



등록특허 10-2635635



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년02월14일
(11) 등록번호 10-2635635
(24) 등록일자 2024년02월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/00 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01) *A61P 37/00* (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/00 (2013.01)
A61P 29/00 (2023.02)

(21) 출원번호 10-2022-7037780(분할)

(22) 출원일자(국제) 2017년05월23일
심사청구일자 2022년11월25일

(85) 번역문제출일자 2022년10월28일

(65) 공개번호 10-2022-0151025

(43) 공개일자 2022년11월11일

(62) 원출원 특허 10-2018-7037334
원출원일자(국제) 2017년05월23일
심사청구일자 2020년05월21일

(86) 국제출원번호 PCT/US2017/034084

(87) 국제공개번호 WO 2017/205434
국제공개일자 2017년11월30일

(30) 우선권주장
62/340,322 2016년05월23일 미국(US)
62/443,451 2017년01월06일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌
WO2015168643 A2*
일본 후생노동성, '항체 의약품의 품질 평가를
위한 가이던스', 2012.*
US06737056 B
US07951917 B

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 2 항

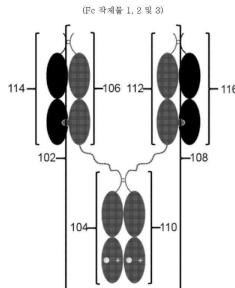
심사관 : 문영준

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

(57) 요약

본 개시는 유전자 조작 IgG Fc 작제물 및 그의 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 37/00 (2018.01)

C07K 16/46 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/526 (2013.01)

C07K 2317/53 (2013.01)

C07K 2317/60 (2013.01)

C07K 2317/94 (2013.01)

(72) 발명자

오르티즈 다니엘

미국 매사추세츠주 02180 스톤험 하이스트리트 15

루티트즈키 로라

미국 매사추세츠주 02144 소머빌 클라렌든 애비뉴

70

워시번 나타니얼 제이.

미국 매사추세츠주 10460 리틀턴 킹 스트리트 543

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 48의 서열로 이루어진 폴리펩타이드 및 서열번호 49의 서열로 이루어진 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 분자를 함유하는 단리된 재조합 포유동물 세포.

청구항 2

서열번호 48의 서열로 이루어진 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 분자 및 서열번호 49의 서열로 이루어진 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 분자를 함유하는 단리된 재조합 포유동물 세포.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

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

배경 기술

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

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 개시는 생물학적 활성이 있는 Fc 도메인-함유 치료 작제물을 특징으로 한다. 이러한 작제물은 Fc 수용체에 대한 바람직한 혈청 반감기 및/또는 결합 친화도 및/또는 결합능을 가질 수 있다.

과제의 해결 수단

[0005] 일반적으로, 본 개시는 2~10개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물, 예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, Fc 작제물은 2~10개의 Fc 도메인, 2~5개의 Fc 도메인, 2~4개의 Fc 도메인, 2~3개의 Fc 도메인, 3~5개의 Fc 도메인, 2~8개의 Fc 도메인, 또는 2~6개의 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 작제물은 2~4개의 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 작제물은 5~10개의 Fc 도메인(예컨대, 5~6개, 5~7개, 5~8개, 5~9개, 또는 5~10개의 Fc 도메인)을 포함한다.

[0006] 일부 구현예에서, 본 개시의 작제물(예컨대, 2~4개의 Fc 도메인, 예컨대, 2, 3, 또는 4개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물) 및 동질 약제학적 조성물(예컨대, 2~4개의 Fc 도메인, 예컨대, 2, 3, 또는 4개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물을 함유하는 조성물)은 예컨대, 대상의 염증 감소, 대상의 자가항체의 제거 촉진, 대상의 항원 제거

억제, 대상의 면역 반응의 면역 복합체-기반 활성을 억제하는 것과 같은 면역 반응 억제, 및 대상의 면역 질환 및 염증성 질환(예컨대, 자가면역 질환) 치료에 유용하다. 본원에 기재된 Fc 작제물은 면역 세포의 현저한 자극 없이 면역 질환 및 염증성 질환이 있는 환자를 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시의 작제물(예컨대, 5~10개의 Fc 도메인, 예컨대, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물) 및 동질 약제학적 조성물(예컨대, 5~10개의 Fc 도메인, 예컨대, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물을 함유하는 조성물)은 예컨대, 대상의 면역 반응의 면역 세포 활성 유도, 대상의 표적 세포의 식균 작용 증가(즉, 암 세포 또는 감염 세포) 및 대상의 암 및 감염증과 같은 질환의 치료에 유용하다.

[0007] 이들 작제물의 특성은 실질적으로 동질인 조성물의 효율적인 생성을 가능하게 한다. 조성물의 동질성 정도는 조성물의 약동학 및 생체내 성능에 영향을 미친다. 조성물의 이러한 동질성은 조성물의 안전성, 효능, 균일성 및 신뢰도를 확실히 하기 위해 바람직하다. 본 개시의 Fc 작제물은 실질적으로 동질(예컨대, 적어도 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동질)인 집단 또는 조성물에 있을 수 있다.

[0008] 본원에 더 상세하게 기술된 바와 같이, 본 개시는 모두 동일한 수의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물을 함유하는 실질적으로 동질인 조성물뿐 아니라 이러한 실질적으로 동질인 조성물을 제조하는 방법을 특징으로 한다.

[0009] 제1 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L-B를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L은 글라이신 스페이서(spacer)이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함함; b) 식 A'-L'-B'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L'는 글라이신 스페이서이며, iii) B'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함함; c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩타이드; 및 d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩타이드를 포함하되, B와 B'는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, A와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, A'와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하는 Fc 작제물을 특징으로 한다.

[0010] 본 양태의 일부 구현예에서, B와 B' 각각은 돌연변이 D399K 및 K409D를 포함하고, A와 A' 각각은 돌연변이 S354C, T366W, 및 E357K를 포함하며, 제5 및 제6 Fc 도메인 단량체 각각은 돌연변이 Y349C, T366S, L368A, Y407V, 및 K370D를 포함한다.

[0011] 제2 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L-B를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L은 글라이신 스페이서이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함함; b) 식 A'-L'-B'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L'는 글라이신 스페이서이며, iii) B'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함함; c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩타이드; 및 d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩타이드를 포함하되, A와 A'는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, B와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, B'와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하는 Fc 작제물을 특징으로 한다.

[0012] 본 양태의 일부 구현예에서, A와 A' 각각은 돌연변이 D399K 및 K409D를 포함하고, B와 B' 각각은 돌연변이 S354C, T366W, 및 E357K를 포함하며, 제5 및 제6 Fc 도메인 단량체 각각은 돌연변이 Y349C, T366S, L368A, Y407V, 및 K370D를 포함한다.

[0013] 본 개시의 전술한 2개의 양태의 일부 구현예에서, L과 L' 각각은 적어도 4, 8, 12, 14, 16, 18, 또는 20개의 글라이신을 포함한다. 일부 구현예에서, L과 L' 각각은 4~30개, 8~30개, 또는 12~30개의 글라이신을 포함한다. 일부 구현예에서, L과 L' 각각은 GGGGGGGGGGGGGGGGGGG(서열번호 27)을 포함하거나 이로써 이루어지거나 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0014] 본 개시의 전술한 2개의 양태의 일부 구현예에서, A는 Fc 도메인 단량체로 이루어진다. 일부 구현예에서, B는 Fc 도메인 단량체로 이루어진다. 일부 구현예에서, A'는 Fc 도메인 단량체로 이루어진다. 일부 구현예에서, B'는 Fc 도메인 단량체로 이루어진다. 일부 구현예에서, 제3 폴리펩타이드는 Fc 도메인 단량체로 이루어진다. 일부 구현예에서, 제4 폴리펩타이드는 Fc 도메인 단량체로 이루어진다.

[0015] 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체 중 하나 이상은 IgG 힌지(hinge) 도메인, IgG C_H2 항체 불변 도메인, 및 IgG C_H3 항체 불변 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체 중 각각은 IgG 힌지 도메인, IgG C_H2 항체 불변 도메인, 및 IgG C_H3 항체 불변 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체 중 각각은 IgG1 Fc 도메인 단량체이다.

[0016] 본 개시의 전술한 2개의 양태의 일부 구현예에서, 제1, 제2, 제3, 및 제4 폴리펩타이드 중 하나 이상에서 N-말

단 Asp는 Glu으로 돌연변이된다. 일부 구현예에서, 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리펩타이드 각각에서 N-말단 Asp는 Glu으로 돌연변이된다.

[0017] 일부 구현예에서, 제1, 제2, 제3, 및 제4 폴리펩타이드 중 하나 이상은 C-말단 라이신. 일부 구현예에서, 제1, 제2, 제3, 및 제4 폴리펩타이드 각각은 C-말단 라이신이 결여된다.

[0018] 본 개시의 전술한 2개의 양태의 일부 구현예에서, 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드는 동일한 아미노산 서열을 갖되, 제3 폴리펩타이드 및 제4 폴리펩타이드는 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0019] 본 개시의 제1 양태의 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드는

[0020] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISAKGQPREPVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGPGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 49)의 서열에 적어도 95%의 서열 동일성(예컨대, 적어도 97%, 99%, 또는 99.5%의 서열 동일성)을 갖는다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은

[0021] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISAKGQPREPVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGPGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 49)의 서열에 적어도 95%의 서열 동일성(예컨대, 적어도 97%, 99%, 또는 99.5%의 서열 동일성)을 갖는다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은

[0022] 본 개시의 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은 최대 10개(9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개)의 단일 아미노산 변형(예컨대, 치환, 예컨대, 보존성 치환)을 갖는

[0023] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISAKGQPREPVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGPGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 49)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0024] 본 개시의 제1 양태의 일부 구현예에서, 제3 및 제4 폴리펩타이드 각각은

[0025] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 48)의 서열에 적어도 95%의 서열 동일성(예컨대, 적어도 97%, 99%, 또는 99.5%의 서열 동일성)을 갖는다. 일부 구현예에서, 제3 및 제4 폴리펩타이드는

[0026] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 48)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0027] 본 개시의 일부 구현예에서, 제3 및 제4 폴리펩타이드 각각은 최대 10개(9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개)의 단일 아미노산 변형(예컨대, 치환, 예컨대, 보존성 치환)을 갖는

[0028] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 48)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0029] 본 개시의 제1 양태의 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은

[0030] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK

VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVGVVEVNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 49)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어지고,

[0031] 제3 및 제4 폴리펩타이드 각각은

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVGVVEVNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 48)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0033] 본 개시의 제1 양태의 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은 최대 10개(9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개)의 단일 아미노산 변형(예컨대, 치환, 예컨대, 보존성 치환)을 갖는

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVGVVEVNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVGVVEVNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 49)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어지고,

[0035] 제3 및 제4 폴리펩타이드 각각은 최대 10개(9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개)의 단일 아미노산 변형(예컨대, 치환, 예컨대, 보존성 치환)을 갖는

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVGVVEVNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 48)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0037] 본 개시의 제1 양태의 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은

QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVGVVEVNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVGVVEVNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 60)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어지고, 제3 및 제4 폴리펩타이드 각각은

QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVGVVEVNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 59)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0040] 본 개시의 제2 양태의 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVGVVEVNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVGVVEVNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 61)의 서열에 적어도 95%의 서열 동일성(예컨대, 적어도 97%, 99%, 또는 99.5%의 서열 동일성)을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0042] 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVGVVEVNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK

VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVDSHEDPEVFKFNLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVDSHEDPEVFKFNLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSKLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 61)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0044] 본 개시의 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은 최대 10개(9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개)의 단일 아미노산 변형(예컨대, 치환, 예컨대, 보존성 치환)을 갖는

[0045] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVDSHEDPEVFKFNLWYVDGVEVHNKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVDSHEDPEVFKFNLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSKLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 61)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0046] 본 개시의 제2 양태의 일부 구현예에서, 제3 및 제4 폴리펩타이드 각각은

[0047] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVDSHEDPEVFKFNLWYVDGVEVHNKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSKLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 48)의 서열에 적어도 95%의 서열 동일성(예컨대, 적어도 97%, 99%, 또는 99.5%의 서열 동일성)을 갖는다. 일부 구현예에서, 제3 및 제4 폴리펩타이드는

[0048] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVDSHEDPEVFKFNLWYVDGVEVHNKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSKLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 48)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다. 일부 구현예에서, 제3 및 제4 폴리펩타이드는 최대 10개(9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개)의 단일 아미노산 변형(예컨대, 치환, 예컨대, 보존성 치환)을 갖는

[0049] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVDSHEDPEVFKFNLWYVDGVEVHNKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSKLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 48)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0050] 본 개시의 제2 양태의 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은

[0051] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVDSHEDPEVFKFNLWYVDGVEVHNKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVDSHEDPEVFKFNLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSKLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 61)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어지고, 제3 및 제4 폴리펩타이드 각각은

[0052] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVDSHEDPEVFKFNLWYVDGVEVHNKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSKLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 48)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0053] 본 개시의 제2 양태의 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은

[0054] QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVDSHEDPEVFKFNLWYVDGVEVHNKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVDSHEDPEVFKFNLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSKLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 62)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어지고, 제3 및 제4 폴리펩타이드 각각은

[0055] QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVDSHEDPEVFKFNLWYVDGVEVHNKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK

VSNKALPAPIEKTISKAKGQPQREPQVCTLPPSRDELTQNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 59)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0056] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L-B를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L은 링커(linker)이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함함); b) 식 A'-L'-B'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L'는 링커이며, iii) B'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함함); c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩타이드; 및 d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩타이드를 포함하되, B와 B'는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, A와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, A'와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드 각각은 서열번호 49의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어지고, 제3 폴리펩타이드 및 제4 폴리펩타이드 각각은 서열번호 48의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어지는 Fc 작제물을 특징으로 한다.

[0057] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L-B를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L은 링커이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함함); b) 식 A'-L'-B'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L'는 링커이며, iii) B'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함함); c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩타이드; 및 d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩타이드를 포함하되, A와 A'는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, B와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, B'와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드 각각은 서열번호 61의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어지고, 제3 폴리펩타이드 및 제4 폴리펩타이드 각각은 서열번호 48의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어지는 Fc 작제물을 특징으로 한다.

[0058] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L-B를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L은 글라이신 스페이서이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함함); b) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩타이드, 및 c) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩타이드를 포함하되, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하는 Fc 작제물을 특징으로 한다.

[0059] 본 개시의 본 양태의 일부 구현예에서, 제1 및 제3 Fc 도메인 단량체 각각은 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체 각각은 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체 각각의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 유전자 조작 돌출부를 포함하고, 제3 및 제4 Fc 도메인 단량체 각각의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 유전자 조작 핵심부를 포함한다.

[0060] 본 개시의 본 양태의 일부 구현예에서, L은 적어도 4, 8, 또는 12개의 글라이신을 포함한다. 일부 구현예에서, L은 4~30개, 8~30개, 또는 12~30개의 글라이신을 포함한다. 일부 구현예에서, L은 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG(서열 번호 27)의 서열을 포함하거나 이로써 이루어지거나 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0061] 본 개시의 본 양태의 일부 구현예에서, A, B, 제2 폴리펩타이드, 및 제3 폴리펩타이드 중 하나 이상은 Fc 도메인 단량체로 이루어진다. 일부 구현예에서, A, B, 제2 폴리펩타이드, 및 제3 폴리펩타이드 각각은 Fc 도메인 단량체로 이루어진다.

[0062] 본 개시의 본 양태의 일부 구현예에서, 제1, 제2 및 제3 폴리펩타이드 중 하나 이상에서 N-말단 Asp는 Gln으로 돌연변이된다. 일부 구현예에서, 제1, 제2 및 제3 폴리펩타이드 각각에서 N-말단 Asp는 Gln으로 돌연변이된다.

[0063] 본 개시의 본 양태의 일부 구현예에서, 제1, 제2, 및 제3 폴리펩타이드 중 하나 이상은 C-말단 라이신이 결여된다. 일부 구현예에서, 제1, 제2, 및 제3 폴리펩타이드 각각은 C-말단 라이신이 결여된다.

[0064] 본 개시의 본 양태의 일부 구현예에서, 제2 폴리펩타이드 및 제3 폴리펩타이드는 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0065] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L1-B-L2-C를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L1은 글라이신 스페이서이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함하고, iv) L2는 글라이신 스페이서이며, v) C는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함함); b) 식 A'-L1'-B'-L2'-C'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는

제4 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L1'는 글라이신 스페이서이며, iii) B'는 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하고, iv) L2'는 글라이신 스페이서이며, v) C'는 제6 Fc 도메인 단량체를 포함함); c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩타이드; d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩타이드; e) 제9 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제5 폴리펩타이드; 및 f) 제10 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제6 폴리펩타이드를 포함하되, A와 제7 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, B와 B'는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, C와 제8 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, A'와 제9 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제4 Fc 도메인을 형성하며, C'와 제10 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제5 Fc 도메인을 형성하는 Fc 작제물을 특징으로 한다.

[0066] 본 개시의 본 양태의 일부 구현예에서, 제1 및 제7 Fc 도메인 단량체 각각은 제1 Fc 도메인 단량체와 제7 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체 각각은 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제3 및 제8 Fc 도메인 단량체 각각은 제3 Fc 도메인 단량체와 제8 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제4 및 제9 Fc 도메인 단량체 각각은 제4 Fc 도메인 단량체와 제9 Fc 도메인 단량체 사이의 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제6 및 제10 Fc 도메인 단량체 각각은 제6 Fc 도메인 단량체와 제10 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다.

[0067] 일부 구현예에서, 제2 Fc 도메인 단량체의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 음하전 아미노산 치환을 포함하고, 제5 Fc 도메인 단량체의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 양하전 아미노산 치환을 포함하며, 제1, 제3, 제4 및 제6 Fc 도메인 단량체 각각의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 유전자 조작 돌출부를 포함하고, 제7, 제8, 제9 및 제10 Fc 도메인 단량체 각각의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 유전자 조작 함몰부를 포함한다.

[0068] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L1-B-L2-C를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L1은 글라이신 스페이서이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함하고, iv) L2는 글라이신 스페이서이며, v) C는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함함); b) 식 A'-L1'-B'-L2'-C'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L1'는 글라이신 스페이서이며, iii) B'는 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하고, iv) L2'는 글라이신 스페이서이며, v) C'는 제6 Fc 도메인 단량체를 포함함); c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩타이드; d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩타이드; e) 제9 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제5 폴리펩타이드; 및 f) 제10 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제6 폴리펩타이드를 포함하되, C와 C'는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, B와 제7 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, A와 제8 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, B'와 제9 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제4 Fc 도메인을 형성하며, A'와 제10 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제5 Fc 도메인을 형성하는 Fc 작제물을 특징으로 한다.

[0069] 본 개시의 본 양태의 일부 구현예에서, 제3 및 제7 Fc 도메인 단량체 각각은 제3 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제2 및 제7 Fc 도메인 단량체 각각은 제2 Fc 도메인 단량체와 제7 Fc 도메인 단량체 사이의 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제1 및 제8 Fc 도메인 단량체 각각은 제1 Fc 도메인 단량체와 제8 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제5 및 제9 Fc 도메인 단량체 각각은 제5 Fc 도메인 단량체와 제9 Fc 도메인 단량체 사이의 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제4 및 제10 Fc 도메인 단량체 각각은 제4 Fc 도메인 단량체와 제10 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다.

[0070] 일부 구현예에서, 제3 Fc 도메인 단량체의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 음하전 아미노산 치환을 포함하고, 제6 Fc 도메인 단량체의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 양하전 아미노산 치환을 포함하며, 제1, 제2, 제4 및 제5 Fc 도메인 단량체 각각의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 유전자 조작 돌출부를 포함하고, 제7, 제8, 제9 및 제10 Fc 도메인 단량체 각각의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 유전자 조작 함몰부를 포함한다.

[0071] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L1-B-L2-C를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L1은 글라이신 스페이서이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함하고, iv) L2는 글라이신 스페이서이며, v) C는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함함); b) 식 A'-L1'-B'-L2'-C'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L1'는 글라이신 스페이서이며, iii) B'는 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하고, iv) L2'는 글라이신 스페이서이며, v) C'는 제6 Fc 도메인 단량체를 포함함); c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩타이드; d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩타이드; e) 제9 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제5 폴리펩타이드; 및 f) 제10 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제6 폴리펩타이드를 포함하되, A와

A'는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, B와 제7 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, C와 제8 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, B'와 제9 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제4 Fc 도메인을 형성하며, C'와 제10 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제5 Fc 도메인을 형성하는 Fc 작제물을 특징으로 한다.

[0072] 본 개시의 본 양태의 일부 구현예에서, 제1 및 제4 Fc 도메인 단량체 각각은 제1 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제2 및 제7 Fc 도메인 단량체 각각은 제2 Fc 도메인 단량체와 제7 Fc 도메인 단량체 사이의 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제3 및 제8 Fc 도메인 단량체 각각은 제3 Fc 도메인 단량체와 제8 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제5 및 제9 Fc 도메인 단량체 각각은 제5 Fc 도메인 단량체와 제9 Fc 도메인 단량체 사이의 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제6 및 제10 Fc 도메인 단량체 각각은 제6 Fc 도메인 단량체와 제10 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다.

[0073] 일부 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 음하전 아미노산 치환을 포함하고, 제4 Fc 도메인 단량체의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 양하전 아미노산 치환을 포함하며, 제2, 제3, 제5 및 제6 Fc 도메인 단량체 각각의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 유전자 조작 돌출부를 포함하고, 제7, 제8, 제9 및 제10 Fc 도메인 단량체 각각의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 유전자 조작 함몰부를 포함한다.

[0074] 본원에 기술된 5개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물의 일부 구현예에서, L1, L2, L1', 및 L2' 각각은 적어도 4, 8, 또는 12개의 글라이신을 포함한다. 일부 구현예에서, L1, L2, L1', 및 L2' 각각은 4~30개, 8~30개, 또는 12~30개의 글라이신을 포함한다. 일부 구현예에서, L1, L2, L1', 및 L2' 각각은 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG(서열번호 27)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0075] 본원에 기술된 5개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물의 일부 구현예에서, A, B, C, A', B', C', 제3 폴리펩타이드, 제4 폴리펩타이드, 제5 폴리펩타이드, 및 제6 폴리펩타이드 각각은 Fc 도메인 단량체로 이루어진다.

[0076] 본원에 기술된 5개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물의 일부 구현예에서, 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 및 제6 폴리펩타이드에서 N-말단 Asp는 Gln으로 돌연변이된다. 일부 구현예에서, 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 및 제6 폴리펩타이드 각각에서 N-말단 Asp는 Gln으로 돌연변이된다.

[0077] 일부 구현예에서, 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 및 제6 폴리펩타이드 중 하나 이상은 C-말단 라이신이 결여된다. 일부 구현예에서, 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 및 제6 폴리펩타이드 각각은 C-말단 라이신이 결여된다.

[0078] 일부 구현예에서, 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드는 동일한 아미노산 서열을 갖고, 제3, 제4, 제5, 및 제6 폴리펩타이드는 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0079] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L1-B-L2-C를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L1은 링커이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함하고, iv) L2는 글라이신 스페이서이며, v) C는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함함); 및 b) 식 A'-L1'-B'-L2'-C'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L1'는 링커이며, iii) B'는 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하고, iv) L2'는 글라이신 스페이서이며, v) C'는 제6 Fc 도메인 단량체를 포함함)를 포함하되, 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제4 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 작제물을 특징으로 한다.

[0080] 본 개시의 본 양태의 일부 구현예에서, 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체 각각은 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제4 및 제5 Fc 도메인 단량체 각각은 제4 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 제3 및 제6 Fc 도메인 단량체 각각은 제3 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다.

[0081] 일부 구현예에서, 제1 및 제4 Fc 도메인 단량체 각각의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 유전자 조작 돌출부를 포함하고, 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체 각각의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 유전자 조작 함몰부를 포함하며, 제3 Fc 도메인 단량체의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 음하전 아미노산 치환을 포함하고, 제6 Fc 도메인 단량체의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 양하전 아미노산 치환을 포함한다.

[0082] 본 개시의 본 양태의 일부 구현예에서, L2와 L2' 각각은 적어도 12개의 글라이신을 포함한다. 일부 구현예에서,

L2와 L2' 각각은 4~30개, 8~30개, 또는 12~30개의 글라이신을 포함한다. 일부 구현예에서, L2와 L2' 각각은 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG(서열번호 27)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0083] 본 개시의 본 양태의 일부 구현예에서, A, B, C, A', B', 및 C' 각각은 Fc 도메인 단량체로 이루어진다.

[0084] 본 개시의 본 양태의 일부 구현예에서, 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드는 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0085] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L-B를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고; ii) L은 링커이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함함; b) 식 A'-L'-B'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L'는 링커이며, iii) B'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함함)를 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, L과 L' 중 적어도 하나는 글라이신 스페이서인 Fc 작제물을 특징으로 한다.

[0086] 본 양태의 일부 구현예에서, 제1 및 제3 Fc 도메인 단량체 각각은 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체 각각은 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다.

[0087] 본 양태의 일부 구현예에서, 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체 각각의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 유전자 조작 돌출부를 포함하고, 제3 및 제4 Fc 도메인 단량체 각각의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 유전자 조작 합물부를 포함한다.

[0088] 본 양태의 일부 구현예에서, L과 L' 중 적어도 하나는 적어도 4, 8, 또는 12개의 글라이신을 포함한다. 일부 구현예에서, L과 L' 중 적어도 하나는 4~30개, 8~30개, 또는 12~30개의 글라이신을 포함한다. 일부 구현예에서, L2와 L2' 중 적어도 하나는 GGGGGGGGGGGGGGGGGGG(서열번호 27)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다. 본 양태의 일부 구현예에서, L과 L' 각각은 적어도 4, 8, 또는 12개의 글라이신을 포함한다. 일부 구현예에서, L과 L' 각각은 4~30개, 8~30개, 또는 12~30개의 글라이신을 포함한다. 일부 구현예에서, L과 L' 각각은 GGGGGGGGGGGGGGGGGGG(서열번호 27)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0089] 본 양태의 일부 구현예에서, A, B, A', 및 B' 중 하나 이상은 Fc 도메인 단량체로 이루어진다. 본 양태의 일부 구현예에서, A, B, A', 및 B' 각각은 Fc 도메인 단량체로 이루어진다.

[0090] 본 개시의 전술한 2개의 양태의 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 중 하나 이상에서 N-말단 Asp는 Gln으로 돌연변이된다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각에서 N-말단 Asp는 Gln으로 돌연변이된다.

[0091] 본 개시의 전술한 2개의 양태의 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 중 하나 이상은 C-말단 라이신이 결여된다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은 C-말단 라이신이 결여된다.

[0092] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물의 Fc 도메인 단량체 중 각각은 IgG 헌지 도메인, IgG C_h2 항체 불변도메인, 및 IgG C_h3 항체 불변 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물의 Fc 도메인 단량체 중 각각은 IgG1 Fc 도메인 단량체이다.

[0093] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L-B를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L은 글라이신 스페이서이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함함; b) 식 A'-L'-B'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L'는 글라이신 스페이서이며, iii) B'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함함; c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩타이드; 및 d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩타이드를 포함하되, B와 B'는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, A와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, A'와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하는 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물을 특징으로 한다.

[0094] 본 양태의 일부 구현예에서, B와 B' 각각은 돌연변이 D399K 및 K409D를 포함하고, A와 A' 각각은 돌연변이 S354C, T366W, 및 E357K를 포함하며, 제5 및 제6 Fc 도메인 단량체 각각은 돌연변이 Y349C, T366S, L368A, Y407V, 및 K370D를 포함한다.

[0095] 본 양태의 일부 구현예에서, 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드는 동일한 아미노산 서열을 갖되, 제3 폴리펩타이드 및 제4 폴리펩타이드는 조성물의 Fc 작제물의 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0096] 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드는

[0097] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 49)의 서열에 적어도 95%의 서열 동일성(예컨대, 적어도 97%, 99%, 또는 99.5%의 서열 동일성)을 갖는다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은

[0098] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 49)의 서열에 적어도 95%의 서열 동일성(예컨대, 적어도 97%, 99%, 또는 99.5%의 서열 동일성)을 갖는다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은 최대 10개(9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개)의 단일 아미노산 변형(예컨대, 치환, 예컨대, 보존성 치환)을 갖는다.

[0099] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 49)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은 최대 10개(9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개)의 단일 아미노산 변형(예컨대, 치환, 예컨대, 보존성 치환)을 갖는다.

[0100] 일부 구현예에서, 제3 및 제4 폴리펩타이드 각각은

[0101] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 48)의 서열에 적어도 95%의 서열 동일성(예컨대, 적어도 97%, 99%, 또는 99.5%의 서열 동일성)을 갖는다. 일부 구현예에서, 제3 및 제4 폴리펩타이드 각각은

[0102] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 48)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다. 본 개시의 일부 구현예에서, 제3 및 제4 폴리펩타이드 각각은 최대 10개(9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개)의 단일 아미노산 변형(예컨대, 치환, 예컨대, 보존성 치환)을 갖는다.

[0103] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 48)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0104] 본 양태의 일부 구현예에서, 조성물의 Fc 작제물의 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은

[0105] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 49)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어지고:, 제3 및 제4 폴리펩타이드 각각은

[0106] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS

CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 48)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다. 일부 구현예에서, Fc 작제물은 최대 10개(9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개)의 단일 아미노산 변형(예컨대, 치환, 예컨대, 보존성 치환)을 갖는

[0107] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYV DGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEW ESNQGPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 49)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어지고, 조성물의 Fc 작제물의 제3 및 제4 폴리펩타이드 각각은 최대 10개(9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개)의 단일 아미노산 변형(예컨대, 치환, 예컨대, 보존성 치환)을 갖는

[0108] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 48)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다. 일부 경우에서, 본원에 기술된 Fc 작제물 중 어느 하나는 항-염증 활성을 갖는다.

[0109] 본원에 기술된 Fc 작제물 중 어느 하나의 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체 중 하나 이상은 IgG Fc 도메인 단량체(예컨대, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, 또는 IgG4)이다. 일부 경우에서, Fc 도메인 단량체 중 하나 이상은 최대 10개(예컨대, 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개)의 아미노산 변형을 갖는 IgG Fc 도메인 단량체이다. 일부 경우에서, 각각의 Fc 도메인 단량체는 10개 이하의 아미노산 변형(예컨대, 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 아미노산 변형)을 갖는다.

[0110] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L-B를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L은 글라이신 스페이서이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함함); b) 식 A'-L'-B'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L'는 글라이신 스페이서이며, iii) B'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함함); c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩타이드; 및 d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩타이드를 포함하되, A와 A'는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, B와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, B'와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하는 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물을 특징으로 한다.

[0111] 본 양태의 일부 구현예에서, A와 A' 각각은 돌연변이 D399K 및 K409D를 포함하고, B와 B' 각각은 돌연변이 S354C, T366W, 및 E357K를 포함하며, 제5 및 제6 Fc 도메인 단량체 각각은 돌연변이 Y349C, T366S, L368A, Y407V, 및 K370D를 포함한다.

[0112] 본 양태의 일부 구현예에서, 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드는 동일한 아미노산 서열을 갖되, 제3 폴리펩타이드 및 제4 폴리펩타이드는 조성물의 Fc 작제물의 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드는 동일한 아미노산 서열(예컨대, 서열번호. 49)을 갖되, 제3 폴리펩타이드 및 제4 폴리펩타이드는 조성물의 Fc 작제물의 동일한 아미노산 서열(예컨대, 서열번호 48)을 갖는다.

[0113] 본 양태의 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은

[0114] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYV DGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFPYPSDIAVEW ESNQGPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 61)의 서열에 적어도 95%의 서열 동일성(예컨대, 적어도 97%, 99%, 또는 99.5%의 서열 동일성)을 갖는다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은

[0115] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYV DGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFPYPSDIAVEW ESNQGPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 61)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0116] 본 양태의 일부 구현예에서, 제3 및 제4 폴리펩타이드 각각은

[0117] DKTHCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMSRTPEVTCVVDSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 48)의 서열에 적어도 95%의 서열 동일성(예컨대, 적어도 97%, 99%, 또는 99.5%의 서열 동일성)을 갖는다. 일부 구현예에서, 제3 및 제4 폴리펩타이드는

[0118] DKTHCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMSRTPEVTCVVDSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 48)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0119] 본 양태의 일부 구현예에서, 조성물의 Fc 작제물의 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은

[0120] DKTHCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMSRTPEVTCVVDSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 48)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0121] DKTHCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMSRTPEVTCVVDSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 61)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어지고, 조성물의 Fc 작제물의 제3 및 제4 폴리펩타이드 각각은

[0122] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L-B를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L은 링커이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함함); b) 식 A'-L'-B'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L'는 링커이며, iii) B'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함함); c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩타이드; 및 d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩타이드를 포함하되, B와 B'는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, A와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, A'와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드 각각은 서열번호 49의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어지고, 제3 폴리펩타이드 및 제4 폴리펩타이드 각각은 서열번호 48의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어지는 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물을 특징으로 한다.

[0123] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L-B를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L은 링커이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함함); b) 식 A'-L'-B'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L'는 링커이며, iii) B'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함함); c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩타이드; 및 d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩타이드를 포함하되, A와 A'는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, B와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, B'와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드 각각은 서열번호 61의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어지고, 제3 폴리펩타이드 및 제4 폴리펩타이드 각각은 서열번호 48의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어지는 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물을 특징으로 한다.

[0124] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L-B를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L은 글라이신 스페이서이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함함); b) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩타이드, 및 c) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩타이드를 포함하되, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하는 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물을 특징으로 한다.

[0125] 본 양태의 일부 구현예에서, 조성물의 Fc 작제물의 제1 및 제3 Fc 도메인 단량체 각각은 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 조성물의 Fc 작제물의 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체 각각은 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체사이의 이량체화를

촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다.

[0126] 본 양태의 일부 구현예에서, 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체 각각의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 유전자 조작 돌출부를 포함하고, 제3 및 제4 Fc 도메인 단량체 각각의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 유전자 조작 함몰부를 포함한다.

[0127] 본 양태의 일부 구현예에서, 제2 폴리펩타이드 및 제3 폴리펩타이드는 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0128] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L1-B-L2-C를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L1은 글라이신 스페이서이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함하고, iv) L2는 글라이신 스페이서이며, v) C는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함함); b) 식 A'-L1'-B'-L2'-C'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L1'는 글라이신 스페이서이며, iii) B'는 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하고, iv) L2'는 글라이신 스페이서이며, v) C'는 제6 Fc 도메인 단량체를 포함함); c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩타이드; d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩타이드; e) 제9 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제5 폴리펩타이드; 및 f) 제10 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제6 폴리펩타이드를 포함하되, A와 제7 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, B와 B'는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, C와 제8 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, A'와 제9 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제4 Fc 도메인을 형성하며, C'와 제10 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제5 Fc 도메인을 형성하는 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물을 특징으로 한다.

[0129] 본 양태의 일부 구현예에서, 조성물의 Fc 작제물에서 제1 및 제7 Fc 도메인 단량체 각각은 제1 Fc 도메인 단량체와 제7 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 조성물의 Fc 작제물에서 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체 각각은 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 조성물의 Fc 작제물에서 제3 및 제8 Fc 도메인 단량체 각각은 제3 Fc 도메인 단량체와 제8 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 조성물의 Fc 작제물에서 제4 및 제9 Fc 도메인 단량체 각각은 제4 Fc 도메인 단량체와 제9 Fc 도메인 단량체 사이의 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 조성물의 Fc 작제물에서 제6 및 제10 Fc 도메인 단량체 각각은 제6 Fc 도메인 단량체와 제10 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다.

[0130] 본 양태의 일부 구현예에서, 제2 Fc 도메인 단량체의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 음하전 아미노산 치환을 포함하고, 제5 Fc 도메인 단량체의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 양하전 아미노산 치환을 포함하며, 제1, 제3, 제4 및 제6 Fc 도메인 단량체 각각의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 유전자 조작 돌출부를 포함하고, 제7, 제8, 제9 및 제10 Fc 도메인 단량체 각각의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 유전자 조작 함몰부를 포함한다.

[0131] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L1-B-L2-C를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L1은 글라이신 스페이서이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함하고, iv) L2는 글라이신 스페이서이며, v) C는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함함); b) 식 A'-L1'-B'-L2'-C'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L1'는 글라이신 스페이서이며, iii) B'는 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하고, iv) L2'는 글라이신 스페이서이며, v) C'는 제6 Fc 도메인 단량체를 포함함); c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩타이드; d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩타이드; e) 제9 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제5 폴리펩타이드; 및 f) 제10 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제6 폴리펩타이드를 포함하되, C와 C'는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, B와 제7 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, A와 제8 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, B'와 제9 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제4 Fc 도메인을 형성하며, A'와 제10 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제5 Fc 도메인을 형성하는 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물을 특징으로 한다.

[0132] 본 양태의 일부 구현예에서, 조성물의 Fc 작제물에서 제3 및 제6 Fc 도메인 단량체 각각은 제3 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 조성물의 Fc 작제물에서 제2 및 제7 Fc 도메인 단량체 각각은 제2 Fc 도메인 단량체와 제7 Fc 도메인 단량체 사이의 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 조성물의 Fc 작제물에서 제1 및 제8 Fc 도메인 단량체 각각은 제1 Fc 도메인 단량체와 제8 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 조성물의 Fc 작제물에서 제5 및 제9 Fc 도메인 단량체 각각은 제5 Fc 도메인 단량체와 제9 Fc 도메인 단량체 사이의 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 조성물의 Fc 작제물에서 제4 및 제10 Fc 도메인 단량체 각각은 제4 Fc 도메인 단량체와 제10 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한

다.

[0133] 본 양태의 일부 구현예에서, 제3 Fc 도메인 단량체의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 음하전 아미노산 치환을 포함하고, 제6 Fc 도메인 단량체의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 양하전 아미노산 치환을 포함하며, 제1, 제2, 제4 및 제5 Fc 도메인 단량체 각각의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 유전자 조작 돌출부를 포함하고, 제7, 제8, 제9 및 제10 Fc 도메인 단량체 각각의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 유전자 조작 함몰부를 포함한다.

[0134] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L1-B-L2-C를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L1은 글라이신 스페이서이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함하고, iv) L2는 글라이신 스페이서이며, v) C는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함함); b) 식 A'-L1'-B'-L2'-C'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L1'은 글라이신 스페이서이며, iii) B'는 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하고, iv) L2'는 글라이신 스페이서이며, v) C'는 제6 Fc 도메인 단량체를 포함함); c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩타이드; d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩타이드; e) 제9 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제5 폴리펩타이드; 및 f) 제10 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제6 폴리펩타이드를 포함하되, A와 A'는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, B와 제7 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, C와 제8 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, B'와 제9 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제4 Fc 도메인을 형성하며, C'와 제10 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제5 Fc 도메인을 형성하는 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물을 특징으로 한다.

[0135] 본 양태의 일부 구현예에서, 조성물의 Fc 작제물에서 제1 및 제4 Fc 도메인 단량체 각각은 제1 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 조성물의 Fc 작제물에서 제2 및 제7 Fc 도메인 단량체 각각은 제2 Fc 도메인 단량체와 제7 Fc 도메인 단량체 사이의 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 조성물의 Fc 작제물에서 제3 및 제8 Fc 도메인 단량체 각각은 제3 Fc 도메인 단량체와 제8 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 조성물의 Fc 작제물에서 제5 및 제9 Fc 도메인 단량체 각각은 제5 Fc 도메인 단량체와 제9 Fc 도메인 단량체 사이의 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 조성물의 Fc 작제물에서 제6 및 제10 Fc 도메인 단량체 각각은 제6 Fc 도메인 단량체와 제10 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다.

[0136] 본 양태의 일부 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 음하전 아미노산 치환을 포함하고, 제4 Fc 도메인 단량체의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 양하전 아미노산 치환을 포함하며, 제2, 제3, 제5 및 제6 Fc 도메인 단량체 각각의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 유전자 조작 돌출부를 포함하고, 제7, 제8, 제9 및 제10 Fc 도메인 단량체 각각의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 유전자 조작 함몰부를 포함한다.

[0137] 본원에 기술된 5개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물의 일부 구현예에서, 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드는 동일한 아미노산 서열을 갖고, 제3, 제4, 제5, 및 제6 폴리펩타이드는 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0138] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L1-B-L2-C를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L1은 링커이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함하고, iv) L2는 글라이신 스페이서이며, v) C는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함함); 및 b) 식 A'-L1'-B'-L2'-C'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L1'은 링커이며, iii) B'는 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하고, iv) L2'는 글라이신 스페이서이며, v) C'는 제6 Fc 도메인 단량체를 포함함)를 포함하되, 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제4 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 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물을 특징으로 한다.

[0139] 본 양태의 일부 구현예에서, 조성물의 Fc 작제물의 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체 각각은 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 조성물의 Fc 작제물의 제4 및 제5 Fc 도메인 단량체 각각은 제4 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하며, 조성물의 Fc 작제물의 제3 및 제6 Fc 도메인 단량체 각각은 제3 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체 사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다.

[0140] 본 양태의 일부 구현예에서, 제1 및 제4 Fc 도메인 단량체 각각의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 유전자 조작

돌출부를 포함하고, 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체 각각의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 유전자 조작 합물부를 포함하며, 제3 Fc 도메인 단량체의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 음하전 아미노산 치환을 포함하고, 제6 Fc 도메인 단량체의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 양하전 아미노산 치환을 포함한다.

[0141] 본 양태의 일부 구현예에서, 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드는 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0142] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L-B를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고; ii) L은 링커이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함함); b) 식 A'-L'-B'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L'는 링커이며, iii) B'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함함)를 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, L과 L' 중 적어도 하나는 글라이신 스페이서인 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물을 특징으로 한다.

[0143] 본 양태의 일부 구현예에서, 조성물의 Fc 작제물의 제1 및 제3 Fc 도메인 단량체 각각은 제1 Fc 도메인 단량체와 제3 Fc 도메인 단량체사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 조성물의 Fc 작제물의 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체 각각은 제2 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체사이의 이량체화를 촉진하는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 포함한다.

[0144] 본 양태의 일부 구현예에서, 조성물의 Fc 작제물의 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체 각각의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 유전자 조작 돌출부를 포함하고, 조성물의 Fc 작제물의 제3 및 제4 Fc 도메인 단량체 각각의 상보적 이량체화 선택성 모듈은 유전자 조작 합물부를 포함한다.

[0145] 본 양태의 일부 구현예에서, 조성물의 Fc 작제물의 L과 L' 중 적어도 하나는 적어도 4, 8, 또는 12개의 글라이신을 포함한다. 일부 구현예에서, L과 L' 중 적어도 하나는 4~30개, 8~30개, 또는 12~30개의 글라이신을 포함한다. 일부 구현예에서, L과 L' 중 적어도 하나는 GGGGGGGGGGGGGGGGGGG(서열번호 27)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다. 본 양태의 일부 구현예에서, 조성물의 Fc 작제물의 L과 L' 각각은 적어도 4, 8, 또는 12개의 글라이신을 포함한다. 일부 구현예에서, L과 L' 각각은 4~30개, 8~30개, 또는 12~30개의 글라이신을 포함한다. 일부 구현예에서, L과 L' 각각은 GGGGGGGGGGGGGGGGGGG(서열번호 27)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0146] 본 양태의 일부 구현예에서, 조성물의 Fc 작제물의 A, B, A' 및 B' 중 하나 이상은 Fc 도메인 단량체로 이루어진다. 본 양태의 일부 구현예에서, A, B, A' 및 B' 각각은 Fc 도메인 단량체로 이루어진다.

[0147] 본원에 기술된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물의 일부 구현예에서, 조성물의 Fc 작제물의 L, L', L1, L2, L1' 및 L2' 중 하나 이상은 적어도 4, 8, 또는 12개의 글라이신을 포함한다. 일부 구현예에서, L, L', L1, L2, L1' 및 L2' 각각은 4, 8, 또는 12개의 글라이신을 포함한다.

[0148] 본원에 기술된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물의 일부 구현예에서, 조성물의 Fc 작제물의 L, L', L1, L2, L1' 및 L2' 중 하나 이상은 적어도 4~30개, 8~30개, 또는 12~30개의 글라이신을 포함한다. 일부 구현예에서, L, L', L1, L2, L1' 및 L2' 각각은 4~30개, 8~30개, 또는 12~30개의 글라이신을 포함한다.

[0149] 본원에 기술된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물의 일부 구현예에서, 조성물의 Fc 작제물의 L, L', L1, L2, L1' 및 L2' 중 하나 이상은 GGGGGGGGGGGGGGGGG(서열번호 27)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다. 일부 구현예에서, L, L', L1, L2, L1' 및 L2' 각각은 GGGGGGGGGGGGGGGGG(서열번호 27)의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0150] 본원에 기술된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물의 일부 구현예에서, 조성물의 Fc 작제물의 A, B, C, A', B', C', 제2 폴리펩타이드, 제3 폴리펩타이드, 제4 폴리펩타이드, 제5 폴리펩타이드 및 제6 폴리펩타이드 중 하나 이상은 Fc 도메인 단량체로 이루어진다. 본원에 기술된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물의 일부 구현예에서, A, B, C, A', B', C', 제2 폴리펩타이드, 제3 폴리펩타이드, 제4 폴리펩타이드, 제5 폴리펩타이드 및 제6 폴리펩타이드 각각은 Fc 도메인 단량체로 이루어진다.

[0151] 본원에 기술된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물의 일부 구현예에서, 조성물의 Fc 작제물의 Fc 도메인 단량체 중 하나 이상은 IgG 헌지 도메인, IgG C_h2 항체 불변 도메인 및 IgG C_h3 항체 불변 도메인을 포함한다. 본원에 기술된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물의 일부 구현예에서, Fc 도

메인 단량체 각각은 IgG 헌지 도메인, IgG C_{H2} 항체 불변 도메인 및 IgG C_{H3} 항체 불변 도메인을 포함한다.

[0152] 본원에 기술된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물의 일부 구현예에서, 조성물의 Fc 작제물의 Fc 도메인 단량체 중 하나 이상은 IgG1 Fc 도메인 단량체이다. 본원에 기술된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물의 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체 각각은 IgG1 Fc 도메인 단량체이다.

[0153] 본원에 기술된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물의 일부 구현예에서, 조성물의 Fc 작제물의 폴리펩타이드 중 하나 이상의 N-말단 Asp는 Gln으로 돌연변이된다. 본원에 기술된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물의 일부 구현예에서, 조성물의 Fc 작제물의 폴리펩타이드 각각의 N-말단 Asp는 Gln으로 돌연변이된다.

[0154] 본원에 기술된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물의 일부 구현예에서, 조성물의 Fc 작제물의 폴리펩타이드 중 하나 이상은 C-말단 라이신이 결여된다. 본원에 기술된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물의 일부 구현예에서, 조성물의 Fc 작제물의 폴리펩타이드 각각은 C-말단 라이신이 결여된다.

[0155] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L-B를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L은 링커이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함함; b) 식 A'-L'-B'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L'는 링커이며, iii) B'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함함; c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩타이드; 및 d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩타이드를 포함하되, B와 B'는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, A와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, A'와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리펩타이드 각각은 C-말단 라이신이 결여된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성을 특징으로 한다.

[0156] 또 다른 양태에서, 본 개시는 C-말단 라이신의 코돈이 결여된 2개의 폴리뉴클레오타이드 모두를 발현하는 숙주 세포를 특징으로 하되, 제1 폴리뉴클레오타이드는 본 개시의 이전 양태의 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각을 인코딩하고, 제2 폴리뉴클레오타이드는 본 개시의 이전 양태의 제3 및 제4 폴리펩타이드 각각을 인코딩한다.

[0157] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L-B를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L은 링커이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함함; b) 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩타이드, 및 c) 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩타이드를 포함하되, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하고, 제1, 제2 및 제3 폴리펩타이드 각각은 C-말단 라이신이 결여된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성을 특징으로 한다.

[0158] 또 다른 양태에서, 본 개시는 C-말단 라이신의 코돈이 결여된 2개의 폴리뉴클레오타이드 모두를 발현하는 숙주 세포를 특징으로 하되, 제1 폴리뉴클레오타이드는 본 개시의 이전 양태의 제1 폴리펩타이드를 인코딩하고, 제2 폴리뉴클레오타이드는 본 개시의 이전 양태의 제2 및 제3 폴리펩타이드 각각을 인코딩한다.

[0159] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L1-B-L2-C를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L1은 링커이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함하고, iv) L2는 링커이며, v) C는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함함; b) 식 A'-L1'-B'-L2'-C'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L1'는 링커이며, iii) B'는 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하고, iv) L2'는 링커이며, v) C'는 제6 Fc 도메인 단량체를 포함함; c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩타이드; d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩타이드; e) 제9 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제5 폴리펩타이드; 및 f) 제10 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제6 폴리펩타이드를 포함하되, A와 제7 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, B와 B'는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, C와 제8 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, A'와 제9 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제4 Fc 도메인을 형성하며, C'와 제10 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제5 Fc 도메인을 형성하고, 제1, 제2, 제3, 제4, 제5 및 제6 폴리펩타이드 각각은 C-말단 라이신이 결여된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성을 특징으로 한다.

[0160] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L1-B-L2-C를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L1은 링커이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함하고, iv) L2는 링커이며, v) C는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함함; b) 식 A'-L1'-B'-L2'-C'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L1'는 링커이며, iii) B'는 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하고, iv) L2'는 링커이며, v) C'는 제6

Fc 도메인 단량체를 포함함); c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩타이드; d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩타이드; e) 제9 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제5 폴리펩타이드; 및 f) 제10 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제6 폴리펩타이드를 포함하되, C와 C'는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, B와 제7 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, A와 제8 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, B'와 제9 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제4 Fc 도메인을 형성하며, A'와 제10 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제5 Fc 도메인을 형성하고, 제1, 제2, 제3, 제4, 제5 및 제6 폴리펩타이드 각각은 C-말단 라이신이 결여된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물을 특징으로 한다.

[0161] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L1-B-L2-C를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L1은 링커이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함하고, iv) L2는 링커이며, v) C는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함함); b) 식 A'-L1'-B'-L2'-C'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L1'는 링커이며, iii) B'는 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하고, iv) L2'는 링커이며, v) C'는 제6 Fc 도메인 단량체를 포함함); c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩타이드; d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩타이드; e) 제9 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제5 폴리펩타이드; 및 f) 제10 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제6 폴리펩타이드를 포함하되, A와 A'는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, B와 제7 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, C와 제8 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, B'와 제9 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제4 Fc 도메인을 형성하며, C'와 제10 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제5 Fc 도메인을 형성하고, 제1, 제2, 제3, 제4, 제5 및 제6 폴리펩타이드 각각은 C-말단 라이신이 결여된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물을 특징으로 한다.

[0162] 또 다른 양태에서, 본 개시는 C-말단 라이신의 코돈이 결여된 2개의 폴리뉴클레오타이드 모두를 발현하는 숙주 세포를 특징으로 하되, 제1 폴리뉴클레오타이드는 본 개시의 이전의 3개의 양태의 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각을 인코딩하고, 제2 폴리뉴클레오타이드는 본 개시의 이전의 3개의 양태의 제3, 제4, 제5 및 제6 폴리펩타이드 각각을 인코딩한다.

[0163] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L1-B-L2-C를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L1은 링커이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함하고, iv) L2는 링커이며, v) C는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함함); 및 b) 식 A'-L1'-B'-L2'-C'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L1'는 링커이며, iii) B'는 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하고, iv) L2'는 링커이며, v) C'는 제6 Fc 도메인 단량체를 포함함)를 포함하되, 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제4 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, 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은 C-말단 라이신이 결여된 Fc 작제물의 실질적으로 균질인 집단을 포함하는 조성물을 특징으로 한다.

[0164] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L-B를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고; ii) L은 링커이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함함); b) 식 A'-L'-B'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L'는 링커이며, iii) B'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함함)를 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 폴리펩타이드 각각은 C-말단 라이신이 결여된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물을 특징으로 한다.

[0165] 또 다른 양태에서, 본 개시는 C-말단 라이신의 코돈이 결여된 폴리뉴클레오타이드를 발현하는 숙주 세포를 특징으로 하되, 폴리뉴클레오타이드는 본 개시의 이전의 2개의 양태의 제1 및 제2 폴리펩타이드를 인코딩한다.

[0166] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 기술된 Fc 작제물을 제조하는 방법을 특징으로 한다. 방법은 a) 본 개시의 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 숙주 세포를 제공하는 단계, b) Fc 작제물을 형성할 수 있는 조건 하에서 숙주 세포에서 폴리펩타이드를 발현하는 단계, 및 c) Fc 작제물을 회수하는 단계를 포함한다.

[0167] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 기술된 Fc 작제물을 발현하는 숙주 세포를 특징으로 한다. 숙주 세포는 본 개시의 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하되, 폴리뉴클레오타이드는 숙주 세포에서 발현된다.

[0168] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 기술된 Fc 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 약제학적 조성물 또는 본원에 기술된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하

는 조성물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물) 및 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 특징으로 한다. 이러한 약제학적 조성물은 Fc 작제물의 상당한 응집 또는 원치 않는 다량체화 없이 제조될 수 있다.

[0169] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 기술된 Fc 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)을 대상에 투여하는 것을 포함하는, 대상의 면역 반응의 면역 세포 활성을 감소시키는 방법 또는 본원에 기술된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물)을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 대상은 자가면역 질환을 갖는다.

[0170] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 기술된 Fc 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)을 대상에 투여하는 것을 포함하는, 대상의 염증 또는 염증성 질환을 치료하는 방법 또는 본원에 기술된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물)을 특징으로 한다.

[0171] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 기술된 Fc 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)을 대상에 투여하는 것을 포함하는, 대상의 자가항체의 제거를 촉진하고/하거나 항원 제시를 억제하는 방법 또는 본원에 기술된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물)을 특징으로 한다.

[0172] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)을 투여함으로써 치료될 수 있는 예시적인 질환은 류마티스 관절염(RA); 전신 홍반성 루푸스(SLE); ANCA-관련 혈관염; 항인지질 항체 증후군; 자가면역 용혈성 빈혈; 만성 염증성 탈수초성 신경병증; 이식조직에서 항-알로(anti-allo), GVHD에서 항-자기, 항-교환(anti-replacement), IgG 치료법, IgG 파라단백질의 제거; 피부근염; 굿파스처 증후군(Goodpasture's Syndrome); 항체-의존성 세포 매개 세포 독성을 통해 매개된 조직계-표적형 II 과민성, 예컨대, 길랭바레 증후군(Guillain Barre syndrome), CIDP, 피부근염, 펠티 증후군(Felty's syndrome), 항체 매개 거부 반응, 자가면역성 갑상선 질환, 케양성 대장염, 자가면역성 간 질환; 특발성 혈소판 감소성 자반증; 중증 근무력증, 시신경 척수염; 수포창 및 기타 자가면역성 수포 질환; 쇼그伦 증후군(Sjogren's Syndrome); 항체-의존성 식균 작용을 통해 매개된 자가면역성 혈구감소증 및 기타 질환; 기타 FcR-의존성 염증 증후군, 예컨대, 활액막염, 피부근염, 전신성 혈관염, 사구체염 또는 혈관염을 포함한다.

[0173] 또 다른 양태에서, 본 개시는 a) 식 A-L-B를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L은 클라이신 스페이서이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함함); b) 식 A'-L'-B'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L'은 클라이신 스페이서이며, iii) B'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함함); c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩타이드; 및 d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩타이드를 포함하되, 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은

[0174] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 49)의 서열에 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고, 제3 및 제4 폴리펩타이드 각각은

[0175] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 48)의 서열에 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고, B와 B'는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, A와 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, A'와 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하고, B 및 B' 각각은 돌연변이 D399K 및 K409D를 포함하고, A 및 A' 각각은 돌연변이 S354C, T366W, 및 E357K를 포함하며, 제5 및 제6 Fc 도메인 단량체 각각은 돌연변이 Y349C, T366S, L368A, Y407V, 및 K370D를 포함하고, L 및 L' 각각은 12~30개의 클라이신을 포함하며, 제1, 제2, 제3, 및 제4 폴리펩타이드 각각은 C-말단 라이신을 포함하는 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 세포 배양 배지를 특징으로 한다.

[0176] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 기술된 Fc 작제물(예컨대, 본 개시의 제1 양태의 Fc 작제물)의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 세포 배양 배지를 제조하는 방법을 특징으로 한다. 본 방법은 a) 세포 배양 배지에 숙

주 세포를 제공하는 단계(세포는 Fc 작제물(예컨대, 본 개시의 제1 양태의 Fc 작제물)의 제1, 제2, 제3, 및 제4 폴리펩타이드 각각을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함함); b) Fc 작제물의 형성 및 세포 배양 배지로의 분비를 허용하는 조건 하에서 숙주 세포의 폴리펩타이드를 발현하는 단계; 및 c) 세포 배양 배지를 회수하는 단계를 포함한다.

[0177] 추가로, 본 개시는 또한 본 개시의 다른 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 다른 세포 배양 배지 및 이러한 세포 배양 배지를 제조하는 방법을 특징으로 한다.

[0178] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물은 항원-인식 영역, 예컨대 가변 도메인 또는 상보성 결정 영역 (complementarity determining region, CDR)을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, Fc 작제물(또는 Fc 작제물 내의 Fc 도메인)은 상이한 폴리펩타이드에 존재하는 Fc 도메인 단량체의 결합에 의해 전체로 또는 부분으로 형성된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물은 항원 인식 영역, 예컨대, 가변 도메인 또는 CDR을 포함한다. 특정 구현예에서, Fc 작제물은 2개의 폴리펩타이드의 결합을 촉진하는 추가 도메인(예컨대, IgM 꼬리조각 (tailpiece) 또는 IgA 꼬리조각)을 포함하지 않는다. 다른 구현예에서, 공유결합은 Fc 도메인을 형성하도록 접합하는 2개의 Fc 도메인 단량체 사이에서만 Fc 작제물에 존재한다. 다른 구현예에서, Fc 작제물은 Fc 도메인 사이에 공유결합을 포함하지 않는다. 또 다른 구현예에서, Fc 작제물은 Fc 작제물 중의 Fc 도메인 중 전부 또는 실질적으로 전부가 세포 표면 상의 Fc 수용체와 동시에 상호작용할 수 있도록 충분한 구조적 가요성을 제공한다. 하나의 구현예에서, 도메인 단량체는 이량체화 선택성 모듈을 가진다는 점에서 야생형과 또는 서로간에 1차 서열이 상이하다.

[0179] 작제물의 Fc 도메인의 Fc 도메인 단량체는 동일한 1차 아미노산 서열을 가질 수 있다. 예를 들어, Fc 도메인의 Fc 도메인 단량체는 둘 다 동일한 이량체화 선택성 모듈을 가질 수 있다. 예컨대, Fc 도메인의 Fc 도메인 단량체 둘 다 C_H3 도메인 사이의 계면에서 하전된 잔기의 고리 내에 적어도 2개의 위치에서 동일한 역전하 돌연변이를 가질 수 있다.

[0180] 본원에 기재된 Fc 작제물 중 임의의 것에 있어서, 작제물의 Fc 도메인의 Fc 도메인 단량체는 2개의 Fc 도메인 단량체 사이(즉, Fc 도메인 단량체와 Fc 작제물의 다른 단량체 사이)에 상이한 서열, 예컨대 20개 이하의 아미노산(예컨대, 15개, 10개 이하의 아미노산), 예컨대, 20, 15, 10, 8, 7, 6, 5, 4, 3 또는 2개 이하의 아미노산 까지 상이한 서열을 가질 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 작제물의 Fc 도메인 단량체 서열은 Fc 작제물 중 임의의 것의 상보적인 이량체화 선택성 모듈이 도메인 단량체 중 하나의 C_H3 항체 불변 도메인에 유전자 조작 함몰부 및 Fc 도메인 단량체 중 다른 하나의 C_H3 항체 불변 도메인에 유전자 조작 돌출부를 포함할 수 있되, 유전자 조작 함몰부 및 유전자 조작 돌출부는 Fc 도메인 단량체의 돌출부-함몰부 쌍(protuberance-into-cavity pair)을 형성하도록 위치된다. 예시적인 유전자 조작 함몰부 및 돌출부는 표 1에 나타낸다. 다른 구현예에서, 상보적 이량체화 선택성 모듈은 도메인 단량체 중 하나의 C_H3 항체 불변 도메인에 조작된(치환된) 음하전 아미노산 및 Fc 도메인 단량체 중 다른 하나의 C_H3 항체 불변 도메인에 조작된(치환된) 양하전 아미노산을 포함하되, 음하전 아미노산 및 양하전 아미노산은 상보적 도메인 단량체 사이의 Fc 도메인의 형성을 촉진하도록 위치된다. 예시적인 상보적 아미노산 변화는 표 2A 내지 표 2C에 나타낸다.

[0181] 본 개시는 또한 본원에 기술된 임의의 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 약제학적 조성물을 특징으로 한다. 하나의 구현예에서, 약학적 용도로 적합한 멸균 주사기 또는 바이알은 유일한 또는 주요한 유효성분이 본원에 기술된 Fc 작제물 중 어느 하나의 실질적으로 동질인 집단인 약제학적 조성물을 함유한다. 약제학적 조성물은 예컨대, 염, 세척제, 계면활성제, 벌킹제(bulking agent), 중합체, 방부제, 및 기타 약제학적 부형제에서 선택되는 하나 이상의 유효 성분을 포함할 수 있다.

[0182] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 기술된 Fc 작제물 중 임의의 것을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0183] 일부 구현예에서, Fc 작제물은 상이한 폴리펩타이드에 존재하는 Fc 도메인 단량체의 결합으로 적어도 부분적으로 형성된다. 특정 구현예에서, Fc 작제물은 상이한 폴리펩타이드에 존재하는 Fc 도메인 단량체의 결합으로 형성된다. 이들 구현예에서, Fc 작제물은 2개의 폴리펩타이드의 결합을 촉진하는 추가 도메인(예컨대, IgM 꼬리조각 또는 IgA 꼬리조각)을 포함하지 않는다. 다른 구현예에서, 공유결합(예컨대, 이황화 결합)은 Fc 도메인을 형성하도록 접합하는 2개의 Fc 도메인 단량체 사이에서만 Fc 작제물에 존재한다. 다른 구현예에서, Fc 작제물은 Fc 도메인 사이에 공유결합(예컨대, 이황화 결합)을 포함하지 않는다. 또 다른 구현예에서, Fc 작제물은 Fc 작제물 중의 Fc 도메인 중 전부 또는 실질적으로 전부가 세포 표면 상의 Fc 수용체와 동시에 상호작용할 수 있도록 충분한 구조적 가요성을 제공한다. 이들 구현예의 임의의 특정 예에서, Fc 작제물은 링커(예컨대, 가요성 아

미노산 스페이서)를 통해 접합된 적어도 2개의 Fc 도메인을 포함한다.

[0184] 또 다른 양태에서, 본 개시는 Fc 도메인 단량체의 선택성 이량체화를 촉진하기 위한 조성물 및 방법을 특징으로 한다. 본 개시는 Fc 도메인의 2개의 Fc 도메인 단량체가 C_h3 항체 불변 도메인 사이의 계면에 하전된 잔기의 고리 내에 적어도 2개의 위치에 동일한 돌연변이를 포함하는 Fc 도메인을 포함한다. 본 개시는 또한 C_h3 항체 불변 도메인 사이의 계면에 하전된 잔기의 고리 내에 적어도 2개의 위치에 2개의 Fc 도메인 단량체에 동일한 돌연변이를 갖는 상보적 이량체화 선택성 모듈을 도입하는 단계를 포함하는 이러한 Fc 도메인을 제조하는 방법을 포함한다. C_h3 항체 불변 도메인 사이의 계면은 하전된 잔기의 고리로 둘러싸인 소수성 패치(patch)로 이루어진다. 하나의 C_h3 항체 불변 도메인이 또 다른 하나와 합쳐지는 경우, 이들 하전된 잔기는 반대 전하 잔기와 쌍을 이룬다. 잔기의 둘 이상의 상보적인 쌍의 두 구성원의 전하를 서로 바꿈으로써, 돌연변이된 Fc 도메인 단량체는 동일한 돌연변이 서열의 Fc 도메인 단량체에 상보적으로 남아있지만, 이들 돌연변이가 없는 Fc 도메인 단량체에 더 낮은 상보성을 갖는다. 본 구현예에서, 동일한 이량체화 선택성 모듈은 동종이량체화(homodimerization)를 촉진한다. 이러한 Fc 도메인은 이중 돌연변이 K409D/D399K, K392D/D399K, E357K/K370E, D356K/K439D, K409E/D399K, K392E/D399K, E357K/K370D, 또는 D356K/K439E를 함유하는 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 또 다른 구현예에서, Fc 도메인은 이중 돌연변이, 예컨대, K409D/D399K/E357K/K370E의 임의의 쌍을 결합하는 4중 돌연변이를 포함하는 Fc 도메인 단량체를 포함한다.

[0185] 또 다른 구현예에서, 동일한 이량체화 선택성 모듈에 추가로, Fc 도메인의 Fc 도메인 단량체는 특이적 결합(예컨대, 유전자 조작 함몰부 및 돌출부)을 촉진하는 비동일한 돌연변이를 가지는 상보적인 이량체화 선택성 모듈을 포함한다. 그 결과, 2개의 Fc 도메인 단량체는 2개의 이량체화 선택성 모듈을 포함하고, 서로 상보적으로 남아있지만, 다른 Fc 도메인 단량체에 대한 상보성이 감소된다. 본 구현예는 함몰부-함유 Fc 도메인 및 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이량체화(heterodimerization)를 촉진한다. 하나의 실시예에서, Fc 도메인 단량체 둘 다의 하전된 쌍 잔기에서의 비동일한 돌연변이를 갖는 상보성 이량체화 선택성 모듈은 하나의 Fc 도메인 단량체상의 돌출부 및 다른 Fc 도메인 단량체상의 함몰부와 결합된다.

[0186] 본원에 기재된 Fc 작제물 중 임의의 것에 있어서, Fc 도메인 단량체의 순서는 상호 교환할 수 있음이 이해된다. 예를 들어, 식 A-L-B를 갖는 폴리펩타이드에서, A의 카복시 말단은 L의 아미노 말단에 접합될 수 있되, 그의 카복시 말단에서 B의 아미노 말단으로 차례로 접합된다. 대안으로, B의 카복시 말단은 L의 아미노 말단에 접합될 수 있되, 그의 카복시 말단에서 C의 아미노 말단으로 차례로 접합된다. 이들 구성 모두는 식 A-L-B에 포함된다.

[0187] 정의:

[0188] 본원에서 사용된 "Fc 도메인 단량체"라는 용어는 적어도 한자 도메인 및 제2와 제3 항체 불변 도메인(C_h2 및 C_h3) 또는 그의 기능성 단편(예컨대, (i) Fc 도메인을 형성하기 위해 또 다른 Fc 도메인 단량체와 이량체화, 및 (ii) Fc 수용체에 결합할 수 있는 단편)을 포함하는 폴리펩타이드 사슬을 지칭한다. Fc 도메인 단량체는 IgG, IgE, IgM, IgA, 또는 IgD(예컨대, IgG1)를 포함하는 임의의 면역글로불린 항체 동종형(isotype)일 수 있다. 추가로, Fc 도메인 단량체는 IgG 아형(예컨대, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, 또는 IgG4)(예컨대, IgG1)일 수 있다. Fc 도메인 단량체는 항원 인식 부위, 예컨대, 가변 도메인 또는 상보성 결정 영역(CDR)으로 작용할 수 있는 면역글로불린의 어떤 부분도 포함하지 않는다. Fc 도메인 단량체는 Fc 도메인과 Fc 수용체 사이의 상호 작용을 변경하는 야생형 Fc 도메인 단량체 서열에서부터 10개의 변화(예컨대, 1~10개, 1~8개, 1~6개, 1~4개의 아미노산 치환, 첨가, 또는 결실)만큼 함유할 수 있다. 적합한 변화의 예는 당업계에 공지되어 있다.

[0189] 본원에서 사용된 "Fc 도메인"이란 용어는 Fc 수용체에 결합할 수 있는 2개의 Fc 도메인 단량체의 이량체를 지칭한다. 야생형 Fc 도메인에서, 2개의 Fc 도메인 단량체는 2개의 C_h3 항체 불변 도메인 사이의 상호작용뿐만 아니라 2개의 이량체화 Fc 도메인 단량체의 한자 도메인 사이에 형성되는 하나 이상의 이황화 결합에 의해 이량체화된다.

[0190] 본 개시에서, "Fc 작제물"이란 용어는 본원에 기술된 바와 같이 Fc 도메인을 형성하는 결합된 폴리펩타이드 사슬(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)을 지칭한다. 본원에 기재된 Fc 작제물은 동일한 서열 또는 상이한 서열을 갖는 Fc 도메인 단량체를 포함할 수 있다. 예를 들어, Fc 작제물은 3개의 Fc 도메인을 가질 수 있고, 그 중 2개는 IgG1 또는 IgG1-유래 Fc 도메인 단량체를 포함하고, 세 번째는 IgG2 또는 IgG2-유래 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 또 다른 예에서, Fc 작제물은 3개의 Fc 도메인을 가질 수 있고, 그 중 2개는 "돌출부-함몰부 쌍"을 포함하고, 세 번째는 "돌출부-함몰부 쌍"을 포함하지 않는다. 본 개시에서, Fc 도메인은 항체, 예컨대,

V_H , V_L , CDR, 또는 HVR의 가변 영역을 포함하지 않는다. Fc 도메인은 Fc 수용체, 예컨대, Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa, Fc γ RIIIb, Fc γ RIV에 결합하는 최소 구조를 형성한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물은 항원-인식 영역, 예컨대 가변 도메인 또는 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물은 항원 인식 영역, 예컨대, 가변 도메인 또는 CDR을 포함한다.

[0191] 본원에서 사용된 "항체 불변 도메인"이라는 용어는 항체의 불변 영역 도메인(예컨대, C_L 항체 불변 도메인, C_H1 항체 불변 도메인, C_H2 항체 불변 도메인, 또는 C_H3 항체 불변 도메인)에 상응하는 폴리펩타이드를 지칭한다.

[0192] 본원에서 사용된 "촉진시키다"라는 용어는 조장하고 장려하는 것, 예컨대 다른, 별개의 Fc 도메인 단량체보다 서로 간에 결합 친화도가 더 높은 2개의 Fc 도메인 단량체에서 Fc 도메인의 형성을 장려하는 것을 지칭한다. 본원에 기재된 바와 같이, 결합하여 Fc 도메인을 형성하는 2개의 Fc 도메인 단량체는 그들 각각의 C_H3 항체 불변 도메인의 계면에서 양립성(compatible) 아미노산 변형(예컨대, 유전자 조작 돌출부 및 유전자 조작 함몰부)을 가질 수 있다. 양립성 아미노산 변형은 이러한 아미노산 변형이 결여되거나 비양립성 아미노산 변형을 갖는 다른 Fc 도메인 단량체와 비교하여 이러한 Fc 도메인 단량체의 서로 간의 선택적 상호 작용을 촉진하거나 장려한다. 이는 2개의 상호작용하는 C_H3 항체 불변 도메인의 계면에서의 아미노산 변형으로 인해, 아미노산 변형이 결여된 다른 Fc 도메인 단량체보다 서로를 향해 더 높은 친화도를 갖는 Fc 도메인 단량체 때문에 발생한다.

[0193] 본원에서 사용된 "이량체화 선택성 모듈"이라는 용어는 2개의 도메인 단량체 사이의 바람직한 짹짓기(pairing)를 용이하게 하는 Fc 도메인 단량체의 서열을 지칭한다. "상보적" 이량체화 선택성 모듈은 2개의 Fc 도메인 단량체의 서로 간의 선택적 상호 작용을 촉진하거나 장려하는 이량체화 선택성 모듈이다. 상보적 이량체화 선택성 모듈은 동일한 또는 상이한 서열을 가질 수 있다. 예시적인 상보적 이량체화 선택성 모듈은 본원에 기재된다.

[0194] 본원에서 사용된 "유전자 조작 함몰부"라는 용어는 원래의 아미노산 잔기보다 더 작은 측쇄 체적을 갖는 상이한 아미노산 잔기를 가진 C_H3 항체 불변 도메인에 있는 원래의 아미노산 잔기 중 적어도 하나의 치환을 지칭하며, 따라서 C_H3 항체 불변 도메인에 3차원 함몰부를 생성한다. "원래의 아미노산 잔기"라는 용어는 야생형 C_H3 항체 불변 도메인의 유전 암호에 의해 인코딩된 자연 발생 아미노산 잔기를 지칭한다.

[0195] 본원에서 사용된 "유전자 조작 돌출부"라는 용어는 원래의 아미노산 잔기보다 더 큰 측쇄 체적을 갖는 상이한 아미노산 잔기를 가진 C_H3 항체 불변 도메인에 있는 원래의 아미노산 잔기 중 적어도 하나의 치환을 지칭하며, 따라서 C_H3 항체 불변 도메인에 3차원 돌출부를 생성한다. "원래의 아미노산 잔기들"이라는 용어는 야생형 C_H3 항체 불변 도메인의 유전 암호에 의해 인코딩된 자연 발생 아미노산 잔기들을 지칭한다.

[0196] 본원에서 사용된 "돌출부-함몰부 쌍"이라는 용어는 2개의 Fc 도메인 단량체를 포함하는 Fc 도메인을 설명하되, 제1 Fc 도메인 단량체는 그의 C_H3 항체 불변 도메인에 유전자 조작 함몰부를 포함하는 반면, 제2 Fc 도메인 단량체는 그의 C_H3 항체 불변 도메인에 유전자 조작 돌출부를 포함한다. 돌출부-함몰부 쌍에서, 제1 Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인에 있는 유전자 조작 돌출부는 C_H3 항체 불변 도메인간 계면에서 이량체의 정상 결합을 유의미하게 교란시키지 않으면서 제2 Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인의 유전자 조작 함몰부와 상호작용하도록 위치된다.

[0197] 본원에서 사용된, "이종이량체 Fc 도메인"이라는 용어는 2개의 Fc 도메인 단량체의 이종이량체화에 의해 형성되는 Fc 도메인을 지칭하되, 2개의 Fc 도메인 단량체는 이를 2개의 Fc 도메인 단량체의 양호한 형성을 촉진하는 상이한 역전하 돌연변이(예컨대, 표 2A의 돌연변이 참조)를 함유한다. 도 1 및 도 2에 도시된 바와 같이, 3개의 Fc 도메인(하나의 카복시 말단 "줄기(stem)" Fc 도메인 및 2개의 아미노 말단 "가지(branch)" Fc 도메인)을 갖는 Fc 작제물에서, 아미노 말단 "가지" Fc 도메인 각각은 이종이량체 Fc 도메인("가지" 이종이량체 Fc 도메인"이라고도 불림)(예컨대, 도 1의 Fc 도메인 단량체 106 및 114 또는 Fc 도메인 단량체 112 및 116에 의해 형성된 이종이량체 Fc 도메인; 도 2의 Fc 도메인 단량체 206 및 214 또는 Fc 도메인 단량체 212 및 216에 의해 형성된 이종이량체 Fc 도메인)일 수 있다.

[0198] 본원에서 사용된 "동종이량체 Fc 도메인"이라는 용어는 2개의 Fc 도메인 단량체의 동종이량체화에 의해 형성되는 Fc 도메인을 지칭하되, 2개의 Fc 도메인 단량체는 동일한 역전하 돌연변이(예컨대, 표 2B 및 표 2C의 돌연변이 참조)를 함유한다. 도 1 및 도 2에 도시된 바와 같이, 3개의 Fc 도메인(하나의 카복시 말단 "줄기" Fc 도메인 및 2개의 아미노 말단 "가지" Fc 도메인)을 갖는 Fc 작제물에서, 카복시 말단 "줄기" Fc 도메인은 동종이량체

Fc 도메인("줄기 동종이량체 Fc 도메인"이라고도 불림)(예컨대, 도 1의 Fc 도메인 단량체 104 및 110에 의해 형성된 동종이량체 Fc 도메인; 도 2의 Fc 도메인 단량체 204 및 210에 의해 형성된 동종이량체 Fc 도메인)일 수 있다.

[0199] 본원에서 사용된 "이종이량체화 선택성 모듈"이란 용어는 양립 가능한 이종이량체화 선택성 모듈을 갖는 2개의 Fc 도메인 단량체의 양호한 이종이량체화를 촉진하기 위해 Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인에서 이루어질 수 있는 유전자 조작 돌출부, 유전자 조작 핵몰부 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 1 및 표 2A에 나타낸다.

[0200] 본원에서 사용된 "동종이량체화 선택성 모듈"이란 용어는 동종이량체 Fc 도메인을 형성하도록 Fc 도메인 단량체의 동종이량체화를 촉진하는 C_H3 도메인 사이의 계면에서 하전 잔기의 고리 내의 적어도 2개의 위치의 Fc 도메인 단량체의 역전하 돌연변이를 지칭한다. 동종이량체화 선택성 모듈의 예는 표 2A 및 표 2B에 나타낸다.

[0201] 본원에서 사용된 "접합된"이라는 용어는 화학적 컨쥬게이션, 재조합 수단 및 화학 결합, 예컨대, 이황화 결합 및 아미드 결합을 포함하는 수단에 의한 둘 이상의 요소, 성분, 또는 단백질 도메인, 예컨대, 폴리펩타이드의 조합 또는 부착을 기술하는 데 사용된다. 예를 들어, 2개의 단일 폴리펩타이드는 화학적 컨쥬게이션, 화학 결합, 웨타이드 링커, 또는 공유 결합의 임의의 다른 수단을 통해 접합되어 하나의 인접 단백질 구조를 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체는 웨타이드 링커를 통해 제2 Fc 도메인 단량체에 접합되어, 웨타이드 링커의 N-말단은 화학 결합, 예컨대, 웨타이드 결합을 통해 제1 Fc 도메인 단량체의 C-말단에 접합되고, 웨타이드 링커의 C-말단은 화학 결합, 예컨대, 웨타이드 결합을 통해 제2 Fc 도메인 단량체의 N-말단에 접합된다. 다른 구현예에서, 일부민-결합 웨타이드의 N-말단은 전술한 바와 동일한 방식으로 링커를 통해 Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인의 C-말단에 접합된다.

[0202] 본원에서 사용된 "결합된"이라는 용어는 폴리펩타이드(또는 하나의 단일 폴리펩타이드 내의 서열)가 본원에 기술된 Fc 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)을 형성하도록 위치되게 하는 폴리펩타이드(또는 하나의 단일 폴리펩타이드 내의 서열) 사이의 상호 작용, 예컨대, 수소 결합, 소수성 상호 작용, 또는 이온 결합을 기술하는 데 사용된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 4개의 폴리펩타이드, 예컨대, 2개의 Fc 도메인 단량체를 각각 포함하는 하나의 폴리펩타이드 및 하나의 Fc 도메인 단량체를 각각 포함하는 2개의 폴리펩타이드는 결합하여 (예컨대, 도 1 및 도 2에 도시된 바와 같은) 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물을 형성한다. 4개의 폴리펩타이드는 그들 각각의 Fc 도메인 단량체를 통하여 결합할 수 있다. 폴리펩타이드 사이의 결합은 공유 결합을 포함하지 않는다.

[0203] 본원에서 사용된 "링커"라는 용어는 2개의 요소, 예컨대, 단백질 도메인 사이의 결합을 지칭한다. 링커는 공유 결합 또는 스페이서일 수 있다. "결합"이라는 용어는 화학 결합, 예컨대, 아미드 결합 또는 이황화 결합, 또는 화학 반응에 의해 생성된 임의의 종류의 결합, 예컨대, 화학적 컨쥬게이션을 지칭한다. "스페이서"라는 용어는 2개의 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 도메인 사이에 공간 및/또는 가요성을 제공하기 위해 2개의 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 도메인 사이에 발생하는 모이어티(예컨대, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 중합체) 또는 아미노산 서열(예컨대, 3~200개의 아미노산, 3~150개의 아미노산, 3~100개의 아미노산, 3~60개의 아미노산, 3~50개의 아미노산, 3~40개의 아미노산, 3~30개의 아미노산, 3~20개의 아미노산, 3~10개의 아미노산, 3~8개의 아미노산, 3~5개의 아미노산, 4~30개의 아미노산, 5~30개의 아미노산, 6~30개의 아미노산, 8~30개의 아미노산, 10~20개의 아미노산, 10~30개의 아미노산, 12~30개의 아미노산, 14~30개의 아미노산, 20~30개의 아미노산, 15~25개의 아미노산, 15~30개의 아미노산, 18~22개의 아미노산, 및 20~30개의 아미노산 서열)을 지칭한다. 아미노산 스페이서는 (예컨대, 이격된 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 도메인에 폴리펩타이드 백본(backbone)을 통해 접합된) 폴리펩타이드의 1차 서열의 부분이다. 예컨대, Fc 도메인을 형성하는 2개의 힌지 영역 또는 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 이황화 결합의 형성은 링커로 간주되지 않는다.

[0204] 본원에서 사용된 "글라이신 스페이서"라는 용어는 2개의 Fc 도메인 단량체를 직렬연결로 접합하는 글라이신만 함유하는 링커를 지칭한다. 글라이신 스페이서는 적어도 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 또는 20개의 글라이신(예컨대, 4~30개, 8~30개, 12~30개, 12~50개, 12~100개, 또는 12~200개의 글라이신; 예컨대, 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 글라이신)을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 글라이신 스페이서는 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG(서열번호 27)의 서열을 포함하거나 이로써 이루어지거나 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0205] 본원에서 사용된 "알부민-결합 웨타이드"라는 용어는 혈청 알부민에 대한 친화도가 있고 혈청 알부민에 결합하도록 기능하는 12개 내지 16개의 아미노산의 아미노산 서열을 지칭한다. 알부민-결합 웨타이드는 상이한 기원, 예컨대, 인간, 마우스, 또는 래트의 것일 수 있다. 본 개시의 일부 구현예에서, 알부민-결합 웨타이드는 Fc 도메인 단량체의 C-말단에 융합되어 Fc 작제물의 혈청 반감기를 증가시킨다. 알부민-결합 웨타이드는 직접 또는 링커를 통해, Fc 도메인 단량체의 N-말단 또는 C-말단에 융합될 수 있다.

[0206] 본원에서 사용된 "정제 웨타이드"란 용어는 폴리웨타이드의 정제, 단리 또는 식별에 사용될 수 있는 임의의 길이의 웨타이드를 지칭한다. 정제 웨타이드는 예컨대, 세포 용해 혼합물에서 폴리웨타이드를 정제하고/하거나 폴리웨타이드를 단리하는 것을 돋기 위해 폴리웨타이드에 접합될 수 있다. 일부 구현예에서, 정제 웨타이드는 결합하여 정제 웨타이드에 특이적 친화도를 갖는 또 다른 모이어티에 결합한다. 일부 구현예에서, 정제 웨타이드에 특이적으로 결합하는 이러한 모이어티는 매트릭스, 수지, 또는 아가로스 비드와 같은 고형 지지체에 부착된다. Fc 작제물에 접합될 수 있는 정제 웨타이드의 예는 본원에 더 상세히 기술된다.

[0207] 본원에서 사용된 "다량체"라는 용어는 본원에 기재된 적어도 2개의 결합된 Fc 작제물을 포함하는 분자를 지칭한다.

[0208] 본원에서 사용된 "항원 인식 영역"이라는 용어는 항원에 대한 항체의 인식 및 결합을 담당하는 항체의 경쇄 및 중쇄의 부분을 지칭한다. 항원 인식 영역은 상보성 결정 영역(complementary determining region, CDR, 예컨대, CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2, 및 CDR H3) 및 프레임워크 영역(framework region, FR)을 포함하는 경쇄 및 중쇄(Fab)의 가변 도메인을 포함한다.

[0209] 본원에서 사용된 "면역 반응의 면역 세포 활성화"라는 용어는 세포(예컨대, 면역 세포 (예컨대, 단핵구))상의 Fc γ 수용체(Fc γ R)(예컨대, 활성화 Fc γ R, 예컨대, Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIa, 또는 Fc γ RIIIb)에 면역 복합체 또는 Fc 작제물이 결합하여 유도되거나 활성화되는 면역 반응을 지칭한다. 면역 복합체는 항원에 항체가 결합하여 형성된 항원-항체 복합체이다. 면역 복합체는 Fc γ R을 응집하고 염증, 감염증, 및 기타 질환에서 중요한 역할을 하는 세포 과정을 억제하거나 활성화시키는 다수의 Fc 도메인을 종종 갖는다. 일부 구현예에서, 본 개시의 Fc 작제물은 Fc γ R에 결합할 수 있고 면역 세포(예컨대, 단핵구)상에서 Fc γ R(예컨대, Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIa, 또는 Fc γ RIIIb) 신호의 활성화를 유도할 수 있다. 키나아제 인산화(예컨대, Syk 인산화) 및 Fc γ R-발현 세포에서의 칼슘 유입(calcium influx)과 같은 특정 하류 신호 이벤트의 측정은 면역 복합체 또는 Fc 작제물의 결합으로 야기된 면역 반응의 면역 세포 활성화를 탐지하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 면역 반응의 면역 세포 활성화는 세포의 키나아제 인산화(예컨대, Syk 인산화)의 수준 또는 칼슘 유입 수준이 면역 복합체 또는 Fc 작제물에 의한 어떤 활성화도 없는 세포의 키나아제 인산화(예컨대, Syk 인산화) 또는 칼슘 유입의 수준보다 적어도 5배, 예컨대, 5~100배(예컨대, 5~100배, 10~95배, 15~90배, 20~85배, 25~80배, 30~75배, 35~70배, 40~65배, 45~60배, 또는 50~55배; 예컨대, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 11배, 12배, 13배, 14배, 15배, 16배, 17배, 18배, 19배, 20배, 21배, 22배, 23배, 24배, 25배, 26배, 27배, 28배, 29배, 30배, 31배, 32배, 33배, 34배, 35배, 36배, 37배, 38배, 39배, 40배, 41배, 42배, 43배, 44배, 45배, 46배, 47배, 48배, 49배, 50배, 51배, 52배, 53배, 54배, 55배, 56배, 57배, 58배, 59배, 60배, 61배, 62배, 63배, 64배, 65배, 66배, 67배, 68배, 69배, 70배, 71배, 72배, 73배, 74배, 75배, 76배, 77배, 78배, 79배, 80배, 81배, 82배, 83배, 84배, 85배, 86배, 87배, 88배, 89배, 90배, 91배, 92배, 93배, 94배, 95배, 96배, 97배, 98배, 99배, 또는 100배) 더 높은 경우에 유도된다.

[0210] 본원에서 사용된 "식균작용"이란 용어는 세포, 종종 포식세포(예컨대, 단핵구)가 또 다른 세포, 입자, 또는 병원체(예컨대, 미생물 또는 기생균)를 완전히 에워싸서 포식소체(phagosome)를 형성하는 세포내이입(endocytosis)의 형태를 지칭한다. 면역계에서, 식균작용은 병든 세포(예컨대, 암세포, 감염 세포, 또는 죽은 세포), 병원체 및 세포 잔해물을 제거하는 데 사용되는 주요 메커니즘이다. 또 다른 세포(예컨대, 포식세포(예컨대, 단핵구))에 의해 포식작용되도록 표적화되는 세포는 표적 세포라 지칭된다. 예를 들어, 면역 세포상의 Fc γ R(예컨대, Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIa, 또는 Fc γ RIIIb)에 본 개시의 Fc 작제물의 결합에 의해 활성화된 면역 세포(예컨대, 단핵구)는 대상의 암세포 또는 감염 세포일 수 있는 표적 세포를 포식작용할 수 있다.

[0211] 본원에서 사용된 표적 세포의 식균작용이 "증가하다" 또는 "증가하는"이라는 말은 Fc 작제물 도입 없이 일어나는 식균작용의 수준에 비해 면역 세포(예컨대, 단핵구)상의 Fc γ R(예컨대, Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIa, 또는 Fc γ RIIIb)에 본 개시의 Fc 작제물의 결합에 의해 유도된 식균작용의 증가를 지칭한다. 예를 들어, 표적 세포의 식균작용은 식균작용의 수준이 Fc 작제물 도입 없이 일어나는 식균작용의 수준보다 적어도 10%, 예

컨대, 10~100%(예컨대, 10~100%, 15~95%, 20~90%, 25~85%, 30~80%, 35~75%, 40~70%, 45~65%, 또는 50~60%; 예컨대, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%) 더 높은 경우에 증가된다.

[0212] 본원에서 사용된 "암 치료"라는 용어는 대상에서 암의 치료적 처리를 지칭한다. 치료적 처리는 암의 진행을 늦추고, 대상의 결과를 개선하고/하거나 암을 제거하는 것이다.

[0213] 본원에서 사용된 "감염증 치료"라는 용어는 대상에서 감염증의 치료적 처리를 지칭한다. 치료적 처리는 감염증의 진행을 늦추고, 대상의 결과를 개선하고/하거나 감염증을 제거하는 것이다.

[0214] 본원에서 사용된 "감염증"이라는 용어는 세균, 바이러스, 진균, 연충(helminth), 원충(protozoan), 절지동물 및 기타 미생물, 기생균 및 기생충(worm)과 같은 병원체에 의한 대상의 세포, 조직, 및/또는 기관에의 침입을 지칭한다. 일부 구현예에서, 병원체는 대상의 세포, 조직, 및/또는 기관에서 성장하고, 증식하고/하거나 독소를 생성할 수 있다. 일부 구현예에서, 대상은 병원체에 대해 부정적인 반응(즉, 알레르기 반응 또는 면역 반응)을 일으킬 수 있다. 감염증의 예는 이에 제한되지 않지만, 세균성 감염증, 바이러스성 감염증, 진균성 감염증, 연충 감염증 및 원충 감염증을 포함한다.

[0215] 본원에서 사용된 "세균성 감염증"이란 용어는 하나 이상의 세균에 의해 야기된 감염증을 지칭한다. 감염 유발 세균의 예는 당엽계에 잘 알려져 있고, 이에 제한되지 않지만, 연쇄상구균(*Streptococcus*)속의 세균(예컨대, *Streptococcus pyogenes*), 대장균속의 세균(예컨대, *Escherichia coli*), 비브리오(*Vibrio*)속의 세균(예컨대, *Vibrio cholerae*), 장염균(*Enteritis*)속의 세균(예컨대, *Enteritis salmonella*) 및 살모넬라(*Salmonella*)속의 세균(예컨대, *Salmonella typhi*)을 포함한다.

[0216] 본원에서 사용된 "바이러스성 감염증"이란 용어는 하나 이상의 바이러스에 의해 야기된 감염증을 지칭한다. 감염 유발 바이러스의 예는 당엽계에 잘 알려져 있고, 이에 제한되지 않지만, 레트로바이러스과의 바이러스(예컨대, 인간 면역결핍 바이러스(HIV)), 아데노바이러스과의 바이러스(예컨대, 아데노바이러스(adenovirus)), 단순포진바이러스과의 바이러스(예컨대, 단순성 포진 바이러스 1형 및 2형), 파필로마바이러스과의 바이러스(예컨대, 인간 유두종 바이러스(human papillomavirus, HPV)), 폭스바이러스과의 바이러스(예컨대, 천연두), 피코르나바이러스과의 바이러스(예컨대, A형 간염 바이러스, 폴리오바이러스, 리노바이러스), 헤파드나바이러스과의 바이러스(예컨대, B형 간염 바이러스), 플라비바이러스과의 바이러스(예컨대, C형 간염 바이러스, 황열병 바이러스, 웨스트 나일 바이러스), 토가바이러스과의 바이러스(예컨대, 풍진 바이러스), 오르토믹소바이러스과의 바이러스(예컨대, 인플루엔자 바이러스), 필로바이러스과의 바이러스(예컨대, 에볼라 바이러스, 마버그 바이러스(marburg virus)) 및 파라믹소바이러스과의 바이러스(예컨대, 홍역 바이러스, 볼거리 바이러스)를 포함한다.

[0217] 본원에서 사용된 "진균성 감염증"이란 용어는 하나 이상의 진균으로 야기된 감염증을 지칭한다. 감염 유발 진균의 예는 당엽계에 잘 알려져 있고, 이에 제한되지 않지만 아스페르길루스(*Aspergillus*)속의 진균(예컨대, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. corynoides*, *A. clavatus*, *A. ochraceus*), 칸디다(*Candida*)속의 진균(예컨대, *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*), 크립토코커스(*Cryptococcus*)속의 진균(예컨대, *Cryptococcus neoformans*) 및 푸사리움(*Fusarium*)속의 진균(예컨대, *Fusarium solani*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*)을 포함한다.

[0218] 본원에서 사용된 "연충 감염증"이란 용어는 하나 이상의 연충에 의해 야기된 감염증을 지칭한다. 연충의 예는 이에 제한되지 않지만, 조충류(tapeworm)(촌충류(cestode)), 회충류(roundworm)(선충류(nematode)), 흡충류(flukes)(디스토마류(trematode)) 및 단생강(monogenean)을 포함한다.

[0219] 본원에서 사용된 "원충 감염증"이란 용어는 하나 이상의 원충에 의해 야기된 감염증을 지칭한다. 원충의 예는 이에 제한되지 않지만, 엔트아메바(*Entamoeba*)속의 원충(예컨대, *Entamoeba histolytica*), 열원충(*Plasmodium*)속의 원충(예컨대, *Plasmodium falciparum*, *P. malariae*), 람블편모충(*Giardia*)속의 원충(예컨대, *Giardia lamblia*) 및 과동편모충(*Trypanosoma*)속의 원충(예컨대, *Trypanosoma brucei*)을 포함한다.

[0220] 본원에서 사용된 "폴리뉴클레오타이드"라는 용어는 올리고뉴클레오타이드, 또는 뉴클레오타이드, 및 단편 또는

그의 부분, 및 계놈 또는 합성 근원의 DNA 또는 RNA를 지칭하고, 이는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있고, 센스 가닥 또는 안티-센스 가닥을 나타낼 수 있다. 단일 폴리뉴클레오타이드는 단일 폴리펩타이드로 번역된다.

[0221] 본원에서 사용된 "폴리펩타이드"라는 용어는 단량체가 아미드 결합을 통해 서로 접합되는 아미노산 잔기인 단일 중합체를 말한다. 폴리펩타이드는 자연 발생이거나, 재조합, 또는 합성하여 제조된 것 중 하나의 임의의 아미노산 서열을 포괄하려는 것이다.

[0222] 본원에서 사용된 "아미노산 위치"라는 용어는 단백질 또는 단백질 도메인의 아미노산의 위치 번호를 의미한다. 항체 또는 Fc 작제물에 대한 아미노산 위치는 카밧(Kabat) 넘버링 시스템(Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, Md., ed 5, 1991)을 사용하여 번호가 부여된다.

[0223] 본원에서 사용된 "아미노산 변형"이란 용어는 기준 서열(예컨대, 야생형, 비돌연변이, 또는 비변형 Fc 서열)과 비교하여, 약물동력학(PK) 및/또는 약물력학(PD) 특성, 혈청 반감기, 효과기 기능(예컨대, 세포 용해(예컨대, 항체-의존성 세포-매개 독성(ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포 독성 활성(CDC)), 식균 작용(예컨대, 항체 의존성 세포 식균 작용(ADCP) 및/또는 보체-의존성 세포 독성(CDCC)), 면역 활성, 및 T-세포 활성), Fc 수용체에(예컨대, Fc-감마 수용체(Fc γR)(예컨대, Fc γRI(CD64), Fc γRIIa(CD32), Fc γRIIb(CD32), Fc γRIIIa(CD16a), 및/또는 Fc γRIIIb(CD16b)), Fc-알파 수용체(Fc αR), Fc-엡실론 수용체(Fc εR), 및/또는 신생아의 Fc 수용체(FcRn)에) 대한 친화도, 보체 연쇄반응(compliment cascade)(예컨대, C1q)에 관여하는 단백질에 대한 친화도, 번역후 변형(예컨대, 당화, 시알릴화), 응집 특성(예컨대, 이량체(예컨대, 동종이량체 및/또는 이종이량체) 및/또는 다량체를 형성하는 능력) 및 (예컨대, C_H1 및 C_L 사이의 상호작용을 변경, 안정성을 변경 및/또는 온도 및/또는 pH에 대한 감수성을 변경하는) Fc 작제물의 생물물리학적 특성에 영향을 끼칠 수 있고, 면역성 질환 및 염증성 질환, 암 및 감염증의 치료 효능 개선을 촉진시킬 수 있는 Fc 도메인 폴리펩타이드 서열의 변경을 지칭한다. 아미노산 변형은 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 포함한다. 일부 구현예에서, 아미노산 변형은 단일 아미노산의 변형이다. 다른 구현예에서, 아미노산 변형은 다수의(예컨대, 하나 초과의) 아미노산의 변형이다. 아미노산 변형은 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입의 조합을 포함할 수 있다. Fc 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 점 돌연변이(point mutation)(예컨대, 단일 뉴클레오타이드를 또 다른 것과 교환), 삽입 및 결실(예컨대, 하나 이상의 뉴클레오타이드의 첨가 및/또는 제거)과 같은 유전자(즉, DNA 및 RNA) 변경은 아미노산 변형의 기재에 포함된다.

[0224] 특정 구현예에서, Fc 작제물 내의 적어도 하나의(예컨대, 하나, 둘, 또는 셋의) Fc 도메인은 아미노산 변형을 포함한다. 일부 예시에서 적어도 하나의 Fc 도메인은 하나 이상의(예컨대, 둘, 셋, 넷, 다섯, 여섯, 일곱, 여덟, 아홉, 열, 또는 스물 이상의) 아미노산 변형을 포함한다. 일부 예시에서, 적어도 하나의 Fc 도메인은 열 여섯 개 이하의 아미노산 변형(예컨대, 하나, 둘, 셋, 넷, 다섯, 여섯, 일곱, 여덟, 아홉, 열, 열 하나, 열 둘, 열 셋, 열 넷, 열 다섯, 또는 열 여섯 개 이하의 아미노산 변형)을 포함한다. 일부 경우에 있어서, Fc 도메인 단량체는 열 개 이하의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 경우에 있어서, Fc 도메인 단량체는 12개 이하의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 경우에 있어서, Fc 도메인 단량체는 14개 이하의 아미노산 변형을 포함한다.

[0225] 본원에서 사용된 "퍼센트(%) 동일성"이란 용어는 (필요한 경우, 최대 퍼센트 동일성을 달성하기 위해 서열을 정렬하고 갭(gap)을 도입한 후에(즉, 비교를 위해 최적 정렬 및 비동질성 서열이 무시될 수 있도록 후보 및 기준 서열 중 하나 또는 둘 다에 갭이 도입될 수 있음) 기준 서열, 예컨대 야생형 Fc 도메인 단량체의 서열의 아미노산(또는 핵산) 잔기와 동일한) 본원에 기술된 Fc 작제물의 Fc 도메인 단량체의 서열과 같은 후보 서열의 아미노산(또는 핵산)의 백분율을 지칭한다. 퍼센트 동일성을 결정하기 위해 정렬은 당업계의 기술 내에 있는 다양한 방법, 예를 들어 BLAST, ALIGN, 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 사용가능한 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 특정 퍼센트 아미노산(또는 핵산) 서열 동일성을 갖거나 포함하는 주어진 후보 서열로 대체하여 표현될 수 있는) 주어진 기준 서열에 대한, 이에 대해, 또는 이와 비교하여 주어진 후보 서열의 퍼센트 아미노산(또는 핵산) 서열 동일성은 다음과 같이 계산된다:

[0226] $100 \times (A/B \text{의 분수})$

[0227] 여기서 A는 후보 서열 및 기준 서열의 정렬에서 동일한 것으로 기록된 아미노산(또는 핵산) 잔기의 수이고, B는 기준 서열에서 아미노산(또는 핵산) 잔기의 총 수이다. 후보 서열의 길이가 기준 서열의 길이와 같지 않은 일부 구현예에서, 기준 서열에 대한 후보 서열의 퍼센트 아미노산(또는 핵산) 서열 동일성은 후보 서열에 대한 기준

서열의 퍼센트 아미노산(또는 핵산) 서열 동일성과 같지 않을 수 있다.

[0228] 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 서열의 위치가 기준 서열에서의 상응하는 위치와 동일한 아미노산(또는 핵산) 잔기에 의해 차지되고, 이때 분자는 그 위치에서 동일하다.

[0229] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물의 Fc 도메인 단량체(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)는 야생형 Fc 도메인 단량체(예컨대, 서열번호 42)의 서열에 적어도 95% 동일한(예컨대, 적어도 97%, 99%, 또는 99.5% 동일한) 서열을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물의 Fc 도메인 단량체(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)는 서열번호 44, 46, 48 및 50~53 중 어느 하나의 서열에 적어도 95% 동일한(예컨대, 적어도 97%, 99%, 또는 99.5% 동일한) 서열을 가질 수 있다. 특정 구현예에서, Fc 작제물의 Fc 도메인 단량체는 서열번호 48, 52, 및 53의 서열에 적어도 95% 동일한(예컨대, 적어도 97%, 99%, 또는 99.5% 동일한) 서열을 가질 수 있다.

[0230] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물의 Fc 도메인 단량체(예컨대, 다수의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)는 최대 10개(예컨대, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개)의 단일 아미노산 변형(예컨대, 치환, 예컨대, 보존성 치환)을 갖는 서열을 가질 수 있다. 일부 예시에서, 적어도 하나의 Fc 도메인은 열 여섯 개 이하의 아미노산 변형(예컨대, 하나, 둘, 셋, 넷, 다섯, 여섯, 일곱, 여덟, 아홉, 열, 열 하나, 열 둘, 열 셋, 열 넷, 열 다섯, 또는 열 여섯 개 이하의 아미노산 변형)을 포함한다.

[0231] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물의 2개의 Fc 도메인 단량체를 갖는 폴리펩타이드(예컨대, 도 1의 폴리펩타이드 102 및 108; 도 2의 폴리펩타이드 202 및 208)는 서열번호 43, 45, 47, 및 49 중 어느 하나의 서열에 적어도 95% 동일한(예컨대, 적어도 97%, 99%, 또는 99.5% 동일한) 서열을 가질 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물의 2개의 Fc 도메인 단량체를 갖는 폴리펩타이드는 서열번호 49의 서열에 적어도 95% 동일한(예컨대, 적어도 97%, 99%, 또는 99.5% 동일한) 서열을 가질 수 있다.

[0232] 일부 구현예에서, 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 스페이서는 본원에 추가로 기술된 서열번호 1~36(예컨대, 서열번호: 17, 18, 26, 및 27) 중 어느 하나의 서열에 적어도 75% 동일한(예컨대, 75%, 77%, 79%, 81%, 83%, 85%, 87%, 89%, 91%, 93%, 95%, 97%, 99%, 99.5%, 또는 100% 동일한) 서열을 가질 수 있다.

[0233] 본원에서 사용된 "숙주 세포"라는 용어는 필요한 세포 성분, 예컨대, 그의 상응하는 핵산에서부터 단백질을 발현하는 데 필요한 세포 기관을 포함하는 비히클(vehicle)을 지칭한다. 핵산은 전형적으로 당업계에 공지된 종래 기술(형질전환, 형질주입, 전기 천공법, 인산칼슘 침전, 직접 미세현미주입(direct microinjection) 등)로 숙주 세포에 도입될 수 있는 핵산 벡터에 포함된다. 숙주 세포는 원핵 세포, 예컨대, 세균 세포, 또는 진핵 세포, 예컨대, 포유류 세포(예컨대, CHO 세포)일 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 이어서 결합하여 원하는 Fc 작제물을 형성할 수 있는 원하는 도메인을 인코딩하는 하나 이상의 폴리펩타이드를 발현하는 데 숙주 세포가 사용된다.

[0234] 본원에서 사용된 "약제학적 조성물"이란 용어는 유효 성분뿐 아니라 유효 성분을 투여 방법에 적합하도록 하는 하나 이상의 부형제 및 희석제를 함유하는 의약적 또는 약제학적 제형을 지칭한다. 본 개시의 약제학적 조성물은 Fc 작제물과 양립 가능한 약제학적으로 허용가능한 조성물을 포함한다. 약제학적 조성물은 전형적으로 정맥 내 또는 피하 투여를 위한 수용성 형태이다.

[0235] 본원에서 사용된 폴리펩타이드의 또는 Fc 작제물의 "실질적으로 동질인 집단"은 조성물(예컨대, 세포 배양 배지 또는 약제학적 조성물)의 폴리펩타이드 또는 Fc 작제물의 적어도 50%가 비활원 SDS 겔 전기영동 또는 크기 배제 크로마토그래피로 결정된 Fc 도메인과 동일한 수를 갖는다. 폴리펩타이드 또는 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단(예컨대, 적어도 85%, 90%, 또는 95% 동질인 집단)은 정제 전에 또는 단백질 A 또는 단백질 G 정제 후에, 또는 임의의 Fab 또는 Fc-특이적 친화 크로마토그래피후에만 수득될 수 있다. 다양한 구현예에서, 조성물의 폴리펩타이드 또는 Fc 작제물의 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 85%는 Fc 도메인의 동일한 수를 갖는다. 다른 구현예에서, 조성물의 폴리펩타이드 또는 Fc 작제물의 최대 85%, 90%, 92%, 또는 95%는 Fc 도메인의 동일한 수를 갖는다.

[0236] 본원에서 사용된 "약제학적으로 허용 가능한 담체"라는 용어는 약제학적 조성물 중의 부형제 또는 희석제를 지칭한다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 제형의 다른 성분과 양립 가능해야 하고 수용자에게 해가 없어야 한다. 본 개시에서, 약제학적으로 허용 가능한 담체는 Fc 작제물에 적절한 약제학적 안정성을 제공해야 한다. 담체의 특성은 투여 방식에 따라 다르다. 예를 들어, 경구 투여에서는 고형 담체가 바람직하고, 정맥내 투여에서는 수용액 담체(예컨대, WFI, 및/또는 완충액)가 일반적으로 사용된다.

[0237] 본원에서 사용된 "치료 유효량"은 어떤 양, 예컨대, 대상 또는 환자에서 원하는 생물학적 효과를 일으키거나 본원에 기재된 질병 또는 장애를 가진 환자를 치료하는 데 효과적인 약학적 투여량을 지칭한다. "치료 유효량"은 하나의 투여량 또는 임의의 투약 또는 경로로 섭취되거나 단일 또는 다른 치료제와 병용하여 섭취되어 원하는 치료효과를 주는 양으로 해석될 수 있음이 본원에서 또한 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0238] 도 1은 4개의 폴리펩타이드로 형성된 3개의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물(Fc 작제물 1, Fc 작제물 2, 또는 Fc 작제물 3)의 도해이다. 제1 폴리펩타이드(102)는 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(106)와 직렬로 접합된 야생형 Fc 도메인 단량체 서열과 상이한 하전 아미노산을 C_H3-C_H3 계면에 함유하는 하나의 Fc 도메인 단량체(104)를 함유한다. 제1 폴리펩타이드(108)는 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(112)와 직렬로 접합된 야생형 Fc 도메인 단량체 서열과 상이한 하전 아미노산을 C_H3-C_H3 계면에 함유하는 하나의 Fc 도메인 단량체(110)를 함유한다. 제3 및 제4 폴리펩타이드(각각 114 및 116)는 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체를 각각 함유한다.

도 2는 3개의 폴리펩타이드로 형성된 2개의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물(Fc 작제물 4)의 도해이다. 제1 폴리펩타이드(202)는 상이한 하전 아미노산 및 돌출부를 함유하는 또 다른 Fc 도메인 단량체(206)와 직렬연결로 접합된 야생형 Fc 도메인 단량체 서열과 상이한 하전 아미노산을 C_H3-C_H3 계면에 함유하는 하나의 Fc 도메인 단량체(204)를 함유한다. 제1 폴리펩타이드(208)는 상이한 하전 아미노산 및 돌출부를 함유하는 또 다른 Fc 도메인 단량체(212)와 직렬연결로 접합된 야생형 Fc 도메인 단량체 서열과 상이한 하전 아미노산을 C_H3-C_H3 계면에 함유하는 하나의 Fc 도메인 단량체(210)를 함유한다. 제3 및 제4 폴리펩타이드(각각 214 및 216)는 상이한 하전 아미노산 및 함몰부를 함유하는 Fc 도메인 단량체를 각각 함유한다.

도 3은 LC-MS/MS에 의해 작제물 2 링커(SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG(서열번호 18))의 0-자일로실화(0-xylosylated) Ser의 식별을 보여준다.

도 4는 LC-MS/MS로 결정된 바, 2개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물(도 13에 나타낸 Fc 작제물)의 링커 0-자일로 실화의 양을 보여준다.

도 5는 CE-SDS로 결정된 바, 45° C에서 저장 시 Fc 작제물 2와 4에서의 단량체 Fc 종의 형성을 보여준다.

도 6은 LC-MS로 결정된 바, 45° C에서 2주간 저장 시 Fc 작제물 2의 단백질 분해(proteolysis) 산물을 보여준다.

도 7은 LC-MS로 결정된 바, 45° C에서 2주간 저장 시 Fc 작제물 4의 단백질 분해 산물을 보여준다.

도 8은 다양한 링커 길이를 갖는 Fc 작제물 2로 THP-1 세포에 의한 IL-8 방출의 억제를 보여준다.

도 9는 다양한 링커 길이를 갖는 Fc 작제물 2로 중성구에서의 칼슘 유입의 억제를 보여준다.

도 10은 미정제 배지에서의 Fc 작제물 2 및 Fc 작제물 4의 비활원 SDS-PAGE에 의한 크기 분포를 보여준다.

도 11은 Fc 작제물 2("정전기 스티어링 있음")의 발현 및 조립 및 "줄기" 소단위체("정전기 스티어링 없음")에 정전기 스티어링 돌연변이가 없는 3개의 Fc 도메인을 갖는 또 다른 Fc 작제물을 보여준다.

도 12는 Fc 작제물 2를 생성하는 C-말단 라이신의 제거는 시험관내 보체 의존 세포독성(complement dependent cytotoxicity, CDC)을 유도하지 않는 것을 보여준다.

도 13은 3개의 폴리펩타이드로 형성된 2개의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물의 도해이다.

도 14는 6개의 폴리펩타이드로 형성된 5개의 Fc 도메인(Fc5X)을 함유하는 Fc 작제물의 도해이다.

도 15는 6개의 폴리펩타이드로 형성된 5개의 Fc 도메인(Fc5Y)을 함유하는 Fc 작제물의 도해이다.

도 16은 6개의 폴리펩타이드로 형성된 5개의 Fc 도메인(Fc5Y-도치)을 함유하는 Fc 작제물의 도해이다.

도 17은 2개의 폴리펩타이드로 형성된 3개의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물의 도해이다.

도 18은 만성 ITP 모델에서 IVIG, 작제물 2, 및 작제물 4를 비교하여 혈소판 수준을 보여준다.

도 19는 만성 ITP 모델에서 IVIG, 작제물 2, 및 작제물 4를 비교하여 혈소판 수준을 보여준다.

도 20은 만성 IPT 모델에서 IVIG, 작제물 2, 및 작제물 4를 비교하여 혈소판 수준을 보여준다.

도 21은 정제 Fc 작제물 4(중간) 및 정제 작제물 X1(우측)의 비활원 SDS-PAGE에 의한 크기 분포를 보여준다. 분자량 표준은 좌측에 도시된다.

도 22는 작제물 4(검은 사각형의 실선) 및 작제물 X1(옅린 원의 파선)에 대해 24시간에 걸쳐 약동학적 행태(pharmacokinetic behavior)를 보여준다.

도 23은 작제물 4(검은 사각형의 실선) 및 작제물 X1(옅린 원의 파선)에 대해 12시간에 걸쳐 약동학적 행태를 보여준다.

도 24는 50 mg/kg(검은 삼각형, 검은 실선), 25 mg/kg(검은 사각형, 검은 점선), 또는 12.5 mg/kg(검은 원, 검은 파선)으로 6일차에 콜라겐 항체-유도 관절염(CAIA) 모델에서 치료적으로 투약된 작제물 4를 보여준다. 동일한 용량의 식염수(회색 엑스, 회색 실선)가 6일차에 비히클 대조로 투약되었다. 평균 및 평균의 표준 오차가 각각의 시간 지점에 표시되어 있다.

도 25는 콜라겐 항체-유도 관절염(CAIA) 모델에서 1일차에 100 mg/kg으로 예방을 위해 투약된 작제물 4(AA: 검은 사각형, 실선) 또는 식염수(회색 원, 쇄선)의 효능을 비교한다. 동일한 용량의 식염수(회색 원, 쇄선)가 1일차에 투약되었다. 평균 및 평균의 표준 오차가 각각의 시간 지점에 표시되어 있다.

도 26은 작제물 4(SIF) 및 작제물 4-Fc γRIIb+ 돌연변이의 발현으로 얻어진 정화 배지의 비활원 SDS-PAGE에 의한 크기 분포를 나타낸다.

도 27은 IgG1 대조, 작제물 4(SIF3), 및 작제물 4-Fc γRIIb+돌연변이(FcfRIIb+)의 Fc 감마 수용체에 대한 상대적 결합을 나타낸다.

도 28은 단핵구 유래 수지상 세포(moDC)상의 CD86 표면 발현을 나타낸다.

도 29는 단핵구 유래 수지상 세포(moDC)상의 CD86 표면 발현을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0239] IgG의 Fc 도메인을 포함하는 치료 단백질은 염증과 면역학적 질환 및 염증성 질환, 암 및 감염증을 치료하는 데 사용될 수 있다. 본 개시는 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물(예컨대, 2~10개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물, 예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)을 제조하기 위한 조성물 및 방법을 특징으로 한다. 본원에 기술된 Fc 작제물은 제조 결과를 상당히 개선시키는 구조적 특징(예를 들어, 글라이신 스페이서)을 혼입시킴으로써 동질인 약제학적 조성물의 제조를 용이하게 한다.

[0240] 따라서, 본 개시는 본원에 기술된 Fc 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 약제학적 조성물을 특징으로 한다. 동질성은 조성물의 약동학 및 생체내 성능에 영향을 미치는 약제학적 조성물의 중요한 측면이다. 전통적으로, 약제학적 산물의 제조에 있어서, 산물을 어떻게 제조하느냐에 따라 몇몇 요인들에 의해 야기될 수 있는 산물 이질성의 문제가 존재한다. 예를 들어, 약제학적 산물은 무작위 산물 절단, 단백질 분해, 분해, 및/또는 응집, 소단위체의 비표적 결합(off-target association), 및/또는 비효율적 단백질 접힘을 겪을 수 있다. 약제학적 산물을 제조하는 데 사용되는 상이한 생합성 과정 또는 세포 기구를 갖는 상이한 유기체는 또한 산물에서 이질성을 일으킬 수 있다. 종종, 원하는 약제학적 산물을 함유하는 초기 배양은 약제학적 산물을 함유하는 조성물을 이질성이 적게 제조하기 위해 엄격한 정제 과정을 거칠 필요가 있다.

[0241] 본 개시는 하나의 양태에서, Fc 작제물의 접힘 효율을 개선시키고 소단위체의 비표적 결합을 최소화함으로써 높은 동질성을 갖는 이를 Fc 작제물을 함유하는 약제학적 조성물을 가져오는 구조적 특징을 갖는 Fc 작제물을 특징으로 한다. 동질성의 정도가 높으면 약제학적 조성물의 안전성, 효능, 균일성 및 신뢰도를 보장한다. 동질성의 정도가 높으면 또한 원치않는 물질(예컨대, 분해 산물 및/또는 응집 산물 또는 다량체)에 의해 야기되는 약

제학적 생산물의 잠재적인 응집 또는 분해를 최소화할 뿐만 아니라 원치않는 물질에 의해 야기되는 비표적 및 부작용을 제한한다.

[0242] 본원에 상세하게 기술된 바와 같이, 본 개시는 모두 동일한 수의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물을 함유하는 실질적으로 동질인 조성물뿐 아니라 이러한 실질적으로 동질인 조성물을 제조하는 방법을 특징으로 한다.

[0243] 본원에 기술된 Fc 작제물은 Fc 도메인 사이에 글라이신 스페이서를 포함한다. 당업계에 알려진 바와 같이, 세린 및 글라이신 둘 다를 함유하는 링커는 단백질에 구조적 가요성을 제공하고 2개의 폴리펩타이드를 접합하는 데 통상 사용된다. 세린 및 글라이신 둘 다를 함유하는 링커가 링커의 다수의 세린에서 0-당화(예컨대, 0-자일로실화) 및 세린의 N-말단 측에서 단백질 분해를 겪음을 실험을 통해(실시예 4 참조) 관찰하였다. Fc 작제물의 동질성을 더 개선시키기 위해 링커 서열 및 길이를 최적화하려고 하였다. 작제물내의 모든 링커는 글라이신(예컨대, 적어도 12개의 글라이신, 예컨대, 12~30개의 글라이신; 예컨대, 20개의 글라이신, 서열번호 27)만을 갖는 글라이신 스페이서인 Fc 작제물을 만들었다. Fc 작제물에 전부 글라이신인 스페이서를 갖는 것은 세린에서 0-당화를 제거하고 또한 작제물의 단백질 분해율을 감소시킴으로써 Fc 작제물의 동질성을 더 개선시켰다(실시예 4 참조). 따라서, Fc 작제물에 전부 글라이신인 스페이서를 사용함으로써 Fc 작제물의 보다 실질적으로 동질인 집단을 달성할 수 있었다.

[0244] 동질성을 Fc 작제물 성분의 결과이다. 예를 들어, 제1 접근법("접근법(a)")에서, Fc 도메인 단량체를 접합하기 위해 오직 글라이신을 함유하는 링커의 혼입을 이용할 수 있다. 실험을 통해 관찰한 바와 같이, Fc 작제물에 있는 전부-글라이신인 스페이서(예컨대, 적어도 12개의 글라이신, 예컨대, 12~30개의 글라이신; 서열번호 27)는 0-당화를 겪지 않고 세린 및 글라이신을 포함하는 전통적인 링커와 비교하여 단백질 분해에 덜 민감하다(실시예 4 참조).

[0245] 게다가, 또 다른 접근법("접근법 (b)")에서, 본원에 기술된 Fc 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)을 함유하는 조성물의 동질성은 C-말단 라이신의 제거에 의해 개선된다. 이러한 C-말단 라이신 잔기는 많은 종에 걸쳐 면역글로불린에 고도로 보존되어 있고 단백질 생산 중에 세포 기구에 의해 완전히 또는 부분적으로 제거될 수 있다. 본 개시의 Fc 작제물에서 C-말단 라이신의 제거는 생성된 조성물의 균일성을 개선시키고 보다 동질인 Fc 작제물 제조를 달성한다(실시예 8 참조). 예를 들어, 본원에 개시된 Fc 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)의 일부 구현예에서, C-말단 라이신의 코돈은 제거되어 C-말단 라이신 잔기가 없는 폴리펩타이드를 가진 Fc 작제물을 생성하고 그 결과 동질인 집단이 생성된다.

[0246] 본원에 기술된 Fc 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)을 함유하는 조성물의 동질성을 개선하기 위한 추가 접근법("접근법 (c)")은 두 세트의 이종이량체화 선택성 모듈((i) 상이한 역전하 돌연변이를 갖는 이종이량체화 선택성 모듈 및 (ii) 유전자 조작 함몰부 및 돌출부를 갖는 이종이량체화 선택성 모듈)을 이용하였다. Fc 작제물에서 이종이량체 Fc 도메인을 형성하고자 할 때, (i)과 (ii) 둘 다 Fc 도메인 단량체의 비제어(uncontrolled) 결합을 줄여서 바람직하지 않은 올리고며 및 다량체를 감소시킴으로써 제조된 약제학적 조성물의 동질성을 더 개선시켰음을 실험을 통해(예컨대 실시예 6 참조) 관찰하였다. 특정 실시예에서, (i) 적어도 하나의 역전하 돌연변이 및 (ii) 적어도 하나의 유전자 조작 함몰부 또는 적어도 하나의 유전자 조작 돌출부를 함유하는 Fc 도메인 단량체가 제조될 수 있고 (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 것이다. 또 다른 실시예에서, 역전하 돌연변이 K370D 및 유전자 조작 함몰부 Y349C, T366S, L368A, 및 Y407V를 함유하는 Fc 도메인 단량체 및 역전하 돌연변이 E357K 및 유전자 조작 돌출부 S354C 및 T366W를 함유하는 또 다른 Fc 도메인 단량체가 제조될 수 있고 선택적으로 결합하여 Fc 도메인을 형성할 것이다.

[0247] 본원에 상세하게 기술된 바와 같이, 본 개시의 Fc 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)을 함유하는 실질적으로 동질인 조성물은 Fc 작제물의 2개의 Fc 도메인 단량체 사이에 전부-글라이신인 스페이서를 사용(접근법 (a)), Fc 작제물의 C-말단 라이신이 결여된 폴리펩타이드를 사용(접근법 (b)), 및/또는 Fc 작제물의 일부 Fc 도메인 단량체에 의해 이종이량체 Fc 도메인 형성을 촉진하기 위해 두 세트의 이종이량체화 선택성 모듈((i) 상이한 역전하 돌연변이를 갖는 이종이량체화 선택성 모듈 및 (ii) 유전자 조작 함몰부 및 돌출부를 갖는 이종이량체화 선택성 모듈)을 사용(접근법 (c))함으로써 달성될 수 있다.

[0248] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)을 함유하는 실질적으로 동질인 조성물은 접근법 (a)를 통해 달성될 수 있다.

[0249] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)을 함유하는 실질적으로 동질인 조성물은 접근법 (b)를 통해 달성될 수 있다.

[0250] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)을 함유하는 실질적으로 동질인 조성물은 접근법 (c)를 통해 달성될 수 있다.

[0251] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)을 함유하는 실질적으로 동질인 조성물은 접근법 (a) 및 (b)의 조합을 통해 달성될 수 있다.

[0252] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)을 함유하는 실질적으로 동질인 조성물은 접근법 (a) 및 (c)의 조합을 통해 달성될 수 있다.

[0253] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)을 함유하는 실질적으로 동질인 조성물은 접근법 (b) 및 (c)의 조합을 통해 달성될 수 있다.

[0254] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)을 함유하는 실질적으로 동질인 조성물은 접근법 (a), (b) 및 (c)의 조합을 통해 달성될 수 있다.

[0255] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물을 함유하는 약제학적 조성물의 동질성을 더 개선하기 위하여, 조성물의 Fc 작제물의 폴리펩타이드 중 하나 이상의 N-말단 Asp는 Gln으로 돌연변이된다. 본원에 기술된 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함하는 조성물의 일부 구현예에서, 조성물의 Fc 작제물의 폴리펩타이드 각각의 N-말단 Asp는 Gln으로 돌연변이된다.

[0256] 또한, 본 개시의 Fc 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)에서, Fc 도메인 단량체를 접합하는 링커의 길이는 Fc 작제물의 접힘 효율에 영향을 끼친다. 일부 구현예에서, 적어도 4, 8, 또는 12개의 글라이신(예컨대, 4~30개, 8~30개, 12~30개의 글라이신; 서열번호 26 및 27)을 갖는 링커는 본 개시의 Fc 작제물의 Fc 도메인 단량체를 접합하는 데 사용될 수 있다.

[0257] **I. Fc 도메인 단량체**

[0258] Fc 도메인 단량체는 힌지 도메인, C_H2 항체 불변 도메인 및 C_H3 항체 불변 도메인을 포함한다. Fc 도메인 단량체는 면역글로불린 항체 동종형 IgG, IgE, IgM, IgA, 또는 IgD일 수 있다. Fc 도메인 단량체는 또한 임의의 면역글로불린 항체 동종형(예컨대, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, 또는 IgG4)일 수 있다. Fc 도메인 단량체는 또한 예컨대, IgG1에서부터 힌지 및 C_H2를 갖거나, IgA에서부터 C_H3를 갖거나, IgG1에서부터 힌지 및 C_H2를 갖지만 IgG3에서부터 C_H3를 갖는 혼성체일 수 있다. Fc 도메인 단량체의 이량체는 백혈구의 표면에 위치된 수용체인, Fc 수용체, 예컨대, Fc_γRIIIa에 결합할 수 있는 (본원에서 추가로 정의된) Fc 도메인이다. 본 개시에서, Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인은 서로 결합을 촉진하기 위해 C_H3-C_H3 항체 불변 도메인의 계면에서 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, Fc 도메인 단량체는 N-말단 또는 C-말단에 부착된 추가 모이어티, 예컨대, 알부민-결합 웨بت아이드 또는 정제 웨بت아이드를 포함한다. 본 개시에서, Fc 도메인 단량체는 항체 가변 영역, 예컨대, V_H, V_L, 상보성 결정 영역(CDR), 또는 초가변 영역(HVR)의 임의의 유형을 함유하지 않는다. Fc 도메인 단량체는 상이한 기원 예컨대, 인간, 마우스, 또는 래트일 수 있다.

[0259] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물의 Fc 도메인 단량체(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)는 야생형 Fc 도메인 단량체(서열번호 42)의 서열에 적어도 95% 동일한(예컨대, 적어도 97%, 99%, 또는 99.5% 동일한) 서열을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물의 Fc 도메인 단량체(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)는 최대 10개(9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개)의 단일 아미노산 변형(예컨대, 치환, 예컨대, 보존성 치환)을 갖는 야생형 Fc 도메인 단량체(서열번호 42)의 서열인 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어질 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물의 Fc 도메인 단량체(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)는 서열번호 44, 46, 48 및 50~53 중 어느 하나의 서열(실시예 1, 표 4 및 5 참조)에 적어도 95% 동일한(예컨대, 적어도 97%, 99%, 또는 99.5% 동일한) 서열을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물의 Fc 도메인 단량체(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)는 최대 10개(9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개)의 단일 아미노산 변형(예컨대, 치환, 예컨대, 보존성 치환)을 갖는 서열번호 44, 46, 48 및 50~53 중 어느 하나의 서열(실시예 1, 표 4 및 5 참조)인 서열을 가질 수 있다. 특정 구현예에서, Fc 작제물의 Fc 도메인 단량체는 서열번호 48, 52, 및 53 중 어느 하나의 서열에 적어도 95% 동일한(예컨대, 적어도 97%, 99%, 또는 99.5% 동일한) 서열을 가질 수 있다. 특정 구현예에서, Fc 작제물의 Fc 도

메인 단량체는 최대 10개(9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개)의 단일 아미노산 변형(예컨대, 치환, 예컨대, 보존성 치환)을 갖는 서열번호 48, 52, 및 53 중 어느 하나의 서열인 서열을 가질 수 있다.

서열번호 42: 야생형 인간 IgG1 Fc 도메인 단량체 아미노산 서열

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

[0260]

서열번호 44

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLSCAVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSP

[0261]

GK

서열번호 46

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLSCAVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSP

[0262]

G

서열번호 48

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLCAVD
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSP

[0263]

G

서열번호 50

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLWCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSP

[0264]

GK

서열번호 51

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSP

[0265]

GK

서열번호 52

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLSLDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

G

[0266]

서열번호 53

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLSLDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVPSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

GK

[0267]

II. Fc 도메인

[0268]

본원에 정의된 바와 같이, Fc 도메인은 C_h3 항체 불변 도메인 사이의 상호 작용으로 이량체화된 2개의 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 본 개시에서, Fc 도메인은 항체, 예컨대, V_H, V_L, CDR, 또는 HVR의 가변 영역을 포함하지 않는다. Fc 도메인은 Fc 수용체, 예컨대, Fc-감마 수용체(즉, Fc γ 수용체(Fc γ R)), Fc-알파 수용체(즉, Fc α 수용체(Fc α R)), Fc-엡실론 수용체(즉, Fc ε 수용체 (Fc ε R)), 및/또는 신생아의 Fc 수용체(FcRn)에 결합하는 최소 구조를 형성한다. 일부 구현예에서, 본 개시의 Fc 도메인은 Fc γ 수용체(예컨대, Fc γ RI(CD64), Fc γ RIIa(CD32), Fc γ RIIb(CD32), Fc γ RIIIa(CD16a) 및/또는 Fc γ RIIIb(CD16b)) 및/또는 Fc γ RIV 및/또는 신생아의 Fc 수용체(FcRn)에 결합한다.

[0269]

본원에 기재된 Fc 작제를 중 임의의 것에 있어서, 아미노산 변형은 하나 이상의 Fc 수용체에 대한 결합 친화도를 변경할 수 있다. 일부 구현예에서, 아미노산 변형은 S267E/L328F이다. 일부 구현예에서, Fc 수용체는 Fc γ RIIb이다. 일부 경우에 있어서, 본원에 기재된 변형은 Fc γ RIIb 수용체에 대한 친화도를 증가시킨다. 일부 경우에 있어서, S267E/L328F 변형은 Fc γ RIIb에 대한 결합 친화도를 증가시킨다.

[0270]

III. 이량체화 선택성 모듈

[0271]

본 개시에서, 이량체화 선택성 모듈은 Fc 도메인을 형성하는 2개의 Fc 도메인 단량체의 바람직한 짹짓기를 용이하게 하는 Fc 도메인 단량체의 부분이다. 상세하게는, 이량체화 선택성 모듈은 2개의 Fc 도메인 단량체의 상호 작용하는 C_h3 항체 불변 도메인의 계면에 위치된 아미노산 치환을 포함하는 Fc 도메인 단량체의 C_h3 항체 불변 도메인의 부분이다. 이량체화 선택성 모듈에서, 아미노산 치환은 이들 치환을 위해 선택된 아미노산의 양립성의 결과로서 2개의 C_h3 항체 불변 도메인의 단량체화를 양호하게 한다. 유리한 Fc 도메인의 최종 형성은 이량체화 선택성 모듈이 결여되거나 이량체화 선택성 모듈내의 비양립성 아미노산 치환을 갖는 Fc 도메인 단량체로 형성되는 다른 Fc 도메인에 대해 선택적이다. 아미노산 치환의 이러한 유형은 QuikChange[®] 돌연변이 유발과 같이 당업계에 잘 알려진 통상적인 문자 클로닝 기술을 사용하여 이루어질 수 있다.

[0272]

일부 구현예에서, 이량체화 선택성 모듈은 C_h3 항체 불변 도메인의 (본원에서 추가로 기술되는) 유전자 조작 함몰부를 포함한다. 다른 구현예에서, 이량체화 선택성 모듈 C_h3 항체 불변 도메인의 유전자 조작 (본원에서 추가로 기술되는) 돌출부를 포함한다. 선택적으로 Fc 도메인을 형성하기 위하여, 양립 가능한 이량체화 선택성 모듈을 갖는 2개의 Fc 도메인 단량체, 예컨대, 유전자 조작 함몰부를 함유하는 하나의 C_h3 항체 불변 도메인 및 유전자 조작 돌출부를 함유하는 다른 하나의 C_h3 항체 불변 도메인은 결합하여 Fc 도메인 단량체의 돌출부-함몰부 쌍을 형성한다. 유전자 조작 돌출부 및 유전자 조작 함몰부는 양립 가능한 이종이량체화 선택성 모듈을 갖는 2개의 Fc 도메인 단량체의 양호한 이종이량체화를 촉진하기 위해 Fc 도메인 단량체의 C_h3 항체 불변 도메인에서 이루어질 수 있는 이종이량체화 선택성 모듈의 예이다.

[0273]

다른 구현예에서, 양하전 아미노산 치환을 함유하는 이량체화 선택성 모듈을 갖는 Fc 도메인 단량체 및 음하전

아미노산 치환을 함유하는 이량체화 선택성 모듈을 갖는 Fc 도메인 단량체는 (본원에서 추가로 기술되는) 하전 아미노산의 유리한 정전기 스티어링(정전기 스티어링)을 통해 선택적으로 결합하여 Fc 도메인을 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체는 다음의 양하전 및 음하전 아미노산 치환 중 하나를 포함할 수 있다: K392D, K392E, D399K, K409D, K409E, K439D, 및 K439E. 하나의 실시예에서, 양하전 아미노산 치환, 예컨대, D356K 또는 E357K를 함유하는 Fc 도메인 단량체와 음하전 아미노산 치환, 예컨대, 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 있되, 상이하지만 양립 가능한 역전하 아미노산 치환을 함유하는 2개의 Fc 도메인 단량체는 결합하여 이종이량체 Fc 도메인을 형성한다. 특이적 이량체화 선택성 모듈은 아래에서 더 기술되는 표 1 및 2A에 제한 없이, 추가로 열거되어 있다.

[0275] 다른 구현예에서, 2개의 Fc 도메인 단량체는 잔기 C_h3 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. 하나의 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 이중 돌연변이, 예컨대, K409D/D399K/E357K/K370E의 임의의 쌍을 결합하는 4중 돌연변이를 포함하는 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 동종 이량체화 선택성 모듈의 예는 표 2B 및 표 2C에 추가로 나타낸다.

[0276] 비변형 Fc 도메인 단량체는 자연 발생 인간 Fc 도메인 단량체 또는 WT 인간 Fc 도메인 단량체일 수 있다. Fc 도메인 단량체는 헌지, CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 포함하는 자연 발생 인간 Fc 도메인 단량체; 또는 유도된 이량체화를 수용하거나 촉진하는 최대 16개(예컨대, 최대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16개)의 아미노산 변형(예컨대, 단일 아미노산 변형)을 가지는 이의 변이체일 수 있다. 일부 경우에 있어서, Fc 도메인은 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하되, 아미노산 변형은 (예컨대, 비변형 Fc 도메인과 비교했을 때) (i) 하나 이상의 Fc 수용체에 대한 결합 친화도, (ii) 효과기 기능, (iii) Fc 도메인 황산화의 수준, (iv) 반감기, (v) 프로테아제 저항성, (vi) Fc 도메인 안정성, 및/또는 (vii) 열화에 대한 감수성 중 하나 이상을 변경한다. 추가 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. 일부 경우에 있어서, Fc 도메인은 16개 이하의 아미노산 변형(예컨대, CH3 도메인에 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16개 이하의 아미노산 변형)을 포함한다.

[0277] 이러한 Fc 도메인의 형성은 C_h3 항체 불변 도메인의 양립 가능한 아미노산 치환에 의해 촉진된다. 양립 불가능한 아미노산 치환을 함유하는 2개의 이량체화 선택성 모듈, 예컨대, C_h3-C_h3 계면에서 유전자 조작 함몰부를 함유하는 둘 모두, 유전자 조작 돌출부를 함유하는 둘 모두, 또는 동일한 하전 아미노산을 함유하는 둘 모두는 이종이량체 Fc 도메인의 형성을 촉진하지 않을 것이다.

[0278] 또한, 정의된 Fc 도메인 단량체를 갖는 Fc 도메인의 형성을 촉진하는 데 사용된 다른 방법은 제한 없이, 이종이량체를 형성하도록 류신 지퍼(zipper)의 단량체 α-헬릭스의 C-말단 융합을 Fc 도메인 단량체 각각에 포함하는 LUZ-Y 접근법(미국 특허 출원 공개 번호 제W02011034605호)뿐 아니라, IgA 및 IgG C_h3 서열의 교차 조작을 각각 포함하는 이종이량체 Fc 도메인 단량체를 갖는 Fc 도메인을 생성하는 가닥-교환 조작된 도메인(SEED) 바디 접근법(Davis et al., *Protein Eng Des Sel.* 23:195-202, 2010)을 포함한다.

IV. 유전자 조작 함몰부 및 유전자 조작 돌출부

[0280] 유전자 조작 함몰부 및 유전자 조작 돌출부(또는 "놉-인투-홀(knob-into-hole)" 전략)는 Carter 및 동료 연구자

들에 의해 기술되었다(Ridgway et al., *Protein Eng.* 9:617-612, 1996; Atwell et al., *J Mol Biol.* 270:26-35, 1997; Merchant et al., *Nat Biotechnol.* 16:677-681, 1998). 놉과 흘의 상호작용은 이종이량체 형성을 용이하게 하되, 놉-농과 흘-흘 상호작용은 입체적 충돌 및 양호한 상호작용의 결실로 인해 동종이량체 형성을 저해한다. "농-인투-흘" 기술은 미국 특허 번호 제5,731,168호에도 개시되어 있다.

[0281]

본 개시에서, 유전자 조작 함몰부 및 유전자 조작 돌출부 본원에 기술된 Fc 작제물의 제조에 사용된다. 유전자 조작 함몰부는 단백질의 원래의 아미노산이 더 작은 측쇄 체적을 갖는 상이한 아미노산으로 대체될 때 생성되는 빈 공간이다. 유전자 조작 돌출부는 단백질의 원래의 아미노산이 더 큰 측쇄 체적을 갖는 상이한 아미노산으로 대체될 때 생성되는 용기이다. 상세하게는, 대체된 아미노산은 Fc 도메인 단량체의 C_h3 항체 불변 도메인에 있고 2개의 Fc 도메인 단량체의 이량체화에 관여한다. 일부 구현예에서, 하나의 C_h3 항체 불변 도메인의 유전자 조작 함몰부는 또 다른 C_h3 항체 불변 도메인의 유전자 조작 돌출부를 수용하도록 생성되어, C_h3 항체 불변 도메인 둘 모두는 2개의 Fc 도메인 단량체의 이량체화를 촉진하거나 용이하게 하는 (상술한) 이량체화 선택성 모듈(예컨대, 이종이량체화 선택성 모듈)로서 작용하게 된다. 다른 구현예에서, 하나의 C_h3 항체 불변 도메인의 유전자 조작 함몰부는 또 다른 C_h3 항체 불변 도메인의 원래의 아미노산을 더 잘 수용하도록 생성된다. 또 다른 구현예에서, 하나의 C_h3 항체 불변 도메인의 유전자 조작 돌출부는 또 다른 C_h3 항체 불변 도메인의 원래의 아미노산과 추가 상호작용을 형성하도록 생성된다.

[0282]

유전자 조작 함몰부는 타이로신 또는 트립토판과 같은 더 큰 측쇄를 함유하는 아미노산을 알라닌, 발린, 또는 트레오닌과 같은 더 작은 측쇄를 함유하는 아미노산으로 치환함으로써 구성될 수 있다. 상세하게는, (상기에 추가로 기술된) 일부 이량체화 선택성 모듈(예컨대, 이종이량체화 선택성 모듈)은 C_h3 항체 불변 도메인에 Y407V 돌연변이와 같은 유전자 조작 함몰부를 함유한다. 이와 유사하게, 유전자 조작 돌출부는 더 작은 측쇄를 함유하는 아미노산을 더 큰 측쇄를 함유하는 아미노산으로 치환함으로써 구성될 수 있다. 상세하게는, (상기에 추가로 기술된) 일부 이량체화 선택성 모듈(예컨대, 이종이량체화 선택성 모듈)은 C_h3 항체 불변 도메인에 T366W 돌연변이와 같은 유전자 조작 돌출부를 함유한다. 본 개시에서, 유전자 조작 함몰부 및 유전자 조작 돌출부는 또한 이종이량체 형성을 강화하기 위해 C_h3 도메인간 이황화 결합 조작과 결합된다. 하나의 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, 유전자 조작 함몰부 Y349C를 함유하는 Fc 도메인 단량체와 유전자 조작 돌출부 S354C를 함유하는 Fc 도메인 단량체는 선택적으로 결합하여 Fc 도메인을 형성할 수 있다. 다른 유전자 조작 함몰부 및 유전자 조작 돌출부, 이황화 결합 조작 또는 구조 계산(혼합 HA-TF)과 함께 제한 없이 표 1에 포함된다.

[0283]

표 1

| 전략 | Fc 도메인 단량체 1의 Db 항체 불변 도메인 | Fc 도메인 단량체 2의 Db 항체 불변 도메인 | 참고 문헌 |
|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--|
| 유전자 조작 항몰부 및 돌출부(“놈-인투-홀”) | Y407I | T366Y | US 8,216,805 |
| | Y407A | T366W | US 8,216,805 |
| | F405A | T394W | US 8,216,805 |
| | Y407T | T366Y | US 8,216,805 |
| | T394S | F405W | US 8,216,805 |
| | T394W:Y407T | T366Y:F405A | US 8,216,805 |
| | T394S:Y407A | T366W:F405W | US 8,216,805 |
| | T366W:T394S | F405W:Y407A | US 8,216,805 |
| 유전자 조작 항몰부 및 돌출부(“놈-인투-홀”), S-S 조작 | T366S:L368A:Y407W:Y349C | T366W:S354C | Zeidler et al., <i>J. Immunol.</i> 163:1246-52, 1999 |
| 혼합 HA-TR | S364H:F405A | Y349T:T394F | WO2006106905 |

[0284]

[0285] 상이한 아미노산 잔기를 갖는 C_h3 항체 불변 도메인의 원래의 아미노산 잔기를 치환하는 것은 원래의 아미노산 잔기를 인코딩하는 핵산을 변경함으로써 달성될 수 있다. 치환될 수 있는 원래의 아미노산 잔기 수의 상한은 계면에서의 충분한 상호작용이 여전히 유지되는 것을 고려하면 C_h3 항체 불변 도메인의 계면에서의 잔기의 총 수이다.

[0286]

V. 정전기 스티어링

[0287]

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

[0288]

본 개시에서, 정전기 스티어링은 Fc 도메인 단량체의 이량체화 및 Fc 작제물의 형성을 조절하는 데 사용된다. 특히, 정전기 스티어링을 사용하는 Fc 도메인 단량체의 이량체화를 조절하기 위하여, C_h3-C_h3 계면을 구성하는 하나 이상의 아미노산 잔기는 양하전 또는 음하전 아미노산 잔기로 치환되어 도입된 특정 하전 아미노산에 따라 상호작용은 유리하거나 불리하게 된다. 일부 구현예에서, 계면의 양하전 아미노산, 예를 들어 라이신, 아르기닌, 또는 히스티дин은 아스파르트산 또는 글루탐산과 같은 음하전 아미노산으로 치환된다. 다른 구현예에서, 계면의 음하전 아미노산은 양하전 아미노산으로 치환된다. 하전 아미노산은 상호작용 C_h3 항체 불변 도메인 중 하나, 또는 둘 다에 도입될 수 있다. 하전 아미노산을 상호작용 C_h3 항체 불변 도메인에 도입함으로써, 하전 아미노산 사이의 상호작용으로 발생한 정전기 스티어링 효과에 의해 조절되는 Fc 도메인 단량체의 이량체를 선택적으로 형성할 수 있는 (상기에서 추가로 기술된) 이량체화 선택성 모듈이 생성된다.

[0289]

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 이중이량체화 또는 동종이량체화를 통해 선택적으로 형성될 수 있다.

[0290]

Fc 도메인 단량체의 이중이량체화

[0291]

Fc 도메인 단량체의 이중이량체화는 제한 없이 표 2A에 포함된 전하 잔기 쌍과 같이 2개의 Fc 도메인 단량체에 상이하지만 양립 가능한 돌연변이를 도입함으로써 촉진될 수 있다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체는 다음의 양하전 및 음하전 아미노산 치환 중 하나를 포함할 수 있다: D356K, D356R, E357K, E357R, K370D, K370E, K392D, K392E, D399K, K409D, K409E, K439D, 및 K439E. 하나의 실시예에서, 양하전 아미노산 치환, 예컨대,

D356K 또는 E357K를 함유하는 Fc 도메인 단량체와 음하전 아미노산 치환, 예컨대, 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.

[0292] 예를 들어, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 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 양호한 형성을 촉진하는 상이한 역전하 돌연변이(이종이량체화 선택성 모듈)(예컨대, 표 2A의 돌연변이 참조)를 함유한다. 도 1 및 도 2에 도시된 바와 같이, 3개의 Fc 도메인(하나의 카복시 말단 "줄기" Fc 도메인 및 2개의 아미노 말단 "가지" Fc 도메인)을 갖는 Fc 작제물에서, 아미노 말단 "가지" Fc 도메인 각각은 이종이량체 Fc 도메인("가지 이종이량체 Fc 도메인"이라고도 불림)(예컨대, 도 1의 Fc 도메인 단량체 106 및 114 또는 Fc 도메인 단량체 112 및 116에 의해 형성된 이종이량체 Fc 도메인; 도 2의 Fc 도메인 단량체 206 및 214 또는 Fc 도메인 단량체 212 및 216에 의해 형성된 이종이량체 Fc 도메인)일 수 있다. 가지 이종이량체 Fc 도메인은 E357K를 함유하는 Fc 도메인 단량체 및 K370D를 함유하는 또 다른 Fc 도메인 단량체에 의해 형성될 수 있다.

[0293]

표 2A

| Fc 도메인 단량체 1의 C _α 3 항체 불변 도메인의 역전하 돌연변이(들) | Fc 도메인 단량체 2의 C _α 3 항체 불변 도메인의 역전하 돌연변이(들) |
|---|---|
| K409D | D399K |
| K409D | D399R |
| K409E | D399K |
| K409E | D399R |
| K392D | D399K |
| K392D | D399R |
| K392E | D399K |
| K392E | D399R |
| K370D | E357K |
| K370D | E357R |
| K370E | E357K |
| K370E | E357R |
| K370D | D356K |
| K370D | D356R |
| K370E | D356K |
| K370E | D356R |
| K409D, K392D | D399K, E356K |
| K370E, K409D, K439E | E356K, E357K, D399K |

[0294]

Fc 도메인 단량체의 동종이량체화

[0295]

Fc 도메인 단량체의 동종이량체화는 동일한 정전기 스티어링 돌연변이(동종이량체화 선택성 모듈)를 Fc 도메인 단량체 둘 다에 대칭적으로 도입함으로써 촉진될 수 있다. 일부 구현예에서, 2개의 Fc 도메인 단량체는

잔기 C₄₃ 도메인 사이의 계면에서 하전된 잔기의 고리 내의 적어도 2개의 위치에 동일한 역전하 돌연변이를 함유하는 동종이량체화 선택성 모듈을 포함한다. 2개의 Fc 도메인 단량체 잔기의 둘 이상의 상보적인 쌍의 두 구성원의 전하를 서로 바꿈으로써, 돌연변이된 Fc 도메인 단량체는 동일한 돌연변이 서열의 Fc 도메인 단량체에 상보적으로 남아있지만, 이들 돌연변이가 없는 Fc 도메인 단량체에 더 낮은 상보성을 갖는다. Fc 도메인 단량체 내에 도입되어 이의 동종이량체화를 촉진할 수 있는 정전기 스티어링 돌연변이는 제한 없이 표 2B 및 2C에 나타낸다. 하나의 구현예에서, Fc 도메인은 이중 역전하 돌연변이(표 2B), 예컨대, K409D/D399K를 각각 포함하는 2개의 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 또 다른 구현예에서, Fc 도메인은 사중 역전하 돌연변이(표 2C), 예컨대, K409D/D399K/K370D/E357K를 각각 포함하는 2개의 Fc 도메인 단량체를 포함한다.

[0297] 예를 들어, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 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(예컨대, 표 2B 및 표 2C의 돌연변이 참조)를 함유한다. 도 1 및 도 2에 도시된 바와 같이, 3개의 Fc 도메인(하나의 카복시 말단 "줄기" Fc 도메인 및 2개의 아미노 말단 "가지" Fc 도메인)을 갖는 Fc 작제물에서, 카복시 말단 "줄기" Fc 도메인은 동종이량체 Fc 도메인("줄기 동종이량체 Fc 도메인"이라고도 불림)(예컨대, 도 1의 Fc 도메인 단량체 104 및 110에 의해 형성된 동종이량체 Fc 도메인; 도 2의 Fc 도메인 단량체 204 및 210에 의해 형성된 동종이량체 Fc 도메인)일 수 있다. 줄기 동종이량체 Fc 도메인은 이중 돌연변이 K409D/D399K를 각각 함유하는 2개의 Fc 도메인 단량체에 의해 형성될 수 있다.

표 2B

| 동종이량체 Fc 도메인의 2개의 Fc 도메인 단량체 각각의 C ₄₃ 항체 불변 도메인의 역전하 돌연변이(들) |
|--|
| K409D/D399K |
| K409D/D399R |
| K409E/D399K |
| K409E/D399R |
| K392D/D399K |
| K392D/D399R |
| K392E/D399K |
| K392E/D399R |
| K370D/B357K |
| K370D/B357R |
| K370E/B357K |
| K370E/B357R |
| K370D/D356K |
| K370D/D356R |
| K370E/D356K |
| K370E/D356R |

[0299]

[0300]

표 2C

| 동종이랑체 Fc 도메인의 2 개의 Fc 도메인 단량체 각각의 C _α 3 항체 불변 도메인의 역전하 돌연변이(들) | 동종이랑체 Fc 도메인의 2 개의 Fc 도메인 단량체 각각의 C _α 3 항체 불변 도메인의 역전하 돌연변이(들) |
|---|---|
| I409D/D399I/I370D/E357I | I392D/D399I/I370D/E357I |
| I409D/D399I/I370D/E357R | I392D/D399I/I370D/E357R |
| I409D/D399I/I370E/E357I | I392D/D399I/I370E/E357I |
| I409D/D399I/I370E/E357R | I392D/D399I/I370E/E357R |
| I409D/D399I/I370D/D356I | I392D/D399I/I370D/D356I |
| I409D/D399I/I370D/D356R | I392D/D399I/I370D/D356R |
| I409D/D399I/I370E/D356I | I392D/D399I/I370E/D356I |
| I409D/D399I/I370E/D356R | I392D/D399I/I370E/D356R |
| I409D/D399R/I370D/E357I | I392D/D399R/I370D/E357I |
| I409D/D399R/I370D/E357R | I392D/D399R/I370D/E357R |
| I409D/D399R/I370E/E357I | I392D/D399R/I370E/E357I |
| I409D/D399R/I370E/E357R | I392D/D399R/I370E/E357R |
| I409D/D399R/I370D/D356I | I392D/D399R/I370D/D356I |
| I409D/D399R/I370D/D356R | I392D/D399R/I370D/D356R |
| I409D/D399R/I370E/D356I | I392D/D399R/I370E/D356I |
| I409D/D399R/I370E/D356R | I392D/D399R/I370E/D356R |
| I409E/D399I/I370D/E357I | I392E/D399I/I370D/E357I |
| I409E/D399I/I370D/E357R | I392E/D399I/I370D/E357R |
| I409E/D399I/I370E/E357I | I392E/D399I/I370E/E357I |
| I409E/D399I/I370E/E357R | I392E/D399I/I370E/E357R |
| I409E/D399I/I370D/D356I | I392E/D399I/I370D/D356I |
| I409E/D399I/I370D/D356R | I392E/D399I/I370D/D356R |
| I409E/D399I/I370E/D356I | I392E/D399I/I370E/D356I |
| I409E/D399I/I370E/D356R | I392E/D399I/I370E/D356R |

[0301]

| 동종이랑체 Fc 도메인의 2 개의 Fc 도메인 단량체 각각의 C _α 3 항체 불변 도메인의 역전하 돌연변이(들) | 동종이랑체 Fc 도메인의 2 개의 Fc 도메인 단량체 각각의 C _α 3 항체 불변 도메인의 역전하 돌연변이(들) |
|---|---|
| I409E/D399R/I370D/E357I | I392E/D399R/I370D/E357I |
| I409E/D399R/I370D/E357R | I392E/D399R/I370D/E357R |
| I409E/D399R/I370E/E357I | I392E/D399R/I370E/E357I |
| I409E/D399R/I370E/E357R | I392E/D399R/I370E/E357R |
| I409E/D399R/I370D/D356I | I392E/D399R/I370D/D356I |
| I409E/D399R/I370D/D356R | I392E/D399R/I370D/D356R |
| I409E/D399R/I370E/D356I | I392E/D399R/I370E/D356I |
| I409E/D399R/I370E/D356R | I392E/D399R/I370E/D356R |

[0302]

[0303]

VI. 링커

[0304]

본 개시에서, 링커는 폴리펩타이드 또는 단백질 도메인 및/또는 결합된 비단백질 모이어티 사이의 결합 또는 연결을 기술하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 링커는 적어도 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 결합 또는 연결이고, 링커는 제1 Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인의 C-말단을 제2 Fc 도메인 단량체의 힌지 도메인의 N-말단에 연결하여, 2개의 Fc 도메인 단량체가 직렬연결로 서로 접합된다. 다른 구현예에서, 링커는 Fc 도메인 단량체와 그에 부착되는 임의의 다른 단백질 도메인 사이의 결합이다. 예를 들어, 링커는 Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인의 C-말단을 일부민-결합 웨타이드의 N-말단에 부착시킬 수 있다.

[0305]

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

[0306]

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

[0307]

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

[0308]

스페이서

[0309]

본 개시에서, 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 링커는 3~200개의 아미노산(예컨대, 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)(예컨대, 3~150개, 3~100개, 3~60개, 3~50개, 3~40개, 3~30개, 3~20개, 3~10개, 3~8개, 3~5개, 4~30개, 5~30개, 6~30개, 8~30개, 10~20개, 10~30개, 12~30개, 14~30개, 20~30개, 15~25개, 15~30개, 18~22개, 및 20~30개의 아미노산)을 포함하는 아미노산 스페이서일 수 있다. 일부 구현예에서, 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 링커는 적어도 12개의 아미노산, 예컨대 12~200개의 아미노산(예컨대, 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)(예컨대, 3~150개, 3~100개, 3~60개, 3~50개, 3~40개, 3~30개, 3~20개, 3~10개, 3~8개, 3~5개, 4~30개, 5~30개, 6~30개, 8~30개, 10~20개, 10~30개, 12~30개, 14~30개, 20~30개, 15~25개, 15~30개, 18~22개, 및 20~30개의 아미노산)을 함유하는 아미노산 스페이서이다. 일부 구현예에서, 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 링커는 12~30개의 아미노산(예컨대, 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 웨타이드 스페이서는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, 글라이신 및 세린과 같은 가요성 아미노산 잔기를 함유하는 웨타이드 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), GGSGGGGS(서열 번호 10), 및 GGSGGGSGGGGS(서열 번호 11)의 모티프를 포함하는 3 내지 12개의 아미노산을 함유할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 스페이서는 GGSG(서열 번호 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 구현 예에서, 스페이서는 GGGGS(서열번호 1), 예컨대, GGGGSGGGS(서열번호 16) 또는 GGGGSGGGSGGGS(서열번호 17)의 모티프를 함유할 수 있다. 특정 구현 예에서, 스페이서는 SGGSGGSGGGSGGGSGGG(서열번호 18)이다.

[0310] 일부 구현 예에서, 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 스페이서는 클라이신 잔기만, 예컨대, 적어도 4개의 클라이신 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 클라이신 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, 190~200개 또는 20개의 클라이신 잔기)를 함유한다. 특정 구현 예에서, 스페이서는 4~30개의 클라이신 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 클라이신 잔기)를 갖는다. 일부 구현 예에서, 클라이신 잔기만 함유하는 스페이서는 당화(예컨대, 0-연결 당화(0-linked glycosylation), 0-당화라고도 지칭됨)되지 않을 수 있거나 예컨대, 하나 이상의 세린 잔기(예컨대, SGGSGGSGGGSGGGSGGG(서열번호 18))를 함유하는 스페이서와 비교하여 당화의 감소된 수준(예컨대, 0-당화의 감소된 수준)(예컨대, 자일로스, 만노스, 시알산, 푸코스(Fuc), 및/또는 갈락토스(Ga1)(예컨대, 자일로스)와 같은 글리칸을 갖는 0-당화의 감소된 수준)을 가질 수 있다(실시예 4 참조).

[0311] 일부 구현 예에서, 클라이신 잔기만 함유하는 스페이서는 0-당화(예컨대, 0-자일로실화)되지 않을 수 있거나 예컨대, 하나 이상의 세린 잔기(예컨대, SGGSGGSGGGSGGGSGGG(서열번호 18))를 함유하는 스페이서와 비교하여 0-당화의 감소된 수준(예컨대, 0-자일로실화의 감소된 수준)을 가질 수 있다.

[0312] 일부 구현 예에서, 클라이신 잔기만 함유하는 스페이서는 단백질 분해를 겪지 않을 수 있거나 예컨대, 하나 이상의 세린 잔기(예컨대, SGGSGGSGGGSGGGSGGG(서열번호 18))를 함유하는 스페이서와 비교하여 단백질 분해율이 감소될 수 있다(실시예 4 참조).

[0313] 특정 구현 예에서, 스페이서는 GGGG(서열 번호 19), 예컨대, GGGGGGGG(서열 번호 20), GGGGGGGGGGGGG(서열 번호 21), GGGGGGGGGGGGGGG(서열 번호 22), 또는 GGGGGGGGGGGGGGGGG(서열 번호 23)의 모티프를 함유할 수 있다. 특정 구현 예에서, 스페이서는 GGGGG(서열번호 24), 예컨대, GGGGGGGGG(서열번호 25), 또는 GGGGGGGGGGGGGGG(서열번호 26)의 모티프를 함유할 수 있다. 특정 구현 예에서, 스페이서는 GGGGGGGGGGGGGGGGG(서열 번호 27)이다.

[0314] 다른 구현 예에서, 스페이서는 클라이신 및 세린 외의 아미노산, 예컨대, GENLYFQSGG(서열번호 28), SACYCELS(서열번호 29), RSIAT(서열번호 30), RPACIPNDLKQKVMNH(서열번호 31), GGSAGGSGSGSSGGSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG(서열번호 32), AAANSSIDLISVPVDSR(서열번호 33), 또는 GGSAGGSEGGGSEGGSEGGSEGGSEGGSGGGS(서열번호 34)를 또한 함유할 수 있다.

[0315] 본 개시의 특정 구현 예에서, 12-아미노산 또는 20-아미노산 웹타이드 스페이서는 2개의 Fc 도메인 단량체를 직렬연결로 연결하는 데 사용되고(예컨대, 도1의 폴리웹타이드 102 및 108; 도 2의 폴리웹타이드 202 및 208), 12-아미노산 및 20-아미노산 웹타이드 스페이서는 각각 서열 GGGSGGGSGGG(서열 번호 35) 및 SGGSAGGSGGGSGGGSGGG(서열 번호 18)로 이루어진다. 다른 구현 예에서, 서열 GGSAGGSGGGSGGGSGGS(서열 번호 36)로 이루어진 18-아미노산 웹타이드 스페이서가 사용될 수 있다.

[0316] 일부 구현 예에서, 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 스페이서는 상술한 서열번호 1~36 중 어느 하나의 서열에 적어도 75% 동일한(예컨대, 75%, 77%, 79%, 81%, 83%, 85%, 87%, 89%, 91%, 93%, 95%, 97%, 99%, 또는 99.5% 동일한) 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다. 특정 구현 예에서, 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 스페이서는 서열번호 17, 18, 26 및 27 중 어느 하나의 서열에 적어도 80% 동일한(예컨대, 적어도 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95%, 97%, 99%, 또는 99.5% 동일한) 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다. 특정 구현 예에서, 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 스페이서는 서열번호 18 또는 27의 서열에 적어도 80% 동일한(예컨대, 적어도 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95%, 97%, 99%, 또는 99.5%) 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다. 특정 구현 예에서, 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 스페이서는 상술한 서열번호 1~36의 어느 하나의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0317]

VII. 혈청 단백질-결합 웨타이드

[0318]

혈청 단백질 웨타이드에 결합하는 것은 단백질 의약품의 약동학을 개선할 수 있고, 특히 본원에 기술된 Fc 작제물 혈청 단백질-결합 웨타이드와 융합될 수 있다.

[0319]

하나의 실시예로서, 본원에 기술된 방법 및 조성물에서 사용될 수 있는 알부민-결합 웨타이드는 당업계에 일반적으로 알려져 있다. 하나의 구현예에서, 알부민 결합 웨타이드는 서열 DICLPRWGCLW(서열번호 37)을 포함한다. 일부 구현예에서, 알부민 결합 웨타이드는 서열번호 37의 서열에 적어도 80% 동일한(예컨대, 80%, 90%, 또는 100% 동일한) 서열을 갖는다.

[0320]

본 개시에서, 알부민-결합 웨타이드는 작제물의 특정 폴리웨타이드의 N-말단 또는 C-말단에 부착될 수 있다. 하나의 구현예에서, 알부민-결합 웨타이드는 작제물 1~4(도 1 및 2)의 하나 이상의 폴리웨타이드의 C-말단에 부착될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 알부민-결합 웨타이드는 작제물 1~4(예컨대, 도 1의 폴리웨타이드 102 및 108과 도 2의 폴리웨타이드 202 및 208)에 직렬연결로 연결된 2개의 Fc 도메인 단량체를 인코딩하는 폴리웨타이드의 C-말단에 융합될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 알부민-결합 웨타이드는 직렬연결로 연결된 2개의 Fc 도메인 단량체를 인코딩하는 폴리웨타이드의 제2 Fc 도메인 단량체에 접합되는 Fc 도메인 단량체의 C-말단(예컨대, 도 1의 폴리웨타이드 114 및 116과 도 2의 폴리웨타이드 214 및 216)에 부착될 수 있다. 알부민-결합 웨타이드는 Fc 작제물에 유전자가 융합될 수 있거나 또는 Fc 작제물에 화학적 수단, 예컨대, 화학적 컨쥬게이션을 통해 부착될 수 있다. 원하는 경우, 스페이서는 Fc 작제물과 알부민-결합 웨타이드 사이에 삽입될 수 있다. 이론에 구속되지 않지만, 본 개시의 Fc 작제물의 알부민-결합 웨타이드를 포함시켜 혈청 알부민에 대한 이의 결합을 통해 치료 단백질을 오랫동안 유지할 수 있음이 기대된다.

[0321]

VIII. Fc 작제물

[0322]

일반적으로, 본 개시는 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)을 특징으로 한다. 이들은 Fc 수용체, 예컨대, Fc_YRIIIa에 대한 단일 야생형 Fc 도메인보다 더 큰 결합 친화도 및/또는 결합 능을 가질 수 있다. 본 개시는 2개의 상호작용 C_H3 항체 불변 도메인의 계면에서 아미노산 조작 방법을 개시하여, Fc 도메인의 2개의 Fc 도메인 단량체는 서로 선택적으로 이량체를 형성함으로써, 원치 않는 다량체 또는 응집의 형성을 방지한다. Fc 작제물은 Fc 도메인을 형성하는 Fc 도메인 단량체의 각각의 쌍으로 짹수의 Fc 도메인 단량체를 포함한다. Fc 작제물은 2개의 Fc 도메인 단량체의 이량체로 형성된 하나의 작용성 Fc 도메인을 최소한으로 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물은 항원-인식 영역, 예컨대 가변 도메인(예컨대, V_H, V_L, 초가변 영역(HVR)) 또는 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물은 항원 인식 영역, 예컨대, 가변 도메인(예컨대, V_H, V_L, HVR) 또는 CDR을 포함한다.

[0323]

3개의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물은 4개의 폴리웨타이드로 형성할 수 있다(도 1 및 2). 제1 및 제2 폴리웨타이드(예컨대, 도 1의 폴리웨타이드 102 및 108; 도 2의 폴리웨타이드 202 및 208)는 제3 및 제4 폴리웨타이드(예컨대, 도 1의 폴리웨타이드 114 및 116; 도 2의 폴리웨타이드 214 및 216)와 동일하거나 상이할 수 있다. 도 1에서, 제1 및 제2 폴리웨타이드 둘 다는 링커를 통해 직렬연결로 연결된 2개의 Fc 도메인 단량체(예컨대, Fc 도메인 단량체 104, 106, 110 및 112)를 인코딩하되, 하나의 Fc 도메인 단량체는 C_H3 항체 불변 도메인의 하전 아미노산 치환을 함유하는 반면, 다른 Fc 도메인 단량체는 C_H3 항체 불변 도메인의 돌출부(예컨대, Fc 도메인 단량체 106 및 112)를 함유한다. 제3 및 제4 폴리웨타이드 둘 다는 핵몰부를 갖는 Fc 도메인 단량체(예컨대, Fc 도메인 단량체 114 및 116)를 인코딩한다. 줄기 동종이량체 Fc 도메인은 각각 동일한 역전하 돌연변이를 그의 C_H3 항체 불변 도메인에 함유하는(예컨대, Fc 도메인 단량체 104와 110 각각이 D399K 및 K409D를 함유하는) Fc 도메인 단량체 104와 110을 결합함으로써 형성될 수 있다. 제1 가지 이종이량체 Fc 도메인은 (예컨대, Fc 도메인 단량체 106은 유전자 조작 돌출부 S354C 및 T366W를 함유하고, Fc 도메인 단량체 114는 유전자 조작 핵몰부 Y349C, T366S, L368A, 및 Y409V를 함유하는) Fc 도메인 단량체 106과 114를 결합함으로써 형성될 수 있다. 제2 이종이량체 Fc 도메인은 (예컨대, Fc 도메인 단량체 112는 유전자 조작 돌출부 S354C 및 T366W를 함유하고, Fc 도메인 단량체 116은 유전자 조작 핵몰부 Y349C, T366S, L368A, 및 Y409V를 함유하는) Fc 도메인 단량체 112와 116을 결합함으로써 형성될 수 있다.

[0324]

도 2에서, 제1 및 제2 폴리웨타이드 둘 다는 링커를 통해 직렬연결로 연결된 2개의 Fc 도메인 단량체(예컨대, Fc 도메인 단량체 204, 206, 210 및 212)를 인코딩하되, 하나의 Fc 도메인 단량체는 C_H3 항체 불변 도메인의 하전 아미노산 치환(예컨대, Fc 도메인 단량체 204 및 210)을 함유하는 반면, 다른 Fc 도메인 단량체는 C_H3 항체

불변 도메인의 돌출부(예컨대, Fc 도메인 단량체 206 및 212)를 함유한다. 제3 및 제4 폴리펩타이드 둘 다는 함몰부 및 하전 아미노산 치환을 갖는 Fc 도메인 단량체(예컨대, Fc 도메인 단량체 214 및 216)를 인코딩한다. 줄기 동종이량체 Fc 도메인은 각각 동일한 역전하 돌연변이를 그의 C₄₃ 항체 불변 도메인에 함유하는(예컨대, Fc 도메인 단량체 204와 210 각각이 D399K 및 K409D를 함유하는) Fc 도메인 단량체 204와 210을 결합함으로써 형성될 수 있다. 제1 가지 이종이량체 Fc 도메인은 (예컨대, Fc 도메인 단량체 206은 유전자 조작 돌출부 S354C 및 T366W 및 역전하 돌연변이 E357K를 함유하고, Fc 도메인 단량체 214는 유전자 조작 함몰부 Y349C, T366S, L368A, 및 Y409V 및 역전하 돌연변이 K370D를 함유하는) Fc 도메인 단량체 206과 214를 결합함으로써 형성될 수 있다. 제2 이종이량체 Fc 도메인은 (예컨대, Fc 도메인 단량체 212는 유전자 조작 돌출부 S354C 및 T366W 및 역전하 돌연변이 E357K를 함유하고, Fc 도메인 단량체 216은 유전자 조작 함몰부 Y349C, T366S, L368A, 및 Y409V 및 역전하 돌연변이 K370D를 함유하는) Fc 도메인 단량체 212와 216을 결합함으로써 형성될 수 있다.

[0325]

추가 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.

[0326]

일부 구현예에서, a) 식 A-L-B를 갖는 제1 폴리펩타이드(i) A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고; ii) L은 링커이며, iii) B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함함); b) 식 A'-L'-B'를 갖는 제2 폴리펩타이드(i) A'는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하고, ii) L'는 링커이며, iii) B'는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함함); c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩타이드; 및 d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩타이드를 포함하되, A와 A'는 결합하여 제1 Fc 도메인을 형성하고, B 및 상기 제5 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제2 Fc 도메인을 형성하며, B'와 상기 제6 Fc 도메인 단량체는 결합하여 제3 Fc 도메인을 형성하는 Fc 작제물에서, Fc 작제물의 Fc 도메인 단량체내로 혼입될 수 있는 일부 아미노산 돌연변이의 예가 표 3A-3D에 나타나 있다. 일부 구현예에서, Fc 작제물의 제1, 제2, 제3, 및 제4 폴리펩타이드 각각은 C-말단 라이신이 결여된다. 일부 구현예에서, Fc 작제물의 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리펩타이드 각각에서 N-말단 Asp는 Gln으로 돌연변이된다. 일부 구현예에서, L과 L' 각각은 서열 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG(서열번호 27)을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어진다.

[0327]

표 3A

| Fc 도메인 단량체 | 아미노산 돌연변이 (각각의 열은 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물의 돌연변이의 세트를 나타낸다) | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|---|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 유전자 조작 돌출부 | | T366W | | T366W | | T366W | | T366W | | T366W | | T366W | | T366W | |
| A 및 A' | 역전하 돌연변이(들) | | E357K | E357B | E357K | E357K | E357B | E357B | E357K | E357B | E357K | E357B | E357K | E357B | E357K | E357B |
| | GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (서열번호 27) | | | | | | | | | | | | | | | |
| L 및 L' | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 역전하 돌연변이(들) | | D399X | D399K | D399B | D399X | D399B | D399K | D399B | D399K | D399X | D399B | D399K | D399B | D399K | D399B |
| B 및 B' | 유전자 조작 돌출부 | | I409D | I409D | I409D | I409B | I409D | I409B | I409E | I409E | I409D | I409D | I409B | I409D | I409B | I409E |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 제 5 및 제 6 Fc 도메인 단량체 | 유전자 조작 함몰부 | | Y349C |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fc 도메인 단량체 | 역전하 돌연변이(들) | | T366S |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| [0328] | L368A | | L368A |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Y407V | | Y407V |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |

[0329]

표 3B

| Fc 도메인 단량체 | 아미노산 돌연변이 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | (각각의 열은 3 개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물의 돌연변이의 세트를 나타낸다) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A 및 A' | 유전자 조작 돌출부 | S354C T365W | |
| | 역전하 돌연변이(들) | I370D | I370E |
| I 및 I' | GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (서열번호 27) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B 및 B' | 역전하 돌연변이(들) | D399K I409D | D399E I409D | D399R I409D | D399K I409E | D399R I409E | D399K I409E | D399R I409E | D399K I409D | D399R I409D | D399K I409D | D399R I409D | D399K I409E | D399R I409E | D399K I409D | D399R I409D | D399K I409E | D399R I409E |
| 제 5 및 제 6 Fc 도메인 단량체 | 유전자 조작 합물부 | Y349C T366S | |
| | 역전하 돌연변이(들) | I368A Y407V |
| | 유전자 조작 돌연변이(들) | E357K E357B | |

[0330]

표 3C

| Fc 도메인 단량체 | 아미노산 돌연변이 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | (각각의 열은 3 개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물의 돌연변이의 세트를 나타낸다) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A 및 A' | 유전자 조작 합물부 | Y349C T366S | |
| | 역전하 돌연변이(들) | I368A Y407V | |
| I 및 I' | GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (서열번호 27) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B 및 B' | 역전하 돌연변이(들) | D399K I409D | D399E I409D | D399R I409D | D399K I409E | D399R I409E | D399K I409E | D399R I409E | D399K I409D | D399R I409D | D399K I409D | D399R I409D | D399K I409E | D399R I409E | D399K I409D | D399R I409D | D399K I409E | D399R I409E |
| 제 5 및 제 6 Fc 도메인 단량체 | 유전자 조작 돌출부 | S354C T366W | |
| | 역전하 돌연변이(들) | I370D | I370E |
| | 유전자 조작 돌연변이(들) | E357K E357B | |

[0333]

표 3D

| Fc 도메인 단량체 | 아미노산 돌연변이 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | (각각의 열은 3 개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물의 돌연변이의 세트를 나타낸다) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A 및 A' | 유전자 조작 합물부 | Y349C T366S | |
| | 역전하 돌연변이(들) | I368A Y407V | |
| I 및 I' | GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (서열번호 27) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B 및 B' | 역전하 돌연변이(들) | D399K I409D | D399E I409D | D399R I409D | D399K I409E | D399R I409E | D399K I409E | D399R I409E | D399K I409D | D399R I409D | D399K I409D | D399R I409D | D399K I409E | D399R I409E | D399K I409D | D399R I409D | D399K I409E | D399R I409E |
| 제 5 및 제 6 Fc 도메인 단량체 | 유전자 조작 돌출부 | S354C T366W | |
| | 역전하 돌연변이(들) | E357K E357B | |
| | 유전자 조작 돌연변이(들) | Y349C T366S | |

[0334]

일부 구현예에서, Fc 작제물은 3개의 폴리펩타이드로 형성된 2개의 Fc 도메인을 함유한다. 제1 폴리펩타이드는 링커(예컨대, 글라이신 스페이서; 서열번호 26 및 27)를 통해 접합된 직렬연결로 접합된 2개의 Fc 도메인 단량체를 함유하고, 제2 및 제3 폴리펩타이드는 하나의 Fc 도메인 단량체를 함유한다. 제2 및 제3 폴리펩타이드는

동일한 폴리펩타이드일 수 있거나 상이한 폴리펩타이드일 수 있다. 도 13은 이러한 Fc 작제물의 실시예를 도시한다. 제1 폴리펩타이드(1302)는 링커(예컨대, 글라이신 스페이서; 서열번호 26 및 27)를 통해 직렬연결로 접합된 2개의 Fc 도메인 단량체(1304 및 1306)를 함유한다. Fc 도메인 단량체 1304 및 1306 둘 다 C_H3 항체 불변 도메인에 유전자 조작 돌출부를 함유한다. 제2 및 제3 폴리펩타이드(1308 및 1310)는 C_H3 항체 불변 도메인에 유전자 조작 돌출부를 갖는 하나의 Fc 도메인 단량체를 각각 함유한다. 제1 폴리펩타이드의 Fc 도메인 단량체(1304) 중 하나는 제2 폴리펩타이드를 갖는 제1 이종이량체 Fc 도메인(1308)을 형성하는 반면, 제1 폴리펩타이드의 다른 Fc 도메인 단량체(1306)는 제3 폴리펩타이드를 갖는 제2 이종이량체 Fc 도메인(1310)을 형성한다. 제2 및 제3 폴리펩타이드는 서로 부착되거나 연결되지 않는다. 돌출부-유전자 조작 돌출부 C_H3-C_H3 계면은 Fc 도메인 단량체의 이종이량체의 형성을 용이하게 하고 원치 않는 다량체의 비제어 형성을 방지한다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체 각각은 이종이량체화를 촉진하기 위해 역전하 돌연변이를 더 함유할 수 있다. 예를 들어, 유전자 조작 돌출부 및 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 갖는 Fc 도메인 단량체 1304는 유전자 조작 돌출부 및 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체 1308을 갖는 이종이량체 Fc 도메인을 양호하게 형성할 수 있다.

[0336]

또 다른 구현예에서, Fc 작제물은 6개의 폴리펩타이드로 형성되는 5개의 Fc 도메인을 함유할 수 있다. 2개의 실시예가 도 14 및 도 15에 도시된다. 이들 도시된 Fc 작제물은 6개의 폴리펩타이드로 구성되고, 폴리펩타이드 중 4개는 동일한 핵산으로 인코딩될 수 있고, 나머지 2개의 폴리펩타이드도 또한 동일한 핵산으로 인코딩될 수 있다. 그 결과, 이들 Fc 작제물은 적합한 숙주 세포의 2개의 핵산의 발현에 의해 제조될 수 있다.

[0337]

도 14는 6개의 폴리펩타이드로 형성된 5개의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물의 도해이다. 제1 및 제2 폴리펩타이드(1402 및 1410)는 링커(예컨대, 글라이신 스페이서; 서열번호 26 및 27)를 통해 직렬로 접합된 3개의 Fc 도메인 단량체(각각 1404, 1406, 1408, 및 1412, 1414, 1416)를 각각 함유한다. 상세하게는, 폴리펩타이드 1402 또는 1410에서, 제1 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(1404 또는 1412)는 제3 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(1408 또는 1416)에 연결된 야생형 서열과 상이한 하전 아미노산을 C_H3-C_H3 계면(1406 또는 1414)에 함유하는 제2 Fc 도메인 단량체에 연결된다. Fc 도메인 단량체 1406 및 1414는 동종이량체 Fc 도메인의 형성을 촉진하는 동일한 역전하 돌연변이(예컨대, D399K/K409D)를 각각 함유할 수 있다. 제3 내지 제6 폴리펩타이드(1418, 1420, 1422 및 1424)는 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체를 각각 함유하고 Fc 도메인 단량체 1404, 1408, 1412 및 1416 각각과 이종이량체 Fc 도메인을 각각 형성한다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체 1404, 1408, 1412, 1416, 1418, 1420, 1422 및 1424 각각은 이종이량체화를 촉진하기 위해 역전하 돌연변이를 더 함유할 수 있다. 예를 들어, 유전자 조작 돌출부 및 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 갖는 Fc 도메인 단량체 1408은 유전자 조작 돌출부 및 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체 1420을 갖는 이종이량체 Fc 도메인을 양호하게 형성할 수 있다.

[0338]

도 15는 6개의 폴리펩타이드로 형성된 5개의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물의 도해이다. 제1 및 제2 폴리펩타이드(1502 및 1510)는 링커(예컨대, 글라이신 스페이서; 서열번호 26 및 27)를 통해 직렬로 접합된 3개의 Fc 도메인 단량체(각각 1504, 1506, 1508, 및 1512, 1514, 1516)를 각각 함유한다. 상세하게는, 폴리펩타이드 1502 또는 1510에서, 제1 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(1504 또는 1512)는 야생형 서열과 상이한 하전 아미노산을 C_H3-C_H3 계면(1508 또는 1516)에 함유하는 제3 Fc 도메인 단량체에 연결된 제2 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(1506 또는 1514)에 연결된다. Fc 도메인 단량체 1508 및 1516은 동종이량체 Fc 도메인의 형성을 촉진하는 동일한 역전하 돌연변이(예컨대, D399K/K409D)를 각각 함유할 수 있다. 제3 내지 제6 폴리펩타이드(1518, 1520, 1522 및 1524)는 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체를 각각 함유하고 Fc 도메인 단량체 1504, 1506, 1512 및 1516 각각과 이종이량체 Fc 도메인을 각각 형성한다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체 1504, 1506, 1512, 1514, 1518, 1520, 1522 및 1524 각각은 이종이량체화를 촉진하기 위해 역전하 돌연변이를 더 함유할 수 있다. 예를 들어, 유전자 조작 돌출부 및 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 갖는 Fc 도메인 단량체 1504는 유전자 조작 돌출부 및 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체 1518을 갖는 이종이량체 Fc 도메인을 양호하게 형성할 수 있다.

[0339]

도 16은 6개의 폴리펩타이드로 형성된 5개의 Fc 도메인을 함유하는 또 다른 Fc 작제물의 도해이다. 제1 및 제2 폴리펩타이드(1602 및 1610)는 링커(예컨대, 글라이신 스페이서; 서열번호 26 및 27)를 통해 직렬로 접합된 3개의 Fc 도메인 단량체(각각 1604, 1606, 1608, 및 1612, 1614, 1616)를 각각 함유한다. 상세하게는, 폴리펩타이드 1602 또는 1610에서, 야생형 서열과 상이한 하전 아미노산을 C_H3-C_H3 계면(1604 또는 1612)에 함유하는 제1 Fc 도메인 단량체는 제3 돌출부-함유 Fc 도메인 단량체(1608 또는 1616)에 연결된 제2 돌출부-함유 Fc 도메인

단량체(1606 또는 1614)에 연결된다. Fc 도메인 단량체 1604 및 1612는 동종이량체 Fc 도메인의 형성을 촉진하는 동일한 역전하 돌연변이(예컨대, D399K/K409D)를 각각 함유할 수 있다. 제3 내지 제6 폴리펩타이드(1618, 1620, 1622, 및 1624)는 함몰부-함유 Fc 도메인 단량체를 각각 함유하고 Fc 도메인 단량체 1606, 1608, 1614 및 1616 각각과 이종이량체 Fc 도메인을 각각 형성한다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체 1606, 1608, 1614, 1616, 1618, 1620, 1622, 및 1624 각각은 이종이량체화를 촉진하기 위해 역전하 돌연변이를 더 함유할 수 있다. 예를 들어, 유전자 조작 돌출부 및 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 갖는 Fc 도메인 단량체 1608은 유전자 조작 함몰부 및 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체 1620을 갖는 이종이량체 Fc 도메인을 양호하게 형성할 수 있다.

[0340]

또 다른 구현예에서, 둘 이상의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물은 동일한 1차 서열을 갖는 2개의 폴리펩타이드로 형성될 수 있다. 이러한 작제물은 숙주 세포에서의 단일 폴리펩타이드 서열의 발현으로 형성될 수 있다. 하나의 실시예가 도 17에 도시된다. 본 실시예에서, 단일 핵산은 3개의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물을 인코딩하는 데 충분하다. 동일한 폴리펩타이드의 부분인 2개의 Fc 도메인 단량체는 충분한 길이 및 가요성의 가요성 링커의 포함으로 이종이량체 Fc 도메인을 형성 가능하게 한다. 이런 동일한 폴리펩타이드는 또한 가요성 링커(예컨대, 글라이신 스페이서; 서열번호 26 및 27)를 통해 접합된 제3 Fc 도메인 단량체를 함유한다. 이러한 제3 Fc 도메인 단량체(1708)는 동종이량체 Fc 도메인을 형성하고 도 17에 도시된 Y-형 Fc 작제물을 제조하기 위해 또 다른 Fc 도메인 단량체(1716)와 접합할 수 있다. Fc 도메인의 형성은 이량체화 선택성 모듈의 사용으로 제어될 수 있고, 또한 이는 도 17에 도시되어 있다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체 1704, 1706, 1712, 및 1714 각각은 이종이량체화를 촉진하기 위해 역전하 돌연변이를 더 함유할 수 있다. 예를 들어, 유전자 조작 돌출부 및 역전하 돌연변이(예컨대, E357K)를 갖는 Fc 도메인 단량체 1704는 유전자 조작 함몰부 및 역전하 돌연변이(예컨대, K370D)를 갖는 Fc 도메인 단량체 1706을 갖는 이종이량체 Fc 도메인을 양호하게 형성할 수 있다.

[0341]

일부 구현예에서, Fc 작제물(예컨대, 도 1의 Fc 작제물 1~3; 도 2의 Fc 작제물 4)의 하나 이상의 Fc 폴리펩타이드는 C-말단 라이신 잔기가 결여된다. 일부 구현예에서, Fc 작제물의 모든 Fc 폴리펩타이드는 C-말단 라이신의 부재는 Fc 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)의 집단, 예컨대, 실질적으로 동질인 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물의 집단(실시예 8 참조)의 동질성을 개선시킬 수 있다. 하나의 실시예에서, 서열번호 43 및 44의 어느 하나의 서열(실시예 1, 표 6 참조)을 갖는 Fc 폴리펩타이드의 C-말단 라이신 잔기는 C-말단 라이신 잔기를 함유하지 않는 상응하는 Fc 폴리펩타이드를 생성하기 위해 제거될 수 있다.

[0342]

일부 구현예에서, Fc 작제물의 하나 이상의 Fc 폴리펩타이드는 S267E/L328F 돌연변이를 포함한다. 일부 경우에서, Fc 작제물은 Fc 작제물 4이고 작제물은 S267E/L328F 돌연변이를 포함한다. 이 돌연변이는 Fc γRIIb에 대한 Fc 작제물의 결합 친화도를 증가시킨다.

[0343]

일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물의 Fc 도메인 단량체(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)는 야생형 Fc 도메인 단량체(예컨대, 서열번호 42)의 서열에 적어도 95% 동일한(예컨대, 적어도 97%, 99%, 또는 99.5% 동일한) 서열을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물의 Fc 도메인 단량체(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)는 서열번호 44, 46, 48 및 50~53 중 어느 하나의 서열(실시예 1, 표 4 및 5 참조)에 적어도 95% 동일한(예컨대, 적어도 97%, 99%, 또는 99.5% 동일한) 서열을 가질 수 있다. 특정 구현예에서, Fc 작제물의 Fc 도메인 단량체는 서열번호 48, 52, 및 53의 서열에 적어도 95% 동일한(예컨대, 적어도 97%, 99%, 또는 99.5% 동일한) 서열을 가질 수 있다.

[0344]

일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물의 2개의 Fc 도메인 단량체를 갖는 폴리펩타이드(예컨대, 도 1의 폴리펩타이드 102 및 108; 도 2의 폴리펩타이드 202 및 208)는 서열번호 43, 45, 47, 및 49 중 어느 하나의 서열(실시예 1, 표 6 참조)에 적어도 95% 동일한(예컨대, 적어도 97%, 99%, 또는 99.5% 동일한) 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어질 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물의 2개의 Fc 도메인 단량체를 갖는 폴리펩타이드는 서열번호 49의 서열에 적어도 95% 동일한(예컨대, 적어도 97%, 99%, 또는 99.5% 동일한) 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어질 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물의 2개의 Fc 도메인 단량체(예컨대, 도 1의 폴리펩타이드 102 및 108; 도 2의 폴리펩타이드 202 및 208)를 갖는 폴리펩타이드의 아미노산 돌연변이는 Fc 도메인 단량체(예컨대, 도 1의 Fc 도메인 단량체 104, 106, 110, 및 112; 도 2의 Fc 도메인 단량체 204, 206, 210, 및 212)에서만 발생하고 스페이서에서는 발생하지 않는다. 예를 들어, 표 8에 나타낸 폴리펩타이드에서, 추가 아미노산 돌연변이 서열번호 50~53의 서열을 포함하거나, 이로써 이루어지거나, 이로써 본질적으로 이루어지는 Fc 도메인 단량체에서 이

루어질 수 있는 반면, 서열번호 18, 26 및 27의 서열을 갖는 스페이서는 변하지 않는다.

[0345]

일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물의 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리펩타이드(예컨대, 도 1의 폴리펩타이드 102, 108, 114, 및 116; 도 2의 202, 208, 214, 및 216) 중 하나 이상의 N-말단 Asp는 Gln으로 돌연변이될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물의 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리펩타이드 각각에서 N-말단 Asp는 Gln으로 돌연변이된다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)은 Gln으로 돌연변이 되는 N-말단 Asp를 갖는 Fc 도메인 단량체를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물의 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리펩타이드 중 하나 이상에서 Gln으로의 N-말단 Asp의 돌연변이는 Fc 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)의 집단, 예컨대, 실질적으로 동질인 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물의 집단의 동질성을 개선시킬 수 있다. 예를 들어, 표 4는 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물에서 Gln으로 돌연변이된 N-말단 Asp를 갖는 제1, 제2, 제3, 및 제4 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 나타낸다.

[0346]

표 4

| 모든 4개의 폴리펩타이드에서 Gln으로 돌연변이된 N-말단 Asp를 갖는 Fc 작제물 | |
|---|--|
| 제 1 및 제 2 폴리펩타이드 | QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFMWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPREPQVYTLPPCRDELTQNQVSLWCL VKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNWFSCSVMHEALHNHYTQESLS LSPGKSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGIKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFMWYVDGVEVHNAKTKPREE DPEVKFMWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQP REPQVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRW QOGNWFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK(서열번호 54) |
| 제 3 및 제 4 폴리펩타이드 | QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFMWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPREPQVYTLPPCRDELTQNQVSLSCA VKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNWFSCSVMHEALHNHYTQESLS LSPGK(서열번호 55) |
| 모든 4개의 폴리펩타이드에서 Gln으로 돌연변이된 N-말단 Asp를 갖는 Fc 작제물 | |
| 제 1 및 제 2 폴리펩타이드 | QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFMWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPREPQVYTLPPCRDELTQNQVSLWCL VKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNWFSCSVMHEALHNHYTQESLS LSPGKSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGIKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFMWYVDGVEVHNAKTKPREE DPEVKFMWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQP REPQVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRW QOGNWFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK(서열번호 56) |
| 제 3 및 제 4 폴리펩타이드 | QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFMWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPREPQVYTLPPCRDELTQNQVSLSCA VKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNWFSCSVMHEALHNHYTQESLS LSPGK(서열번호 57) |

[0347]

| 모든 4개의 폴리펩타이드에서 Gln으로 돌연변이된 N-말단 Asp를 갖는 Fc 작제물 | |
|---|--|
| 제 1 및 제 2 폴리펩타이드 | QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFMWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPREPVYTLPPCRDKLTKNQWSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNWFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFMWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPREPVYTLPPCRDKLTKNQWSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNWFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPG(서열번호 58) |
| 제 3 및 제 4 폴리펩타이드 | QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFMWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPREPVYTLPPCRDKLTKNQWSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNWFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPG(서열번호 59) |
| 모든 4개의 폴리펩타이드에서 Gln으로 돌연변이된 N-말단 Asp를 갖는 Fc 작제물 | |
| 제 1 및 제 2 폴리펩타이드 | QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFMWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPREPVYTLPPCRDKLTKNQWSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNWFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFMWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPREPVYTLPPCRDKLTKNQWSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNWFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPG(서열번호 60) |
| 제 3 및 제 4 폴리펩타이드 | QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFMWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPREPVYTLPPCRDKLTKNQWSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNWFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPG(서열번호 59) |

[0348]

IX. 숙주 세포 및 단백질 생산

[0349]

본 개시에서, 숙주 세포는 본원에 기재된 폴리펩타이드 및 작제물을 그들의 상응하는 핵산으로부터 발현하는 데 필요한 필수 세포 성분, 예컨대, 세포 소기관을 포함하는 비히클을 지칭한다. 핵산은 당업계에 공지된 종래 기술(형질전환, 형질주입, 전기 천공법, 인산칼슘 침전, 직접 미세현미주입 등)으로 숙주 세포에 도입될 수 있는 핵산 벡터에 포함될 수 있다. 숙주 세포는 포유류, 세균, 진균 또는 곤충 기원 중 하나일 수 있다. 포유류 숙주 세포는 이에 제한되지 않지만, CHO(또는 CHO-유래 세포주, 예컨대, CHO-K1, CHO-DXB11 CHO-DG44), 쥐 숙주 세포(예컨대, NS0, Sp2/0), VERY, HEK (예컨대, HEK293), BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, CRL7030 및 Hs78Bst 세포를 포함한다. 단백질 작제물의 발현을 조절하거나, 원하는 특정 방식으로 단백질 산물을 변형하고 처리하는 숙주 세포가 또한 선택될 수 있다. 상이한 숙주 세포는 단백질 산물의 번역후 처리 및 변형을 위한 특성과 특정 기구를 갖는다. 발현된 단백질의 올바른 변형 및 처리를 보장하도록 적절한 세포주 또는 숙주 시스템이 선택될 수 있다.

[0350]

그의 상응하는 DNA 플라스미드 작제물에서 단백질 산물의 발현 및 분비를 위해, 숙주 세포는 프로모터, 인핸서, 서열, 전사 종결자, 폴리아데닐화 부위 및 선별 마커를 포함하여, 당업계에 공지된 적절한 발현 조절 요소로 조절된 DNA로 형질주입되거나 형질전환될 수 있다. 치료 단백질의 발현 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들

어, Paulina Balbas, Argelia Lorence (eds.) *Recombinant Gene Expression: Reviews 및 Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Humana Press; 2nd ed. 2004 edition (July 20, 2004); Vladimir Voynov 및 Justin A. Caravella (eds.) *Therapeutic Proteins: Methods 및 Protocols (Methods in Molecular Biology)* Humana Press; 2nd ed. 2012 edition (June 28, 2012) 참조.

[0352] X. 정제

Fc 작제물은 예를 들어, 크로마토그래피(예컨대, 이온 교환, 친화(예컨대, 단백질 A 친화), 및 크기-배제 컬럼 크로마토그래피), 원심 분리, 용해도 차이, 또는 단백질 정제용 임의의 기타 표준 기술 등 단백질 정제의 당업계에 공지된 임의의 방법으로 정제될 수 있다. 예를 들어, Fc 작제물은 크로마토그래피 컬럼, 여과, 한외여과, 염석 및 투석 절차(예컨대, *Process Scale Purification of Antibodies*, Uwe Gottschalk (ed.) John Wiley & Sons, Inc., 2009; and Subramanian (ed.) *Antibodies-Volume I-Production and Purification*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (2004) 참조)로 단백질 A 컬럼과 같은 친화 컬럼을 적절하게 선택하고 결합함으로써 단리되고 정제될 수 있다.

일부 예시에서, Fc 작제물은 예컨대, 전체 세포 용해 혼합물에서부터 Fc 작제물의 정제 및 단리를 용이하게 하기 위해 하나 이상의 정제 웨بت아이드에 컨쥬게이트될 수 있다. 일부 구현예에서, 정제 웨بت아이드는 결합하여 정제 웨بت아이드에 특이적 친화도를 갖는 또 다른 모이어티에 결합한다. 일부 구현예에서, 정제 웨بت아이드에 특이적으로 결합하는 이러한 모이어티는 매트릭스, 수지, 또는 아가로스 비드와 같은 고형 지지체에 부착된다. Fc 작제물에 접합될 수 있는 정제 웨بت아이드의 예는 이에 제한되지 않지만, 헥사-히스티딘 웨بت아이드, FLAG 웨بت아이드, myc 웨بت아이드 및 혈구응집소(hemagglutinin, HA) 웨بت아이드를 포함한다. 헥사-히스티딘 웨بت아이드(HHHHHH(서열번호 38))는 마이크로풀 친화력으로 니켈-작용화된 아가로스 친화 컬럼에 결합한다. 일부 구현예에서, FLAG 웨بت아이드는 서열 DYKDDDK(서열번호 39)를 포함한다. 일부 구현예에서, FLAG 웨بت아이드는 직렬연결로 서열 DYKDDDK의 정수 배수, 예컨대, 3xDYKDDDK를 포함한다. 일부 구현예에서, myc 웨بت아이드는 서열 EQKLISEEDL(서열번호 40)을 포함한다. 일부 구현예에서, myc 웨بت아이드는 직렬연결로 서열 EQKLISEEDL의 정수 배수, 예컨대, 3xEQKLISEEDL을 포함한다. 일부 구현예에서, HA 웨بت아이드는 서열 YPYDVPDYA(서열번호 41)를 포함한다. 일부 구현예에서, HA 웨بت아이드는 직렬연결로 서열 YPYDVPDYA의 정수 배수, 예컨대, 3xYPYDVPDYA를 포함한다. FLAG, myc, 또는 HA 정제 웨بت아이드를 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 항체는 당업계에 잘 알려져 있고, 종종 상업적으로 이용 가능하다. 이들 항체와 작용화된 고형 지지체(예컨대, 매트릭스, 수지, 또는 아가로스 비드)는 FLAG, myc, 또는 HA 웨بت아이드를 포함하는 Fc 작제물을 정제하는 데 사용될 수 있다.

[0355] Fc 작제물의 경우, 단백질 A 컬럼 크로마토그래피는 정제 과정으로 이용될 수 있다. 단백질 A 리간드는 Fc 영역을 통해 Fc 작제물과 상호작용하고, 단백질 A 크로마토그래피를 숙주 세포 단백질의 대부분을 제거할 수 있는 고도의 선별 포획 과정으로 만든다. 본 개시에서, Fc 작제물은 실시예 2에 기술된 단백질 A 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 정제될 수 있다.

[0356] XI. 약제학적 조성물/제조

[0357] 본 개시는 본원에 기술된 하나 이상의 Fc 작제물을 포함하는 약제학적 조성물을 특징으로 한다. 하나의 구현예에서, 약제학적 조성물은 Fc 작제물의 실질적으로 동질인 집단을 포함한다. 다양한 실시예에서, 약제학적 조성물은 작제물 1~4 중 어느 하나의 실질적으로 동질인 집단을 포함한다.

[0358] 본 개시의 치료 단백질 작제물, 예컨대, 본원에 기술된 Fc 작제물(예컨대, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물)은 약제학적 조성물에 혼입될 수 있다. 치료 단백질을 포함하는 약제학적 조성물은 당업자에게 공지된 방법으로 제형화될 수 있다. 약제학적 조성물은 물 또는 또 다른 약제학적으로 허용 가능한 액체에서의 멸균 용액 또는 혼탁액을 포함하는 주사 가능한 제형의 형태로 비경구 투여될 수 있다. 예를 들어, 약제학적 조성물은 주사용 멸균수(WFI), 생리 식염수, 유화제, 혼탁제, 계면활성제, 안정화제, 희석제, 결합제, 부형제와 같은 약제학적으로 허용 가능한 비히클 또는 매개물과 Fc 작제물을 적합하게 결합하고 이어서 일반적으로 허용되는 약무(pharmaceutical practice)에서 요구되는 단위 용량 형태로 혼합함으로써 제형화될 수 있다. 약제(pharmaceutical preparation)에 포함된 유효 성분의 양은 지정된 범위 내에서 제공되는 적합한 용량이다.

[0359] 주사용 멸균 조성물은 비히클로서 주사용 증류수를 사용하여 통상적인 약무에 따라 제형화될 수 있다. 예를 들어, 생리 식염수 또는 글루코스 함유 등장액 및 D-소비톨, D-만노스, D-만니톨, 및 염화나트륨과 같은 기타 보충제 통상 당업계에 공지되어 있는 적합한 안정화제, 예를 들어, 에탄올과 같은 알코올 및 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리알코올, 및 폴리소르베이트 80TM, HCO-50과 같은 비이온성 계면활성제 등과 선

택적으로 조합하여 주사용 수용액으로 사용될 수 있다. 치료 단백질 산물용 제형 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예컨대, Banga (ed.) *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing 및 Delivery Systems* (2d ed.) Taylor & Francis Group, CRC Press (2006)를 참조한다.

[0360]

XII. 투약

[0361]

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

[0362]

XIII. 적응증(indication)

[0363]

본 개시의 약제학적 조성물(예컨대, 2, 3, 또는 4개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물을 포함하는 조성물)은 대상의 염증 감소, 대상의 자가항체의 제거 촉진, 대상의 항원 제시 억제, 대상의 면역 반응의 면역 복합체-기반 활성을 억제하는 것과 같은 면역 반응 감소, 및 대상의 면역 및 염증성 질병 또는 질환 치료에 유용하다. 예시적인 질병 및 질환은 류마티스 관절염(RA); 전신 홍반성 루푸스(SLE); ANCA-관련 혈관염; 항인지질 항체 증후군; 자가면역 용혈성 빈혈; 만성 염증성 탈수초성 신경병증; 이식조직에서 항-알로, GVHD에서 항-자기, 항-교환, IgG 치료법, IgG 파라단백질의 제거; 피부근염; 굿파스쳐 증후군; 항체-의존성 세포 매개 세포 독성을 통해 매개된 조직계-표적형 II 과민성, 예컨대, 길랭바레 증후군, CIDP, 피부근염, 펠티 증후군, 항체 매개 거부반응, 자가면역성 갑상선 질환, 궤양성 대장염, 자가면역성 간 질환; 특발성 혈소판 감소성 자반증; 중증 근무력증, 시신경 척수염; 수포창 및 기타 자가면역성 수포 질환; 쇼그伦 증후군; 항체-의존성 식균 작용을 통해 매개된 자가면역성 혈구감소증 및 기타 질환; 기타 FcR-의존성 염증 증후군, 예컨대, 활액막염, 피부근염, 전신성 혈관염, 사구체염 또는 혈관염을 포함한다.

[0364]

일부 구현예에서, 5~10개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물을 함유하는 본 개시의 약제학적 조성물은 또한 예컨대, 대상의 면역 반응의 면역 세포 활성화를 유도하고, 대상의 표적 세포(즉, 암세포 또는 감염 세포)의 식균작용을 증가시키고, 대상의 암 및 감염증과 같은 질환을 치료하는 데 유용하다. 본 개시의 Fc 작제물 및 동질인 약제학적 조성물은 활성화 Fc γ 수용체(예컨대, Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIa, 및 Fc γ RIIIb)에 결합하여 면역 반응을 유도할 수 있다. 본 개시의 Fc 작제물 및 동질 약제학적 조성물은 1차 THP-1 단핵구에서부터 Syk 인산화 및 칼슘 유입을 활성화시킬 수 있다. 활성화 단핵구 및 그의 분화된 대식세포는 표적 세포를 포식작용하거나 죽이는 능력을 갖는다. 그러므로 본 개시는 암과 감염증과 같은 질환 및 장애를 앓고 있는 대상을 치료하는 데 사용될 수 있는 치료 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Fc 작제물 및 동질인 약제학적 조성물은 대상의 암세포나 감염 세포를 포식작용하거나 죽이기 위한 치료유효량으로 대상에 투여될 수 있다.

[0365]

본 개시의 방법에 따라 치료받을 수 있는 암은 이에 제한되지 않지만, 방광암, 췌장암, 폐암, 간암, 난소암, 대장암, 위암, 유방암, 전립선암, 신장암, 고환암, 갑상선암, 자궁암, 직장암, 호흡기계 암, 비뇨기계 암, 구강암, 피부암, 백혈병, 육종(sarcoma), 암종(carcinoma), 기저 세포암, 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 림프구성 백혈병(CLL), B-세포형 만성 림프구성 백혈병(B-CLL), 다발성 골수종(multiple myeloma, MM), 적백혈병(erythroleukemia), 신세포암(renal cell carcinoma), 성상 세포 종, 펩지교성상세포종(oligoastrocytoma), 담도암, 융모막 암종, CNS 암, 후두암, 소세포 폐암, 선암(adenocarcinoma), 거대(또는 귀리) 세포 암종, 편평상피암, 역형성 큰 세포 림프종(anaplastic large cell lymphoma), 비소세포성(non-small-cell) 폐암, 신경아세포종, 횡문근육종(rhabdomyosarcoma), 신경외배엽 암, 교아세포종(glioblastoma), 유방암종, 흑색종, 염증 근육섬유모세포종 암(inflammatory myofibroblastic tumor cancer) 및 연조직 종양암을 포함한다.

[0366]

본 개시의 방법에 따라 치료받을 수 있는 감염증은 이에 제한되지 않지만 세균성 감염증, 바이러스성 감염증, 진균성 감염증, 연충 감염증 및 원충 감염증을 포함한다.

[0367]

감염 유발 세균의 예는 당업계에 잘 알려져 있고, 이에 제한되지 않지만, 연쇄상구균속의 세균(예컨대, *Streptococcus pyogenes*), 대장균속의 세균(예컨대, *Escherichia coli*), 비브리오속의 세균(예컨대, *Vibrio cholerae*), 장염균속의 세균(예컨대, *Enteritis salmonella*), 및 살모넬라속의 세균(예컨대, *Salmonella typhi*)을 포함한다.

[0368] 감염 유발 바이러스의 예는 당업계에 잘 알려져 있고, 이에 제한되지 않지만, 레트로바이러스과의 바이러스(예컨대, 인간 면역결핍 바이러스(HIV)), 아데노바이러스과의 바이러스(예컨대, 아데노바이러스), 단순포진바이러스과의 바이러스(예컨대, 단순성 포진 바이러스 1형 및 2형), 파필로마바이러스과의 바이러스(예컨대, 인간 유두종 바이러스(HPV)), 폭스바이러스과의 바이러스(예컨대, 천연두), 피코르나바이러스과의 바이러스(예컨대, A형 간염 바이러스, 폴리오바이러스, 리노바이러스), 헤파드나바이러스과의 바이러스(예컨대, B형 간염 바이러스), 플라비바이러스과의 바이러스(예컨대, C형 간염 바이러스, 황열병 바이러스, 웨스트 나일 바이러스), 토가바이러스과의 바이러스(예컨대, 풍진 바이러스), 오르토믹소바이러스과의 바이러스(예컨대, 인플루엔자 바이러스), 필로바이러스과의 바이러스(예컨대, 에볼라 바이러스, 마버그 바이러스), 및 파라믹소바이러스과의 바이러스(예컨대, 홍역 바이러스, 볼거리 바이러스)를 포함한다.

[0369] 감염 유발 진균의 예는 당업계에 잘 알려져 있고, 이에 제한되지 않지만 아스페르길루스속의 진균(예컨대, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. candidus*, *A. clavatus*, *A. ochraceus*), 칸디다속의 진균(예컨대, *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*), 크립토코커스속의 진균(예컨대, *Cryptococcus neoformans*) 및 푸사리움속의 진균(*Fusarium solani*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*)을 포함한다.

[0370] 연충의 예는 이에 제한되지 않지만, 조충류(촌충류), 회충류(선충류), 흡충류(디스토마류) 및 단생강을 포함한다.

[0371] 원충의 예는 이에 제한되지 않지만, 엔트아메바속의 원충(예컨대, *Entamoeba histolytica*), 열원충속의 원충(예컨대, *Plasmodium falciparum*, *P. malariae*), 람블편모충속의 원충(예컨대, *Giardia lamblia*) 및 과동편모충속의 원충(예컨대, *Trypanosoma brucei*)을 포함한다.

0372] 실시예

0373] 실시예 1. Fc 작제물 설계

[0374] 바람직하게는, Fc 작제물은 접힘 효율을 증가시키고, 원치않는 고분자량의 올리고머 및 다량체를 생성할 수 있는 소단위체의 비제어 결합을 최소화하고, 실질적으로 동질인 조성물을 생성하도록 설계된다. 이를 목표를 염두에 두고, 폴리펩타이드 스페이서에 의해 분리된 2개의 Fc 도메인 단량체를 포함하는 긴 폴리펩타이드(도 1의 폴리펩타이드 102 및 108 및 도 2의 폴리펩타이드 202 및 208) 및 단일 Fc 도메인 단량체를 포함하는 짧은 폴리펩타이드(도 1의 폴리펩타이드 114 및 116 및 도 2의 폴리펩타이드 214 및 216)을 각각 포함하는 4개의 Fc 작제물(도 1 및 2)을 설계하였다. 각각은 IgG1 Fc 서열에 기초하여, 폴리펩타이드의 조립을 제어하기 위해 유전자 조작 함몰부, 유전자 조작 돌출부, 및/또는 정전기 스티어링 변형을 포함한다. 긴 폴리펩타이드 및 짧은 폴리펩타이드를 인코딩하는 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. 총 8개의 DNA 플라스미드 작제물을 3개의 Fc 도메인을 각각 갖는 4개의 Fc 작제물을 조립하는 데 사용하였다.

[0375] 각각의 Fc 작제물의 경우, 공동-발현 시에, 긴 폴리펩타이드 및 짧은 폴리펩타이드는 긴 폴리펩타이드의 C-말단 Fc 단량체가 서로 특이적으로 결합하여 하나의 C-말단 Fc 도메인을 형성하고, 긴 폴리펩타이드의 N-말단 Fc 단량체가 짧은 폴리펩타이드와 특이적으로 결합하여 2개의 N-말단 Fc 도메인을 형성하는 3개의 Fc 도메인을 함유하는 분지된 분자를 제조한다. Fc 작제물 1~4 및 그의 설계는 표 5 및 도 1 및 2에 기술된다. 각각의 Fc 작제물에서 이용되는 서열은 표 6에 나타낸다. 하기 표 7은 작제물 1~4 각각에서 긴 폴리펩타이드 및 짧은 폴리펩타이드의 특성을 더 요약한다.

0376] 표 5

| Fc 작제물 | 긴 폴리펩타이드 #s (서열번호) | 짧은 폴리펩타이드 #s (서열번호) | 도면 |
|----------|--------------------|---------------------|-----|
| Fc 작제물 1 | 102 및 108(서열번호 43) | 114 및 116(서열번호 44) | 도 1 |
| Fc 작제물 2 | 102 및 108(서열번호 45) | 114 및 116(서열번호 46) | 도 1 |
| Fc 작제물 3 | 102 및 108(서열번호 47) | 114 및 116(서열번호 48) | 도 1 |
| Fc 작제물 4 | 202 및 208(서열번호 49) | 214 및 216(서열번호 48) | 도 2 |

0377]

[0378]

五 6

| 서열번호 | 아미노산 서열 |
|---------|--|
| 서열번호 43 | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREBQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSMKALPAPI EKTISAKAGQPREPVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGGSGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREBQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSMKALPAPI EKTISAKAGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 서열번호 44 | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREBQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSMKALPAPI EKTISAKAGQPREPVYTLPPCRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 서열번호 45 | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREBQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSMKALPAPI EKTISAKAGQPREPVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGGSGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREBQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSMKALPAPI EKTISAKAGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 서열번호 46 | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREBQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSMKALPAPI EKTISAKAGQPREPVYTLPPCRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

[0379]

| 서열번호 | 아미노산 서열 |
|---------|--|
| 서열번호 47 | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSMKALPAPIEKTISAKAGQPREPVYTLPPCRDQLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSMKALPAPIEKTISAKAGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 서열번호 48 | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSMKALPAPIEKTISAKAGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 서열번호 49 | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSMKALPAPIEKTISAKAGQPREPVYTLPPCRDQLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSMKALPAPIEKTISAKAGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPG |

[0380]

[0381]

표 7

| | Fc 작제물 1 | Fc 작제물 2 | Fc 작제물 3 | Fc 작제물 4 |
|---|---------------------------------------|---------------------------------------|---|---|
| 긴 폴리펩타이드(102/202 및 108/208)에서의 스페이서 | SGGGSGGGSGGGS GGGSGGG(서열 번호 18) | SGGGSGGGSGGGS GGGSGGG(서열 번호 18) | GGGGGGGGGGGGGG GG(서열번호 26) | GGGGGGGGGGGGGG GGGGGGG(서열 번호 27) |
| 긴 폴리펩타이드(102/202 및 108/208)에서의 C- 말단 라이신? | Y | N | N | N |
| 짧은 폴리펩타이드(114/214 및 116/216)에서의 C- 말단 라이신? | Y | N | N | N |
| 106/206 및 108/208에서의 아미노산 돌연변이 | S354C* T366W | S354C T366W | S354C E357K T366W | S354C E357K T366W |
| 104/204 및 110/210에서의 아미노산 돌연변이 | D399K K409D | D399K K409D | D399K K409D | D399K K409D |
| 114/214 및 116/216에서의 아미노산 돌연변이 | Y349C T366S L368A Y407W | Y349C T366S L368A Y407W | Y349C T366S L368A K370D Y407W | Y349C T366S L368A K370D Y407W |
| 도면 | 도 1 | 도 1 | 도 1 | 도 2 |

[0382]

*서열 위치는 카밧 넘버링 시스템(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., ed 5, 1991)에 따라 번호가 부여된다.

[0383]

Fc 작제물 1~3의 긴 폴리펩타이드 102 및 108(도 1) 및 Fc 작제물 4의 긴 폴리펩타이드 202 및 208 (도 2) 각각은 스페이서에 의해 직렬연결로 접합된 2개의 Fc 도메인 단량체를 함유한다. 하기 표 8은 긴 폴리펩타이드에서의 Fc 도메인 단량체의 서열과 Fc 작제물 1~4에서의 스페이서를 제공한다.

| Fc 작제물 1 폴리펩타이드 102/108 | |
|-------------------------|---|
| N-말단 Fc | DKTHTCPPCPAPEELLGGPSVLFPPPKITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KP REQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQWYTLPPCRDELTKNQ VSLWCLVKVGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 50) |
| 도메인 단량체 | SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG(서열 번호 18) |
| C-말단 Fc | DKTHTCPPCPAPEELLGGPSVLFPPPKITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KP REQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQWYTLPPSRIELTKNQ VSLTCLVKVGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSILTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 51) |
| Fc 작제물 2 폴리펩타이드 102/108 | |
| N-말단 Fc | DKTHTCPPCPAPEELLGGPSVLFPPPKITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KP REQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQWYTLPPCRDELTKNQ VSLWCLVKVGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 50) |
| 도메인 단량체 | SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG(서열 번호 18) |
| C-말단 Fc | DKTHTCPPCPAPEELLGGPSVLFPPPKITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KP REQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQWYTLPPSRIELTKNQ VSLTCLVKVGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSILTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG(서열 번호 52) |
| 도메인 단량체 | |

| Fc 작제물 3 폴리펩타이드 102/108 | |
|---------------------------|---|
| N-말단 Fc 도메인 단량체 | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQWYTLPPCRDQLTKNQ VSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPWLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 53) |
| 스페이서 | GGGGGGGGGGGGGGGGGG(서열번호 26) |
| Fc 작제물 4 폴리펩타이드 202/208 | |
| C-말단 Fc 도메인 단량체 | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQWYTLPPSRIELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPWLSDGSFFLYSILTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG(서열 번호 52) |
| 스페이서 | GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG(서열번호 27) |
| C-말단 Fc 도메인 단량체 | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQWYTLPPSRIELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPWLSDGSFFLYSILTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG(서열 번호 52) |

[0387]

[0388]

실시예 2 Fc 작제물의 발현

[0389]

발현된 단백질을 Poros MabCapture A(LifeTechnologies) 컬럼을 사용하는 단백질 A-기반 친화 컬럼 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상청액에서부터 정제하였다. 포획된 Fc 작제물을 인산염 완충 식염수로 세척하였고(저염 세척) pH 3, 100 mM 글라이신으로 용리하였다. 용출액을 pH 7.4 1 M TRIS의 첨가로 빠르게 중화하였고, 0.2 μ m 필터로 멸균 여과하였다.

[0390]

단백질을 Poros XS 수지(Applied Biosciences)를 사용하여 이온 교환 크로마토그래피에 의해 추가로 분류하였다. 컬럼을 50 mM MES, pH 6(완충액 A)로 사전평형화하였고 샘플을 용출 완충액으로서 50 mM MES, 400 mM 염화나트륨, pH 6(완충액 B)을 사용하여 단계 구배로 용리하였다.

[0391]

이온 교환 후에, 표적 분획물을 접촉 유동 여과(tangential flow filtration) 시스템상에서 10 kDa 컷오프(cutoff) 폴리에터설폰(polyether sulfone, PES) 막 카트리지를 사용하여 PBS로 완충액 교환하였다. 샘플을 대략 30 mg/mL로 농축하였고 0.2 μ m 필터로 멸균 여과하였다.

[0392]

실시예 3. Fc 작제물을 특성 분석하는 데 사용되는 실험적 분석법

[0393]

펩타이드 및 당펩타이드 액체 크로마토그래피-MS/MS

[0394]

단백질을 6M 구아니딘(Sigma)에서 1 μ g/ μ L로 희석하였다. 디티오프레이톨(Dithiothreitol, DTT)을 10 mM의 농도에 첨가하여 65° C에서 30분간 변성 조건하에서 이황화결합을 감소시켰다. 열음에서 냉각한 후, 샘플을 어두운 상태로 1시간 동안 30 mM 아이오도아세트아미드(IAM)로 배양하여 자유 티올을 알킬화(카바미도메틸화(carbamidomethylate))하였다. 그런 다음 단백질을 10-kDa 멤브레인을 통과하여 25 mM 중탄산 암모늄 완충액(pH 7.8)으로 투석하여 IAM, DTT 및 구아니딘을 제거하였다. 단백질을 Barocycler(NEP 2320; Pressure Biosciences, Inc.)에서 트립신으로 분해하였다. 압력을 37° C에서 20,000 psi와 주위 압력 사이를 1시간 동안 총 30 사이클 순환하였다. 펩타이드의 LC-MS/MS 분석을 Ultimate 3000(Dionex) Chromatography System 및 Q-

Exactive (Thermo Fisher Scientific) Mass Spectrometer에서 수행하였다. 단백질을 BEH PepMap(Waters) Column상에서 이동상으로 물에 0.1% FA 및 아세토니트릴에 0.1% FA를 사용하여 분리하였다. 단독 자일로실화 링커 웹타이드를 ± 1.5 Da 사중극 단리폭(quadrupole isolation width)으로 이중 하전 이온(z=2) m/z 842.5에 기초하여 표적화하였다.

[0395] 원형 질량 분석(*Intact Mass Spectrometry*)

단백질을 78.98% 물, 20% 아세토니트릴, 1% 품산 (FA), 및 0.02% 트리플루오로아세트산으로 이루어지는 전개 완충액(running buffer)에서 2 μ g/ μ L의 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 μ L/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.

[0397] 모세관 전기영동-소듐 도데실 살파이트(*CE-SDS*) 분석법

샘플을 1 mg/mL로 희석하고 HT Protein Express 변성 완충액(PerkinElmer)과 혼합하였다. 혼합물을 40° C에서 20분간 배양하였다. 샘플을 물 70 μ L로 희석하였고 96-웰 플레이트로 옮겼다. 샘플을 HT Protein Express LabChip(PerkinElmer)에 장착된 Caliper GXII 도구(PerkinElmer)로 분석하였다. 각각의 크기 변형의 상대적인 양을 산출하는 데 형광 강도를 사용하였다.

[0399] 비활원 *SDS-PAGE*

샘플을 95° C에서 10분간 Laemmli 샘플 완충액(4% SDS, Bio-Rad)에서 변성시켰다. Criterion TGX 무착색(stain-free) 겔(4~15% 폴리아크릴아미드, Bio-Rad)상에 샘플을 흐르게 했다. 단백질 랜드를 UV 조사 또는 쿠마시 블루(Coomassie blue) 염색으로 시각화하였다. ChemiDoc MP Imaging System(Bio-Rad)으로 겔을 이미지화하였다. ImageLab 4.0.1 소프트웨어(Bio-Rad)를 사용하여 랜드를 정량 분석하였다.

[0400] 보체 의존 세포독성(*CDC*)

Raji 세포(ATCC)를 순차 희석된 리툭시맙(Rituximab), Fc 작제물 4, 또는 IVIg로 코팅한 비색분석법(colorimetric assay)으로 CDC를 평가하였다. 인간 혈청 보체(Quidel)를 25% v/v로 모든 웰에 첨가하였고 37° C에서 2시간 동안 배양하였다. WST-1 세포 증식 시약(Roche Applied Science)을 첨가한 후 세포를 37° C에서 12시간 동안 배양하였다. 플레이트를 2분간 진탕기에 두었고, 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

[0403] 실시예 4. 링커 세린 잔기의 0-당화 및 단백질 분해

[0404] 링커 세린 잔기에서의 0-당화

실시예 1에 기술된 바와 같이, 접힘 효율을 증가시키고, 소단위체의 비제어 결합을 최소화하고, 실질적으로 동질인 약제학적 용도의 조성물을 생성하도록 Fc 작제물을 설계하였다. 이를 목표를 달성하기 위한 노력의 일환으로, 긴 폴리웹타이드(도 1의 102 및 108; 도 2의 202 및 208) 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 상이한 링커를 조사하였다. Fc 작제물 1 및 Fc 작제물 2는 긴 폴리웹타이드의 2개의 Fc 도메인 단량체 사이에 세린-글라이신 링커(SGGSGGGSGGGSGGGSGGG(서열번호 18))를 각각 갖는다.

[0406] 긴 폴리웹타이드의 2개의 Fc 도메인 단량체 사이에 링커 SGGSGGGSGGGSGGGSGGG(서열번호 18)를 함유하는 Fc 작제물 2를 웹타이드 LC-MS/MS로 분석했을 때, 0-자일로실화를 관찰하였다(도 3). 하지만, 단편 y2 내지 y9는 자일로스를 함유하지 않고, 링커의 제5 세린은 0-자일로실화되지 않는다. 0-자일로실화된 다수의 부위가 있을 수 있지만, 각각의 웹타이드는 오직 단독 0-자일로실화된다. 이러한 번역후 변형의 정도 및 위치는 서열과 발현 시 스텝 둘 다에 의해 결정될 수 있다.

[0407] 이와 유사하게, 0-자일로실화를 동일한(SG₃)₅ 링커(도4)를 함유하는 2개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물(도 13에 도시된 Fc 작제물)에서 관찰하였다. 다수의 부위에서 변형을 관찰하였고, 각각의 링커에서 최대 2개의 자일로스 변형이 있었다. 게다가, 변형의 수준은 배치(batch) 사이에서 가변적이었다.

[0408] 세린-글라이신 링커의 세린 잔기에서 0-자일로실화를 관찰한 후에, 링커 서열을 더 최적화하고 Fc 작제물의 동질성을 개선시키기 위하여 오직 글라이신 잔기를 포함한 대체 링커를 조사하였다. 그 결과, 전부-글라이신인 스페이서를 Fc 작제물 3 및 Fc 작제물 4에서 사용하기 위해 선택하였다. Fc 작제물 3은 긴 폴리웹타이드의 2개의

Fc 도메인 단량체 사이에 15-량체의 전부-글라이신인 스페이서 (GGGGGGGGGGGGGGGG(서열번호 26))를 갖는다. Fc 작제물 4는 긴 폴리펩타이드의 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 20-량체의 전부-글라이신인 스페이서 (GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG(서열번호 27))를 갖는다.

[0409] 링커 세린 잔기에서의 단백질 분해

[0410] 일부 구현예에서, 인산염 완충 식염수에서 45°C에서 배양 시에 Fc 작제물이 링커에서 단백질 분해를 겪고, 단량체 Fc 산물을 생성하는 것을 확인하였다. (폴리펩타이드 102 및 108 각각의 링커 SGGSGGSGGGSGGGSGGG를 함유하는) Fc 작제물 2의 단량체 형성 속도가 (폴리펩타이드 202 및 208 각각의 전부-글라이신인 스페이서 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG를 함유하는) Fc 작제물 4(도 5)보다 더 빠르고, 이는 전부-글라이신인 스페이서가 단백질 분해에 덜 취약함을 나타낸다. 이러한 결과가 다수의 링커 길이에서 3개의 Fc 도메인을 갖는 분지된 Fc 작제물 중에 일반적임을 발견하였고, 전부-글라이신인 스페이서는 세린-글라이신 링커보다 더 느리게 단백질 분해되었다(표 9).

[0411] 표 9

| 링커 서열 | 단량체 형성 속도(%단량체/일) |
|---------------------------------|-------------------|
| G ₈ | 0.17 |
| G ₁₅ | 0.21 |
| G ₂₀ | 0.24 |
| (SG ₃) ₄ | 0.33 |
| (SG ₃) ₅ | 0.34 |

[0412]

[0413] 게다가, 폴리펩타이드 102 및 108 각각의 (SG₃)₅ 링커를 갖는 Fc 작제물 2의 단량체 Fc 산물의 질량 분석법에 의한 분석은 지배 산물이 단백질 분해에 취약한 제1 세린을 제외하고 모두 세린의 N-말단 측으로 절단됨을 입증하였다(도 6). 반면에, 폴리펩타이드 202 및 208 각각의 G₂₀ 스페이서를 갖는 Fc 작제물 4의 절단 산물은 임의의 특징 스페이서 잔기에 대한 강한 특이도를 보이지 않았다(도 7). 동시에, 이들 결과는 전부-글라이신인 스페이서가 단백질 분해에 대한 취약성을 감소시킴을 나타내었다. 단백질 분해를 제한하기 위해, Fc 작제물 4에 사용된 G₂₀ 스페이서와 같이 무세린(serine-free) 스페이서가 사용될 수 있다. 이러한 글라이신 스페이서의 사용은 최종 Fc 작제물 조성물의 동질성을 실질적으로 개선시킨다.

[0414] 실시예 5. 링커 길이의 최적화

[0415] 추가로 최적화된 동질성을 위하여, (SG₃)₅ 링커가 G₈, G₁₅, 또는 G₂₀ 스페이서로 치환된 Fc 작제물 2 서열상의 변이를 제조함으로써 링커 길이를 탐구하였다. 시험판내 검사에 의한 분석은 아마도 Fc γ 수용체와 상호작용하는 Fc 작제물의 능력을 변경시킴으로써 링커 길이가 생물학적 활성에 영향을 주는 것임을 보여주었다.

[0416] 플레이트-고정 IgG에 의해 자극된 THP-1 세포에 의한 IL-8 방출의 억제는 링커 길이에 따라 결정됨을 확인하였다(도 8). 낮은 Fc 작제물 농도에서의 억제는 G₈ < G₁₅ < G₂₀ 순서를 따랐고, Fc 작제물 2는 THP-1 세포에 의한 IL-8 방출을 가장 강하게 억제하는 G₂₀ 스페이서를 갖는다.

[0417] 또한, 중성구에서 칼슘 유입의 억제는 링커 길이에 의존적임을 확인하였다(도 9). 억제는 G₈ < G₁₅ < G₂₀ 순서를 따랐고, Fc 작제물 2는 중성구에서 칼슘 유입의 가장 강한 억제를 보인 G₂₀ 스페이서를 갖는다.

[0418] 실시예 6. 늄-인투-흘 기술에 의한 이종이량체화의 최적화

[0419] Fc 작제물 2의 긴 폴리펩타이드 및 짧은 폴리펩타이드(도 1의 폴리펩타이드 102, 108, 114, 및 116) 또는 Fc 작제물 4의 긴 폴리펩타이드 및 짧은 폴리펩타이드(도 2의 폴리펩타이드 202, 208, 214, 및 216)를 발현하는 플라스미드를 HEK293 세포내로 형질주입하였다. 7일간의 배양 후에, 세포를 원심분리로 제거하고, 원배지 상청액을 비활원 SDS-PAGE로 분리하였다(도 10). 시각화된 단백질 밴드의 농도계 분석은 3개의 Fc 도메인을 갖는 작제물 2 및 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물 4(Fc3)가 유사한 수준으로 발현됨을 나타냈다. 하지만, Fc 작제물 2에

서 작제물은 오염시키는 이량체(Fc2) 종을 유의하게 더 높은 수준으로 발현하였다(도 10). 작제물의 두 세트 모두 단량체 종(Fc1)은 유사한 수준으로 발현하였다. 이미지에 존재하는 추가 밴드는 모의 형질주입 대조에 존재하는 배지 성분을 나타낸다.

[0420] 이들 결과는 "가지" 소단위체(예컨대, 도 1의 Fc 도메인 단량체 106, 114, 112, 및 116; 도 2의 Fc 도메인 단량체 206, 214, 212, 및 216)에서 이종이량체화를 촉진하는 정전기 스티어링 돌연변이 및 이종이량체화를 촉진하는 늄-인투-홀 돌연변이를 둘 다 가지는 것이 Fc 작제물의 이종이량체 Fc 도메인 형성을 강화하고, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물의 조립을 최적화하고, Fc 작제물을 함유하는 조성물의 동질성을 개선시킴을 나타낸다.

실시예 7. 동종이량체화의 제어를 위한 정전기 스티어링

[0422] 원치않는 고분자량 올리고머 및 다량체를 생성하는 소단위체의 오프-레지스터(off-register) 결합을 최소화하기 위해, 이종이량체화(예컨대, 늄 및 홀)를 용이하게 하는 돌연변이를 "가지" 소단위체(예컨대, 도 1의 Fc 도메인 단량체 106, 112, 114, 및 116; 도 2의 Fc 도메인 단량체s 206, 212, 214, 및 216)내로 도입하였다. 이들 아미노산 치환은 늄 소단위체(예컨대, 도 1의 Fc 도메인 단량체 106 및 112; 도 2의 Fc 도메인 단량체 206 및 212)의 대응하는 홀(예컨대, 도 1의 Fc 도메인 단량체 114 및 116; 도 2의 Fc 도메인 단량체 214 및 216)에 대한 인력을 보존하고 동시에 늄 소단위체 끼리의 결합을 방지한다. 늄 돌연변이는 또한 야생형 Fc 서열과의 결합을 억제하므로, 늄 및 홀 "가지" 소단위체에 대한 "줄기" Fc 소단위체(예컨대, 도 1의 Fc 도메인 단량체 104 및 110; 도 2의 Fc 도메인 단량체 204 및 210)의 친화도를 더 감소시키는 추가 돌연변이를 포함하는 것에 대한 필요성에 의문을 제기한다. 이러한 의문을 해결하기 위해, 카복시 말단 "줄기" 소단위체에 야생형 Fc 도메인 단량체 서열을 함유하고 아미노 말단 "가지" 소단위체에 늄 돌연변이를 지니는 Fc 도메인 단량체를 함유하는 Fc 작제물의 긴 폴리펩타이드를 생성하였다. 상응하는 짧은 폴리펩타이드는 홀 돌연변이를 지니는 Fc 도메인 단량체였다. 이러한 Fc 작제물은 Fc 작제물 2의 폴리펩타이드의 서열에 기초하지만, 긴 폴리펩타이드 각각의 카복시 말단 "줄기" 소단위체의 야생형 Fc 도메인 단량체 서열을 갖는다.

[0423] HEK293 세포는 (실시예 1의 표 5 및 6 참조; 긴 폴리펩타이드 각각의 카복시 말단 "줄기" 소단위체의 Fc 도메인 단량체에 동종이량체화 정전기 스티어링 돌연변이를 갖는) Fc 작제물 2, 또는 (상술한 바와 같이) 긴 폴리펩타이드 각각의 카복시 말단 "줄기" 소단위체의 Fc 도메인 단량체가 야생형 Fc 도메인 단량체 서열(서열번호 42)과 치환된 Fc 작제물 2에 기초한 Fc 작제물을 발현하는 플라스미드로 공-형질주입(co-transfect)하였다. 7일간의 배양 후에, 세포를 원심분리로 제거하고, 원배지 상청액을 비활원 SDS-PAGE로 분리하였다. 염색된 단백질의 이미징은 "줄기" 소단위체의 정전기 스티어링 돌연변이가 없는 Fc 작제물(도 11의 "정전기 스티어링 없음"으로 표지된 (레인 1~3))이 대응하는 Fc 작제물 2(도 11의 "정전기 스티어링 있음"으로 표지된 (레인 4 및 5))보다 훨씬 더 높은 수준의 단량체(Fc1) 및 이량체(Fc2)를 함유함을 나타냈다. 게다가, 삼량체보다 더 높은 분자량인 밴드의 수가 훨씬 더 많이 검출될 수 있다(도 11의 레인 1~3).

[0424] 이들 결과는 "줄기" 소단위체(예컨대, 도 1의 Fc 도메인 단량체 104 및 110; 도 2의 Fc 도메인 단량체 204 및 210)의 동종이량체화를 촉진하는 정전기 스티어링 돌연변이를 갖는 것은 Fc 작제물에서 동종이량체 Fc 도메인의 형성을 더 강화하고, 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물의 결합을 최적화하고 Fc 작제물을 함유하는 조성물의 동질성을 개선시킴을 확인한다.

실시예 8. C-말단 라이신 잔기의 제거에 의한 조성물 동질성의 최적화

[0425] 면역글로불린의 C-말단 라이신 잔기는 많은 종에 걸쳐 고도로 보존된다. 일부 예시에서, 폴리펩타이드의 C-말단 라이신이 단백질 생산 중에 세포 기구에 의해 제거된다. 조성물의 Fc 작제물의 균일성을 더 개선시키고 Fc 작제물의 폴리펩타이드 각각에서 C-말단 라이신을 제거함으로써 본원에 기술된 Fc 작제물을 함유하는 보다 동질인 조성물을 달성하고자 하였다. Fc 작제물 2는 그의 긴 폴리펩타이드(102 및 108; 실시예 1, 표 5~7 참조; 도 1) 또는 짧은 폴리펩타이드(114 및 116) 중 하나에 어떤 C-말단 라이신 잔기도 포함하지 않는다. 도 12는 Fc 작제물 2를 생성하는 C-말단 라이신의 제거는 시험판내 보체 의존 세포독성을 유도하지 않는 것을 보여준다. 따라서, C-말단 라이신 잔기의 제거에 의해, 부정적인 면역학적 부작용을 촉발하지 않으면서 Fc 작제물 약제학적 조성물의 동질성을 개선시킬 수 있었다.

실시예 9. 만성 특발 혈소판감소 자색반(Chronic Idiopathic Thrombocytopenic Purpura, ITP) 모델에서의 Fc 작제물의 효능

[0426] 무게가 18~22 그램인 암컷 C57BL/6 마우스를 Charles River Labs에서 구입하였고 1주일간 환경에 적응 후 연구에 사용하였다. 마우스를 래트 항-마우스 CD41 항체(항-CD41; 1.5 μ g/마우스)로 4일 동안 복강내 처리하였다.

식염수, IVIg, 작제물 2, 및 작제물 4를 3일차에 제3 항체 주사 후 1 내지 2시간 째에 정맥내 공급하였다. 5일 차에, 제4 항-CD41 항체 주사 후 24시간 째에, 하악 사혈(submandibular bleed)에 의해 혈액을 취하여 혈소판 수준을 측정하였다.

[0429] 작제물 2 및 작제물 4를 비교하는 다수의 연구를 ITP 모델(도 18, 도 19, 및 20)에서 수행하였다. 세 개의 모든 연구에서, 작제물 4는 0.1 g/kg으로 투약된 작제물 2보다 높은 효능을 보였다.

실시예 10. Fc 다양체 작제물과 비교한 작제물 4의 약동학적 행태

[0431] (Strome et al, US 2010/0239633 A1; Jain et al, *Arthritis Res. Ther.* 14, R192 (2012))에 기술된 바와 같이 Fc 다양체를 생성하였다. 구체적으로는, 야생형 IgG1 Fc를 IgG2 헌지 서열(작제물 X1)의 C-말단에 융합하였다. DNA 플라스미드 작제물을 리포좀을 통해 HEK293 세포내로 형질주입하였다. 7일간의 배양 후에, 세포를 원심 분리로 제거하였다.

[0432] 발현된 단백질을 Poros MabCapture A 컬럼을 사용하는 단백질 A-기반 친화 컬럼 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상청액에서부터 정제하였다. 포획된 작제물을 인산염 완충 식염수로 세척하였고(저염 세척) pH 3, 100 mM 글라이신으로 용리하였다. 용출액을 pH 7.4 1 M TRIS의 첨가로 빠르게 중화하였고, 0.2 μ m 필터로 멸균 여과하였다.

[0433] 단백질을 Poros XS 수지를 사용하여 이온 교환 크로마토그래피에 의해 추가로 분류하였다. 컬럼을 50 mM MES, pH 6(완충액 A)로 사전평형화하였고, 샘플을 로딩 전에 평형 완충액(equilibration buffer)에 희석하였다. 샘플을 용출 완충액으로서 50 mM MES, 400 mM 염화나트륨, pH 6(완충액 B)으로 다중 단계 구배를 사용하여 용리하였다. 구배 단계는 저분자량 종을 제거하기 위해 2 컬럼 부피(CV)에 대해 0~40%의 B를 포함하고, 단계는 40% B(4 CV)에서 정지한 후 표적 종을 단리하기 위해 40~80% B(4 CV)로 이어지고 이어서 연속적으로 100% B로 증가시켰다. 모든 단백질-함유 분획물을 크기 배제 크로마토그래피 분석으로 스크린하였고 성분을 280 nm에서 흡광도에 의해 정량분석하였다. Fc(대략 50 kDa) 플러스 Fc 이량체(대략 100 kDa)의 8% 이하의 총 함량을 갖는 분획물을 결합하여 정제 Fc 다양체를 제조하였다.

[0434] 이온 교환 후에, 표적 분획물을 접촉 유동 여과 시스템상에서 30 kDa 컷오프 폴리에터설폰(PES) 막 카트리지를 사용하여 PBS로 완충액 교환하였다. 샘플을 대략 30 mg/mL로 농축하였고 0.2 μ m 필터로 멸균 여과하였다.

[0435] 작제물 4 및 작제물 X1의 분자량 분포를 소듐 도데실 세레이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 비교하였다(도 21). 작제물 4는 주로 약 150 kDa 종(3개의 Fc 도메인)으로 구성된다. 반면에, 작제물 X1은 범위가 약 100 kDa(2개의 Fc 도메인)부터, 대부분 단일 성분이 아닌, 250 kDa이 넘는 많은 밴드를 갖는 다수의 종으로 구성된다.

[0436] 암컷 C57BL/6 마우스(n=15, 8주령)에 작제물 X1 또는 작제물 4를 각각 0.1 g/kg으로 정맥내(i.v.) 투약하였다. 혈액(25 μ L)을 하악 정맥에서 수집하였고 혈청을 얻기 위해 처리하였다. 그룹 당 다섯 마리의 마우스를 5일에 걸쳐 교호 시간 지점에서 피를 뽑았고 나머지 시간 지점에 대해 각 그룹에서 15마리의 마우스 전부를 피를 뽑았다. 수집한 시간 지점은 15 및 30분; 1, 2, 4, 6, 8 및 24시간; 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 14, 16, 18, 21 및 24 일을 포함하였다. Fc 다양체 혈청 농도를 Fc 특이적 탐지 항체로 항-인간 IgG ELISA에 의해 결정하였다.

[0437] 도 22에서 보이는 바와 같이, 3일차와 5일차 사이에 곡선이 잠시 교차하지만, 작제물 X1의 혈청 수준은 대부분의 시간 지점에서 작제물 4의 혈청 수준보다 낮다. 도 22에서, 작제물 4는 검은 사각형 및 실선으로 도시되고, 작제물 X1은 열린 원의 파선으로 도시된다. 초기 시간 지점을 확대한 것이 작제물 4(검은 사각형에 실선) 및 작제물 X1(열린 원에 파선)로 도 23에 도시된다.

실시예 11. 콜라겐 항체-유도 관절염(CAIA) 모델에서의 Fc 작제물의 효능

[0439] 콜라겐 II에 대한 4개 항체의 관절염으로 유발된 단일클론 항체 각테일(Arthritomab, MDBiosciences; 8 mg)을 수컷 C57BL/6 마우스에 복강내(i.p.) 주사하였다. 4일차에, 지질다당류(lipopolysaccharide)(100 μ g)를 동물에 복강내 주사하였다. 1일차 내지 14일차의 범위(일자는 0은 생략하고 숫자 부여)에서 하루, 비히를 또는 테스트 화합물을 동물에 정맥내 투약하였다. 임상 점수 파라미터는 다음과 같았다: 0 = 정상, 종창, 발적, 또는 변형(distortion) 없음; 완전한 관절 유연성. 1 = 경증 관절염: 경미한 종창 및/또는 변형; 완전한 관절 유연성. 2 = 중등도 관절염: 중등도의 종창 및/또는 변형; 관절 유연성 또는 악력의 감소. 3 = 중증 관절염: 중증의 종창 및/또는 변형; 관절 유연성 또는 악력의 심각한 감소. 4 = 폐색된 관절: 관절 유연성이 없고 심각하게 손상된 움직임; 빈사상태(moribund). 12일 후에 동물을 희생시켰다.

[0440] 도 24는 50 mg/kg(검은 삼각형, 검은 실선), 25 mg/kg(검은 사각형, 검은 점선), 또는 12.5 mg/kg(검은 원, 검은 파선)으로 6일차에 콜라겐 항체-유도 관절염(CAIA) 모델에서 치료적으로 투약된 작제물 4의 효능을 비교하는 그래프이다. 동일한 용량의 식염수(회색 엑스, 회색 실선)가 6일차에 비히클 대조로 투약되었다. 평균 및 평균의 표준 오차가 각각의 시간 지점에 표시되어 있다.

[0441] CAIA 모델에서 1일차에 작제물 4의 100 mg/kg으로 예방적 투약을 수행하였다(도 25). 비히클 대조(식염수)를 1일차에만 투약하였다.

[0442] 도 25는 콜라겐 항체-유도 관절염(CAIA) 모델에서 1일차에 100 mg/kg으로 예방을 위해 투약된 작제물 4(AA: 검은 사각형, 실선) 또는 식염수(회색 원, 쇄선)의 효능을 비교하는 그래프이다. 동일한 용량의 식염수(회색 원, 쇄선)가 1일차에 투약되었다. 평균 및 평균의 표준 오차가 각각의 시간 지점에 표시되어 있다.

[0443] 작제물 4는 치료적(도 24) 또는 예방적으로(도 25) 투약했을 때 비히클 대조와 비교하여 질환 중증도를 감소함을 확인하였다.

[0444] **실시예 12. Fc γRIIb에 결합하는 Fc 작제물의 강화**

[0445] S267E/L328F 돌연변이는 Fc γRIIb 수용체에 대한 IgG1 결합을 유의미하게 그리고 특이적으로 증가시킴을 이전에 보였다(Chu et al. Molecular Immunology 45 2008) S267E/L328F 돌연변이를 작제물 4(SIF) 백본으로 혼입하였다. 본 작제물 4-Fc γRIIb+ 돌연변이는 잘 발현되고 조립된다(도 26 참조)(SIF: 작제물 4; Fc γRIIb+: 작제물 4-Fc γRIIb+ 돌연변이). 도 26은 작제물 4(SIF) 및 작제물 4-Fc γRIIb+ 돌연변이의 일과성 발현으로 수득한 정화 배지에 대한 비활원 소듐 도데실 세포판이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 결과의 이미지이다. 작제물 4-Fc γRIIb의 장쇄 및 측쇄를 인코딩하는 플라스미드를 1/1(w/w) 또는 2/1 비로 HEK293 세포에 형질주입하였다.

[0446] 억제성 Fc γRIIb 수용체에 대한 작제물 4-Fc γRIIb+ 돌연변이의 결합을 작제물 4(SIF3) 대조와 비교할 때 크게 강화하였다(결합 시 300배 초과 증가). 반대로, 활성화 Fc γRIIa에의 결합은 비교적 영향받지 않는 반면, Fc γRIIa에의 결합은 감소한다(도 27 참조).

[0447] 도 27은 IgG1 대조의 Fc 감마 수용체, 작제물 4 및 작제물 4-Fc γRIIb+ 돌연변이에 대한 결합을 비교하는 실험의 결과를 요약하는 그래프이다. 상대적인 결합을 세포 기반, 경쟁 시간차 형광 공명 에너지 전이 분석법(competitive Time Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer assays)(CisBio Bioassays, Bedford, MA)을 사용하여 측정하였다. 결과는 EC50 값으로 나타내고, 이는 특정 세포 표면 Fc 감마 수용체에 결합된 형광 표지된 항체를 대체하는 데 필요한 발단자(proband)의 농도를 표시한다. 숫자가 높을수록 결합 또는 친화도가 더 낮다.

[0448] **실시예 13. 단핵구 유래 수지상 세포(moDC) 활성의 억제**

[0449] 작제물 4-Fc γRIIb+ 돌연변이 단핵구 유래 수지상 세포(moDC)의 활성을 매우 강력하게 한다. 전문적인 항원 제시 세포의 가장 중요한 집단인 수지상 세포(DC)는 항원 물질을 처리하고 T-세포 반응을 개시할 목적으로 세포 표면 상에 항원 물질을 제시한다. Fc γR은 moDC 기능을 조절하는 데 중요한 역할을 할 수 있다. 활성화 Fc γR의 면역 복합체 결합은 미성숙 인간 moDC의 성숙 및 활성화를 촉발시킬 수 있다. 반대로, 억제성 Fc γRIIb의 결합은 성숙 및 활성화를 억제할 수 있다(Boruchov AM et al. J Clin Invest. 2005 115(10)). Fc 작제물은 moDC의 성숙 및 활성화를 억제할 수 있음을 이전에 보인 바 있다(Ortiz et al Sci Transl Med 2016 및 도 3 참조). 반면에, Fc γRIIb+ 돌연변이를 갖는 Fc 작제물(예컨대, 작제물 4/SIF3)은 플레이트 고정 IgG1과 같은 면역 복합체 대용물질(immune complex surrogate)에 노출에 대한 반응으로 moDC 활성화를 유의미하게 강화시킬 수 있다(도 28). 작제물 4-Fc γRIIb+단독으로 배양하면 moDC 활성화를 유도하지 않는다(도 29).

[0450] 미성숙 인간 moDC를 100 ng/mL GM-CSF 및 50 ng/mL IL-4의 존재하에 음성 선택 CD14+ 단핵구에서부터 생성하였다. 수거된 DC를 37° C에서 20분간 배지에서 PBS, 항-CD32a 항체 IV.3, 작제물 4 (SIF3), 또는 작제물 4-Fc γRIIb+ 중 하나와 배양하였다. 차단 후에, 세포 혼탁액을 IgG1 코팅 플레이트로 옮기고 추가 GM-CSF 및 IL-4 보충 배지를 첨가하였다. 48 시간 배양 후에, 얼음처럼 차가운(ice cold) PBS로 플레이트를 2회 세척하여 가볍게 착생한 세포를 수거하였다. 수거된 세포를 항-HLA-DR FITC 및 항-CD86-PE Cy7 Ab로 염색하였다. 세포를 FACSCanto(BD) 및 FlowJo Software(TreeStar)로 분석하였다.

[0451] 도 28: 작제물 4는 플레이트 고정 IgG에 의해 moDC 활성화를 억제하는 반면, 작제물 4-Fc γRIIb+는 활성화를 강화한다. 표본 히스토그램은 음성 대조(UT)로서 미처리 플레이트상에서 배양되거나 항체 차단 활성화 Fc γRIIa(IV.3) 또는 작제물 4 또는 작제물 4-Fc γRIIb+의 증가한 농도로 20분간 전처리한 moDC상의 CD86 표면 발현

을 나타낸다. 이어서 처리된 세포를 고정 IgG1(PB IgG)을 함유하는 플레이트로 옮겼다. 종양 괴사 인자 알파(TNF α) 처리를 양성 대조로 사용하였다. CD86의 표면 발현을 유동 세포 분석법으로 평가하였다. CD86 발현의 히스토그램을 대조로서 미자극 세포를 사용하여 케이팅하였다. 치료 질병에 대한 CD86에 양성인 세포의 백분율을 y-축에 나타내었다.

[0452] 도 29: 작제물 4-Fc γ RIIb+는 moDC 활성화를 그것만으로 유도하지는 않지만 플레이트 고정 IgG에 의해 활성화를 강화시킨다. 표본 히스토그램은 음성 대조(UT)로서 미처리 플레이트상에서 배양되거나 작제물 4-Fc γ RIIb+로 20분간 전처리하고 이어서 미처리 플레이트(오직 Fc γ RIIb+)로 옮긴 moDC상의 CD86 표면 발현을 나타낸다. PBS(PB IgG), 활성화 Fc γ RIIa(IV.3)를 차단하는 항체, 또는 작제물 4-Fc γ RIIB+(Fc γ RIIB+)로 전처리한 MoDC를 고정 IgG1을 함유하는 플레이트에 옮겼다. CD86의 표면 발현을 유동 세포 분석법으로 평가하였다. CD86 발현의 히스토그램을 대조로서 미자극 세포를 사용하여 케이팅하였다. 치료 질병에 대한 CD86에 양성인 세포의 백분율을 y-축에 나타내었다.

[0453] 기타 구현예

[0454] 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특히 및 특히 출원은 각각의 독립적인 간행물 또는 특히 출원이 구체적으로 그리고 개별적으로 참조로서 포함되는 것으로 나타내어진 것처럼 그와 같은 정도로 본원에 참조로서 포함된다.

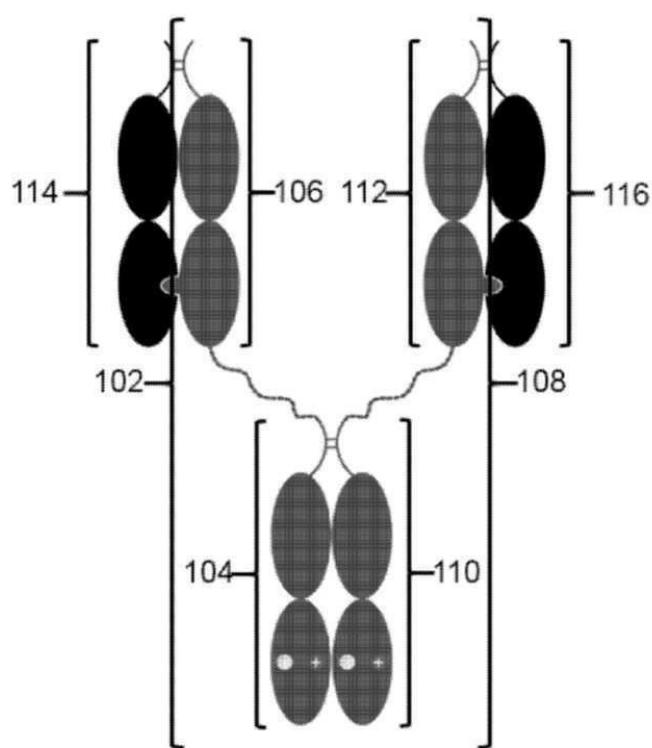
[0455] 본 개시는 이의 구체적 구현예와 관련하여 기술되어 있지만, 추가의 변형이 가능하고 본 출원은 일반적으로 본 개시의 원리를 따르고 본 개시가 관련된 분야에 공지되거나 통상적인 관행에 속하고 상기 기술된 본질적 특징에 적용될 수 있는 본 개시에서부터의 이러한 변경을 포함하는 본 개시의 임의의 변형, 사용 또는 응용을 포함하도록 의도되며, 청구항의 범주를 따르는 것으로 이해될 것이다.

[0456] 기타 구현예는 청구 범위내에 있다.

도면

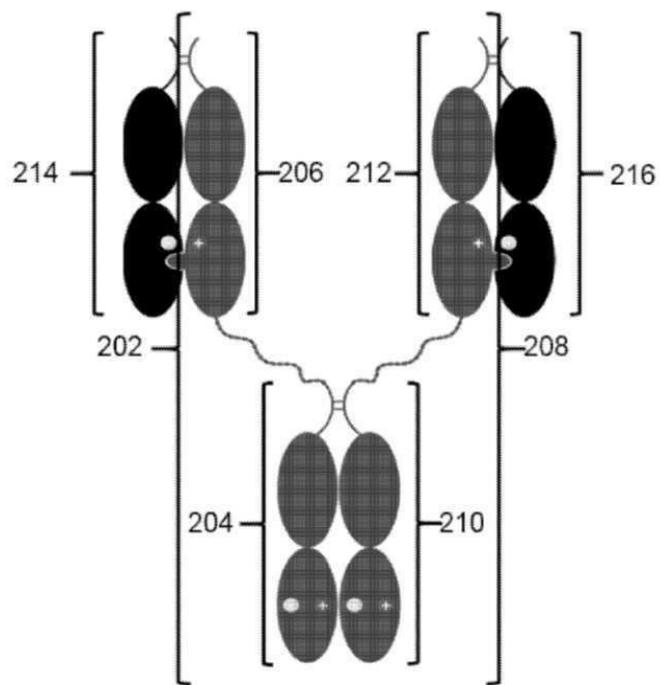
도면1

(Fc 작제물 1, 2 및 3)

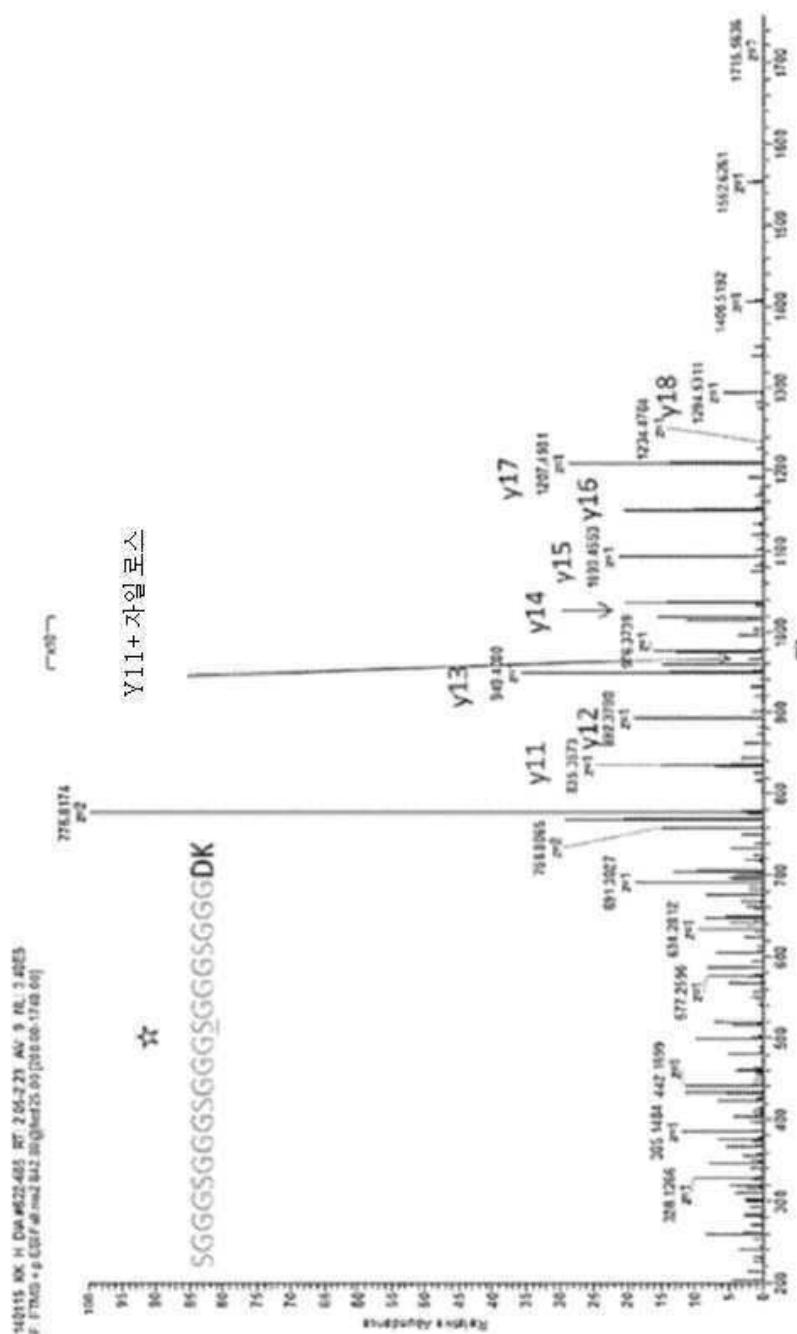


도면2

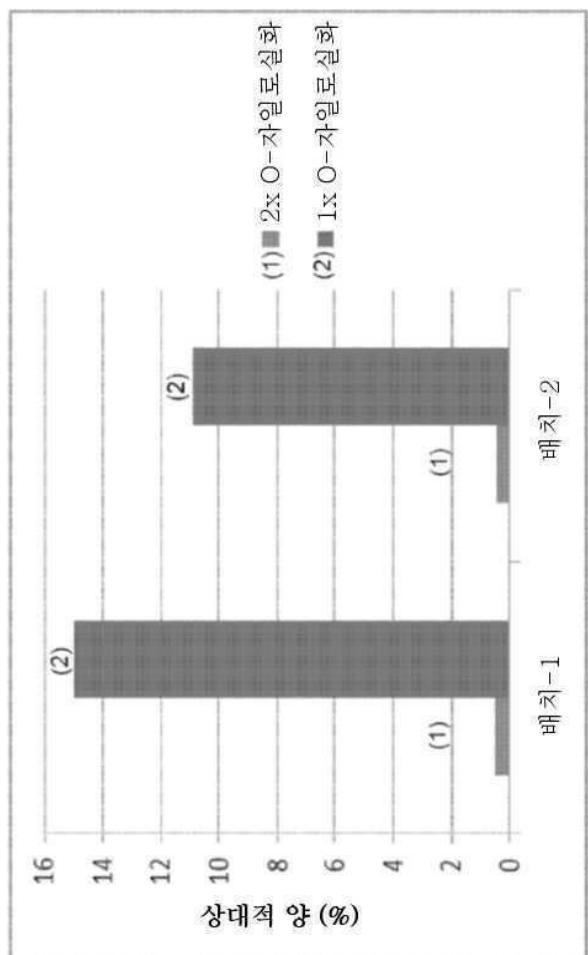
(Fc 작제물 4)



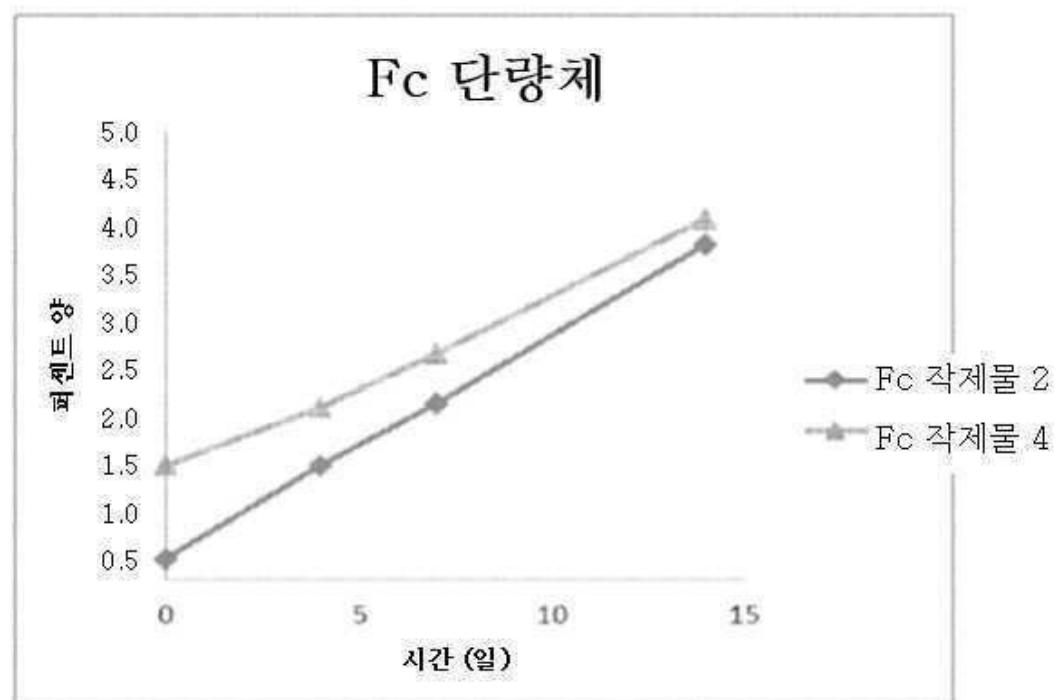
도면3



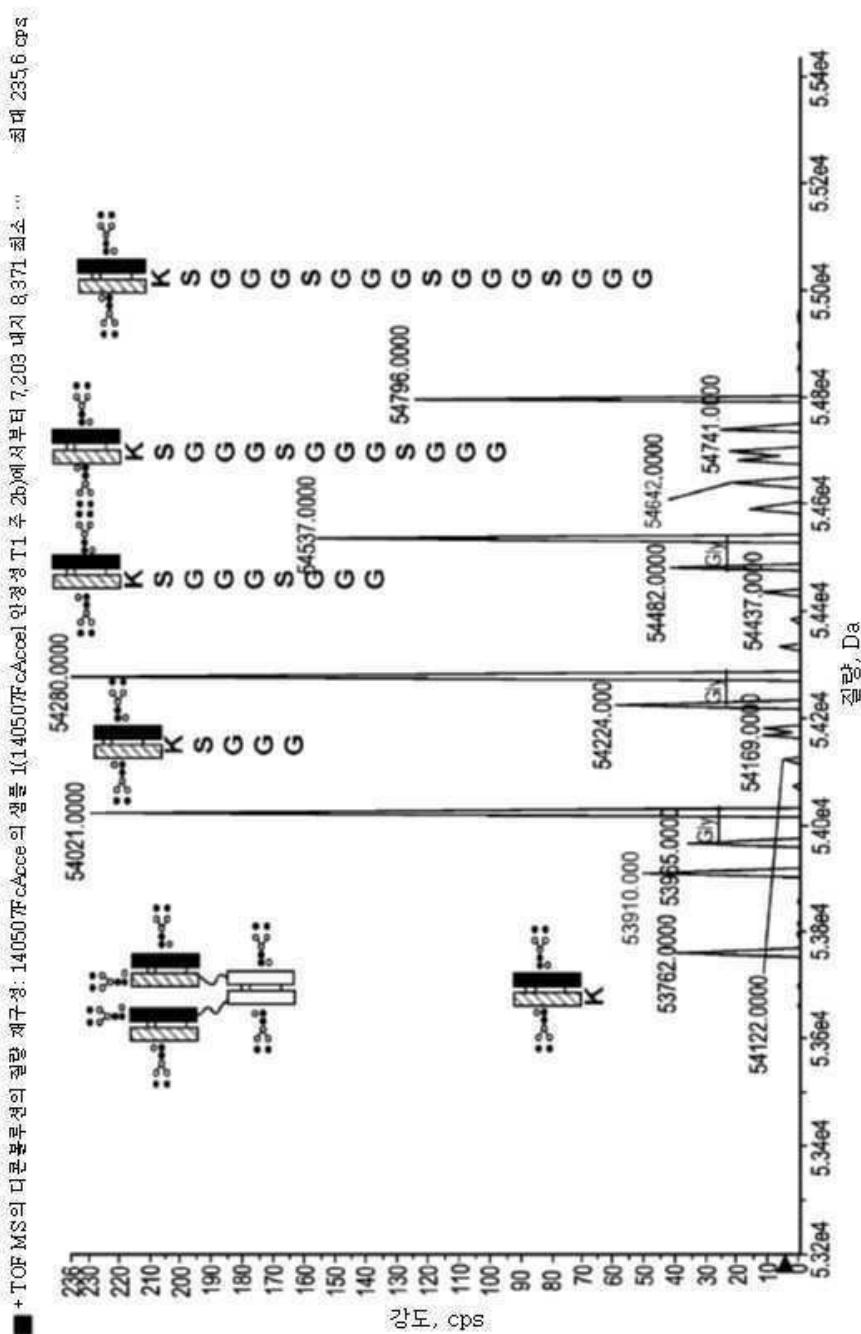
도면4



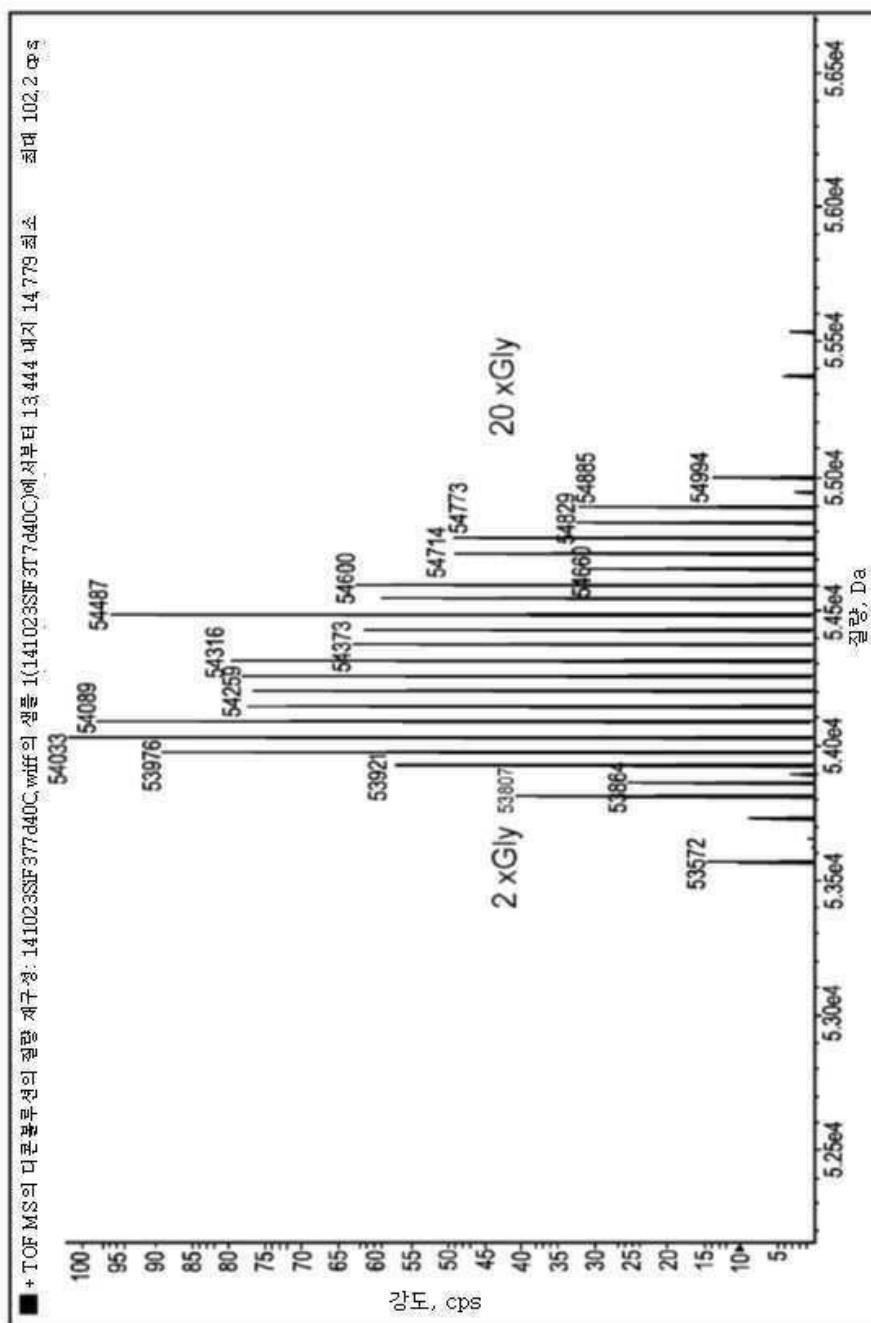
도면5



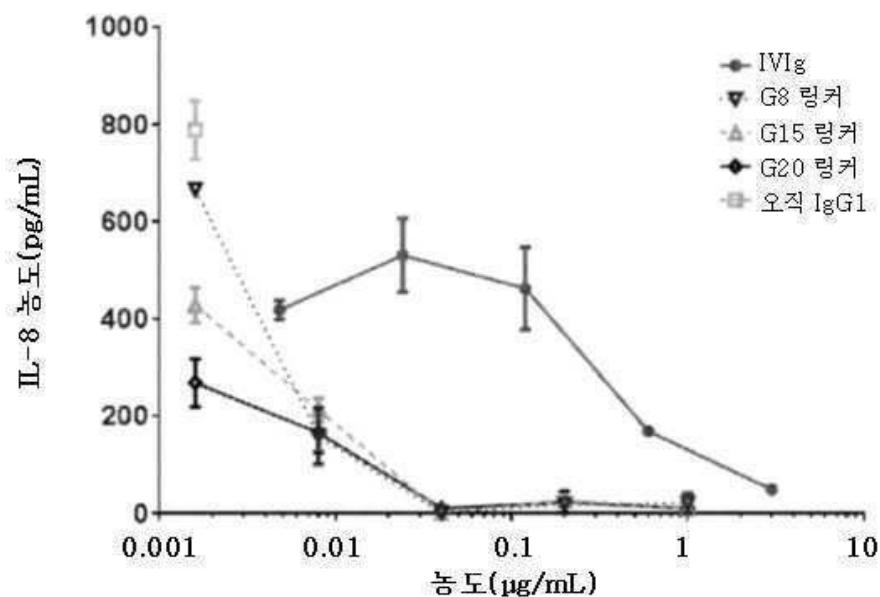
도면6



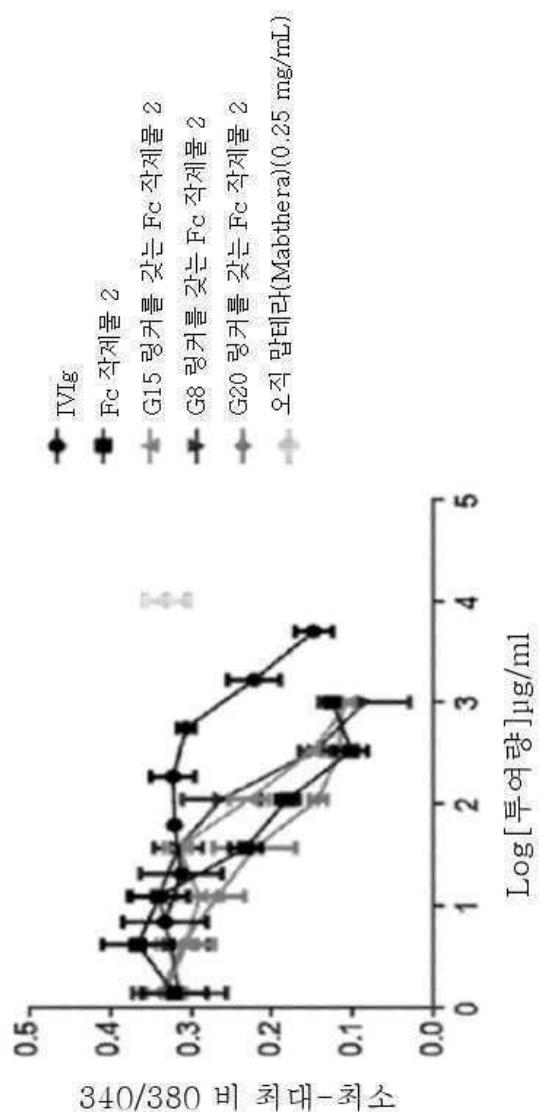
도면7



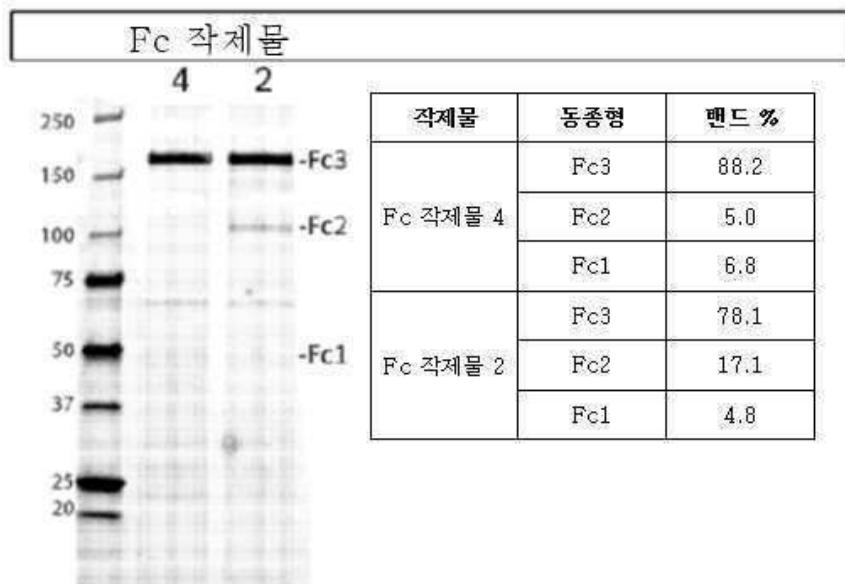
도면8



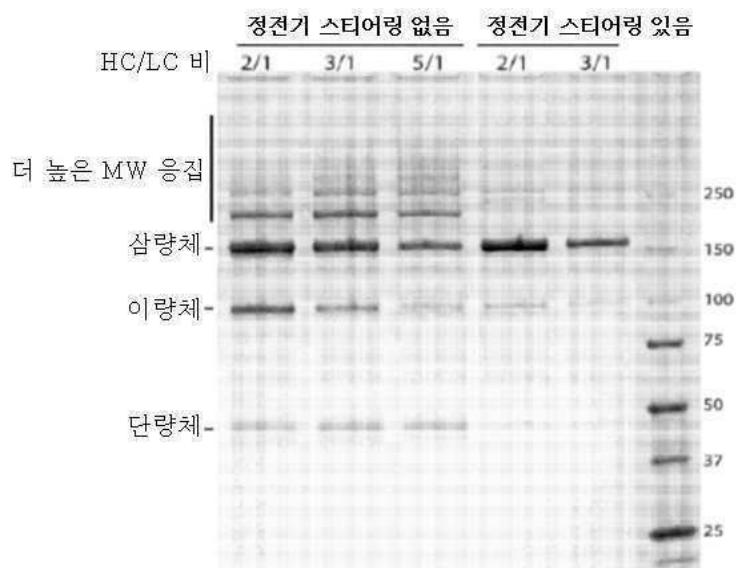
도면9



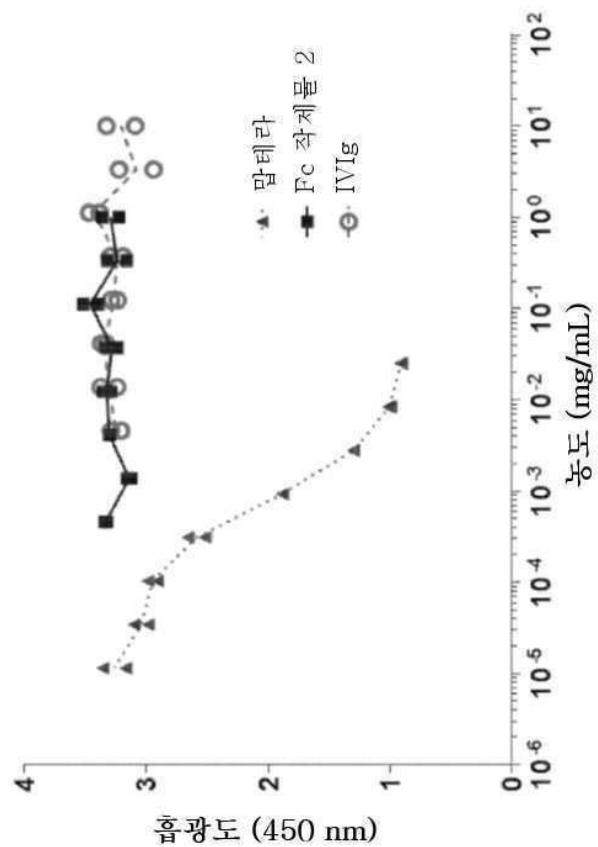
도면10



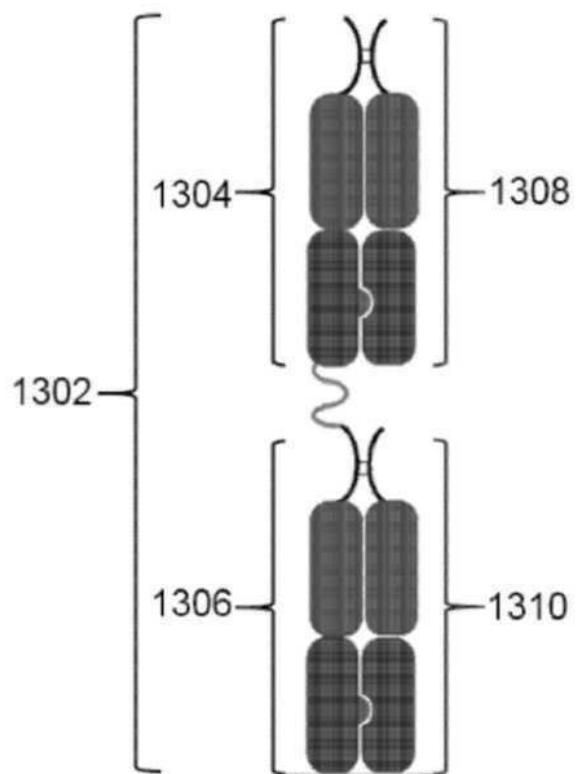
도면11



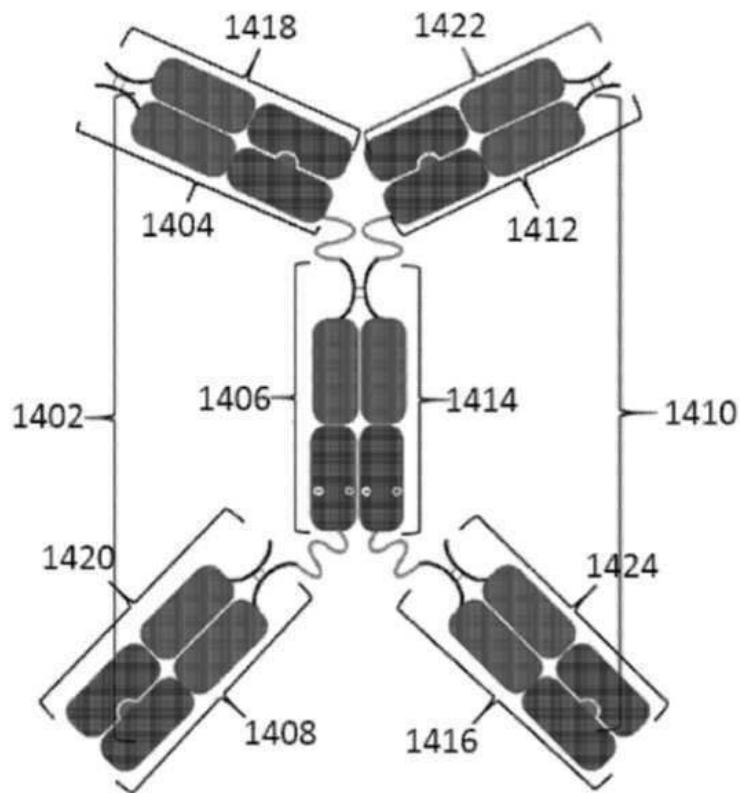
도면12



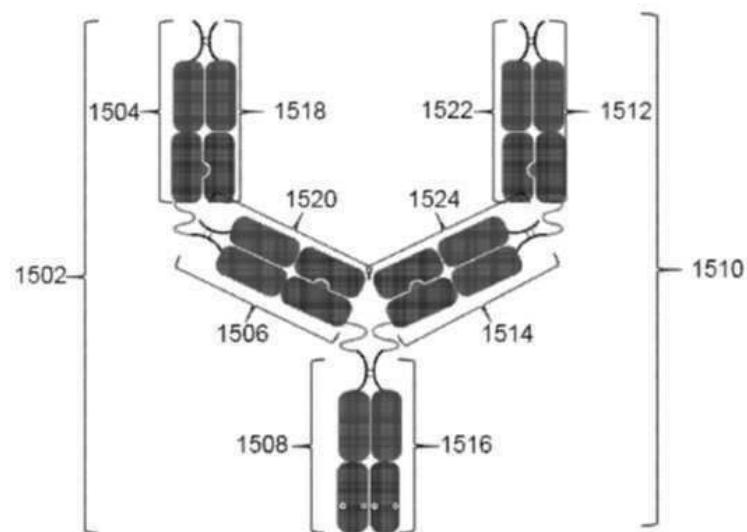
도면13



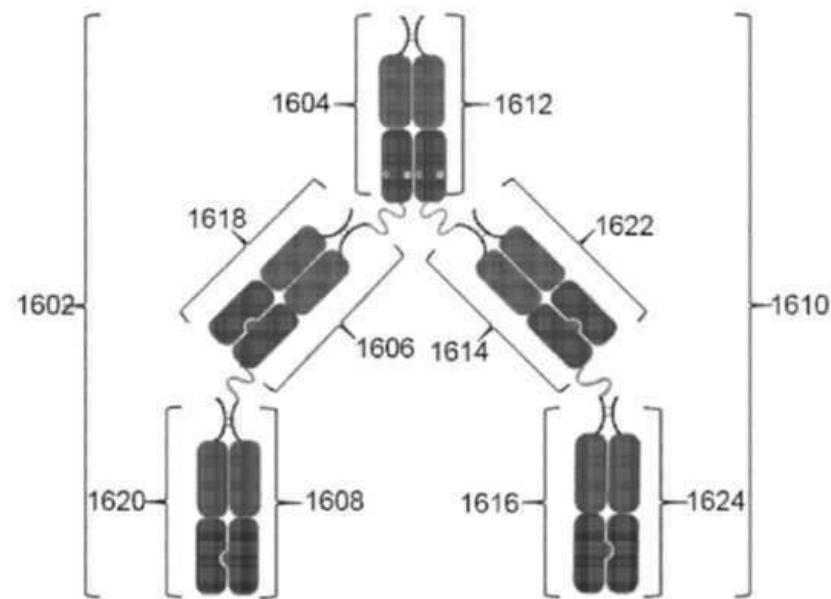
도면14



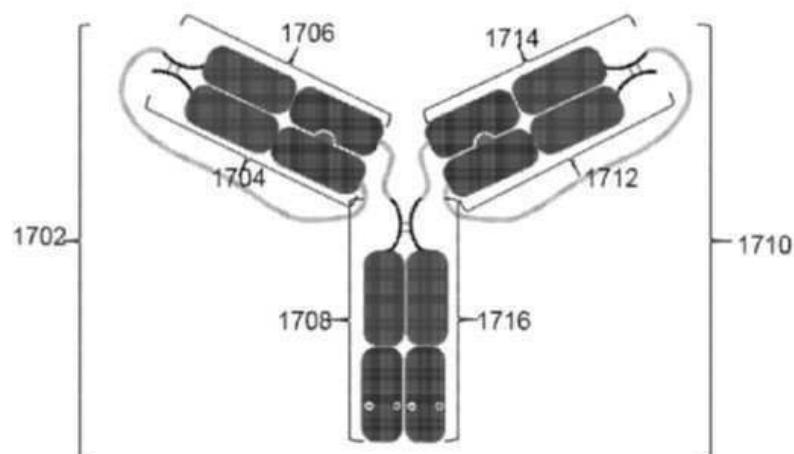
도면15



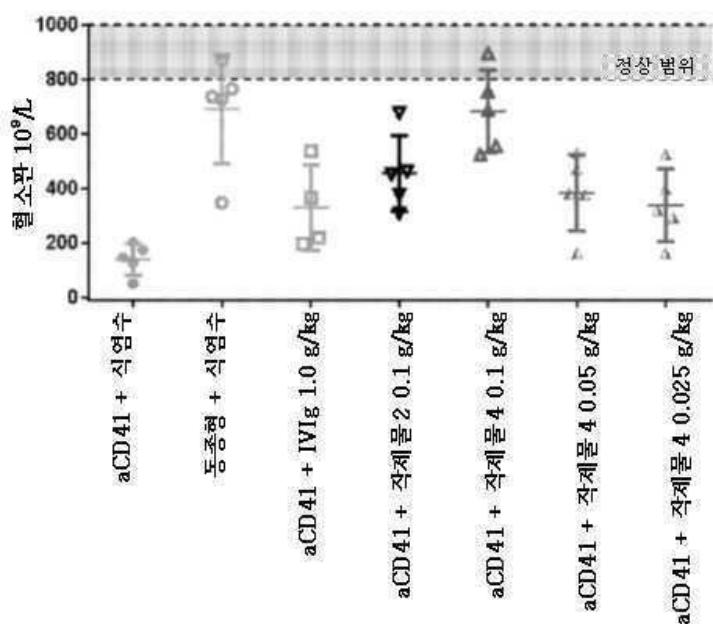
도면16



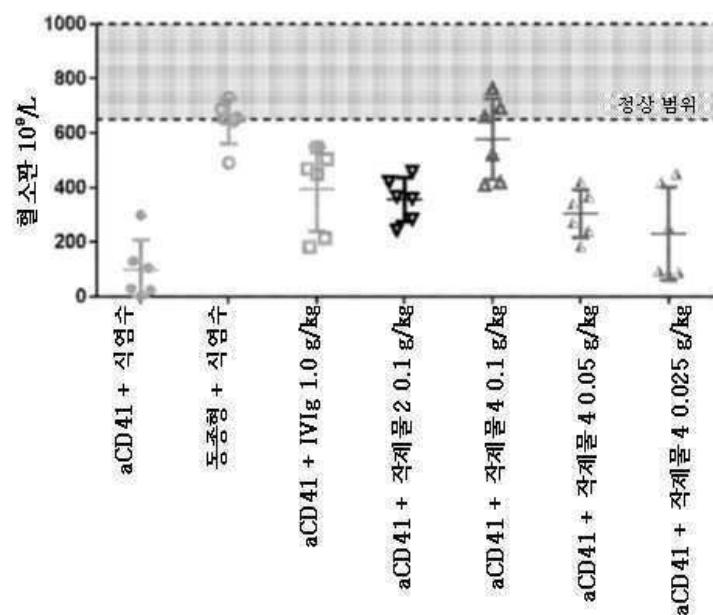
도면17



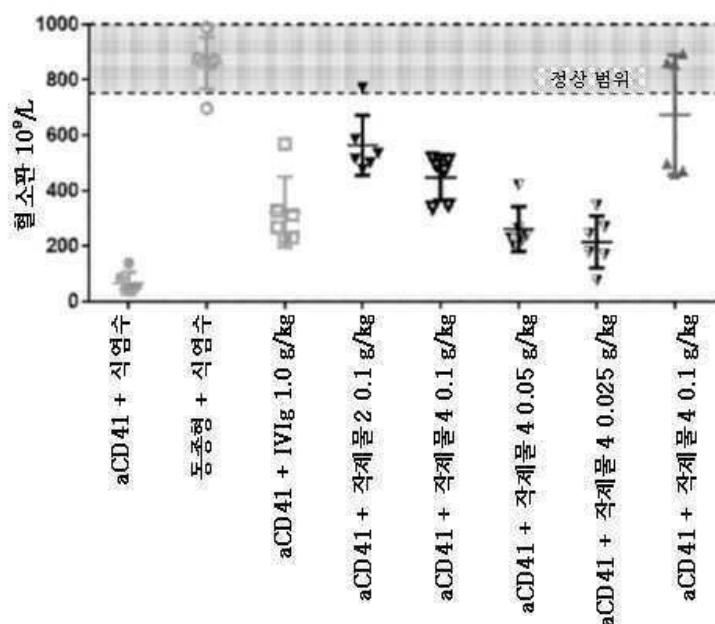
도면18



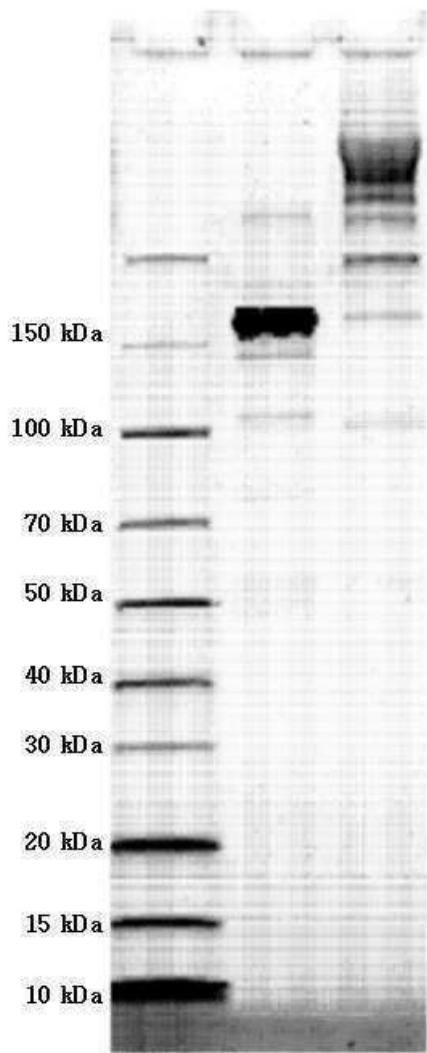
도면19



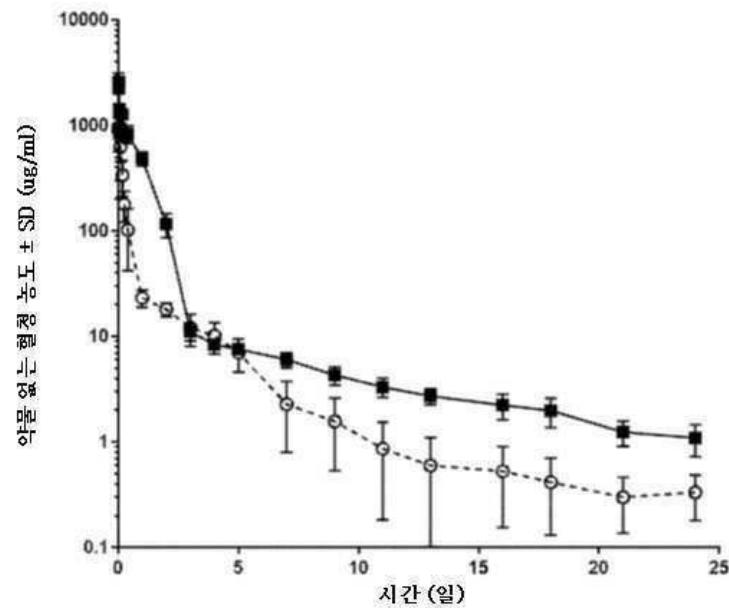
도면20



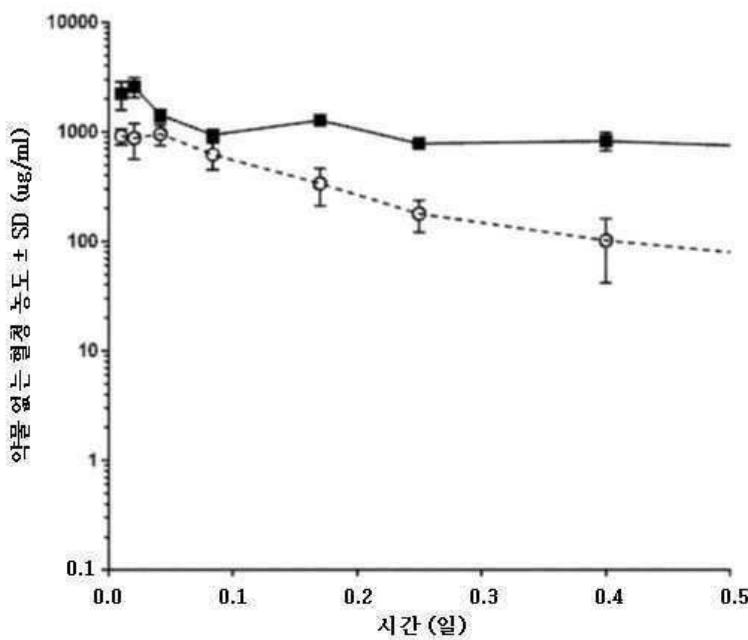
도면21



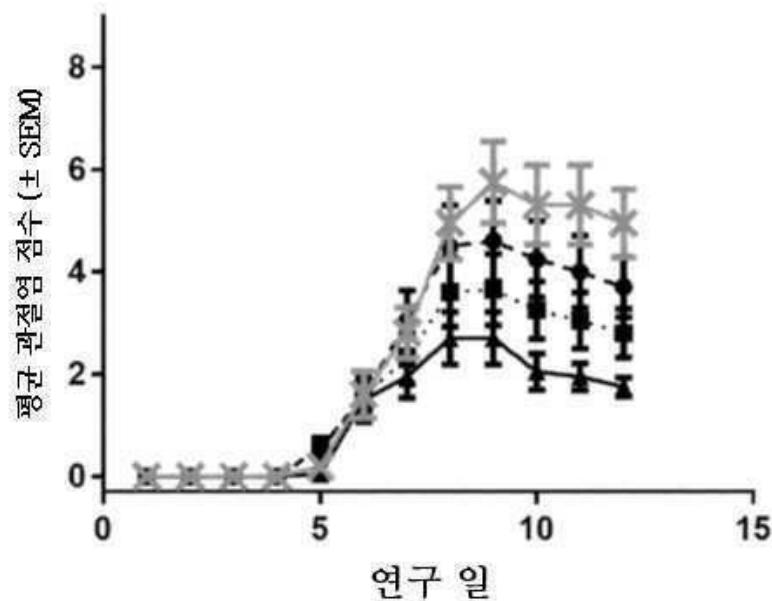
도면22



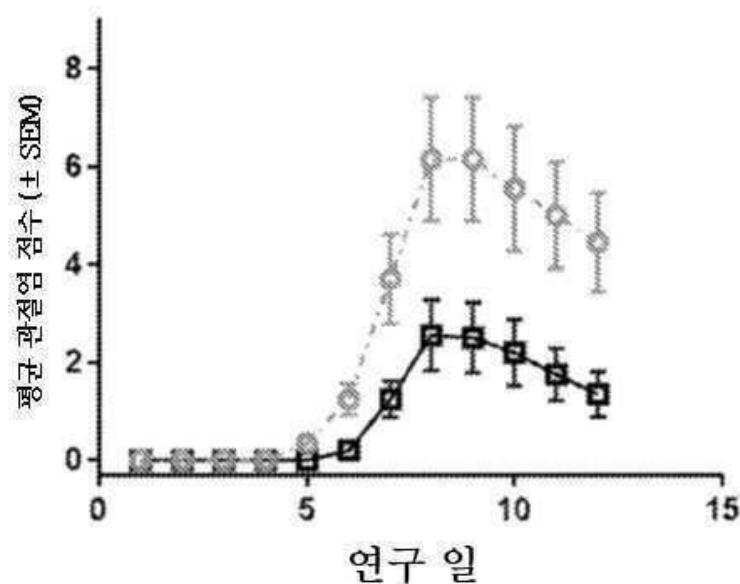
도면23



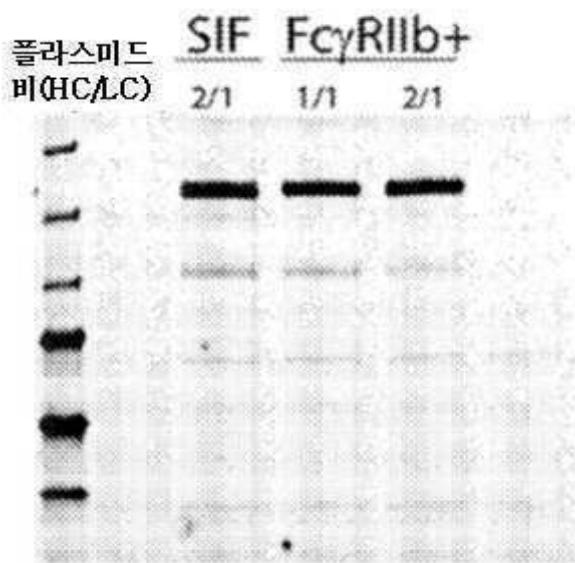
도면24



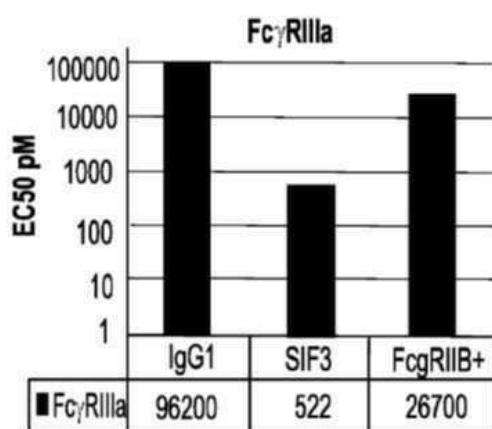
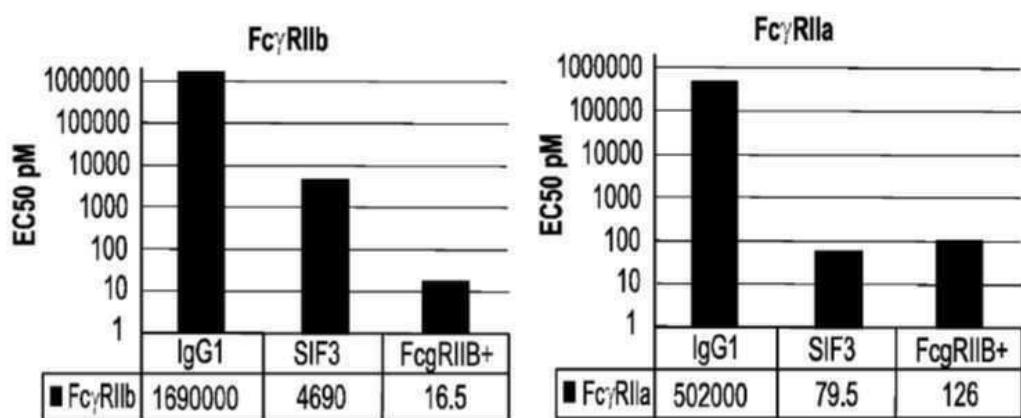
도면25



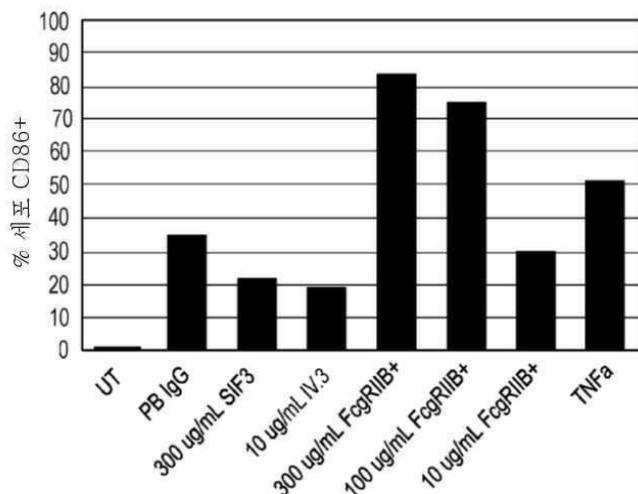
도면26



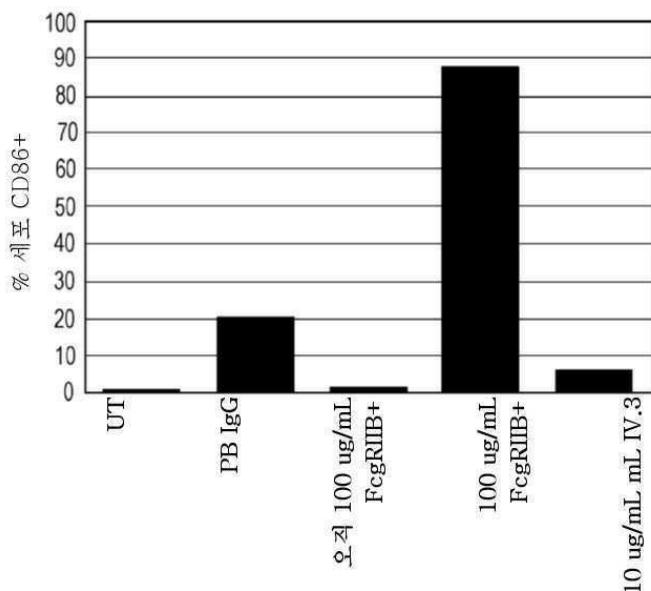
도면27



도면28



도면29



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS RELATED TO ENGINEERED Fc CONSTRUCTS

<130> 14131-0148W02

<150> US 62/340,322

<151> 2016-05-23

<150> US 62/443,451

<151> 2017-01-06

<160> 62

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 1

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 2

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 3

Ser Gly Gly Gly

1

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 4

Gly Ser Gly Ser

1

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 5

Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5

<210>

6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 6

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<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> synthetic polypeptide

<400> 8

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 9

Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 10

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<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> synthetic polypeptide

<400> 12

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 13

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

1 5 10

<210> 14

<211

> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 14

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

1 5 10 15

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 15

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

1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly

20

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 16

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 17

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

1 5 10 15

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> synthetic polypeptide

<400> 18

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

1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly

20

<210> 19

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 19

Gly Gly Gly Gly

1

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 20

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 21

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 22

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 22

Gly Gly

1 5 10 15

<210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 23

Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly

20

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 24

Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 25

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 26

Gly Gly

1 5 10 15

<210> 27

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 27

Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly

20

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<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> synthetic polypeptide

<400> 29

Ser Ala Cys Tyr Cys Glu Leu Ser

1 5

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 30

Arg Ser Ile Ala Thr

1 5

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<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> synthetic polypeptide

<400> 32

Gly Gly Ser Ala Gly 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

| | | |
|---|----|----|
| 20 | 25 | 30 |
| Thr Gly Ser Gly | | |
| 35 | | |
| <210> 33 | | |
| <211> 17 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220><223> synthetic polypeptide | | |
| <400> 33 | | |
| Ala Ala Ala Asn Ser Ser Ile Asp Leu Ile Ser Val Pro Val Asp Ser | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Arg | | |
| <210> 34 | | |
| <211> 36 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220><223> synthetic polypeptide | | |
| <400> 34 | | |
| Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Ser Glu Gly Gly Ser Glu Gly Gly Ser Glu Gly Gly Ser | | |
| 20 | 25 | 30 |
| Gly Gly Gly Ser | | |
| 35 | | |
| <210> 35 | | |
| <211> 12 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220><223> synthetic polypeptide | | |
| <400> 35 | | |
| Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser | | |
| 1 | 5 | 10 |

<210> 36

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 36

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

1 5 10 15

Gly Ser

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 37

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10

<210> 38

<211> 6

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 38

His His His His His His

1 5

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 39

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 40

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 41

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1 5

<210> 42

<211> 227

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<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> 474

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 43

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

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

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

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

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 290 | 295 | 300 | |
| Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu | | | |
| 325 | 330 | 335 | |
| His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn | | | |
| 340 | 345 | 350 | |
| Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly | | | |
| 355 | 360 | 365 | |
| Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu | | | |
| 370 | 375 | 380 | |
| Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn | | | |
| 405 | 410 | 415 | |
| Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe | | | |
| 420 | 425 | 430 | |
| Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn | | | |
| 435 | 440 | 445 | |
| Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr | | | |
| 450 | 455 | 460 | |
| Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys | | | |
| 465 | 470 | | |
| <210> 44 | | | |
| <211> 227 | | | |
| <212> PRT | | | |
| <213> Artificial Sequence | | | |
| <220><223> 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> 473
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> 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 Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gly Lys Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu | | | |
| 325 | 330 | 335 | |
| His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn | | | |
| 340 | 345 | 350 | |
| Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly | | | |
| 355 | 360 | 365 | |
| Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu | | | |
| 370 | 375 | 380 | |
| Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn | | | |
| 405 | 410 | 415 | |
| Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe | | | |
| 420 | 425 | 430 | |
| Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn | | | |
| 435 | 440 | 445 | |
| Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr | | | |
| 450 | 455 | 460 | |
| Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly | | | |
| 465 | 470 | | |

<210> 46

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 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> 468

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 47

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

| | | |
|---|-----|-----|
| 420 | 425 | 430 |
| Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Leu Ser Pro Gly | | |
| 465 | | |
| <210> 48 | | |
| <211> 226 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220><223> synthetic polypeptide | | |
| <400> 48 | | |
| Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly | | |
| 1 | 5 | 10 |
| 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 |
| 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 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> 473

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 49

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
 225 230 235 240

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

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

465 470

<210> 50

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 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> 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 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> 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> 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 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> 474

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 54

Gln 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 30Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45Glu 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 95Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110Glu 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 160Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gly Lys Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435

440

445

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

450

455

460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465 470

<210> 55

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 55

Gln 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 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> 56

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 56

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

465 470

<210> 57

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 57

Gln 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 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 |
| 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> 58 | | |
| <211> 468 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220><223> synthetic polypeptide | | |
| <400> 58 | | |
| Gln Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly | | |
| 1 | 5 | 10 |
| 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 | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val | | | |
| | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 340 345 350
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 370 375 380
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415
 Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Asp Leu
 420 425 430
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460
 Leu Ser Pro Gly
 465
 <210> 59

<211> 226
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic polypeptide
 <400> 59
 Gln 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 |
| 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 |
| 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> 60 | | |
| <211> 473 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220><223> synthetic polypeptide | | |
| <400> 60 | | |
| Gln 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 | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys | | | |
| 245 | 250 | 255 | |

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

465 470

<210> 61

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 61

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 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
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 245 250 255
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu 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 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> 62

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 62

Gln 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 | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| 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