(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년06월26일
(11) 등록번호 10-2546875
(24) 등록일자 2023년06월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/46 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01) *C07K 16/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/46 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7029772
(22) 출원일자(국제) 2015년05월01일
심사청구일자 2020년04월29일
(85) 번역문제출일자 2016년10월25일
(65) 공개번호 10-2016-0147762
(43) 공개일자 2016년12월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/028926
(87) 국제공개번호 WO 2015/168643
국제공개일자 2015년11월05일
(30) 우선권주장
61/987,863 2014년05월02일 미국(US)
62/081,923 2014년11월19일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020100028599 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
모멘타 파머슈티컬스 인코포레이티드
미국 뉴저지 08560 타이터스빌 토렌턴-하버턴 로드 1125
(72) 발명자
보스퀘스 카를로스 제이.
미국 매사추세츠주 02476 알링턴 에이피티. 7 브래틀 스트리트 40
휴스턴 제임스 에스.
미국 매사추세츠주 뉴턴 코넬 스트리트 126
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장훈

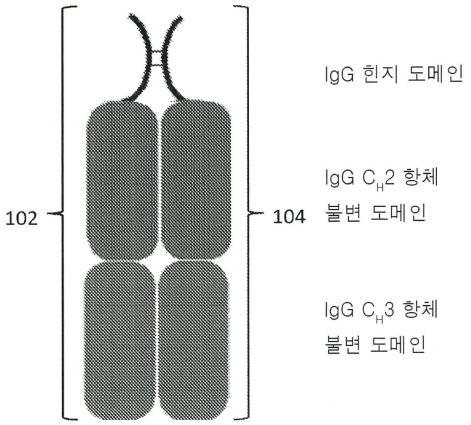
전체 청구항 수 : 총 15 항 심사관 : 김종호

(54) 발명의 명칭 **공학처리된 F C 작제물과 관련된 조성물 및 방법**

(57) 요 약

본 발명은 공학처리된 IgG Fc 작제물의 조성물 및 방법에 관한 것으로, 상기 Fc 작제물은 하나 이상의 Fc 도메인을 포함한다.

대 표 도 - 도1



작제물 1

(52) CPC특허분류
C07K 14/00 (2013.01)
C07K 16/00 (2013.01)
C07K 16/283 (2013.01)
C07K 2317/14 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/526 (2013.01)
C07K 2317/60 (2013.01)
C07K 2319/30 (2013.01)
(72) 발명자
랜싱 조나단 씨.
미국 매사추세츠주 01867 레딩 우번 스트리트 220
링 레오나 이.
미국 매사추세츠주 01890 윈체스터 펠스 로드 45
미도르 제임스
미국 매사추세츠주 01702 프레이밍햄 그라이즈보스카 써클 38
오리츠 다니엘
미국 매사추세츠주 02476 알링턴 몰턴 로드 18
루티츠키 로라
미국 매사추세츠주 02144 소머빌 클라렌든 애비뉴 70

명 세 서

청구범위

청구항 1

a). 화학식 A-L-B를 갖는 제1 폴리펩티드로서,

i). A가 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고;

ii). L이 링커이고;

iii). B가 제2 Fc 도메인 단량체를 포함하는, 제1 폴리펩티드;

b). 화학식 A'-L'-B'를 갖는 제2 폴리펩티드로서,

i). A'가 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하고;

ii). L'가 링커이고;

iii). B'가 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하는, 제2 폴리펩티드;

c). 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제3 폴리펩티드; 및

d). 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제4 폴리펩티드를 포함하는, Fc 작제물로서,

상기 제1 폴리펩티드의 A 및 상기 제2 폴리펩티드의 A'가 조합되어 제1 Fc 도메인을 형성하고, 상기 제1 폴리펩티드의 B 및 상기 제5 Fc 도메인 단량체가 조합되어 제2 Fc 도메인을 형성하고, 상기 제2 폴리펩티드의 B' 및 상기 제6 Fc 도메인 단량체가 조합되어 제3 Fc 도메인을 형성하고,

상기 제1 Fc 도메인 단량체, 상기 제2 Fc 도메인 단량체, 상기 제3 Fc 도메인 단량체, 상기 제4 Fc 도메인 단량체, 상기 제5 Fc 도메인 단량체, 및 상기 제6 Fc 도메인 단량체는 각각 인간 IgG1 CH2 도메인 단량체 및 인간 IgG1 CH3 도메인 단량체를 포함하고, 각각의 CH3 도메인 단량체는 Fc 도메인 단량체들의 상보성 이합체화를 촉진하기 위해 10개 이하의 단일 아미노산 치환을 가지고, 상기 제1 폴리펩티드는 상기 제2 폴리펩티드와 동일한 아미노산 서열을 가지고, 상기 제3 폴리펩티드는 상기 제4 폴리펩티드와 동일한 아미노산 서열을 가지고,

상기 제1 Fc 도메인 단량체 및 상기 제3 Fc 도메인 단량체의 상기 CH3 도메인 단량체들은 각각 상기 제1 Fc 도메인 단량체와 상기 제3 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 상보성 이합체화 선택성 모듈을 포함하고, 상기 제2 Fc 도메인 단량체 및 상기 제5 Fc 도메인 단량체의 상기 CH3 도메인 단량체들은 각각 상기 제2 Fc 도메인 단량체와 상기 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 상보성 이합체화 선택성 모듈을 포함하고, 상기 제4 Fc 도메인 단량체 및 상기 제6 Fc 도메인 단량체의 상기 CH3 도메인 단량체들은 각각 상기 제4 Fc 도메인 단량체와 상기 제6 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 상보성 이합체화 선택성 모듈을 포함하고,

상기 제1 Fc 도메인 단량체 및 상기 제3 Fc 도메인 단량체의 상기 상보성 이합체화 선택성 모듈들은 각각 상기 제1 Fc 도메인 단량체 및 상기 제3 Fc 도메인 단량체의 상기 CH3 도메인 단량체들 사이의 계면에서 하전된 잔기의 고리 내의 적어도 2개의 위치에서 반대 전하 돌연변이를 포함하고,

상기 제2 Fc 도메인 단량체 및 상기 제5 Fc 도메인 단량체의 상기 상보성 이량체화 선택성 모듈들 중의 하나는 공학처리된 융기(protuberance)를 포함하고, 상기 제2 Fc 도메인 단량체 및 상기 제5 Fc 도메인 단량체의 상기 상보성 이량체화 선택성 모듈들 중의 다른 하나는 공학처리된 공동(cavity)을 포함하고,

상기 제4 Fc 도메인 단량체 및 상기 제6 Fc 도메인 단량체의 상기 상보성 이량체화 선택성 모듈들 중의 하나는 공학처리된 융기를 포함하고, 상기 제4 Fc 도메인 단량체 및 상기 제6 Fc 도메인 단량체의 상기 상보성 이량체화 선택성 모듈들 중의 다른 하나는 공학처리된 공동을 포함하는, Fc 작제물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 적어도 2개의 위치에서 상기 반대 전하 돌연변이는 K409D/D339K, K392D/D399K, E357K/K370E, D356K/K439D, K409E/D339K, K392E/D399K, E357K/K370D, 또는 D356K/K439E이고, 상기 모든 위치는 EU 케이뱃 넘버링 시스템(EU Kabat numbering system)을 이용하는, Fc 작제물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 제1 Fc 도메인 단량체 및 상기 제3 Fc 도메인 단량체의 상기 상보성 이합체화 선택성 모듈들은 상기 제1 Fc 도메인 단량체 및 상기 제3 Fc 도메인 단량체의 상기 CH3 도메인 단량체들 사이의 계면에서 4개의 위치에서 4중 반대 전하 돌연변이를 포함하는, Fc 작제물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 4중 반대 전하 돌연변이들이 K409D/D339K, K392D/D399K, E357K/K370E, D356K/K439D, K409E/D339K, K392E/D399K, E357K/K370D, 및 D356K/K439E로부터 선택된 이중 돌연변이들의 임의의 쌍을 조합시키며, 상기 모든 위치는 EU 케이뱃 넘버링 시스템을 이용하는, Fc 작제물.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 제2 Fc 도메인 단량체 및 상기 제4 Fc 도메인 단량체의 상기 상보성 이량체화 선택성 모듈들은 각각 공학처리된 융기를 포함하고, 상기 제5 Fc 도메인 단량체 및 상기 제6 Fc 도메인 단량체의 상기 상보성 이량체화 선택성 모듈들은 각각 공학처리된 공동을 포함하는, Fc 작제물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 공학처리된 융기는 S354C, T366W, T366Y, T394W, T394F, 및 F405W로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 돌연변이를 포함하고, 상기 공학처리된 공동은 Y349C, T366S, L368A, Y407V, Y407T, Y407A, F405A, 및 T394S로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 돌연변이를 포함하고, 상기 모든 위치는 EU 케이뱃 넘버링 시스템을 이용하는, Fc 작제물.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 제2 Fc 도메인 단량체 및 상기 제4 Fc 도메인 단량체의 상기 상보성 이량체화 선택성 모듈들은 각각 공학처리된 공동을 포함하고, 상기 제5 Fc 도메인 단량체 및 상기 제6 Fc 도메인 단량체의 상기 상보성 이량체화 선택성 모듈들은 각각 공학처리된 융기를 포함하는, Fc 작제물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 공학처리된 공동은 Y349C, T366S, L368A, Y407V, Y407T, Y407A, F405A, 및 T394S로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 돌연변이를 포함하고, 상기 공학처리된 융기는 S354C, T366W, T366Y, T394W, T394F, 및 F405W로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 돌연변이를 포함하고, 상기 모든 위치는 EU 케이뱃 넘버링 시스템을 이용하는, Fc 작제물.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 Fc 작제물이 3개 이하의 Fc 도메인을 함유하는, Fc 작제물.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 Fc 작제물에서 하나 이상의 링커가 스페이서인, Fc 작제물.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 제2 Fc 도메인 단량체 및 상기 제5 Fc 도메인 단량체의 상기 아미노산 서열들은 2개의 아미노산이 상이하고, 상기 제4 Fc 도메인 단량체 및 상기 제6 Fc 도메인 단량체의 상기 아미노산 서열들은 2개의 아미노산이 상이한, Fc 작제물.

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 제2 Fc 도메인 단량체는 상기 제5 Fc 도메인 단량체와 상이한 아미노산 서열을 포함하고, 상기 제4 Fc 도메인 단량체는 상기 제6 Fc 도메인 단량체와 상이한 아미노산 서열을 포함하는, Fc 작제물.

청구항 20

삭제

청구항 21

제1항, 제4항 내지 제6항, 제9항 내지 제14항, 제18항 및 제19항 중 어느 한 항에 따르는 Fc 작제물 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는, 자가면역 질환 또는 염증 질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 자가면역 질환 치료에 사용하기 위한, 약학적 조성물.

청구항 23

제21항에 있어서, 염증 질환 치료에 사용하기 위한, 약학적 조성물.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

배 경 기 술

[0001] 치료 단백질, 예를 들어, 치료 항체 및 Fc-융합 단백질은 급속하게 면역학적 질병 및 염증 질병을 갖는 환자에 대한 임상적으로 중요한 약물 부류가 되고 있다.

발명의 내용

[0002] 본 발명은 생물학적 활성 Fc 도메인-함유 치료 작제물을 특징으로 한다. 상기 작제물은 바람직한 혈청 반감기 및/또는 Fc 수용체에 대한 결합 친화성 및/또는 결합성을 가질 수 있다. 이들 작제물은, 예를 들어, 대상체에서 염증을 감소시키고, 대상체에서 자가항체의 청소를 촉진하고, 대상체에서 항원 제시를 억제하고, 대상체에서 면역 반응을 차단하고, 예를 들어, 면역 반응의 면역 복합체-기반 활성화를 차단하고, 대상체에서 면역학적 질병 및 염증 질병(예를 들어, 자가면역 질병)을 치료하는데 유용하다. 본원에 기재된 Fc 작제물은 면역 세포의 유의한 자극 없이 면역학적 질병 및 염증 질병을 갖는 환자를 치료하는데 이용될 수 있다.

[0003] 일반적으로, 본 발명은 2 내지 10개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물, 예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, Fc 작제물은 2 내지 10개의 Fc 도메인, 2 내지 5개의 Fc 도메인, 3 내지 5개의 Fc 도메인, 2 내지 8개의 Fc 도메인, 또는 2 내지 6개의 Fc 도메인을 포함한다. 작제물은 2 내지 6개(예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개)의 회합된 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 각각의 폴리펩티드는 적어도 하나의 Fc 도메인 단량체를 포함하며, 작제물의 각각의 Fc 도메인 단량체는 작제물의 또 다른 단량체와 동일하거나 20개 이하의 아미노산(예를 들어, 15개 이하, 10개 이하의 아미노산), 예를 들어, 20개, 15개, 10개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개 또는 2개 이하의 아미노산까지 상이하다. 본원에 기재된 Fc 작제물은 면역글로불린의 항원-결합 도메인을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, Fc 작제물(또는 Fc 작제물 내의 Fc 도메인)은 다양한 폴리펩티드에 존재하는 Fc 도메인 단량체의 회합에 의해 전적으로 또는 부분적으로 형성된다. 특정 구현예에서, Fc 작제물은 2개의 폴리펩티드의 회합을 촉진하는 추가 도메인(예를 들어, IgM 테일피스(tailpiece) 또는 IgA 테일피스)을 포함하지 않는다. 다른 구현예에서, Fc 도메인을 형성하기 위해 연결되는 2개의 Fc 도메인 단량체 사이에만 Fc 작제물에 공유 결합이 존재한다. 다른 구현예에서, Fc 작제물은 Fc 도메인 사이에 공유 결합을 포함하지 않는다. 또 다른 구현예에서, Fc 작제물은 Fc 작제물 내의 Fc 도메인의 모두 또는 실질적으로 모두가 세포 표면 상의 Fc 수용체와 동시에 상호작용할 수 있도록 하기에 충분한 구조적 가요성을 제공한다. 일부 구현예에서, Fc 작제물은 링커(예를 들어, 가요성 아미노산 스페이서)를 통해 연결된 적어도 2개의 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 도메인 단량체는 이들이 이합체화 선택성 모듈을 갖는 점에서 야생형에 대해 또는 서로에 대해 일차 서열에 있어서 상이하다.

[0004] 본 발명의 Fc 작제물은 본원에 기재된 것과 같은 2 내지 10개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물, 예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개의 Fc 도메인을 갖는 작제물의 실질적으로 상동성인 집단(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 상동성)을 포함하는 약학적 조성물로 존재할 수 있다. 결과로서, Fc 작제물의 실질적 응집 또는 원치 않는 다합체화를 갖지 않는 약학적 조성물이 생성될 수 있다.

[0005] 한 양태에서, Fc 작제물은 2개의 Fc 도메인을 형성하는 3개의 폴리펩티드를 포함한다. 제1 폴리펩티드는 화학식 A-L-B를 가지며, 여기서 A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고; L은 링커이고; B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 제2 폴리펩티드는 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하고, 제3 폴리펩티드는 제4 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 이러한 양태에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 조합되어 제1 Fc 도메인을 형성한다. 유사하게, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 조합되어 제2 Fc 도메인을 형성한다. 본 발명의 이러한 양태의 예시적 Fc 작제물은 도 4 및 도 6에 예시되어 있다.

[0006] 특정 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 이들 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 상보성 이합체화 선택성 모듈을 포함한다. 다른 구현예에서, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 이들 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 상보성 이합체화 선택성 모듈을 포함한다.

[0007] 특정 구현예에서, A, B, 제2 폴리펩티드, 및 제3 폴리펩티드 중 하나 이상은 Fc 도메인 단량체로 구성된다. 한 구현예에서, A, B, 제2 폴리펩티드, 및 제3 폴리펩티드 각각은 Fc 도메인 단량체로 구성된다.

[0008] 특정 구현예에서, Fc 작제물은 이종성 모이어티, 예를 들어, 펩티드, 예를 들어, 혈청 단백질, 예를 들어, 알부민-결합 펩티드에 결합하는 펩티드를 추가로 포함할 수 있다. 모이어티는, 예를 들어, 링커에 의해 B 또는 제3 폴리펩티드의 N-말단 또는 카르복시-말단에 연결될 수 있다.

[0009] 특정 구현예에서, Fc 작제물은 IgG C_L 항체 불변 도메인 및 IgG C_H1 항체 불변 도메인을 추가로 포함한다. IgG C_H1 항체 불변 도메인은, 예를 들어, 링커에 의해 A 또는 제2 폴리펩티드의 N-말단에 부착될 수 있다.

[0010] 다른 구현예에서, Fc 작제물의 제2 및 제3 폴리펩티드는 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0011] 또 다른 양태에서, 본 발명은 3개의 Fc 도메인을 형성하는 4개의 폴리펩티드를 포함하는 Fc 작제물을 특징으로

한다. 제1 폴리펩티드는 화학식 A-L-B를 가지며, 여기서 A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고; L은 링커이고; B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 제2 폴리펩티드는 화학식 A'-L'-B'을 가지며, 여기서 A'은 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하고; L'은 링커이고; B'은 제4 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 제3 폴리펩티드는 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하고, 제4 폴리펩티드는 제6 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 이러한 양태에서, A 및 A'은 조합되어 제1 Fc 도메인을 형성하고, B 및 제5 Fc 도메인 단량체는 조합되어 제2 Fc 도메인을 형성하고, B' 및 제6 Fc 도메인 단량체는 조합되어 제3 Fc 도메인을 형성한다. 본 발명의 이러한 양태의 예시적 Fc 작제물은 도 5에 예시되어 있다.

[0012] 특정 구현예에서, A 및 A' 각각은 이들 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 이합체화 선택성 모듈을 포함한다. 다른 구현예에서, B 및 제5 Fc 도메인 단량체 각각은 이들 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 이합체화 선택성 모듈을 포함한다. 또 다른 구현예에서, B' 및 제6 Fc 도메인 단량체 각각은 이들 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 이합체화 선택성 모듈을 포함한다.

[0013] 특정 구현예에서, A, B, A', B', 제3 폴리펩티드, 및 제4 폴리펩티드 중 하나 이상은 Fc 도메인 단량체로 구성된다. 한 구현예에서, A, B, A', B', 제3 폴리펩티드, 및 제4 폴리펩티드 각각은 Fc 도메인 단량체로 구성된다.

[0014] 특정 구현예에서, Fc 작제물은 IgG C_L 항체 불변 도메인 및 IgG C_H1 항체 불변 도메인을 추가로 포함하며, IgG C_L 항체 불변 도메인은 링커에 의해 IgG C_H1 항체 불변 도메인의 N-말단에 부착되고, IgG C_H1 항체 불변 도메인은, 예를 들어, 링커에 의해 A의 N-말단에 부착된다. 한 구현예에서, Fc 작제물은 제2 IgG C_L 항체 불변 도메인 및 제2 IgG C_H1 항체 불변 도메인을 추가로 포함하며, 제2 IgG C_L 항체 불변 도메인은, 예를 들어, 링커에 의해 제2 IgG C_H1 항체 불변 도메인의 N-말단에 부착되고, 제2 IgG C_H1 항체 불변 도메인은, 예를 들어, 링커에 의해 A'의 N-말단에 부착된다.

[0015] 특정 구현예에서, Fc 작제물은 이종성 모이어티, 예를 들어, 펩티드, 예를 들어, 링커에 의해 B 또는 B'의 N-말단 또는 C-말단에 연결된 알부민-결합 펩티드를 추가로 포함한다.

[0016] 다른 구현예에서, Fc 작제물의 제1 및 제2 폴리펩티드는 동일한 아미노산 서열을 갖고, Fc 작제물의 제3 및 제4 폴리펩티드는 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0017] 또 다른 양태에서, 본 발명은 2개의 폴리펩티드를 포함하는 Fc 작제물을 특징으로 한다. 제1 폴리펩티드는 화학식 A-L-B를 가지며, 여기서 A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고; L은 링커이고; B는 혈청 단백질-결합 모이어티, 예를 들어, 알부민 결합 펩티드를 포함한다. 제2 폴리펩티드는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 이러한 양태에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제2 Fc 도메인 단량체는 조합되어 Fc 도메인을 형성한다.

[0018] 특정 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제2 Fc 도메인 단량체는 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 상보성 이합체화 선택성 모듈을 포함한다.

[0019] 특정 구현예에서, A 및 제2 폴리펩티드 각각은 Fc 도메인 단량체로 구성된다.

[0020] 또 다른 양태에서, 본 발명은 2개의 폴리펩티드를 포함하는 Fc 작제물을 특징으로 한다. 제1 폴리펩티드는 화학식 A-L1-B-L2-C를 가지며, 여기서 A는 IgG C_L 항체 불변 도메인을 포함하고; L1 및 L2는 각각 링커이고; B는 IgG C_H1 항체 불변 도메인을 포함하고; C는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 제2 폴리펩티드는 화학식 A'-L1'-B'-L2'-C'을 가지며, 여기서 A'은 IgG C_L 항체 불변 도메인을 포함하고; L1' 및 L2'은 각각 링커이고; B'은 IgG C_H1 항체 불변 도메인을 포함하고; C'은 제2 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 이러한 양태에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제2 Fc 도메인 단량체는 조합되어 Fc 도메인을 형성한다. 본 발명의 이러한 양태의 예시적 Fc 작제물은 도 7a에 예시되어 있다.

[0021] 특정 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제2 Fc 도메인 단량체는 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 이합체화 선택성 모듈을 포함한다.

[0022] 특정 구현예에서, C 및 C' 각각은 Fc 도메인 단량체로 구성된다.

[0023] 특정 구현예에서, Fc 작제물은 혈청 단백질 결합 모이어티, 예를 들어, 링커에 의해 C 또는 C'의 N-말단 또는 C-말단에 연결된 알부민-결합 펩티드를 추가로 포함한다.

[0024] 또 다른 양태에서, 본 발명은 4개 이상의 폴리펩티드를 포함하는 Fc 작제물을 특징으로 한다. 제1 폴리펩티드는

화학식 A-L1-B-L2-C를 가지며, 여기서 A는 IgG C_L 항체 불변 도메인을 포함하고; L1 및 L2는 각각 링커이고; B는 IgG C_H1 항체 불변 도메인을 포함하고; C는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 제2 폴리펩티드는 화학식 A'-L1'-B'-L2'-C'을 가지며, 여기서 A'은 IgG C_L 항체 불변 도메인을 포함하고; L1' 및 L2'은 각각 링커이고; B'은 IgG C_H1 항체 불변 도메인을 포함하고; C'은 제2 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 이러한 양태에서, 제1 Fc 도메인 단량체는 제3 Fc 도메인 단량체와 조합되어 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체는 제4 Fc 도메인 단량체와 조합되어 제2 Fc 도메인을 형성한다. 또한, 제1 폴리펩티드의 IgG C_H1 항체 불변 도메인은 제2 폴리펩티드의 IgG C_L 항체 불변 도메인과 조합되고, 제2 폴리펩티드의 IgG C_H1 항체 불변 도메인은 제1 폴리펩티드의 IgG C_L 항체 불변 도메인과 조합되어 2개 이상의 Fc 도메인을 포함하는 Fc 작제물을 형성한다. 본 발명의 이러한 양태의 예시적 Fc 작제물은 도 7b에 예시되어 있다.

[0025] 또 다른 양태에서, 본 발명은 2개의 폴리펩티드를 포함하는 Fc 작제물을 특징으로 한다. 제1 폴리펩티드는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고, 제2 폴리펩티드는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 이러한 양태에서, 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체는 조합되어 Fc 도메인을 형성한다. 본 발명의 이러한 양태의 예시적 Fc 작제물은 도 1에 예시되어 있다. 추가로, 이러한 양태에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제2 Fc 도메인 단량체 각각은 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 이합체화 선택성 모듈을 포함한다. 이러한 구현예의 예시적 Fc 작제물은 도 2 및 도 3에 예시되어 있다.

[0026] 특정 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩티드 각각은 Fc 도메인 단량체로 구성된다.

[0027] 특정 구현예에서, Fc 작제물은 혈청 단백질 결합 모이어티, 예를 들어, 링커에 의해 제1 또는 제2 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 연결된 알부민-결합 펩티드를 추가로 포함한다.

[0028] 또 다른 양태에서, 본 발명은 2개의 폴리펩티드를 포함하는 Fc 작제물을 특징으로 한다. 제1 폴리펩티드는 화학식 A-L-B를 가지며, 여기서 A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고; L은 링커이고; B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 제2 폴리펩티드는 화학식 A'-L'-B'을 가지며, 여기서 A'은 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하고; L'은 링커이고; B'은 제4 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 이러한 양태에서, 제1 및 제2 Fc 도메인 단량체 각각은 이들의 각각의 C_H3 항체 불변 도메인으로의 공학처리된 공동(cavity)을 포함하고, 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체 각각은 이들의 각각의 C_H3 항체 불변 도메인으로의 공학처리된 융기(protuberance)를 포함하며, 공학처리된 공동 및 공학처리된 융기는 공동 내로의 융기 쌍(protuberance-into-cavity pair)을 형성하도록 위치된다. 또한, 이러한 양태에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제3 Fc 도메인 단량체는 조합되어 제1 Fc 도메인을 형성하고, 제2 Fc 도메인 단량체 및 제4 Fc 도메인 단량체는 조합되어 제2 Fc 도메인을 형성한다.

[0029] 특정 구현예에서, A, B, A', 및 B' 중 하나 이상은 Fc 도메인 단량체로 구성된다. 한 구현예에서, A, B, A', 및 B' 각각은 Fc 도메인 단량체로 구성된다.

[0030] 특정 구현예에서, Fc 작제물은 혈청 단백질 결합 모이어티, 예를 들어, 링커에 의해 B 또는 B'의 N-말단 또는 C-말단에 연결된 알부민-결합 펩티드를 추가로 포함한다.

[0031] 특정 구현예에서, Fc 작제물은 IgG C_L 항체 불변 도메인 및 IgG C_H1 항체 불변 도메인을 추가로 포함하며, IgG C_L 항체 불변 도메인은, 예를 들어, 링커에 의해 IgG C_H1 항체 불변 도메인의 N-말단에 부착되고, IgG C_H1 항체 불변 도메인은 링커에 의해 A의 N-말단에 부착된다. 한 구현예에서, Fc 작제물은 제2 IgG C_L 항체 불변 도메인 및 제2 IgG C_H1 항체 불변 도메인을 추가로 포함하며, 제2 IgG C_L 항체 불변 도메인은 링커에 의해 제2 IgG C_H1 항체 불변 도메인의 N-말단에 부착되고, 제2 IgG C_H1 항체 불변 도메인은 링커에 의해 A'의 N-말단에 부착된다.

[0032] 또 다른 양태에서, 본 발명은 a) A가 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되고; L이 링커이고; B가 제2 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되는, 화학식 A-L-B를 갖는 제1 폴리펩티드; b) A'이 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되고; L'이 링커이고; B'이 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되는, 화학식 A'-L'-B'을 갖는 제2 폴리펩티드; c) 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되는 제3 폴리펩티드; 및 d) 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되는 제4 폴리펩티드로 구성된 Fc 작제물을 특징으로 한다. 제1 폴리펩티드의 A 및 제2 폴리펩티드의 A'은 조합되어 제1 Fc 도메인을 형성하고; 제1 폴리펩티드의 B 및 제5 Fc 도메인 단량체는 조합되어 제2 Fc 도메인을 형성하고; 제2 폴리펩티드의 B' 및 제6 Fc 도메인 단량체는 조합되어 제3 Fc 도메인을 형성한다. 제1 및 제3 Fc 도메인 단량체 각각은 제1 Fc 도메인 단량체와 제

3 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 상보성 이합체화 선택성 모듈을 포함하고, 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체 각각은 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 상보성 이합체화 선택성 모듈을 포함하고, 제4 및 제6 Fc 도메인 단량체 각각은 제4 Fc 도메인 단량체와 제6 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 상보성 이합체화 선택성 모듈을 포함하고; Fc 작제물은 3개 이하의 Fc 도메인을 함유한다.

[0033] 이러한 양태의 일부 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체 또는 제3 Fc 도메인 단량체 중 어느 하나는 음성으로 하전된 아미노산 치환을 포함하고, 다른 하나의 Fc 도메인 단량체는 양성으로 하전된 아미노산 치환을 포함하며, 제2 및 제4 Fc 도메인 단량체 또는 제5 및 제6 Fc 도메인 단량체 중 어느 하나는 공학처리된 융기를 포함하고, 다른 하나의 Fc 도메인 단량체는 공학처리된 공동을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커 L1, L2, L1', 및/또는 L2'은 3 내지 200개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 링커 L 및/또는 L'은 SEQ ID NO:1, 2, 및 3 중 어느 하나의 서열로 구성된다.

[0034] 또 다른 양태에서, 본 발명은 a) A가 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되고; L1이 링커이고; B가 제2 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되고; L2가 링커이고; C가 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되는, 화학식 A-L1-B-L2-C를 갖는 제1 폴리펩티드; 및 b) A'이 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되고; L1'이 링커이고; B'이 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되고; L2'이 링커이고; C'이 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되는, 화학식 A'-L1'-B'-L2'-C'을 갖는 제2 폴리펩티드; c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되는 제3 폴리펩티드; d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되는 제4 폴리펩티드; e) 제9 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되는 제5 폴리펩티드; 및 f) 제10 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되는 제6 폴리펩티드로 구성된 Fc 작제물을 특징으로 한다. 제1 폴리펩티드의 A 및 제7 Fc 도메인 단량체는 조합되어 제1 Fc 도메인을 형성하고; 제1 폴리펩티드의 B 및 제2 폴리펩티드의 B'은 조합되어 제2 Fc 도메인을 형성하고; 제1 폴리펩티드의 C 및 제8 Fc 도메인 단량체는 조합되어 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제2 폴리펩티드의 A' 및 제9 Fc 도메인 단량체는 조합되어 제4 Fc 도메인을 형성하고, 제2 폴리펩티드의 C' 및 제10 Fc 도메인 단량체는 조합되어 제5 Fc 도메인을 형성한다. 제1 및 제7 Fc 도메인 단량체 각각은 제1 Fc 도메인 단량체와 제7 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 상보성 이합체화 선택성 모듈을 포함하고, 제2 및 제5 Fc 도메인 단량체 각각은 제2 Fc 도메인 단량체와 제5 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 상보성 이합체화 선택성 모듈을 포함하고, 제3 및 제8 Fc 도메인 단량체 각각은 제3 Fc 도메인 단량체와 제8 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 상보성 이합체화 선택성 모듈을 포함하고; 제4 및 제9 Fc 도메인 단량체 각각은 제4 Fc 도메인 단량체와 제9 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 상보성 이합체화 선택성 모듈을 포함하고; 제6 및 제10 Fc 도메인 단량체 각각은 제6 도메인 단량체와 제10 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 상보성 이합체화 선택성 모듈을 포함하고; Fc 작제물은 5개 이하의 Fc 도메인을 함유한다.

[0035] 이러한 양태의 일부 구현예에서, 제1, 제3, 제4, 및 제6 Fc 도메인 단량체 각각은 공학처리된 융기를 포함하고, 제2 Fc 도메인 단량체는 음성으로 하전된 아미노산 치환을 포함하고, 제5 Fc 도메인 단량체는 양성으로 하전된 아미노산 치환을 포함하고, 제7, 제8, 제9, 및 제10 Fc 도메인 단량체 각각은 공학처리된 공동을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커 L1, L2, L1', 및/또는 L2'은 3 내지 200개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 링커 L1, L2, L1', 및/또는 L2'은 SEQ ID NO:1, 2, 및 3 중 어느 하나의 서열로 구성된다.

[0036] 또 다른 양태에서, 본 발명은 a) A가 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되고; L1이 링커이고; B가 제2 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되고; L2가 링커이고; C가 제3 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되는, 화학식 A-L1-B-L2-C를 갖는 제1 폴리펩티드; 및 b) A'이 제4 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되고; L1'이 링커이고; B'이 제5 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되고; L2'이 링커이고; C'이 제6 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되는, 화학식 A'-L1'-B'-L2'-C'을 갖는 제2 폴리펩티드; c) 제7 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되는 제3 폴리펩티드; d) 제8 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되는 제4 폴리펩티드; e) 제9 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되는 제5 폴리펩티드; 및 f) 제10 Fc 도메인 단량체를 포함하거나 이로 구성되는 제6 폴리펩티드로 구성된 Fc 작제물을 특징으로 한다. 제1 폴리펩티드의 A 및 제2 폴리펩티드의 A'은 조합되어 제1 Fc 도메인을 형성하고; 제1 폴리펩티드의 B 및 제7 Fc 도메인 단량체는 조합되어 제2 Fc 도메인을 형성하고; 제1 폴리펩티드의 C 및 제8 Fc 도메인 단량체는 조합되어 제3 Fc 도메인을 형성하고, 제2 폴리펩티드의 B' 및 제9 Fc 도메인 단량체는 조합되어 제4 Fc 도메인을 형성하고, 제2 폴리펩티드의 C' 및 제10 Fc 도메인 단량체는 조합되어 제5 Fc 도메인을 형성한다. 제1 및 제4 Fc 도메인 단량체 각각은 제1 Fc 도메인 단량체와 제4 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 상보성 이합체화 선택성 모듈을 포

함하고, 제2 및 제7 Fc 도메인 단량체 각각은 제2 Fc 도메인 단량체와 제7 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 상보성 이합체화 선택성 모듈을 포함하고, 제3 및 제8 Fc 도메인 단량체 각각은 제3 Fc 도메인 단량체와 제8 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 상보성 이합체화 선택성 모듈을 포함하고; 제5 및 제9 Fc 도메인 단량체 각각은 제5 Fc 도메인 단량체와 제9 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 상보성 이합체화 선택성 모듈을 포함하고; 제6 및 제10 Fc 도메인 단량체 각각은 제6 도메인 단량체와 제10 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 상보성 이합체화 선택성 모듈을 포함하고; Fc 작제물은 5개 이하의 Fc 도메인을 함유한다.

[0037] 이러한 양태의 일부 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체는 음성으로 하전된 아미노산 치환을 포함하고, 제4 Fc 도메인 단량체는 양성으로 하전된 아미노산 치환을 포함하고, 제2, 제3, 제5, 및 제6 Fc 도메인 단량체 각각은 공학처리된 융기를 포함하고, 제7, 제8, 제9, 및 제10 Fc 도메인 단량체 각각은 공학처리된 공동을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커 L1, L2, L1', 및/또는 L2'은 3 내지 200개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 링커 L1, L2, L1', 및/또는 L2'은 SEQ ID NO:1, 2, 및 3 중 어느 하나의 서열로 구성된다.

[0038] 또 다른 양태에서, 본 발명은 하나 이상의 Fc 도메인을 포함하는 Fc 작제물을 특징으로 하며, Fc 작제물은 단일 폴리펩티드 서열로부터 어셈블리된다. 폴리펩티드는 화학식 A-L-B를 가지며, 여기서 A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고; L은 링커(임의로, 예를 들어, 1개, 2개 또는 그 초과의 분해 부위를 갖는 분해 가능한 링커)이고; B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 링커는 폴리펩티드의 제1 Fc 도메인 단량체 및 제2 Fc 도메인 단량체가 조합되어 Fc 도메인을 형성하는 충분한 길이(예를 들어, 적어도 15개의 아미노산, 바람직하게는 적어도 약 20개의 아미노산 잔기 길이, 예를 들어, 15 내지 200개의 아미노산 길이) 및 가요성의 아미노산 스페이서일 수 있다. 특정 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제2 Fc 도메인 단량체는 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 상보성 이합체화 선택성 모듈을 포함한다. 상기 작제물은 숙주 세포에서의 단일 폴리펩티드 서열의 발현으로부터 형성될 수 있다. 한 구현예에서, 폴리펩티드는 화학식 A-L1-B-L2-C를 가지며, 여기서 A는 제1 Fc 도메인 단량체를 포함하고; L1은 링커(임의로, 예를 들어, 1개, 2개 또는 그 초과의 분해 부위를 갖는 분해 가능한 링커)이고; B는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함하고; L2는 링커이고; C는 제3 Fc 도메인 단량체이다. 링커는 폴리펩티드의 제1 Fc 도메인 단량체 및 제2 Fc 도메인 단량체가 조합되어 Fc 도메인을 형성하는 충분한 길이(예를 들어, 적어도 15개의 아미노산, 바람직하게는 적어도 약 20개의 아미노산 잔기 길이, 예를 들어, 15 내지 200개의 아미노산 길이) 및 가요성의 아미노산 스페이서일 수 있다. 특정 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체 및 제2 Fc 도메인 단량체는 제1 Fc 도메인 단량체와 제2 Fc 도메인 단량체 사이의 이합체화를 촉진하는 상보성 이합체화 선택성 모듈을 포함한다. 3개의 Fc 도메인을 포함하는 이러한 구현예의 Fc 작제물의 예는 도 10에 도시되어 있다.

[0039] 본원에 기재된 Fc 작제물 중 임의의 Fc 작제물에서, 작제물의 Fc 도메인의 Fc 도메인 단량체는 동일한 일차 아미노산 서열을 가질 수 있다. 예를 들어, Fc 도메인의 Fc 도메인 단량체는 둘 모두 야생형 서열일 수 있거나, Fc 도메인의 둘 모두의 Fc 도메인 단량체는 동일한 이합체화 선택성 모듈을 가질 수 있고, 예를 들어, Fc 도메인의 둘 모두의 Fc 도메인 단량체는 C_H3 도메인 사이의 계면에서 하전된 잔기의 고리 내의 적어도 2개의 위치에서 동일한 반대 전하 돌연변이를 가질 수 있다.

[0040] 본원에 기재된 Fc 작제물 중 임의의 Fc 작제물에서, 작제물의 Fc 도메인의 Fc 도메인 단량체는 2개의 Fc 단량체 사이(즉, Fc 작제물의 Fc 도메인 단량체와 또 다른 단량체 사이)에서 상이한 서열, 예를 들어, 20개 이하의 아미노산(예를 들어, 15개 이하, 10개 이하의 아미노산), 예를 들어, 20개, 15개, 10개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개 또는 2개 이하의 아미노산까지 상이한 서열을 가질 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 작제물의 Fc 단량체 서열은 상이할 수 있는데, 이는 Fc 작제물 중 임의의 Fc 작제물의 상보성 이합체화 선택성 모듈이 도메인 단량체 중 하나의 C_H3 항체 불변 도메인 내에 공학처리된 공동 및 Fc 도메인 단량체 중 다른 하나의 C_H3 항체 불변 도메인 내에 공학처리된 융기를 포함할 수 있으며, 공학처리된 공동 및 공학처리된 융기가 Fc 도메인 단량체의 공동 내로의 융기 쌍을 형성하도록 위치되기 때문이다. 예시적인 공학처리된 공동 및 융기는 표 1에 제시되어 있다. 다른 구현예에서, 상보성 이합체화 선택성 모듈은 도메인 단량체 중 하나의 C_H3 항체 불변 도메인 내에 공학처리된(치환된) 음성으로 하전된 아미노산 및 Fc 도메인 단량체 중 다른 하나의 C_H3 항체 불변 도메인 내에 공학처리된(치환된) 양성으로 하전된 아미노산을 포함하며, 음성으로 하전된 아미노산 및 양성으로 하전된 아미노산은 상보성 도메인 단량체 사이의 Fc 도메인의 형성을 촉진하도록 위치된다. 예시적인 상보성 아미노산 변화가 표 2에 제시되어 있다.

[0041] 일부 구현예에서, 이합체화 선택성 모듈(예를 들어, 공학처리된 공동 및 융기, 또는 공학처리된 양성으로 하전

된 아미노산 및 음성으로 하전된 아미노산(예를 들어, 표 1 및 표 2의 예시적 아미노산 변화 참조))에 더하여, 본원에 기재된 Fc 작제물은 또한, 예를 들어, Fc 작제물을 안정화시키거나 단백질 응집을 방지하는 것을 돕기 위해 Fc 단량체 서열 내에 야생형 서열로부터의 추가의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[0042] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 Fc 작제물은 2 내지 10개의 Fc 도메인(예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개의 도메인)을 포함하며, 작제물의 Fc 도메인 중 적어도 2개는 상이한 이합체화 선택성 모듈을 갖는다. 예를 들어, 작제물 5, 8, 9 및 10은 공학처리된 공동 및 융기를 포함하는 적어도 하나의 Fc 도메인 및 상보성 반대 전하 돌연변이를 포함하는 적어도 하나의 Fc 도메인을 갖는다.

[0043] 다른 구현예에서, 본원에 기재된 Fc 작제물 내의 하나 이상의 링커는 결합이다.

[0044] 다른 구현예에서, 본원에 기재된 Fc 작제물 내의 하나 이상의 링커는 스페이서, 예를 들어, 2 내지 200개의 아미노산의 아미노산 스페이서이다.

[0045] 특정 구현예에서, 아미노산 스페이서는 글리신 및/또는 세린 풍부 스페이서이고, 예를 들어, 스페이서는 서열 GS, GGS, GGGGS(SEQ ID NO:1), GGSG(SEQ ID NO:2), 또는 SGGG(SEQ ID NO:3) 중 2개 이상의 모티프를 포함한다.

[0046] 특정 구현예에서, Fc 작제물이 알부민-결합 펩티드를 포함하는 경우, 알부민-결합 펩티드는 DICLPRWGCLW(SEQ ID NO:28)의 서열을 갖는다.

[0047] 다른 구현예에서, 본원에 기재된 Fc 작제물 내의 Fc 도메인 단량체 중 하나 이상은 IgG 힌지 도메인, IgG C_H2 항체 불변 도메인, 및 IgG C_H3 항체 불변 도메인을 포함한다.

[0048] 특정 구현예에서, 상기 Fc 작제물 내의 Fc 도메인 단량체 각각은 IgG 힌지 도메인, IgG C_H2 항체 불변 도메인, 및 IgG C_H3 항체 불변 도메인을 포함한다.

[0049] 특정 구현예에서, IgG는 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, 및 IgG4로 구성된 군으로부터 선택된 서브타입의 IgG이다.

[0050] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 Fc 작제물의 실질적으로 상동성(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 상동성)인 집단을 포함하는 약학적 조성물을 특징으로 한다. 한 구현예에서, 약학적 사용에 적합화된 멸균 주사기 또는 바이알은 유일한 성분 또는 주요 활성 성분이 본원에 기재된 Fc 작제물 중 어느 하나의 실질적으로 상동성(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 상동성) 집단인 약학적 조성물을 함유한다. 약학적 조성물은, 예를 들어, 염, 세제, 계면활성제, 충전제, 중합체, 보존제, 및 다른 약학적 부형제로부터 선택된 하나 이상의 비활성 성분을 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 실질적으로 상동성인 약학적 조성물은 10% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 1% 미만, 또는 0.5% 미만의 Fc 작제물의 응집물 또는 원치 않는 다합체를 함유한다.

[0051] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기 Fc 작제물 중 어느 하나를 제조하는 방법을 특징으로 한다. 상기 방법은 Fc 작제물을 어셈블리시키는데 필요한 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드들을 포함하는 숙주 세포를 제공하는 단계, Fc 작제물의 형성을 가능케 하는 조건하에서 숙주 세포에서 폴리펩티드를 발현시키는 단계, 및 Fc 작제물을 회수(예를 들어, 정제)하는 단계를 포함한다.

[0052] 일부 구현예에서, Fc 작제물은 다양한 폴리펩티드에 존재하는 Fc 도메인 단량체의 회합에 의해 적어도 부분적으로 형성된다. 특정 구현예에서, Fc 작제물은 다양한 폴리펩티드에 존재하는 Fc 도메인 단량체의 회합에 의해 형성된다. 이들 구현예에서, Fc 작제물은 2개의 폴리펩티드의 회합을 촉진하는 추가 도메인(예를 들어, IgM 테일피스 또는 IgA 테일피스)을 포함하지 않는다. 다른 구현예에서, 공유 결합(예를 들어, 이황화 다리)은 Fc 도메인을 형성하기 위해 연결되는 2개의 Fc 도메인 단량체 사이에만 존재한다. 다른 구현예에서, Fc 작제물은 Fc 도메인 사이에 공유 결합(예를 들어, 이황화 다리)을 포함하지 않는다. 또 다른 구현예에서, Fc 작제물은 Fc 작제물 내의 Fc 도메인의 모두 또는 실질적으로 모두가 세포 표면 상의 Fc 수용체와 동시에 상호작용할 수 있도록 하기에 충분한 구조적 가요성을 제공한다. 이들 구현예 중 임의의 구현예의 특정 예에서, Fc 작제물은 링커(예를 들어, 가요성 아미노산 스페이서)를 통해 연결된 적어도 2개의 Fc 도메인을 포함한다.

[0053] 한 구현예에서, Fc 도메인의 Fc 도메인 단량체는 Fc 도메인을 형성하기 위해 회합되는 다양한 폴리펩티드 사슬에서 발견된다. 예를 들어, 도 4 및 도 6에 도시된 작제물은 3개의 회합된 폴리펩티드를 포함하는 2개의 Fc 도메인을 갖는다. 3개의 폴리펩티드 중 1개는 2개의 Fc 도메인 단량체를 포함하고, 폴리펩티드의 다른 2개 각각은 1개의 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 도 5에 도시된 작제물은 4개의 회합된 폴리펩티드를 포함하는 3개의 Fc 도메인을 갖고; 4개의 폴리펩티드 중 2개는 2개의 Fc 도메인 단량체를 갖고, 4개의 폴리펩티드 중 다른 2개 각각

은 1개의 Fc 도메인 단량체를 갖는다. 도 7b에 도시된 Fc 작제물은 2n개의 폴리펩티드를 포함하는 n개의 Fc 도메인(여기서, n은 2 내지 10임)을 가질 수 있으며, 각각의 폴리펩티드는 Fc 도메인 단량체, IgG C_L 항체 불변 도메인, 및 IgG C_H1 항체 불변 도메인을 포함한다. 도 8 및 9에 도시된 작제물 각각은 6개의 회합된 폴리펩티드를 포함하는 5개의 Fc 도메인을 갖는다. 6개의 폴리펩티드 중 2개는 3개의 Fc 도메인 단량체를 갖고, 6개의 폴리펩티드 중 다른 4개 각각은 1개의 Fc 도메인 단량체를 갖는다. 도 10에 도시된 작제물은 2개의 회합된 폴리펩티드를 포함하는 3개의 Fc 도메인을 갖는다. 2개의 폴리펩티드 각각은 직렬(tandem series)로 연결된 3개의 Fc 도메인 단량체를 함유한다.

[0054] 또 다른 양태에서, 본 발명은 Fc 도메인 단량체의 선택적 이합체화를 촉진하기 위한 조성물 및 방법을 특징으로 한다. 본 발명은 Fc 도메인의 2개의 Fc 도메인 단량체가 C_H3 항체 불변 도메인 사이의 계면에서 하전된 잔기의 고리 내의 적어도 2개의 위치에서 동일한 돌연변이를 포함하는 Fc 도메인을 포함한다. 본 발명은 또한 C_H3 항체 불변 도메인 사이의 계면에서 하전된 잔기의 고리 내의 적어도 2개의 위치에서 2개의 Fc 도메인 단량체 서열 내에 동일한 돌연변이를 갖는 상보성 이합체화 선택성 모듈을 도입시키는 단계를 포함하는 상기 Fc 도메인을 제조하는 방법을 포함한다. C_H3 항체 불변 도메인 사이의 계면은 하전된 잔기의 고리에 의해 둘러싸인 소수성 패치(hydrophobic patch)로 구성된다. 하나의 C_H3 항체 불변 도메인이 또 다른 C_H3 항체 불변 도메인과 함께하게 되는 경우, 이들 하전된 잔기는 반대 전하의 잔기와 쌍을 이룬다. 잔기의 2개 이상의 상보성 쌍의 둘 모두의 일원의 전하를 반대로 함으로써, 돌연변이된 Fc 도메인 단량체는 동일한 돌연변이된 서열의 Fc 도메인 단량체에 대해 상보성인 채로 유지되나, 상기 돌연변이가 없는 Fc 도메인 단량체에 대해 낮은 상보성을 갖는다. 이러한 구현예에서, 동일한 이합체화 선택성 모듈은 동종이합체화를 촉진한다. 예시적 Fc 도메인은 이중 돌연변이 K409D/D339K, K392D/D399K, E357K/K370E, D356K/K439D, K409E/D339K, K392E/D399K, E357K/K370D, 또는 D356K/K439E를 함유하는 Fc 단량체를 포함한다. 또 다른 구현예에서, Fc 도메인은 이중 돌연변이의 임의의 쌍을 조합시키는 4중 돌연변이, 예를 들어, K409D/D399K/E357K/K370E를 포함하는 Fc 단량체를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 동일한 이합체화 선택성 모듈에 더하여, Fc 도메인의 Fc 도메인 단량체는 특정 회합을 촉진하는 동일하지 않은 돌연변이를 갖는 상보성 이합체화 선택성 모듈(예를 들어, 공학처리된 공동 및 융기)을 포함한다. 결과로서, 2개의 Fc 도메인 단량체는 2개의 이합체화 선택성 모듈을 포함하고, 서로에 대해 상보성인 채로 유지되나, 다른 Fc 도메인 단량체에 대해 감소된 상보성을 갖는다. 이러한 구현예는 공동-함유 Fc 도메인과 융기-함유 Fc 도메인 단량체 사이의 이종이합체화를 촉진한다. 한 예에서, 둘 모두의 Fc 도메인 단량체의 하전된 쌍 잔기 내의 동일한 돌연변이는 하나의 Fc 도메인 단량체 상의 융기 및 다른 하나의 Fc 도메인 단량체 상의 공동과 조합된다.

[0055] 또 다른 양태에서, 본 발명은 염증을 감소시킬 필요가 있는 대상체에서 염증을 감소시키는 방법을 특징으로 한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 자가항체의 청소를 촉진시킬 필요가 있는 대상체에서 자가항체의 청소를 촉진시키는 방법을 특징으로 한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 항원 제시를 억제할 필요가 있는 대상체에서 항원 제시를 억제하는 방법을 특징으로 한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 면역 반응을 감소시킬 필요가 있는 대상체에서 면역 반응을 감소시키는 방법, 예를 들어, 면역 반응의 면역 복합체-기반 활성화를 감소시킬 필요가 있는 대상체에서 면역 반응의 면역 복합체-기반 활성화를 감소시키는 방법을 특징으로 한다. 이들 방법은 본원에 기재된 Fc 작제물 또는 약학적 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0056] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 Fc 작제물 또는 약학적 조성물(예를 들어, 작제물 1 내지 10 및 5* 중 어느 하나)을 대상체에 투여함으로써 대상체의 염증성 질병 또는 자가면역 질병 또는 면역 질병을 치료하는 방법을 특징으로 한다. 예시적 질병은 류마티스 관절염(RA); 전신홍반루푸스(SLE); ANCA-관련 혈관염; 항인지질 항체 증후군; 자가면역 용혈 빈혈; 만성 염증성 탈수초 신경병증; 이식편에서의 반-알로(anti-allo), GVHD에서의 반 자기반란(anti-self), 반 대치술(anti-replacement), IgG 요법제, IgG 파라단백질의 청소; 피부근육염; 굿파스처 증후군; 항체-의존성 세포-매개 세포독성을 통해 매개되는 기관계-표적화 II형 과민성 증후군, 예를 들어, 길랑 바레 증후군, CIDP, 피부근육염, 펠티증후군, 항체-매개 거부, 자가면역 갑상샘 질병, 궤양대장염, 자가면역 간 질병; 특발성 혈소판감소성 자반병; 중증근무력증, 시신경척수염; 천포창 및 다른 자가면역 수포성 장애; 쇼그렌 증후군; 자가면역 혈구감소증 및 항체-의존성 포식작용을 통해 매개되는 다른 장애; 다른 FcR-의존성 염증 증후군, 예를 들어, 윤활막염, 피부근육염, 전신 혈관염, 사구체염 및 혈관염을 포함한다.

[0057] 또 다른 양태에서, 본 발명은 염증을 감소시킬 필요가 있는 대상체에서 염증을 감소시키는데 사용하기 위한 본원에 기재된 Fc 작제물 또는 약학적 조성물(예를 들어, 작제물 1 내지 10 및 5* 중 어느 하나)을 특징으로

한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 자가항체의 청소를 촉진할 필요가 있는 대상체에서 자가항체의 청소를 촉진시키는데 사용하기 위한 본원에 기재된 Fc 작제물 또는 약학적 조성물(예를 들어, 작제물 1 내지 10 및 5* 중 어느 하나)을 특징으로 한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 항원 제시를 억제할 필요가 있는 대상체에서 항원 제시를 억제하는데 사용하기 위한 본원에 기재된 Fc 작제물 또는 약학적 조성물(예를 들어, 작제물 1 내지 10 및 5* 중 어느 하나)을 특징으로 한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 면역 반응을 감소시킬 필요가 있는 대상체에서 면역 반응을 감소시키고, 예를 들어, 면역 반응의 면역 복합체-기반 활성화를 감소시킬 필요가 있는 대상체에서 면역 반응의 면역 복합체-기반 활성화를 감소시키는데 사용하기 위한 본원에 기재된 Fc 작제물 또는 약학적 조성물(예를 들어, 작제물 1 내지 10 및 5* 중 어느 하나)을 특징으로 한다.

[0058] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서 염증 질병 또는 자가면역 질병 또는 면역 질병을 치료하는데 사용하기 위한 본원에 기재된 Fc 작제물 또는 약학적 조성물(예를 들어, 작제물 1 내지 10 및 5* 중 어느 하나)을 특징으로 한다. 예시적 질병은 류마티스 관절염(RA); 전신홍반루푸스(SLE); ANCA-관련 혈관염; 항인지질 항체 증후군; 자가면역 용혈 빈혈; 만성 염증성 탈수초 신경병증; 이식편에서의 반-알로, GVHD에서의 반 자기반란, 반대치술, IgG 요법제, IgG 파라단백질의 청소; 피부근육염; 굿파스처 증후군; 항체-의존성 세포-매개 세포독성을 통해 매개되는 기관계-표적화 II형 과민성 증후군, 예를 들어, 길랑 바레 증후군, CIDP, 피부근육염, 펠티증후군, 항체-매개 거부, 자가면역 갑상샘 질병, 궤양대장염, 자가면역 간 질병; 특발성 혈소판감소성 자반병; 중증 근무력증, 시신경척수염; 천포창 및 다른 자가면역 수포성 장애; 쇼그렌 증후군; 자가면역 혈구감소증 및 항체-의존성 포식작용을 통해 매개되는 다른 장애; 다른 FcR-의존성 염증 증후군, 예를 들어, 윤활막염, 피부근육염, 전신 혈관염, 사구체염 및 혈관염을 포함한다.

[0059] 본원에 기재된 Fc 작제물 중 임의의 Fc 작제물에서, Fc 도메인 단량체의 순서는 상호교환 가능한 것이 이해된다. 예를 들어, 화학식 A-L-B를 갖는 폴리펩티드에서, A의 카르복시 말단은 L의 아미노 말단에 연결될 수 있고, 이는 차례로 이의 카르복시 말단에서 B의 아미노 말단에 연결된다. 대안적으로, B의 카르복시 말단은 L의 아미노 말단에 연결될 수 있고, 이는 차례로 이의 카르복시 말단에서 C의 아미노 말단에 연결된다. 이들 입체형태 둘 모두는 화학식 A-L-B에 의해 포함된다.

[0060] 관련 양태에서, 본 발명은 상기 Fc 작제물 중 어느 하나를 발현하는 숙주 세포를 특징으로 한다. 숙주 세포는 Fc 작제물을 어셈블리시키는데 필요한 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포에서 발현된다.

[0061] 정의:

[0062] 본원에서 사용되는 용어 "Fc 도메인 단량체"는 적어도 하나의 힌지 도메인 및 제2 및 제3 항체 불변 도메인(C_H2 및 C_H3)을 포함하는 폴리펩티드 사슬 또는 이의 기능성 단편(예를 들어, (i) 또 다른 Fc 도메인 단량체와 이합체화되어 Fc 도메인을 형성할 수 있고, (ii) Fc 수용체에 결합할 수 있는 단편)을 나타낸다. Fc 도메인 단량체는 IgG, IgE, IgM, IgA, 또는 IgD를 포함하는 임의의 면역글로불린 항체 아이소형일 수 있다. 또한, Fc 도메인 단량체는 IgG 서브타입(예를들어, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, 또는 IgG4)일 수 있다. Fc 도메인 단량체는 항원-인지 영역으로 작용할 수 있는 면역글로불린의 임의의 부분, 예를 들어, 가변 도메인 또는 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하지 않는다. Fc 도메인 단량체는 Fc 도메인과 Fc 수용체 사이의 상호작용을 변경시키는 야생형 Fc 도메인 단량체 서열로부터의 10개나 되는 변화(예를 들어, 1 내지 10개, 1 내지 8개, 1 내지 6개, 1 내지 4개의 아미노산 치환, 첨가, 또는 결실)를 함유할 수 있다. 적합한 변화의 예는 당 분야에 공지되어 있다.

[0063] 본원에서 사용되는 용어 "Fc 도메인"은 Fc 수용체에 결합할 수 있는 2개의 Fc 도메인 단량체의 이합체를 나타낸다. 야생형 Fc 도메인에서, 2개의 Fc 도메인 단량체는 2개의 C_H3 항체 불변 도메인 사이의 상호작용뿐만 아니라 2개의 이합체화되는 Fc 도메인 단량체의 힌지 도메인 사이에 형성되는 하나 이상의 이황화 결합에 의해 이합체화된다.

[0064] 본 발명에서, 용어 "Fc 작제물"은 본원에 기재된 바와 같은 2 내지 10개의 Fc 도메인 사이에 형성되는 회합된 폴리펩티드 사슬을 나타낸다. 본원에 기재된 Fc 작제물은 동일하거나 상이한 서열을 갖는 Fc 도메인 단량체를 포함할 수 있다. 예를 들어, Fc 작제물은 2개의 Fc 도메인을 가질 수 있고, 이 중 하나는 IgG1 또는 IgG1-유래 Fc 도메인 단량체를 포함하고, 두번째 것은 IgG2 또는 IgG2-유래 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 또 다른 예에서, Fc 작제물은 2개의 Fc 도메인을 가질 수 있고, 이 중 하나는 "공동 내로의 융기 쌍(protuberance-into-cavity pair)"을 포함하고, 두번째 것은 "공동 내로의 융기 쌍"을 포함하지 않는다. 본 발명에서, Fc 도메인은

항체의 가변 영역, 예를 들어, V_H, V_L, CDR, 또는 HVR을 포함하지 않는다. Fc 도메인은 Fc 수용체에 결합하는 최소 구조, 예를 들어, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, FcγRIIIb, FcγRIV를 형성한다.

[0065] 본원에서 사용되는 용어 "항체 불변 도메인"은 항체의 불변 영역 도메인(예를 들어, C_L 항체 불변 도메인, C_H1 항체 불변 도메인, C_H2 항체 불변 도메인, 또는 C_H3 항체 불변 도메인)에 해당하는 폴리펩티드를 나타낸다.

[0066] 본원에서 사용되는 용어 "촉진시키다"는 다른 별개의 Fc 도메인 단량체에 대해서보다 서로에 대해 더 높은 결합 친화성을 갖는 2개의 Fc 도메인 단량체로부터의 Fc 도메인의 형성을 조장하고, 이를 유리하게 하고, 예를 들어, 유리하게 하는 것을 의미한다. 본원에 기재되는 바와 같이, 조합되어 Fc 도메인을 형성하는 2개의 Fc 도메인 단량체는 이들의 각각의 C_H3 항체 불변 도메인의 계면에서 양립되는 아미노산 변형(예를 들어, 공학처리된 융기 및 공학처리된 공동)을 가질 수 있다. 양립되는 아미노산 변형은 상기 아미노산 변형이 결여되거나 양립되지 않는 아미노산 변형을 갖는 다른 Fc 도메인 단량체에 비해 상기 Fc 도메인 단량체 서로의 선택적 상호작용을 촉진시키거나 유리하게 한다. 이는 2개의 상호작용하는 C_H3 항체 불변 도메인의 계면에서의 아미노산 변형으로 인해 Fc 도메인 단량체가 아미노산 변형이 결여된 다른 Fc 도메인 단량체보다 서로에 대해 더 높은 친화성을 갖기 때문에 발생한다.

[0067] 본원에서 사용되는 용어 "이합체화 선택성 모듈"은 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 선호된 쌍형성을 촉진시키는 Fc 도메인 단량체의 서열을 나타낸다. "상보성" 이합체화 선택성 모듈은 2개의 Fc 도메인 단량체 서로의 선택적 상호작용을 촉진하거나 유리하게 하는 이합체화 선택성 모듈이다. 상보성 이합체화 선택성 모듈은 동일하거나 상이한 서열을 가질 수 있다. 예시적 상보성 이합체화 선택성 모듈은 본원에 기재되어 있다.

[0068] 본원에서 사용되는 용어 "공학처리된 공동"은 C_H3 항체 불변 도메인 내의 본래의 아미노산 잔기 중 적어도 하나의 본래의 아미노산 잔기보다 작은 측쇄 부피를 갖는 상이한 아미노산 잔기에 의한 치환에 따라 C_H3 항체 불변 도메인 내에 3차원적 공동을 발생시키는 것을 나타낸다. 용어 "본래의 아미노산 잔기"는 야생형 C_H3 항체 불변 도메인의 유전 부호에 의해 인코딩되는 천연 발생 아미노산 잔기를 나타낸다.

[0069] 본원에서 사용되는 용어 "공학처리된 융기"는 C_H3 항체 불변 도메인 내의 본래의 아미노산 잔기 중 적어도 하나의 본래의 아미노산 잔기보다 큰 측쇄 부피를 갖는 상이한 아미노산 잔기에 의한 치환에 따라 C_H3 항체 불변 도메인 내에 3차원적 융기를 발생시키는 것을 나타낸다. 용어 "본래의 아미노산 잔기"는 야생형 C_H3 항체 불변 도메인의 유전 부호에 의해 인코딩되는 천연 발생 아미노산 잔기를 나타낸다.

[0070] 본원에서 사용되는 용어 "공동 내로의 융기 쌍"은 제1 Fc 도메인 단량체가 이의 C_H3 항체 불변 도메인 내에 공학처리된 공동을 포함하면서, 제2 Fc 도메인 단량체가 이의 C_H3 항체 불변 도메인 내에 공학처리된 융기를 포함하는 2개의 Fc 도메인 단량체를 포함하는 Fc 도메인을 기재한다. 공동 내로의 융기 쌍에서, 제1 Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인 내의 공학처리된 융기는 C_H3 항체 불변 도메인간 계면에서 이합체의 일반적인 회합을 유의하게 교란시키지 않고 제2 Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인의 공학처리된 공동과 상호작용하도록 위치된다.

[0071] 본원에서 사용되는 용어 "연결된"은 화학적 컨쥬게이션, 재조합 수단, 및 화학적 결합, 예를 들어, 이황화 결합 및 아미드 결합에 의해 2개 이상의 요소, 성분, 또는 단백질 도메인, 예를 들어, 폴리펩티드의 조합 또는 부착을 기재하기 위해 이용된다. 예를 들어, 2개의 단일 폴리펩티드는 화학적 컨쥬게이션, 화학적 결합, 펩티드 링커, 또는 공유 결합의 임의의 다른 수단을 통해 연결되어 하나의 연속적 단백질 구조를 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 Fc 도메인 단량체는 펩티드 링커에 의해 제2 Fc 도메인 단량체에 연결되며, 여기서 펩티드 링커의 N-말단은 화학적 결합, 예를 들어, 펩티드 결합을 통해 제1 Fc 도메인 단량체의 C-말단에 연결되고, 펩티드 링커의 C-말단은 화학적 결합, 예를 들어, 펩티드 결합을 통해 제2 Fc 도메인 단량체의 N-말단에 연결된다. 다른 구현예에서, 알부민-결합 펩티드의 N-말단은 상기 언급된 것과 동일한 방식으로 링커에 의해 Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인의 C-말단에 연결된다.

[0072] 본원에서 사용되는 용어 "회합된"은 폴리펩티드(또는 하나의 단일 폴리펩티드 내의 서열)가 적어도 하나의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물을 형성하도록 위치되도록 하는 폴리펩티드(또는 하나의 단일 폴리펩티드 내의 서열) 사이의 상호작용, 예를 들어, 수소 결합, 소수성 상호작용, 또는 이온성 상호작용을 기재하기 위해 이용된다.

예를 들어, 1개의 Fc 도메인 단량체를 각각 포함하는 2개의 폴리펩티드는 회합되어 Fc 작제물을 형성할 수 있다(예를 들어, 도 1 내지 3에 도시된 바와 같음). 일부 구현예에서, 3개의 폴리펩티드, 예를 들어, 2개의 Fc 도메인 단량체를 포함하는 1개의 폴리펩티드 및 각각이 1개의 Fc 도메인 단량체를 포함하는 2개의 폴리펩티드는 회합되어 2개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물을 형성한다(예를 들어, 도 4 및 6에 제시된 바와 같음). 일부 구현예에서, 4개의 폴리펩티드, 예를 들어, 각각이 2개의 Fc 도메인 단량체를 포함하는 2개의 폴리펩티드 및 각각이 1개의 Fc 도메인 단량체를 포함하는 2개의 폴리펩티드는 회합되어 3개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물을 형성한다(예를 들어, 도 5에 도시된 바와 같음). 다른 구현예에서, 2n개의 폴리펩티드, 예를 들어, Fc 도메인 단량체, IgG C_L 항체 불변 도메인, 및 IgG C_H1 항체 불변 도메인을 포함하는 각각의 폴리펩티드는 회합되어 n개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물을 형성한다(도 7b에 도시된 바와 같음). 2개의 폴리펩티드는 이들의 각각의 Fc 도메인 단량체, 또는 폴리펩티드의 다른 성분을 통해 회합될 수 있다. 예를 들어, 도 7b에서, 폴리펩티드(708)는 이의 Fc 도메인 단량체를 통해 폴리펩티드(706)와 회합되고, 폴리펩티드(710)의 C_H1 도메인과 회합하는 이의 C_L 도메인의 회합을 통해 폴리펩티드(710)와 회합된다. 폴리펩티드 사이의 회합은 공유적 상호작용을 포함하지 않는다. 예를 들어, 도 10에서, 단일 폴리펩티드 내의 Fc 단량체 서열(1014 및 1012)은 Fc 단량체 서열(1004 및 1006)이 하는 바와 같이 회합되어 Fc 도메인을 형성한다.

[0073] 본원에서 사용되는 용어 "링커"는 2개의 요소, 예를 들어, 단백질 도메인 사이의 결합을 나타낸다. 링커는 공유 결합 또는 스페이서일 수 있다. 용어 "결합"은 화학적 결합, 예를 들어, 아미드 결합 또는 이황화 결합, 또는 화학 반응으로부터 생성되는 임의의 종류의 결합, 예를 들어, 화학적 컨쥬게이션을 나타낸다. 용어 "스페이서"는 2개의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 도메인 사이의 공간 및/또는 가요성을 제공하기 위해 2개의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 도메인 사이에서 발생하는 모이어티(예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 중합체) 또는 아미노산 서열(예를 들어, 3 내지 200개의 아미노산, 3 내지 150개의 아미노산, 또는 3 내지 100개의 아미노산 서열)을 나타낸다. 아미노산 스페이서는 폴리펩티드의 일차 서열의 일부(예를 들어, 폴리펩티드 백본을 통해 이격된 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 도메인에 연결됨)이다. 예를 들어, Fc 도메인을 형성하는 2개의 힌지 영역 또는 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 이황화 결합의 형성은 링커로 간주되지 않는다.

[0074] 본원에서 사용되는 용어 "분해 가능한 링커"는, 예를 들어, 작제물이 형성된 후 선택적으로 분해될 수 있는 하나 이상의 요소를 함유하는 링커를 나타내며, 예를 들어, 분해 가능한 링커는 프로테아제에 의해 선택적으로 분해될 수 있는 폴리펩티드 서열을 포함한다.

[0075] 본원에서 사용되는 용어 "알부민-결합 펩티드"는 혈청 알부민에 대한 친화성을 갖고 혈청 알부민에 결합하는 기능을 하는 12 내지 16개의 아미노산의 아미노산 서열을 나타낸다. 알부민-결합 펩티드는 다양한 기원, 예를 들어, 인간, 마우스, 또는 래트 기원의 것일 수 있다. 본 발명의 일부 구현예에서, 알부민-결합 펩티드는 Fc 도메인 단량체의 C-말단에 융합되어 Fc 작제물의 혈청 반감기를 증가시킨다. 알부민-결합 펩티드는 Fc 도메인 단량체의 N-말단 또는 C-말단에 직접 또는 링커를 통해 융합될 수 있다.

[0076] 본원에서 사용되는 용어 "다합체"는 본원에 기재된 적어도 2개의 회합된 Fc 작제물을 포함하는 분자를 나타낸다.

[0077] 본원에서 사용되는 용어 "폴리뉴클레오티드"는 올리고뉴클레오티드, 또는 뉴클레오티드, 및 이들의 단편 또는 일부를 나타내고, 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있고, 센스 또는 안티-센스 가닥인 유전체 또는 합성 기원의 DNA 또는 RNA를 나타낸다. 단일 폴리뉴클레오티드는 단일 폴리펩티드로 번역된다.

[0078] 본원에서 사용되는 용어 "폴리펩티드"는 단량체가 아미드 결합을 통해 함께 연결되는 아미노산 잔기인 단일 중합체를 기재한다. 폴리펩티드는 천연 발생이거나, 재조합이거나, 합성적으로 생성되는 임의의 아미노산 서열을 포함하는 것으로 의도된다.

[0079] 본원에서 사용되는 용어 "아미노산 위치"는 단백질 또는 단백질 도메인 내의 아미노산의 위치 번호를 나타낸다. 항체 또는 Fc 작제물에 대한 아미노산 위치는 케이뱃(Kabat) 넘버링 시스템(Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, Md., ed 5, 1991)을 이용하여 넘버링된다.

[0080] 본원에서 사용되는 용어 "숙주 세포"는 이들의 해당 핵산으로부터 단백질을 발현시키는데 필요한 필수 세포 성분, 예를 들어, 소기관을 포함하는 비히클을 나타낸다. 핵산은 당 분야에 공지된 통상적인 기술(형질전환, 트랜스펙션, 전기천공, 칼슘 포스페이트 침전, 직접 미세주입 등)에 의해 숙주 세포로 도입될 수 있는 핵산 벡터에 통상적으로 포함된다. 숙주 세포는 원핵생물 세포, 예를 들어, 박테리아 세포, 또는 진핵생물 세포, 예를 들어,

포유동물 세포(예를 들어, CHO 세포)일 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 숙주 세포는 조합되어 필요한 Fc 작제물을 형성할 수 있는 필요한 도메인을 인코딩하는 하나 이상의 폴리펩티드를 발현시키기 위해 이용된다.

[0081] 본원에서 사용되는 용어 "약학적 조성물"은 활성 성분뿐만 아니라 활성 성분이 투여 방법에 적합화되는 것을 가능케 하는 하나 이상의 부형제 및 희석제를 함유하는 의학적 또는 약학적 제형을 나타낸다. 본 발명의 약학적 조성물은 Fc 작제물과 양립되는 약학적으로 허용되는 성분을 포함한다. 약학적 조성물은 통상적으로 정맥내 또는 피하 투여를 위한 수성 형태로 존재한다.

[0082] 본원에서 사용되는 용어 폴리펩티드 또는 Fc 작제물의 "실질적으로 상동성인 집단"은 조성물(예를 들어, 약학적 조성물) 내의 폴리펩티드 또는 Fc 작제물의 적어도 85%가 동일한 번호의 Fc 도메인 및 동일한 Fc 도메인 구조를 갖는 것이다. 다양한 구현예에서, 조성물 내의 폴리펩티드 또는 Fc 작제물의 적어도 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 99.5%는 동일하다. 따라서, Fc 작제물의 실질적으로 상동성인 집단을 포함하는 약학적 조성물은 조성물 내의 Fc 작제물의 적어도 85%가 동일한 번호의 Fc 도메인 및 동일한 구조를 갖는 것이다. Fc 작제물의 실질적으로 상동성인 집단은 Fc 작제물의 10% 초과의 다합체 또는 응집물을 포함하지 않는다(예를 들어, 8%, 5%, 2%, 또는 1% 이하의 다합체 또는 응집물을 포함한다).

[0083] 본원에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용되는 담체"는 약학적 조성물 내의 부형제 또는 희석제를 나타낸다. 약학적으로 허용되는 담체는 제형의 다른 성분과 양립되어야 하고, 수용자에게 유해하지 않아야 한다. 본 발명에서, 약학적으로 허용되는 담체는 Fc 작제물에 적절한 약학적 안정성을 제공해야 한다. 담체의 특성은 투여 방식에 따라 상이하다. 예를 들어, 경구 투여를 위해, 고체 담체가 선호되고; 정맥내 투여를 위해, 수용액 담체(예를 들어, WFI, 및/또는 완충 용액)가 일반적으로 이용된다.

[0084] 본원에서 사용되는 용어 "치료적 유효량"은 대상체 또는 환자에서 필요한 생물학적 효과를 유도하거나 본원에 기재된 질환 또는 장애를 갖는 환자를 치료하는데 효과적인 양, 예를 들어, 약학적 용량을 나타낸다. "치료적 유효량'은 1회 용량 또는 임의의 투여량 또는 경로로 투여되거나, 단독으로 또는 다른 치료제와 함께 투여되어 필요한 치료 효과를 제공하는 양으로 해석될 수 있음이 또한 본원에서 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0085] 도 1은 2개의 야생형(wt) Fc 도메인 단량체(102 및 104)의 이합체를 함유하는 Fc 작제물(작제물 1)의 예시이다.

도 2는 2개의 Fc 도메인 단량체의 이합체를 함유하는 Fc 작제물(작제물 2)의 예시이다. 제1 Fc 도메인 단량체(202)는 이의 C_H3 항체 불변 도메인 내에 융기를 함유하는 한편, 제2 Fc 도메인 단량체(204)는 이의 C_H3 항체 불변 도메인 내에 병치된공동을 함유한다.

도 3은 또 다른 Fc 작제물(작제물 3)의 예시이다. 이러한 Fc 작제물은 2개의 도메인 단량체(302 및 304)의 이합체를 함유하며, 둘 모두의 Fc 도메인 단량체는 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 유리한 정전기적 상호작용을 촉진하기 위해 이의 C_H3-C_H3 계면에서 wt 서열이 아닌 상이한 하전된 아미노산을 함유한다.

도 4는 2개의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물(작제물 4)의 예시이다. 이러한 작제물은 3개의 폴리펩티드로부터 형성된다. 제1 폴리펩티드(402)는 직렬로 연결된 2개의 wt Fc 도메인 단량체(404 및 406)를 함유한다. 제2 및 제3 폴리펩티드(각각 408 및 410) 각각은 wt Fc 도메인 단량체를 함유한다.

도 5는 4개의 폴리펩티드로부터 형성된 3개의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물(작제물 5 또는 작제물 5^*)의 예시이다. 제1 폴리펩티드(502)는 C_H3-C_H3 계면에서 융기-함유 Fc 도메인 단량체(504)와 직렬로 연결된 wt 서열이 아닌 상이한 하전된 아미노산을 함유하는 하나의 Fc 도메인 단량체(506)를 함유한다. 제2 폴리펩티드(508)는 C_H3-C_H3 계면에서 또 다른 융기-함유 Fc 도메인 단량체(510)와 직렬로 연결된 wt 서열이 아닌 상이한 하전된 아미노산을 함유하는 하나의 Fc 도메인 단량체(512)를 함유한다. 제3 및 제4 폴리펩티드(각각 514 및 516) 각각은 공동-함유 Fc 도메인 단량체를 함유한다.

도 6은 3개의 폴리펩티드로부터 형성된 2개의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물(작제물 6)의 예시이다. 제1 폴리펩티드(602)는 직렬로 연결된 2개의 융기-함유 Fc 도메인 단량체(604 및 606)를 함유하는 한편, 제2 및 제3 폴리펩티드(각각 608 및 610) 각각은 상응하는 공동을 함유하도록 공학처리된 Fc 도메인 단량체를 함유한다.

도 7a는 또 다른 Fc 작제물(작제물 7)의 예시이다. 이러한 Fc 작제물은 2개의 C_L-C_H1-Fc 도메인 단량체(702 및

704)의 이합체를 함유한다. 이러한 구현예에서, C_L 항체 불변 도메인은 인접한 C_H1 항체 불변 도메인에 연결된다.

도 7b는 다수의 Fc 도메인을 함유하는 C_L-C_H1-Fc 도메인 단량체(예를 들어, 706, 708, 및 710)의 다합체를 함유하는 Fc 작제물(작제물 8)의 예시이다. 이러한 Fc 작제물에서, 구성 폴리펩티드는 작제물 7의 구성 폴리펩티드와 동일할 수 있다. 하나의 Fc 작제물(예를 들어, 712)의 C_L 항체 불변 도메인은 제2의 이웃하는 Fc 작제물(예를 들어, 714)의 C_H1 항체 불변 도메인과 상호작용한다.

도 8은 6개의 폴리펩티드로부터 형성된 5개의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물(작제물 9)의 예시이다. 제1 및 제2 폴리펩티드(802 및 810) 각각은 직렬로 연결된 3개의 Fc 도메인 단량체(각각 804, 806, 808, 및 812, 814, 816)를 함유한다. 상세하게는, 폴리펩티드(802 또는 810)에서, 제1 융기-함유 Fc 도메인 단량체(804 또는 812)는 C_H3-C_H3 계면에서 wt 서열이 아닌 상이한 하전된 아미노산을 함유하는 제2 Fc 도메인 단량체(806 또는 814)에 연결되고, 이는 제3 융기-함유 Fc 도메인 단량체(808 또는 816)에 연결된다. 제3 내지 제6 폴리펩티드(818, 820, 822, 및 824) 각각은 공동-함유 Fc 도메인 단량체를 함유하며, Fc 도메인 단량체(각각 804, 808, 812 및 816) 각각과 Fc 도메인을 형성한다.

도 9는 6개의 폴리펩티드로부터 형성된 5개의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물(작제물 10)의 예시이다. 제1 및 제2 폴리펩티드(902 및 910) 각각은 직렬로 연결된 3개의 Fc 도메인 단량체(각각 904, 906, 908, 및 912, 914, 916)를 함유한다. 상세하게는, 폴리펩티드(902 또는 910)에서, 제1 융기-함유 Fc 도메인 단량체(904 또는 912)는 제2 융기-함유 Fc 도메인 단량체(906 또는 914)에 연결되고, 이는 C_H3-C_H3 계면에서 wt 서열이 아닌 상이한 하전된 아미노산을 함유하는 제3 Fc 도메인 단량체(908 또는 916)에 연결된다. 제3 내지 제6 폴리펩티드(918, 920, 922, 및 924) 각각은 공동-함유 Fc 도메인 단량체를 함유하며, Fc 도메인 단량체(각각 904, 906, 912 및 914) 각각과 Fc 도메인을 형성한다.

도 10은 동일한 서열의 2개의 폴리펩티드로부터 형성된 3개의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물(작제물 11)의 예시이다. 2개의 폴리펩티드(1002 및 1010) 각각은 직렬로 연결된 3개의 Fc 도메인 단량체(각각 1004, 1006, 1008, 및 1012, 1014, 1016)를 함유한다. 상세하게는, 각각의 폴리펩티드는 제2 공동-함유 Fc 도메인 단량체(1006 또는 1014)에 연결된 제1 융기-함유 Fc 도메인 단량체(1004 또는 1012)를 함유하며, 이는 C_H3-C_H3 계면에서 wt 서열이 아닌 상이한 하전된 아미노산을 갖는 제3 Fc 도메인 단량체(1008, 또는 1016)에 연결된다. Fc 도메인 단량체(1008 및 1016)는 회합되어 제1 Fc 도메인을 형성하고; Fc 도메인 단량체(1004 및 1006)는 회합되어 제2 Fc 도메인을 형성하고; Fc 도메인 단량체(1012 및 1014)는 회합되어 제3 Fc 도메인을 형성한다. 작제물 11은 숙주 세포에서의 단일 폴리펩티드 서열의 발현으로부터 형성될 수 있다.

도 11의 A 및 도 11의 B는 작제물 4의 환원 및 비-환원 SDS-PAGE를 각각 제시한다.

도 12의 A 및 도 12의 B는 작제물 6의 환원 및 비-환원 SDS-PAGE를 각각 제시한다.

도 13은 작제물 5의 SDS-PAGE 및 작제물 5 정제 전 및 후의 3개의 Fc 도메인(삼합체), 2개의 Fc 도메인(이합체), 또는 1개의 Fc 도메인(단량체)을 갖는 발현된 단백질의 백분율을 제시하는 표이다.

도 14a 및 도 14b는 작제물 1, 5, 및 6을 이용한 THP-1 단핵구 활성화(도 14a) 및 차단(도 14b) 검정을 제시한다.

도 15는 류마티스 관절염의 K/BxN 모델에서의 IVIG 및 작제물 5 및 6의 효과를 제시한다.

도 16은 만성 ITP 모델에서의 IVIG 및 작제물 5 및 6의 효과를 제시한다.

도 17은 THP-1 단핵구 세포에서의 IVIg 또는 작제물 5에 의한 포식작용의 억제를 제시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0086] IgG의 Fc 도메인을 포함하는 치료 단백질이 염증 및 면역학적 질병 및 염증성 질병을 치료하기 위해 이용될 수 있다. 본 발명은 2개 이상(예를 들어, 2 내지 10개)의 Fc 도메인을 함유하는 다양한 Fc 작제물을 제조하기 위한 조성물 및 방법을 특징으로 한다.

[0087] **I. Fc 도메인 단량체**

[0088] Fc 도메인 단량체는 힌지 도메인, C_H2 항체 불변 도메인, 및 C_H3 항체 불변 도메인을 포함한다. Fc 도메인 단량체는 면역글로불린 항체 아이소형 IgG, IgE, IgM, IgA, 또는 IgD의 Fc 도메인 단량체일 수 있다. Fc 도메인 단량체는 또한 임의의 면역글로불린 항체 아이소형(예를 들어, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, 또는 IgG4)의 Fc 도메인 단량체일 수 있다. Fc 도메인 단량체의 이합체는 Fc 수용체, 예를 들어, 백혈구의 표면에 위치된 수용체인 FcγRIIIa에 결합할 수 있는 Fc 도메인(본원에서 추가로 정의됨)이다. 본 발명에서, Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인은 이들의 서로에 대한 회합을 촉진시키기 위해 C_H3-C_H3 항체 불변 도메인의 계면에서 아미노산 치환을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 단량체는 N-말단에 부착된 2개의 다른 불변 도메인, 예를 들어, C_L 및 C_H1 항체 불변 도메인을 포함한다(도 7). 다른 구현예에서, Fc 도메인 단량체는 C-말단에 부착된 추가의 모이어티, 예를 들어, 알부민-결합 펩티드를 포함한다. 본 발명에서, Fc 도메인 단량체는 임의의 유형의 항체 가변 영역, 예를 들어, V_H, V_L, 상보성 결정 영역(CDR), 또는 과가변 영역(HVR)을 함유하지 않는다.

[0089] **II. Fc 도메인**

[0090] 본원에 정의된 바와 같이, Fc 도메인은 C_H3 항체 불변 도메인 사이의 상호작용에 의해 이합체화되는 2개의 Fc 도메인 단량체를 포함한다. 본 발명에서, Fc 도메인은 항체의 가변 영역, 예를 들어, V_H, V_L, CDR, 또는 HVR을 포함하지 않는다. Fc 도메인은 Fc 수용체에 결합하는 최소 구조, 예를 들어, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, FcγRIIIb, FcγRIV를 형성한다.

[0091] **III. 이합체화 선택성 모듈**

[0092] 본 발명에서, 이합체화 선택성 모듈은 Fc 도메인을 형성하는 2개의 Fc 도메인 단량체의 바람직한 쌍형성을 촉진하는 Fc 도메인 단량체의 부분이다. 상세하게는, 이합체화 선택성 모듈은 2개의 Fc 단량체의 상호작용하는 C_H3 항체 불변 도메인 사이의 계면에 위치된 아미노산 치환을 포함하는 Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인의 부분이다. 이합체화 선택성 모듈에서, 아미노산 치환은 치환을 위해 선택된 아미노산의 양립성의 결과로서 2개의 C_H3 항체 불변 도메인의 이합체화를 유리하게 만든다. 바람직한 Fc 도메인의 궁극적 형성은 이합체화 선택성 모듈이 결여되거나, 이합체화 선택성 모듈 내에 양립되지 않는 아미노산 치환을 갖는 Fc 도메인 단량체로부터 형성되는 다른 Fc 도메인에 비해 선택적이다. 이러한 유형의 아미노산 치환은 당 분야에 널리 공지된 통상적인 분자 클로닝 기술, 예를 들어, QuikChange® 돌연변이유발을 이용하여 이루어질 수 있다.

[0093] 일부 구현예에서, 이합체화 선택성 모듈은 C_H3 항체 불변 도메인 내에 공학처리된 공동(본원에 추가로 기재됨)을 포함한다. 다른 구현예에서, 이합체화 선택성 모듈은 C_H3 항체 불변 도메인 내에 공학처리된 융기(본원에 추가로 기재됨)를 포함한다. Fc 도메인을 선택적으로 형성시키기 위해, 양립되는 이합체화 선택성 모듈을 갖는 2개의 Fc 도메인 단량체, 예를 들어, 공학처리된 공동을 함유하는 하나의 C_H3 항체 불변 도메인 및 공학처리된 융기를 함유하는 다른 하나의 C_H3 항체 불변 도메인이 조합되어 Fc 도메인 단량체의 공동 내로의 융기 쌍을 형성한다.

[0094] 다른 구현예에서, 양성으로 하전된 아미노산 치환을 함유하는 이합체화 선택성 모듈을 갖는 Fc 도메인 단량체 및 음성으로 하전된 아미노산 치환을 함유하는 이합체화 선택성 모듈을 갖는 Fc 도메인 단량체가 하전된 아미노산의 유리한 정전기적 스티어링(electrostatic steering)(본원에 추가로 기재됨)을 통해 선택적으로 조합되어 Fc 도메인을 형성할 수 있다. 특정한 이합체화 선택성 모듈이 하기에 추가로 기재되는 표 1 및 표 2에 추가로 나열되나, 이에 제한되지는 않는다.

[0095] 다른 구현예에서, 2개의 Fc 도메인 단량체는 C_H3 도메인 사이의 계면에서 하전된 잔기의 고리 내의 적어도 2개의 위치에서 동일한 반대 전하 돌연변이를 함유하는 이합체화 선택성 모듈을 포함한다. 2개의 Fc 도메인 단량체 내의 잔기의 2개 이상의 상보성 쌍의 둘 모두의 일원의 전하를 반대로 함으로써, 돌연변이된 Fc 도메인 단량체는 동일한 돌연변이된 서열의 Fc 도메인 단량체에 대해 상보성인 채로 유지되나, 상기 돌연변이가 없는 Fc 도메인 단량체에 대해 낮은 상보성을 갖는다. 한 구현예에서, Fc 도메인은 이중 돌연변이 K409D/D339K, K392D/D399K, E357K/K370E, D356K/K439D, K409E/D339K, K392E/D399K, E357K/K370D, 또는 D356K/K439E를 포함하는 Fc 단량체를 포함한다. 또 다른 구현예에서, Fc 도메인은 이중 돌연변이의 임의의 쌍을 조합시키는 4중 돌연변이, 예를 들어, K409D/D399K/E357K/K370E를 포함하는 Fc 단량체를 포함한다.

[0096] 상기 Fc 도메인의 형성은 C_H3 항체 불변 도메인에서의 양립되는 아미노산 치환에 의해 촉진된다. 양립되지 않는

아미노산 치환을 함유하는 2개의 이합체화 선택성 모듈, 예를 들어, 둘 모두가 공학처리된 공동을 함유하는 이합체화 선택성 모듈, 둘 모두가 공학처리된 융기를 함유하는 이합체화 선택성 모듈, 또는 둘 모두가 C_H3-C_H3 계면에서 동일한 하전된 아미노산을 함유하는 이합체화 선택성 모듈은 Fc 도메인의 형성을 촉진하지 않을 것이다.

[0097] 또한, 규정된 Fc 도메인 단량체를 갖는 Fc 도메인의 형성을 촉진하기 위해 이용되는 다른 방법은 이종이합체 형성을 가능케 하는 Fc 도메인 단량체 각각으로의 류신 지퍼의 단량체 α-헬릭스의 C-말단 융합을 포함하는 LUZ-Y 접근법(미국 특허 출원 공개 번호 WO2011034605)뿐만 아니라 IgA 및 IgG C_H3 서열의 교대로 존재하는 세그먼트를 각각 포함하는 이종이합체 Fc 도메인 단량체를 갖는 Fc 도메인을 생성시키는 가닥-교환 공학처리 도메인(strand-exchange engineered domain)(SEED) 본체 접근법(Davis et al., *Protein Eng Des Sel*. 23:195-202, 2010)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0098] **IV. 공학처리된 공동 및 공학처리된 융기**

[0099] 공학처리된 공동 및 공학처리된 융기(또는 "놉-인투-홀(knob-into-hole)" 전략)의 이용은 카터(Carter) 및 동료의 문헌[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]에 기재되어 있다. 놉 및 홀 상호작용은 이종이합체 형성을 유리하게 하는 반면, 놉-놉 및 홀-홀 상호작용은 입체적 충돌 및 유리한 상호작용의 결실로 인해 동종이합체 형성을 방해한다. "놉-인투-홀" 기술은 또한 미국 특허 번호 5,731,168에 개시되어 있다.

[0100] 본 발명에서, 공학처리된 공동 및 공학처리된 융기는 본원에 기재된 Fc 작제물의 제조에서 이용된다. 공학처리된 공동은 단백질 내의 본래의 아미노산이 더 작은 측쇄 부피를 갖는 상이한 아미노산으로 대체되는 경우에 발생되는 공간이다. 공학처리된 융기는 단백질 내의 본래의 아미노산이 더 큰 측쇄 부피를 갖는 상이한 아미노산으로 대체되는 경우에 발생되는 범프(bump)이다. 상세하게는, 대체되는 아미노산은 Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인 내에 존재하고, 2개의 Fc 도메인 단량체의 이합체화와 관련된다. 일부 구현예에서, 하나의 C_H3 항체 불변 도메인 내의 공학처리된 공동은 또 다른 C_H3 항체 불변 도메인 내의 공학처리된 융기를 수용하도록 생성되어, 둘 모두의 C_H3 항체 불변 도메인은 2개의 Fc 도메인 단량체의 이합체화를 촉진하거나 유리하게 하는 이합체화 선택성 모듈(상기 기재됨)로 작용한다. 다른 구현예에서, 하나의 C_H3 항체 불변 도메인 내의 공학처리된 공동은 또 다른 C_H3 항체 불변 도메인 내의 본래의 아미노산을 더 잘 수용하도록 생성된다. 또 다른 구현예에서, 하나의 C_H3 항체 불변 도메인 내의 공학처리된 융기는 또 다른 C_H3 항체 불변 도메인 내의 본래의 아미노산과의 추가 상호작용을 형성하도록 생성된다.

[0101] 공학처리된 공동은 더 큰 측쇄를 함유하는 아미노산, 예를 들어, 티로신 또는 트립토판을 더 작은 측쇄를 함유하는 아미노산, 예를 들어, 알라닌, 발린, 또는 트레오닌으로 대체함으로써 작제될 수 있다. 상세하게는, 일부 이합체화 선택성 모듈(상기 추가로 기재됨)은 C_H3 항체 불변 도메인 내에 공학처리된 공동, 예를 들어, Y407V 돌연변이를 함유한다. 유사하게, 공학처리된 융기는 더 작은 측쇄를 함유하는 아미노산을 더 큰 측쇄를 함유하는 아미노산으로 대체함으로써 작제될 수 있다. 상세하게는, 일부 이합체화 선택성 모듈(상기 추가로 기재됨)은 C_H3 항체 불변 도메인 내에 공학처리된 융기, 예를 들어, T366W 돌연변이를 함유한다. 본 발명에서, 공학처리된 공동 및 공학처리된 융기는 또한 C_H3 도메인간 이황화 결합 공학처리와 조합되어 이종이합체 형성을 향상시킨다. 상세하게는, 공동 Fc는 Y349C 돌연변이를 함유하며, 융기 Fc는 S354C 돌연변이를 함유한다. 이황화 결합 공학처리 또는 구조적 계산(혼합된 HA-TF)과 조합되는 다른 공학처리된 공동 및 공학처리된 융기가 표 1에 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.

표 1

전략	Fc 도메인 단량체 1의 CH_3 항체 불변 도메인	Fc 도메인 단량체 2의 CH_3 항체 불변 도메인	참고문헌
공학처리된 공동 및 융기 ("놉-인투-홀(knob-into-hole)")	Y407T	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
공학처리된 공동 및 융기 ("놉-인투-홀"). S-S 공학처리	T366S:L368A:Y407V:Y349C	T366W:S354C	Zeidler et al., *J Immunol.* 163:1246-52, 1999
혼합된 HA-TF	S364H:F405A	Y349T:T394F	WO2006106905

[0102]

[0103] C_H3 항체 불변 도메인 내의 본래의 아미노산 잔기를 상이한 아미노산 잔기로 대체하는 것은 본래의 아미노산 잔기를 인코딩하는 핵산을 변경시킴으로써 달성될 수 있다. 대체될 수 있는 본래의 아미노산 잔기의 수에 대한 상한은 계면에서의 충분한 상호작용이 여전히 유지되는 것을 고려한 C_H3 항체 불변 도메인의 계면 내의 잔기의 전체 수이다.

[0104] **V. 정전기적 스티어링**

[0105] 정전기적 스티어링은 고차 단백질 분자의 형성을 조절하기 위한 펩티드, 단백질 도메인, 및 단백질에서의 반대로 하전된 아미노산 사이의 유리한 정전기적 상호작용의 이용이다. 이특이적 항체의 생성에서 이종이합체 형성을 위해 동종이합체의 형성을 감소시키도록 항체 도메인의 상호작용을 변경시키는 정전기적 스티어링 효과를 이용하는 방법은 미국 특허 출원 공개 번호 2014-0024111에 개시되어 있다.

[0106] 본 발명에서, 정전기적 스티어링은 Fc 도메인 단량체의 이합체화 및 Fc 작제물의 형성을 조절하기 위해 이용된다. 특히, 정전기적 스티어링을 이용하여 Fc 도메인 단량체의 이합체화를 조절하기 위해, C_H3-C_H3 계면을 구성하는 하나 이상의 아미노산 잔기는 도입되는 특정한 하전된 아미노산에 따라 상호작용이 정전기적으로 유리하거나 유리하지 않게 되도록 양성으로 하전된 아미노산 잔기 또는 음성으로 하전된 아미노산 잔기로 대체된다. 일부 구현예에서, 계면 내의 양성으로 하전된 아미노산, 예를 들어, 리신, 아르기닌, 또는 히스티딘은 음성으로 하전된 아미노산, 예를 들어, 아스파르트산 또는 글루탐산으로 대체된다. 다른 구현예에서, 계면 내의 음성으로 하전된 아미노산은 양성으로 하전된 아미노산으로 대체된다. 하전된 아미노산은 상호작용하는 C_H3 항체 불변 도메인 중 하나, 또는 둘 모두로 도입될 수 있다. 상호작용하는 C_H3 항체 불변 도메인에 하전된 아미노산을 도입시킴으로써, 하전된 아미노산 사이의 상호작용으로부터 발생하는 정전기적 스티어링 효과에 의해 조절되는 바와 같은 Fc 도메인 단량체의 이합체를 선택적으로 형성할 수 있는 이합체화 선택성 모듈(상기 추가로 기재됨)이 생성된다.

[0107] 한 특정 예에서, 반대 전하를 포함하는 이합체화 선택성 모듈을 생성시키기 위해, C_H3 항체 불변 도메인 내의 아미노산 Asp399가 Lys으로 대체되고, 아미노산 Lys409가 Asp로 대체된다. Fc 도메인 단량체의 이종이합체화는 2개의 Fc 도메인 단량체 내에 상이하나 양립되는 돌연변이, 예를 들어, 표 2에 포함되나 이에 제한되지는 않는 전하 잔기 쌍을 도입시킴으로써 촉진될 수 있고, Fc 도메인 단량체의 동종이합체화는 둘 모두의 Fc 도메인 단량체 내에 대칭 방식으로 동일 돌연변이, 예를 들어, 이중 돌연변이 K409D/D339K 또는 K392D/D399K를 도입시킴으로써 촉진될 수 있다.

표 2

Fc 도메인 단량체 1의 CH_3 항체 불변 도메인	Fc 도메인 단량체 2의 CH_3 항체 불변 도메인	참고문헌
K409D	D399K	US 2014/0024111
K409D	D399R	US 2014/0024111
K409E	D399K	US 2014/0024111
K409E	D399R	US 2014/0024111
K392D	D399K	US 2014/0024111
K392D	D399R	US 2014/0024111
K392E	D399K	US 2014/0024111
K392E	D399R	US 2014/0024111
K409D:K392D	D399K:E356K	Gunasekaran et al., *J Biol Chem.* 285:19637-46, 2010
K370E:K409D:K439E	E356K:E357K:D399K	Martens et al., *Clin Cancer Res.* 12:6144-52, 2006

[0108]

[0109] **VI. 링커**

[0110] 본 발명에서, 링커는 폴리펩티드 또는 단백질 도메인 및/또는 관련된 비-단백질 모이어티 사이의 결합 또는 연결을 기재하기 위해 이용된다. 일부 구현예에서, 링커는 적어도 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 결합 또는 연결이며, 여기서 링커는 제1 Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인의 C-말단을 제2 Fc 도메인 단량체의 힌지 도메인의 N-말단에 연결시켜, 2개의 Fc 도메인 단량체는 직렬로 서로 연결된다. 다른 구현예에서, 링커는 Fc 도메인 단량체와 이에 부착되는 임의의 다른 단백질 도메인 사이의 결합이다. 예를 들어, 링커는 Fc 도메인 단량체의 C_H3 항체 불변 도메인의 C-말단을 알부민-결합 펩티드의 N-말단에 부착시킬 수 있다. 또 다른 예에서, 링커는 C_H1 항체 불변 도메인의 C-말단을 Fc 도메인 단량체의 힌지 도메인의 N-말단에 연결시킬 수 있다. 또 다른 구현예에서, 링커는 2개의 개별적 단백질 도메인(Fc 도메인을 포함하지 않음)을 연결시킬 수 있고, 예를 들어, C_L 항체 불변 도메인의 C-말단이 링커에 의해 C_H1 항체 불변 도메인의 N-말단에 부착될 수 있다.

[0111] 링커는 단순한 공유 결합, 예를 들어, 펩티드 결합, 합성 중합체, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 중합체, 또는 화학적 반응으로부터 생성되는 임의의 종류의 결합, 예를 들어, 화학적 컨쥬게이션일 수 있다. 링커가 펩티드 결합인 경우에, 하나의 단백질 도메인의 C-말단의 카르복실산 기는 축합 반응으로 또 다른 단백질 도메인의 N-말단의 아미노기와 반응하여 펩티드 결합을 형성할 수 있다. 상세하게는, 펩티드 결합은 당 분야에 널리 공지된 통상적인 유기 화학 반응을 통한 합성 수단으로부터, 또는 숙주 세포로부터의 천연 생성에 의해 형성될 수 있으며, 직렬의 둘 모두의 단백질, 예를 들어, 2개의 Fc 도메인 단량체의 DNA 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이 숙주 세포에서 필수 분자 기구, 예를 들어, DNA 중합효소 및 리보솜에 의해 둘 모두의 단백질을 인코딩하는 연속 폴리펩티드로 직접 전사되고 번역될 수 있다.

[0112] 링커가 합성 중합체, 예를 들어, PEG 중합체인 경우, 중합체는 각각의 말단에서 반응성 화학 작용기로 관능화되어 2개의 단백질의 연결 말단의 말단 아미노산과 반응할 수 있다.

[0113] 링커(상기 언급된 펩티드 결합 제외)가 화학적 반응으로부터 제조되는 경우, 화학적 작용기, 예를 들어, 아민, 카르복실산, 에스테르, 아지드, 또는 당 분야에서 일반적으로 사용되는 다른 작용기가 한 단백질의 C-말단 및 또 다른 단백질의 N-말단에 각각 합성적으로 부착될 수 있다. 2개의 작용기는 이후 합성 화학 수단을 통해 반응하여 화학 결합을 형성하고, 이에 따라 2개의 단백질을 함께 연결시킬 수 있다. 상기 화학적 컨쥬게이션 절차는 당업자에게 일상적인 일이다.

[0114] *스페이서*

[0115] 본 발명에서, 2개의 Fc 도메인 단량체 사이의 링커는 3 내지 200개의 아미노산을 포함하는 아미노산 스페이서일

수 있다. 적합한 펩티드 스페이서는 당 분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, 가요성 아미노산 잔기, 예를 들어, 글리신 및 세린을 함유하는 펩티드 링커를 포함한다. 특정 구현예에서, 스페이서는 모티프, 예를 들어, GS, GGS, GGGGS(SEQ ID NO:1), GGSG(SEQ ID NO:2), 또는 SGGG(SEQ ID NO:3)의 다수 또는 반복 모티프를 함유할 수 있다. 특정 구현예에서, 스페이서는 GS의 모티프, 예를 들어, GS, GSGS(SEQ ID NO:4), GSGSGS(SEQ ID NO:5), GSGSGSGS(SEQ ID NO:6), GSGSGSGSGS(SEQ ID NO:7), 또는 GSGSGSGSGSGS(SEQ ID NO:8)를 포함하는 2 내지 12개의 아미노산을 함유할 수 있다. 특정한 다른 구현예에서, 스페이서는 GGS의 모티프, 예를 들어, GGS, GGSGGS(SEQ ID NO:9), GGSGGSGGS(SEQ ID NO:10), 및 GGSGGSGGSGGS(SEQ ID NO:11)를 포함하는 3 내지 12개의 아미노산을 함유할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 스페이서는 GGSG(SEQ ID NO:12)의 모티프, 예를 들어, GGSG(SEQ ID NO:13), GGSGGGSG(SEQ ID NO:14), 또는 GGSGGGSGGGSG(SEQ ID NO:15)를 포함하는 4 내지 12개의 아미노산을 함유할 수 있다. 다른 구현예에서, 스페이서는 GGGGS(SEQ ID NO:16)의 모티프, 예를 들어, GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:17)를 함유할 수 있다. 다른 구현예에서, 스페이서는 또한 글리신 및 세린이 아닌 아미노산, 예를 들어, GENLYFQSGG(SEQ ID NO:18), SACYCELS(SEQ ID NO:19), RSIAT(SEQ ID NO:20), RPACKIPNDLKQKVMNH(SEQ ID NO:21), GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG(SEQ ID NO:22), AAANSSIDLISVPVDSR(SEQ ID NO:23), 또는 GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS(SEQ ID NO:24)를 함유할 수 있다. 본 발명의 특정 구현예에서, 12-아미노산 펩티드 스페이서 또는 20-아미노산 펩티드 스페이서가 2개의 Fc 도메인 단량체를 직렬로 연결시키기 위해 이용되며(도 4 내지 6), 12-아미노산 펩티드 스페이서 및 20-아미노산 펩티드 스페이서는 각각 서열 GGGSGGGSGGGS(SEQ ID NO:25) 및 SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG(SEQ ID NO:26)로 구성된다. 다른 구현예에서, 서열 GGSGGGSGGGSGGGSGGS(SEQ ID NO:27)로 구성된 18-아미노산 펩티드 스페이서가 C_L 및 C_H1 항체 불변 도메인을 연결시키기 위해 이용된다(도 7a 및 도 7b).

[0116] **VII. 혈청 단백질-결합 펩티드**

[0117] 혈청 단백질 펩티드로의 결합은 단백질 의약의 약동학을 개선시킬 수 있으며, 특히 본원에 기재된 Fc 작제물은 혈청 단백질-결합 펩티드와 융합될 수 있다.

[0118] 한 예로서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 이용될 수 있는 알부민-결합 펩티드는 일반적으로 당 분야에 공지되어 있다. 한 구현예에서, 알부민 결합 펩티드는 서열 DICLPRWGCLW(SEQ ID NO:28)를 포함한다.

[0119] 본 발명에서, 알부민-결합 펩티드는 Fc 작제물 내의 특정 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 부착될 수 있다. 한 구현예에서, 알부민-결합 펩티드는 작제물 1, 2, 3, 또는 7A(각각 도 1, 2, 3, 및 7a) 내의 하나 이상의 폴리펩티드의 C-말단에 부착될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 알부민-결합 펩티드는 작제물 4, 5, 및 6(각각 도 4, 5, 및 6) 내의 직렬로 연결된 2개의 Fc 도메인 단량체를 인코딩하는 폴리펩티드의 C-말단에 융합될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 알부민-결합 펩티드는 작제물 4 및 6(각각 도4 및 6)에 제시된 바와 같이 직렬로 연결된 2개의 Fc 도메인 단량체를 인코딩하는 폴리펩티드 내의 제2 Fc 도메인 단량체에 연결된 Fc 도메인 단량체의 C-말단에 부착될 수 있다. 알부민-결합 펩티드는 Fc 작제물에 유전학적으로 융합되거나 화학적 수단, 예를 들어, 화학적 컨쥬게이션을 통해 Fc 작제물에 부착될 수 있다. 필요한 경우, 스페이서가 Fc 작제물과 알부민-결합 펩티드 사이에 삽입될 수 있다. 이론으로 한정하고자 하는 것은 아니지만, 본 발명의 Fc 작제물 내의 알부민-결합 펩티드의 포함이 이의 혈청 알부민으로의 결합을 통해 치료 단백질의 연장된 체류를 초래할 수 있는 것으로 예상된다.

[0120] **VIII. Fc 작제물**

[0121] 일반적으로, 본 발명은 2 내지 10개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 작제물을 특징으로 한다. 이들은 Fc 수용체, 예를 들어, FcγRIIIa에 대해 단일 야생형 Fc 도메인보다 큰 결합 친화성 및/또는 결합성을 가질 수 있다. 본 발명은 Fc 도메인의 2개의 Fc 도메인 단량체가 서로 선택적으로 이합체를 형성시켜 이에 따라 원치 않는 다합체 또는 응집물의 형성을 방지하도록 2개의 상호작용하는 C_H3 항체 불변 도메인의 계면의 아미노산을 공학처리하는 방법을 개시한다. Fc 작제물은 짝수의 Fc 도메인 단량체를 포함하며, Fc 도메인 단량체의 각각의 쌍은 Fc 도메인을 형성한다. Fc 작제물은 2개의 Fc 도메인 단량체의 이합체로부터 형성된 최소 1개의 기능성 Fc 도메인을 포함한다.

[0122] 일부 구현예에서, Fc 작제물은 2개의 Fc 도메인 단량체의 이합체를 포함하는 1개의 Fc 도메인을 함유한다(도 1 내지 3 및 7a). 상호작용하는 C_H3 항체 불변 도메인은 변형되지 않을 수 있거나(도 1), 이들의 계면에 아미노산 치환을 함유할 수 있다. 상세하게는, 아미노산 치환은 공학처리된 공동(도 2), 공학처리된 융기(도 2), 또는 하전된 아미노산(도 3)일 수 있다.

[0123] 다른 구현예에서, Fc 작제물은 3개의 폴리펩티드로부터 형성된 2개의 Fc 도메인(도 4 및 6)을 함유한다. 제1 폴리펩티드는 링커에 의해 연결된 직렬로 연결된 2개의 Fc 도메인 단량체를 함유하며, 제2 및 제3 폴리펩티드는 1개의 Fc 도메인 단량체를 함유한다. 제2 및 제3 폴리펩티드는 동일한 폴리펩티드일 수 있거나, 상이한 폴리펩티드일 수 있다. 도 4는 상기 Fc 작제물의 예를 도시한다. 제1 폴리펩티드는 링커에 의해 직렬로 연결된 2개의 야생형 Fc 도메인 단량체를 함유하며, 제2 및 제3 폴리펩티드 각각은 1개의 야생형 Fc 도메인 단량체를 함유한다. 제1 폴리펩티드 내의 Fc 도메인 단량체 중 하나는 제2 폴리펩티드와 함께 제1 Fc 도메인을 형성하는 한편, 제1 폴리펩티드 내의 다른 하나의 Fc 도메인 단량체는 제3 폴리펩티드와 함께 제2 Fc 도메인을 형성한다. 제2 및 제3 폴리펩티드는 서로 부착되거나 연결되지 않는다. 도 6은 도 4의 것과 유사한 Fc 작제물을 도시한다. 도 6에서, 제1 폴리펩티드 내의 Fc 도메인 단량체 둘 모두는 C_H3 항체 불변 도메인 내에 공학처리된 융기를 함유하는 한편, 제2 및 제3 폴리펩티드는 C_H3 항체 불변 도메인 내에 공학처리된 공동을 함유한다. 공학처리된 공동 내로의 융기 C_H3-C_H3 계면은 Fc 도메인 단량체의 이종이합체의 형성을 유리하게 하고, 원치 않는 다합체의 조절되지 않는 형성을 방지한다. 실시예 4에서 본원에 추가로 기재된 바와 같이, 공학처리된 C_H3 항체 불변 도메인을 포함하는 이합체화 선택성 모듈은 이합체화 선택성 모듈이 결여된 Fc 도메인 단량체로부터의 Fc 작제물 형성을 기재하는 실시예 3에서 관찰되는 원치 않는 다합체의 형성을 방지한다.

[0124] 또한, 다른 구현예에서, Fc 작제물은 4개의 폴리펩티드로부터 형성된 3개의 Fc 도메인을 함유할 수 있다(도 5). 제1 및 제2 폴리펩티드는 동일하거나 상이할 수 있으며, 제3 및 제4 폴리펩티드도 마찬가지일 수 있다. 이러한 예에서, 제1 및 제2 폴리펩티드 둘 모두는 링커에 의해 직렬로 연결된 2개의 Fc 도메인 단량체를 인코딩하며, 여기서 하나의 Fc 도메인 단량체는 C_H3 항체 불변 도메인 내에 하전된 아미노산 치환을 함유하는 한편, 다른 하나의 Fc 도메인 단량체는 C_H3 항체 불변 도메인 내에 융기를 함유한다. 제3 및 제4 폴리펩티드 둘 모두는 공동을 갖는 Fc 도메인 단량체를 인코딩한다. 제1 및 제2 폴리펩티드는 이들의 C_H3 항체 불변 도메인 내의 반대 전하의 상호작용을 통해 서로 제1 Fc 도메인을 형성한다. 제2 및 제3 Fc 도메인은 제1 및 제2 폴리펩티드 내의 융기와 제3 및 제4 폴리펩티드 내의 공동 사이의 공동 내로의 융기 상호작용으로부터 형성된다. 이러한 Fc 작제물 내의 각각의 Fc 도메인 단량체는 특정 Fc 도메인의 형성을 촉진하는 이합체화 선택성 모듈을 함유한다.

[0125] 또 다른 구현예에서, 단일 폴리펩티드는 C_H3 항체 불변 도메인 사이의 상호작용을 통하지 않고 C_L 불변 도메인과 C_H1 불변 도메인 사이의 상호작용을 통해 이합체(예를 들어, 작제물 7a; 도 7a) 또는 다합체(예를 들어, 작제물 7b; 도 7b)를 형성할 수 있다. 도 7b는 하나의 Fc 도메인의 C_L 도메인이 이웃하는 Fc 도메인의 C_H1 도메인과 상호작용하는 다수의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물을 도시한다.

[0126] 또 다른 구현예에서, Fc 작제물은 6개의 폴리펩티드로부터 형성된 5개의 Fc 도메인을 함유할 수 있다. 2개의 예가 도 8 및 도 9에 도시되어 있다. 이들 도시된 Fc 작제물은 6개의 폴리펩티드로 구성되며, 폴리펩티드 중 4개는 동일한 핵산에 의해 인코딩될 수 있고, 나머지 2개의 폴리펩티드도 또한 동일한 핵산에 의해 인코딩될 수 있다. 결과로서, 이들 Fc 작제물은 적합한 숙주 세포에서 2개의 핵산의 발현에 의해 생성될 수 있다.

[0127] 또 다른 구현예에서, 2개 이상의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물이 동일한 일차 서열을 갖는 2개의 폴리펩티드로부터 형성될 수 있다. 상기 작제물은 숙주 세포에서의 단일 폴리펩티드 서열의 발현으로부터 형성될 수 있다. 한 예가 도 10에 도시되어 있다. 이러한 예에서, 단일 핵산이 3개의 Fc 도메인을 함유하는 Fc 작제물을 인코딩하기에 충분하다. 동일한 폴리펩티드의 일부인 2개의 Fc 도메인 단량체는 충분한 길이 및 가요성의 가요성 링커의 포함에 의해 Fc 도메인을 형성하는 것을 가능케 하며; 이러한 링커는 분해 가능한 링커일 수 있다. 이러한 동일한 폴리펩티드는 또한 임의의 가요성 링커에 의해 연결되는 제3의 Fc 도메인 단량체를 함유한다. 이러한 제3의 Fc 도메인 단량체는 또 다른 Fc 도메인 단량체에 연결되어 도 10에 도시된 Y-형태의 Fc 작제물을 생성시킬 수 있다. Fc 도메인의 형성은 도 10에 또한 도시된 바와 같이 이합체화 선택성 모듈의 사용을 통해 조절될 수 있다.

[0128] **IX. 숙주 세포 및 단백질 생성**

[0129] 본 발명에서, 숙주 세포는 해당 핵산으로부터 본원에 기재된 폴리펩티드 및 작제물을 발현시키는데 필요한 필수 세포 성분, 예를 들어, 소기관을 포함하는 비히클을 나타낸다. 핵산은 당 분야에 공지된 통상적인 기술(형질전환, 트랜스펙션, 전기천공, 칼슘 포스페이트 침전, 직접 미세주입 등)에 의해 숙주 세포로 도입될 수 있는 핵산 벡터에 포함될 수 있다. 숙주 세포는 포유동물 또는 박테리아 기원의 숙주 세포일 수 있다. 포유동물 숙주 세포

는 CHO(또는 CHO-유래 세포 계통, 예를 들어, CHO-K1, CHO-DXB11 CHO-DG44), 뮤린 숙주 세포(예를 들어, NS0, Sp2/0), VERY, HEK(예를 들어, HEK293), BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, CRL7030 및 HsS78Bst 세포를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 단백질 작제물의 발현을 조절하거나, 필요한 특정 방식으로 단백질 생성물을 변형시키고 가공하는 숙주 세포가 또한 선택될 수 있다. 다양한 숙주 세포가 단백질 생성물의 번역 후 가공 및 변형을 위한 특징 및 특정 메커니즘을 갖는다. 발현된 단백질의 정확한 변형 및 가공을 보장하는 적절한 세포주 또는 숙주 시스템이 선택될 수 있다.

[0130] 해당 DNA 플라스미드 작제물로부터의 단백질 생성물의 발현 및 분비를 위해, 숙주 세포는 프로모터, 인핸서, 서열, 전사 종료자, 아데닐중합체형성 부위, 및 선택가능한 마커를 포함하는 당 분야에 공지된 적절한 발현 조절 요소에 의해 조절되는 DNA로 트랜스펙션되거나 형질전환될 수 있다. 치료 단백질의 발현을 위한 방법은 당 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Paulina Balbas, Argelia Lorence (eds.) *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Humana Press; 2nd ed. 2004 edition (July 20, 2004); Vladimir Voynov and Justin A. Caravella (eds.) *Therapeutic Proteins: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)* Humana Press; 2nd ed. 2012 edition (June 28, 2012)]을 참조한다.

[0131] **X. 정제**

[0132] Fc 작제물은 단백질 정제 분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들어, 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환, 친화성(예를 들어, 단백질 A 친화성), 및 크기-배제 컬럼 크로마토그래피), 원심분리, 차별적 용해도, 또는 단백질의 정제를 위한 임의의 다른 표준 기술에 의해 정제될 수 있다. 예를 들어, Fc 작제물은 친화성 컬럼, 예를 들어, 단백질 A 컬럼을 적절하게 선택하고, 이와 크로마토그래피 컬럼, 여과, 초여과, 염석 및 투석 절차를 적절하게 조합시킴으로써 분리되고 정제될 수 있다(예를 들어, *Process Scale Purification of Antibodies*, Uwe Gottschalk (ed.) John Wiley & Sons, Inc., 2009; 및 Subramanian (ed.) *Antibodies-Volume I-Production and Purification*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (2004) 참조). 일부 예에서, Fc 작제물은 정제를 촉진하기 위해 마커 서열, 예를 들어, 펩티드에 컨쥬게이션될 수 있다. 마커 아미노산 서열의 예는 마이크로몰 친화성으로 니켈-관능화 아가로스 친화성 컬럼에 결합하는 헥사-히스티딘 펩티드이다. 정제에 유용한 다른 펩티드 태그는 인플루엔자 헤마글루티닌 단백질로부터 유래된 에피토프에 해당하는 헤마글루티닌 "HA" 태그를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다(Wilson et al., 1984, Cell 37:767).

[0133] Fc 작제물에 대해, 정제 공정으로서 단백질 A 컬럼 크로마토그래피가 이용될 수 있다. 단백질 A 리간드는 Fc 영역을 통해 Fc 작제물과 상호작용하며, 이는 단백질 A 크로마토그래피를 숙주 세포 단백질 대부분을 제거할 수 있는 매우 선택적인 포획 공정으로 만든다. 본 발명에서, Fc 작제물은 실시예 2에 기재된 바와 같이 단백질 A 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제될 수 있다.

[0134] **XI. 약학적 조성물/제조물**

[0135] 본 발명은 본원에 기재된 하나 이상의 Fc 작제물을 포함하는 약학적 조성물을 특징으로 한다. 한 구현예에서, 약학적 조성물은 구조에 있어서 동일하거나 실질적으로 동일한 Fc 작제물의 실질적으로 상동성인 집단을 포함한다. 다양한 예에서, 약학적 조성물은 작제물 1 내지 10 및 5* 중 어느 하나의 실질적으로 상동성인 집단을 포함한다.

[0136] 본 발명의 치료 단백질 작제물, 예를 들어, Fc 작제물은 약학적 조성물로 혼입될 수 있다. 치료 단백질을 포함하는 약학적 조성물은 당업자에게 공지된 방법에 의해 제형화될 수 있다. 약학적 조성물은 물 또는 또 다른 약학적으로 허용되는 액체 중 멸균 용액 또는 현탁액을 포함하는 주사 가능한 제형의 형태로 비경구적으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 약학적 조성물은 Fc 작제물과 약학적으로 허용되는 비히클 또는 매질, 예를 들어, 주사용 멸균수(WFI), 생리학적 염수, 유화제, 현탁제, 계면활성제, 안정화제, 희석제, 결합제, 부형제를 적합하게 조합한 후, 일반적으로 허용되는 약학적 실시에 필요한 단위 용량 형태로 혼합함으로써 제형화될 수 있다. 약학적 제조물에 포함된 활성 성분의 양은 지정된 범위 내의 적합한 용량이 제공되도록 하는 양이다.

[0137] 주사용 멸균 조성물은 비히클로서 주사용 증류수를 이용하여 통상적인 약학적 실시에 따라 제형화될 수 있다. 예를 들어, 글루코스 및 다른 보충물, 예를 들어, D-소르비톨, D-만노스, D-만니톨, 및 소듐 클로라이드를 함유하는 생리학적 염수 또는 등장성 용액이 임의로 적합한 가용화제, 예를 들어, 알콜, 예를 들어, 에탄올 및 폴리알콜, 예를 들어, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜, 및 비이온성 계면활성제, 예를 들어, 폴리소르베이트 80™, HCO-50, 및 당 분야에 일반적으로 공지된 것과 함께 주사용 수용액으로서 이용될 수 있다. 치료 단백질 생성물에 대한 제형화 방법은 당 분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, 문헌[Banga (ed.) *Therapeutic*

Peptides and Proteins: Formulation, Processing and Delivery Systems (2d ed.) Taylor & Francis Group, CRC Press (2006)]을 참조한다.

[0138] **XII. 투여량**

[0139] 약학적 조성물은 투여 제형과 양립되는 방식으로 그리고 증상의 개선 또는 치료를 발생시키는데 치료적으로 효과적인 것과 같은 양으로 투여된다. 약학적 조성물은 다양한 투여 형태, 정맥내 투여 형태, 피하 투여 형태, 경구 투여 형태, 예를 들어, 섭취가능한 용액, 약물 방출 캡슐 등으로 투여된다. 개별적 대상체에 대한 적절한 투여량은 치료 목적, 투여 경로, 및 환자의 상태에 좌우된다. 일반적으로, 재조합 단백질은 1 내지 200 mg/kg, 예를 들어, 1 내지 100 mg/kg, 예를 들어, 20 내지 100 mg/kg으로 투여된다. 따라서, 건강관리 제공자가 최적 치료 효과를 획득하기 위해 필요에 따라 투여량을 맞춤화하고 적정하고, 투여 경로를 변형시키는 것이 필요할 것이다.

[0140] **XIII. 적응증**

[0141] 본 발명의 약학적 조성물 및 방법은 대상체 내의 염증을 감소시키고, 대상체 내의 자가항체의 청소를 촉진시키고, 대상체 내의 항원 제시를 억제하고, 대상체 내의 면역 반응을 감소시키고, 예를 들어, 면역 반응의 면역 복합체-기반 활성화를 차단하고, 대상체 내의 면역학적 질환 또는 질병 및 염증 질환 또는 질병을 치료하는데 유용하다. 예시적 질환은 류마티스 관절염(RA); 전신홍반루푸스(SLE); ANCA-관련 혈관염; 항인지질 항체 증후군; 자가면역 용혈 빈혈; 만성 염증성 탈수초 신경병증; 이식편에서의 반-알로, GVHD에서의 반 자기반란, 반대치술, IgG 요법제, IgG 파라단백질의 청소; 피부근육염; 굿파스처 증후군; 항체-의존성 세포-매개 세포독성을 통해 매개되는 기관계-표적화 II형 과민성 증후군, 예를 들어, 길랑 바레 증후군, CIDP, 피부근육염, 펠티증후군, 항체-매개 거부, 자가면역 갑상샘 질병, 궤양대장염, 자가면역 간 질병; 특발성 혈소판감소성 자반병; 중증 근무력증, 시신경척수염; 천포창 및 다른 자가면역 수포성 장애; 쇼그렌 증후군; 자가면역 혈구감소증 및 항체-의존성 포식작용을 통해 매개되는 다른 장애; 다른 FcR-의존성 염증 증후군, 예를 들어, 윤활막염, 피부근육염, 전신 혈관염, 사구체염 및 혈관염을 포함한다.

[0142] **실시예**

[0143] **실시예 1 - DNA 플라스미드 작제물의 설계 및 클로닝**

[0144] 8개의 Fc 작제물을 어셈블리시키기 위해 전체 8개의 DNA 플라스미드 작제물을 이용하였다(도 1 내지 도 7b). DNA 플라스미드 작제물을 단백질 생성을 위해 인간 배아 신장(HEK) 293 세포로 트랜스펙션시켰다. 8개의 인코딩된 분비된 폴리펩티드는 하기 기재되는 바와 같은 일반 구조를 가졌다:

[0145] A. *wt Fc*: 야생형 Fc 도메인 단량체(도 1: 102 및 104; 도 4: 408 및 410).

[0146] B. *융기 Fc*: C_H3 항체 불변 도메인 내 공학처리된 융기를 갖는 Fc 도메인 단량체(도 2: 202).

[0147] C. *공동 Fc*: C_H3 항체 불변 도메인 내 공학처리된 공동을 갖는 Fc 도메인 단량체(도 2: 204; 도 5: 514 및 516).

[0148] C*. *공동 Fc**: C_H3 항체 불변 도메인 내 공학처리된 공동을 갖는 Fc 도메인 단량체(도 2: 204; 도 5: 514 및 516). 공동 Fc*는 또한 공동 Fc에 비해 추가의 아미노산 치환을 함유한다.

[0149] D. *전하 Fc*: C_H3 항체 불변 도메인 내 반대 전하를 갖는 Fc 도메인 단량체(도 3: 302 및 304).

[0150] E. *wt-12-wt Fc2*: 12-아미노산 GGGS 펩티드 링커에 의해 일렬로 연결된 2개의 Fc 도메인 단량체(도 4: 402).

[0151] F. *융기-20-전하 Fc2*: 20-아미노산 SGGG 펩티드 링커에 의해 일렬로 연결된 C_H3 항체 불변 도메인 내 반대 전하를 갖는 Fc 도메인 단량체 및 C_H3 항체 불변 도메인 내 공학처리된 융기를 갖는 Fc 도메인 단량체(도 5: 502 및 508).

[0152] F*. *융기-20-전하 Fc2**: 20-아미노산 SGGG 펩티드 링커에 의해 일렬로 연결된 C_H3 항체 불변 도메인 내 반대 전하를 갖는 Fc 도메인 단량체 및 C_H3 항체 불변 도메인 내 공학처리된 융기를 갖는 Fc 도메인 단량체(도 5: 502 및 508). 융기-20-전하 Fc2*은 또한 융기 Fc에 비해 추가의 아미노산 치환을 함유한다.

[0153] G. *융기-20-융기 Fc2*: 20-아미노산 GGGS 펩티드 링커에 의해 일렬로 연결된 C_H3 항체 불변 도메인 내 공학처리된 융기를 모두 갖는 2개의 Fc 도메인 단량체(도 6: 602).

[0154] H. C_HC_L *Fc+*: 힌지 도메인에 부착된 C_H1 및 C_L 불변 도메인을 갖는 Fc 도메인 단량체(도 7a: 702 및 704; 도 7b: 706, 708, 710, 712, 714, 및 716). C_L 불변 도메인은 18 아미노산 GGGS 펩티드 링커에 의해 C_H1 불변 도메인에 부착된다.

[0155] Fc DNA 서열은 인간 IgG1 Fc로부터 유래되었다. 융기, 공동 및 전하 돌연변이를 모 Fc 서열에서 치환시켰다. 인간 면역글로불린 카파 경쇄로부터 유래된 선도 펩티드를 인코딩하는 DNA를 5' 영역에 부착시켰다. 하나를 제외한 모든 폴리펩티드(C_HC_L Fc+)는 아미노 말단에 이러한 인코딩된 펩티드를 함유하여 어셈블리 및 분비를 위해 소포체로의 단백질 전위를 유도하였다. 다양한 선도 펩티드 중 어느 하나가 본 발명과 함께 이용될 수 있음이 이해될 것이다. 선도 펩티드는 보통 ER 루멘에서 절단된다. 5' 말단 EcoR1 부위를 함유하는 11개의 뉴클레오티드 서열을 ATG 시작 코돈의 업스트림에 첨가하였다. 3' 말단 Xho1 부위를 함유하는 30 뉴클레오티드 서열을 3' 말단 TGA 번역 종료 코돈의 다운스트림에 첨가하였다. DNA 서열을 포유동물 세포에서의 발현을 위해 최적화시키고, pcDNA3.4 포유동물 발현 벡터로 클로닝하였다.

[0156] 돌연변이는 야생형 아미노산 잔기 뒤의 EU 케이뱃 넘버링 시스템(Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, Md., ed. 5, 1991), 및 이후 단일 문자 부호의 대체 잔기에 의해 표시된다. 상기 기재된 분비된 폴리펩티드 A 내지 H의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 하기에 제공된다(아미노산 서열만 제공되는, 공동 Fc^* 및 융기-20-전하 $Fc2^*$ 제외).

[0157] wt Fc

[0158] SEQ ID NO:29:

```
1         10         20         30         40         50
|         |          |          |          |          |
GACAAGACCCACACCTGTCCGCCTTGCCCTGCCCCTGAGCTGCTGGGAGG
CCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCA
GCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGAC
CCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGC
CAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGT
CCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAG
TGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAG
CAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCCCCCA
GCCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAA
GGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCC
CGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCAT
TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGC
AACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC
CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
```

[0159]

[0160] SEQ ID NO:30:

```
1         10         20         30         40         50
|         |          |          |          |          |
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

[0161]

[0162] 융기 Fc

[0163] SEQ ID NO:31:

```
1         10         20         30         40         50
|         |          |          |          |          |

GACAAGACCCACACCTGTCCGCCTTGCCCTGCCCCTGAGCTGCTGGGAGG
CCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCA
GCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGAC
CCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGC
CAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGT
CCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAG
TGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAG
CAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAAGTGTGTACACTGCCCCCCA
GCCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTGCGCCGTGAAA
GGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCC
CGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCAT
TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGC
AACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC
CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
```

[0164]

[0165] SEQ ID NO:32:

```
1         10         20         30         40         50
|         |          |          |          |          |

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

[0166]

[0167] 공동 Fc

[0168] SEQ ID NO:33:

```
1         10         20         30         40         50
|         |          |          |          |          |

GACAAGACCCACACCTGTCCGCCTTGCCCTGCCCCTGAGCTGCTGGGAGG
CCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCA
GCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGAC
CCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGC
CAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGT
CCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAG
TGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAG
CAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAAGTGTGTACACTGCCCCCCA
GCCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTGCGCCGTGAAA
GGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCC
CGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCAT
TCTTCCTGGTTAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGC
AACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC
CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
```

[0169]

[0170] SEQ ID NO:34:

```
1         10         20         30         40         50
|         |          |          |          |          |

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

[0171]

[0172] 공동 Fc*SEQ ID NO:45:

```
1         10         20         30         40         50
|         |          |          |          |          |

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVE
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

[0173]

[0174] 전하 Fc

[0175] SEQ ID NO:35:

```
1         10         20         30         40         50
|         |          |          |          |          |

GACAAGACCCACACCTGTCCGCCTTGCCCTGCCCCTGAGCTGCTGGGAGG
CCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCA
GCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGAC
CCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGC
CAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGT
CCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAG
TGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAG
CAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCCCCCA
GCCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAA
GGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCC
CGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCCTGTGCTGAAAAGCGACGGCTCAT
TCTTCCTGTACAGCGACCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGC
AACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC
CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
```

[0176]

[0177] SEQ ID NO:36:

```
1         10         20         30         40         50
|         |          |          |          |          |

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

[0178]

[0179] wt-12-wt Fc2

[0180] SEQ ID NO:37:

```
1         10         20         30         40         50
|         |          |          |          |          |

GACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGCCCTGCCCCTGAGCTGCTGGGAGG
CCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCA
GCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGAC
CCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGC
CAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGT
CCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTCAACGGCAAAGAGTACAAG
TGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAG
CAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTCTACACACTGCCCCCCA
GCCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTCTCCCTGACCTGCCTGGTGAAA
GGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCC
CGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCAT
TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGC
AACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC
CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAAGGCGGGGGATCTGGGGGAG
GAAGCGGAGGCGGCAGCGATAAGACCCATACCTGCCCTCCCTGTCCCGCT
CCCGAACTGCTGGGGGGACCCTCCGTGTTTCTGTTTCCACCTAAGCCTAA
GGATACGCTCATGATCTCCAGAACCCCTGAAGTCACATGTGTGGTGGTCG
ATGTGTCTCATGAAGATCCCGAAGTCAAGTTTAACTGGTATGTGGATGGG
GTCGAGGTCCACAATGCCAAAACAAAGCCTCGGGAAGAACAGTATAACTC
CACCTACAGAGTCGTCAGCGTGCTGACAGTCCTTCATCAGGATTGGCTGA
ATGGGAAAGAGTACAAATGTAAAGTGTCTAACAAAGCTCTGCCCGCTCCT
ATCGAAAAGACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCAGAGAACCTCAGGT
GTACACCCTGCCACCCTCCAGAGATGAGCTGACAAAAAATCAGGTGTCAC
TGACATGTCTGGTGAAAGGGTTTTATCCCTCCGACATTGCTGTGGAATGG
GAATCCAATGGGCAGCCTGAAAACAATTATAAGACAACACCTCCCGTGCT
GGACTCCGATGGCTCATTTTTTCTGTACTCTAAACTGACAGTGGATAAGT
CCAGATGGCAGCAGGGAAATGTGTTTTCCTGCTCTGTGATGCATGAAGCT
CTGCATAATCACTATACACAGAAAAGCCTGTCCCTGTCCCCCGGCAAG
```

[0181]

[0182] SEQ ID NO:38:

```
1         10         20         30         40         50
|         |          |          |          |          |
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGSGGGSDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK
```

[0183]

[0184] 융기-20-전하 Fc2

[0185] SEQ ID NO:39:

```
1         10         20         30         40         50
|         |          |          |          |          |
GACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGCCCAGCCCCTGAGCTGCTGGGAGG
CCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCA
GCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGAC
CCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGC
CAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGT
CCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAG
TGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAG
CAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTT
GCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGCCTGGTCAAG
GGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCC
CGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCAT
TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGC
AACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC
CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAGTCTGGGGGAGGATCAGGGG
GTGGAAGTGGCGGTGGATCTGGTGGTGGAAGCGGAGGCGGCGATAAGACA
CACACATGCCCCCCCTGTCCAGCTCCCGAACTGCTGGGGGGACCCTCCGT
GTTTCTGTTTCCACCTAAGCCTAAGGATACGCTCATGATCTCCAGAACCC
CTGAAGTCACATGTGTGGTGGTCGATGTGTCTCATGAAGATCCCGAAGTC
AAGTTTAATTGGTATGTCGATGGGGTCGAGGTGCACAATGCCAAAACAAA
ACCTCGGGAAGAACAGTATAACTCCACATACAGAGTGGTGTCTGTCCTCA
CAGTCCTGCATCAGGATTGGCTCAATGGGAAAGAGTACAAATGTAAAGTC
TCTAACAAGGCTCTCCCCGCTCCGATCGAAAAGACCATCTCCAAAGCCAA
AGGGCAGCCCAGAGAACCTCAGGTCTACACACTGCCTCCCAGCCGGGACG
AGCTGACAAAAAATCAAGTGTCTCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTTTAT
CCCTCCGACATTGCCGTCGAGTGGGAGTCCAATGGACAGCCGGAAAACAA
TTATAAGACCACGCCTCCAGTGCTGAAGTCCGACGGCAGCTTCTTTCTGT
ACTCCGACCTGACAGTGGATAAGTCCAGATGGCAGCAAGGGAATGTGTTC
TCCTGTTCCGTGATGCATGAAGCCCTCCATAATCACTATACCCAGAAAAG
CCTGTCCCTGTCCCCTGGCAAG
```

[0186]

[0187] SEQ ID NO:40:

```
1         10         20         30         40         50
|         |          |          |          |          |
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

[0188]

[0189] 융기-20-전하 Fc2*

[0190] SEQ ID NO:46:

```
1         10         20         30         40         50
|         |          |          |          |          |
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

[0191]

[0192] 융기-20-융기 Fc2

[0193] SEQ ID NO:41:

```
1         10         20         30         40         50
|         |          |          |          |          |
GACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGCCCTGCCCCTGAGCTGCTGGGAGG
CCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCA
GCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGAC
CCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGC
CAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGT
CCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAG
TGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAG
CAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTT
GCAGAGATGAACTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGCCTGGTCAAG
GGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCC
CGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCAT
TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGC
AACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC
CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAGTCTGGGGGAGGATCAGGGG
GTGGAAGTGGCGGTGGATCTGGTGGTGGAAGCGGAGGCGGCGATAAGACA
CACACATGCCCCCCCTGTCCAGCTCCCGAACTGCTGGGGGGACCCTCCGT
GTTTCTGTTTCCACCTAAGCCTAAGGATACGCTCATGATCTCCAGAACCC
CTGAAGTCACATGTGTGGTGGTCGATGTGTCTCATGAAGATCCCGAAGTC
AAGTTTAACTGGTATGTGGATGGGGTCGAGGTCCACAATGCCAAAACAAA
GCCTCGGGAAGAACAGTATAACTCCACCTACAGAGTCGTCAGCGTGCTGA
CAGTCCTGCATCAAGATTGGCTCAATGGGAAAGAGTATAAGTGTAAAGTC
TCGAACAAAGCCCTCCCCGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAAGCCAA
AGGGCAGCCCAGAGAACCTCAGGTCTACACACTGCCTCCATGTCGGGACG
AGCTGACAAAAAATCAGGTGTCACTGTGGTGTCTGGTGAAGGGGTTTTAC
CCTTCCGACATTGCTGTGGAATGGGAATCCAATGGGCAGCCTGAAAACAA
TTATAAGACAACACCTCCCGTGCTGGACTCCGATGGCTCATTTTTTCTGT
ACTCTAAACTGACAGTGGATAAGTCCAGATGGCAGCAGGGAAATGTGTTT
TCCTGCTCTGTGATGCATGAAGCTCTGCATAATCACTATACACAGAAAAG
CCTGTCCCTGTCCCCTGGCAAG
```

[0194]

[0195] SEQ ID NO:42:

```
1         10         20         30         40         50
|         |          |          |          |          |
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

[0196]

[0197] C_HC_L Fc+

[0198] SEQ ID NO:43:

```
1         10         20         30         40         50
|         |          |          |          |          |
AGGACAGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCACCCAGCGACGAGCA
GCTGAAGTCCGGCACAGCCAGCGTGGTCTGCCTGCTGAACAACTTCTACC
CCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGC
AACAGCCAGGAAAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAG
CCTGTCTAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGG
TGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG
AGCTTCAACAGAGGCGAGTGCGGCGGCTCTGGCGGAGGATCCGGGGGAGG
ATCAGGCGGCGGAAGCGGAGGCAGCGCTAGCACAAAGGGCCCCTCCGTGT
TCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTG
GGCTGCCTGGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAA
CTCTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGA
GCAGCGGCCTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCTAGCAGCAGC
CTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACAC
CAAAGTGGACAAGCGGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACGT
GTCCCCCCTGCCCAGCCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTG
TTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGT
GACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCA
ATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGA
GAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT
GCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA
AGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAG
CCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCCCCCAGCCGGGACGAGCTGAC
CAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCG
ATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAG
ACCACCCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAA
GCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCT
CCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGC
CTGAGCCCCGGCAAA
```

[0199]

[0200] SEQ ID NO:44:

```
1         10         20         30         40         50
|         |          |          |          |          |
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGECGGSGGGSGGGSGGGSGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK
```

[0201]

[0202] **실시예 2 - Fc 작제물 단백질의 발현**

[0203] Fc 작제물의 단백질 발현을 위해, 실시예 1에 기재된 A 내지 H로부터 선택된 DNA 플라스미드 작제물 중 2개를 EXPI293 세포(LifeTechnologies)로 트랜스펙션시켰다. 플라스미드 DNA를 EXPI293 세포로 도입시키기 위해 리포솜 트랜스펙션을 이용하였다. 트랜스펙션된 플라스미드 작제물의 전체량을 고정시킨 반면, 다양한 플라스미드 작제물의 비를 변화시켜, 필요한 작제물의 수득량을 최대화시켰다(하기 표 3 참조). 각각의 Fc 작제물에 대해, 2개의 트랜스펙션된 DNA 플라스미드 작제물의 비(질량 기준)가 표 3에 제시된다. 작제물의 예시는 도 1 내지 도 7b에 제시된다.

[0204] 단백질 발현 후, 발현된 작제물을 단백질 A-기반 친화성 컬럼 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상층액으로부터 정제하였다. 배지 상층액을 AKTA Avant 분취용 크로마토그래피 시스템(GE Healthcare Life Sciences)을 이용하여 Poros MabCapture A(LifeTechnologies) 컬럼 상에 로딩하였다. 이후, 포획된 Fc 작제물을 인산염 완충 염수(저염 세척)로 세척한 후, 500 mM NaCl이 보충된 인산염 완충 염수(고염 세척)로 세척하였다. Fc 작제물을 100 mM 글리신, 150 mM NaCl, pH 3 완충액으로 용리시켰다. 컬럼으로부터 나온 단백질 용액을 100 mM의 최종 농도로의 1M TRIS pH 7.4의 첨가에 의해 중화시켰다. Fc 작제물을 Poros® XS 수지(Applied Biosciences Cat. # 4404336)를 이용한 이온 교환 크로마토그래피에 의해 추가로 분획화시켰다. 컬럼을 10 mM MES, pH 6(완충액 A)으로 예비 평형화시키고, 샘플을 10 mM MES, 500 mM 소듐 클로라이드, pH 6(완충액 B)에 대한 구배로 용리시켰다.

[0205] 본 발명자는 전체 7개의 Fc 작제물을 획득하였다(하기 표 3 및 도 1 내지 도 7b 참조). 정제된 Fc 작제물을 환원 및 비-환원 조건 둘 모두 하에서 SDS-PAGE(소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 젤 전기영동)에 의해 분석한 후, 쿠마시 블루 염색하여, 예상 크기의 단백질 밴드의 존재를 확인하였다.

표 3

작제물	트랜스펙션된 플라스미드	플라스미드 A:B 의 비	kDa 단위의 대략적 MW (환원 SDS-Page)	kDa 단위의 대략적 MW (비-환원 SDS-Page)
1	A: Wt Fc	n/a	25	50
2	A: 융기 Fc B: 공동 Fc	1:1	25	50
3	A: 전하 Fc		25	50
4	A: Wt-12-Wt Fc2 B: Wt FC	1:2	25, 50	100
5	A: 융기-20-전하 Fc2 B: 공동 Fc	2:1	25, 50	150
5*	A: 융기-20-전하 Fc2* B: 공동 Fc*	2:1	25, 50	150
6	A: 융기-20-융기 Fc2 B: 공동 Fc	1:1	25, 50	100
7 및 8	A: Ch, Cl, Fc+	n/a	50	100

[0206]

[0207] **실시예 3 - 작제물 4의 제조 및 SDS-PAGE 분석**

[0208] 2개의 DNA 플라스미드 작제물, wt-12-wt Fc2(실시예 1의 DNA 플라스미드 작제물 E) 및 wt Fc(실시예 1의 DNA 플라스미드 작제물 A)를 작제물 4를 발현시키기 위해 이용하였다(도 4). 실시예 2에 기재된 바와 같이 단백질 발현 및 정제를 위해 2개의 플라스미드 작제물을 HEK 293 세포로 트랜스펙션시켰다. 도 11의 A 및 도 11의 B는 작제물 4의 환원 및 비-환원 SDS-PAGE를 제시한다. 환원 SDS-PAGE(도 11의 A) 시, 본 발명자는 wt Fc 도메인 단량체에 해당하는 약 25 kDa의 밴드(레인 2 및 3, 도 11의 A) 및 wt-12-wt Fc2 직렬 이합체에 해당하는 50 kDa의 밴드(레인 1 내지 3, 도 11의 A)를 관찰하였다. 비-환원 SDS-PAGE(도 11의 B) 시, 레인 2 및 3 각각은 각각 더 높은 단백질 양(1/2) 및 더 낮은 단백질 양(1/3)의 작제물 4의 최종 단백질 생성물을 함유한다. 본 발명자는 작제물 4를 형성하는 wt-12-wt Fc2 직렬 이합체와 2개의 wt Fc 도메인 단량체의 회합에 해당하는 약 100 kDa에서의 하나의 주요 밴드, 및 wt Fc 도메인 단량체와 연결되지 않는 자유 wt-12-wt Fc2 직렬 이합체에 해당하는 약 50 kDa에서의 대략 동등한 신호 강도의 또 다른 주요 밴드를 관찰하였다.

[0209] 또한, 본 발명자는 wt-12-wt Fc2 및 wt Fc 도메인 단량체의 다합체에 해당하는 약 150 kDa, 200 kDa 및 250 kDa(레인 2 및 3, 도 11의 B)에서의 고분자량 밴드를 관찰하였다.

[0210] **실시예 4 - 작제물 6의 제조 및 SDS-PAGE 분석**

[0211] 2개의 플라스미드 작제물, 융기-20-융기 Fc2(실시예 1의 DNA 플라스미드 작제물 G) 및 공동 Fc(실시예 1의 DNA 플라스미드 작제물 C)를 작제물 6을 발현시키기 위해 이용하였다(도 6). 실시예 2에 기재된 바와 같이 단백질 발현 및 정제를 위해 2개의 플라스미드 작제물을 HEK 293 세포로 트랜스펙션시켰다. 도 12의 A 및 도 12의 B는 작제물 6의 환원 및 비-환원 SDS-PAGE를 제시한다. 환원 SDS-PAGE(도 12의 A) 시, 본 발명자는 공동 Fc 도메인 단량체에 해당하는 약 25 kDa의 밴드(레인 2 및 3, 도 12의 A) 및 융기-20-융기 Fc2 직렬 이합체에 해당하는 50 kDa의 밴드(레인 1 내지 3, 도 12의 A)를 관찰하였다. 비-환원 SDS-PAGE(도 12의 B) 시, 레인 2 및 3 각각은 더 높은 단백질 양(1/2) 및 더 낮은 단백질 양(1/3)의 작제물 6의 최종 단백질 생성물을 함유한다. 본 발명자는 융기-20-융기 Fc2 직렬 이합체와 2개의 공동 Fc 도메인 단량체의 회합에 해당하는 약 100 kDa에서의 하나의 주요 밴드 및 임의의 공동 Fc 도메인 단량체와 조합되지 않은 자유 융기-20-융기 Fc2 직렬 이합체에 해당하는 약 50 kDa에서의 더 약한 신호 강도의 작은 밴드를 관찰하였다.

[0212] 작제물 5를 이용하여 유사한 실험을 수행하였다(도 13). 2개의 플라스미드 작제물, 융기-20-전하 Fc2(실시예 1의 DNA 플라스미드 작제물 F) 및 공동 Fc(실시예 1의 DNA 플라스미드 작제물 C)를 작제물 5을 발현시키기 위해 이용하였다(도 5). 2개의 플라스미드 작제물을 양이온성 지질 트랜스펙션에 의해 경험적으로 결정된 비로 EXPI293 세포로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션된 배양물을 6 내지 8일 동안 세포 배양 배지에서 인큐베이션하였다. 이 시간 후, 세포를 원심분리에 의해 제거하였다. 상층액(배지, 도 13의 레인 1)은 트랜스펙션된 세포에 의해 배지로 분비된 작제물 5를 함유한다. 배지 내에는 또한 오염 숙주 세포 단백질이 존재하였다. 작제물 5를 단백질-A 친화성 크로마토그래피에 의해 배지로부터 정제하였다. 이러한 시점에서, 배지는 3개의 Fc 도메인(삼합

체)를 갖는 필요한 작제물 5뿐만 아니라 2개의 Fc 도메인(이합체, 약 10 내지 15%) 및 1개의 Fc 도메인(단량체, 5 내지 10%)을 갖는 일부 비율의 잘못 어셈블리된 단백질을 함유하였다. 또한, 적은 양의 오염 숙주 세포 단백질이 여전히 존재하였다. 단백질 A 컬럼 용리액을 완충액 교환하고, 농축시키고, 강한 양성 교환(SCX) 크로마토그래피에 의해 분획화시켰다. 간단히, 작제물 5를 SCX 컬럼에 결합시킨 후, 염 및 pH 구배로 용리시켰다. 이러한 단계는 2개 또는 1개의 Fc 도메인을 갖는 잘못 어셈블리된 단백질 대부분, 원치 않는 번역 후 변형을 갖는 작제물 5, 및 오염 숙주 세포 단백질로부터 3개의 Fc 도메인을 갖는 필요한 작제물 5의 분리를 가능케 하였다. 또 다른 라운드의 농축 및 완충액 교환 후, 작제물 5의 순수한 최종 단백질 생성물을 획득하였다(순수, 도 13의 레인 2).

[0213] 도 13은 작제물 5를 발현하도록 공학처리된 배양된 숙주 세포로부터 획득된 배지(레인 1), 및 정제된 작제물 5(레인 2)의 SDS-PAGE를 도시한다. 각각의 샘플에 대한 SDS-PAGE의 주요 밴드의 백분율을 제시하는 표가 또한 제시된다. 배지 샘플(레인 1)에서, 3개의 Fc 도메인을 갖는 작제물 5의 최종 단백질 생성물에 해당하는 약 150 kDa의 주요 밴드가 관찰되었다. 배지 샘플은 또한 2개의 Fc 도메인을 갖는 단백질에 해당하는 100 kDa에서의 더 약한 신호 강도의 작은 밴드, 및 1개의 Fc 도메인을 갖는 단백질에 해당하는 50 kDa에서의 가장 약한 신호 강도의 제2의 작은 밴드를 함유하였다. 정제(레인 2) 후, 3개의 Fc 도메인을 갖는 작제물 5의 최종 단백질 생성물에 해당하는 약 150 kDa에서의 주요 밴드가 진해졌다. 작제물 5의 SDS-PAGE에서의 단백질 밴드의 신호 강도의 정량은 배양 배지에서 단백질 정제 전에 전체 단백질의 약 79%가 작제물 5의 필요한 단백질 생성물인 것을 나타내었다. 단백질 정제 후, 약 95% 순도를 갖는 작제물 5의 실질적으로 상동성인 집단이 획득되었다.

[0214] 이들 발견은 C_H3 항체 불변 도메인 내에 공학처리된 융기 또는 공학처리된 공동을 함유하는 선택성 이합체화 모듈이 자가 회합을 감소시키고, 조절되지 않는 Fc-매개 응집물 또는 다합체 형성을 방지하는 것을 입증하며, 이는 본원에 기재된 작제물에서의 이합체화 선택성 모듈의 사용이 Fc 작제물의 실질적으로 상동성인 제조물을 생성시키기 위해 이용될 수 있음을 나타낸다. 이러한 관찰은, 예를 들어, 생물학적 활성 및 효능을 조절하기 위한 작제물의 제조, 수득량, 및 순도에서의 장점과 유의한 관련성을 갖는다.

[0215] **실시예 5 - 결합 친화성 및 결합성**

[0216] 다수의 Fcɣ 수용체에 대한 작제물의 결합을 세포-기반 FRET 경쟁 검정(Cisbio Bioassays)을 이용하여 평가하였다. 작제물 5 및 6은 야생형 Fc 도메인(작제물 1)에 비해 FcɣRIIa, FcɣRIIb, 및 FcɣRIIIa에 대해 IC50에서의 적어도 10배 감소(즉, 증가된 결합)를 나타내었다.

[0217] **실시예 6 - 단핵구 활성화 및 차단 검정**

[0218] 1개, 3개, 및 2개의 Fc 도메인을 각각 함유하는 3개의 Fc 작제물인 작제물 1, 5, 및 6을 단독으로 THP-1 단핵구를 활성화시키는 이들의 능력에 대해 시험하였다. 단핵구 활성화의 지표로서 IL-8 방출을 이용하였다. 작제물 1, 5, 및 6을 실시예 1 및 2에 기재된 바와 같이 발현시키고 정제하였다. 정제된 Fc 작제물 각각을 THP-1 단핵구에 첨가하였다. 3개의 작제물 중 어느 것에 대해서도 실질적 IL-8 방출이 관찰되지 않았다. 데이터는 도 14a에 제공된다.

[0219] 이후, 동일한 3개의 Fc 작제물을 Fc 수용체-매개 단핵구 활성화를 억제하는 이들의 능력에 대해 시험하였다. IgG1(100 ㎍/mL)을 96 웰 플레이트에 고정시키고, THP-1 단핵구에 의한 IL-8 방출을 유도하도록 이용하였다. 이후, 작제물 1, 5 및 6 또는 대조군 물질(정맥내 면역글로불린(IVIg), 인간 혈청 알부민(HSA), 및 글리신 완충액)의 연속 희석을 조직 배양 플레이트에서 수행하였다. THP-1 단핵구(1.5×10^5 세포)를 충분한 혼합과 함께 즉시 첨가하였다. 배양물을 18시간 동안 인큐베이션하고, 상층액을 IL-8에 대해 분석하였다. 작제물 5 및 6은 적은 용량에서 작제물 1보다 더욱 효과적으로 IL-8 방출을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 데이터는 도 14b에 제공된다.

[0220] **실시예 7 - K/BxN 관절염 모델**

[0221] Fc 작제물 1, 5, 및 6 및 IVIg를 문헌[Anthony, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105:19571-19578 (2008)]에 기재된 방법을 이용하여 K/BxN 혈청 전달 모델에서 관절 염증으로부터 마우스를 보호하는 이들의 능력에 대해 시험하였다. 12주령 K/BxN 마우스를 발생시키고, Jackson Laboratories로부터 구입하였다. 전체 30마리의 C57BL 마우스를 각각 6마리의 마우스의 5개 그룹으로 나누었다. 각각의 그룹에 200 ㎕의 K/BxN 혈청(관절염 유도 혈청)의 주사(0일) 1시간 전에 200 ㎕의 0.1 g/kg의 작제물 6, 200 ㎕의 0.1 g/kg의 작제물 5, 200 ㎕의 0.1 g/kg의 IVIg, 230 ㎕의 1 g/kg의 IVIg, 또는 200 ㎕의 인산염-완충 염수(PBS)를 정맥내(i.v.) 주사하였다.

발 종창 및 발목 두께의 임상 시험에 의해 염증을 스코어링하였다. 발 종창에 대해, 각각의 발은 0 내지 3(0, 종창 없음; 3, 최대 종창)으로 스코어링되었다. 개별적 마우스 당 전체 임상 스코어를 위해 4개의 발의 스코어를 추가하였다. 발목 두께에 대해, 캘리퍼스 측정을 이용하였다. 각각의 마우스를 0일로부터 10일까지 매일 스코어링하였다. 6마리의 마우스의 각각의 그룹에 대한 매일의 평균 임상 스코어를 도 15에서 작도하였다.

[0222] 도 15에 제시된 바와 같이, 1 g/kg의 IVIg, 0.1 g/kg의 작제물 5, 및 0.1 g/kg의 작제물 6은 유사한 수준의 염증 보호를 제공하였다. 작제물 5 및 6을 IVIg의 용량에 비해 10배 적은 용량으로 투여했음을 고려하면, 작제물 5 및 6은 IVIg보다 더욱 효능이 있는 것으로 보였다.

[0223] **실시예 8 - 만성 ITP 모델**

[0224] 작제물 1 및 5뿐만 아니라 IVIg를 면역성 혈소판감소증(ITP)을 겪는 마우스를 치료하는 이들의 능력에 대해 시험하였다. 혈소판 고갈을 야기시키는 항-혈소판 Ab에 의해 ITP를 유도하였다. 45마리의 C57BL/6 마우스(18 내지 22 g, Charles Rivers Labs, MA)에 4일 동안 매일(1일, 2일, 3일 및 4일) 1회로 1.5 ㎍/마우스의 래트 항-CD41 항체(Ab)(클론 MWReg30 BioLegend cat#133910)를 i.p. 주사하였다. 정상 혈소판 수준을 결정하기 위해 5마리의 마우스에 1.5 ㎍/마우스의 래트 IgG1, k 아이소형 대조군 Ab(BioLegend cat# 400414)를 주사하였다. Ab를 100 ㎕의 PBS 중에서 주사하였다. 모든 마우스에 3일에서의 세번째 항-CD41 Ab 주사 2시간 후 200 ㎕의 염수 대조군, 1 g/kg의 IVIg, 0.02, 0.03, 0.1 및 0.3 g/kg의 작제물 1, 및 0.004, 0.02 및 0.1 g/kg의 작제물 5를 1회 정맥내 투여하였다. VetScan 기계에 의해 전체 혈소판 수준을 정량하기 위해 마우스를 5일(네번째 항-CD41 Ab 주사 24시간 후)에 채혈하였다. 모든 절차를 동물복지법 및 실험 동물의 관리 및 이용에 대한 지침에 따라 수행하였다.

[0225] 도 16에 제시된 바와 같이, 염수 대조군과 비교하는 경우 0.02 및 0.1 g/kg의 작제물 5를 이용한 치료적 처리 후에 혈소판 수준이 유의하게 증가되었다(다중 비교 검정과 함께 1원 ANOVA에 의해 **** p< 0.0001). 이들 그룹에서의 혈소판 수준은 정상의 아이소형 처리 그룹에서의 수준과 유사하였다. 1 g/kg의 IVIg 및 0.1 및 0.3 g/kg의 작제물 1을 이용한 치료적 처리는 또한 염수 대조군과 비교하는 경우 혈소판 수준을 유의하게 증가시켰으나(다중 비교 검정과 함께 1원 ANOVA에 의해 각각 * p< 0.05; **p<0.01), 이들 그룹에서의 혈소판 수준은 0.02 및 0.1 g/kg 작제물 5 처리 그룹에서보다 낮았다. 이러한 모델에서, 작제물 5는 IVIg보다 약 50배 더 효능이 있는 것으로 보였다.

[0226] **실시예 9 - 작제물 5*는 IVIg에 비해 FcγR에 대한 증가된 결합 및 결합성을 나타낸다.**

[0227] 실시예 8에 기재된 것과 동일한 프로토콜에 따라, 작제물 5*을 발현시키고 정제하기 위해 융기-20-전하 Fc2*(실시예 1의 작제물 F*) 및 공동 Fc*(실시예 1의 작제물 C*)를 인코딩하는 2개의 플라스미드 작제물을 이용하였다. 다양한 Fc 수용체에 대한 이러한 작제물의 결합 프로파일을 형광 공명 에너지 전달(FRET) 경쟁 결합 검정에서 IVIG의 결합 프로파일과 비교하였다.

[0228] 작제물 5*는 IVIg의 전체 결합 프로파일과 유사한 다양한 Fcγ-수용체에 대한 전체 결합 프로파일을 나타내었으나(FcγRIIb에 대해 가장 낮은 결합 친화성이 관찰됨), IVIg와 비교하는 경우 모든 낮은 친화성 FcγR에 대해 크게 향상된 결합을 나타내었다. FcγR에 대한 증가된 결합은 더 높은 결합성에 해당하며, 이는 각각의 개별적 결합 상호작용의 축적된 친화성의 누적 효과와 관련된다. 작제물 5*에 대한 IC50 값은 IVIg의 IC50 값보다 시종일관 낮았으며, 이는 개별적 IgG 분자에 비한 낮은 친화성 FcγR에 대한 결합에서의 현저한 증가를 나타낸다. 예를 들어, IVIg에 비해, 작제물 5*은 FcγRIIa(H131 변이체)에 대해 약 170배 증가된 친화성, 및 FcγRIIb에 대해 55배 증가된 친화성을 나타내었다.

[0229] **실시예 10 - THP-1 단핵구 세포에서의 포식작용의 억제**

[0230] 작제물 5* 및 IVIg를 포식작용의 모델에서 시험하였다.

[0231] 포식작용은 세포(포식세포)가 고체 입자, 예를 들어, 박테리아를 삼켜 포식소체로 공지된 내부 소포를 형성하는 과정이다. 면역계에서, 포식작용은 병원체 및 세포 조직파편을 제거하는데 이용되는 주요 메커니즘이다. 단핵구 및 대식세포가 FcγR 매개 진입에 크게 의존하는 메커니즘인 포식작용을 통해 면역계로부터 옵소닌화(항체 코팅된) 입자를 청소하는데 특화된 세포 중 하나이다. 그러나, 자가면역 질병에서, 포식세포는 활성화되어 염증유발 사이토카인의 유해한 방출 또는 신체 내의 다른 중요한 세포의 포식작용을 초래할 수 있다. 1000명이 넘는 혈액

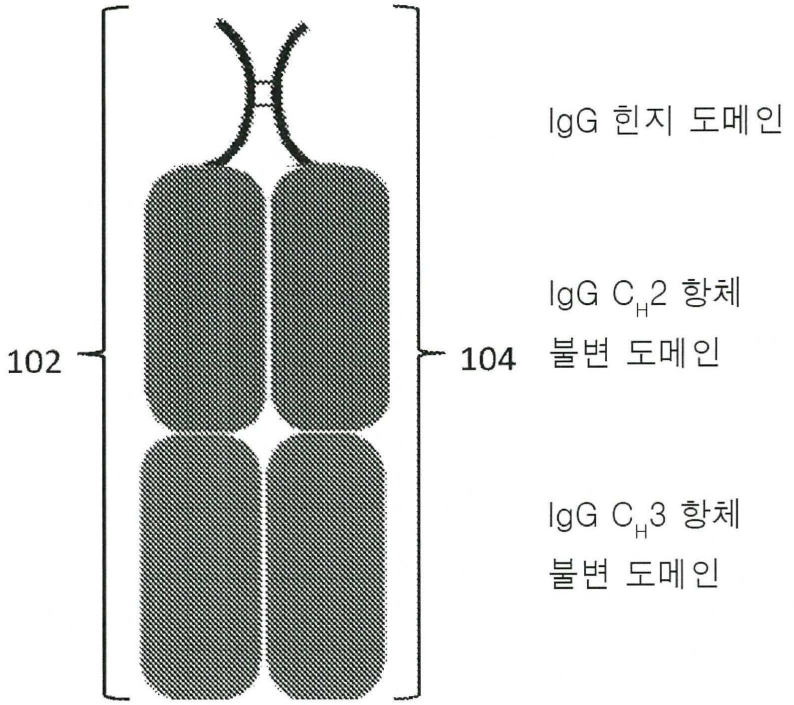
공여자의 혈장으로부터 추출된 풀링된 다가 IgG 항체를 함유하는 IVIg가 자가면역 질병을 치료하는데 이용된다.

[0232] 이러한 검정 시스템에서, 옵소닌화된 박테리아 또는 바이러스의 모방체인 형광 표지된 항체-코팅된 라텍스 비드가 THP-1 세포에 공급되었고, 작제물 5* 및 IVIg의 존재 또는 부재하에서 포식작용되었다. 인큐베이션 기간 종료시, 임의의 외부 형광을 트립판 블루로 켄칭시키고, 세포내 형광의 양을 흐름세포측정법에 의해 정량하였다. 모든 그룹을 이들의 비-처리 대조군(THP-1 세포 및 라텍스 비드 단독)으로 표준화시켰다. 결과는 2개의 별개의 실험의 대표이다.

[0233] 도 17에 제시된 바와 같이, THP-1 단핵구 세포에 의한 옵소닌화 비드의 포식작용은 IVIg 및 작제물 5* 둘 모두의 처리에 의해 억제되었으나, 작제물 5*에 대한 IC50 값은 IVIg에 대한 IC50 값보다 약 100배 더 낮았다. 이는 본 발명의 Fc 작제물, 예를 들어, 작제물 5*가 자가면역 적응증뿐만 아니라 IVIg를 이용하여 치료 가능한 다른 적응증을 치료하는데 이용될 수 있음을 암시한다.

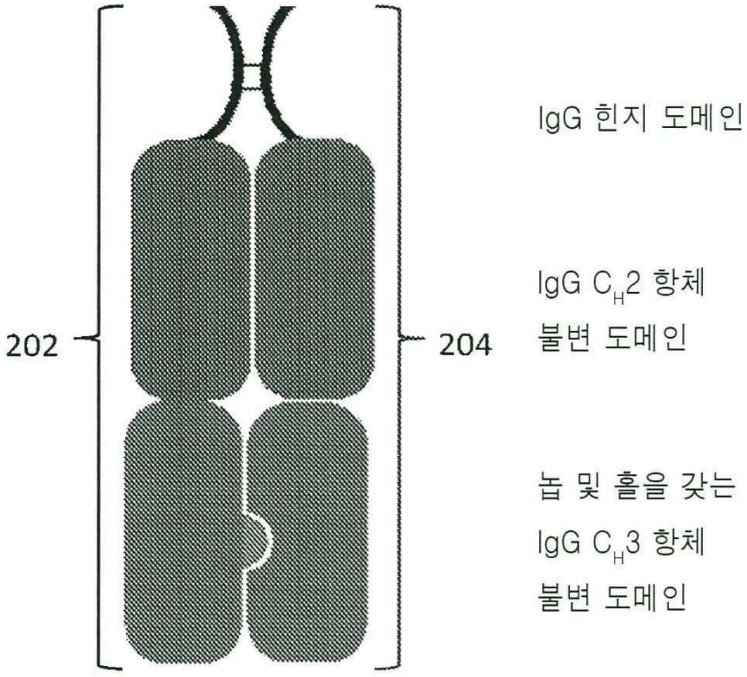
도면

도면1



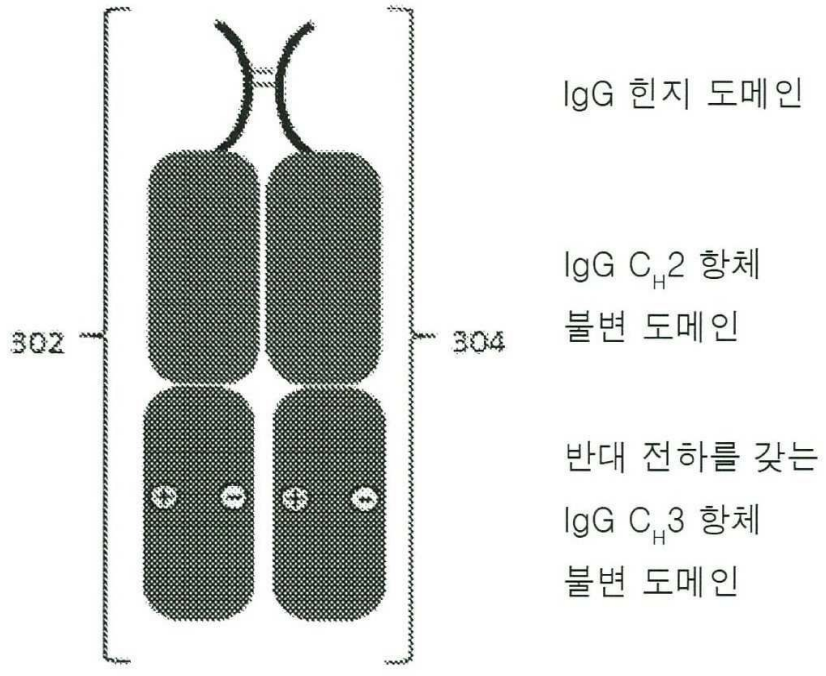
작제물 1

도면2



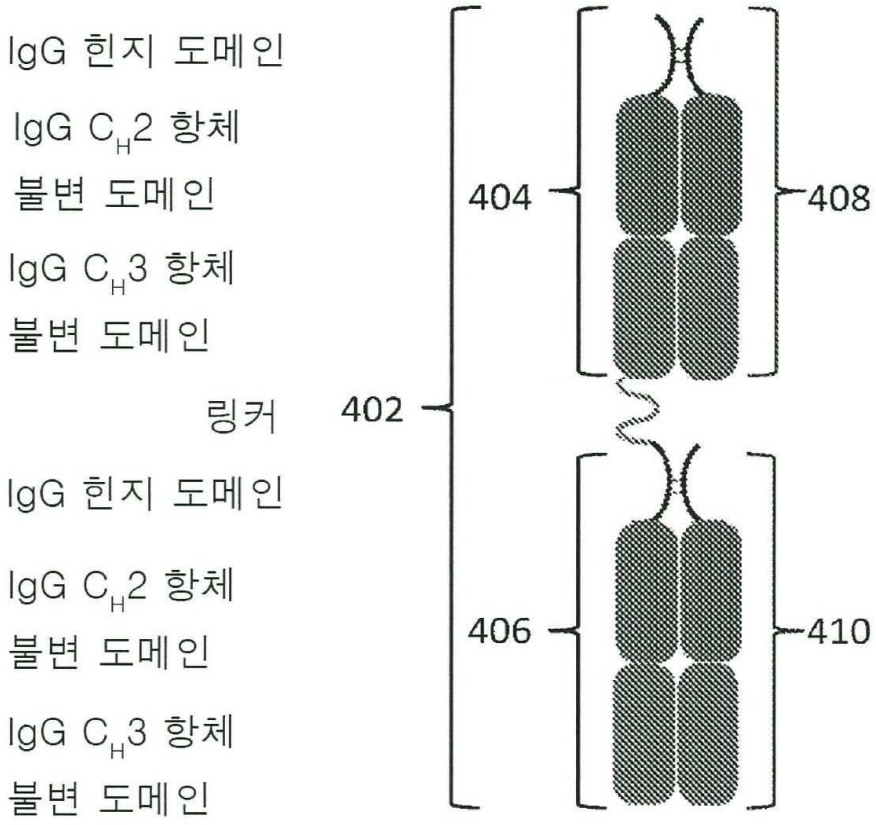
작제물 2

도면3



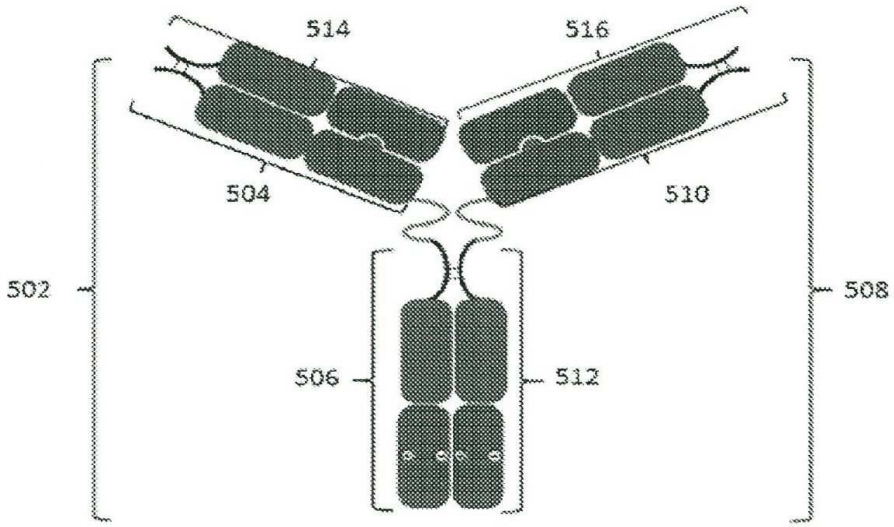
작제물 3

도면4



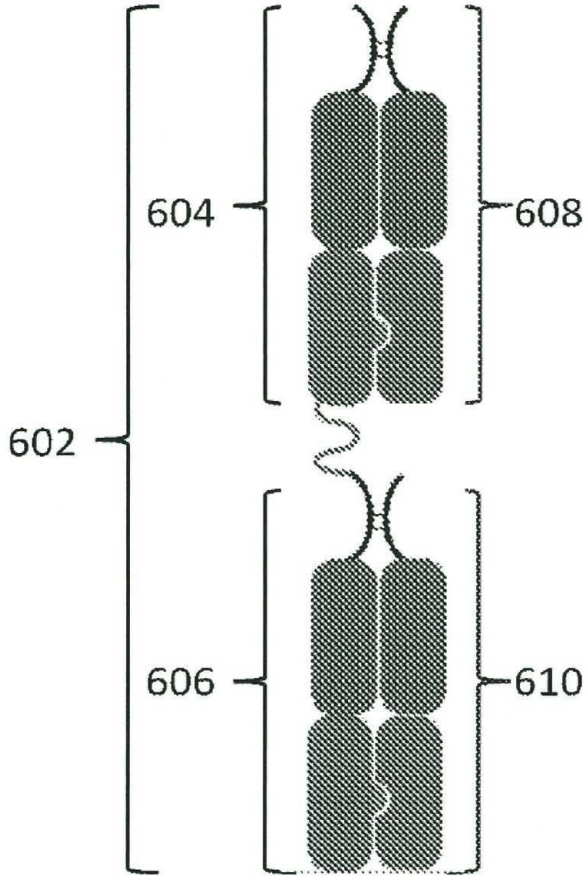
작제물 4

도면5



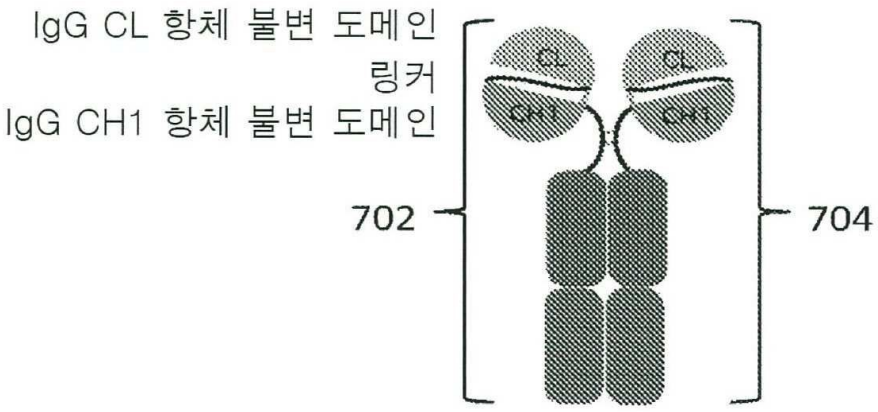
작제물 5, 5*

도면6



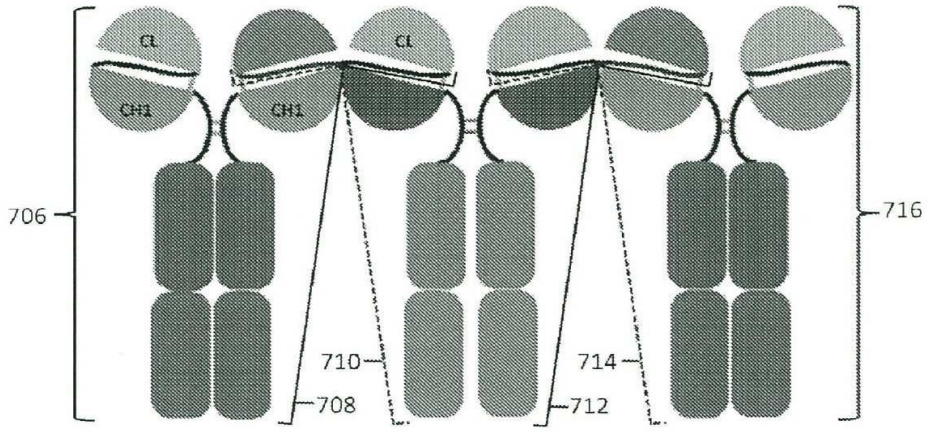
작제물 6

도면7a



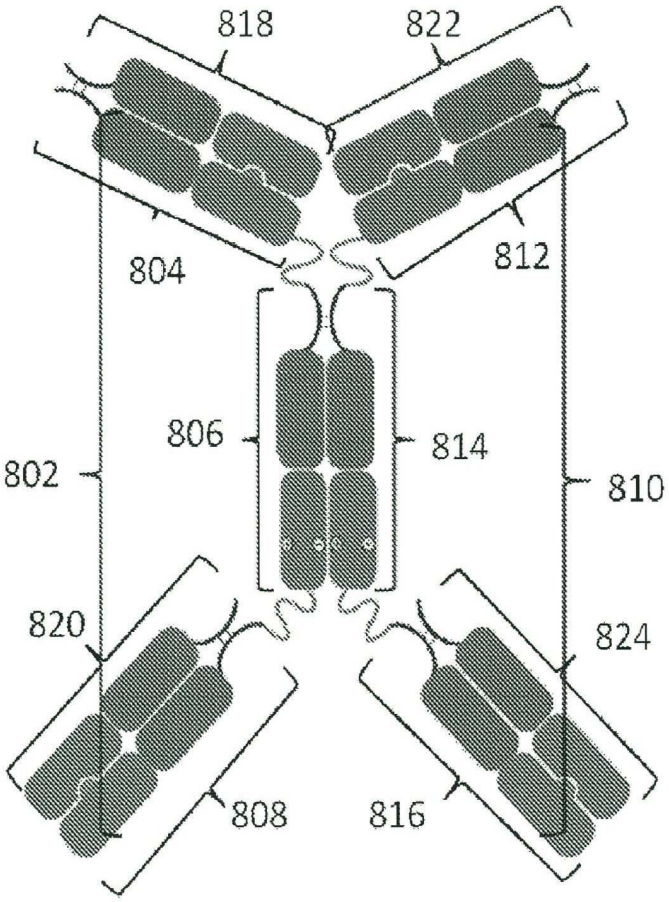
작제물 7

도면7b

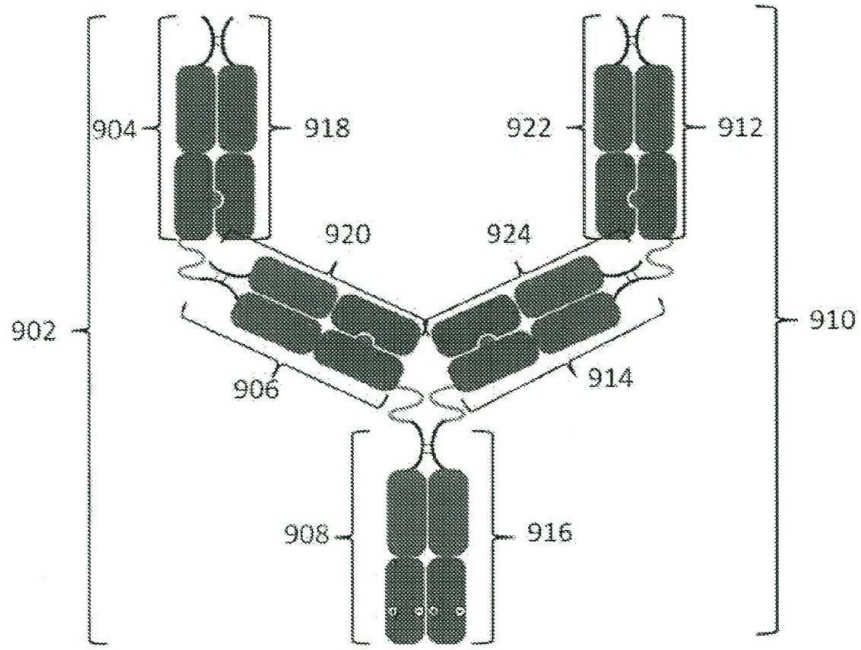


작제물 8 (작제물 7의 다합체)

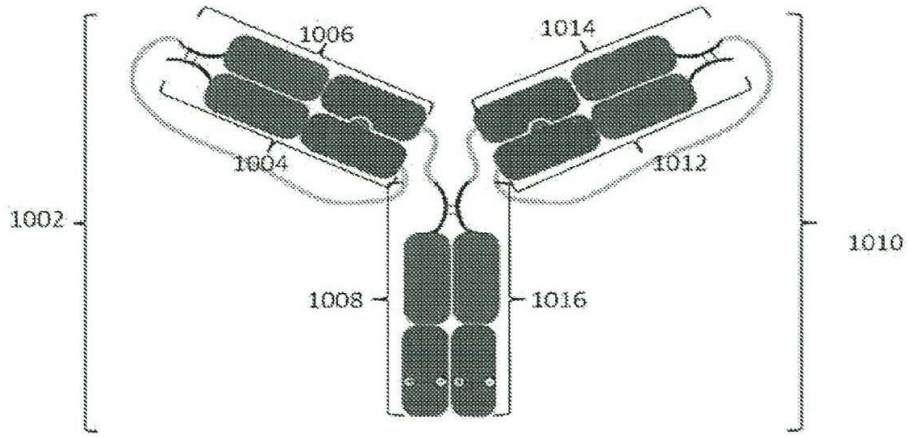
도면8



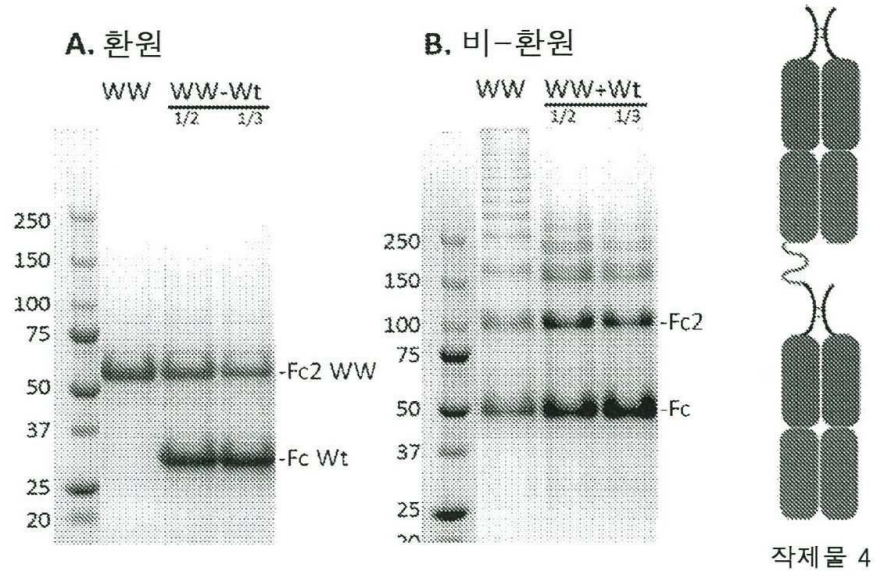
도면9


904
918
922
912
920
924
902
910
906
914
908
916

도면10

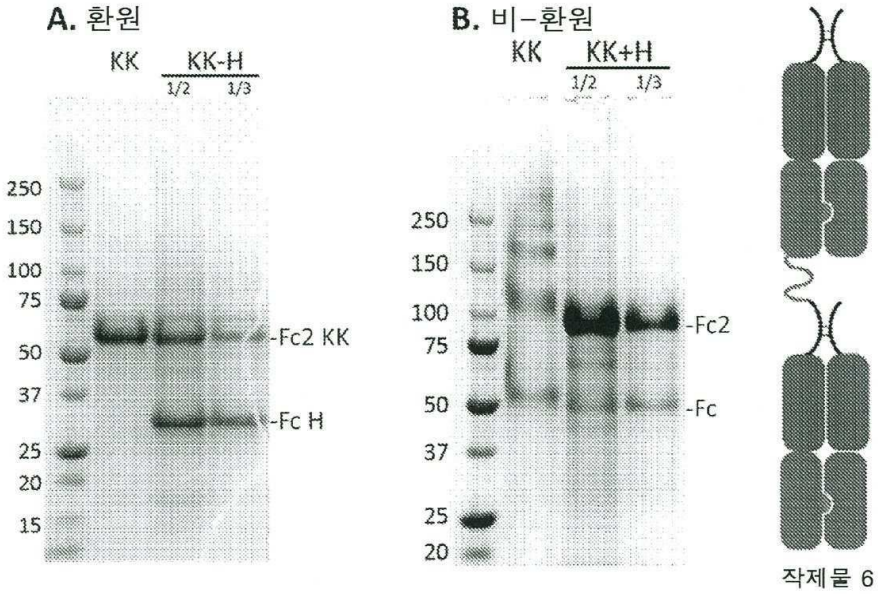

1006
1014
1004
1012
1002
1010
1008
1016

도면11



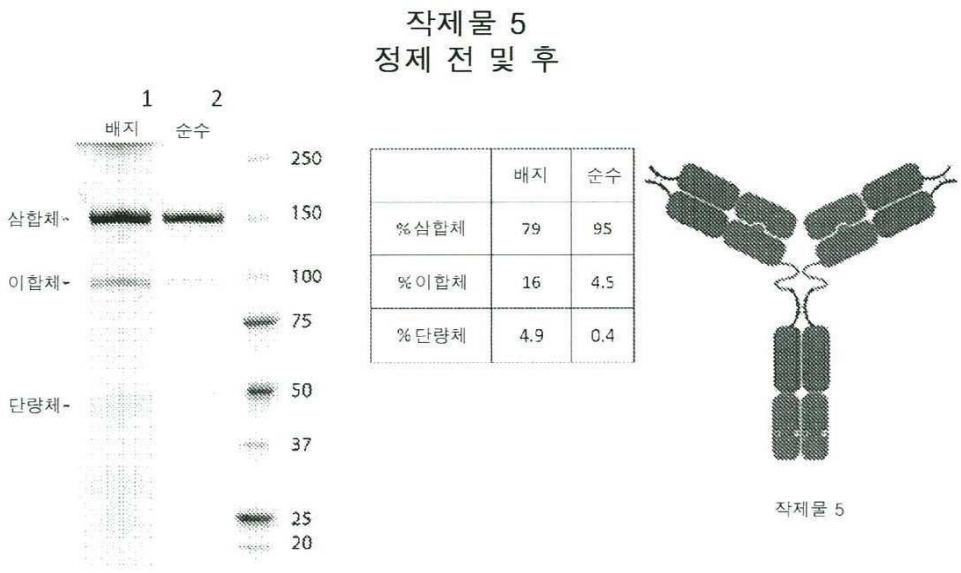
작제물 4

도면12

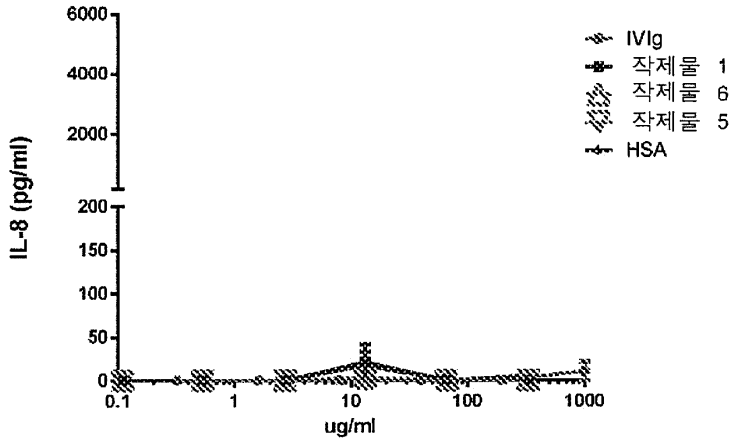


작제물 6

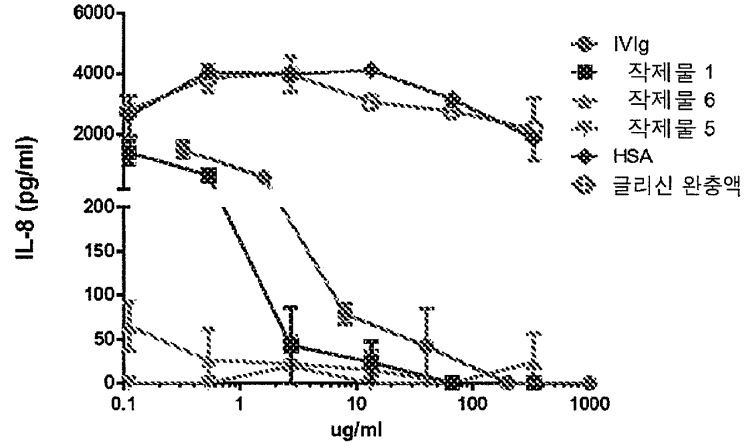
도면13



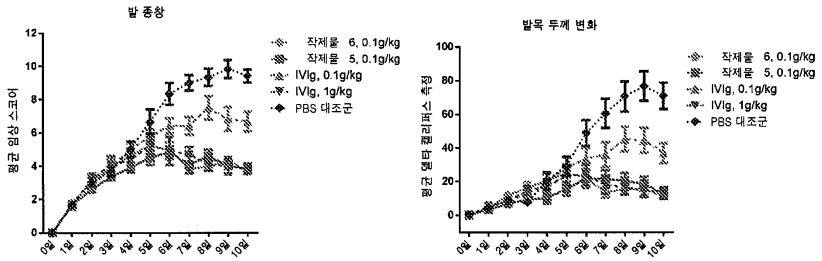
도면14a



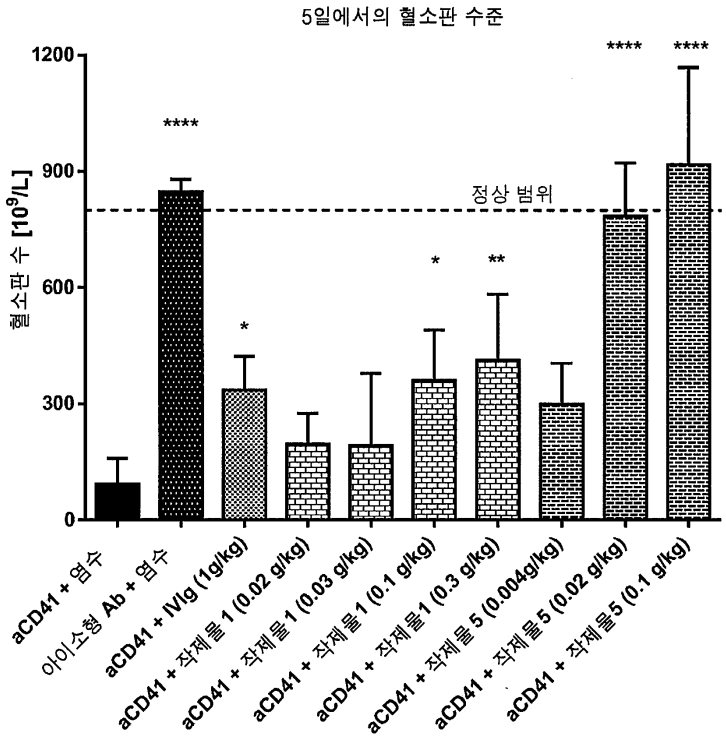
도면14b



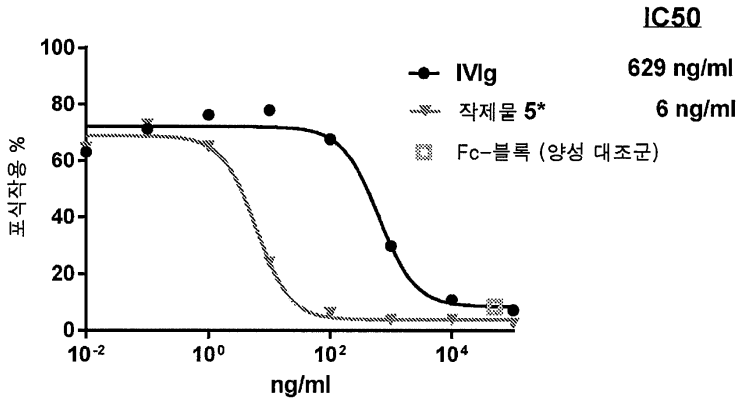
도면15



도면16



도면17



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS RELATED TO ENGINEERED FC CONSTRUCTS

<130> 50937-012WO3

<150> US 61/987,863

<151> 2014-05-04

<150> US 62/081,923

<151> 2014-11-19

<160> 46

<170> KopatentIn 3.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 1

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Synthetic Construct

<400> 2

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 3

Ser Gly Gly Gly

1

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 4

Gly Ser Gly Ser

1

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 5

Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 6

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<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 Construct

<400> 8

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

1 5 10

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Syntheic Construct

<400> 9

Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<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 Construct

<400> 11

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

1 5 10

<210> 12

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 12

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 13

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 14

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 15

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

1 5 10

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 16

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 17

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

1 5 10 15

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 18

Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly

1 5 10

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 19

Ser Ala Cys Tyr Cys Glu Leu Ser

1 5

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Synthetic Construct

<400> 20

Arg Ser Ile Ala Thr

1 5

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 21

Arg Pro Ala Cys Lys Ile Pro Asn Asp Leu Lys Gln Lys Val Met Asn

1 5 10 15

His

<210> 22

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 22

Gly Gly Ser Ala Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser

1 5 10 15

Gly Ala Ser Gly Thr Gly Thr Ala Gly Gly Thr Gly Ser Gly Ser Gly

20 25 30

Thr Gly Ser Gly

35

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 23

Ala Ala Ala Asn Ser Ser Ile Asp Leu Ile Ser Val Pro Val Asp Ser

1 5 10 15

Arg

<210> 24

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 24

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser

20 25 30

Gly Gly Gly Ser

35

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 25

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

1 5 10

<210> 26

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 26

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

1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly

20

<210> 27

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 27

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

1 5 10 15

Gly Ser

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 28

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10

<210> 29

<211> 681

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

gacaagaccc acacctgtcc gccttgccct gcccctgagc tgctgggagg ccccagcgtg 60

ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc cgaagtgacc 120

tgcgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac cctgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180

ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtacaa cagcacctac 240

cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agaatacaag 300

tgcaaagtct ccaacaaggc cctgcctgcc cccatcgaga aaaccatcag caaggccaag 360

ggccagcccc gcgagcccca ggtgtacaca ctgccccca gccgggacga gctgaccaag 420

aaccaggtgt ccctgacctg cctggtgaaa ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggaa 480

tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca ccccccctgt gctggacagc 540

gacggctcat tcttcctgta cagcaagctg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc 600

aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 660

ctgagcctga gccccggcaa g 681

<210> 30

<211> 227

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

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> 31

<211> 681

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 31

gacaagaccc acacctgtcc gccttgccct gcccctgagc tgctgggagg ccccagcgtg 60

ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc cgaagtgacc 120

tgcgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac cctgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180

ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtacaa cagcacctac 240

cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agaatacaag 300

tgcaaagtct ccaacaaggc cctgcctgcc cccatcgaga aaaccatcag caaggccaag 360

ggccagcccc gcgagcccca ggtgtacaca ctgccccccct gccgggacga gctgaccaag 420

aaccaggtgt ccctgtggtg cctggtgaaa ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggaa 480

tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca ccccccctgt gctggacagc 540

gacggctcat tcttcctgta cagcaagctg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc 600

aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 660

ctgagcctga gccccggcaa g 681

<210> 32

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 32

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> 33

<211> 681

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 33

gacaagaccc acacctgtcc gccttgccct gcccctgagc tgctgggagg ccccagcgtg 60

ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc cgaagtgacc 120

tgcgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac cctgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180
ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtacaa cagcacctac 240
cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agaatacaag 300
tgcaaagtct ccaacaaggc cctgcctgcc cccatcgaga aaaccatcag caaggccaag 360
ggccagcccc gcgagcccca agtgtgtaca ctgccccccа gccgggacga gctgaccaag 420
aaccaggtgt ccctgagctg cgccgtgaaa ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggaa 480
tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca ccccccctgt gctggacagc 540

gacggctcat tcttcctggt tagcaagctg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc 600
aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 660
ctgagcctga gccccggcaa g 681

<210> 34
<211> 227
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<400> 34

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> 35
<211> 681
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<400> 35

gacaagaccc acacctgtcc gccttgccct gcccctgagc tgctgggagg ccccagcgtg 60
ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc cgaagtgacc 120
tgcgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac cctgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180
ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtacaa cagcacctac 240

cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agaatacaag 300
tgcaaagtct ccaacaaggc cctgcctgcc cccatcgaga aaaccatcag caaggccaag 360
ggccagcccc gcgagcccca ggtgtacaca ctgcccccca gccgggacga gctgaccaag 420
aaccaggtgt ccctgacctg cctggtgaaa ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggaa 480
tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca ccccccctgt gctgaaaagc 540
gacggctcat tcttcctgta cagcgacctg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc 600

aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 660

ctgagcctga gccccggcaa g 681

<210> 36

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 36

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gly Lys

225

<210> 37

<211> 1398

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 37

gacaagaccc acacctgtcc cccttgccct gcccctgagc tgctgggagg ccccagcgtg 60

ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc cgaagtgacc 120

tgcgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac cctgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180

ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtacaa cagcacctac 240

cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tcaacggcaa agagtacaag 300

tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgcctgcc cccatcgaga aaaccatcag caaggccaag 360

ggccagcccc gcgagcccca ggtctacaca ctgccccca gccgggacga gctgaccaag 420

aaccaggtct ccctgacctg cctggtgaaa ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggaa 480

tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca ccccccctgt gctggacagc 540

gacggctcat tcttcctgta cagcaagctg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc 600

aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 660

ctgagcctga gccccggcaa aggcgggggg tctgggggag gaagcggagg cggcagcgat 720

aagacccata cctgccctcc ctgtcccgct cccgaactgc tgggggggacc ctccgtgttt 780

ctgtttccac ctaagcctaa ggatacgctc atgatctcca gaacccctga agtcacatgt 840

gtggtggtcg atgtgtctca tgaagatccc gaagtcaagt ttaactggta tgtggatggg 900

gtcgaggtcc acaatgccaa aacaaagcct cgggaagaac agtataactc cacctacaga 960

gtcgtcagcg tgctgacagt ccttcatcag gattggctga atgggaaaga gtacaaatgt 1020

aaagtgtcta acaaagctct gcccgctcct atcgaaaaga ccatctccaa agccaaaggg 1080

cagcccagag aacctcaggt gtacaccctg ccaccctcca gagatgagct gacaaaaaat 1140

caggtgtcac tgacatgtct ggtgaaaggg ttttatccct ccgacattgc tgtggaatgg 1200

gaatccaatg ggcagcctga aaacaattat aagacaacac ctcccgtgct ggactccgat 1260

ggctcatttt ttctgtactc taaactgaca gtggataagt ccagatggca gcagggaaat 1320

gtgttttcct gctctgtgat gcatgaagct ctgcataatc actatacaca gaaaagcctg 1380

tccctgtccc ccggcaag 1398

<210> 38

<211> 466

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 38

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 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp
225 230 235 240
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
245 250 255
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
275 280 285
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
290 295 300
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305 310 315 320
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
325 330 335

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

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Gly Lys

465

<210> 39

<211> 1422

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 39

gacaagaccc acacctgtcc cccttgccca gcccctgagc tgctgggagg ccccagcgtg 60

ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc cgaagtgacc 120

tgcgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac cctgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180

ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtacaa cagcacctac 240

cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 300

tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgcctgcc cccatcgaga aaaccatcag caaggccaag 360

ggccagcccc gcgagcccca ggtgtacacc ctgccccctt gcagagatga gctgaccaag 420

aaccaggtgt ccctgtggtg cctggtcaag ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggaa 480

tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca ccccccctgt gctggacagc 540

gacggctcat tcttcctgta cagcaagctg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc 600

aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 660

ctgagcctga gccccggcaa gtctgggggga ggatcagggg gtggaagtgg cggtggatct 720

ggtggtggaa gcggaggcgg cgataagaca cacacatgcc ccccctgtcc agctcccgaa 780

ctgctggggg gaccctccgt gtttctgttt ccacctaagc ctaaggatac gctcatgatc 840

tccagaaccc ctgaagtcac atgtgtggtg gtcgatgtgt ctcatgaaga tcccgaagtc 900

aagtttaatt ggtatgtcga tggggtcgag gtgcacaatg ccaaaacaaa acctcgggaa 960

gaacagtata actccacata cagagtggtg tctgtcctca cagtcctgca tcaggattgg 1020

ctcaatggga aagagtacaa atgtaaagtc tctaacaagg ctctccccgc tccgatcgaa 1080

aagaccatct ccaaagccaa agggcagccc agagaacctc aggtctacac actgcctccc 1140

agccgggacg agctgacaaa aaatcaagtg tctctgacct gcctcgtgaa gggcttttat 1200

ccctccgaca ttgccgtcga gtgggagtcc aatggacagc cggaaaacaa ttataagacc 1260

acgcctccag tgctgaagtc cgacggcagc ttctttctgt actccgacct gacagtggat 1320

aagtccagat ggcagcaagg gaatgtgttc tcctgttccg tgatgcatga agccctccat 1380

aatcactata cccagaaaag cctgtccctg tcccctggca ag 1422

<210> 40

<211> 474

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 40

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 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
225 230 235 240
Gly Gly Gly Ser 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 Lys

465 470

<210> 41

<211> 1422

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 41

gacaagaccc acacctgtcc cccttgccct gcccctgagc tgctgggagg ccccagcgtg 60

ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc cgaagtgacc 120

tgcgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac cctgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180

ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtacaa cagcacctac 240

cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 300

tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgcctgcc cccatcgaga aaaccatcag caaggccaag 360

ggccagcccc gcgagcccca ggtgtacacc ctgccccctt gcagagatga actgaccaag 420

aaccaggtgt ccctgtggtg cctggtcaag ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggaa 480

tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca ccccccctgt gctggacagc 540

gacggctcat tcttcctgta cagcaagctg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc 600

aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 660

ctgagcctga gccccggcaa gtctgggggga ggatcagggg gtggaagtgg cggtggatct 720

ggtggtggaa gcggaggcgg cgataagaca cacacatgcc ccccctgtcc agctcccgaa 780

ctgctggggg gaccctccgt gtttctgttt ccacctaagc ctaaggatac gctcatgatc 840

tccagaaccc ctgaagtcac atgtgtggtg gtcgatgtgt ctcatgaaga tcccgaagtc 900

aagtttaact ggtatgtgga tggggtcgag gtccacaatg ccaaaacaaa gcctcgggaa 960

gaacagtata actccaccta cagagtcgtc agcgtgctga cagtcctgca tcaagattgg 1020

ctcaatggga aagagtataa gtgtaaagtc tcgaacaaag ccctccccgc tcctatcgaa 1080

aagaccatct ccaaagccaa agggcagccc agagaacctc aggtctacac actgcctcca 1140

tgtcgggacg agctgacaaa aaatcaggtg tcactgtggt gtctggtgaa ggggttttac 1200

ccttccgaca ttgctgtgga atgggaatcc aatgggcagc ctgaaaacaa ttataagaca 1260

acacctcccg tgctggactc cgatggctca ttttttctgt actctaaact gacagtggat 1320

aagtccagat ggcagcaggg aaatgtgttt tcctgctctg tgatgcatga agctctgcat 1380

aatcactata cacagaaaag cctgtccctg tcccctggca ag 1422

<210> 42

<211> 474

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<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 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 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
225 230 235 240
Gly Gly Gly Ser 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 Glu

370 375 380

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
385 390 395 400
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
405 410 415
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
420 425 430
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
450 455 460
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 43
<211> 1365
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<400> 43

aggacagtgg ccgctcccag cgtgttcatc ttcccaccca gcgacgagca gctgaagtcc 60
ggcacagcca gcgtggtctg cctgctgaac aacttctacc cccgcgaggc caaggtgcag 120
tggaaggtgg acaacgccct gcagagcggc aacagccagg aaagcgtcac cgagcaggac 180

agcaaggact ccacctacag cctgtctagc accctgaccc tgagcaaggc cgactacgag 240
aagcacaagg tgtacgcctg cgaagtgacc caccagggcc tgtccagccc cgtgaccaag 300
agcttcaaca gaggcgagtg cggcggctct ggcggaggat ccgggggagg atcaggcggc 360
ggaagcggag gcagcgctag cacaaagggc ccctccgtgt tccccctggc ccccagcagc 420
aagagcacat ctggcggaac agccgccctg ggctgcctgg tgaaagacta cttccccgag 480
cccgtgaccg tgtcctggaa ctctggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac ctttccagcc 540
gtgctgcaga gcagcggcct gtactccctg agcagcgtgg tgacagtgcc tagcagcagc 600

ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aaccacaagc ccagcaacac caaagtggac 660
aagcgggtgg aacccaagag ctgcgacaag acccacacgt gtcccccctg cccagccct 720

gaactgctgg gcggacctag cgtgttcctg ttccccccaa agcccaagga caccctgatg 780

atcagccgga cccccgaagt gacctgcgtg gtggtggacg tgtcccacga ggaccctgaa 840

gtgaagttca attggtacgt ggacggcgtg gaagtgcaca atgccaagac caagcccaga 900

gaggaacagt acaacagcac ctaccgggtg gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggac 960

tggctgaacg gcaaagagta caagtgcaag gtctccaaca aggccctgcc tgcccccatc 1020

gagaaaacca tcagcaaggc caagggccag ccccgcgagc cccaggtgta cacactgccc 1080

cccagccggg acgagctgac caagaaccag gtgtccctga cctgtctggt gaaaggcttc 1140

taccctccg atatcgccgt ggaatgggag agcaacggcc agcccgagaa caactacaag 1200

accacccccc ctgtgctgga ctccgacggc tcattcttcc tgtacagcaa gctgaccgtg 1260

gacaagagcc ggtggcagca gggcaacgtg ttcagctgct ccgtgatgca cgaggccctg 1320

cacaaccact acacccagaa gtccctgagc ctgagccccg gcaaa 1365

<210> 44

<211> 455

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 44

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Ser Thr

115 120 125

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

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

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

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

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 45
<211> 227
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<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
Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140
Leu Ser Cys Ala Val Glu 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> 46
<211> 474
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct

<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

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 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
225                 230                 235                 240
Gly Gly Gly Ser 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 Lys
465 470