 단백질을 Poros MabCapture A 컬럼을 사용하여 단백질 A-기반 친화성 컬럼 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상청액으로부터 정제하였다. 포획된 SIF 바디를 로딩 후 인산염 완충 식염수(PBS, pH 7.0)로 세정하고, 추가 공정 관련 불순물을 제거하기 위해 중간 세정 완충액 50 mM 구연산염 완충액(pH 5.5)으로 추가 세정하였다. 결합된 SIF 바디 물질을 pH 3의 100 mM 글리신으로 용리하고, pH 7.4의 1 M TRIS를 첨가하여 용리액을 신속하게 중화한 후, 원심분리하고, 0.2 μm 필터를 통해 멸균 여과하였다.

[0614] Poros XS 수지를 사용하여 이온 교환 크로마토그래피에 의해 단백질을 추가로 분별하였다. pH 6의 50 mM MES(완충액 A)로 컬럼을 사전 평형화하고, 로딩을 위해 샘플을 평형화 완충액에 희석하였다(1:3). 샘플을 용리 완충액으로 50 mM MES (100% A)에서 400 mM 염화나트륨, pH 6(100% B)으로 12~15CV의 선형 구배를 사용하여 용리하였다. 용리 동안 수집된 모든 분획은 분석용 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로 분석하고, 표적 분획을 풀링하여 정제된 SIF 바디 재료를 생성하였다.

[0615] 이온 교환 후, 풀링된 물질을 접선 유동 여과 시스템에서 30 kDa 컷오프 폴리에테르 설폰(PES) 막 카트리지를 사용하여 1X-PBS 완충액으로 완충액 교환하였다. 샘플을 대략 10~15 mg/mL로 농축하고, 0.2 μm 필터로 멸균 여과하였다.

[0616] *물리화학적 분석*

[0617] 분석용 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 사용하여 포스트 단백질 A, 풀링된 이온-교환 분획 및 최종 정제된 재료에 대한 순도를 평가하였다.

[0618] 정제된 재료를 1X-PBS를 사용하여 1 mg/ml로 희석하고, 분석 컬럼으로 Zenix SEC-300(4.6 x 300 mm, 3 μm, 300 Å, Sepax, Cat. #213300-4630)을 사용하여 UV & FLD 검출기를 포함하는 Agilent 1200 시스템 상에서 분석하였다.

[0619] 컬럼을 분석 전에 1시간 동안 0.3 ml/min로 0.05% w/v 아지드화나트륨 완충액으로 100 mM 인산나트륨, 200 mM 아르기닌, 300 mM 염화나트륨 pH=6.7로 평형화하였다. 주입량 약 10~15 ul, 컬럼 온도: 300C, 280 nm에서 UV 검출 및 280 mm에서 여기 및 330 nm에서 방출을 갖는 FLD(총 실행 시간:15분).

[0620] 크기 순도 결과를 표 14에 도시되어 있다. 모든 재료는 낮은 수준의 고차종(HOS)만을 나타내었다.

표 14

[0621]

Fc 결합 분석에 사용된 작제물의 크기 순도

작제물	항원	SEC에 의한 크기 순도(표적 화학종%)	SEC에 의한 크기 순도(HOS%)
mAb	CD20	97.0%	1.7%
작제물 13 (S3Y)	CD20	89.6%	0.0%
작제물 7 (S3I)	CD20	89.0%	1.7%
작제물 8 (S3W)	CD20	83.4%	0.0%
작제물 9 (S3A)	CD20	92.4%	1.5%
작제물 10 (S5I)	CD20	98.4%	1.6%
작제물 19 (S5X)	CD20	90.0%	0.4%
작제물 16 (S5Y)	CD20	73.8%	1.6%
mAb	CD20	97.0%	1.7%

[0622] *결합 분석*

[0623] 결합 실험을 CM3 시리즈 S 센서 칩을 사용하여 Biacore T200 기기(GE Healthcare)에서 수행하였다. FcgR 결합의 원자가 분석을 위해, 천연 단백질 A를 직접 아민 커플링을 통해 고정하였다. 리간드를 전개 완충액에서 희석하고 포획하였다. 인간 재조합 CD32a 또는 CD64(R&D Systems)의 6-포인트 연속 희석을 포획한 리간드 위에 흘렸다. 각 리간드의 원자가를 다음과 같이 계산하였다:

[0624] 리간드 원자가 = Rmax/[(MW 분석물/MW 리간드)*리간드 포획 수준].

[0625] 항-CD20 작제물에 대한 CD64 결합의 분석 결과가 표 15에 도시되어 있다.

[0626] 모든 경우에, CD64 결합 원자가는 Fc 도메인의 수와 같았는데, 이는 모든 Fc 도메인이 CD64에 결합하도록 기능한다는 것을 표시한다. S3Y-AA-OBI 및 S3Y-AA-AVE와 서열이 동일하지만, Fab 도메인이 결여된 대조 화합물은 이러한 작제물에 비해 CD64에 결합하는데, 이는 Fab 도메인을 포함하는 것이 Fc 수용체에 대한 결합을 변경하지 않음을 입증하였다.

표 15

[0627]

특정 항-CD20 작제물의 원자가			
작제물	항원	Fc 도메인 수	SPR에 의한 CD64 원자가
mAb	CD20	1	1.5
작제물 13 (S3Y)	CD20	3	3.4
작제물 7 (S3I)	CD20	3	3.0
작제물 8 (S3W)	CD20	3	2.9
작제물 9 (S3A)	CD20	3	3.1
작제물 10 (S5I)	CD20	5	5.5
작제물 19 (S5X)	CD20	5	4.9
작제물 16 (S5Y)	CD20	5	5.5
대조군 (S3Y)	항원 결합 도메인 없음	3	3.

[0628] **실시예 34: 작제물은 세포 표면 Fc 감마 수용체에 대해 더 격렬하게 결합한다**

[0629] 세포 표면 CD32a에 대한 작제물의 상대적 결합을 항-CD20 작제물을 사용하는 시간 분해 형광 공명 에너지 전달(TR-FRET) 분석(CisBio)에서 평가하였다. 분석 시약은 제조업체의 지침에 따라 제조하였다. Freedom EVOware 150 자동 액체 처리기(Tecan)를 사용하여 표지된 수용체를 갖는 세포에 첨가된 각 샘플에 대한 10-포인트, 3-배 연속 희석을 생성하였다. 이어서, 표지된 경쟁 항체를 첨가하고, 플레이트를 실온에서 인큐베이션하였다. PHERAstar 형광 판독기(BMG Labtech GmBh)를 사용하여 분석 플레이트를 665 및 620 nm에서 판독하였다. 로그 변환한 샘플 농도를 해당 HTRF 신호 비율(665 nm/620 nm)에 대해 플롯하였다. 4개의 파라미터 비선형 회귀 분석(최소 제곱 피팅)을 XY-플롯에서 수행하여 표지되지 않은 샘플의 EC50를 계산하였으며, 이때 EC50은 Fc 감마 수용체에 대한 샘플의 친화도에 반비례한다.

[0630] TR-FRET에 의해 결정된 CD32a에 대한 경쟁 결합의 측정. Fc 도메인의 수를 증가시키면, CD32a에 대해 면역글로불린과 경쟁하는 작제물의 능력이 크게 증가하였는데, 이는 감소된 IC50 값에 의해 반영된 바와 같다. S3Y-AA-OBI 및 S3Y-AA-AVE와 서열이 동일하지만, Fab 도메인이 결여된 대조 화합물은 이러한 작제물에 비해 세포 표면 CD32a에 대해 경쟁하였는데, 이는 Fab 도메인을 포함하는 것이 Fc 수용체에 대한 결합을 변경하지 않음을 입증하였다.

표 16

[0631]

특정 항-CD20 작제물의 Fc 수용체 결합				
작제물	항원	FcγRIIIaV158 IC50 (nM)	FcγRIIaH131 IC50 (nM)	FcγRIIb IC50 (nM)
mAb	CD20	428	1273	3291
작제물 13 (S3Y)	CD20	0.076	0.009	2.146
작제물 7 (S3I)	CD20	0.230	0.014	29.220
작제물 8 (S3W)	CD20	0.476	0.026	34.925
작제물 9 (S3A)	CD20	0.539	0.018	17.361
작제물 10 (S5I)	CD20	0.045	0.002	4.427
작제물 15 (S5X)	CD20	0.055	0.012	0.086
작제물 1 (S5Y)	CD20	0.017	0.014	1.231
대조군 (S3Y)	항원 결합 도메인 없음	0.097	0.025	3.297

[0632] **실시예 35: 항원 결합은 항-CCR4 작제물에서 보존된다.**

[0633] SPR을 사용하여 항원 결합을 평가하였다. 재조합의 히스티딘 태그된 CCR4(9049-B7 R & D Systems) 단백질을 이전에 고정된 항-6X His 항체를 사용하여 센서에서 포획하였다. 동족 항체 및 SIF-바디의 연속 희석액을 센서에 통과시켰으며, 이는 분석물 주입 사이에 낮은 pH 글리신 용액으로 다시 생성하였다. 결합을 1:1 Langmuir 상호작용 모델을 사용하여 계산하였다.

[0634] 항-CCR4 작제물의 결합이 표 17에 도시되어 있다. 시험한 모든 화합물은 SEC에 의한 순도가 96% 미만이었다. 작제물은 1:1 결합을 선호하는 분석에서 상응하는 단일클론 항체와 유사한 항원 결합을 가졌다.

표 17

[0635]

특정 항-CCR4 작제물의 CCR4 결합	
작제물	**KD (nM)**
mAb	7.38
작제물 13 (S3Y)	9.44
작제물 7 (S3I)	0.013

[0636] **실시예 36: 항-CCR4 Fc 작제물은 Fc 수용체에 결합한다.**

[0637] Fc 수용체 결합의 분석으로 항-CCR4 Fc 작제물 13(실시예 2; 표 6)이 Fc 수용체에 결합한다는 것을 알아내었다.

[0638] **기타 구현예**

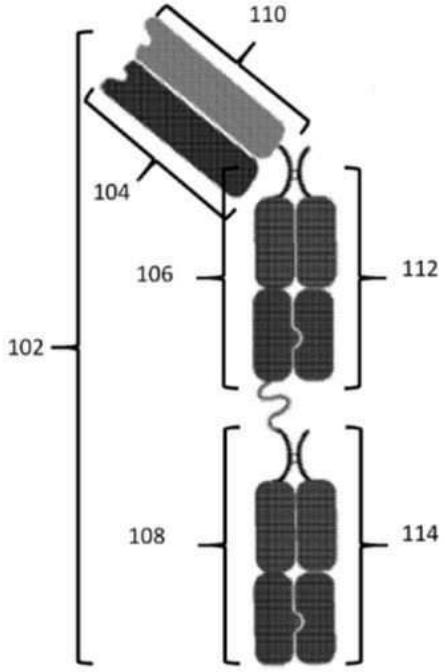
[0639] 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 독립적인 간행물 또는 특허 출원이 구체적으로 그리고 개별적으로 참조로서 포함되는 것으로 나타내어진 것처럼 그와 같은 정도로 본원에 참조로서 포함된다.

[0640] 본 개시는 이의 구체적 구현예와 관련하여 기술되어 있지만, 추가의 변형이 가능하고 본 출원은 일반적으로 본 개시의 원리를 따르고 본 개시가 관련된 분야에 공지되거나 통상적인 관행에 속하고 상기 기술된 본질적 특징에 적용될 수 있는 본 개시에서부터의 이러한 변경을 포함하는 본 개시의 임의의 변형, 사용 또는 응용을 포함하도록 의도되며, 청구항의 범주를 따르는 것으로 이해될 것이다.

[0641] 다른 구현예는 청구 범위 내에 포함된다.

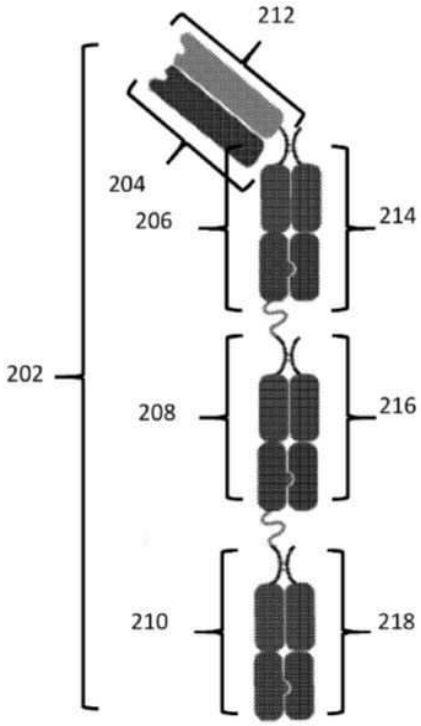
도면

도면1



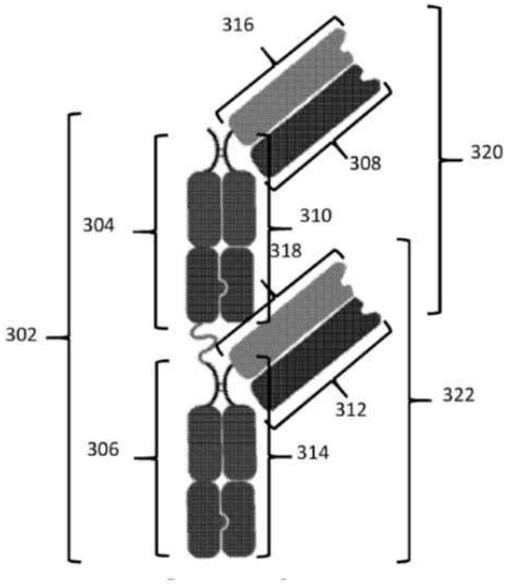
작제물 1

도면2



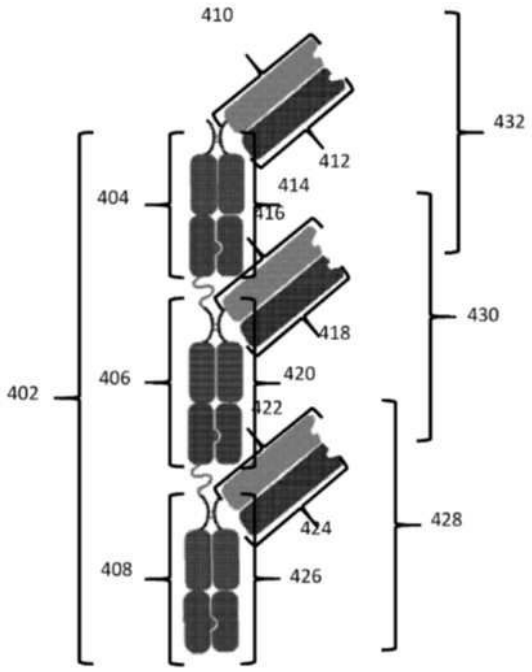
작제물 2

도면3



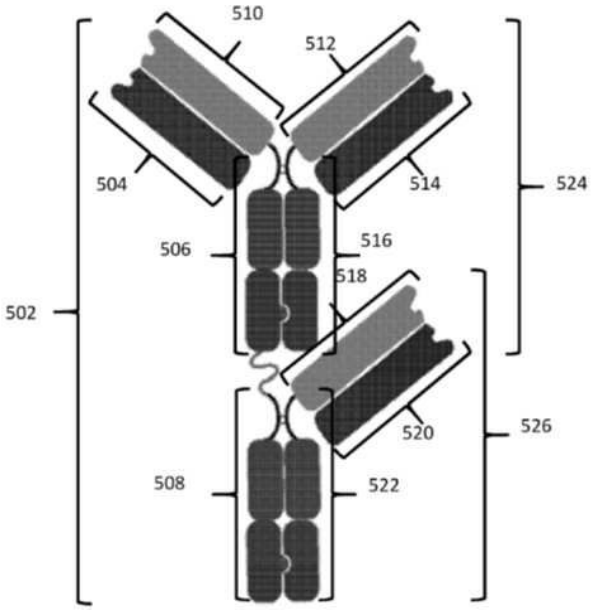
작제물 3

도면4



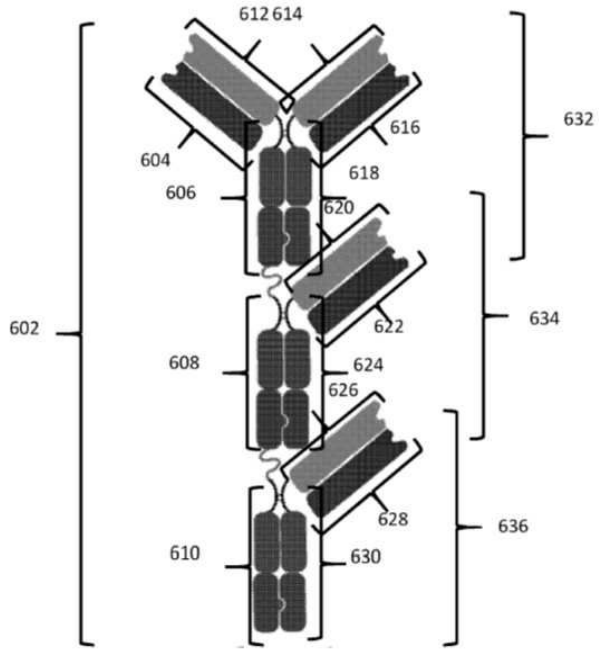
작제물 4

도면5



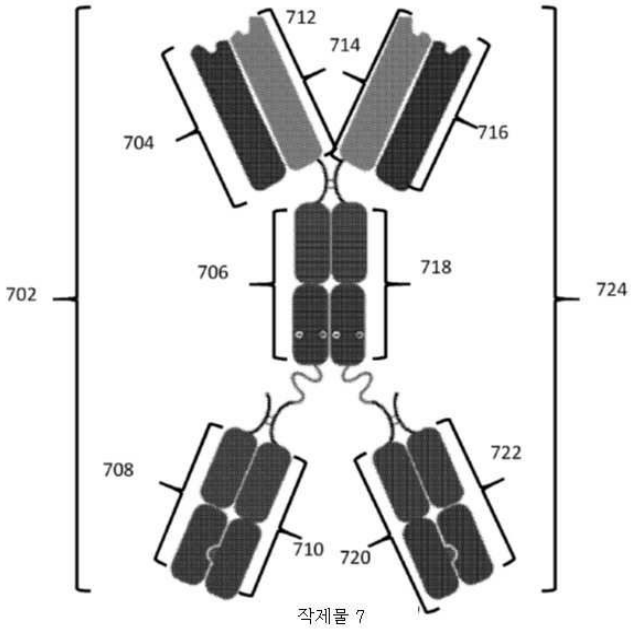
작제물 5

도면6



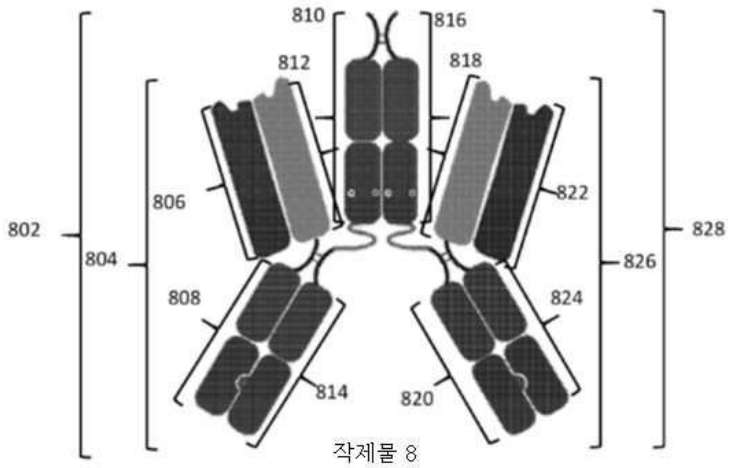
작제물 6

도면7



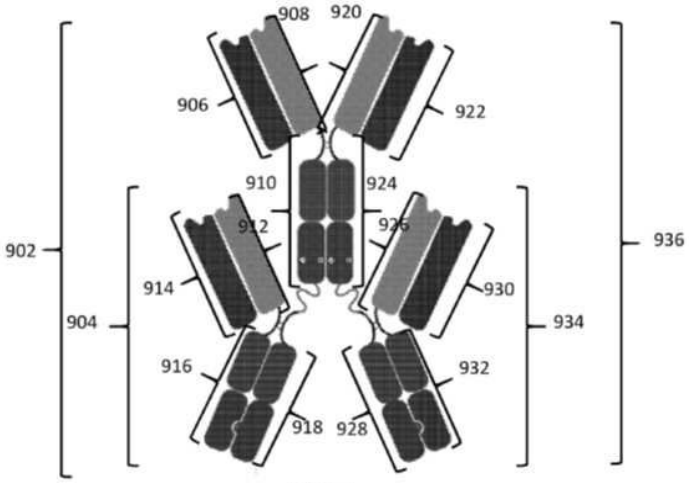
작제물 7

도면8



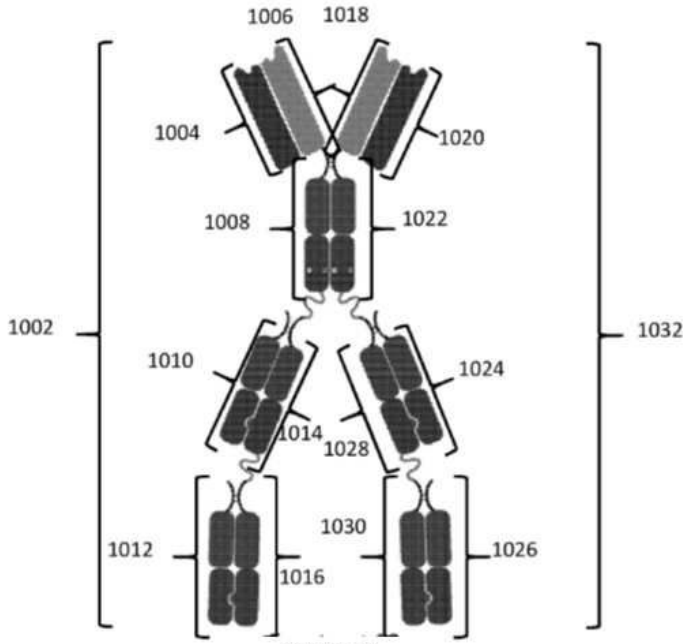
작제물 8

도면9



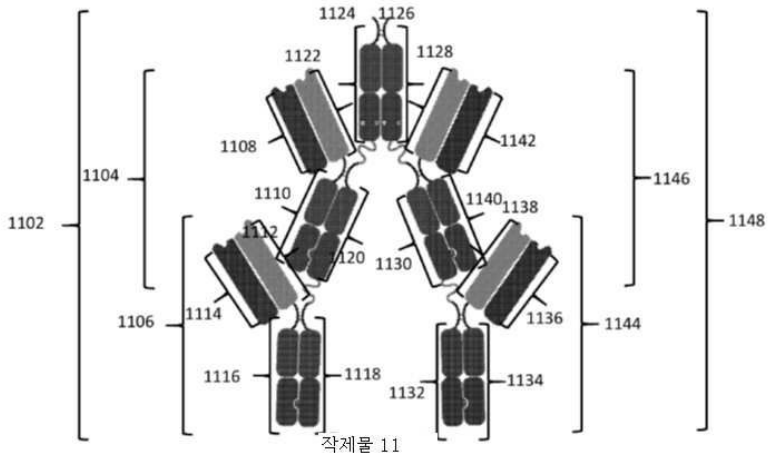
작제물 9

도면10



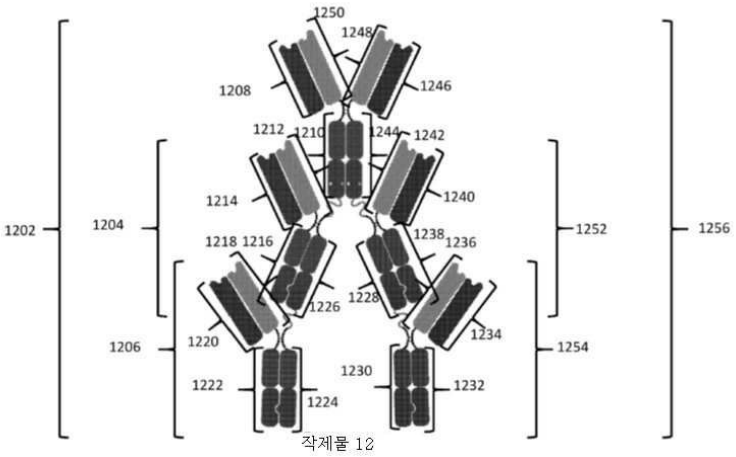
작제물 10

도면11



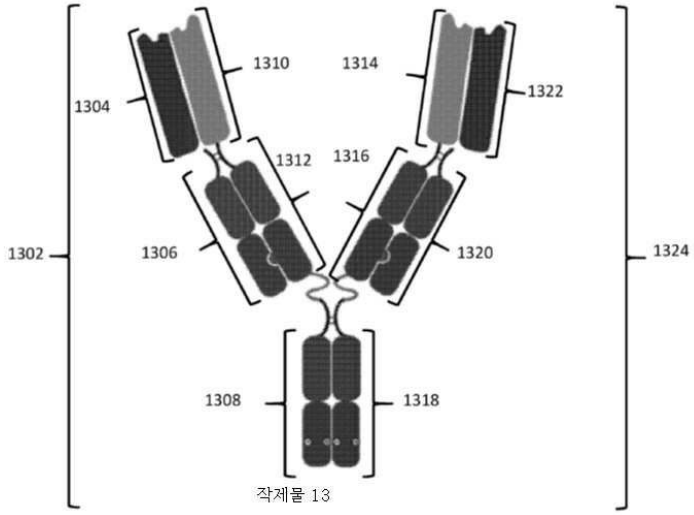
작제물 11

도면12



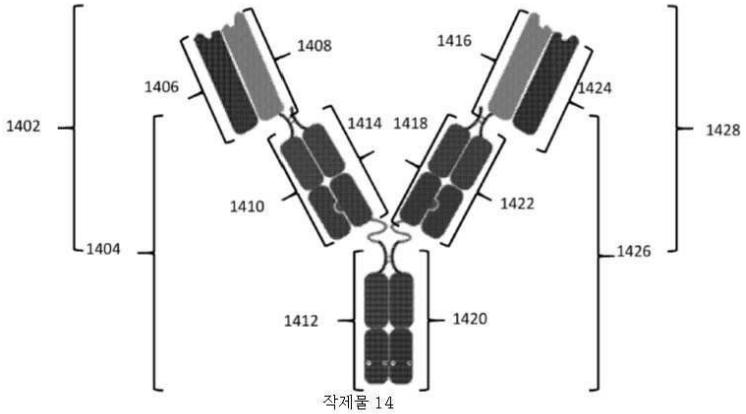
작제물 12

도면13



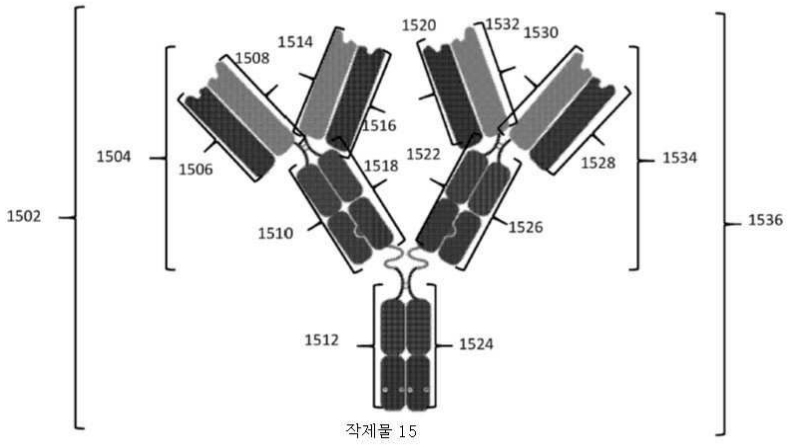
작제물 13

도면14



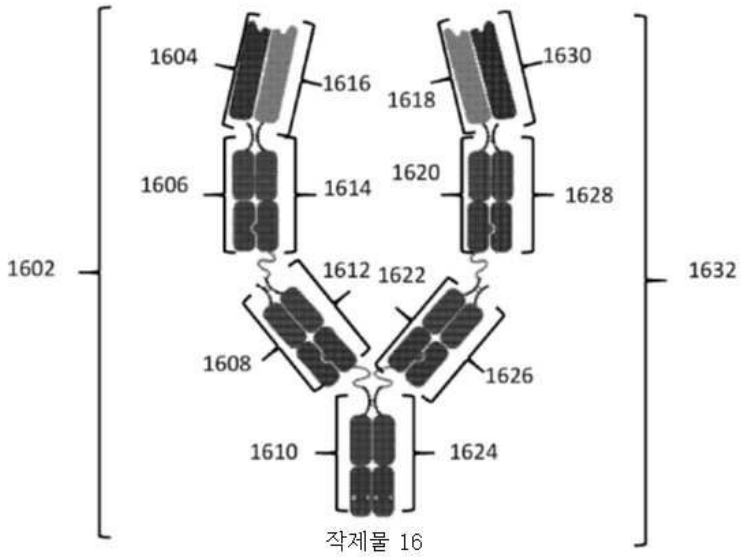
작제물 14

도면15



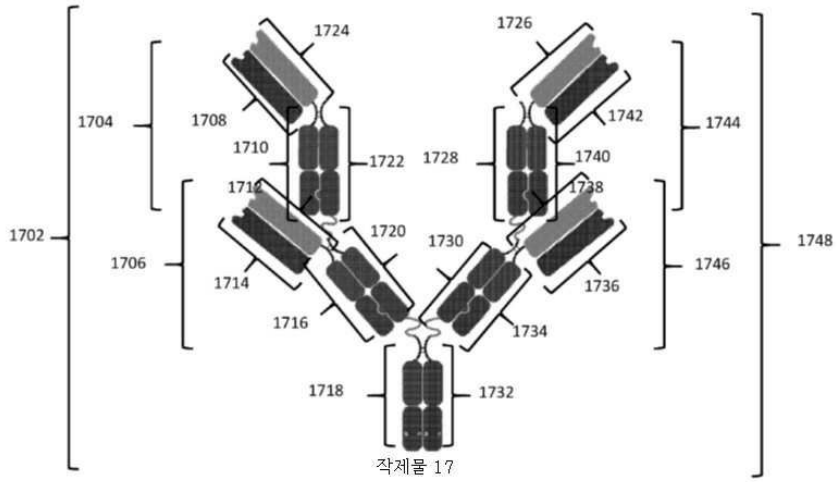
작제물 15

도면16



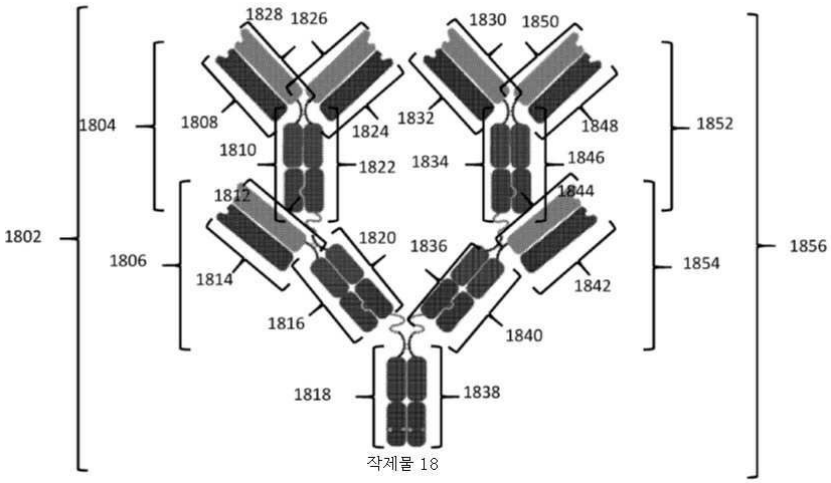
작제물 16

도면17



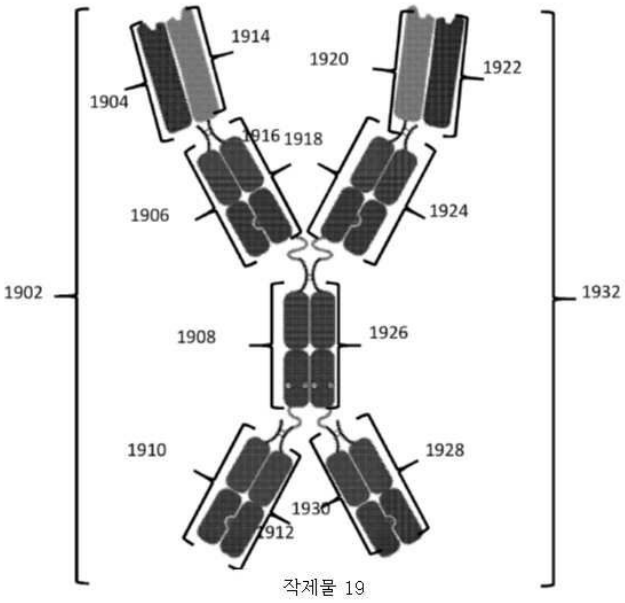
작제물 17

도면18



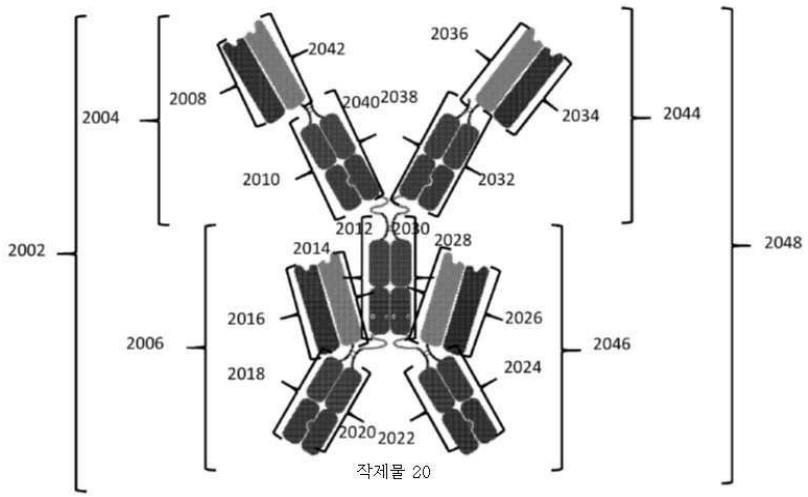
작제물 18

도면19



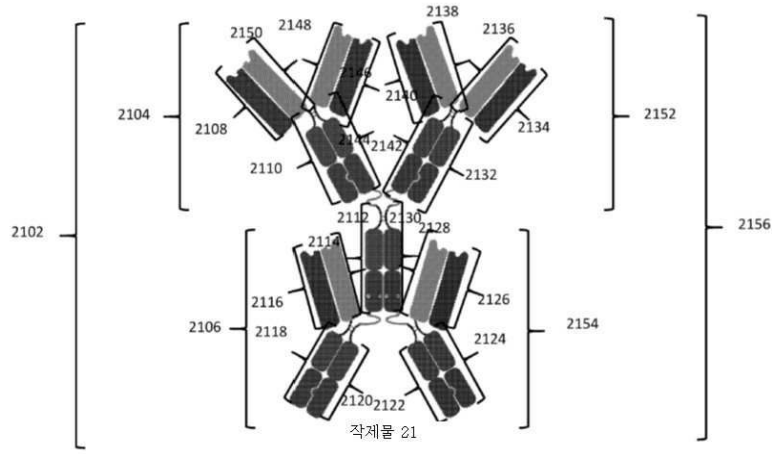
작제물 19

도면20



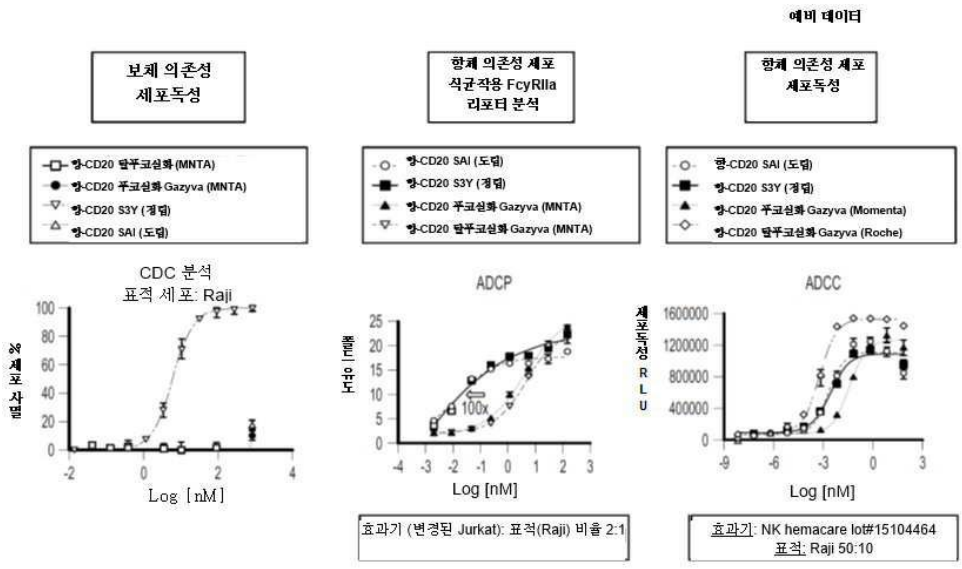
작제물 20

도면21

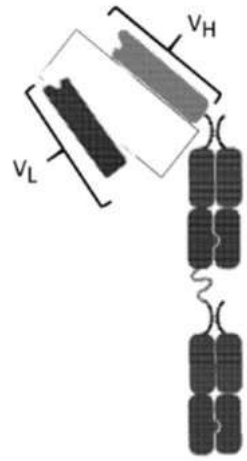


작제물 21

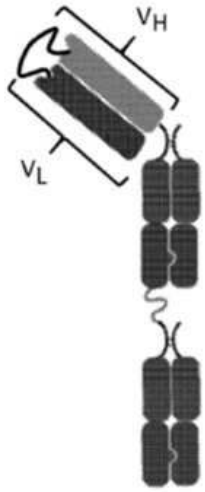
도면22



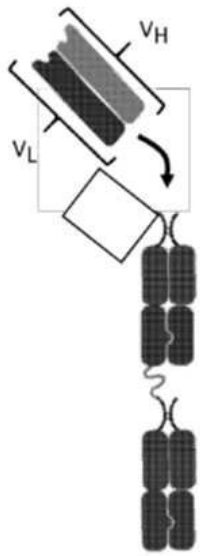
도면23a



도면23b



도면23c



도면24a

216 EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD 280
281 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR 344
345 EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK 409
410 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 447

(서열 번호 43)

도면24b

221 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD 280
281 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR 344
345 EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK 409
410 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 446

(서열 번호 45)

도면24c

216 EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD 280
281 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR 344
345 EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK 409
410 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 446

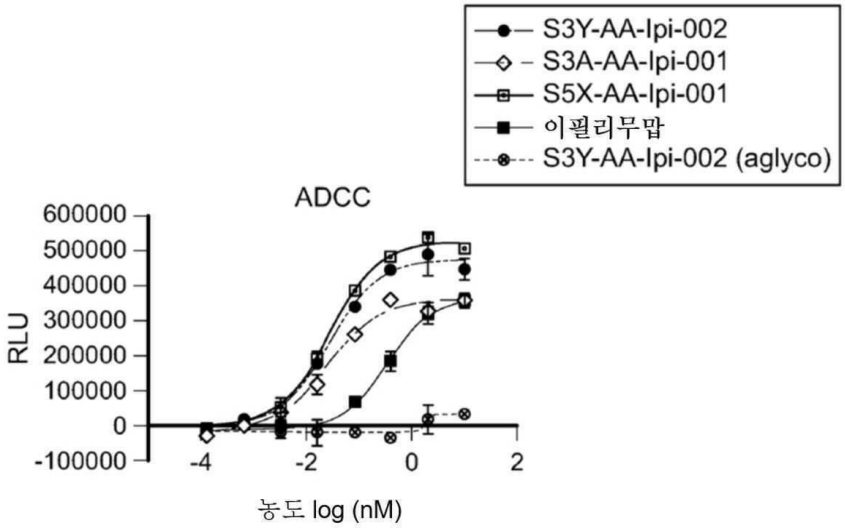
(서열 번호 47)

도면24d

221 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD 280
281 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR 344
345 EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK 409
410 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 447

(서열 번호 42)

도면25



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS RELATED TO ENGINEERED FC-ANTIGEN BINDING DOMAIN CONSTRUCTS TARGETED TO CCR4

<130> 14131-0187WO1

<140> PCT/US2019/041324

<141> 2019-07-11

<150> 62/696,746

<151> 2018-07-11

<160> 141

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 1

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210

> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 2

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 3

Ser Gly Gly Gly

1

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 4

Gly Ser Gly Ser

1

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 5

Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 6

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 7

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 8

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

1 5 10

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 9

Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 10

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 11

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

1 5 10

<210> 12

<211

> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 12

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 13

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

1 5 10

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 14

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

1 5 10 15

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 15

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

1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly

20

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 16

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 17

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

1 5 10 15

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 18

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

1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly

20

<210> 19

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 19

Gly Gly Gly Gly

1

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 20

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 21

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

1 5 10

<210> 22

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 22

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

1 5 10 15

<210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 23

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly

20

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 24

Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 25

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 26

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

1 5 10 15

<210> 27

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 27

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly
20

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 28

Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 29

Ser Ala Cys Tyr Cys Glu Leu Ser
1 5

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 30

Arg Ser Ile Ala Thr

1 5

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 31

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

1 5 10 15

His

<210> 32

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Gly Ser Gly

35

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 33

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

1 5 10 15

Arg

<210> 34

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Gly Gly Ser

35

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 35

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

1 5 10

<210> 36

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 36

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

1 5 10 15

Gly Ser

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

Albumin binding peptide

<400> 37

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10

<210> 38

<400> 38

000

<210> 39

<400> 39

000

<210> 40

<400> 40

000

<210> 41

<400> 41

000

<210> 42

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 42

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gly Lys

225

<210> 43

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 43

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

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

210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

<210> 44

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 44

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

210 215 220
Pro Gly Lys
225

<210> 45
<211> 226
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<400> 45
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

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

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

130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly
225

<210> 46

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 46

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

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

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

<210> 47
<211> 231
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 47
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

50 55 60

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

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
225 230

<210> 48
<211> 226
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<400> 48
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gly

225

<210> 49

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 49

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 50
<211> 227
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
<400> 50

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

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

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

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gly Lys

225

<210> 51

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 51

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220
Pro Gly Lys
225

<210> 52
<211> 226
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
<400> 52
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

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

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gly

225

<210> 53

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 53

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

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

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

210 215 220
Pro Gly Lys
225
<210> 54
<211> 695
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<400> 54
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445
Lys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
450 455 460
Gly Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
465 470 475 480

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
485 490 495
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
500 505 510
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

690 695

<210> 55

<400> 55

000

<210> 56

<400> 56

000

<210> 57

<400> 57

000

<210> 58

<400> 58

000

<210> 59

<400> 59

000

<210> 60

<400> 60

000

<210> 61

<400> 61

000

<210> 62

<400> 62

000

<210> 63

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 63

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gly

225

<210> 64

<400> 64

000

<210> 65

<400> 65

000

<210> 66

<211> 720

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 66

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Gly

465 470 475 480

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp Lys

485 490 495

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
500 505 510
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

515 520 525
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
530 535 540
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
545 550 555 560
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
565 570 575
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

580 585 590
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
595 600 605
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
610 615 620
Leu Pro Pro Cys Arg Asp Lys Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
625 630 635 640
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

645 650 655
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
660 665 670
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
675 680 685
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
690 695 700
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

705 710 715 720
<210> 67
<400> 67
000

<210> 68

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 68

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 69

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 69

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val
180 185 190

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

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220
Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
225 230 235 240
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
245 250 255
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
275 280 285
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
290 295 300
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
305 310 315 320
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
325 330 335

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
465 470

<210> 70

<400> 70

000

<210> 71

<211> 942

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 71

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Lys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
645 650 655
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
660 665 670

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
675 680 685
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
690 695 700
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His
705 710 715 720
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
725 730 735

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
740 745 750
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
755 760 765
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
770 775 780
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
785 790 795 800

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
805 810 815
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
820 825 830
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
835 840 845
Pro Cys Arg Asp Lys Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
850 855 860

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
865 870 875 880
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

885 890 895

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

900 905 910

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

915 920 925

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

930 935 940

<210> 72

<400> 72

000

<210> 73

<211> 942

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 73

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445
Lys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
450 455 460
Gly Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
465 470 475 480

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
485 490 495
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
500 505 510
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
515 520 525
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
530 535 540

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
545 550 555 560
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
565 570 575
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
580 585 590
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Lys Leu Thr
595 600 605

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

610 615 620

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
625 630 635 640

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
645 650 655

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
660 665 670

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
675 680 685

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
690 695 700

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His
705 710 715 720

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
725 730 735

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
740 745 750

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
755 760 765

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
770 775 780

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
785 790 795 800

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
805 810 815

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
820 825 830

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
835 840 845

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
850 855 860

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
865 870 875 880
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser
885 890 895
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
900 905 910
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
915 920 925

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
930 935 940
<210> 74
<400> 74
000
<210> 75
<211> 943
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<400> 75
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

340 345 350

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445
Lys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
450 455 460
Gly Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
465 470 475 480

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
485 490 495
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
500 505 510
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
515 520 525
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
530 535 540

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
545 550 555 560
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
565 570 575
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
580 585 590

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
595 600 605

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
610 615 620

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
625 630 635 640

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
645 650 655

Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
660 665 670

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
675 680 685

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
690 695 700

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr
705 710 715 720

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
725 730 735

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
740 745 750

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
755 760 765

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
770 775 780

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
785 790 795 800

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
805 810 815

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
820 825 830

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

835 840 845

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

850 855 860

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

865 870 875 880

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

885 890 895

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

900 905 910

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

915 920 925

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

930 935 940

<210> 76

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 76

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 77

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(30)

<223> This sequence may encompass 4-30 residues

<400> 77

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 78

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(30)

<223> This sequence may encompass 8-30 residues

<400> 78

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 79

<211> 30

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

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

polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(30)

<223> This sequence may encompass 12-30 residues

<400> 79

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 80

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> This sequence may encompass 4-20 residues

<400> 80

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly

20

<210> 81

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> This sequence may encompass 8-20 residues

<400> 81

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly

20

<210> 82

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> This sequence may encompass 12-20 residues

<400> 82

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly

20

<210> 83

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 83

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

1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu

20

<210> 84

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 84

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

1 5 10 15

<210> 85

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 85

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu

<210> 86

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 86

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

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

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

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

50 55 60

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

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

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105

<210> 87

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 87

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

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

<210> 88

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 88

Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr Gly

1 5

<210> 89

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 89

Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser

1 5

<210> 90

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 90

Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr

1 5 10

<210> 91

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 91

Arg Asn Ile Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr

1 5 10

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 92

Phe Gln Gly Ser Leu Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 93

<211> 200

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(200)
<223> This sequence may encompass 4-200 residues
<400> 93
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

35 40 45
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
50 55 60
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
85 90 95
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

100 105 110
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
130 135 140
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

165 170 175
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
195 200

<210> 94

<211> 180

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(180)

<223> This sequence may encompass 4-180 residues

<400> 94

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
50 55 60

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
85 90 95

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Gly Gly Gly

180

<210> 95

<211> 160

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(160)

<223> This sequence may encompass 4-160 residues

<400> 95

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

<210> 96

<211> 140

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(140)

<223> This sequence may encompass 4-140 residues

<400> 96

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
50 55 60

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
85 90 95

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
130 135 140

<210> 97

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(40)

<223> This sequence may encompass 4-40 residues

<400> 97

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

35 40

<210> 98

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(100)

<223> This sequence may encompass 4-100 residues

<400> 98

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
85 90 95
Gly Gly Gly Gly
100

<210> 99
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(90)
<223> This sequence may encompass 4-90 residues

<400> 99
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
35 40 45
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
50 55 60

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
85 90

<210> 100
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(80)

<223> This sequence may encompass 4-80 residues

<400> 100

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

<210> 101

<211> 70

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(70)

<223> This sequence may encompass 4-70 residues

<400> 101

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Gly Gly Gly Gly Gly

65 70

<210> 102

<211> 60

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(60)

<223> This sequence may encompass 4-60 residues

<400> 102

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

50 55 60

<210> 103

<211> 50

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(50)

<223> This sequence may encompass 4-50 residues

<400> 103

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gly

50

<210> 104

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(19)

<223> This sequence may encompass 4-19 residues

<400> 104

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly

<210> 105

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(18)

<223> This sequence may encompass 4-18 residues

<400> 105

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

1 5 10 15

Gly Gly

<210> 106

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> This sequence may encompass 4-17 residues

<400> 106

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

1 5 10 15

Gly

<210> 107

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(16)

<223> This sequence may encompass 4-16 residues

<400> 107

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

1 5 10 15

<210> 108

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(15)

<223> This sequence may encompass 4-15 residues

<400> 108

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

1 5 10 15

<210> 109

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(14)

<223> This sequence may encompass 4-14 residues

<400> 109

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

1 5 10

<210> 110

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(13)

<223> This sequence may encompass 4-13 residues

<400> 110

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

1 5 10

<210> 111

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(12)

<223> This sequence may encompass 4-12 residues

<400> 111

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

1 5 10

<210> 112

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(11)

<223> This sequence may encompass 4-11 residues

<400> 112

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 113

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(10)

<223> This sequence may encompass 4-10 residues

<400> 113

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 114

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> This sequence may encompass 4-9 residues

<400> 114

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 115

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(8)

<223> This sequence may encompass 4-8 residues

<400> 115

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 116

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> This sequence may encompass 4-7 residues

<400> 116

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 117

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(6)

<223> This sequence may encompass 4-6 residues

<400> 117

Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 118

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> This sequence may encompass 4-5 residues

<400> 118

Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 119

<211> 200

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(200)

<223> This sequence may encompass 6-200 residues

<400> 119

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

35 40 45
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
50 55 60
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
85 90 95
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

100 105 110
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
130 135 140
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

165 170 175
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
180 185 190
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
195 200

<210> 120

<211> 200

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(200)

<223> This sequence may encompass 8-200 residues

<400> 120

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
50 55 60

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
85 90 95

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
165 170 175

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

195 200

<210> 121

<211> 200

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(200)

<223> This sequence may encompass 10-200 residues

<400> 121

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

195 200

<210> 122

<211> 200

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(200)

<223> This sequence may encompass 12-200 residues

<400> 122

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

195 200

<210> 123

<211> 200

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(200)

<223> This sequence may encompass 14-200 residues

<400> 123

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
100 105 110
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

130 135 140
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
165 170 175
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
180 185 190
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
195 200

<210> 124
<211> 200
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(200)
<223> This sequence may encompass 16-200 residues
<400> 124
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
35 40 45
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
50 55 60

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
85 90 95

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
100 105 110
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
130 135 140
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
165 170 175
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
180 185 190
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
195 200

<210> 125
<211> 200
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(200)

<223> This sequence may encompass 18-200 residues
<400> 125
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

195 200

<210> 126

<211> 200

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(200)

<223> This sequence may encompass 20-200 residues

<400> 126

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
35 40 45
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
50 55 60
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
85 90 95
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
100 105 110
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
165 170 175
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
180 185 190
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
195 200

<210> 127

<211> 200

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(200)

<223> This sequence may encompass 30-200 residues

<400> 127

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

35 40 45
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
50 55 60
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
85 90 95
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

100 105 110
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
130 135 140
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

165 170 175
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
180 185 190
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
195 200

<210> 128

<211> 200

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(200)

<223> This sequence may encompass 40-200 residues

<400>

128

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
50 55 60

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
85 90 95

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
165 170 175

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

180 185 190

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
195 200

<210> 129

<211> 200

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(200)

<223> This sequence may encompass 50-200 residues

<400> 129

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

20 25 30
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
35 40 45
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
50 55 60
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

85 90 95
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
100 105 110
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

195 200

<210> 130

<211> 200

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(200)

<223> This sequence may encompass 60-200 residues

<400> 130

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
130 135 140
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
165 170 175

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
180 185 190
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
195 200

<210> 131
<211> 200
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(200)
<223> This sequence may encompass 70-200 residues
<400> 131
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
35 40 45
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

195 200

<210> 132

<211> 200

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(200)

<223> This sequence may encompass 80-200 residues

<400> 132

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
35 40 45
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
50 55 60
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
85 90 95

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
100 105 110
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
130 135 140
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
165 170 175
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
180 185 190
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
195 200

<210> 133
<211> 200
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(200)

<223> This sequence may encompass 90-200 residues

<400> 133

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
35 40 45

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

50 55 60

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
85 90 95

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
165 170 175

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

180 185 190

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
195 200

<210> 134

<211> 200

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(200)
<223> This sequence may encompass 100-200 residues
<400> 134

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
35 40 45
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
50 55 60
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
85 90 95
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
100 105 110
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
165 170 175
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
180 185 190
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
195 200

<210> 135

<211> 200

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(200)

<223> This sequence may encompass 120-200 residues

<400> 135

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

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

35 40 45

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
50 55 60

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
85 90 95

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

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

195 200

<210> 136

<211> 200

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(200)

<223> This sequence may encompass 140-200 residues

<400

> 136

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

195 200

<210> 137

<211> 200

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(200)

<223> This sequence may encompass 160-200 residues

<400> 137

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

195 200

<210> 138

<211> 200

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(200)

<223> This sequence may encompass 180-200 residues

<400> 138

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

195 200

<210> 139

<211> 200

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(200)

<223> This sequence may encompass 190-200 residues

<400> 139

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

195 200

<210> 140

<211> 695

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 140

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

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

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

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275 280 285

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

290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Lys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
530 535 540
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
545 550 555 560

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
565 570 575
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
580 585 590
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
595 600 605
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
610 615 620

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
625 630 635 640
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
645 650 655
Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
660 665 670
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
675 680 685

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
690 695
<210> 141
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
6xHis tag
<400> 141
His His His His His His
1 5
1