(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0022913
(43) 공개일자 2023년02월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-0013677(분할)
(22) 출원일자 2023년02월01일
심사청구일자 2023년02월01일
(62) 원출원 특허 10-2022-0033182
원출원일자 2022년03월17일
심사청구일자 2022년03월17일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
정상택
서울특별시 강남구 선릉로69길 20, 112동 702호
고상환
서울특별시 성북구 솔샘로16길 11, 302호
조미경
서울특별시 성북구 보국문로 32-3, 다온빌 401호
(74) 대리인
위병갑

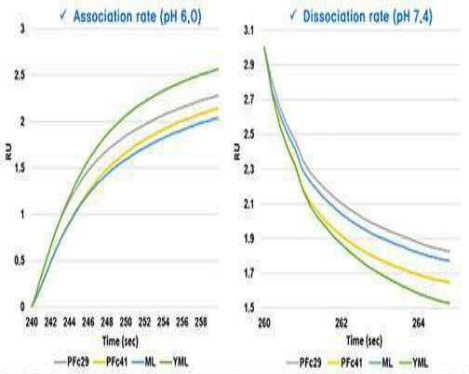
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 **pH-감응성 Fc 변이체**

(57) 요 약

본 발명은 pH 의존적으로 FcRn에 결합 및 해리함으로써 반감기가 향상된 Fc 변이체에 관한 것으로, 본 발명의 Fc 변이체는 종래의 혈중 반감기 향상 Fc 변이체들 보다 뛰어난 pH-선택적 FcRn 결합 및 해리 능력을 보이는 혈중 반감기가 극대화된 변이체이므로, 체내에서 낮은 반감기와 유지시간을 가진 수 많은 펩타이드 의약품 치료제에 결합하여 증가된 혈중 반감기로 장시간 약효 발휘가 가능하게 할 수 있으며, 이를 통해 항체 및 바이오의약의 투여 용량과 빈도를 획기적으로 줄일 수 있고, 신약개발 비용 감소와 신약개발 가능성을 크게 향상시킬 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도6



	Instant association rate (RU/sec)	Instant dissociation rate (RU/sec)	Fold of improved instant association rate	Fold of improved instant dissociation rate	Ratio of improved instant association rate to improved instant dissociation rate	Rank
PFc29	0.0656	0.125	1.34979424	1	1.273585	2
PFc41	0.0491	0.155	1.01028807	1.24	1.199009	3
ML	0.0486	0.1336	1	1.0688	1.107513	4
YML	0.0645	0.1559	1.32716049	1.2472	1.384213	1

(52) CPC특허분류
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2319/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711127806
과제번호 2020M3E5E2037775
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 (원천)바이오의료기술개발사업
연구과제명 포유류 세포 디스플레이, 차세대 염기서열분석 및 Fc epetoie 분석을 기반으로 한 치료용 항체의 표적세포 살상 작용 기작 극대화 기반 기술 개발
기 여 율 1/3
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2020.07.01 ~ 2022.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711135894
과제번호 2021R1F1A1046672
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 기본연구
연구과제명 효과적 암 진단 및 치료제를 위한 무당화 PD-1 단백질 변이체 개발
기 여 율 1/3
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2021.06.01 ~ 2022.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711098515
과제번호 2019R1A4A1029000
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 기초연구지원사업 (기초연구실)
연구과제명 면역관문 억제 항체치료 불응암 통합 제어 연구실
기 여 율 1/3
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2025.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

야생형 면역글로불린(immunoglobulin)의 Fc 영역에서 카밧 넘버링 시스템 (Kabat numbering system)에 따른 Q311M 및 M428L 돌연변이; 및 L309F, L309I, L309M, L309V, L309T, L309A, L309H, L309Q, L309N, L309K, L309W, L309R 또는 L309S 돌연변이를 포함하는, Fc 변이체.

청구항 2

제 1항에 있어서, 면역글로불린이 IgA, IgM, IgE, IgD 및 IgG로 이루어진 군으로부터 선택되는, Fc 변이체.

청구항 3

제 1항에 있어서, 야생형 면역글로불린의 Fc 영역은 서열번호 1의 아미노산서열을 포함하는, Fc 변이체.

청구항 4

제 1항에 있어서, 서열번호 2의 아미노산서열을 포함하는, Fc 변이체.

청구항 5

제 1항에 있어서, pH 7.0 내지 7.8에서 야생형 면역글로불린 Fc 영역에 비해 FcRn에 낮은 결합 친화력을 나타내는, Fc 변이체.

청구항 6

제 1항에 있어서, pH 5.6 내지 6.5에서 야생형 면역글로불린 Fc 영역에 비해 FcRn에 높은 결합 친화력을 나타내는, Fc 변이체.

청구항 7

제 1항에 있어서, pH 감응성인 Fc 변이체.

청구항 8

제 1항의 Fc 변이체를 포함하는 폴리펩타이드.

청구항 9

제 8항에 있어서, 야생형과 비교하여 생체 내 반감기(Half-life)가 증가된 폴리펩타이드.

청구항 10

제 1항의 Fc 변이체를 포함하는 항체.

청구항 11

제 10항에 있어서, 야생형에 비해 증가된 생체 내 반감기를 갖는 항체.

청구항 12

제 10항에 있어서, 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 미니바디(minibody), 도메인 항체, 이중특이적 항체, 항체 모방체, 키메라 항체, 항체 접합체(conjugate), 인간항체 또는 인간화 항체, 또는 이의 단편인 항체.

청구항 13

제 1항의 Fc 변이체, 제 8항의 폴리펩타이드, 제 10항의 항체를 코딩하는 핵산 분자.

청구항 14

제 13항의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 15

제 14항의 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 16

제 1항의 Fc 변이체, 비펩타이드성 중합체 및 생리활성 폴리펩타이드가 공유결합으로 연결되어 증가된 생체 내 반감기를 갖는 단백질 결합체.

청구항 17

제 16항에 있어서, 생리활성 폴리펩타이드가 인간 성장 호르몬, 성장 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬 방출 펩타이드, 인터페론, 콜로니 자극 인자, 인터루킨, 인터루킨 수용성 수용체, TNF 수용성 수용체, 글루코세레브로시다제, 마크로파지 활성 인자, 마크로파지 펩타이드, B세포 인자, T세포 인자, 단백질 A, 알러지 억제 인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 괴사 인자, 종양 억제 인자, 전이성장 인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, 아포리포단백질-E, 에리트로포이에틴, 고 당쇄화 에리트로포이에틴, 혈액인자 VII, 혈액인자 VIII, 혈액인자 IX, 플라즈미노젠 활성 인자, 유로키나제, 스트렙토키나제, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스뮤타제, 렙틴, 혈소판 유래 성장 인자, 표피 성장 인자, 골형성 성장 인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 인슐린, 인슐린 유도체, 글루카곤, 글루카곤 유사체 펩타이드-1 (Glucagon Like Peptide-1) 아트리오펩틴, 연골 유도 인자, 결합 조직 활성인자, 난포 자극호르몬, 황체 형성 호르몬, 난포 자극 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장 인자, 부갑상선 호르몬, 릴랙신, 씨크레틴, 소마토메딘, 인슐린-유사 성장 인자, 부신 피질 호르몬, 콜레시스토키닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드, 코티코트로핀 방출 인자, 갑상선 자극 호르몬, 수용체류, 수용체 길항물질, 세포표면항원, 단일클론 항체, 폴리클론항체, 항체 단편류, 및 바이러스 유래 백신 항원으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 단백질 결합체.

청구항 18

제 1항의 Fc 변이체, 제 8항의 폴리펩타이드, 제 10항의 항체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 19

제 18항에 있어서, 면역원성 세포사멸 유도제를 추가로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 20

제 19항에 있어서, 면역원성 세포사멸 유도제는 안트라사이클린계열 항암제, 탁산 계열 항암제, 항-EGFR 항체, BK 채널 작용제, 보르테조밉(Bortezomib), 강심성 배당체(cardiac glycoside), 사이클로포스마이드 계열 항암제, GADD34/PP1 저해제, LV-tSMAC, Measles 바이러스, 블레오마이신(bleomycin), 미토잔트론(mitoxantrone) 또는 옥살리플라틴(oxaliplatin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 21

1) 제 1항의 Fc 변이체를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및

2) 상기 숙주세포에 의해 발현된 Fc 변이체를 회수하는 단계를 포함하는, 야생형에 비해 증가된 생체 내 반감기를 가지는 Fc 변이체의 제조방법.

청구항 22

1) 제 8항의 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및

2) 상기 숙주세포에 의해 발현된 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는, 야생형에 비해 증가된 생체 내 반감기를 가지는 Fc 변이체를 포함하는 폴리펩타이드의 제조방법.

청구항 23

1) 제 11항의 항체를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및

2) 상기 숙주세포에 의해 발현된 항체를 정제하는 단계를 포함하는, 야생형에 비해 증가된 생체 내 반감기를 가지는 Fc 변이체를 포함하는 항체의 제조방법.

청구항 24

제 1항의 Fc 변이체를 비펩타이드성 중합체를 통해 생리활성 폴리펩타이드에 공유결합으로 연결시키는 단계를 포함하는, 생리활성 폴리펩타이드의 생체 내 반감기를 증가시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 pH 의존적으로 FcRn에 결합 및 해리함으로써 반감기가 향상된 Fc 변이체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 단백질 치료제들은 질병 타깃들에 아주 높은 특이성과 낮은 부작용과 독성을 보이기 때문에 비특이적인 저분자 화합물 치료제들을 아주 빠른 속도로 대체하여 임상에서 널리 이용되고 있으며, 현재 임상에 이용되고 있는 단백질 치료제들 중 항체 치료제들과 항체 Fc영역을 융합된 Fc-융합 단백질 치료제들이 주종을 이루고 있다.

[0003] 치료용 항체는 기존의 저분자 약물에 비해 타깃에 매우 높은 특이성을 보이며, 생체 독성이 낮고 부작용이 적을 뿐만 아니라, 약 3주의 우수한 혈중 반감기를 가지기 때문에 가장 효과적인 암 치료방법 중의 하나로 여겨지고 있다. 실제로 전 세계의 거대 제약회사들과 연구소들에서 암 발병 원인인자를 비롯한 암세포에 특이적으로 결합하여 효과적으로 제거하는 치료용 항체의 연구 개발에 박차를 가하고 있다. 치료용 항체 의약품 개발 기업으로는 로슈, 암젠, 존슨앤존슨, 애보트, 비엠에스 등의 제약 기업이 주를 이루고 있으며, 특히 로슈는 항암 치료 목적의 허셉틴 (Herceptin), 아바스틴 (Avastin), 리툭산 (Rituxan) 등이 대표적 상품으로 이 세 가지 치료용 항체로 2012년 세계시장에서 약 195억 달러의 매출을 달성하는 등 큰 이윤을 창출하고 있을 뿐 아니라, 세계의 항체 의약품 시장을 이끌고 있다. 레미케이드(Remicade)를 개발한 존슨앤존슨 역시 매출의 증가로 세계 항체 시장에서 빠르게 성장해나가고 있으며, 애보트와 비엠에스 등의 제약 기업 역시 개발 막바지 단계의 치료용 항체를 다수 보유하고 있는 것으로 알려져 있다. 이에 따른 결과로 저분자 의약품이 주도권을 가지고 있던 세계 제약 시장에서 질병 타깃에 특이적이고 부작용이 낮은 치료용 항체를 포함한 바이오 의약품이 빠르게 그 자리를 대체해 나가고 있다.

[0004] 그러나, 항체 및 단백질 치료제들은 경구 투여 시 소화기관을 통한 흡수율이 아주 낮고, 소화관 내부에서 쉽게 변성이 되거나 단백질 분해효소에 의해 쉽게 분해되기 때문에 생체이용률이 아주 낮아 정맥주사나 피하주사를 통해 투여되어야 하며, 가시적인 치료 효과를 거두기 위해서는 빈번한 접종이 요구되는데, 혈액 내 안정성이 아주 우수한 단백질 치료제 중의 하나인 항체의 경우에도 성공적인 치료 효과를 위해서는 고용량의 치료용 항체 (2 ~ 8 mg/ 체중 kg)가 2 ~ 3주에 한번씩 투여되어야 한다. 이러한 주사를 통한 빈번한 약물 투여는 환자의 상당한 통증과 불편함을 야기하고, 부종, 감염 등 국소적 및 전신적 부작용을 초래할 수 있는 문제점이 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해서는 해당 치료용 항체와 단백질 치료제의 혈액에서 반감기를 획기적으로 개선해야한다.

[0005] 면역글로불린 (항체)의 생체 내 반감기가 FcRn에 대한 Fc의 결합에 의해 매개된다는 것이 보고되었다. 면역글로불린의 Fc 단편은 비특이적 세포 흡수작용을 통해 내피세포에 의해 섭취(uptake)되고, 이어서 산성 엔도좀 내에 도입된다. FcRn은 엔도좀 내 산성 pH (< 6.5) 하에서 면역글로불린와 결합하고, 혈류 내에서 염기성 pH (> 7.4) 하에서 면역글로불린을 방출한다. 따라서, FcRn은 리소좀 퇴화 경로로부터 면역글로불린을 회수한다. 혈청 면역글로불린 수치가 감소하는 경우에는, 보다 많은 FcRn 분자를 면역글로불린 결합에 이용하여 면역글로불린의 양을 증가시킬 수 있다. 반대로, 혈청 면역글로불린 수치가 상승하는 경우에는, FcRn이 포화되어 퇴화되는 세포 흡수된 면역글로불린의 비율을 증가시킬 수 있다 (Ghetie 및 Ward, Annu. Rev. Immunol. 18: 739-766, 2000). 즉, 항체의 혈중 반감기와 지속성은 항체의 Fc 부위와 IgG 결합 리간드 중의 하나인 FcRn (neonatal Fc receptor) 결합에 크게 의존한다. 면역 백혈구 또는 혈청 보체 분자를 소집하여, 암세포 또는 감염된 세포와 같

은 손상된 세포들이 제거될 수 있도록 역할을 하는 항체의 Fc 부위는 Cɣ2 및 Cɣ3 도메인 사이의 부위이고, 신생(neonatal) 수용체 FcRn과의 상호 작용을 매개하며, 그의 결합은 엔도솜(endosome)으로부터 혈류(bloodstream)로 세포내 이입된 항체를 재순환시킨다 (Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12: 181-220; Ghetie et al., 2000, Annu Rev Immunol 18: 739-766). 이 과정은, 전체 길이 분자의 거대한 크기에 기인하여, 신장 여과(kidney filtration)의 저지와 연관되어, 1주 내지 3주 범위의 유리한 항체 혈청 반감기(antibody serum half-life)를 갖는다. 또한, FcRn에 대한 Fc의 결합은 항체 운반에 있어서도 중요한 역할을 담당한다. 따라서, Fc 부위는 세포 내 수송(intracellular trafficking) 및 리사이클 기작을 통하여 항체가 순환되어 연장된 혈청 지속성(prolonged serum persistence)을 유지하는데 필수적인 역할을 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 항체의 혈중 반감기를 향상시키기 위해서 세포 내 엔도좀 (약산성 pH 조건)에서 FcRn에 결합 속도를 향상시키고, 혈액 (중성 pH 조건)에서 FcRn에서 빠른 속도로 해리될 수 있는 돌연변이를 도입한 항체를 개발하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 pH 감응성 Fc 변이체를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 pH 감응성 Fc 변이체를 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 pH 감응성 Fc 변이체를 포함하는 항체를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 pH 감응성 Fc 변이체, 폴리펩타이드 또는 항체를 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 본 발명은 증가된 생체 내 반감기를 갖는 단백질 결합체를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 pH 감응성 Fc 변이체의 제조방법을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 pH 감응성 Fc 변이체를 포함하는 폴리펩타이드의 제조방법을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 pH 감응성 Fc 변이체를 포함하는 항체의 제조방법을 제공한다.

[0019] 아울러, 본 발명은 생리활성 폴리펩타이드의 생체 내 반감기를 증가시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 Fc 변이체는 종래의 혈중 반감기 향상 Fc 변이체들 보다 뛰어난 pH-선택적 FcRn 결합 및 해리 능력을 보이는 혈중 반감기가 극대화된 변이체이므로, 체내에서 낮은 반감기와 유지시간을 가진 수 많은 펩타이드 의약품 치료제에 결합하여 증가된 혈중 반감기로 장시간 약효 발휘가 가능하게 할 수 있으며, 이를 통해 항체 및 바이오의약의 투여 용량과 빈도를 획기적으로 줄일 수 있고, 신약개발 비용 감소와 신약개발 가능성을 크게 향상시킬 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 Q311M 및 M428L Fc 변이체가 포함된 트라스트주맙의 pH 6.0 및 7.4에서의 FcRn과의 결합력을 ELISA로 확인한 도이다:

PFc29: Q311R 및 M428L Fc 변이체 포함 트라스트주맙; 및

M: Q311M 및 M428L Fc 변이체 포함 트라스트주맙.

도 2는 L309위치의 아미노산 변이체 제작 모식도 (saturation mutagenesis) 및 각각의 Fc 변이체가 포함된 트라

스트주맙의 발현 정제 후 SDS-PAGE 젤 사진을 나타낸 도이다.

도 3은 Fc 변이체 (Q311M, M428L 및 309 위치의 아미노산 변이)가 포함된 트라스트주맙의 pH 6.0 에서의 FcRn과의 결합력을 ELISA로 확인한 도이다:

PFc29: Q311R 및 M428L Fc 변이체 포함 트라스트주맙;

FM: L309F, Q311M 및 M428L Fc 변이체 포함 트라스트주맙;

IM: L309I, Q311M 및 M428LFc Fc 변이체 포함 트라스트주맙;

MM: L309M, Q311M 및 M428LFc Fc 변이체 포함 트라스트주맙;

VM: L309V, Q311M 및 M428LFc Fc 변이체 포함 트라스트주맙;

TM: L309T, Q311M 및 M428LFc Fc 변이체 포함 트라스트주맙;

AM: L309A, Q311M 및 M428LFc Fc 변이체 포함 트라스트주맙;

YM: L309Y, Q311M 및 M428LFc Fc 변이체 포함 트라스트주맙;

HM: L309H, Q311M 및 M428LFc Fc 변이체 포함 트라스트주맙;

QM: L309Q, Q311M 및 M428LFc Fc 변이체 포함 트라스트주맙;

NM: L309N, Q311M 및 M428LFc Fc 변이체 포함 트라스트주맙;

KM: L309K, Q311M 및 M428LFc Fc 변이체 포함 트라스트주맙;

EM: L309E, Q311M 및 M428LFc Fc 변이체 포함 트라스트주맙;

WM: L309W, Q311M 및 M428LFc Fc 변이체 포함 트라스트주맙;

RM: L309R, Q311M 및 M428LFc Fc 변이체 포함 트라스트주맙; 및

SM: L309S, Q311M 및 M428LFc Fc 변이체 포함 트라스트주맙.

도 4는 Fc 변이체가 포함된 트라스트주맙의 pH 6.0 및 7.4에서의 FcRn과의 결합력을 ELISA로 확인한 도이다:

PFc29: Q311R 및 M428L Fc 변이체 포함 트라스트주맙;

ML: Q311M 및 M428L Fc 변이체 포함 트라스트주맙; 및

YML: L309Y, Q311M 및 M428L Fc 변이체 포함 트라스트주맙.

도 5는 약산성 환경에서의 결합속도(on rate) 및 중성 환경에서의 해리속도(off rate)에 대한 모식도이다.

도 6은 Fc 변이체의 결합속도 및 해리속도를 분석한 결과를 나타낸 도이다:

PFc29: Q311R 및 M428L Fc 변이체 포함 트라스트주맙;

PFc41: L309G 및 M428L Fc 변이체 포함 트라스트주맙;

ML: Q311M 및 M428L Fc 변이체 포함 트라스트주맙; 및

YML: L309Y, Q311M 및 M428L Fc 변이체 포함 트라스트주맙.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않으며 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0023] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것들과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 재료가 본 발명을 테스트하기 위한 실행에서 사용될 수 있지만, 바람직한 재료 및 방법이 본원에서 기술된다.

[0024] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아

니라 Aib(α-아미노이소부티르산), Sar(N-methylglycine) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 발명에서 약어로 언급된 아미노산은 하기와 같이 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다:

[0025] 알라닌: A, 아르기닌: R, 아스파라긴: N, 아스파르트산: D, 시스테인: C, 글루탐산: E, 글루타민: Q, 글리신: G, 히스티딘: H, 이소류신: I, 류신: L, 리신: K, 메티오닌: M, 페닐알라닌: F, 프롤린: P, 세린: S, 트레오닌: T, 트립토판: W, 티로신: Y 및 발린: V.

[0027] 일 측면에서, 본 발명은 야생형 면역글로불린(immunoglobulin)의 Fc 영역에서 카밧 넘버링 시스템 (Kabat numbering system)에 따른 L309Y의 아미노산 잔기의 변형을 포함하는, Fc 변이체에 관한 것이다.

[0028] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 변이체는 M428L, Q311M, 또는 M428L 및 Q311M의 아미노산 잔기의 치환을 추가로 포함할 수 있다.

[0029] 일 구현예에서, 면역글로불린이 IgA, IgM, IgE, IgD 또는 IgG, 또는 이들의 변형일 수 있으며, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4일 수 있고, 항-HER2 항체인 것이 바람직하고, 트라스트주맙인 것이 더욱 바람직하다. 항체의 파파인 분해는 2개의 Fab 단편과 1개의 Fc 단편을 형성하며, 인간 IgG 분자에서, Fc 영역은 Cys 226의 N-말단을 파파인 분해함으로써 생성된다 (Deisenhofer, Biochemistry 20: 2361-2370, 1981).

[0030] 일 구현예에서, 야생형 면역글로불린의 Fc 영역은 서열번호 1의 아미노산서열을 포함할 수 있다.

[0031] 일 구현예에서, Fc 변이체는 서열번호 2의 아미노산서열 (Q311M 및 M428L)을 포함할 수 있고, 서열번호 3의 아미노산서열 (L309Y, Q311M 및 M428L)을 포함할 수 있다.

[0032] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 변이체는 pH 선택적으로 (의존적으로) FcRn과의 결합/해리 반응이 일어날 수 있다.

[0033] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 변이체는 pH 감응성 Fc 변이체일 수 있다.

[0034] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 변이체는 pH 7.0 내지 7.8에서 야생형 면역글로불린 Fc 영역에 비해 FcRn에 낮은 결합 친화력을 나타낼 수 있으며, 혈액의 정상 pH 범위일 수 있고, pH 7.2 내지 7.6일 수 있다. 본 발명의 Fc 변이체는 상기 pH 범위에서 FcRn에서 해리(dissociation)되는 정도가 야생형 Fc 도메인과 비교하여 동일하거나 실질적으로 변화되지 않을 수 있다.

[0035] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 변이체는 pH 5.6 내지 6.5에서 야생형 면역글로불린 Fc 영역에 비해 FcRn에 높은 결합 친화력을 나타낼 수 있으며, 엔도좀 내 약산성 조건일 수 있고, pH 5.8 내지 6.0일 수 있다. 본 발명의 pH 감응성 Fc 변이체는 상기 pH 범위에서 FcRn에 대한 결합 친화도가 야생형 Fc 도메인과 비교하여 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 100% 이상 증가되거나, 야생형 Fc 도메인 보다 2배 이상, 3배 이상, 4배 이상, 5배 이상, 6배 이상, 7배 이상, 8배 이상, 9배 이상, 10배 이상, 20배 이상, 30배 이상, 40배 이상, 50배 이상, 60배 이상, 70배 이상, 80배 이상, 90배 이상 또는 100배 이상 증가될 수 있다.

[0036] 본 발명에서, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역에서 아미노산의 변이를 포함하는 변이체는 모 면역글로불린 Fc 영역을 구성하는 아미노산 변형에 따라 정의되고, 통상의 면역글로불린 넘버링은 카밧에 의한 EU 인덱스에 따른다 (Kabat et al., Sequence of proteins of immunological interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, 1991).

[0037] 본 발명의 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3의 아미노산은 카밧 넘버링의 221번부터 시작된다. 예를 들어, 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3의 아미노산 208M이 카밧 넘버링으로 428M과 동일하고, 서열번호 2 및 서열번호 3의 아미노산 91M이 카밧 넘버링으로 311M과 동일하며, 서열번호 3의 아미노산 89Y가 카밧 넘버링으로 309Y와 동일하다.

[0038] 본 발명에서 사용된, 용어 "FcRn" 또는 "신생아 Fc 수용체"는 IgG 항체 Fc 영역에 결합하는 단백질을 의미하며, 이는 적어도 부분적으로는 FcRn 유전자에 의해 코딩된다. 상기 FcRn은, 이로 제한하는 것은 아니나, 인간, 마우스, 래트, 토끼 및 원숭이를 포함하는 임의의 유기체 유래일 수 있다. 당해 기술분야에 공지진 바와 같이, 기능적 FcRn 단백질은 종종 경쇄 및 중쇄로 불리는 2개의 폴리펩타이드를 포함한다. 경쇄는 베타-2-마이크로글로불린 (β-2-microglobulin)이며, 중쇄는 FcRn 유전자에 의해 코딩된다. 본 명세서에서 달리 언급되지 않는 한,

FcRn 또는 하나의 FcRn 단백질은 FcRn 중쇄와 베타-2-마이크로글로불린의 복합체를 언급하는 것이다.

[0039] 본 발명에서 사용된, 용어 "야생형 (wild-type) 폴리펩타이드"는 후에 변형되어 유도체를 생산하는 비변형 폴리펩타이드를 의미한다. 야생형 폴리펩타이드는 자연에서 발견되는 폴리펩타이드 또는 자연에서 발견되는 폴리펩타이드의 유도체 또는 조작된 것일 수 있다. 야생형 폴리펩타이드는 폴리펩타이드 그 자체, 상기 야생형 폴리펩타이드를 포함하는 조성물, 또는 이를 코딩하는 아미노산 서열을 언급하는 것일 수 있다. 따라서, 본 발명에서 사용된 용어 "야생형 면역글로불린"은 아미노산 잔기가 변형되어 유도체를 생성하게 되는 비변형된 면역글로불린 폴리펩타이드를 의미한다. 상기 용어와 호환적으로, 아미노산 변형이 도입되어 유도체를 생성하게 되는 비변형된 면역글로불린 폴리펩타이드를 의미하는 "모(parent) 면역글로불린"이 사용될 수 있다.

[0040] 본 발명에서 사용된, 용어 "아미노산 변형"은 폴리펩타이드 서열의 아미노산의 치환, 삽입 및/또는 결실, 바람직하게는 치환을 의미한다. 본 발명에서 사용된, 용어 "아미노산 치환" 또는 "치환"은 야생형 폴리펩타이드 서열의 특정 위치에서의 아미노산이 다른 아미노산으로 대체되는 것을 의미한다. 예를 들면, L309Y 치환을 포함하는 Fc 변이체는 야생형 면역글로불린 Fc 단편의 아미노산 서열에서 309번째 아미노산 잔기인 류신이 티로신으로 대체된 것을 의미한다.

[0041] 본 명세서에 사용된 용어 "Fc 변이체"는 야생형 면역글로불린 Fc 단편과 비교하여 하나 이상의 아미노산 잔기의 변형을 포함하는 것을 의미한다. 바람직하게는, 본 발명에서 Fc 변이체는 L309Y, M428L 및 Q311M (상기 넘버링은 카밧에 기재된 EU 인덱스에 따른 것임)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 잔기의 변형을 포함하여 야생형 면역글로불린 Fc 단편 (영역)에 비해 약산성 조건에서 FcRn에 대한 결합 친화력이 증가되고 중성 조건에서 FcRn에 대한 결합 친화력이 감소되어 약산성의 세포 내 엔도좀에서는 FcRn에 결합 속도가 향상되며 중성의 혈액에서는 빠르게 해리된다.

[0042] 본 발명은 대응하는 야생형 면역글로불린 Fc 단편과 비교하여 증가된 FcRn에 대한 결합 친화력 및/또는 혈청 반감기를 갖는 Fc 변이체를 제공한다. 항체 및 다른 생리활성분자의 생체 내 반감기 (즉, 대상체의 혈청 또는 다른 조직에서의 지속성)는 항체 (또는 임의의 다른 약학적 분자)의 투여량 및 빈도를 결정하는 중요한 임상 변수이다. 따라서, 증가된 생체 내 반감기를 갖는 항체를 비롯한 상기 생리활성 분자는 제약적으로 매우 중요하다. 본 발명의 치환된 Fc 변이체의 반감기는 야생형 Fc 도메인과 비교하여 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 100% 이상 증가되거나, 야생형 Fc 도메인 보다 2배 이상, 3배 이상, 4배 이상, 5배 이상, 6배 이상, 7배 이상, 8배 이상, 9배 이상 또는 10배 이상 증가될 수 있다.

[0043] 본 발명의 Fc 변이체는 야생형 면역글로불린 Fc 단편 (영역 또는 도메인)과 비교하여 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하며, 그로 인해 아미노산 서열에 있어 차이를 갖는다. 본 발명에 따른 Fc 변이체의 아미노산 서열은 야생형 면역글로불린 Fc 단편의 아미노산 서열과 실질적으로 상동하다. 예를 들면, 본 발명에 따른 pH 감응성 Fc 변이*의 아미노산 서열은 야생셩 면역글로불린의 Fc 단편의 아미노산 서열과 비교하여 약 80% 이상, 바람직하게는 약 90% 이상, 가장 바람직하게는 약 95% 이상의 상동성을 가질 것이다. 아미노산 변형은 분자생물학적 방법을 사용하여 유전적으로 수행될 수 있거나, 또는 효소적 또는 화학적 방법을 이용하여 수행될 수도 있다.

[0044] 본 발명의 Fc 변이체는 당해 기술분야에 공지된 임의의 방법으로 제조될 수 있다. 일 실시예에서, 본 발명에 따른 면역글로불린의 Fc 변이체는 특정 아미노산 변형을 포함하는 폴리펩타이드 서열을 코딩한 후, 원하는 경우, 숙주세포 내로 클로닝되고, 발현 및 검정되는 핵산 형성에 이용된다. 이를 위한 다양한 방법이 문헌 (Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3rd Ed., Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001; Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons)에 기재되어 있다.

[0045] 본 발명에 따른 Fc 변이체를 코딩하는 핵산은 단백질 발현을 위해 발현벡터에 삽입될 수 있다. 발현벡터는, 통상 조절 또는 제어 (regulatory) 서열, 선별마커, 임의의 융합 파트너, 및/또는 추가적 요소와 작동가능하게 연결된, 즉, 기능적 관계에 놓인 단백질을 포함한다. 적절한 상태에서, 핵산으로 형질전환된 숙주세포, 바람직하게는, 본 발명에 따른 Fc 변이체를 코딩하는 핵산 함유 발현벡터를 배양하여 단백질 발현을 유도하는 방법에 의해 본 발명에 따른 Fc 변이체가 생산될 수 있다. 포유류 세포, 박테리아, 곤충 세포, 및 효모를 포함하는 다양한 적절한 숙주세포가 사용될 수 있으나, 이에 제한하는 것은 아니다. 외인성 핵산을 숙주세포에 도입하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 사용되는 숙주세포에 따라 달라질 것이다. 바람직하게는, 생산비가 저렴하여 산업적 이용가치가 높은 대장균을 숙주세포로 하여 본 발명에 따른 Fc 변이체를 생산한다.

[0046] 따라서, 본 발명의 범위에는 Fc 변이체를 코딩하는 핵산이 도입된 숙주세포를 단백질 발현에 적합한 조건 하에

서 배양하는 단계; 및 숙주세포로부터 발현된 Fc 변이체를 정제 또는 분리하는 단계를 포함하는 Fc 변이체의 제조방법이 포함된다.

[0047] 항체는 당해 기술분야에서 공지된 다양한 방법으로 분리 또는 정제될 수 있다. 표준 정제방법은 크로마토그래피 기술, 전기영동, 면역, 침강, 투석, 여과, 농축, 및 크로마토포커싱 (chromatofocusing) 기술을 포함한다. 당해 기술분야에 공지된 바와 같이, 예를 들어 박테리아 단백질 A, G, 및 L과 같은 다양한 천연 단백질이 항체와 결합하며, 상기 단백질은 정제에 이용될 수 있다. 종종, 특정 융합 파트너에 의한 정제가 가능할 수 있다.

[0048] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 변이체를 포함하는 폴리펩타이드에 관한 것이다.

[0049] 일 구현예에서, 상기 폴리펩타이드는 야생형과 비교하여 생체 내 반감기가 증가될 수 있다.

[0050] 일 측면에서, 본 발명은 Fc 변이체 또는 상기 폴리펩타이드를 포함하는 항체에 관한 것이다.

[0051] 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 야생형 Fc 영역을 포함하는 항체에 비해 증가된 생체 내 반감기를 가질 수 있다.

[0052] 일 구현예에서, 상기 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 미니바디(minibody), 도메인 항체, 이중특이적 항체, 항체 모방체, 키메라 항체, 항체 접합체(conjugate), 인간항체 또는 인간화 항체, 또는 이의 단편일 수 있다.

[0053] 본 발명의 항체는 Fc 영역의 최적화 (L309Y, M428L 및 Q311M)를 통해 Fc 도메인 (영역) 또는 이를 포함하는 폴리펩타이드의 반감기를 극대화할 수 있다.

[0054] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 변이체, 비펩타이드성 중합체 및 생리활성 폴리펩타이드가 공유결합으로 연결되어 증가된 생체 내 반감기를 갖는 단백질 결합체에 관한 것이다.

[0055] 일 구현예에서, 본 발명에 따른 Fc 변이체는 단백질 약물과 같은 생리활성 폴리펩타이드의 생체 내 반감기를 증가시키기 위한 캐리어 (carrier)로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0056] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 변이체를 포함하는 단백질 결합체는 생체 내 반감기가 현저히 증가한 지속성 약물 제제로 사용될 수 있다.

[0057] 본 발명에 사용가능한 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐 에틸에테르, PLA (폴리락트산, polylactic acid) 및 PLGA (폴리락틱-글리콜산, polylactic-glycolic acid)와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히아루론산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜이다. 당해 기술분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 기술분야의 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.

[0058] 본 발명에 따른 Fc 변이체에 결합되어 사용될 수 있는 생리활성 폴리펩타이드로는 혈중 반감기를 증가시킬 필요가 있는 것이면 어느 것이나 특별한 제한이 없이 사용할 수 있다. 예를 들어, 인간의 질병을 치료 또는 예방할 목적으로 사용되는 싸이토카인, 인터루킨, 인터루킨 결합 단백질, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 혈액인자, 백신, 구조단백질, 리간드 단백질 또는 수용체, 세포표면항원, 수용체 길항물질과 같은 다양한 생리활성 폴리펩타이드, 이들의 유도체 및 유사체가 사용될 수 있다.

[0059] 본 발명에 사용 가능한 생리활성 폴리펩타이드에는 간 성장호르몬, 성장호르몬 방출 호르몬, 성장호르몬 방출 펩타이드, 인터페론류와 인터페론 수용체류 (예: 인터페론-알파, -베타 및 -감마, 수용성 타입 I 인터페론 수용체), 과립구 콜로니 자극인자 (G-CSF), 과립구-마크로파지 콜로니 자극인자 (GM-CSF), 글루카콘-유사 펩타이드류 (GLP-1), G-단백질-관련 수용체 (G-protein-coupled receptor), 인터루킨 (예: IL-1 수용체, IL-4 수용체), 효소류 (예: 글루코세레브로시다제 (glucocerebrosidase), 이두로네이트-2-설파타제(iduronate-2-sulfatase), 알파-갈락토시다제-A, 아갈시다제 알파 (agalsidase alpha), 베타, 알파-L-이두로니다제 (alpha-L-iduronidase), 뷰티릴콜린에스터라제 (butyrylcholinesterase), 키티나제 (chitinase), 글루타메이트 디카르복실라제 (glutamate decarboxylase), 이미글루세라제 (imiglucerase), 리파제 (lipase), 유리케이즈 (uricase), 혈소판-활성인자 아세틸하이드롤라제 (platelet-activatingfactor acetylhydrolase), 중성 엔도펩티다제 (neutral endopeptidase), 마이엘로퍼옥시다제 (myeloperoxidase)), 인터루킨 및 사이토카인 결합 단백질 (예: IL-18bp, TNF-결합 단백질), 마크로파지 활성인자, 마크로파지 펩타이드, B 세포인자, T 세포인자, 단백질 A, 알러지 억제인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 괴사인자, 종양 억제인자, 전이 성장인자, 알

파-1 안티트립신, 알부민, 알파-락트알부민 (alpha-lactalbumin), 아포리포단백질-E, 적혈구 생성인자, 고 당쇄화 적혈구 생성인자, 안지오포이에틴류 (angiopoietin), 헤모글로빈, 트롬빈 (thrombin), 트롬빈 수용체 활성 펩타이드, 트롬보모듈린 (thrombomodulin), 혈액인자 Ⅶ, 혈액인자 ⅦⅡa, 혈액인자 ⅧⅢ, 혈액인자 ⅨⅨ, 혈액인자 XⅢ, 플라즈미노겐 활성인자, 피브린-결합 펩타이드, 유로키나제, 스트렙토키나제, 히루딘 (hirudin), 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스뮤타제, 렙틴, 혈소판 유래 성장인자, 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오스타틴 (angiostatin), 엔도스타틴 (endostatin) 안지오텐신 (angiotensin), 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 인슐린, 아트리오펩틴, 연골유도인자, 엘카토닌 (elcatonin), 결합조직 활성인자, 조직인자 경로 억제제 (tissue factor pathwayinhibitor), 여포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장인자류(예: 신경 성장인자, 모양체 신경영양인자 (cilliary neurotrophic factor), 악소제네시스 인자-1 (axogenesis factor-1), 뇌-나트륨 이뇨 펩타이드 (brain-natriuretic peptide), 신경교 유래 신경영양인자 (glial derived neurotrophic factor), 네트린 (netrin), 중성구 억제인자(neurophil inhibitor factor), 신경영양인자, 뉴트린(neuturin)), 부갑상선 호르몬, 릴랙신, 시크레틴, 소마토메딘, 인슐린 유사 성장인자, 부신피질 호르몬, 글루카곤, 콜레시스토키닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드, 코티코트로핀 방출인자, 갑상선 자극호르몬, 오토탁신 (autotaxin), 락토페린(lactoferrin), 미오스타틴(myostatin), 수용체류 (예: TNFR(P75), TNFR(P55), IL-1 수용체, VEGF 수용체, B 세포 활성인자 수용체), 수용체 길항물질 (예: IL1-Ra), 세포표면항원(예: CD 2, 3, 4, 5, 7, 11a, 11b, 18, 19, 20, 23, 25, 33, 38, 40, 45, 69), 단일클론 항체, 다중클론 항체, 항체 단편류 (예: scFv, Fab, Fab', F(ab') 2 및 Fd), 바이러스 유래 백신 항원 등 다양한 종류가 포함되나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 항체 단편은 특정 항원에 결합할 수 있는 능력을 지닌 Fab, Fab', F(ab') 2 , Fd 또는 scFv에서 선택될 수 있다.

[0060] 일 구현예에서, Fc 변이체를 포함하는 단백질 결합체에 항체 약물이 결합될 수 있으며, 암 치료용 항체 약물은 트라스투주맙(Trastzumab), 세툭시맙(cetuximab), 베바시주맙(bevacizumab), 리툭시맙(rituximab), 바실릭시맙(basiliximab), 인플릭시맙(infliximab), 이필리무맙(Ipilimumab), 펨브롤리주맙(Pembrolizumab), 니볼루맙(Nivolumab), 아테졸리주맙(Atezolizumab) 또는 아벨루맙(Avelumab)일 수 있다.

[0061] 본 발명은 상기 Fc 변이체를 비펩타이드성 중합체를 통해 생리활성 폴리펩타이드에 공유결합으로 연결하여 지속성 약물 제제를 제조하는 방법을 포함한다.

[0062] 본 발명에 따른 제조방법은 말단에 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체를 통해 생리활성 폴리펩타이드 및 Fc 변이체를 공유결합으로 연결하는 단계; 및 생리활성 폴리펩타이드, 비펩타이드성 중합체 및 Fc 변이체가 공유결합으로 연결된 결합체를 분리하는 단계를 포함할 수 있다.

[0063] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 변이체, 폴리펩타이드 또는 항체를 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다.

[0064] 본 발명의 핵산 분자는 단리된 것이거나 재조합된 것일 수 있으며, 단일쇄 및 이중쇄 형태의 DNA 및 RNA뿐만 아니라 대응하는 상보성 서열이 포함된다. 단리된 핵산은 천연 생성 원천에서 단리된 핵산의 경우, 핵산이 단리된 개체의 게놈에 존재하는 주변 유전 서열로부터 분리된 핵산이다. 주형으로부터 효소적으로 또는 화학적으로 합성된 핵산, 예컨대 PCR 산물, cDNA 분자, 또는 올리고뉴클레오타이드의 경우, 이러한 절차로부터 생성된 핵산이 단리된 핵산분자로 이해될 수 있다. 단리된 핵산분자는 별도 단편의 형태 또는 더 큰 핵산 구축물의 성분으로서의 핵산 분자를 나타낸다. 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 작동가능하게 연결된다. 예를 들면, 전서열 또는 분비 리더(leader)의 DNA는 폴리펩타이드가 분비되기 전의 형태인 전단백질(preprotein)로서 발현되는 경우 폴리펩타이드의 DNA에 작동가능하게 연결되고, 프로모터 또는 인핸서는 폴리펩타이드 서열의 전사에 영향을 주는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되며, 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 촉진하도록 배치될 때 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로 작동가능하게 연결된은 연결될 DNA 서열들이 인접하여 위치함을 의미하며, 분비 리더의 경우 인접하여 동일한 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나 인핸서는 인접하여 위치할 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커를 통상적인 방법에 따라 사용한다.

[0065] 일 측면에서, 본 발명은 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[0066] 본 발명에서 용어, "벡터"는 핵산 서열을 복제할 수 있는 세포로의 도입을 위해서 핵산 서열을 삽입할 수 있는 전달체를 의미한다. 핵산 서열은 외생 (exogenous) 또는 이종 (heterologous)일 수 있다. 벡터로서는 플라스미드, 코스미드 및 바이러스(예를 들면 박테리오파지)를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 당업자는 표준적인 재조합 기술에 의해 벡터를 구축할 수 있다(Maniatis, et al., Molecular Cloning , A Laboratory Manual,

Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; 및 Ausubel et al., In: Current Protocols in Molecular Biology , John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994 등).

[0067] 본 발명에서, 용어 "발현 벡터"는 전사되는 유전자 산물 중 적어도 일부분을 코딩하는 핵산 서열을 포함한 벡터를 의미한다. 일부의 경우에는 그 후 RNA 분자가 단백질, 폴리펩타이드, 또는 펩타이드로 번역된다. 발현 벡터에는 다양한 조절서열을 포함할 수 있다. 전사 및 번역을 조절하는 조절서열과 함께 벡터 및 발현 벡터에는 또 다른 기능도 제공하는 핵산 서열도 포함될 수 있다.

[0068] 일 측면에서, 본 발명은 상기 벡터를 포함하는 숙주세포에 관한 것이다.

[0069] 본 발명에서, 용어 "숙주세포"는 진핵생물 및 원핵생물을 포함하며, 상기 벡터를 복제할 수 있거나 벡터에 의해 코딩되는 유전자를 발현할 수 있는 임의의 형질 전환 가능한 생물을 의미한다. 숙주세포는 상기 벡터에 의해 형질감염(transfected) 또는 형질전환(transformed) 될 수 있으며, 이는 외생의 핵산분자가 숙주세포 내에 전달되거나 도입되는 과정을 의미한다.

[0070] 본 발명의 숙주세포는 바람직하게는 세균(bacteria)세포, CHO 세포, HeLa 세포, HEK293 세포, BHK-21 세포, COS7 세포, COP5 세포, A549 세포, NIH3T3 세포 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0071] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의의 Fc 변이체를 비펩타이드성 중합체를 통해 생리활성 폴리펩타이드에 공유결합으로 연결시키는 단계를 포함하는, 생리활성 폴리펩타이드의 생체 내 반감기를 증가시키는 방법에 관한 것이다.

[0072] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 변이체, 폴리펩타이드 또는 항체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0073] 일 구현예에서, 면역원성 세포사멸 유도제를 추가로 포함할 수 있다.

[0074] 일 구현예에서, 면역원성 세포사멸 유도제는 안트라사이클린계열 항암제, 탁산 계열 항암제, 항-EGFR 항체, BK 채널 작용제, 보르테조밉(Bortezomib), 강심성 배당체(cardiac glycoside), 사이클로포스마이드 계열 항암제, GADD34/PP1 저해제, LV-tSMAC, Measles 바이러스, 블레오마이신(bleomycin), 미토잔트론(mitoxantrone) 또는 옥살리플라틴(oxaliplatin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 안트라사이클린 계열 항암제는 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 이다루비신(idarubicin), 픽산트론(pixantrone), 사바루비신(sabarubicin) 또는 발루비신(valrubicin)일 수 있고, 탁산계열 항암제는 파클리탁셀(paclitaxel) 또는 도세탁셀(docetaxel)일 수 있다.

[0075] 본 발명의 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 화학적 항암 약물(항암제) 등과 함께 투여함으로써, 암세포의 사멸 효과를 통해 종래의 항암제의 암치료 효과를 증가시킬 수 있다. 병용 투여는 상기 항암제와 동시에 또는 순차적으로 이루어질 수 있다. 상기 항암제의 예시에는 DNA 알킬화제(DNA alkylating agents)로 메클로에타민(mechloethamine), 클로람부칠(chlorambucil), 페닐알라닌(phenylalanine), 무스타드(mustard), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 카르무스틴(carmustine: BCNU), 로무스틴(lomustine: CCNU), 스트렙토조토신(streptozotocin), 부술판(busulfan), 티오테파(thiotepa), 시스플라틴(cisplatin) 및 카보플라틴(carboplatin); 항암 항생제(anti-cancer antibiotics)로 닥티노마이신(dactinomycin: actinomycin D), 플리카마이신(plicamycin) 및 마이토마이신 C(mitomycin C); 및 식물 알카로이드(plant alkaloids)로 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 에토포시드(etoposide), 테니포시드(teniposide), 토포테칸(topotecan) 및 이리도테칸(iridotecan) 등이 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0076] 일 구현예에서, 암은 백혈병(leukemias) 및 급성 림프구 백혈병(acute lymphocytic leukemia), 급성 비림프구 백혈병(acute nonlymphocytic leukemias), 만성 림프구 백혈병(chronic lymphocytic leukemia), 만성 골수 백혈병(chronic myelogenous leukemia), 호지킨 병(Hodgkin's Disease), 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphomas) 및 다발 골수종(multiple myeloma) 등과 같은 림프종(lymphomas), 뇌종양(brain tumors), 신경모세포종(neuroblastoma), 망막모세포종(retinoblastoma), 윌름즈종양(Wilms Tumor), 골종양(bone tumors) 및 연부조직육종(soft-tissue sarcomas) 등과 같은 소아 고형 종양(childhood solid tumors), 폐암(lung cancer), 유방암(breast cancer), 전립선암(prostate cancer), 요로암(urinary cancers), 자궁암(uterine cancers), 구강암(oral cancers), 췌장암(pancreatic cancer), 흑색종(melanoma) 및 기타 피부암(skin cancers), 위암(stomach cancer), 난소암(ovarian cancer), 뇌종양(brain tumors), 간암(liver cancer), 후두암(laryngeal cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 식도암(esophageal cancer) 및 고환암(testicular cancer) 등과 같은 성인들의 통상의 고형 종양(common solid tumors)들을 포함할 수 있으며, 본 발명에서 예방 또는 치료하고자 하는

암의 종류는 제한되지 않는다.

[0077] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 암의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0078] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"란 본 발명의 조성물의 투여로 암세포의 사멸 또는 암의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.

[0079] 본 발명에서 유효성분과 결합하여 사용된 "치료학적으로 유효한 양"이란 용어는 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 조성물의 약학적으로 허용가능한 염의 양을 의미하며, 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack Publishing Co.에 기술되어있다.

[0080] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 암의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0081] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0082] 본 발명의 조성물은 또한 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로스 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0083] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 주사제형으로 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명에 따른 조성물의 일일 투여량은 0.0001 ~ 10 ㎎/㎖이며, 바람직하게는 0.0001 ~ 5 ㎎/㎖이며, 하루 일 회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.

[0084] 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조

제제, 좌제 등이 포함된다.

[0085] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 변이체를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및 상기 숙주세포에 의해 발현된 Fc 변이체를 회수하는 단계를 포함하는, 야생형에 비해 증가된 생체 내 반감기를 가지는 Fc 변이체의 제조방법에 관한 것이다.

[0086] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및 상기 숙주세포에 의해 발현된 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는, 야생형에 비해 증가된 생체 내 반감기를 가지는 Fc 변이체를 포함하는 폴리펩타이드의 제조방법에 관한 것이다.

[0087] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및 상기 숙주세포에 의해 발현된 항체를 정제하는 단계를 포함하는, 야생형에 비해 증가된 생체 내 반감기를 가지는 pH 감응성 Fc 변이*를 포함하는 항체의 제조방법에 관한 것이다.

[0088] 일 구현예에서, 항체의 정제는 여과, HPLC, 음이온 교환 또는 양이온 교환, 고속 액체 크로마토그래피(HPLC), 친화도 크로마토그래피, 또는 이들의 조합을 하는 것이 포함될 수 있으며, 바람직하게는 Protein A를 사용하는 친화 크로마토그래피를 이용할 수 있다.

[0090] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0091] **실시예 1. Fc 변이체 (Q311M/M428L)의 생산 및 정제**

[0092] 선행연구에서 반감기 향상효과가 있다고 알려진 YTE의 M252Y, LS의 M428L를 보듯, FcRn 결합력을 향상된 변이체에는 Met이 다른 아미노산으로 치환된 것을 확인하였다. 이러한 이유로 항체 Fc의 FcRn결합 부위에서 Met은 FcRn pH-의존적 결합력을 저해시키는 아미노산으로 판단하여, PFc29 (Q311R 및 M428L Fc 변이체)에 도입하였을 때 FcRn 결합력을 실제로 결합력을 저해시키는지를 알아보기 위해, Q311에 Met이 도입된 Fc 변이체 (Q311M/M428L) 변이체를 제작하여 Expi293F 동물세포에 트랜스펙션하였다. 구체적으로, Freestyle 293 expression 배양액 (Gibco, 12338-018) 30 ml에 상기 Q311에 Met이 도입된 Fc 변이체(Q311M/M428L)의 중쇄유전자 및 경쇄유전자를 1:1의 비율로 먼저 섞고, 다음으로 PEI(Polyethylenimine) (Polyscience , 23966) : 변이체유전자 = 4:1 비율로 섞어 상온에서 20 분간 두었다가 하루 전날 $2x10^6$ cells/ml의 밀도로 분주하여 배양한 Expi293F 세포주와 섞고 진탕배양기에서 37℃, 125 rpm 및 8% CO_2 조건으로 7일간 배양한 후 원심 분리하여 상등액만 취하였다. 그 후 25x PBS를 이용해 평형(equilibrium)을 맞춰주고 0.2 μm 필터 (Merck Millipore) 및 바틀 탑 필터(bottle top filter)를 이용해 여과하였다. 여과된 배양액에 프로테인 A 레진 500 μl을 넣어 주고 4℃에서 16 시간 교반한 후 컬럼을 통해 흘려주어 레진을 회수하고 5 ml PBS로 세척하고 3 ml 100 mM 글라이신 (pH 2.7) 버퍼로 용출한 뒤 1M Tris-HCl pH 8.0을 이용하여 중화시켰다. 버퍼를 바꾸기 위해서는 centrifugal filter units 3K (Merck Millipore)을 사용하였다.

[0094] **실시예 2. Fc 변이체 (Q311M/M428L)의 pH-의존적 결합력 확인**

[0095] 상기 실시예 1에서 정제한 Fc 변이체 (Q311M/M428L) (서열번호 2)의 FcRn에 대한 pH-의존적 결합력을 ELISA로 확인하였다. 구체적으로, 0.05 M Na_2CO_3 (pH 9.6)에 4 μg/ml로 희석한 상기 IgG Fc 변이체를 50 μl씩 Flat Bottom Polystyrene High Bind 96 웰 마이크로플레이트 (costar)에 4 ℃에서 16 시간 동안 고정화한 후 100 μl의 4% 스킴밀크 (GenomicBase) (in 0.05% PBST pH 6.0)로 상온에서 2 시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST (pH 6.0) 180 μl로 4 회씩 세척한 뒤 1% 스킴밀크 (in 0.05% PBST, pH 6.0)로 연속적으로 희석된 FcRn 50 μl를 각 웰에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 세척 과정 후 항-GST-HRP 컨쥬게이트 (GE Healthcare) 50 μl를 이용해 상온에서 1 시간 동안 항체 반응을 진행하고 세척하였다. 그 후, 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific)을 50 μl씩 첨가해 발색한 뒤 2M H_2SO_4를 50μl씩 넣어주어 반응을 종료시킨 다음 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek)을 이용해 분석하였다. 그 결과, FcRn과의 결합력을 저해할 것으로 예상되었던 Met이 오히려 pH 6.0에서 PFc29보다 더 잘 결합하고 pH 7.4에서는 PFc29와 비슷한 결합력을 보이는 것을 확인하였다. 즉, Q311M 변이체는 pH 6.0에서 PFc29보다 더 잘 결합하고 pH 7.4에서는 PFc29와 비슷한 결합력을 나타냈다 (도 1).

[0097] **실시예 3. 향상된 FcRn 결합력을 가지는 Fc 변이체 탐색**

[0098] 상기 실시예에서 선별된 Q311M 및 M428L의 변이를 가지는 Fc 변이체보다 더 향상된 FcRn 결합력을 가지는 변이체를 추가로 발굴하기 위해, L309 위치에 L, G, P, C, D를 제외한 15가지 아미노산이 들어가는 변이체 15종을 상기 실시예에서와 같이 제작하여 동물세포에서 배양한 후 정제하였다 (도 2).

[0100] **실시예 4. Fc 변이체가 포함된 항체의 pH-의존적 결합력 확인**

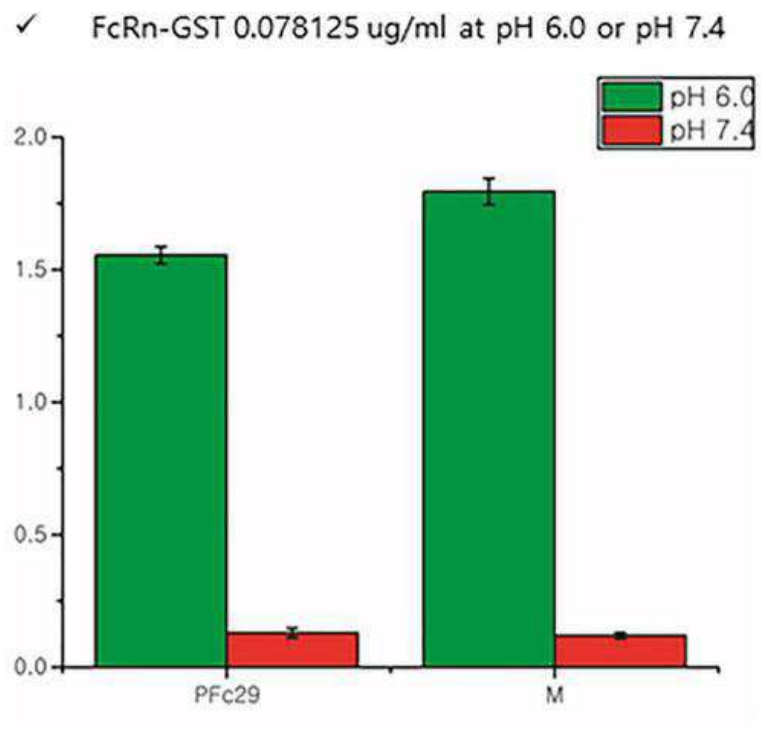
[0101] 상기 실시예 3에서 정제한 변이체들의 pH 6.0에서의 FcRn에 대한 결합력을 확인하기 위해 상기 실시예 2에서와 같이 ELISA 분석을 수행하였다. 그 결과 pH 6.0에서 가장 결합력이 높은 L309Y, Q311M 및 M428L (YML로 표기) 변이체를 확보할 수 있었다 (도 3). 이에, 선발한 YML 변이체의 FcRn에 대한 pH-의존적 결합력을 ELISA로 측정한 결과, 종래의 PFc29 (Q311R 및 M428L Fc 변이체) 및 상기 실시예에서 선발한 ML 변이체 (Q311M 및 M428L Fc 변이체)보다도 pH 6.0에서의 FcRn과의 결합력이 높은 것으로 나타났으며, pH 7.4에서는 유사한 정도의 해리 정도를 나타냈다 (도 4).

[0103] **실시예 5. Fc 변이체의 FcRn에 대한 pH-의존적 결합력 확인**

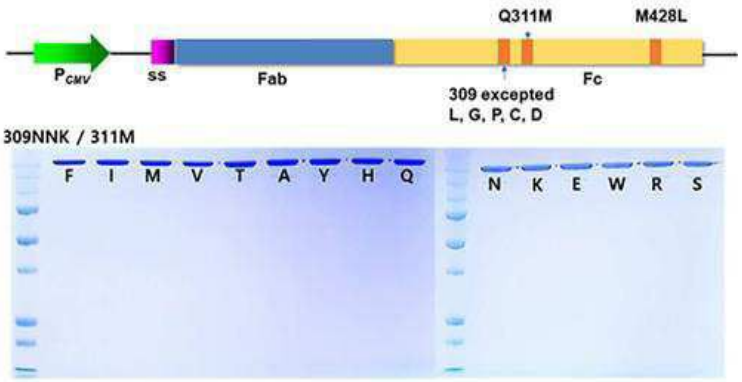
[0104] 혈중 반감기 향상을 위해서는 FcRn에 대한 Fc의 pH-의존적 결합력이 중요하므로 (도 5 참조), Souders et al 2015를 참고하여 약산성 환경에서의 결합 순간속도(on rate) 및 중성 환경에서의 해리 순간속도(off rate)를 상기 실시예들에서 선발한 ML 변이체 (Q311M 및 M428L Fc 변이체) 및 YML 변이체 (L309Y, Q311M 및 M428L)에서 확인하였다. 이의 대조군으로서, 종래의 PFc29 (Q311R 및 M428L Fc 변이체) 및 PFc41 (L309G 및 M428L Fc 변이체)를 이용하였다. 구체적으로, NI-NTA 바이오센서 (Pall Fortebio)에 3분간 40 μg/ml의 His 태깅된 인간 FcRn을 고정화하고 pH 6.0의 PBS 버퍼로 기준(baseline)을 잡은 뒤, 20초 동안 700 nM의 각 항체 Fc 변이체 (in PBS pH 6.0)를 결합시켰다. 약산성 환경 (pH 6.0)에서 FcRn에 항체 Fc 변이체가 결합된 상태에서 pH 7.4의 PBS로 버퍼를 바꾸어 5초간 해리시키고 biolayer interferometry assay (BLItz, Pall Fortebio)를 통해 측정하였다. 이렇게 측정된 데이터(sensorgram)에서 각 pH에서 직선성 구간 (pH6.0, association: 2초 / pH 7.4, dissociation: 1초)의 기울기를 통해 결합 순간속도와 해리 순간속도를 확인하였으며, Fc 변이체들 간의 비교를 위해 각 Fc 변이체의 기울기 값을 나누어 비율로 계산하였다. 결합속도 비와 해리속도 비의 평균으로 스코어링(scoring)하여 결합속도와 해리속도가 가장 빠른 Fc 변이체를 확인하였다. 그 결과, 반감기 증가 효과가 가장 클 것으로 기대되는 항체 Fc 변이체 (YML) (서열번호 3)를 선별하였다 (도 6).

도면

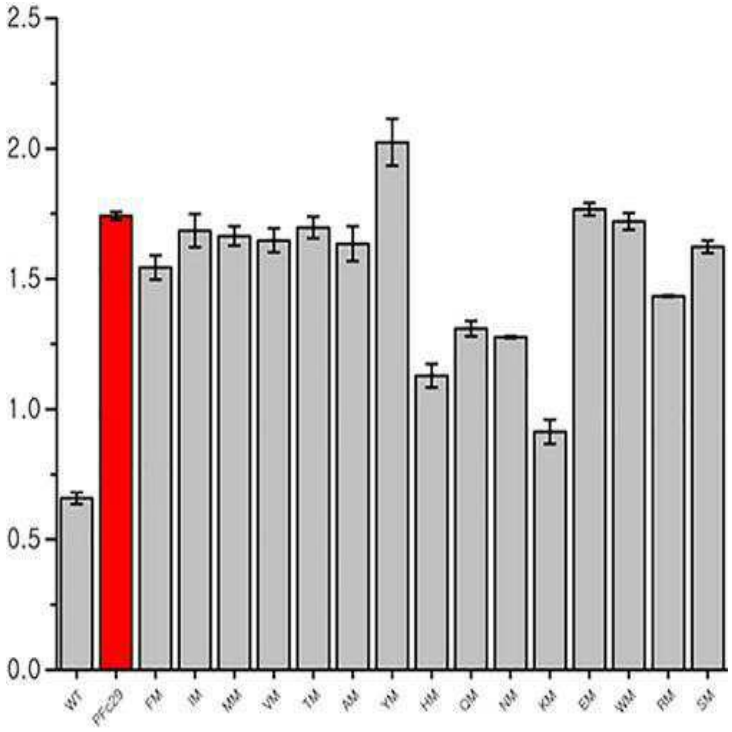
도면1


✓ FcRn-GST 0.078125 ug/ml at pH 6.0 or pH 7.4
pH 6.0
pH 7.4
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
PFc29
M

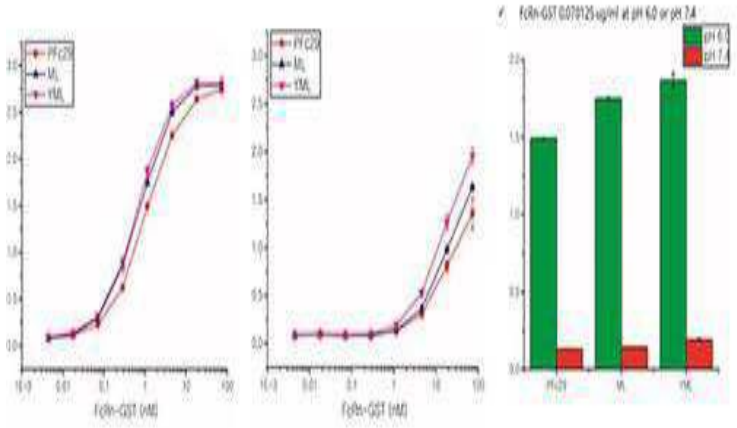
도면2


Q311M
M428L
PCMV
ss
Fab
Fc
309 excepted
L, G, P, C, D
309NNK / 311M
F I M V T A Y H Q
N K E W R S

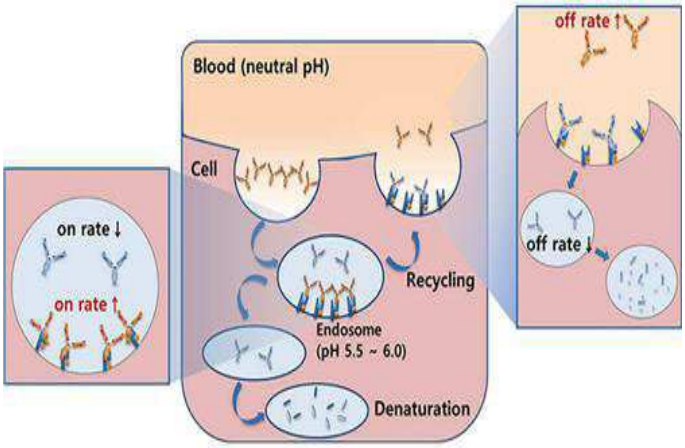
도면3



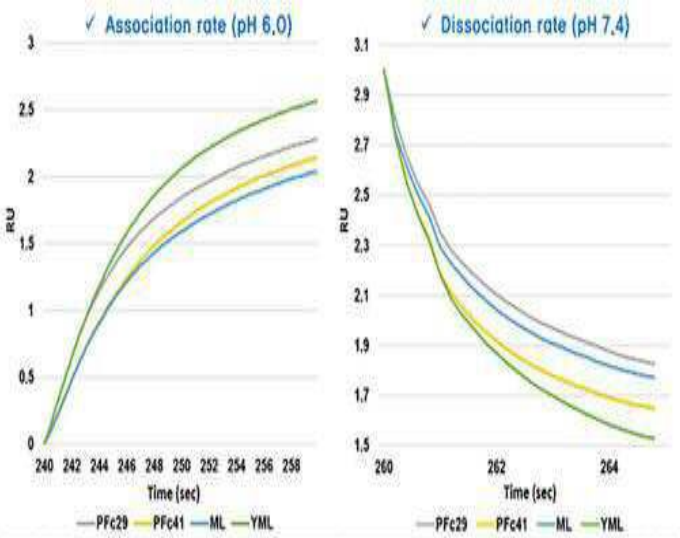
도면4



도면5



도면6



	Instant association rate (RU/sec)	Instant dissociation rate (RU/sec)	Fold of improved instant association rate	Fold of improved instant dissociation rate	Ratio of improved instant association rate to improved instant dissociation rate	Rank
PFc29	0.0656	0.125	1.34979424	1	1.273585	2
PFc41	0.0491	0.155	1.01028807	1.24	1.199009	3
ML	0.0486	0.1336	1	1.0688	1.107513	4
YML	0.0645	0.1559	1.32716049	1.2472	1.384213	1

서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> PH-SENSITIVE FC VARIANTS

<130> DP-2019-0911

<160> 3

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 227

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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> 2

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ML (Q311M/M428L)

<400> 2

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 Met 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 Leu

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> 3

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> YML (L309Y/Q311M/M428L)

<400> 3

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 Tyr His Met 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 Leu

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