



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년12월07일

(11) 등록번호 10-1926663

(24) 등록일자 2018년12월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/435 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) *C12N 15/12* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7024362
(22) 출원일자(국제) 2011년02월22일
심사청구일자 2016년02월22일
(85) 번역문제출일자 2012년09월18일
(65) 공개번호 10-2012-0120993
(43) 공개일자 2012년11월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/025747
(87) 국제공개번호 WO 2011/103584
국제공개일자 2011년08월25일
(30) 우선권주장
61/306,311 2010년02월19일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
W02008047150 A2
W02009058564 A2

(73) 특허권자
젠코어 인코포레이티드
미국 91016 캘리포니아주 몬로비아 웨스트 레몬
애비뉴 111
(72) 발명자
라자르 그레고리 에이.
미국 91007 캘리포니아주 아카디아 유닛 6 아카디
아 애비뉴 750
버넷 매튜 제이.
미국 91016 캘리포니아주 몬로비아 이. 올리브 애
비뉴 222
(74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **신규의 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신**

(57) 요약

본 발명은 CD80 및 CD86을 표적으로 하는 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신, 및 그들의 용도, 특히 치료학적 목적의 용도에 관한 것이다

(30) 우선권주장

61/334,806 2010년05월14일 미국(US)

61/412,309 2010년11월10일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

SEQ ID NO: 6과 비교하여 변이체 CTLA4를 포함하는 제1 도메인 및 IgG Fc 영역을 포함하는 제2 도메인을 포함하는 이뮤노어드헤신으로서, 상기 CTLA4 변이체는 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변이체는 B7-1, B7-2 또는 B7-1 및 B7-2 둘 다에 대한 증진된 결합을 제공하고, 상기 변이체는 A29H/T51N, T51N/K93Q, T51N/M53Y, A29H/T51N/L61E, T51N/L61E/K93Q, T51N/M53Y/L61E, A29H/T51N/L61E/K93Q, A29H/T51N/M53Y/K93Q, A29H/T51N/M53Y/L61E, T51N/M53Y/L61E/K93Q 및 A29H/T51N/M53Y/L61E/K93Q 로 이루어진 군에서 선택되는 치환의 조합을 포함하는 것인, 이뮤노어드헤신.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 변이체가 아미노산 치환 A29H/T51N/L61E/K93Q 를 포함하는 것인, 이뮤노어드헤신.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 변이체가 T51N/L61E/K93Q 및 A29H/T51N/L61E/K93Q로 이루어진 군에서 선택된 치환의 조합을 포함하는 이뮤노어드헤신.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 변이체가 T51N/L61E/K93Q, A29H/T51N/L61E/K93Q, A29H/T51N, T51N/M53Y 및 T51N/M53Y/L61E로 이루어진 군에서 선택된 치환의 조합을 포함하는 이뮤노어드헤신.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 변이체 CTLA4 단백질이 SEQ ID NO: 31 또는 SEQ ID NO: 32에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 이뮤노어드헤신.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 이뮤노어드헤신이 SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 37 또는 SEQ ID NO: 38에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 이뮤노어드헤신.

청구항 7

SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 37, 또는 SEQ ID NO: 38에 상응하는 아미노산 서열을 포함하는 이뮤노어드헤신을 포함하는, 자가면역질환을 치료하기 위한 약학 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 자가면역질환이 크론병, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 루푸스 신염, 건선성 관절염, 건선, 류마티스성 관절염, 궤양성 대장염 및 이식 거부반응으로 이루어진 군에서 선택되는 약학 조성물.

청구항 9

SEQ ID NO: 6과 비교하여 변이체 CTLA4를 포함하는 제1 도메인 및 IgG Fc 영역을 포함하는 제2 도메인을 포함하는 이뮤노어드헤신으로서, 상기 변이체는 천연 CTLA4 내에 적어도 하나 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 CTLA4 위치 51에서의 치환이며, 상기 변이체는 B7-1, B7-2 또는 B7-1 및 B7-2 둘 다에 대한 증진된 결합을 제공하는 이뮤노어드헤신.

청구항 10

제1항의 이뮤노어드헤신을 코드화한 핵산.

청구항 11

제10항의 핵산을 포함하는 숙주 세포.

청구항 12

이뮤노어드헤신이 생산되는 조건 하에서 제11항의 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는 이뮤노어드헤신의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 본 명세서에 온전히 참고로 포함된 것으로서 2010년 11월 10일에 출원된 USSN 61/412,309; 2010년 5월 14일에 출원된 USSN 61/334,806; 및 2010년 2월 19일에 출원된 USSN 61/306,311을 35 U.S.C. § 119(e)에 따른 우선권으로 주장한다.

[0002] 본 발명은 CD80 및 CD86을 표적으로 하는 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신 (immunoadhesins), 및 특히 치료 목적을 위한 이들의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] T 림프구는 항원에 대한 적응성 (adaptive) 면역반응에 있어서 중추적 역할을 한다. 순수한 (naive) T 세포는 그들의 완전한 활성화를 위해서 2개의 시그널을 필요로 한다 [Bretscher 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96:185-90]. 첫 번째 시그널은 항원 특이적이며, T-세포 수용체 (TCR)와 항원 제시 세포 (APC) 상의 MHC/펩타이드 콤플렉스의 상호작용에 의해서 제공된다. 두 번째 시그널은 T 세포 상의 수용체와 APC 상의 그들의 리간드 사이의 상호작용에 의해서 제공된 공동-자극성 (costimulatory) 시그널이다. TCR/MHC 및 공동-자극성 상호작용 둘 다의 연동은 칼슘-칼시뉴린 및 RAS 미토젠-활성화된 단백질 키나제를 포함하는 다수의 세포내 경로, 및 IL-2와 같은 사이토킨을 포함한 다수의 효과기 (effector) 화합물에 대한 전사인자의 후속 활성화를 통한 T-세포 활성화를 유도한다. 이들 현상은 T-세포 증식, CD4⁺ 헬퍼 T-세포 (T_H) 풀 (pool)의 생성, 및 활성화된 CD8⁺ 세포독성 T 세포의 팽창을 유도한다. 공동-자극은 완전한 T-세포 활성화에 중요할 뿐만 아니라, TCR/MHC 연동 중의 그의 부재는 아네르기 (anergy) 및/또는 세포소멸을 야기한다.

[0004] 비록 다수의 양성 및 음성 공동-자극성 경로가 T-세포 조절에 연루되지만, 가장 중요한 것은 T 세포 상의 CD28과 APC 상의 B7-1 (CD80) 및 B7-2 (CD86) 사이의 것이다. CD28은 TH1 표현형 세포로의 T-세포 분화를 촉진하며, B 세포에 의한 항체 생산 및 T 세포의 활성화를 증진시킨다. 수상돌기세포 (DC) 및 B 세포와 같은 APC 상에서 발현된 B7-1 및 B7-2는 중복되지만 상이한 기능을 갖는다. B7-2는 구성적으로 발현되며, TCR/MHC 연동 (시그널 1)과 일치하여 APC 상에서 빠르게 상향조절된다. B7-1 발현은 정지세포 상에서는 매우 낮지만, 전형적으로 장기간의 T-세포 자극 후에 유도된다. 이들 차이점은 B7-2는 T-세포 활성화의 개시에 중요할 수 있지만, B7-1은 면역반응을 영구화시키는데 더 큰 역할을 할 수 있음을 시사한다.

[0005] T-세포 활성화에 이어서, 음성 조절성 수용체 세포독성 T-림프구 항원 4 (CTLA4 또는 CTLA-4, 또한 CD152로 칭함)는 T 세포 상에서 상향조절된다 [Alegre et al., 2001, Nat Rev Immunol 1:220-8]. CTLA4는 구조적으로 CD28에 상응하지만, B7-1 및 B7-2 리간드 둘 다에 더 단단하게 결합한다. CTLA4는 2개의 주된 경로에서 면역반응을 억제한다 - 이것은 B7 리간드에 대해서 CD28과 경쟁하며, 따라서 공동자극을 차단하고, 이것은 또한 T 세포 활성화를 억제하도록 음성적으로 시그널을 보낸다 [Krummel and Allison, 1995, J Exp Med 182:459-465; Walunas et al., 1994, Immunity 1:405-413]. 최근의 연구는 B7-2가 면역 시냅스에서 CTLA4보다 CD28과 더 많이 연동하는 반면에, B7-1은 CD28보다 CTLA4와 더 많이 결합 (ligation)되는 것을 나타내고 있다 [Collins et al., 2002, Immunity 17:201-210; Jansson et al., 2005, J Immunol 175:1575-1585].

[0006] 면역반응을 촉진 및 유지시키는데 있어서의 B7 공동-자극성 경로의 중요한 역할로 인하여, 이것에 길항하도록 디자인된 치료학적 약제는 자가면역 질환 및 장애의 치료에 유망하다. 아바타셉트 (Abatacept; Orencia®)는 인간 IgG의 Fc 도메인에 연결된 CTLA4의 세포외 결합 도메인으로 구성된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신이다. 아바타셉트는 B7 매개된 공동자극을 억제하도록 개발되었으며 [Bluestone et al., 2006, Immunity 24:233-238], 류마티스관절염 (RA)의 치료를 위해서, 및 그 밖의 다른 다수의 자가면역 적응증에 관한 임상실험을 위해서 승인되었다. 그러나, 아바타셉트는 RA를 치료하는 데는 약간의 활성을 나타내는 반면에, 이것은 다른 적응증에는 효과가 없다. 예를 들어, CTLA4-Ig는 이식 거부반응에 대한 내성에는 효과가 훨씬 작다 [Kirk et al., 1997, Proc

Natl Acad Sci USA 94:8789-8794; Levisetti et al., 1997, J Immunol 159:5187-5191].

[0007] 아바타셉트의 불충분한 임상적 성능은 B7 리간드, 특히 면역성의 개시에 있어서 추정되는 그의 중요성에 기인하여 B7-2에 대한 천연 (native) CTLA4의 최적화 친화성으로 인한 것이었다. 본 발명은 개선된 B7 친화성 및 증진된 T-세포 억제활성을 갖는 신규한 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 제공한다. 이러한 신규의 이뮤노어드헤신은 다양한 적용분야, 특히 이하에 상세히 거론되는 면역 관련 장애를 치료하는데 이점을 갖는다.

발명의 내용

[0008] 발명의 요약

[0009] 본 발명은 항원 제시 세포 (APC)와 T 세포 사이의 상호작용을 억제하는 신규의 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 제공한다. 본 발명의 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 인간 B7-1 (CD80) 및 B7-2 (CD86)에 높은 친화성으로 결합하는 CTLA4 부분을 포함하고, 하나 또는 그 초과 Fc 수용체 또는 Fc 리간드에 결합할 수 있는 Ig Fc 부분 (또는 Fc 영역)을 포함한다.

[0010] 본 발명의 일 측면에서, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 변이체 CTLA4 단백질을 포함하며, 여기에서 상기의 변이체는 천연 CTLA4 단백질 내에 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하고, 여기에서 상기의 변형은 A29E, A29F, A29H, A29K, A29N, A29Q, A29R, T30E, T30H, T30R, T30V, E31D, E31I, E31M, E31T, E31V, R33E, R33F, R33I, R33L, R33M, R33Q, R33T, R33W, R33Y, T35D, T35E, T35F, T35M, T35V, T35Y, A49D, A49E, A49F, A49T, A49W, A49Y, T51D, T51E, T51H, T51L, T51N, T51Q, T51R, T51S, T51V, M53E, M53F, M53H, M53Q, M53W, M53Y, T59H, T59I, T59L, T59N, T59Q, T59V, T59Y, L61A, L61D, L61E, L61F, L61G, L61H, L61I, L61K, L61M, L61N, L61P, L61Q, L61R, L61S, L61T, L61V, L61W, L61Y, D63E, S64K, S64R, S64Y, K93D, K93E, K93F, K93H, K93N, K93Q, K93R, K93S, K93T, K93V, K93W, K93Y, E95D, E95H, E95L, E95Q, E95Y, M97D, M97F, M97I, M97N, M97V, Y98F, Y98W, Y102F, Y102W, Y103D, Y103E, Y103F, Y103H, Y103N, Y103Q, Y103W, L104F, L104H, L104M, L104V, L104Y, G105D, G105E, I106E, 및 I106Y로 구성된 그룹으로부터 선택된 치환이며, 여기에서 상기의 치환은 B7-1 및/또는 B7-2에 대한 증진된 결합을 제공한다. 본 발명의 바람직한 측면에서, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 A29H, T51N, M53Y, L61E, 및 K93Q로 구성된 그룹으로부터 선택된 CTLA4 치환을 포함하며, 여기에서 상기의 치환은 B7-1 및/또는 B7-2에 대한 증진된 결합을 제공한다. 본 발명의 가장 바람직한 측면에서, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 A29H, T51N, L61E, 및 K93Q로 구성된 그룹으로부터 선택된 CTLA4 치환을 포함하며, 여기에서 상기의 치환은 B7-1 및/또는 B7-2에 대한 증진된 결합을 제공한다. 본 발명의 다른 측면에서, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 A29H, A29K, T51N, L61E, 및 Y103Q로 구성된 그룹으로부터 선택된 CTLA4 치환을 포함하며, 여기에서 상기의 치환은 B7-1 및/또는 B7-2에 대한 증진된 결합을 제공한다. 본 발명의 다른 측면에서, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 K93V, L61Q, 및 L104H로 구성된 그룹으로부터 선택된 CTLA4 치환을 포함하며, 여기에서 상기의 치환은 B7-1 및/또는 B7-2에 대한 증진된 결합을 제공한다.

[0011] 본 발명의 또 다른 측면에서, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 변이체 CTLA4 단백질을 포함하며, 여기에서 상기의 변이체는 A29H/K93Q, A29H/M53Y, A29H/T51N, T51N/K93Q, T51N/M53Y, A29H/L61E/K93Q, A29H/M53Y/K93Q, A29H/M53Y/L61E, A29H/T51N/L61E, M53Y/L61E/K93Q, T51N/L61E/K93Q, T51N/M53Y/L61E, A29H/M53Y/L61E/K93Q, A29H/T51N/L61E/K93Q, A29H/T51N/M53Y/K93Q, A29H/T51N/M53Y/L61E, T51N/M53Y/L61E/K93Q, 및 A29H/T51N/M53Y/L61E/K93Q로 구성된 그룹으로부터 선택된 CTLA4 치환의 조합을 포함하고, 여기에서 상기의 변이체는 B7-1 및/또는 B7-2에 대한 증진된 결합을 제공한다. 본 발명의 바람직한 측면에서, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 T51N/L61E/K93Q 및 A29H/T51N/L61E/K93Q로 구성된 그룹으로부터 선택된 CTLA4 치환의 조합을 포함하고, 여기에서 상기의 변이체는 B7-1 및/또는 B7-2에 대한 증진된 결합을 제공한다. 본 발명의 다른 측면에서, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 T51N/L61E/K93Q, A29H/T51N/L61E/K93Q, A29H/T51N, T51N/M53Y, 및 T51N/M53Y/L61E로 구성된 그룹으로부터 선택된 CTLA4 치환의 조합을 포함하고, 여기에서 상기의 변이체는 B7-1 및/또는 B7-2에 대한 증진된 결합을 제공한다.

[0012] 본 발명의 또 다른 측면에서, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 변이체 CTLA4 단백질을 포함하며, 여기에서 상기의 변이체는 35, 49, 51, 53, 59, 61, 및 95로 구성된 그룹으로부터 선택된 CTLA4 위치에서의 치환을 포함하고, 여기에서 상기의 변이체는 B7-1 및/또는 B7-2에 대한 증진된 결합을 제공한다. 본 발명의 바람직한 측면에서, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 변이체 CTLA4 단백질을 포함하며, 여기에서 상기의 변이체는 51 및 61로 구성된 그룹으로부터 선택된 CTLA4 위치에서의 치환을 포함하고, 여기에서 상기의 변이체는 B7-1 및/또는 B7-2에 대한 증진된 결합을 제공한다.

- [0013] 추가의 측면에서, 본 발명은 변이체 인간 CTLA4를 포함하는 제1 도메인 및 IgG Fc 영역을 포함하는 제2 도메인을 포함하는 이뮤노어드헤신을 제공하고, 여기에서 상기의 제1 도메인은 식 Fx(1-28)-Vb(29)-Fx(30-50)-Vb(51)-Fx(52)-Vb(53)-Fx(54-60)-Vb(61)-Fx(62-92)-Vb(93)-Fx(94-124) [SEQ ID NO: 1]를 갖고, 여기에서 Fx(1-28)은 서열 MHVAQPAVLASSRGIASFVCEYASPGK (SEQ ID NO: 1의 위치 1-28)이며; Vb(29)는 A 및 H로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Fx(30-50)은 서열 TEVRVTVLQRQADSQVTEVCAA (SEQ ID NO: 1의 위치 30-50)이며; Vb(51)은 T 및 N으로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Fx(52)는 Y이며; Vb(53)은 M 및 Y로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Fx(54-60)은 서열 MGNELTF (SEQ ID NO: 1의 위치 54-60)이며; Vb(61)은 L 및 E로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Fx(62-92)는 서열 DDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYIC (SEQ ID NO: 1의 위치 62-92)이며; Vb(93)은 K 및 Q로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Fx(94-124)는 서열 VELMYPPYYIIGNGTQIYVIDPEPCPDS (SEQ ID NO: 1의 위치 94-124)이며; 여기에서 상기의 변이체는 SEQ ID NO: 6과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하고, 여기에서 상기의 변이체는 B7-1, B7-2 또는 B7-1 및 B7-2 둘 다에 대한 증가된 결합을 나타낸다.
- [0014] 추가의 측면에서, 본 발명은 변이체 인간 CTLA4를 포함하는 제1 도메인 및 IgG Fc 영역을 포함하는 제2 도메인을 포함하는 이뮤노어드헤신을 제공하고, 여기에서 상기의 제1 도메인은 식 Fx(1-28)-Vb(29)-Fx(30-50)-Vb(51)-Fx(52)-Vb(53)-Fx(54-60)-Vb(61)-Fx(62-92)-Vb(93)-Fx(94-124) [SEQ ID NO: 2]를 갖고, 여기에서 Fx(1-28)은 서열 MHVAQPAVLASSRGIASFVCEYASPGK (SEQ ID NO: 2의 위치 1-28)이며; Vb(29)는 H이고; Fx(30-50)은 서열 TEVRVTVLQRQADSQVTEVCAA (SEQ ID NO: 2의 위치 30-50)이며; Vb(51)은 T 및 N으로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Fx(52)는 Y이며; Vb(53)은 M 및 Y로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Fx(54-60)은 서열 MGNELTF (SEQ ID NO: 2의 위치 54-60)이며; Vb(61)은 L 및 E로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Fx(62-92)는 서열 DDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYIC (SEQ ID NO: 2의 위치 62-92)이며; Vb(93)은 K 및 Q로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Fx(94-124)는 서열 VELMYPPYYIIGNGTQIYVIDPEPCPDS (SEQ ID NO: 2의 위치 94-124)이며; 여기에서 상기의 변이체는 B7-1, B7-2 또는 B7-1 및 B7-2 둘 다에 대한 증가된 결합을 나타낸다.
- [0015] 추가의 측면에서, 본 발명은 변이체 인간 CTLA4를 포함하는 제1 도메인 및 IgG Fc 영역을 포함하는 제2 도메인을 포함하는 이뮤노어드헤신을 제공하고, 여기에서 상기의 제1 도메인은 식 Fx(1-28)-Vb(29)-Fx(30-50)-Vb(51)-Fx(52)-Vb(53)-Fx(54-60)-Vb(61)-Fx(62-92)-Vb(93)-Fx(94-124) [SEQ ID NO: 3]를 갖고, 여기에서 Fx(1-28)은 서열 MHVAQPAVLASSRGIASFVCEYASPGK (SEQ ID NO: 3의 위치 1-28)이며; Vb(29)는 A 및 H로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Fx(30-50)은 서열 TEVRVTVLQRQADSQVTEVCAA (SEQ ID NO: 3의 위치 30-50)이며; Vb(51)은 N이고; Fx(52)는 Y이며; Vb(53)은 M 및 Y로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Fx(54-60)은 서열 MGNELTF (SEQ ID NO: 3의 위치 54-60)이며; Vb(61)은 L 및 E로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Fx(62-92)는 서열 DDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYIC (SEQ ID NO: 3의 위치 62-92)이며; Vb(93)은 K 및 Q로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Fx(94-124)는 서열 VELMYPPYYIIGNGTQIYVIDPEPCPDS (SEQ ID NO: 3의 위치 94-124)이며; 여기에서 상기의 변이체는 B7-1, B7-2 또는 B7-1 및 B7-2 둘 다에 대한 증가된 결합을 나타낸다.
- [0016] 추가의 측면에서, 본 발명은 변이체 인간 CTLA4를 포함하는 제1 도메인 및 IgG Fc 영역을 포함하는 제2 도메인을 포함하는 이뮤노어드헤신을 제공하며, 여기에서 상기의 제1 도메인은 식 Fx(1-28)-Vb(29)-Vb(30)-Vb(31)-Fx(32)-Vb(33)-Fx(34)-Vb(35)-Fx(36-48)-Vb(49)-Fx(50)-Vb(51)-Fx(52)-Vb(53)-Fx(54-58)-Vb(59)-Fx(60)-Vb(61)-Fx(62)-Vb(63)-Vb(64)-Fx(65-92)-Vb(93)-Fx(94)-Vb(95)-Fx(96)-Vb(97)-Vb(98)-Fx(99-101)-Vb(102)-Vb(103)-Vb(104)-Vb(105)-Vb(106)-Fx(107-124) [SEQ ID NO: 4]를 갖고; 여기에서 Fx(1-28)은 서열 MHVAQPAVLASSRGIASFVCEYASPGK (SEQ ID NO: 4의 위치 1-28)이며; Vb(29)는 A, E, F, H, K, N, Q 및 R로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Vb(30)은 T, H 및 V로 구성된 그룹으로부터 선택되며; Vb(31)은 E, D, I, M, T 및 V로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Fx(32)는 V이며; Vb(33)은 R, E, F, I, L, M, Q, T, W 및 Y로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Fx(34)는 V이며; Vb(35)는 T, D, E, F, M, V 및 Y로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Fx(36-48)은 서열 VLRQADSQVTEVC (SEQ ID NO: 4의 위치 36-48)이며; Vb(49)는 A, D, E, F, T, W 및 Y로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Fx(50)은 A이며; Vb(51)은 T, D, E, H, L, N, Q, R, S 및 V로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Fx(52)는 Y이며; Vb(53)은 M, E, F, H, Q, W 및 Y로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Fx(54-58)은 서열 MGNELT (SEQ ID NO: 4의 위치 54-58)이며; Vb(59)는 T, H, I, L, N, Q, V 및 Y로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Fx(60)은 F이며; Vb(61)은 L, A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Fx(62)는 D이며; Vb(63)은 D 및 E로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Vb(64)는 S, K, R 및 Y로 구성된 그룹으로부터 선택되며; Fx(65-92)는 서열 ICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYIC (SEQ ID NO: 3의 위치 65-92)이고; Vb(93)은 K, D, E, F, H, N, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 구성된 그룹으로부터 선택되며; Fx(94)는 V이고; Vb(95)는 E, D, H, L, Q 및 Y로 구성된 그룹으로부터 선택되며; Fx(96)은 L이고; Vb(97)은 M, D, F, I, N

및 V로 구성된 그룹으로부터 선택되며; Vb(98)은 Y, F 및 W로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Fx(99-101)은 서열 PPP이며; Vb(102)는 Y, F 및 W로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Vb(103)은 Y, D, E, F, H, N, Q 및 W로 구성된 그룹으로부터 선택되며; Vb(104)는 L, F, H, M, V 및 Y로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Vb(105)는 G, D 및 E로 구성된 그룹으로부터 선택되며; Vb(106)은 I, E 및 Y로 구성된 그룹으로부터 선택되고; Fx(107-124)는 서열 GNGTIYVIDPEPCPDS (SEQ ID NO: 4의 위치 107-124)이며, 여기에서 상기 변이체는 SEQ ID NO: 6과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하고, 여기에서 상기의 변이체는 B7-1, B7-2 또는 B7-1 및 B7-2 둘 다에 대한 증가된 결합을 나타낸다.

[0017] 추가의 측면에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 8을 포함하는 이뮤노어드레신을 제공하며, 여기에서 상기의 이뮤노어드레신은 SEQ ID NO: 6과 비교하여 하나의 아미노산 변형을 포함한다.

[0018] 추가의 측면에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 6과 비교하여 변이체 CTLA4를 포함하는 제1 도메인 및 IgG Fc 영역을 포함하는 제2 도메인을 포함하는 이뮤노어드레신을 제공하며, 여기에서 상기의 CTLA4 변이체는 T51N, A29H, M53Y, L61E, 및 K93Q로 구성된 그룹으로부터 선택된 하나의 아미노산 변형을 포함하고, 여기에서 상기의 변이체는 B7-1, B7-2 또는 B7-1 및 B7-2 둘 다에 대한 증진된 결합을 제공한다.

[0019] 추가의 측면에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 6과 비교하여 변이체 CTLA4를 포함하는 제1 도메인 및 IgG Fc 영역을 포함하는 제2 도메인을 포함하는 이뮤노어드레신을 제공하며, 여기에서 상기의 CTLA4 변이체는 SEQ ID NO: 6의 번호를 사용하여 51, 53, 61 및 93으로 구성된 그룹으로부터 선택된 위치에서 하나의 아미노산 변형을 포함하고, 여기에서 상기의 변이체는 B7-1, B7-2 또는 B7-1 및 B7-2 둘 다에 대한 증진된 결합을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일 측면에서, CTLA4-Ig 이뮤노어드레신은 천연 Fc 영역을 포함한다. 본 발명의 바람직한 천연 Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4 Fc 영역을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0021] 본 발명의 바람직한 측면에서, CTLA4-Ig 이뮤노어드레신은 변이체 Fc 영역을 포함한다. 본 발명의 바람직한 측면에서, 변이체 Fc 영역은 신생아 (neonatal) Fc 수용체 FcRn에 대한 친화성을 증진시킨다. 본 발명의 가장 바람직한 측면에서, 변이체 Fc 영역은 CTLA4-Ig의 생체내 반감기를 연장시킨다. FcRn 친화성을 증진시키고/시키거나 생체내 반감기를 연장시키는데 바람직한 변이체는 259I, 307Q, 308F, 311I, 311V, 378V, 378T, 426V, 428L, 434S, 436I, 436V, 250Q, 434A, 252Y, 254T, 및 256E를 포함하나 이들로 제한되지는 않으며, 여기에서 넘버링 (numbering)은 EU 인덱스에 따른다. FcRn 친화성을 증진시키고/시키거나 생체내 반감기를 연장시키는데 가장 바람직한 변이체는 428L 및 434S이며, 여기에서 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.

[0022] 본 발명은 본 발명에 기술된 신규의 CTLA4-Ig 이뮤노어드레신을 코드화한 분리된 핵산을 제공한다. 본 발명은 임의로 제어서열에 작동적으로 연결된 상기의 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 본 발명은 상기의 벡터를 함유하는 숙주 세포, 및 이뮤노어드레신을 생산하고, 임의로 회수하는 방법을 제공한다.

[0023] 본 발명은 신규의 CTLA4-Ig 단백질을 제공한다. 상기의 신규한 CTLA4-Ig 단백질은 치료학적 생성물에서의 용도를 가질 수 있다.

[0024] 본 발명은 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 단백질, 및 생리학적으로 또는 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0025] 본 발명은 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드레신에 대한 치료학적 및 진단적 용도를 고려한다. 본 발명의 CTLA4-Ig 이뮤노어드레신은 바람직하게는 면역 관련된 장애를 치료하기 위해서 사용된다. 본 발명의 가장 바람직한 구체예에서, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드레신은 크론병, 전신 홍반성 루프스 (SLE), 루프스 신염, 건선성 관절염, 건선, 류마티스성 관절염, 궤양성 대장염, 및/또는 이식 거부반응을 치료하기 위해서 사용된다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 전체 길이 인간 CTLA4, 인간 CTLA4의 세포외 도메인 (ECD), 및 벨라타셉트 (belatacept)인 인간 CTLA4의 A29Y/L104E 변이체 버전 (version)의 아미노산 서열이다. CTLA4의 ECD는 전체 길이 CTLA4 서열에서 회색으로 두드러지게 하였다. 벨라타셉트 서열에서 회색은 A29Y/L104E 치환을 두드러지게 나타낸 것이다 [SEQ ID NOs: 5-8].

도 2는 예시적인 Fc 영역의 아미노산 서열이다. 여기에서 Fc 영역은 EU 넘버링 방식을 기초로 하여 위치 230에서 C-말단까지 (230-447)로 정의된다. 회색 하이라이트 (highlight)는 천연 IgG Fc 영역으로부터의 변형을 나타

낸다 [SEQ ID NOs: 9-15].

도 3은 예시적인 링커의 아미노산 서열이다. 링커의 넘버링은 EU 인덱스를 기초로 하며, 잔기 216-229를 함유하고, 여기에서 216은 EU 넘버링을 기초로 하여 4개의 천연 IgG 이소타입의 N-말단 216E이다. N-말단 Q의 첨가는 번호를 변화시키지 않는다 (즉, 216E는 여전히 216E이다). 회색 하이라이트는 천연 IgG 링커로부터의 변형을 나타낸다 [SEQ ID NOs: 16-23].

도 4는 본 연구에서 사용된 링커 및 Fc 영역의 예시적인 조합의 아미노산 서열이다. 회색 하이라이트는 천연 IgG 불변 영역 서열로부터의 변형을 나타낸다 [SEQ ID NOs: 24-27].

도 5는 본 연구에서 시험한 선택된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 아미노산 서열이다 [SEQ ID NOs: 28-30].

도 6은 회색 삼각형으로 나타낸 것으로서 아바타셉트에 대비한 선별된 모든 단일 치환 CTLA4-Ig 변이체에 대한 폴드(k_{off})의 플롯이다. 흑색 사각형은 모 CTLA4-Ig 아바타셉트를 나타내고, 흑색의 비어있는 원은 벨라타셉트를 나타낸다.

도 7은 아바타셉트 및 벨라타셉트와 비교한 CTLA4-Ig 변이체에 대한 CD80 및 CD86 K_D 의 플롯이다. 본 연구의 CTLA4-Ig 변이체는 회색 삼각형으로 표시된다. 흑색 사각형은 모 CTLA4-Ig 아바타셉트를 나타내고, 흑색의 비어있는 원은 벨라타셉트를 나타낸다.

도 8은 CTLA4-Ig 변이체 HNEQ (A29H/T51N/L61E/K93Q)를 아바타셉트 및 벨라타셉트와 비교하여 CD86 (상단) 및 CD80 (하단)에 대한 결합에 관한 비아코어 센서그램 (Biacore sensorgrams)이다.

도 9는 예시적인 변이체 CTLA4 및 변이체 CTLA4-Ig 단백질의 아미노산 서열이다 [SEQ ID NOs: 31-34].

도 10은 CTLA4-Ig 변이체의 T-세포 억제활성이다. T 세포는 안티-CD4 항체를 사용하는 CD3 및 재조합체 B7-2-Ig를 사용하는 B7-2의 공동-결찰 (co-ligation)에 의해서 활성화되었다. CFSE 표지된 T 세포는 유세포시험을 사용하여 모니터링하였다.

도 11은 생체내 반감기를 연장시킨 Fc 변이체를 갖는 예시적인 CTLA4-Ig 변이체의 아미노산 서열이다 [SEQ ID NOs: 35-38].

도 12는 CTLA4-Ig 단백질의 천연 및 Fc 변이체 버전에 의한 pH 6.0에서의 인간 FcRn에 대한 결합에 관한 비아코어 센서그램이다. LS는 428L/434S 변이체를 나타낸다.

도 13은 비아코어에 의해서 결정된 것으로서 CTLA4-Ig 단백질의 천연 Fc 및 변이체 Fc 버전의 FcRn 결합 친화성 (pH 6.0)의 플롯이다. LS는 428L/434S 변이체를 나타낸다.

도 14는 CTLA4-Ig 변이체의 T-세포 억제활성이다. T 세포는 안티-CD3 항체를 사용하는 CD3 및 재조합체 B7-2-Ig를 사용하는 B7-2의 공동-결찰에 의해서 활성화되었다. CFSE 표지된 T 세포는 유세포시험을 사용하여 모니터링하였다.

도 15는 혼합 림프구 반응에서 CTLA4-Ig 변이체의 T-세포 억제활성이다. T 세포는 2 가지 세트의 실험 (하나는 공여체 2336 및 3070 (상단), 및 하나는 공여체 3070 및 3995 (하단)를 사용)에서 동종이계 PBMC의 혼합물에 의해 활성화되었다. 활성화는 ELISA에 의해서 측정된 IL-2의 방출을 측정함으로써 정량화되었다.

도 16은 생체내에서 변이체 CTLA4-Ig 단백질의 억제활성이다. 과상풍에 대한 인간 면역반응을 억제하는 CTLA4-Ig 단백질의 능력은 인간 말초혈액 림프구 (PBLs)가 이식된 중증 복합 면역결핍 (SCID) 마우스에서 측정되었다. 그래프는 PBS (PBS + TT), 아바타셉트, 및 변이체 CTLA4(NEQ)-Ig(ab) (B7-1 및 B7-2에 대한 증진된 활성을 갖는 51N/61E/93Q)로 처리한 경우의, PBL 이식-후 21일에 과상풍 공격한 후의 항-과상풍 항체 (안티-TT IgG)의 혈청 레벨을 나타낸다. PBS 단독 (무-과상풍)인 경우가 음성 대조군으로 수행되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 발명의 상세한 설명

[0028] 개요

[0029] 본 발명은 개선된 B7 친화성 및 증진된 T-세포 억제활성을 갖는 신규의 변이체 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신에 관한 것이다. 이러한 신규의 이뮤노어드헤신은 이하에 상세히 거론하는 바와 같이 다양한 적용분야에서 이점이 있다.

- [0030] CTLA-4로도 칭하며, 또한 CD152 (분화의 클러스터 (cluster) 152)로도 공지되어 있는 CTLA4 (세포독성 T-림프구 항원 4)는 면역 시스템에서 중요한 조절성 역할을 하는 단백질이다. 인간에게서, CTLA4 단백질은 그의 해독된 아미노산 서열이 SEQ ID NO: 1로 제공되는 CTLA4 유전자에 의해서 코드화된다. CTLA4는 면역글로불린 슈퍼패밀리 (superfamily)의 구성원이며, T 세포 공동자극성 단백질인 CD28과 구조적으로 상응한다. CTLA4는 항원 제시 세포 (APC)의 표면 상에서 공동자극성 리간드 B7-1 및 B7-2에 결합한다. CTLA4는 2개의 주된 경로에서 면역 반응을 억제한다 - 이것은 B7-1 및 B7-2에 대한 결합에 관해서 CD28과 경쟁하며, 이에 의해서 공동자극을 차단하고, 이것은 T 세포 활성화를 억제하도록 음성적으로 시그널을 보낸다. 본 발명에 있어서 CTLA4 단백질의 특히 중요한 영역은 APC 상에서의 B7-1 및 B7-2 리간드에 대한 결합을 매개하는 세포외 도메인 (ECD) (SEQ ID NO: 2)이다.
- [0031] 면역반응을 촉진 및 유지시키는데 있어서의 B7 공동-자극성 경로의 중요한 역할의 결과로서, 이 경로에 길항하도록 디자인된 치료학적 약제를 제공하는 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명은 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 제공한다.
- [0032] **CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신**
- [0033] 본 발명은 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 제공한다. "이뮤노어드헤신"은 하나 또는 그 초과와 폴리에피타이드가 Fc 영역에 작동적으로 연결된 단백질을 나타낸다. 본 명세서에서 사용된 이뮤노어드헤신은 선행기술에서 사용된 것으로 용어 "Fc 융합체", "Ig 융합체", "수용체 Fc 융합체", "Ig 키메라 (chimera)", 및 "수용체 글로불린" (때때로 대시 (dash)가 있음), 및 "TRAPs"와 동의어이다 [Chamow et al., 1996, Trends Biotechnol 14:52-60; Ashkenazi et al., 1997, Curr Opin Immunol 9:195-200; 이들은 둘다 온전히 참고로 포함된다]. 이뮤노어드헤신은 면역글로불린의 Fc 영역을, 일반적으로 표적 단백질에 대한 특이성을 갖는 어떤 단백질 또는 소분자라도 될 수 있는 융합 파트너와 결합시킨다. 따라서, 이뮤노어드헤신은 2개의 주된 부분인 표적 단백질 부분 및 Fc 부분을 갖는다. 표적 단백질 부분은 실질적으로 어떤 표적 또는 표적 항원에 대해서라도 특이성을 가질 수 있다. Fc 부분은 하나 또는 그 초과와 Fc 수용체 또는 Fc 리간드에 결합할 수 있다. 융합 파트너는 N- 또는 C-말단, 또는 말단들 중간의 일부의 잔기를 포함한 Fc 영역의 어떤 영역에라도 연결될 수 있다. 실질적으로 어떤 단백질 또는 소분자라도 Fc에 연결되어 Fc 융합체를 생성시키고, 따라서 실질적으로 어떤 표적이라도 표적화할 수 있지만, 본 발명의 이뮤노어드헤신은 융합 파트너로서 CTLA4 또는 CTLA4의 변이체를 포함한다. CTLA4와 Ig Fc 영역의 융합체는 여기에서 CTLA4-Ig 또는 CTLA4-Ig 단백질로 칭한다.
- [0034] **CTLA4 변이체**
- [0035] 본 발명의 이뮤노어드헤신의 표적 결합 부분 또는 융합 파트너는 단백질 CTLA4로 이루어진다. 따라서, 본 발명의 이뮤노어드헤신은 CTLA4에 의해서 결합되는 B7-1, B7-2, 및 공지되거나 공지되지 않은 어떤 다른 리간드 또는 수용체라도 결합하도록 지시된다. 본 발명의 표적 결합 부분은 인간 CTLA4 단백질의 전부, 어떤 것 또는 일부분으로 구성된 아미노산 서열을 포함할 수 있다 (SEQ ID NO: 1). 바람직하게는, 이뮤노어드헤신 결합 부분은 CTLA4의 ECD의 전부 또는 일부분을 포함한다 (SEQ ID NO: 2). 실시예에 기술된 바와 같이, 이뮤노어드헤신 결합은 바람직하게는 B7-1, B7-2, 또는 B7-1 및 B7-2 둘 다에 대한 결합을 개선시키고, 일부의 경우에는 어느 하나에 대해서 선택적 결합을 나타내는 CTLA4의 변이체이다.
- [0036] CTLA4 변이체는 천연 CTLA4 단백질, 일반적으로 SEQ ID NO: 1에 도시된 인간 CTLA4 단백질 내에 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하며, 전체 CTLA4 단백질은 일반적으로 본 발명의 융합 단백질에서 사용되지 않기 때문에 대부분의 경우에 상기 변이체는 세포외 도메인 내에 있다. 이 구체예에서, 하나 또는 그 초과와 변형은 다음의 위치들 중의 하나 또는 그 초과에서 이루어진다 (SEQ ID NO: 2에서와 같은 넘버링): 29, 30, 31, 33, 35, 49, 51, 53, 59, 61, 63, 64, 93, 95, 97, 98, 102, 103, 104, 105 또는 106. 일부의 구체예에서, 변형은 다음의 치환 중의 하나 또는 그 초과가다: A29E, A29F, A29H, A29K, A29N, A29Q, A29R, T30E, T30H, T30R, T30V, E31D, E31I, E31M, E31T, E31V, R33E, R33F, R33I, R33L, R33M, R33Q, R33T, R33W, R33Y, T35D, T35E, T35F, T35M, T35V, T35Y, A49D, A49E, A49F, A49T, A49W, A49Y, T51D, T51E, T51H, T51L, T51N, T51Q, T51R, T51S, T51V, M53E, M53F, M53H, M53Q, M53W, M53Y, T59H, T59I, T59L, T59N, T59Q, T59V, T59Y, L61A, L61D, L61E, L61F, L61G, L61H, L61I, L61K, L61M, L61N, L61P, L61Q, L61R, L61S, L61T, L61V, L61W, L61Y, D63E, S64K, S64R, S64Y, K93D, K93E, K93F, K93H, K93N, K93Q, K93R, K93S, K93T, K93V, K93W, K93Y, E95D, E95H, E95L, E95Q, E95Y, M97D, M97F, M97I, M97N, M97V, Y98F, Y98W, Y102F, Y102W, Y103D, Y103E, Y103F, Y103H, Y103N, Y103Q, Y103W, L104F, L104H, L104M, L104V, L104Y, G105D, G105E, I106E, 및 I106Y. 일부의 구체예에서 특히 유용한 것은 A29H, T51N, M53Y, L61E, 및 K93Q로부터 선택된 하나 또는 그 초과와 치환을 갖는 CTLA4 변이체이

며, 여기에서 A29H/K93Q, A29H/M53Y, A29H/T51N, T51N/K93Q, T51N/M53Y, A29H/L61E/K93Q, A29H/M53Y/K93Q, A29H/M53Y/L61E, A29H/T51N/L61E, M53Y/L61E/K93Q, T51N/L61E/K93Q, T51N/M53Y/L61E, A29H/M53Y/L61E/K93Q, A29H/T51N/L61E/K93Q, A29H/T51N/M53Y/K93Q, A29H/T51N/M53Y/L61E, T51N/M53Y/L61E/K93Q, 및 A29H/T51N/M53Y/L61E/K93Q를 포함하는 것이 특히 유용한 조합이다.

[0037] 여기에서 모든 위치 및 치환의 리스트에 대해서, 개별적인 치환의 조합은 모든 가능한 조합으로 이루어질 수 있고, 어떤 개별적인 위치 또는 치환이라도 독립적으로 가능성의 리스트에 포함되거나 리스트로부터 제외될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 일반적으로, 야생형 또는 모 CTLA4 (또는 Fc 영역)와 비교하여, 본 발명의 변이체는 일반적으로 CTLA4 영역 내에 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산 치환을 갖지만, 일부의 경우에 바람직한 기능이 보존되는 한은 더 많은 치환이 사용될 수 있다. 마찬가지로, 이하에 기술되는 바와 같이 Fc 도메인도 역시 이러한 방식으로 치환을 가질 수 있다.

[0038] 다른 경우에도 기술된 바와 같이, CTLA4 변이체는 일반적으로 B7-1 및/또는 B7-2에 대한 증진된 결합과 같이 CTLA4 리간드 중의 하나 또는 그 초과에 대한 결합을 보존하거나 증진시킨다.

[0039] Fc 도메인

[0040] 본 발명의 이뮤노어드헤신의 Fc 부분은 항체의 Fc 영역 또는 Fc 영역의 일부의 부분으로 이루어진다. 항체는 특정 항원에 결합하는 면역글로불린이다. 인간 및 마우스를 포함한 대부분의 포유동물에서, 항체는 쌍을 이룬 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드로부터 구성된다. 경쇄 및 중쇄 가변영역은 항체들 사이에서 상당한 서열 다양성을 나타내며, 표적 항원에 결합하는데 책임이 있다. 각각의 쇠는 개별적인 면역글로불린 (Ig) 도메인으로 구성되며, 따라서 일반적 용어 면역글로불린이 이러한 단백질에 대해서 사용된다.

[0041] 전통적인 천연 항체 구조 유닛은 전형적으로 테트라머 (tetramer)로 구성된다. 각각의 테트라머는 전형적으로 폴리펩타이드 쇠의 2개의 동일한 쌍으로 구성되며, 각각의 쌍은 하나의 "경쇄" (전형적으로 약 25 kDa의 분자량을 갖는다) 및 하나의 "중쇄" (전형적으로 약 50-70 kDa의 분자량을 갖는다)를 갖는다. 인간 경쇄는 카파 (kappa) 및 람다 (lambda) 경쇄로 분류된다. 중쇄는 뮤 (mu), 델타 (delta), 감마 (gamma), 알파 (alpha), 또는 입실론 (epsilon)으로 분류되며, 항체의 이소타입을 각각 IgM, IgD, IgG, IgA, 및 IgE로 정의한다. IgG는 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4를 포함하는 몇개의 서브클래스 (subclass)를 갖지만, 이들로 제한되지는 않는다. IgM은 IgM1 및 IgM2를 포함하는 몇개의 서브클래스를 갖지만, 이들로 제한되지는 않는다. IgA는 IgA1 및 IgA2를 포함하는 몇개의 서브클래스를 갖지만, 이들로 제한되지는 않는다. 따라서, 본 명세서에서 사용된 것으로서 "이소타입"은 그들의 불변 영역의 화학적 및 항원적 특징에 의해서 정의된 면역글로불린의 모든 클래스 및 서브클래스를 의미한다. 공지된 인간 면역글로불린 이소타입은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD, 및 IgE이다. 이들 항체 클래스 사이의 식별되는 특징은 그들의 불변 영역이지만, 미세한 차이가 가변영역에 존재할 수도 있다.

[0042] 경쇄 및 중쇄 각각은 가변 및 불변 영역으로 불리는 2개의 상이한 영역으로 이루어진다. IgG 중쇄는 VH-CH1-CH2-CH3의 순서로 N-말단으로부터 C-말단으로 연결된, 각각 중쇄 가변도메인, 중쇄 불변도메인 1, 중쇄 불변도메인 2, 및 중쇄 불변도메인 3으로 불리는 4개의 면역글로불린 도메인으로 구성된다 (또한, 각각 중쇄 가변도메인, 불변 감마 1 도메인, 불변 감마 2 도메인, 및 불변 감마 3 도메인으로 불리는 VH-C γ 1-C γ 2-C γ 3로 불림). IgG 경쇄는 VL-CL의 순서로 N-말단으로부터 C-말단으로 연결된, 각각 경쇄 가변도메인 및 경쇄 불변도메인으로 불리는 2개의 면역글로불린 도메인으로 구성된다. 불변 영역은 보다 적은 서열 다양성을 나타내며, 다수의 천연 단백질에 결합하여 중요한 생화학 현상을 유발하는데 책임이 있다. 가변 및 불변 영역을 포함한 항체의 천연 생물학적 형태를 구성하는 구조는 여기에서 "전체 길이 항체"로 불린다. 인간 및 마우스를 포함하는 대부분의 포유동물에서, IgG 이소타입의 전체 길이 항체는 테트라머이며, 2개의 면역글로불린 쇠의 2개의 동일한 쌍으로 구성되며, 여기에서 각각의 쌍은 하나의 경쇄 및 하나의 중쇄를 갖고, 각각의 경쇄는 면역글로불린 도메인 VL 및 CL을 포함하고, 각각의 중쇄는 면역글로불린 도메인 VH, C γ 1, C γ 2, 및 C γ 3를 포함한다.

[0043] 가변영역, 전형적으로는 항체의 아미노-말단 부분은 분자의 항원 결합 결정인자 (determinants)를 함유하며, 따라서 그의 표적 항원에 대한 항체의 특이성을 결정한다. 가변영역은 동일한 클래스 내의 다른 항체로부터 서열 내에서 가장 상이하기 때문에, 이것은 이렇게 불린다.

[0044] 각각의 쇠의 카복시-말단 부분은 주로 효과기 기능에 책임이 있는 불변 영역을 정의한다. 면역글로불린의 IgG 서브클래스의 경우에는 중쇄 내에 중쇄 불변 (CH) 영역으로 불리는 몇개의 면역글로불린 도메인이 있다. IgG 항체와 관련하여, IgG 이소타입 각각은 3개의 CH 영역을 갖는다. 따라서, IgG와 관련하여 "CH" 도메인은 다음과

같다: "CH1"은 카바트 (Kabat)에서와 같이 EU 인덱스에 따르는 위치 118-220을 나타낸다. "CH2"는 카바트에서와 같이 EU 인덱스에 따르는 위치 237-340을 나타내고, "CH3"은 카바트에서와 같이 EU 인덱스에 따르는 위치 341-447을 나타낸다.

[0045] 중쇄의 또 다른 중요한 영역은 힌지 (hinge) 영역이다. 여기에서 "힌지" 또는 "힌지 영역" 또는 "항체 힌지 영역" 또는 "면역글로불린 힌지 영역"은 항체의 제1 및 제2 불변도메인 사이의 아미노산을 포함하는 유연성 폴리펩타이드를 의미한다. 구조적으로, IgG CH1 도메인은 EU 위치 220에서 끝나며, IgG CH2 도메인은 잔기 EU 위치 237에서 시작한다. 따라서, IgG의 경우에 항체 힌지는 여기에서 위치 221 (IgG1에서는 D221) 내지 236 (IgG1에서는 G236)을 포함하는 것으로 정의되며, 여기에서 넘버링은 카바트에서와 같이 EU 인덱스에 따른다. 일부의 구체예에서는, 예를 들어, Fc 영역과 관련하여 하부 힌지가 포함되며, 여기에서 "하부 힌지"는 일반적으로 위치 226 또는 230 내지 236을 나타낸다.

[0046] 본 발명에서 거론된 모든 불변 영역 위치에 관해서, 넘버링은 카바트에서와 같이 EU 인덱스에 따른다 [Kabat et al., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health; 온전히 참고로 포함된다]. 항체의 기술분야에서 숙련된 전문가, 이들 관례가 면역글로불린 패밀리에서 보존된 위치에 대한 표준화된 참조를 가능하게 하는, 면역글로불린 서열의 특정 영역에서의 비순차적 넘버링으로 구성된다는 것을 이해할 것이다. 따라서, EU 인덱스에 의해서 정의된 것으로서 어떤 소정의 면역글로불린의 위치는 그의 순차적 서열에 반드시 상응하지는 않을 것이다.

[0047] 본 발명의 이뮤노어드헤신은 항체의 Fc 영역과 CTLA4의 융합체인 단백질이다. 본 명세서에서 사용된 것으로서 용어 "Fc" 또는 "Fc 영역"은 제1 불변 영역 면역글로불린 도메인을 제외한 항체의 불변 영역 및 일부의 경우에, 힌지의 일부분을 포함하는 폴리펩타이드를 의미한다. 따라서, Fc는 IgA, IgD, 및 IgG의 마지막 2개의 불변 영역 면역글로불린 도메인 및 IgE 및 IgM의 마지막 3개의 불변 영역 면역글로불린 도메인, 및 이들 영역에 대한 유연성 힌지 N-말단을 나타낸다. IgA 및 IgM의 경우에, Fc는 J 쇄를 포함할 수 있다. IgG의 경우에, Fc는 면역글로불린 도메인 C γ 2 및 C γ 3 (C γ 2 및 C γ 3), 및 C γ 1 (C γ 1)와 C γ 2 사이의 하부 힌지 영역을 포함한다. Fc 영역의 경계는 달라질 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 잔기 230에서 C-말단까지를 포함하는 것으로 정의되며, 여기에서 넘버링은 EU 넘버링 형식을 기초로 한다. Fc는 분리시의 이 영역, 또는 Fc 폴리펩타이드와 관련한 이 영역을 나타낼 수 있다. 본 명세서에서 사용된 것으로서 "Fc 폴리펩타이드"는 Fc 영역의 전부 또는 일부분을 포함하는 폴리펩타이드를 의미한다. Fc 폴리펩타이드는 항체, Fc 융합체, 분리된 Fc's, 및 Fc 단편을 포함한다.

[0048] 항체의 Fc 영역은 다수의 Fc 수용체 및 리간드와 상호작용하여 효과기 기능으로 불리는 중요한 기능적 능력의 어레이를 부여한다. IgG Fc 영역의 경우에, Fc는 Ig 도메인 C γ 2 및 C γ 3 및 C γ 2로 유도하는 N-말단 힌지를 포함한다. IgG 클래스에 관한 Fc 수용체의 중요한 패밀리는 Fc 감마 수용체 (Fc γ Rs)이다. 이들 수용체는 항체와 면역 시스템의 세포 암 (cellular arm) 사이의 교통을 매개한다 [Raghavan et al., 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:181-220; Ravetch et al., 2001, *Annu Rev Immunol* 19:275-290; 둘 다 이에 의해서 온전히 참고로 포함된다]. 인간에게서 이 단백질 패밀리에 이소타입 Fc γ RIa, Fc γ RIb, 및 Fc γ RIc를 포함하는 Fc γ RI (CD64); 이소타입 Fc γ RIIa (알로타입 (allotypes) H131 및 R131을 포함), Fc γ RIIb (Fc γ RIIb-1 및 Fc γ RIIb-2를 포함), 및 Fc γ RIIc를 포함하는 Fc γ RII (CD32); 및 이소타입 Fc γ RIIIa (알로타입 V158 및 F158을 포함) 및 Fc γ RIIIb (알로타입 Fc γ RIIIb-NA1 및 Fc γ RIIIb-NA2)를 포함하는 Fc γ RIII (CD16) [Jefferis et al., 2002, *Immunol Lett* 82:57-65; 이에 의해서 온전히 참고로 포함된다]. 이들 수용체는 전형적으로 Fc에 대한 결합을 매개하는 세포의 도메인, 막 스패닝 (spanning) 영역, 및 세포 내의 일부의 시그널링 현상을 매개할 수 있는 세포 내 도메인을 갖는다. 이들 수용체는 단핵구, 대식세포, 호중구, 수상돌기세포, 호산구, 비만세포, 혈소판, B 세포, 대과립성 림프구, 랑게르한스 (Langerhans') 세포, 천연 살해 (NK) 세포, 및 $\gamma\delta$ T 세포를 포함한 다양한 면역 세포 내에서 발현된다. Fc/Fc γ R 복합체의 형성은 이들 효과기 세포를 결합된 항원의 부위로 동원하여 전형적으로는 세포 내에서의 시그널링 현상, 및 염증 매개체의 방출, B 세포 활성화, 세포내이입 (endocytosis), 식작용 및 세포독성 공격과 같은 중요한 후속 면역반응을 야기한다. 세포독성 및 식작용 효과기 기능을 매개하는 능력은 항체가 표적화된 세포를 파괴하는 잠재적인 기전이다. Fc γ Rs를 발현하는 비특이적 세포독성 세포가 표적 세포 상의 결합된 항체를 인식하고, 이어서 표적 세포의 용해를 야기하는 세포 매개된 반응은 항체 의존성 세포 매개된 세포독성 (ADCC)이라 불린다 [Raghavan et al., 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:181-220; Ghetie et al., 2000, *Annu Rev Immunol* 18:739-766; Ravetch et al., 2001, *Annu Rev Immunol* 19:275-290; 둘 다 이에 의해서 온전히 참고로 포함된다]. Fc γ Rs를 발현하는 비특이적 세포독성 세포가 표적 세포 상의 결합된 항체를 인식하고, 이어서 표적 세포의 식작용을 야기하는 세포 매개된 반응은 항체 의존성 세

포 매개된 식작용 (ADCP)이라 불린다.

- [0049] 상이한 IgG 서브클래스는 Fc γ Rs에 대해서 상이한 친화성을 갖는데, IgG1 및 IgG3은 전형적으로 IgG2 및 IgG4보다 실질적으로 더 잘 수용체에 결합한다 [Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65; 이에 의해서 온전히 참고로 포함된다]. Fc γ Rs는 다양한 친화성을 갖고 IgG Fc 영역에 결합한다. Fc γ RIIIa 및 Fc γ RIIIb의 세포의 도메인은 96% 동일하지만, Fc γ RIIIb는 세포내 시그널링 도메인을 갖지 않는다. 또한, Fc γ RI, Fc γ RIIa/c, 및 Fc γ RIIIa는 면역수용체 티로신-기본 활성화 모티프 (ITAM)를 갖는 세포내 용액을 갖는 것을 특징으로 하는 면역 복합체 유발된 활성화의 양성 조절인자인 반면에, Fc γ RIIb는 면역수용체 티로신-기본 억제 모티프 (ITIM)를 가지며, 따라서 억제성이다. 따라서, 전자는 활성화 수용체로 불리고, Fc γ RIIb는 억제성 수용체로 불린다. 친화성 및 활성화에 있어서의 이들 차이에도 불구하고, 모든 Fc γ Rs는 C γ 2 및 선행하는 힌지의 N-말단에서 Fc 상의 동일한 영역에 결합한다.
- [0050] Fc 상의 중복되지만 별개인 부위는 보체 단백질 C1q에 대한 계면으로 작용한다. Fc/Fc γ R 결합이 ADCC를 매개하는 것과 동일한 방식으로, Fc/C1q 결합은 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 매개한다. C γ 2와 C γ 3 도메인 사이의 Fc 상의 위치는 그의 결합이 세포내이입된 항체를 엔도솜 (endosome)으로부터 다시 혈류로 재순환시키는 신생아 수용체 FcRn와의 상호작용을 매개한다 [Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181 -220; Ghetie et al., 2000, Annu Rev Immunol 18:739-766; 둘 다 이에 의해 온전히 참고로 포함된다]. 전체 길이 분자의 큰 크기로 인한 신장 여과의 방해와 결부된 이 과정은 1 내지 3주 범위의 유리한 항체 혈청 반감기를 제공한다. Fc의 FcRn에 대한 결합은 또한, 항체 수송에 주요 역할을 한다. Fc 상의 FcRn에 대한 결합 부위는 또한, 박테리아 단백질 A 및 G가 결합하는 위치이다. 이들 단백질에 의한 단단한 결합은 전형적으로, 단백질 정제 중에 단백질 A 또는 단백질 G 친화성 크로마토그래피를 사용함으로써 항체를 정제하는 수단으로 이용된다. 이들 영역 보체 및 FcRn/단백질 A 결합 영역의 적합도 (fidelity)는 항체의 임상적 특성 및 그들의 발생 둘 다에 중요하다.
- [0051] Fc 영역의 주요 특징은 N297에서 나타나는 보존된 N-연결 글리코실화이다. 이 탄수화물, 또는 이것이 때때로 불리는 올리고사카라이드는 항체에 대해서 중요한 구조적 및 기능적 역할을 하고, 항체가 반드시 포유동물 발현 시스템을 사용하여 생산되어야 하는 주된 이유들 중의 하나이다. Fc γ R 및 C1q에 대한 효율적인 Fc 결합은 이 변형을 필요로 하며, N297 탄수화물의 조성 또는 그의 제거효과에 있어서의 변화는 이들 단백질에 대한 결합에 영향을 미친다.
- [0052] 본 명세서에 기술된 구체예의 면역글로불린은 실질적으로 항체 클래스 중의 어떤 것이라도 속하는 면역글로불린 유전자에 의해서 코드화될 수 있다. 특징의 구체예에서, 본 발명에 기술된 면역글로불린은 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4를 포함하는 항체의 IgG 클래스에 속하는 서열을 포함한다. 대체 구체예에서, 본 발명에 기술된 면역글로불린은 항체의 IgA (서브클래스 IgA1 및 IgA2를 포함), IgD, IgE, IgG, 또는 IgM 클래스에 속하는 서열을 포함한다. 본 발명에 기술된 면역글로불린은 하나 이상의 단백질 쇄를 포함할 수 있으며, 예를 들어, 호모- 또는 헤테로-올리고머를 포함하는 모노머 또는 올리고머인 항체 또는 Fc 융합체일 수 있다.
- [0053] 본 발명에 기술된 면역글로불린은 실질적으로 모든 유기체, 예를 들어, 포유동물 (인간, 설치류 (마우스 및 랫트를 포함하나, 이들로 제한되지 않음), 토끼목 (토끼 및 헤어 (hares)를 포함하나, 이들로 제한되지 않음), 낙타과 (카멜 (camels), 리마 (llamas), 및 단봉낙타 (dromedaries)를 포함하나, 이들로 제한되지 않음), 및 프로시미안 (Prosimians), 플라티리니 (Platyrrhini) (New World monkeys), 세로코피테코이데아 (Cercopithecoidea) (Old World monkeys), 및 호미노이데아 (Hominoidea) (지본 (Gibbons) 및 레서 (Lesser) 및 그레이트 아페스 (Great Apes)를 포함)를 포함하나 이들로 제한되지 않는 비-인간 영장류를 포함하나, 이들로 제한되지 않음)로부터의 유전자에 의해서 코드화된다. 가장 바람직한 구체예에서, 본 발명에 기술된 면역글로불린은 실질적으로 인간의 것일 수 있다.
- [0054] 본 기술분야에서 잘 알려진 바와 같이, 면역글로불린 다형현상이 인간 집단에 존재한다. Gm 다형현상은 인간 IgG1, IgG2 및 IgG3 분자의 마커에 대한 G1m, G2m, 및 G3m 알로타입으로 불리는 알로타입 항원 결정인자를 코드화한 대립인자를 갖는IGHG1, IGHG2 및 IGHG3 유전자에 의해서 결정된다 (어떤 Gm 알로타입도 감마 4 쇄 상에서 발견되지 않는다). 마커는 '알로타입' 및 '이소알로타입'으로 분류될 수 있다. 이들은 이소타입들 사이의 강력한 서열 상동성에 따른 상이한 혈청학적 염기상에서 구별된다. 알로타입은 Ig 유전자의 대립인자 형태에 의해서 특정화된 항원 결정인자이다. 알로타입은 상이한 개체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노산 서열에서 약간의 차이를 나타낸다. 단일 아미노산 차이조차도 알로타입 결정인자를 발생시킬 수 있지만, 대부분의 경우에는 몇개의 아미노산 치환이 나타난다. 알로타입은 서브클래스의 대립인자들 사이의 서열 차이이며, 이에 의해서 항혈청은 단지 대립인자 차이만을 인식한다. 이소알로타입은 하나 또는 그 초과와 다른 이소타입의 비-다형성 상동성 영역과

공유되는 에피토프를 생산하는 하나의 이소타입 내의 대립인자이며, 이러한 이유로 항혈청은 상응하는 알로타입 및 상응하는 상동성 이소타입 둘 다와 반응할 것이다 [Clark, 1997, IgG effector mechanisms, Chem Immunol. 65:88-110; Gorman & Clark, 1990, Semin Immunol 2(6):457-66; 둘 다 이에 의해서 온전히 참고로 포함된다].

[0055] 인간 면역글로불린의 대립인자 형태는 잘 특정화되어 있다 [WHO Review of the notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins. J Immunogen 1976, 3:357-362; WHO Review of the notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins. 1976, Eur. J. Immunol. 6, 599-601; Loghem E van, 1986, Allotypic markers, Monogr Allergy 19:40-51; 이들은 모두 이에 의해서 온전히 참고로 포함된다]. 추가로, 그 밖의 다른 다형현상도 특정화되었다 [Kim et al., 2001, J. Mol. Evol. 54:1-9; 이에 의해서 온전히 참고로 포함된다]. 현재, 18 Gm 알로타입이 공지되어 있다: G1m (1, 2, 3, 17) 또는 G1m (a, x, f, z), G2m (23) 또는 G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) 또는 G3m (b1, c3, b5, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) [Lefranc, et al., The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation. Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. et al., 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211; 둘 다 이에 의해서 온전히 참고로 포함된다]. 고정화된 조합에서 유전되는 알로타입은 Gm 할로타입 (haplotypes)으로 불린다. 본 발명에 기술된 면역글로불린은 실질적으로 어떤 면역글로불린 유전자의 어떤 알로타입, 이소알로타입 또는 할로타입에 의해서라도 코드화될 수 있다.

[0056] CTLA4 단백질은 링커를 통해서 Fc 영역에 연결될 수 있다. 용어 "링커"는 펩타이드 결합에 의해서 접합된 2 개 또는 그 초과인 아미노산 잔기를 포함하는 폴리펩타이드를 나타내기 위해서 사용되며, 하나 또는 그 초과인 항원 결합 부분을 연결하기 위해서 사용된다. 이러한 링커 폴리펩타이드는 본 기술분야에서 잘 알려져 있다 [참조: 예를 들어, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123]. 다양한 링커가 본 명세서에 기술된 일부의 구체예에서 Fc 영역을 융합 파트너에 공유적으로 연결시키기 위한 용도를 가질 수 있다. 본 명세서에서 "링커"는 또한 "링커 서열", "스페이서 (spacer)", "테터링 (tethering) 서열" 또는 이들의 문법적 동의어로 불린다. 호모- 또는 헤테로-이기능성 링커는 잘 알려져 있다 [참조: 1994 Pierce Chemical Company catalog, technical section on cross-linkers, pages 155-200; 온전히 참고로 포함됨]. 다수의 전략이 분자들을 함께 공유적으로 연결시키기 위해서 사용될 수 있다. 이들에는 단백질 또는 단백질 도메인의 N- 및 C-말단 사이의 폴리펩타이드 연결, 디설파이드 결합을 통한 연결, 및 화학적 교차결합 시약을 통한 연결이 포함되나, 이들로 제한되지 않는다. 이 구체예의 일 측면에서, 링커는 재조합 기술 또는 펩타이드 합성에 의해서 생성된 펩타이드 결합이다. 링커 펩타이드는 주로 다음의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다: Gly, Ser, Ala, 또는 Thr. 링커 펩타이드는 이들이 바람직한 활성을 보유하도록 서로에 관하여 정배좌를 취하도록 하는 방식으로 2개의 분자를 연결하는데 적절한 길이를 가져야 한다. 일 구체예에서, 링커는 길이가 약 1 내지 50개의 아미노산, 바람직하게는 길이가 약 1 내지 30개의 아미노산이다. 일 구체예에서, 길이가 1 내지 20개의 아미노산인 링커가 사용될 수 있다. 유용한 링커에는 예를 들어, (GS)_n, (GSGGS)_n [SEQ ID NO: 39], (GGGGS)_n [SEQ ID NO: 40], 및 (GGGS)_n [SEQ ID NO: 41]을 포함한 글리신-세린 폴리머 (여기에서 n은 적어도 1의 정수이다), 글리신-알라닌 폴리머, 알라닌-세린 폴리머, 및 그 밖의 다른 유연성 링커가 포함된다. 대신으로, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로필렌 글리콜의 코폴리머를 비제한적으로 포함한 다양한 비단백질성 폴리머가 링커로서의 용도를 가질 수 있다.

[0057] 본 발명의 바람직한 링커는 항체 힌지 영역으로부터의 서열을 포함한다. 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 및/또는 IgG4로부터의 힌지 서열을 포함한 어떤 항체 이소타입으로부터의 힌지 영역 서열이라도 사용될 수 있다. 링커 서열은 또한, CL/CH1 도메인의 모든 잔기가 아닌 CL/CH1 도메인의 어떤 길이의 어떤 서열이라도, 예를 들어, CL/CH1 도메인의 첫 번째 5-12 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 링커는 예를 들어, C_γ1, C_γ2, C_γ3, C_γ4, C_α1, C_α2, C_δ, C_ε, 및 C_μ을 포함한 어떤 이소타입의 면역글로불린 중쇄로부터라도 유도될 수 있다. 링커는 면역글로불린 중쇄, 예를 들어, C_κ 또는 C_λ로부터 유도될 수 있다. 링커 서열은 또한, Ig 유사 단백질 (예를 들어, TCR, FcR, KIR), 힌지 영역-유래 서열, 및 다른 단백질로부터의 다른 천연 서열과 같은 다른 단백질로부터 유도될 수도 있다.

[0058] **CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신 내의 아미노산 변형**

[0059] 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 변이체 CTLA4, 변이체 Fc 영역, 또는 변이체 CTLA4 및 변이체 Fc 영역 둘 다를 포함할 수 있다. 변이체는 모 CTLA4-Ig 단백질에 관해 하나 또는 그 초과인 아미노산 변형을 포함하며, 여기에서 아미노산 변형(들)은 하나 또는 그 초과인 최적화된 특성을 제공한다. 여기에서, "변형"은 단백질, 폴리펩타이드, 항체, 또는 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 물리적, 화학적 또는 서열 특성에 있어서의 변화를

의미한다. 본 명세서에서 사용된 것으로서 "아미노산" 및 "아미노산 동일성"은 특정의 정의된 위치에 존재할 수 있는 20개의 천연적으로 존재하는 아미노산 또는 모든 비-천연적 유사체 중의 하나를 의미한다. 따라서, 본 명세서에서 사용된 것으로서 "아미노산"은 천연적으로 존재하는 아미노산 및 합성 아미노산 둘 다를 의미한다. 예를 들어, 호모페닐알라닌, 시트룰린 및 노르류신 (noreleucine)이 본 발명의 목적에 따라 고려되는 아미노산이다. "아미노산"은 또한, 프롤린 및 하이드록시프롤린과 같은 이미노산 잔기를 포함한다. 측쇄는 (R) 또는 (S) 배열로 존재할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 아미노산은 (S) 또는 L배열이다. 비-천연적으로 존재하는 측쇄가 사용되는 경우에는, 예를 들어, 생체내 분해를 방지하거나 지연시키기 위해서 비-아미노산 치환체가 사용될 수 있다. 아미노산 변형은 폴리펩타이드 서열 내에서의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실일 수 있다. 여기에서 "아미노산 치환" 또는 "치환"은 모 폴리펩타이드 서열 내의 특별한 위치에서 아미노산을 또 다른 아미노산으로 대체하는 것을 의미한다. 본 명세서에서 사용된 것으로서 "아미노산 삽입" 또는 "삽입"은 모 폴리펩타이드 서열 내의 특별한 위치에서 아미노산의 부가를 의미한다. 본 명세서에서 사용된 것으로서 "아미노산 결실" 또는 "결실"은 모 폴리펩타이드 서열 내의 특별한 위치에서 아미노산의 제거를 의미한다.

[0060] 본 발명에 기술된 변이체는 적어도 하나의 아미노산 변형에 의하여 아미노산 서열이 그의 모 물질과 상이하다. 본 명세서에서 사용된 것으로서 "모 폴리펩타이드", "모 단백질", "전구체 폴리펩타이드", 또는 "전구체 단백질"은 후에 변형되어 변이체를 생성시키는 비변형 폴리펩타이드를 의미한다. 상기의 모 폴리펩타이드는 천연적으로 존재하는 폴리펩타이드, 즉 WT 또는 천연 단백질, 또는 천연적으로 존재하는 폴리펩타이드의 변이체 또는 조작된 (engineered) 버전일 수 있다. 모 폴리펩타이드는 폴리펩타이드 그 자체, 모 폴리펩타이드를 포함하는 조성물, 또는 그것을 코드화한 아미노산 서열을 나타낼 수 있다. 여기에서 "야생형", "WT", 또는 "천연"은 대립인자 변형체를 포함하는, 자연에서 발견되는 아미노산 서열 또는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 예를 들어, WT CTLA4 또는 WT Fc 영역 단백질을 포함한 WT 단백질은 고의적으로 변형되지 않은 아미노산 서열 또는 뉴클레오타이드 서열을 갖는다. 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 모 물질과 비교하여 하나 이상의 아미노산 변형, 예를 들어, 모 물질과 비교하여 약 1 내지 50개의 아미노산 변형, 예를 들어, 약 1 내지 10개의 아미노산 변형, 약 1 내지 약 5개의 아미노산 변형 등을 가질 수 있다. 따라서, 변이체의 서열 및 모 폴리펩타이드의 서열은 실질적으로 상응한다. 예를 들어, 여기에서 변이체 서열은 모 서열과 약 80% 상동성, 예를 들어, 적어도 약 90% 상동성, 적어도 약 95% 상동성, 적어도 약 98% 상동성, 적어도 약 99% 상동성 등을 가질 것이다. 본 발명에 기술된 변형은 또한 당형태 (glycoform) 변형을 포함한다. 변형은 분자 생물학을 사용하여 유전적으로 만들어질 수 있거나, 효소적으로 또는 화학적으로 만들어질 수 있다.

[0061] 본 발명에 기술된 변이체는 이들을 구성하는 아미노산 변형에 따라 정의된다. 따라서, 예를 들어, CTLA4에서 치환 T51N은 위치 51에서 트레오닌이 아스파라긴으로 대체된 CTLA4 변이체를 나타낸다. 또 다른 예로서, Fc 영역에서의 치환 N434S는 위치 434에서 아스파라긴이 세린으로 대체된 Fc 변이체를 나타낸다. 마찬가지로, M428L/N434S는 모 Fc 폴리펩타이드에 비해서 치환 M428L 및 N434S를 갖는 Fc 변이체를 정의한다. WT 아미노산의 동일성은 불특정화될 수 있으며, 이 경우에 전술한 변이체는 428L/434S로 불린다. 치환이 제공되는 순서는 임의적인 것으로 언급되며, 즉 예를 들어, 428L/434S는 434S/428L과 동일한 Fc 변이체이다. CTLA4 내에서의 변형의 경우에, 여기에서 위치의 넘버링은 SEQ ID NO: 6에서 제공된 CTLA4의 세포외 영역의 순차적 넘버링에 따른다. 여기에서 거론된 항체 불변 영역 및 Fc 영역 위치는 EU 인덱스 또는 EU 넘버링 형식에 따라 넘버링된다 [Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda; 이에 의해 온전히 참고로 포함됨]. EU 인덱스 또는 카바트 또는 EU 넘버링 형식에서와 같은 EU 인덱스는 EU 항체의 넘버링을 나타낸다 [Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85; 이에 의해 온전히 참고로 포함됨].

[0062] 본 발명에서 변이체의 목적은 전형적으로 표적 리간드 또는 Fc 수용체에 대한 친화성을 변화시킴으로써 하나 또는 그 초과와 최적화된 특성을 제공하는 것이다. 친화성은 모 단백질에 비해서 증진되거나 감소될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 것으로서, 모 폴리펩타이드보다 "더 큰 친화성" 또는 "개선된 친화성" 또는 "증진된 친화성" 또는 "더 나은 친화성"은 변이체가 동일한 조건 하에서, 예를 들어, 결합시험에서 변이체 및 모 폴리펩타이드의 양이 본질적으로 동일한 경우에 처리된 모 폴리펩타이드보다 실질적으로 더 큰 회합의 평형상수 (KA 또는 Ka) 또는 더 작은 해리의 평형상수 (KD 또는 Kd)를 갖고 리간드 또는 수용체에 결합하는 것을 의미한다.

[0063] 예를 들어, 개선된 B7-2 결합 친화성을 갖는 CTLA4 변이체는 모 CTLA4 폴리펩타이드와 비교하여 B7-2 결합 친화성의 약 1.2, 1.5, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 배 또는 그 초과를 개선할 수 있으며, 여기에서 B7-2 결합 친화성은 예를 들어, 본 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해, 비아코어 (Biacore™)를 포함한 (단, 이것으로 제한되지 않는다) 본 명세서에 기술된 결합방법에

의해서 결정된다.

- [0064] 따라서, 본 명세서에서 사용된 것으로서 모 폴리펩타이드에 비해서 "감소된 친화성"은 변이체가 모 폴리펩타이드보다 상당히 더 작은 KA 또는 더 큰 KD를 갖고 리간드 또는 수용체에 결합하는 것을 의미한다. 더 크거나 감소된 친화성은 또한, 친화성의 절대 레벨에 관해서 정의될 수 있다.
- [0065] 여기에서 이뮤노어드헤신은 바람직하게는, 변이체 CTLA4를 포함한다. CTLA4 변이체는 B7-1, B7-2, 또는 B7-1 및 B7-2 둘 다에 대한 결합을 개선시킬 수 있다. CTLA4 변이체는 B7-1에 비해 B7-2에 대한 선택적인 결합을 개선시킬 수 있다. 즉, 변이체는 B7-2에 대한 CTLA4의 친화성을 증진시키지만, B7-1에 대한 친화성을 감소시키거나, B7-1에 대한 친화성에 영향을 미치지 않거나, B7-2에 대한 친화성 개선보다 덜 B7-1에 대한 친화성을 개선시킬 수 있다. 대신으로, 변이체는 B7-2에 비해 B7-1에 대한 선택적인 결합을 개선시킬 수 있다.
- [0066] 여기에서 이뮤노어드헤신은 바람직하게는 Fc 변이체를 포함한다. 본 발명에 기술된 Fc 변이체는 Fc 수용체 또는 Fc 리간드에 대한 개선되거나 감소된 결합에 관해 최적화될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 것으로서 "Fc 수용체" 또는 "Fc 리간드"는 항체의 Fc 영역에 결합하여 Fc-리간드 콤플렉스를 형성하는 모든 유기체로부터의 분자, 바람직하게는 폴리펩타이드를 의미한다. Fc 리간드에는 Fc γ Rs, Fc γ Rs, Fc γ Rs, FcRn, C1q, C3, 만난 결합 렉틴, 만노즈 수용체, 스타필로코커스 단백질 A, 스트렙토코커스 단백질 G, 및 바이러스 Fc γ R이 포함된, 이들로 제한되지는 않는다. Fc 리간드는 또한, Fc γ Rs에 대해서 상동성인 Fc 수용체의 패밀리인 Fc 수용체 동족체 (FcRH)를 포함한다. Fc 리간드는 Fc에 결합하는 미발견된 분자를 포함할 수 있다.
- [0067] 바람직한 구체예에서, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 FcRn 결합을 개선시킨 Fc 변이체를 포함한다. 이러한 변이체는 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 생체내 약력학적 특성을 증진시킬 수 있다. FcRn에 대한 결합을 증가시키고/시키거나 약력학적 특성을 개선시킨 바람직한 변이체는 예를 들어, 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434H, 434F, 434Y, 및 434M을 포함하는 (단, 이들로 제한되지 않는다) 것으로서 위치 259, 308, 428, 및 434에서 치환을 포함한다 (단, 이들로 제한되지 않는다) [USSN 12/341,769, 2008년 12월 22일에 출원, 발명의 명칭: "Fc Variants with Altered Binding to FcRn"; 온전히 참고로 포함됨]. FcRn에 대한 Fc 결합을 증가시킨 그 밖의 다른 변이체에는 다음의 변이체가 포함되나 이들로 제한되지 않는다: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L [Hinton et al., 2004, J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216, Hinton et al., 2006 Journal of Immunology 176:346-356], 256A, 272A, 286A, 305A, 307A, 307Q, 311A, 312A, 376A, 378Q, 380A, 382A, 434A [Shields et al., Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(9):6591-6604; 온전히 참고로 포함됨], 252F, 252T, 252Y, 252W, 254T, 256S, 256R, 256Q, 256E, 256D, 256T, 309P, 311S, 433R, 433S, 433I, 433P, 433Q, 434H, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H, 308T/309P/311S [Dall'Acqua et al., Journal of Immunology, 2002, 169:5171-5180, Dall'Acqua et al., 2006, Journal of Biological Chemistry 281:23514-23524; 온전히 참고로 포함됨]. FcRn 결합을 변조시키기 위한 그 밖의 다른 변형은 문헌 [Yeung et al., 2010, J Immunol, 182:7663-7671]에 기술되어 있다.
- [0068] 본 발명에서 사용하기 위한 그 밖의 다른 Fc 변형에는 Fc γ Rs 및/또는 보체 단백질에 대한 결합을 감소시키거나 제거함으로써 ADCC, ADCP, 및 CDC와 같은 Fc 매개된 효과기 기능을 감소시키거나 제거한 변이체가 포함된다. 이러한 변이체는 또한 본 명세서에서 "녹아웃 (knockout) 변이체" 또는 "KO 변이체"로 불린다. Fc γ Rs 및 보체에 대한 결합을 감소시킨 변이체는 Fc 영역에 의해서 매개된 원치 않는 상호작용을 감소시키고, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 선택성을 조정하는데 유용하다. 바람직한 녹아웃 변이체는 US 2008-0242845 A1 (2008년 10월 2일에 공개, 발명의 명칭: "Fc Variants with Optimized Properties, 본 명세서에 명백하게 참고로 포함됨)에 기술되어 있다. 바람직한 변형에는 위치 234, 235, 236, 237, 267, 269, 325, 및 328에서의 치환, 삽입 및 결실이 포함되나 이들로 제한되지 않으며, 여기에서 넘버링은 EU 인덱스에 따른다. 바람직한 치환은 234G, 235G, 236R, 237K, 267R, 269R, 325L, 및 328R을 포함하나 이들로 제한되지 않으며, 여기에서 넘버링은 EU 인덱스에 따른다. 바람직한 변이체는 236R/328R을 포함한다. 변이체는 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 및/또는 IgG4를 비제한적으로 포함한 어떤 IgG 이소타입 또는 IgG 이소타입 Fc 영역과 관련하여서라도 사용될 수 있다. Fc γ R 및 보체 결합을 감소시키고, Fc 매개된 효과기 기능을 감소시키기 위한 바람직한 IgG Fc 영역은 IgG2 및 IgG4 Fc 영역이다. 하이브리드 이소타입, 예를 들어, USSN 11/256,060에 기술된 것과 같은 하이브리드 IgG1/IgG2 이소타입이 또한 유용할 수도 있다. Fc γ R 및 보체 상호작용을 감소시키기 위한 그 밖의 다른 변형에는 치환 297A, 234A, 235A, 237A, 318A, 228P, 236E, 268Q, 309L, 330S, 331S, 220S, 226S, 229S, 238S, 233P, 및 234V뿐만 아니라 돌연변이 또는 효소 수단에 의한, 또는 단백질을 글리코실화하지 않는 박테리아와 같은 유기체 내에서의 생산에 의한 위치 297에서의 글리코실화의 제거가 포함되나, 이들로 제한되지 않는다. 이들 및 그 밖의 다른 변형은 온전히 참고로 포함되어 있는 문헌 [Strohl, 2009, Current Opinion in Biotechnology 20:685-691]에서

검토되었다.

[0069] Fc γ Rs 및/또는 보체에 대한 결합을 개선시킨 Fc 변형이 또한, 본 발명의 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신에서 사용될 수 있다. 이러한 Fc 변이체는 ADCC, ADPC, 및/또는 CDC와 같은 Fc 매개된 효과기 기능을 증진시킬 수 있다. Fc γ R 및 보체 결합을 개선시키기 위한 바람직한 변형은 본 발명에 명백히 참고로 포함된 US 2006-0024298 A1 (2006년 2월 2일에 공개) 및 US 2006-0235208 A1 (2006년 10월 19일에 공개)에 기술되어 있다. 바람직한 변형은 236, 239, 268, 324, 및 332로 구성된 그룹으로부터 선택된 위치에서의 치환을 포함하며, 여기에서 넘버링은 EU 인덱스에 따른다. 바람직한 치환에는 236A, 239D, 239E, 268D, 267E, 268E, 268F, 324T, 332D, 및 332E가 포함되나, 이들로 제한되지 않는다. 바람직한 변이체에는 239D/332E, 236A/332E, 236A/239D/332E, 268F/324T, 267E/268F, 267E/324T, 및 267E/268F/324T가 포함되나, 이들로 제한되지 않는다. Fc γ R 및 보체 상호작용을 증진시키기 위한 그 밖의 다른 변형에는 치환 298A, 333A, 334A, 326A, 247I, 339D, 339Q, 280H, 290S, 298D, 298V, 243L, 292P, 300L, 396L, 305I, 및 396L이 포함되나, 이들로 제한되지 않는다. 이들 및 그 밖의 다른 변형은 문헌 [Strohl, 2009, *ibid*]에서 검토되었다.

[0070] 일 구현예에서, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 억제성 수용체 Fc γ RIIb에 대한 친화성을 증진시킨 Fc 변이체를 포함할 수 있다. 이러한 변이체는 본 발명에서 예를 들어, B 세포 및 단핵구를 포함하는 Fc γ R IIb⁺ 세포와 관련된 면역조절 활성을 갖는 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 제공할 수 있다. 일 구현예에서, 상기의 Fc 변이체는 하나 또는 그 초과와 활성화 수용체에 비해 Fc γ RIIb에 대해서 선택적으로 증진된 친화성을 제공한다. Fc γ RIIb에 대한 결합을 변화시키기 위한 변형은 본 발명에 명백히 참고로 포함된 USSN 12/156,183 (2008년 5월 30일에 출원, 발명의 명칭: "Methods and Compositions for Inhibiting CD32b Expressing Cells")에 기술되어 있다. 특히, Fc γ RIIb에 대한 결합을 개선시킨 Fc 변이체는 EU 인덱스에 따라 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328, 및 332로 구성된 그룹으로부터 선택된 위치에서의 하나 또는 그 초과와 변형을 포함할 수 있다. Fc γ RIIb 친화성을 증진시키기 위한 바람직한 치환에는 234D, 234E, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y, 및 332E가 포함되나 이들로 제한되지 않는다. 더욱 바람직하게는, 치환에는 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W, 및 328Y가 포함되나 이들로 제한되지 않는다. Fc γ RIIb에 대한 결합을 증진시키기 위한 바람직한 Fc 변이체에는 235Y/267E, 236D/267E, 239D/268D, 239D/267E, 267E/268D, 267E/268E, 및 267E/328F가 포함되나 이들로 제한되지 않는다.

[0071] 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 및/또는 IgG4를 비제한적으로 포함한 어떤 IgG 이소타입 또는 IgG 이소타입 Fc 영역과 관련하여서라도 Fc 변형을 포함할 수 있다. IgG 이소타입은 예를 들어, Fc γ R- 및/또는 보체 매개된 효과기 기능(들)을 변화시키도록 선택될 수 있다. 하이브리드 IgG 이소타입이 또한 유용할 수도 있다. 예를 들어, USSN 11/256,060은 특별한 발명에서 사용될 수 있는 다수의 하이브리드 IgG1/IgG2 불변 영역을 기술하고 있다. 본 발명의 일부의 구체예에서, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 이소타입 변형, 즉 모 IgG에서 대체 IgG 내의 아미노산 타입으로의 변형을 위한 수단을 포함할 수 있다. 예를 들어, IgG1/IgG3 하이브리드 변이체는 CH2 및/또는 CH3 영역 내의 IgG1 위치를 2개의 이소타입이 상이한 위치에서 IgG3으로부터의 아미노산으로 치환시키기 위한 치환수단에 의해서 구성될 수 있다. 따라서, 하나 또는 그 초과와 치환수단, 예를 들어, 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R, 및 436F를 포함하는 하이브리드 변이체 IgG 항체가 구성될 수 있다. 본 발명의 다른 구체예에서, IgG1/IgG2 하이브리드 변이체는 CH2 및/또는 CH3 영역 내의 IgG2 위치를 2개의 이소타입이 상이한 위치에서 IgG1로부터의 아미노산으로 치환시키기 위한 치환수단에 의해서 구성될 수 있다. 따라서, 하나 또는 그 초과와 치환수단, 예를 들어, 아미노산 치환 233E, 234L, 235L, -236G (위치 236에서 글리신의 삽입을 나타냄), 및 327A 중의 하나 또는 그 초과를 포함하는 하이브리드 변이체 IgG 항체가 구성될 수 있다.

[0072] 본 기술분야에서의 전문가에 의해 인식될 수 있는 바와 같이, Fc 영역에서의 개별적 및 조합 변이체의 설명은 본 발명에 기술된 CTLA4 변이체 중의 어떤 것이라도 독립적으로 및 임의로 조합될 수 있다. 즉, 본 발명에 기술된 바와 같이, CTLA4 변이체는 기술된 변이체의 세트 내에서 어떤 조합으로나 개별적으로 및 임의로 선택되고/되거나 조합된다. 마찬가지로, 적합한 Fc 도메인 변이체의 상기 리스트는 Fc 영역 내에서만 아니라 어떤 CTLA4 변이체와도 어떤 방식으로든 개별적으로 및 임의로 조합될 수 있다. 즉, 다수의 변이체, 예를 들어, A29H/T51N/L61E/K93Q를 포함하는 CTLA4 변이체가 선택될 수 있으며, 이들 변이체는 239D/332E, 및/또는 428L/434S와 같은 Fc 도메인 변이체와 조합될 수 있다. 따라서, 가능한 개별 변이체의 "리스트"의 설명은 리스트 내의 모든 가능한 조합뿐만 아니라 동일 또는 그 밖의 다른 목적의 변이체의 다른 리스트를 포함하는 것을

의미한다.

[0073] **당형태 변형**

[0074] 항체 Fc 영역은 중쇄의 불변 영역 내의 보존된 위치에서 탄수화물을 함유한다. 각각의 항체 이소타입은 상이한 종류의 N-연결된 탄수화물 구조를 갖는다. 중쇄에 부착된 탄수화물과는 별도로, 인간 IgG의 30%까지는 글리코실화된 Fab 영역을 갖는다. IgG는 CH2 도메인의 Asn297에서 단일 N-연결된 비안테나리 (biantennary) 탄수화물을 갖는다. 혈청으로부터의, 또는 하이브리도마 또는 조작된 세포에서 생체의 생산된 IgG의 경우에, IgG는 Asn297 연결된 탄수화물에 관하여 이종이다. 인간 IgG의 경우에, 코어 (core) 올리고사카라이드는 통상적으로, 상이한 수의 외부 잔기와 함께 GlcNAc2Man3GlcNAc로 구성된다.

[0075] 본 발명에 기술된 이뮤노어드헤신의 탄수화물 부분은 올리고사카라이드의 설명을 위해서 통상적으로 사용되는 명명법을 참고로 하여 기술될 것이다. 이러한 명명법을 사용하는 탄수화물 화학의 검토는 문헌 [Hubbard et al., 1981, Ann. Rev. Biochem. 50:555-583]에서 이루어졌다. 이 명명법은 예를 들어, 예를 들어, 만노즈를 나타내는 Man; 2-N-아세틸글루코사민을 나타내는 GlcNAc; 갈락토스를 나타내는 Gal; 푸코즈에 대한 Fuc; 및 글루코스를 나타내는 Glc를 포함한다. 시알산은 5-N-아세틸뉴라민산의 경우에는 NeuNAc, 및 5-글리콜릴뉴라민산의 경우에는 NeuNGc인 단축 기호로 기술된다.

[0076] 용어 "글리코실화"는 당단백질에 대한 올리고사카라이드 (함께 연결된 2개 또는 그 초과 of 단순당 (simple sugar), 예를 들어, 함께 연결된 2 내지 약 12개의 단순당을 함유하는 탄수화물)의 부착을 의미한다. 올리고사카라이드 측쇄는 전형적으로 N- 또는 O-연결을 통해서 당단백질의 골격에 연결된다. 본 발명에 기술된 이뮤노어드헤신의 올리고사카라이드는 일반적으로, N-연결된 올리고사카라이드로서 Fc 영역의 CH2 도메인에 부착되어 나타난다. "N-연결 글리코실화"는 당단백질 쇄 내의 아스파라긴 잔기에 대한 탄수화물 부분의 부착을 나타낸다. 숙련된 전문가들은 예를 들어, 쥐 IgG1, IgG2a, IgG2b 및 IgG3뿐만 아니라 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgD CH2 도메인이 잔기 297에서 N-연결 글리코실화를 위한 단일 부위를 갖는다는 것을 인식할 것이다.

[0077] 본 발명의 목적에 따라, "성숙 코어 탄수화물 구조"는 주로 비안테나리 올리고사카라이드의 전형인 다음의 탄수화물 구조 GlcNAc(푸코즈)-GlcNAc-Man-(Man-GlcNAc)2로 구성된, Fc 영역에 부착된 가공된 코어 탄수화물 구조를 나타낸다. 성숙 코어 탄수화물 구조는 당단백질의 Fc 영역에, 일반적으로는 N-연결을 통해서 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에 부착된다. "양분성 (bisecting) GlcNAc"는 성숙 코어 탄수화물 구조의 α 1,4 만노즈에 부착된 GlcNAc 잔기이다. 양분성 GlcNAc는 α (1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III 효소 (GnTIII)에 의해서 성숙 코어 탄수화물 구조에 효소적으로 부착될 수 있다. CHO 세포는 통상적으로 GnTIII를 발현하지 않지만 [Stanley et al., 1984, J. Biol. Chem. 261:13370-13378], 그렇게 하도록 조작될 수 있다 [Umana et al., 1999, Nature Biotech. 17:176-180].

[0078] 본 발명에는 변형된 당형태 또는 조작된 당형태를 포함하는 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신이 기술된다. 본 명세서에서 사용된 것으로서 "변형된 당형태" 또는 "조작된 당형태"는 단백질, 예를 들어, 항체에 공유적으로 부착된 탄수화물 조성물을 의미하며, 여기에서 상기의 탄수화물 조성물은 모 단백질의 경우와 화학적으로 상이하다. 조작된 당형태는 Fc γ R 매개된 효과기 기능을 증진 또는 감소시키는 것을 비제한적으로 포함한 다양한 목적에 유용할 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 Fc 영역에 공유적으로 부착된 푸코실화 및/또는 양분성 올리고사카라이드의 레벨을 조절하도록 변형된다.

[0079] 변형된 당형태를 생성시키기 위한 다양한 방법이 본 기술분야에서 잘 알려져 있다 [Umana et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473; USSN 12/434,533; 이들은 모두 명백히 참고로 포함된다]. 이들 기술은 예를 들어, IgG를 조작되거나 다른 식의 다양한 유기체 또는 세포주 (예를 들어, Lec-13 CHO 세포 또는 랫트 하이브리도마 YB2/0 세포)에서 발현시키거나, 글리코실화 경로에 연루된 효소 (예를 들어, FUT8 [α 1,6-푸코실트랜스퍼라제] 및/또는 β 1-4-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III [GnT III])를 조절하거나, IgG가 발현된 후에 탄수화물(들)을 변형시키거나, 항체를 효소적 억제체로서 푸코즈 유사체의 존재 하에서 발현시킴으로써 Fc 영역에 공유적으로 부착된 푸코실화 및/또는 양분성 올리고사카라이드의 레벨을 조절한다. 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 당형태를 변형시키기 위한 그 밖의 다른 방법에는 효모 [Li et al., 2006, Nature Biotechnology 24(2):210-215], 모스 (moss) [Nechansky et al., 2007, Mol Immunol 44(7):1826-8], 및 식물 [Cox et al., 2006, Nat Biotechnol 24(12):1591-7]의 당조작된 (glycoengineered) 스트레인을 사용하는 방법이 포함된다. 변형된 당형태를 생성시키기 위한 특별한 방법의 사용은 구체예를 그 방법으로 제한하는 것을 의미하지 않는다. 오히려, 본 발명에 기술된 구체예는 이들이 어떻게

생산된 것인지와는 무관하게 변형된 당형태를 갖는 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 포함한다.

[0080] 일 구현예에서, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 시알릴화의 레벨을 변화시키도록 당조작된다. CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신 G 분자 내의 시알릴화된 Fc 글리칸의 더 높은 레벨은 기능성에 나쁜 영향을 미칠 수 있으며 [Scallion et al., 2007, Mol Immunol. 44(7):1524-34], Fc 시알릴화의 레벨에 있어서의 차이는 변형된 항염증 활성을 야기할 수 있다 [Kaneko et al., 2006, Science 313:670-673]. 항체는 Fc 코어 폴리사카라이드의 시알릴화에 의해 항염증 특성을 획득할 수 있기 때문에, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 당조작하는 것이 더 크거나 감소된 Fc 시알산 함량에 유리할 수 있다.

[0081] 조작된 당형태는 전형적으로, 상이한 탄수화물 또는 올리고사카라이드를 나타내며; 따라서 예를 들어, 면역글로불린은 조작된 당형태를 포함할 수 있다. 대신으로, 조작된 당형태는 상이한 탄수화물 또는 올리고사카라이드를 포함하는 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 나타낼 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명에 기술된 조성물은 Fc 영역을 갖는 글리코실화된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 포함하며, 여기에서 글리코실화된 항체의 약 51-100%, 예를 들어, 조성물 내의 항체의 80-100%, 90-100%, 95-100% 등은 푸코스가 결여된 성숙 코어 탄수화물 구조를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 조성물 내의 항체는 모두 푸코스가 결여된 성숙 코어 탄수화물 구조를 포함하며, 추가로 Fc 영역 내에 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함한다. 대체 구체예에서, 조성물은 Fc 영역을 갖는 글리코실화된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 포함하며, 여기에서 글리코실화된 항체의 약 51-100%, 조성물 내의 항체의 80-100%, 또는 90-100%는 시알산이 결여된 성숙 코어 탄수화물 구조를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 조성물 내의 항체는 모두 시알산이 결여된 성숙 코어 탄수화물 구조를 포함하며, 추가로 Fc 영역 내에 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 조성물은 Fc 영역을 갖는 글리코실화된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 포함하며, 여기에서 글리코실화된 항체의 약 51-100%, 조성물 내의 항체의 80-100%, 또는 90-100%는 시알산을 함유하는 성숙 코어 탄수화물 구조를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 조성물 내의 항체는 모두 시알산을 함유하는 성숙 코어 탄수화물 구조를 포함하며, 추가로 Fc 영역 내에 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 조작된 당형태와 아미노산 변형의 조합은 항체에 최적의 Fc 수용체 결합 특성을 제공한다.

[0082] 그 밖의 다른 변형

[0083] 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 최적화된 특성을 제공하는 하나 또는 그 초과를 변형을 포함할 수 있다. 상기의 변형은 아미노산 변형일 수 있거나, 효소적으로 또는 화학적으로 만들어진 변형일 수 있다. 이러한 변형(들)은 아마도 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신에서의 약간의 개선, 예를 들어, 그의 안정성, 용해도, 기능 또는 임상적 용도에 있어서의 증진을 제공할 수 있다. 본 발명에는 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신에 추가의 변형과 커플링시킴으로써 만들어질 수 있는 다양한 개선이 기술된다.

[0084] 일 구현예에서, 변형은 안정성, 용해도 및 올리고머 상태를 포함하는 (단, 이들로 제한되지 않는다) 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 생물물리학적 특성을 개선시키기 위해서 만들어진 다. 변형에는 예를 들어, 더 큰 안정성을 제공하기 위한 것과 같이 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신에서 더욱 유리한 분자내 상호작용을 제공하는 치환, 또는 더 큰 용해도를 위한 노출된 비극성 아미노산의 극성 아미노산에 의한 치환이 포함될 수 있다. 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신에 대한 그 밖의 다른 변형에는 호모다имер 또는 호모멀티머 분자의 특정한 형성을 가능하게 하는 변형이 포함된다. 이러한 변형에는 조작된 디설파이드뿐만 아니라 화학적 변형 또는 응집방법이 포함되나, 이들로 제한되지 않는다.

[0085] 추가의 구체예에서, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 단백분해적 분해 부위를 제거하는 변형을 포함한다. 이들에는 예를 들어, 생산 수율을 감소시키는 프로테아제 부위뿐만 아니라 투여된 단백질을 생체내에서 분해시키는 프로테아제 부위가 포함될 수 있다. 일 구현예에서, 추가의 변형은 탈아미드화 (즉, 글루타미닐 및 아스파라기닐 잔기의 상응하는 글루탐산 및 아스파르트산 잔기로의 탈아미드화), 산화 및 단백분해적 분해 부위와 같은 공유적 분해 부위를 제거하기 위해서 만들어진 다. 제거하는데 특히 유용한 탈아미드화 부위는 아스파라기닐 및 글루탐산 잔기에 이어서 글리신 (각각, NG 및 QG 모티프)을 포함하는 (단, 이들로 제한되지 않는다) 것으로, 탈아미드화의 경향을 증진시키는 것을 포함한다. 이러한 경우에, 어느 한 잔기의 치환은 탈아미드화의 경향을 상당히 감소시킬 수 있다. 통상적인 산화 부위에는 메티오닌 및 시스테인 잔기가 포함된다. 도입되거나 제거될 수 있는 그 밖의 다른 공유적 변형에는 프롤린 및 리신의 하이드록실화, 세린 또는 트레오닌 잔기의 하이드록실 그룹의 포스포릴화, 리신, 아르기닌 및 히스티딘 측쇄의 "-아미노 그룹"의 메틸화, N-말단 아민의 아세틸화, 및 C-말단 카복실 그룹의 아미드화가 포함된다. 추가의 변형에는 또한 N-연결 또는 O-연결된 글리코실화 및 포스포릴화와 같은 해독-후 변형이 포함될 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다.

[0086] 변형은 생물학적 물질의 생산을 위해서 통상적으로 사용되는 숙주 또는 숙주 세포로부터의 발현 및/또는 정제

수율을 개선시키는 변형을 포함할 수 있다. 이들에는 다양한 포유동물 세포주 (예를 들어, CHO), 효모 세포주, 박테리아 세포주, 및 식물이 포함되나, 이들로 제한되지 않는다. 추가의 변형에는 세포-간 디설파이드 결합을 형성시키는 중쇄의 능력을 제거 또는 감소시키는 변형이 포함된다. 추가의 변형에는 세포-내 디설파이드 결합을 형성시키는 중쇄의 능력을 제거 또는 감소시키는 변형이 포함된다.

[0087] 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 문헌 [Liu & Schultz, 2010, Annu Rev Biochem 79:413-444; 본 발명에 명백히 참고로 포함됨]에 기술된 방법을 포함하는 (단, 이것으로 제한되지 않음) 방법을 사용하여 통합되는 비천연 아미노산의 사용을 포함하는 변형을 포함할 수 있다. 일부의 구체예에서, 이들 변형은 상기 거론된 다양한 기능적, 생물물리학적, 면역학적 또는 제조 특성의 조작을 가능하게 한다. 추가의 구체예에서, 이들 변형은 다른 목적에 따른 추가의 화학적 변형을 가능하게 한다.

[0088] 그 밖의 다른 변형이 본 발명에서 고려된다. 예를 들어, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 다양한 비단백질성 폴리머 중의 하나, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로필렌 글리콜의 코폴리머에 연결될 수 있다. 추가의 아미노산 변형이 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 특이적 또는 비 특이적인 화학적 또는 해독-후 변형이 가능하도록 만들어질 수 있다. 이러한 변형에는 페질화 (PEGylation) 및 글리코실화가 포함되나, 이들로 제한되지 않는다. 페질화가 가능하도록 이용될 수 있는 특이적인 치환에는 효율적이며 특이적인 커플링 화학이 PEG 또는 그 밖의 다른 폴리머 부분을 부착시키기 위해서 사용될 수 있도록 하는 신규의 시스테인 잔기 또는 비천연 아미노산의 도입이 포함되나, 이들로 제한되지 않는다. 특이적인 글리코실화 부위의 도입은 신규의 N-X-T/S 서열을 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신 내로 도입시킴으로써 달성될 수 있다.

[0089] 면역원성을 감소시키는 변형은 모 서열로부터 유도된 가공된 펩타이드의 MHC 단백질에 대한 결합을 감소시키는 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 아미노산 변형은 어떤 우세한 MHC 대립인자이라도 높은 친화성으로 결합하는 것으로 예상되는 면역 에피토프가 전혀 존재하지 않거나 최소의 수로 존재하도록 조작될 수 있다. 단백질 서열 내의 MHC-결합 에피토프를 확인하는 몇 가지 방법이 본 기술분야에서 공지되어 있으며, 본 발명에 기술된 항체 내의 에피토프를 평가하기 위해서 사용될 수 있다.

[0090] 공유적 변형이 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 범위 내에 포함되며, 항상은 아니지만 일반적으로 해독-후에 이루어진다. 예를 들어, 몇 가지 타입의 공유적 변형은 특정한 아미노산 잔기를 선택된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제 (derivatizing agent)와 반응시킴으로써 분자 내에 도입될 수 있다. 일부의 구체예에서, 본 발명에 기술된 면역글로불린의 공유적 변형은 하나 또는 그 초과 라벨 (labels)의 첨가를 포함한다. 용어 "표지 그룹"은 모든 검출가능한 라벨을 의미한다. 일부의 구체예에서, 라벨링 그룹은 잠재적인 입체적 장애를 감소시키기 위해서 다양한 길이의 스페이서 암 (arm)을 통해서 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신에 커플링된다. 단백질을 표지하는 다양한 방법은 본 기술분야에서 공지되어 있으며, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 생성시키는데 사용될 수 있다.

[0091] 일 구현예에서, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 본 발명에서 때때로 "컨주게이트"로 불리는 "융합 단백질"이다. 융합 파트너 또는 컨주게이트 파트너는 단백질성이거나 비-단백질성일 수 있으며; 후자는 일반적으로 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신 및 커플링 파트너 상의 기능적 그룹을 사용하여 생성된다. 컨주게이트 및 융합 파트너는 소분자 화학적 화합물 및 폴리펩타이드를 포함한 어떤 분자라도 될 수 있다. 예를 들어, 다양한 컨주게이트 및 방법이 문헌 [Trail et al., 1999, Curr. Opin. Immunol. 11:584-588; 온전히 참고로 포함됨]에 기술되어 있다. 이용가능한 컨주게이트 파트너에는 사이토킨, 세포독성제, 독소, 방사성 동위원소, 화학요법제, 항-혈관형성제, 티로신 키나제 억제제, 및 그 밖의 다른 치료학적 활성제가 포함되나 이들로 제한되지 않는다. 일부의 구체예에서, 컨주게이트 파트너는 페이로드 (payloads)로 더 생각될 수 있으며, 즉 컨주게이트의 목표는 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신에 의한 표적화된 세포, 예를 들어, 암 세포 또는 면역 세포에 대한 컨주게이트 파트너의 표적화된 전달이다. 따라서, 예를 들어, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신에 대한 독소의 컨주게이션은 상기 독소를 표적 항원을 발현하는 세포에 전달하는 것을 목표로 한다. 본 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 인식될 수 있는 바와 같이, 융합 및 컨주게이트의 개념 및 정의는 실제로 중복된다. 융합 또는 컨주게이트의 지정은 이것을 본 명세서에 기술된 어떤 특정 구체예로 제한하는 것을 의미하지 않는다. 오히려, 이들 용어는 본 발명에 기술된 모든 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신이 하나 또는 그 초과 폴리펩타이드 또는 분자에 유전적으로, 화학적으로 또는 다른 식으로 연결되어 일부의 바람직한 특성을 제공할 수 있다는 광범한 개념을 전달하기 위하여 느슨하게 사용된다.

[0092] **CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 생산**

- [0093] 본 발명에는 또한, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 생산하고, 실험적으로 시험하는 방법이 기술된다. 기술된 방법은 구체예를 작동의 어떤 특별한 적용 또는 원리로 제한하는 것을 의미하지 않는다. 오히려, 제공된 방법은 하나 또는 그 초과 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신이 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 수득하기 위해서 생산되고, 실험적으로 시험할 수 있음을 일반적으로 설명하는 것을 의미한다. 항체 및 단백질 분자 생물학, 발현, 정제 및 선별을 위한 일반적 방법은 문헌 [Antibody Engineering, edited by Kontermann & Dubel, Springer, Heidelberg, 2001; 및 Hayhurst & Georgiou, 2001, Curr Opin Chem Biol 5:683-689; Maynard & Georgiou, 2000, Annu Rev Biomed Eng 2:339-76]에 기술되어 있다.
- [0094] 본 발명에 기술된 일 구현예에서는, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 코드화한 핵산이 생성되며, 이것은 그 다음에 필요에 따라 숙주 세포 내에 클로닝하고, 발현시키고, 시험할 수 있다. 따라서, 각각의 단백질 서열을 코드화한 핵산, 및 특히 DNA가 만들어질 수 있다. 이들 작업은 잘 알려진 절차를 사용하여 수행된다. 예를 들어, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 생성시키는데 사용될 수 있는 다양한 방법은 문헌 [Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001), 및 Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons); 이들은 둘 다 온전히 참고로 포함된다]에 기술되어 있다. 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 코드화한 DNA를 효율적으로 생성시키기 위해서 사용될 수 있는 다양한 기술이 있다. 이러한 방법에는 유전자 조립방법, PCR-기본 방법 및 PCR의 변형을 사용하는 방법, 리가제 연쇄반응-기본 방법, 합성 서플링 (shuffling), 오류 유발 (error-prone) 증폭방법 및 랜덤 (random) 돌연변이를 갖는 올리고 (oligos)를 사용하는 방법과 같은 풀드 (pooled) 올리고 방법, 고전적 부위-지시 돌연변이유발 방법, 카세트 (cassette) 돌연변이유발, 및 그 밖의 다른 증폭 및 유전자 합성방법이 포함되나, 이들로 제한되지 않는다. 본 기술분야에서 공지된 바와 같이, 유전자 조립, 돌연변이유발, 벡터 서브클로닝 등을 위한 상업적으로 유용한 다양한 키트 및 방법이 있으며, 이러한 상업적 생성물은 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 코드화한 핵산을 생성시키는데 유용성이 있다.
- [0095] 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신 단백질은 단백질의 발현을 유도하거나 야기하는 적절한 조건 하에서, 핵산으로 형질전환된 숙주 세포, 예를 들어, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 코드화한 핵산을 함유하는 발현 벡터를 배양함으로써 생산될 수 있다. 발현에 적절한 조건은 발현 벡터 및 숙주 세포의 선택에 따라 달라질 수 있고, 일상적인 실험을 통해 본 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 쉽게 확인될 수 있다. 포유동물 세포, 박테리아, 곤충 세포, 효모 및 식물 세포를 비제한적으로 포함한 광범한 종류의 적절한 숙주 세포가 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 생성시키는데 사용될 수 있는 다양한 세포주는 American Type Culture Collection로 입수할 수 있는 ATCC® 세포주 카탈로그에 기술되어 있다.
- [0096] 일 구현예에서, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 발현 구조물을 레트로바이러스 또는 아데노바이러스와 같은 바이러스를 사용하여 포유동물 세포 내에 도입시키는 시스템을 포함한 포유동물 발현 시스템에서 발현된다. 모든 포유동물 세포, 예를 들어, 인간, 마우스, 랫트, 햄스터, 및 영장류 세포가 사용될 수 있다. 적합한 세포에는 또한 저캣 (Jurkat) T 세포, NIH3T3, CHO, BHK, COS, HEK293, PER C.6, HeLa, Sp2/0, NSO 세포 및 이들의 변이체를 비제한적으로 포함한 공지된 연구용 세포 (research cells)가 포함된다. 대체 구체예에서, 라이브러리 (library) 단백질은 박테리아 세포 내에서 발현된다. 박테리아 발현 시스템은 본 기술분야에서 잘 알려져 있으며, 에스케리키아 콜라이 (Escherichia coli (E. coli)), 바실루스 서브틸리스 (Bacillus subtilis), 스트렙토코커스 크레모리스 (Streptococcus cremoris), 및 스트렙토코커스 리비단스 (Streptococcus lividans)를 포함한다. 대체 구체예에서, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 곤충 세포 (예를 들어, Sf21/Sf9, 트리코플러시아 니 (Trichoplusia ni) Bti-Tn5b1-4) 또는 효모 세포 (예를 들어, 에스 세레비지아에 (S. cerevisiae), 피치아 (Pichia) 등)에서 생산된다. 대체 구체예에서, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 무-세포 해독 시스템 (cell free translation systems)을 사용하여 시험관내에서 발현된다. 원핵 (예를 들어, 이. 콜라이) 및 진핵 (예를 들어, 밀 배아, 토끼 망상적혈구) 세포로부터 유도된 시험관내 해독 시스템을 이용할 수 있으며, 관심이 있는 단백질의 발현 레벨 및 기능적 특성에 따라 선택할 수 있다. 예를 들어, 본 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 이해되는 바와 같이 시험관내 해독은 일부의 디스플레이 (display) 기술, 예를 들어, 리보솜 디스플레이에 필요하다. 또한, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 화학적 합성방법에 의해서 생산될 수 있다. 또한, 유전자이식 발현 시스템에는 동물 (예를 들어, 소, 양 또는 염소 밀크, 배화된 계란, 전체 곤충 유충 등) 및 식물 (예를 들어, 옥수수, 담배, 개구리밥 (duckweed) 등) 둘 다로부터 유도된 것이 포함된다.
- [0097] 단백질을 발현시키기 위해서는 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 코드화한 핵산을 발현 벡터 내에 통합시킬 수 있다. 다양한 발현 벡터가 발현을 목적으로 이용될 수 있다. 발현 벡터에는 자체-복제성 염색체-외 벡터 또는 숙주 게놈 내로 통합되는 벡터를 포함할 수 있다. 발현 벡터는 숙주 세포 타입과 상화적이 되도록 구

성된다. 따라서, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 생성시키는데 사용되는 발현 벡터에는 포유동물 세포, 박테리아, 곤충 세포, 효모, 및 시험관내 시스템에서 단백질 발현이 가능한 것이 포함되나, 이들로 제한되지 않는다. 본 기술분야에서 공지된 바와 같이, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 발현시키는데 사용될 수 있는 다양한 발현 벡터는 상업적으로, 또는 다른 식으로 이용할 수 있다.

[0098] 발현 벡터는 전형적으로 제어 또는 조절 서열, 선택가능한 마커, 어떤 융합 파트너, 및/또는 추가의 요소와 작동적으로 연결된 단백질을 포함한다. 여기에서 "작동적으로 연결된"은 핵산이 또 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 위치하는 것을 의미한다. 일반적으로, 이들 발현 벡터는 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 코드화한 핵산에 작동적으로 연결된 전사 및 해독 조절 핵산을 포함하며, 전형적으로 단백질을 발현시키기 위해서 사용된 숙주 세포에 적절한 것이다. 일반적으로, 전사 및 해독 조절 서열은 프로모터 서열, 리보솜 결합 부위, 전사 개시 및 중지 서열, 해독 개시 및 중지 서열, 및 인핸서 (enhancer) 또는 활성화제 (activator) 서열을 포함할 수 있다. 또한 본 기술분야에서 공지된 바와 같이, 발현 벡터는 전형적으로 발현 벡터를 함유하는 형질전환된 숙주 세포의 선택을 가능하게 하기 위한 선택 유전자 또는 마커를 함유한다. 선택 유전자는 본 기술분야에서 잘 알려져 있으며, 사용된 숙주 세포에 따라 달라질 것이다.

[0099] CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 발현된 단백질의 표적화, 정제, 선별, 디스플레이 등이 가능하도록 융합 파트너에 작동적으로 연결될 수 있다. 융합 파트너는 링커 서열을 통해서 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신 서열에 연결될 수 있다. 링커 서열은 일반적으로 작은 수의 아미노산, 전형적으로 10 개 미만을 포함할 것이지만, 더 긴 링커가 사용될 수도 있다. 전형적으로, 링커 서열은 분해에 대해서 유연하고 저항성이 있도록 선택된다. 본 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 이해될 수 있는 바와 같이, 광범한 종류의 서열 중의 어떤 것이라도 링커로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 통상적인 링커 서열은 아미노산 서열 GGGGS [SEQ ID NO: 40]을 포함한다. 융합 파트너는 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신 및 모든 결합된 융합 파트너를 원하는 세포 위치에 또는 세포의 배지에 유도하는 표적화 또는 시그널 서열일 수 있다. 본 기술분야에서 공지된 바와 같이, 특정의 시그널 서열은 단백질이 성장 배지 내로, 또는 세포의 내막과 외막 사이에 위치하는 주변세포질 공간 (periplasmic space) 내로 분비되도록 표적화할 수 있다. 융합 파트너는 또한, 정제 및/또는 선별을 가능하게 하는 펩타이드 또는 단백질을 코드화한 서열일 수도 있다. 이러한 융합 파트너에는 폴리히스티딘 태그 (His-태그) (예를 들어, H6 및 H10 또는 고정화된 금속 친화성 크로마토그래피 (IMAC) 시스템 (예를 들어, Ni²⁺ 친화성 칼럼)에서 사용하기 위한 그 밖의 다른 태그), GST 융합체, MBP 융합체, Strep-태그, 박테리아 효소 BirA의 BSP 비오틴화 표적 서열, 및 항체에 의해서 표적화된 에피토프 태그 (예를 들어, c-myc 태그, 플래그 (flag)-태그 등)이 포함되나, 이들로 제한되지 않는다. 본 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 이해될 수 있는 바와 같이, 이러한 태그는 정제에, 선별에, 또는 둘 다에 유용할 수 있다. 예를 들어, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 His-태그를 사용하여 이것을 Ni²⁺ 친화성 칼럼에 고정화시킴으로써 정제할 수 있으며, 이어서 정제 후에 동일한 His-태그를 사용하여 항체를 Ni²⁺ 코팅된 플레이트에 고정화시켜 ELISA 또는 그 밖의 다른 결합시험 (이하에 기술되는 바와 같음)을 수행할 수 있다. 융합 파트너는 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 선별하는 선택 방법의 사용을 가능하게 할 수 있다 (이하 참조). 다양한 선택 방법을 가능하게 하는 융합 파트너는 본 기술분야에서 잘 알려져 있다.

[0100] 일 구현예에서, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 발현 후에 정제 또는 분리된다. 단백질은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 공지된 다양한 방법으로 분리 또는 정제될 수 있다. 정제는 본 명세서에 기술된 바와 같이 호모다imer 중쇄 중으로부터 헤테로다imer 중쇄 중을 분리하기 위한 발명에서 특히 유용할 수 있다. 표준 정제방법에는 대기압에서, 또는 FPLC 및 HPLC와 같은 시스템을 사용하여 고압에서 수행되는 이온교환, 소수성 상호작용, 친화성, 사이징 (sizing) 또는 겔 여과, 및 역상 크로마토그래피를 포함한 크로마토그래피 기술이 포함된다. 정제방법은 또한 전기영동, 등전 집속 (isoelectric focusing), 면역학적, 침전, 투석, 및 크로마토포커싱 (chromatofocusing) 기술을 포함한다. 단백질 농도와 관련한 한외여과 및 투석여과도 유용하다. 본 기술분야에서 잘 알려진 바와 같이, 다양한 천연 단백질은 Fc 및 항체에 결합하며, 이들 단백질은 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 정제하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 박테리아 단백질 A 및 G는 Fc 영역에 결합한다. 마찬가지로, 박테리아 단백질 L은 물론 항체의 표적 항원에 결합하는 것과 같이, 일부의 항체의 Fab 영역에 결합한다. 정제는 종종 특별한 융합 파트너에 의해서 가능하게 될 있다. 예를 들어, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 GST 융합체가 이용되는 경우에는 글루타치온 수지를, His-태그가 이용되는 경우에는 Ni²⁺ 친화성 크로마토그래피를, 또는 플래그-태그가 이용되는 경우에는 고정화된 안티-플래그 항체를 사용하여 정제될 수 있다. 적합한 정제기술에서의 일반적인 지침에 대해서는 예를 들어, 온전히 참고로 포함된 문헌 [Protein Purification: Principles and Practice, 3rd Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994; 온전히 참고로 포함됨]을 참고로 한다. 정제의 정도는 반드시 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 선별 또는 용도에 따라 달라질 것이다. 일부의 경우에, 정제는 필요하지 않다. 예를 들어, 일 구현예에서, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신이 분리되면, 선별은 배지로부터 직

접 수행될 수 있다. 본 기술분야에서 잘 알려져 있는 바와 같이, 일부의 선택방법은 단백질의 정제를 수반하지 않는다.

[0101] **시험관내 실험**

[0102] CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 결합시험, 세포-기본 시험 및 선택 기술을 사용하는 것을 포함하는 (단, 이들로 제한되지 않는다) 다양한 시험관내 방법을 사용하여 실험적으로 시험할 수 있다. 자동화 및 고속 (high-throughput) 선별기술이 선별 절차에서 이용될 수 있다. 선별은 융합 파트너 또는 라벨의 사용을 이용할 수 있다. 융합 파트너의 사용은 상기에 거론하였다. 여기에서 "표지된"은 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신이 선별시에 검출이 가능하도록 부착된 하나 또는 그 초과 요소, 동위원소 또는 화학적 화합물을 갖는 것을 의미한다. 일반적으로, 라벨은 다음의 3 가지 클래스에 속한다: a) 항체에 의해서 인식되는 융합 파트너로서 혼입되는 에피토프일 수 있는 면역 라벨, b) 방사성 또는 중질 동위원소일 수 있는 동위원소 라벨, 및 c) 형광성 및 비색성 염료를 포함할 수 있는 소분자 라벨, 또는 그 밖의 다른 표지방법을 가능하게 하는 비오틴과 같은 분자. 라벨은 어떤 위치에서나 화합물 내로 혼입될 수 있으며, 단백질 발현 중에 시험관내 또는 생체내로 혼입될 수 있다.

[0103] 일 구현예에서, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 기능적 및/또는 생물물리학적 특성이 시험관내 시험에서 선별된다. 시험관내 시험은 관심이 있는 특성을 선별하기 위한 광범한 동적 범위를 허용할 수 있다. 본 발명에 특히 적절한 것으로, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 하나 또는 그 초과 항원에 대한 그들의 친화성에 대해서 시험할 수 있다. 선별될 수 있는 특성에는 안정성, 용해도, 및 Fc 리간드, 예를 들어, Fc γ Rs에 대한 친화성이 포함되나, 이들로 제한되지 않는다. 다수의 특성은 동시에 또는 개별적으로 선별될 수 있다. 단백질은 시험의 필요조건에 따라 정제되거나 정제되지 않을 수 있다. 일 구현예에서, 선별은 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신에 결합하는 것으로 알려져 있거나 생각되는 단백질 또는 비단백질 분자에 대한 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 결합에 관한 정성적 또는 정량적 결합시험이다. 일 구현예에서, 선별은 표적 항원에 대한 결합을 측정하기 위한 결합시험이다. 대체 구현예에서, 선별은 Fc γ Rs의 패밀리를, 신생아 수용체 FcRn, 보체 단백질 C1q, 및 박테리아 단백질 A 및 G를 포함하나 이들로 제한되지 않는 Fc 리간드에 대한 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 결합에 대한 시험이다. 상기 Fc 리간드는 어떤 유기체부터라도 유래할 수 있다. 일 구현예에서, Fc 리간드는 인간, 마우스, 랫트, 토끼, 및/또는 원숭이로부터 유래할 수 있다. 결합시험은 FRET (형광 공명 에너지 전이) 및 BRET (생물발광 공명 에너지 전이)-기본 시험, 알파스크린 (AlphaScreen™) (증폭된 발광 근접 균질시험 (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay)), 섬광 근접시험, ELISA (효소-연결된 면역흡착 시험), SPR (표면 플라즈몬 공명, 또한 비아코어 (BIAcore®)로도 알려짐), 등온 적정 열량측정법, 시차 주사 열량측정법, 겔 전기영동, 및 겔 여과를 포함한 크로마토그래피를 비제한적으로 포함한 본 기술분야에서 공지된 다양한 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 이들 및 그 밖의 다른 방법은 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 일부의 융합 파트너 또는 라벨의 이점을 이용할 수 있다. 시험들은 색원성, 형광성, 발광성 또는 동위원소 라벨을 비제한적으로 포함한 다양한 검출방법을 이용할 수 있다.

[0104] CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 생물물리학적 특성, 예를 들어, 안정성 및 용해도는 본 기술분야에서 공지된 다양한 방법을 사용하여 시험한다. 단백질 안정성은 접힌 (folded) 상태와 펼쳐진 (unfolded) 상태 사이의 열역학적 평형을 측정함으로써 결정될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 화학적 변성제, 열 또는 pH를 사용하여 펼쳐질 수 있으며, 이 전이는 원편광 이색성 분광법, 형광 분광법, 흡광 분광법, NMR 분광법, 열량측정법, 및 단백분해를 비제한적으로 포함한 방법을 사용하여 모니터링할 수 있다. 본 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 이해될 수 있는 바와 같이, 접힘 및 펼쳐짐 전이의 동력학적 파라미터는 또한 이들 및 그 밖의 다른 기술을 사용하여 모니터링할 수 있다. CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 용해도 및 전반적인 구조적 완전성은 본 기술분야에서 공지된 광범한 방법을 사용하여 정량적으로 또는 정성적으로 결정될 수 있다. 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 생물물리학적 특성을 특정화하기 위하여 사용될 수 있는 방법에는 겔 전기영동, 등전 집속, 모세관 전기영동, 크기 배제 크로마토그래피, 이온-교환 크로마토그래피 및 역상 고성능 액체 크로마토그래피와 같은 크로마토그래피, 펩타이드 지도작성 (mapping), 올리고사카라이드 지도작성, 질량 분광광도법, 자외선 흡수 분광법, 형광 분광법, 원편광 이색성 분광법, 등온성 적정 열량측정법, 시차 주사 열량측정법, 분석용 초원심분리, 동적 광산란, 단백분해, 및 교차-결합, 혼탁도 측정, 여과 지연시험, 면역학적 시험, 형광 염료 결합시험, 단백질-염색 시험, 현미경검사, 및 ELISA 또는 그 밖의 다른 결합시험을 통한 응집체의 검출이 포함된다. X-선 결정학 기술 및 NMR 분광법을 이용한 구조 분석이 또한 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 안정성 및/또는 용해도는 약간의 규정된 시간 후에 단백질 용액의 양을 결정함으로써 측정될 수 있다. 이 시험에서, 단백질은 일부의 극한 조건, 예를 들어, 상승된 온도, 낮은 pH, 또는 변성제의 존재에 노출될 수 있

거나, 노출될 수 없다. 기능은 전형적으로 안정하고, 가용성이며/이거나 잘-접힌/구조화된 단백질을 필요로 하기 때문에, 상기 언급한 기능 및 결합시험은 또한 이러한 측정을 수행하는 방법을 제공한다. 예를 들어, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 포함하는 용액은 표적 항원에 결합하는 그의 능력에 관해서 시험한 다음에, 한 시간 또는 그 초과인 규정된 기간 동안 상승된 온도에 노출시킨 다음에, 항원 결합에 대해서 다시 시험할 수 있다. 펼쳐지고 응집된 단백질은 항원에 결합할 수 있는 것으로 예상되지 않기 때문에, 잔류하는 활성의 양은 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 안정성 및 용해도의 척도를 제공한다.

[0105] 일 구현예에서, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 하나 또는 그 초과인 세포-기본 또는 시험관내 시험을 사용하여 시험할 수 있다. 이러한 시험의 경우에, 정제되거나 정제되지 않은 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 전형적으로, 세포가 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신에 노출되도록 외인성으로 첨가된다. 이들 시험은 항상은 아니지만 전형적으로, 표적 항원에 결합하고, 일부의 생화학적 현상, 예를 들어, 세포 용해, 식작용, 리간드/수용체 결합 억제, 성장 및/또는 증식의 억제, 칼슘 방출 및/또는 시그널링의 억제, 세포소멸 등과 같은 효과기 기능을 매개하는 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 능력의 생물학을 기초로 한다. 이러한 시험들은 종종 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신에 대한 세포의 반응, 예를 들어, 세포 생존, 세포 사멸, 세포 식작용, 세포 용해, 세포 형태학의 변화, 또는 천연 유전자 또는 리포터 유전자의 세포 발현과 같은 전사 활성화를 모니터링하는 것을 수반한다. 예를 들어, 이러한 시험은 세포 살해를 유발하는 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 능력, 예를 들어, ADCC, ADCP, 및 CDC를 측정할 수 있다. 항원의 공동-관여에 의해서 매개된 세포 살해를 측정하는 시험이 본 발명에 특히 적절하다. 일부의 시험의 경우에는, 표적 세포 이외에도 추가의 세포 또는 보체, 예를 들어, 혈청 보체, 또는 말초혈액 단핵구 (PBMC), NK 세포, 대식세포, T 세포 등과 같은 효과기 세포를 첨가하는 것이 필요할 수 있다. 이러한 추가의 세포는 모든 유기체, 예를 들어, 인간, 마우스, 랫트, 토끼, 및 원숭이로부터 유래할 수 있다. 교차결합 또는 모노머 항체는 항체의 표적 항원을 발현하는 특성의 세포주의 세포소멸을 야기할 수 있거나, 이들은 시험에 첨가된 면역세포에 의한 표적 세포에 대한 공격을 매개할 수 있다. 세포 사멸 또는 생존도를 모니터링하는 방법은 본 기술분야에서 공지되어 있으며, 염료, 형광단, 면역화학, 세포화학 및 방사성 시약의 사용을 포함한다. 예를 들어, 카스파제 시험 또는 아넥신-플루오로켄주게이트는 세포소멸이 측정되도록 할 수 있고, 방사성 기질의 흡수 또는 방출 (예를 들어, 크롬-51 방출시험) 또는 알라마르 블루 (alamar blue)와 같은 형광 염료의 대사적 환원은 세포 성장, 증식 또는 활성화가 모니터링되도록 할 수 있다. 일 구현예에서는, DELFIA EuTDA-기본 세포독성 시험 (Perkin Elmer, MA)이 사용된다. 대신으로, 죽거나 손상된 표적세포는 하나 또는 그 초과인 천연 세포 내 단백질, 예를 들어, 락테이트 데하이드로게나제의 방출을 측정함으로써 모니터링할 수 있다. 전사 활성화가 또한, 세포-기본 시험에서 기능을 시험하는 방법으로 제공된다. 이 경우에, 반응은 상향조절되거나 하향-조절될 수 있는 천연 유전자 또는 단백질에 대해서 시험함으로써 모니터링될 수 있으며, 예를 들어, 특성의 인터류킨의 방출이 측정될 수 있거나, 대신으로 리드아웃 (readout)은 루시퍼라제 또는 GFP-리포터 구조물을 통해서 이루어질 수 있다. 세포-기본 시험은 또한, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 존재에 대한 반응으로서의 세포의 형태학적 변화의 측정을 수반할 수 있다. 이러한 시험을 위한 세포 타입은 원핵 또는 진핵성일 수 있으며, 본 기술분야에서 공지된 다양한 세포주가 이용될 수 있다. 대신으로, 세포-기본 선별은 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 코드화한 핵산으로 형질전환되거나 형질감염된 세포를 사용하여 수행된다.

[0106] 생체내 실험

[0107] 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 생물학적 특성은 세포, 조직 및 전체 유기체 실험에서 특정화될 수 있다.

[0108] 본 명세서에 나타낸 바와 같이, 일반적으로 본 발명의 이뮤노어드헤신의 변이체 CTLA4 도메인의 결합 및 연관된 친화성의 시험은 실시예에 개략적으로 설명된 바와 같은 결합시험을 사용하여 수행된다. 상술한 바와 같이, 친화성은 모 폴리펩타이드에 비해 변이체 폴리펩타이드의 K_A 가 상당히 더 높거나, 변이체 폴리펩타이드의 K_D 가 모 폴리펩타이드에 비해서 상당히 더 낮은 경우에 증진된 것으로 기술될 수 있다. 비율, 예를 들어, K_A (변이체 폴리펩타이드)/ K_A (모 폴리펩타이드) 또는 K_D (모 폴리펩타이드)/ K_D (변이체 폴리펩타이드)의 식으로 표현되는 경우에, 친화성에 있어서의 상당한 증가는 예를 들어, 이들 비율 중의 하나 및/또는 n 이 1.2, 1.5, 2.0, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 100, 250, 500, 1000 또는 그 초과인 경우에 증명된다.

[0109] 본 기술분야에서 공지된 바와 같이, 약물은 질병 또는 질병 모델에 대한 약물의 치료 효능을 측정하거나 약물의 약력학, 독성 및 그 밖의 다른 특성을 측정하기 위해서 종종 마우스, 랫트, 토끼, 개, 고양이, 돼지 및 원숭이를 비제한적으로 포함한 동물에게서 시험한다. 상기 동물은 질병 모델로 볼릴 수 있다. 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신에 관해서, 후보 폴리펩타이드의 인간에게서의 잠재력을 평가하기 위하여 동물 모델을

사용하는 경우에, 즉 적어도 부분적으로는 인간 Fc 수용체에 대한 친화성에 관하여 특이적인 효과를 갖는 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 Fc 도메인이 이종상동성 (orthologous) 동물 수용체와는 유사한 친화성 효과를 갖지 않을 수 있다는 사실로 인하여 특별한 문제가 일어난다. 이들 문제는 진정한 이종상동체의 정확한 지정과 연관된 피할 수 없는 모호성 [Mechetina et al., 2002, Immunogenetics 54:463-468; 온전히 참고로 포함됨], 및 일부의 이종상동체는 단순히 동물에 존재하지 않는다는 사실에 의해서 더 악화될 수 있다. 치료제는 종종 누드 마우스, Rag-결핍 마우스, SCID 마우스, 이종이식 마우스, 및 유전자이식 마우스 (노킨 (knockins) 및 녹아웃 (knockouts) 포함)를 포함하는 (단, 이들로 제한되지 않는다) 마우스에서 시험한다. 본 발명에서 치료학적 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 마우스 스트레인 NZB, NOD, BXSB, MRL/lpr, K/BxN 및 유전자이식체 (노킨 및 녹아웃 포함)에서 시험할 수 있다. 이러한 마우스는 전신 홍반성 루푸스 (SLE) 및 류마티스성 관절염 (RA)과 같은 인간 기관 특이적인 전신성 자가면역 또는 염증성 질병 병리학과 닮은 다양한 자가면역 조건을 발생시킬 수 있다. 예를 들어, 자가면역 질환에 대해서 예정된 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 마우스를 처리하여 질병 병리학의 발생을 감소시키거나 억제하는 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 능력을 결정함으로써 이러한 마우스 모델에서 시험할 수 있다. 마우스와 인간 Fc γ 수용체 시스템 사이의 비상화성으로 인하여, 대체 접근방법은 면역 결핍 마우스에 인간 PBLs 또는 PBMC (huPBL-SCID, huPBMC-SCID)를 생착시켜 인간 효과기 세포 및 Fc 수용체를 갖는 반-기능적 인간 면역 시스템을 제공한 쥐 SCID 모델을 사용하는 것이다. 그 밖의 다른 유기체, 예를 들어, 포유동물이 또한 시험에 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간에 대한 그들의 유전적 유사성으로 인하여 원숭이가 적합한 치료학적 모델일 수 있으며, 따라서 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 효능, 독성, 약리학 또는 그 밖의 다른 특성을 시험하기 위해서 사용될 수 있다. 인간에게서의 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 시험은 약물로서의 승인을 위해서는 궁극적으로 필요하며, 따라서 이들 실험이 물론 고려된다. 따라서, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 그들의 치료학적 효능, 독성, 약리학 및/또는 그 밖의 다른 임상적 특성을 결정하기 위해 인간에게서 시험할 수 있다.

[0110] 일부의 구체예에서, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 다양한 인간 질환의 임상적으로 적절한 동물 모델에서 효능에 대해 평가할 수 있다. 다수의 경우에, 적절한 모델에는 특이적 항원 및 수용체에 대한 다양한 유전자이식 동물이 포함된다.

[0111] 일 구현예에서, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 시험은 표적 항원을 포함하는 특이적 표적 세포의 고갈의 평가를 촉진시키기 위한 영장류 (예를 들어, 시노몰구스 (cynomolgus) 원숭이 모델)에서의 효능시험을 포함할 수 있다. 추가의 영장류 모델은 자가면역, 이식 및 암의 치료학적 연구에서 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 평가하기 위한 레서스 (rhesus) 원숭이의 사용을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0112] 독성 연구는 표준 약리학 프로파일에서 평가될 수 없거나, 약제의 반복 투여 후에만 나타나는 약물 관련된 효과를 결정하기 위해서 수행된다. 대부분의 독성 시험은 새로운 치료학적 약제를 인간에게 투여하기 전에 어떤 예기치 않은 부작용이라도 간과하지 않도록 보장하기 위해서 2 가지 중, 즉 설치류 및 비-설치류에 수행된다. 일반적으로, 이들 모델은 유전자 독성, 만성 독성, 면역원성, 생식/발육 독성 및 발암성을 포함한 다양한 독성을 측정할 수 있다. 상기 언급된 파라미터 내에는 식품 소비, 체중, 항체 형성, 임상 화학, 및 표준 기관/조직의 육안-및 현미경 검사 (예를 들어, 심장독성)의 표준 측정이 포함된다. 추가의 측정 파라미터는 존재하는 경우의 주사 부위 외상 및 중화 항체의 측정이다. 전통적으로, 기존 형태 (naked)이거나 컨주게이트된 모노클로날 항체는 정상 조직과의 교차-반응성, 면역원성/항체 생산, 컨주게이트 또는 링커 독성 및 방사성표지된 종의 "방관자 (bystander)" 독성에 대해서 평가된다. 그럼에도 불구하고, 이러한 연구는 특정한 관심을 처리하도록 ICH S6 (역시 상기 언급한 생물공학적 생성물에 대한 안전성 연구)에 의해 설정된 지침에 따라 개별화되도록 할 수 있다. 그 자체로서 일반적 원칙은 생성물이 생성물이 충분히 잘 특정화되고, 불순물/오염물이 제거되었으며, 시험 물질이 발생 전체에 걸쳐서 동등하고, GLP 순응성이 유지되는 것이다.

[0113] 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 약리학 (PK)은 다양한 동물 시스템 (여기에서, 가장 적절한 것은 시노몰구스 및 레수스 원숭이와 같은 비-인간 영장류이다)에서 검할 수 있다. 6000배의 용량 범위 (0.05-300 mg/kg)에 걸친 단일 또는 반복된 i.v./s.c. 투여는 혈장 농도 및 청소율을 사용하여 반감기 (며칠 내지 몇 주) 동안 평가될 수 있다. 정상 상태에서의 분포 용적 및 전신 흡수도의 레벨이 또한 측정될 수 있다. 이러한 측정 파라미터의 예에는 일반적으로 관찰된 최대 혈장 농도 (Cmax), Cmax에 도달하는 시간 (Tmax), 0에서 무한대까지의 혈장 농도-시간 곡선 아래의 면적 [AUC(0-inf)] 및 걸보기 제거 반감기 (T1/2)가 포함된다. 측정된 추가의 파라미터에는 i.v. 투여 후에 수득된 농도-시간 데이터의 구획 분석 및 생체이용률이 포함될 수 있다.

[0114] 약동학적 연구에는 특정한 세포의 표적화 또는 시그널링 기전의 차단, 항원 특이적 항체의 억제 측정 등이 포함될 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 특별한 효과기 세포를 표

적화할 수 있으며, 이에 의해서 효력을 개선시키거나 특히 바람직한 생리학적 구획 내로의 침투를 증가시키는 특성의 활성을 유도하도록 약물을 유도할 수 있다. 이러한 약동학적 효과는 동물 모델에서 또는 인간에게서 입증될 수 있다.

[0115] **임상적 용도**

[0116] 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 광범한 생성물의 범위에서의 용도를 가질 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 치료제, 진단제 또는 연구용 시약이다. CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 모노클로날 또는 폴리클로날인 조성물에서의 용도를 가질 수 있다. 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 치료학적 목적으로 사용될 수 있다. CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 장애를 치료하기 위해서 환자에게 투여될 수 있다.

[0117] 본 발명에 기술된 목적에 따른 "환자"는 인간 및 그 밖의 다른 동물, 예를 들어, 그 밖의 다른 포유동물 둘 다를 포함한다. 따라서, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 인간 치료 및 수의과적 적용 용도 둘 다를 갖는다. 본 명세서에 기술된 것으로서 용어 "치료" 또는 "치료하는"은 치료학적 처리뿐만 아니라 질병 또는 장애에 대한 예방적 또는 억제성 방법을 포함하는 것을 의미한다. 따라서, 예를 들어, 질병의 발병 전의 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 성공적인 투여는 질병의 치료를 제공한다. 또 다른 예로서, 질병의 증상과 싸우기 위하여 질병의 임상적 발현 후에 최적화된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 성공적으로 투여하는 것은 질병의 치료를 포함한다. "치료" 및 "치료하는"은 또한, 질병을 근절시키기 위해서 질병의 출현 후에 최적화된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 투여하는 것을 포함한다. 발병 후 및 임상적 증상의 발생 후에 임상적 증상의 가능한 완해 및 아마도 질병의 개선이 있는 약제의 성공적 투여는 질병의 치료를 포함한다. "치료가 필요한" 대상에는 이미 질병 또는 장애를 갖는 포유동물뿐만 아니라, 질병 또는 장애가 예방되어야 하는 포유동물을 포함한, 질병 또는 장애를 갖기 쉬운 포유동물이 포함된다.

[0118] 본 발명에서 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 바람직하게는 면역 관련된 상태 또는 장애를 치료하기 위해서 사용될 수 있다. 면역 관련된 상태에는 자가면역 질환, 염증성 장애, 및 공여체 조직의 거부반응과 연관된 면역반응의 예방이 포함되나 이들로 제한되지 않는다.

[0119] 본 발명에서 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 자가면역 질환을 치료하기 위해서 사용될 수 있다. 여기에서 "자가면역 질환"에는 동종 섬 (allogenic islet) 이식 거부반응, 원형 탈모, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역 애디슨병 (Addison's disease), 항호중구 세포질 자가항체 (ANCA), 부신의 자가면역 질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 심근염, 자가면역 호중구감소증, 자가면역 난소염 및 고환염, 자가면역 혈소판감소증, 자가면역 담마진, 베체트병 (Behcet's disease), 수포성 유선포창, 심근증, 캐슬만 (Castleman) 증후군, 셀리악 스프루스 (celiac spruce)-피부염, 만성 피로 면역 기능부전 증후군, 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증, 척-스트라우스 (Churg-Strauss) 증후군, 반흔성 유선포창, CREST 증후군, 한랭 응집소병, 크론병 (Crohn's disease), 피부근염, 원관상 루푸스, 필수 혼합 한성글로불린혈증, 인자 VIII 결핍증, 섬유성근통-섬유성근염, 사구체신염, 그레이브스병 (Grave's disease), 길랑-바레 (Guillain-Barre), 굿파스튜어 (Goodpasture) 증후군, 이식편대숙주 질환 (GVHD), 하시모토 (Hashimoto) 갑상선염, 혈우병 A, 특발성 폐섬유증, 특발성 혈소판감소성 자반증 (ITP), IgA 신경병증, IgM 다발성 신경병증, 면역 매개된 혈소판감소증, 소아 관절염, 카와사키병 (Kawasaki's disease), 편평태선, 홍반성 루푸스, 메니에르병 (Meniere's disease), 혼합 결합조직 질환, 다발성 경화증, 타입 1 진성당뇨병, 중증 근무력증, 심상성 천포창, 악성 빈혈, 결절성 다발동맥염, 다연골염, 다선성 증후군, 류마티스성 다발근통, 다발성 근염 및 피부근염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담즙성 간경변, 건선, 건선성 관절염, 레이놀드 (Reynauld) 현상, 라이터 (Reiter) 증후군, 류마티스성 관절염, 유육종증, 경피증, 쇼그렌 증후군, 고형 기관 이식 거부반응, 강직-인간 증후군, 전신 홍반성 루푸스, 타카야수 (takayasu) 관절염, 측두 동맥염/거대세포 동맥염, 혈전성 혈소판감소성 자반증, 폐양성 대장염, 포도막염, 포진성 피부염 맥관염과 같은 혈관병증, 백반증, 및 베케너 (Wegner) 육아종증이 포함된다.

[0120] 본 발명에서 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 염증성 장애를 치료하기 위해서 사용될 수 있다. 여기에서 "염증성 장애"는 급성 호흡부전 증후군 (ARDS), 급성 화농성 관절염, 애주번트 (adjuvant) 관절염, 소아 특발성 관절염, 알레르기성 뇌척수염, 알레르기성 비염, 알레르기성 맥관염, 알레르기, 천식, 아테롬성 경화증, 만성 박테리아 또는 바이러스 감염에 기인한 만성 염증, 만성 폐쇄성 폐질환 (COPD), 관상동맥 질환, 뇌염, 염증성 장질환, 염증성 골용해, 급성 및 지연된 과민성 반응과 연관된 염증, 종양과 연관된 염증, 말초신경 손상 또는 탈수초성 질환, 화상 및 허혈과 같은 조직 외상과 연관된 염증, 수막염에 기인한 염증, 다발성 기관 손상 증후군, 폐섬유증, 폐혈증 및 폐혈성 쇼크, 스티븐스-존슨 (Stevens-Johnson) 증후군, 미분화 관절증, 및 미분화 척추관절증을

포함한다.

[0121] 본 발명에서 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 수용주 대상체에 의한 공여체 조직, 세포, 이식편, 또는 기관 이식의 거부반응과 연관된 면역반응을 예방하거나 억제하기 위해서 사용될 수 있다. 이식편 관련된 질병 또는 장애에는 골수 이식과 연관된 것과 같은 이식편대숙주 질환 (GVDH), 및 예를 들어, 피부, 근육, 뉴론, 섬, 기관, 간의 실질세포 등의 이식편을 포함한 기관, 조직 또는 세포 이식편 이식 (예를 들어, 조직 또는 세포 동종이식 또는 이종이식편)의 거부반응으로부터 유래하거나 그와 연관된 면역 장애가 포함된다. 수용주 대상체에서의 공여체 조직, 세포, 이식편 또는 고형 기관 이식에 관해서, 본 발명에 기술된 본 발명의 이러한 분자 (예를 들어, 변이체 CTLA-4 ECD 폴리펩타이드 또는 변이체 CTLA-4-Ig 융합 단백질)는 수용주에게서 이러한 이식의 급성 거부반응을 예방하는데, 및/또는 수용주에게서 이러한 이식의 거부반응을 예방 (예를 들어, 당뇨병을 앓고 있는 대상 수용주에게서 공여체로부터의 인슐린 생산 섬세포 이식의 거부반응을 억제)하기 위한 장기간 유지요법에 효과적일 수 있다.

[0122] 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신에 의해서 치료될 수 있는 바람직한 면역 관련된 장애에는 크론병 (Crohn's disease), 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 루푸스 신염, 건선성 관절염, 건선, 류마티스성 관절염, 궤양성 대장염, 및 신장 이식, 간 이식 및 췌장 이식을 포함하는 (단, 이들로 제한되지 않는다) 이식 거부반응이 포함된다.

[0123] 본 발명에서 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 암을 치료하기 위해서 사용될 수 있다. 여기에서 "암" 및 "암성 (cancerous)"은 전형적으로는 조절되지 않은 세포 성장에 의해서 특정화되는 포유동물에서의 생리학적인 상태를 나타내거나 기술한다. 암의 예로는 암종, 림프종, 아세포종, 육종 (지방육종을 포함), 신경내분비 종양, 중피종, 신경초종, 수막종, 선암, 흑색종, 및 백혈병 또는 림프구양 악성종양이 포함되나, 이들로 제한되지 않는다.

[0124] 본 발명에서 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 감염성 질환을 치료하기 위해서 사용될 수 있다. 여기에서 "감염성 질환"에는 바이러스, 박테리아, 진균, 원생동물, 및 기생충과 같은 병원체에 의해서 야기된 질병이 포함된다.

[0125] 더욱이, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 울혈성 심부전 (CHF), 심근염 및 심근의 그 밖의 다른 상태와 같은 심장 상태; 빨간 코, 여드름 및 습진과 같은 피부 상태; 골 소실, 골다공증, 파제트병 (Paget's disease), 랑게르한스 (Langerhans) 세포 조직구증, 치주 질환, 불용성 골감소증, 골연화증, 단골성 섬유성 이형성증, 다골성 섬유성 이형성증, 골 전이, 골통증 관리, 체액성 악성 고칼슘혈증, 치주 재건, 척수 손상, 및 골 골절과 같은 뼈 및 치아 상태; 가우치병 (Gaucher's disease)과 같은 대사성 상태; 쿠싱 (Cushing) 증후군과 같은 내분비 상태; 및 알츠하이머병과 같은 신경학적 및 신경변성 상태를 포함하는 (단, 이들로 제한되지 않는다) 추가의 상태를 예방하거나 치료하기 위해서 사용될 수 있다.

[0126] 제형

[0127] 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신 및 하나 또는 그 초과 치료학적 활성제가 제형된 약제학적 조성물이 계획된다. 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 제제는 바람직한 정도의 순도를 갖는 상기의 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 임의의 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed., 1980; 온전히 참고로 포함됨]와 혼합시킴으로써, 동결건조된 제제 또는 수용액의 형태로 저장을 위해서 제조된다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투약량 및 농도에서 수용주에게 비독성이며, 포스페이트, 시트레이트, 아세테이트 및 그 밖의 다른 유기산과 같은 완충제; 아스코르빈산 및 메티오닌과 같은 항산화제; 보존제 (예를 들어, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 오르벤질 알콜; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥사놀; 3-펜타논; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10 잔기 미만) 폴리펩타이드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 폴리머; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산; 글루코즈, 만노즈 또는 텍스트린을 포함한 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 그 밖의 다른 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트화제; 슈크로즈, 만니톨, 트레할로즈 또는 소르비톨과 같은 당류; 감미제 및 그 밖의 다른 방향제; 미세결정성 셀룰로즈, 락토즈, 옥수수 및 그 밖의 다른 전분과 같은 충전제; 결합제; 첨가제; 착색제; 나트륨과 같은 염-형성 반대-이온; 금속 킵플렉스 (예를 들어, Zn-단백질 킵플렉스); 및/또는 트윈 (TWEEN™), 플루로닉스 (PLURONICS™) 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과 같은 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 포함하는 약제학적 조성물은 산 및 염기 부가염 둘 다를 포함하는 것을 의미하는 약제학적으로 허용되는 염으로 존재하는 것과 같은 수용성 형태로 존재할 수 있다. "약제학적으로 허용되는 산부

가염"은 유리 염기의 생물학적 유효성을 유지하며, 생물학적으로나 다른 식으로 바람직하지 않은 것이 아니며, 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산 등과 같은 무기산, 및 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 피루브산, 옥살산, 말레산, 말론산, 석신산, 푸마르산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 신남산, 만델산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 살리실산 등과 같은 유기산에 의해서 형성된 이들 염을 나타낸다. "약제학적으로 허용되는 염기 부가염"에는 나트륨, 칼륨, 리튬, 암모늄, 칼슘, 마그네슘, 철, 아연, 구리, 망간, 알루미늄 염 등과 같은 무기 염기로부터 유도된 것이 포함된다. 일부의 구체예는 암모늄, 칼륨, 나트륨, 칼슘 및 마그네슘염 중의 적어도 하나를 포함한다. 약제학적으로 허용되는 유기 비독성 염기로부터 유도된 염에는 이소프로필아민, 트리메틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 트리프로필아민, 및 에탄올아민과 같은 일급, 이급 및 삼급 아민, 천연적으로 존재하는 치환된 아민을 포함하는 치환된 아민, 사이클릭 아민 및 염기성 이온교환수지의 염이 포함된다. 생체 내 투여를 위해서 사용되는 제제는 멸균될 수 있다. 이것은 멸균 여과막을 통한 여과 또는 그 밖의 다른 방법에 의해서 쉽게 성취된다.

[0128] 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 또한, 이뮤노리포솜 (immunoliposome)으로서 제형될 수 있다. 리포솜은 포유동물에 대한 치료학적 약제의 전달에 유용한 다양한 타입의 지질, 인지질 및/또는 계면활성제를 포함하는 작은 소포체이다. CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 함유하는 리포솜은 본 기술분야에서 공지된 방법에 의해서 제조된다. 리포솜의 성분은 통상적으로, 생물학적 막의 지질 배열과 유사한 이중층 (bilayer) 형성으로 배열된다. 특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 사용한 역상 증발방법에 의해서 생성될 수 있다. 리포솜은 바람직한 직경을 갖는 리포솜을 수득하도록 규정된 공극 크기의 필터를 통해서 압출된다.

[0129] CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신 및 그 밖의 다른 치료학적 활성제는 또한, 코아세르베이션 (coacervation) 기술, 계면 중합반응 (예를 들어, 하이드록시메틸셀룰로즈 또는 젤라틴-마이크로캡셀, 또는 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡셀을 사용)을 포함하는 (단, 이들로 제한되지 않는다) 방법에 의해서 제조된 마이크로캡셀, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 미립구, 마이크로에멀전, 나노-입자, 및 나노캡셀), 및 마크로에멀전 내에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 온전히 참고로 포함된 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed., 1980]에 기술되어 있다. 서방성 제제가 제조될 수 있다. 서방성 제제의 적합한 예는 고체 소수성 폴리머의 반투과성 매트릭스를 포함하며, 이 매트릭스는 성형된 제품, 예를 들어, 필름 또는 마이크로캡셀의 형태이다. 서방성 매트릭스의 예로는 폴리에스테르, 하이드로겔 (예를 들어, 폴리(2-하이드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드, L-글루탐산과 감마 에틸-L-글루타메이트의 코폴리머, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 루프론 데포 (Lupron Depot®) (락트산-글리콜산 코폴리머 및 류프롤라이드 아세테이트로 구성된 주사용 미립구)와 같은 분해성 락트산-글리콜산 코폴리머, 폴리-D-(-)-3-하이드록시부티르산, 및 폴리-DL-락티드-코-글리콜리드 (PLG)의 매트릭스 내에 혼입된 바람직한 생물활성 분자로 구성된 미립구-기본 전달 시스템인 프로리아제 (ProLease®) (Alkermes로부터 상업적으로 입수할 수 있음)에 포함된다.

[0130] 투여

[0131] 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 포함하는, 예를 들어, 멸균 수용액의 형태인 약제학적 조성물의 투여는 경구, 피하, 정맥내, 비내, 이내 (intraotically), 경피, 국소 (예를 들어, 젤, 연고 (salves), 로션, 크림 등), 복강내, 근육내, 폐내, 질내, 비경구, 직장, 또는 안내를 포함하는 (단, 이들로 제한되지 않는다) 다양한 방식으로 이루어질 수 있다. 일부의 경우에, 예를 들어, 창상, 염증 등의 치료를 위해서 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 용액 또는 스프레이로서 직접 적용될 수 있다. 본 기술분야에서 공지된 바와 같이, 약제학적 조성물은 은 도입의 방식에 따라 제형될 수 있다.

[0132] 피하 투여는 환자가 약제학적 조성물을 자체-투여할 수 있는 환경에서 사용될 수 있다. 다수의 단백질 치료제는 치료학적 유효 용량을 피하 투여에 허용되는 최대 용적으로 제형화하는 것을 허용하기에 충분히 강력하지 않다. 이 문제는 아르기닌-HCl, 히스티딘 및 폴리소르베이트를 포함하는 단백질 제제의 사용에 의해서 부분적으로 처리될 수 있다. 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 예를 들어, 증가된 효력, 개선된 혈청 반감기 또는 증진된 용해도로 인하여 피하 투여가 더 가능할 수 있다. 본 기술분야에서 공지된 바와 같이, 단백질 치료제는 종종 IV 주입 또는 볼루스 (bolus)에 의해서 전달된다. 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 또한 이러한 방법을 사용하여 전달될 수 있다. 예를 들어, 투여는 주입 비히클로서 0.9% 염화나트륨과 함께 정맥내 주입함으로써 이루어질 수 있다.

[0133] 폐 전달은 흡입기 (inhaler) 또는 분무기 (nebulizer) 및 에어로졸화제를 포함하는 제제를 사용하여 성취될 수

있다. 예를 들어, AERx™ 흡입가능한 기술 (Aradigm으로부터 상업적으로 이용할 수 있음), 또는 인헨스 (Inhance™) 패 전달 시스템 (Nektar Therapeutics로부터 상업적으로 이용할 수 있음)가 사용될 수 있다. 더구나, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 경구 전달이 가능할 수 있다.

[0134] 또한, 다수의 전달 시스템 중의 어떤 것이라도 본 기술분야에서 공지되어 있으며, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 투여하기 위해서 사용될 수 있다. 예로는 리포솜, 미립구 (예를 들어, PLA/PGA 미립구) 등에 캡셀화하는 것이 포함되나, 이들로 제한되지 않는다. 대신으로, 막 또는 섬유를 포함한 다공성, 비-다공성 또는 젤라틴성 물질의 임플란트 (implant)가 사용될 수 있다. 서방출 시스템은 폴리에스테르, 하이드로겔, 폴리(비닐 알콜), 폴리락티드, L-글루탐산과 에틸-L-글루타메이트의 코폴리머, 에틸렌-비닐 아세테이트, 루프론 데포 (Lupron Depot®)와 같은 락트산-글리콜산 코폴리머, 및 폴리-D-(-)-3-하이드록시부티르산과 같은 폴리머 물질 또는 매트릭스를 포함할 수 있다. 또한, 예를 들어, 레트로바이러스 감염, 직접 주사, 또는 지질, 세포 표면 수용체 또는 그 밖의 다른 형질감염체에 의한 코팅에 의해서 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 코딩화한 핵산을 투여할 수도 있다. 모든 경우에, 제어 방출 시스템을 사용하여 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신을 원하는 작용 위치에서 또는 그에 근접하게 방출시킬 수 있다.

[0135] 투약량

[0136] 투약량 및 투여의 빈도는 일 구현예에서, 치료학적으로 또는 예방적으로 효과적이 되도록 선택된다. 본 기술분야에서 공지된 바와 같이, 단백질 분해, 전신 대 국제화된 전달, 및 새로운 프로테아제 합성을뿐만 아니라 연령, 체중, 일반적 건강, 성별, 다이어트, 투여의 시간, 약물 상호작용 및 사태의 중증도에 관한 조정이 필요할 수 있으며, 본 기술분야에서 숙련된 전문가에 의한 일상적인 실험에 의해서 확인될 것이다.

[0137] 제제 내의 치료학적 활성 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 농도는 약 0.1 내지 100 중량%로 달라질 수 있다. 일 구현예에서, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 농도는 0.003 내지 1.0 몰 (molar)의 범위이다. 환자를 치료하기 위해서는 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 치료학적 유효량이 투여될 수 있다. 본 명세서에서 "치료학적 유효량"은 이것이 투여되는 효과를 제공하는 용량을 의미한다. 정확한 용량은 치료의 목적에 따라 좌우될 수 있으며, 공지된 기술을 사용하여 본 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 확인될 것이다. 투약량은 체중의 kg당 0.0001 내지 100 mg 또는 그 초과, 예를 들어, 체중의 kg당 0.1, 1, 10 또는 50 mg의 범위일 수 있다. 일 구현예에서, 투약량은 1 내지 10 mg/kg의 범위이다.

[0138] 일부의 구체예에서는, 단지 단일 용량의 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신이 사용된다. 다른 구체예에서는, 수회 용량의 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신이 투여된다. 투여 사이의 경과시간은 1 시간 미만, 약 1 시간, 약 1-2 시간, 약 2-3 시간, 약 3-4 시간, 약 6 시간, 약 12 시간, 약 24 시간, 약 48 시간, 약 2-4일, 약 4-6일, 약 1주, 약 2주, 또는 2주 이상일 수 있다.

[0139] 다른 구체예에서, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 연속 주입, 또는 연장된 휴지기간이 없는 빈번한 투여에 의해서 규칙적 (metronomic) 투약 레지멘으로 투여된다. 이러한 규칙적 투여는 휴지기간이 없이 일정한 간격으로 투약하는 것을 수반할 수 있다. 전형적으로 이러한 레지멘은 연장된 기간 동안, 예를 들어, 1-2일, 1-2주, 1-2 개월, 또는 6 개월 또는 그 초과까지의 만성적인 저용량 또는 연속적 주입을 포함한다. 더 저용량의 사용은 부작용 및 휴지기간의 필요성을 최소화시킬 수 있다.

[0140] 특정의 구체예에서는, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신 및 하나 또는 그 초과 다른 예방 또는 치료제가 환자에게 주기적으로 투여된다. 주기적 (cycling) 치료법은 첫 번째 시기에는 제1 약제의 투여, 두 번째 시기에는 제2 약제, 임의로 추가의 시기에 추가의 약제, 임의로 휴지 기간, 및 이어서 이 순서의 투여를 1 회 또는 그 초과 반복하는 것을 포함한다. 주기의 수는 전형적으로 2-10이다. 주기적 요법은 하나 또는 그 초과 약제에 대한 저항성의 발생을 감소시킬 수 있거나, 부작용을 최소화시킬 수 있거나, 치료 효능을 개선시킬 수 있다.

[0141] 병용요법

[0142] 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 하나 또는 그 초과 다른 치료학적 레지멘 또는 약제와 동시에 투여될 수 있다. 추가의 치료학적 레지멘 또는 약제는 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 효능 또는 안정성을 개선시키기 위해서 사용될 수 있다. 또한, 추가의 치료학적 레지멘 또는 약제는 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 작용을 변화시키기보다는 동일한 질병 또는 공존질환 (comorbidity)을 치료하기 위해서 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 화학요법, 방사선 요법, 또는 화학요법 및 방사선 요법 둘 다와 함께 환자에게 투여될 수 있다.

- [0143] 용어 "~와 함께" 및 "공동-투여"는 정확하게 동시에 상기의 예방 또는 치료제를 투여하는 것으로 제한되지 않는다. 대신에, 이것은 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신 및 다른 약제 또는 약제들을 이들이 함께 작용하여 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신 또는 다른 약제 또는 약제들 단독으로 치료한 경우에 대비해서 증가된 효과를 제공할 수 있도록 하는 시간 간격 내에서, 및 순서대로 투여하는 것을 의미한다. 일부의 구체예에서, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신 및 다른 약제 또는 약제들은 상가적으로, 및 때때로는 상승적으로 작용한다. 이러한 분자들은 적합하게는 계획된 목적에 효과적인 양으로 함께 존재한다. 숙련된 의료 전문가가는 경험적으로, 또는 약제의 약력학 및 작용 모드를 고려함으로써 각각의 치료제의 적절한 용량 또는 용량들뿐만 아니라 투여의 적절한 시기 및 방법을 결정할 수 있다.
- [0144] 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 세포독성제, 화학요법제, 항생제, 항진균제, 항바이러스제, 사이토킨, 성장억제제, 항-호르몬제, 키나제 억제제, 항-혈관신생제, 심장보호제, 면역 자극제, 면역억제제, 혈액학적 세포의 증식을 촉진시키는 약제, 혈관신생 억제제, 단백질 티로신 키나제 (PTK) 억제제, 그 밖의 다른 항체, Fc 융합물, 또는 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신, 또는 그 밖의 다른 치료제를 포함하는 (단, 이들로 제한되지 않는다) 하나 또는 그 초과와 다른 예방 또는 치료제와 함께 투여될 수 있다. 본 발명의 치료는 다른 면역요법과 조합될 수 있다. 본 발명의 치료는 항체 및 Fc 융합물을 포함하는 (단, 이들로 제한되지 않는다) 케모킨 또는 사이토킨의 길항제와 조합될 수 있다.
- [0145] 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 다른 치료학적 레지멘과 조합될 수 있다. 예를 들어, 일 구체예에서 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신에 의해서 치료되는 환자는 또한 방사선 요법을 받을 수 있다. 방사선 요법은 본 기술분야에서 통상적으로 사용되며, 숙련된 전문가에게 공지된 프로토콜에 따라 투여될 수 있다. 이러한 치료법은 세슘, 이리듐, 요오드, 또는 코발트 방사선이 포함되나 이들로 제한되지 않는다. 방사선 요법은 전신 조사일 수 있거나, 폐, 방광, 또는 전립선과 같은 신체 내의 또는 신체 상의 특정한 부위 또는 조직에 국소적으로 유도될 수 있다. 임의로, 방사선 요법은 단일 용량으로, 또는 수회, 순차적 용량으로 투여될 수 있다. 숙련된 의료 전문가가는 본 발명에서 유용한 방사선 요법의 적절한 용량 또는 용량들을 경험적으로 결정할 수 있다. 또 다른 것에 따라, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신 및 하나 또는 그 초과와 다른 항암요법이 생체외에서 암세포를 치료하기 위해서 사용된다. 이러한 생체외 치료는 골수 이식, 및 특히 자가유래 골수 이식에 유용할 수 있는 것으로 생각된다. 예를 들어, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신 및 상술한 것과 같은 하나 또는 그 초과와 다른 항암요법에 의한 암세포를 함유하는 세포 또는 조직(들)의 치료는 수용주 환자에게서 이식 전에 암세포를 고갈시키거나 실질적으로 고갈시키기 위해서 사용될 수 있다. 물론, 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 수술과 같은 다른 치료학적 기술과 함께 사용할 수 있는 것으로 생각된다.
- [0146] 본 발명의 특별한 구체예는 설명을 목적으로 상기에 기술되어 있는 반면에, 상세한 사항의 다수의 변형이 첨부된 특허청구범위에 기술된 바와 같은 본 발명으로부터 벗어남이 없이 이루어질 수 있다는 것은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 이해될 것이다. 본 명세서에서 인용된 모든 참고문헌은 온전히 그대로 포함된다.
- [0147] **실시예**
- [0148] 실시예들은 본 발명을 설명하기 위해서 이하에 제공된다. 이들 실시예는 본 발명을 작업의 어떤 특별한 적용 또는 이론으로 제한하는 것을 의미하지 않는다.
- [0149] **실시예 1. B7-1 및 B7-2의 결합을 증진시킨 조작된 CTLA4-Ig 변이체**
- [0150] 전체 길이 인간 CTLA4의 아미노산 서열은 도 1에 제공된다. B7-1 및 B7-2와의 상호작용에 책임이 있는 세포외도메인 (ECD)도 또한 도 1에 제공된다.
- [0151] CTLA4의 이뮤노어드헤신 (Fc 융합물)은 ECD (또는 ECD의 일부 변이체)를 IgG의 Fc 영역에 연결함으로써 구성될 수 있다. 천연 인간 IgG's (IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4)의 Fc 영역은 도 2에 제공된다. 도 2에 제공된 IgG1 Fc는 356D/358L 할로타입을 함유하지만, 그 밖의 다른 할로타입 또는 알로타입 형태가 사용될 수도 있다 (예를 들어, 356E/358M). 여기에서 Fc 영역은 EU 넘버링 형식을 기초로 하여 위치 230에서 C-말단까지로 정의된다. 아바타셉트는 P238S 치환을 함유하는 변형된 IgG1에 연결된 CTLA4의 이뮤노어드헤신이다 (도 2에서 Fc(IgG1-238S)로 칭함). 본 발명의 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 위치 238에서 세린 또는 프롤린을 포함할 수 있다 (즉, CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신은 238S 또는 238P를 포함할 수 있다). 하부 힌지 영역에 4개의 IgG1 변형을 갖는 IgG2 Fc 영역을 포함한 IgG Fc 영역의 다른 변이체 버전도 또한 도 2에 제공된다 (Fc(IgG2-233E/234L/235L/236G로 칭함).
- [0152] CTLA4 ECD는 다양한 링커를 통해서 Fc 영역에 연결될 수 있다. 본 발명에서 사용된 링커는 CH1 도메인 및 상부 힌지의 C-말단성 말단을 포함하는 인간 IgG 불변 쇠로부터의 서열을 포함한다. 천연 IgG 이소타입을 기초로 한

예시적인 링커 서열은 도 3에 제공된다. 변형된 링커가 사용될 수도 있다. 본 작업에서 사용된 예시적인 링커는 시스테인이 세린으로 대체된 변형된 IgG 링커 (예를 들어, IgG1- 또는 IgG2-기본 링커)이다. 아바타셋트는 N-말단 글루타민의 삽입 이외에도 시스테인의 세린 치환이 있는 변형된 IgG1 링커를 사용한다. 이러한 링커의 예는 또한 도 3에 제공된다.

[0153] 본 연구에서 사용된 링커와 Fc 영역의 예시적인 조합의 예는 도 4에 제공된다. 이들에는 Ig(ab)로 불리는 아바타셋트의 Fc 영역뿐만 아니라, IgG2 Fc 영역 내에 조립된 하부 힌지 내의 4개의 IgG1 변형 (233E/234L/235L/236G)을 함유하는, Ig(G2) 및 Ig(G2-ELLG)로 불리는 IgG2 Fc 영역을 기초로 하는 2개의 융합물이 포함된다. 예시적인 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤션은 도 5에 제공된다. 이들에는 또한 CTLA4-Ig(ab)로도 불리는 아바타셋트, CTLA4-Ig(G2)로 불리는 아바타셋트의 IgG2 Fc-기본 버전, 및 B7-1 및 B7-2에 대한 친화성을 증진시킨 것으로 CTLA4 부분 내에 2개의 치환 A29Y 및 L104E를 갖는 아바타셋트의 변이체 버전인 벨라타셋트가 포함된다.

[0154] 인간 B7-1 (CD80) 및 B7-2 (CD86)에 대한 인간 CTLA4의 친화성을 증진시키기 위해서, CTLA4 변이체는 합리적인 구조-기본 접근방법 (rational structure-based approach)을 사용하여 디자인되었다. 인간 CTLA4와 인간 B7-1 [Stamper et al., 2001, Nature 410:608-611] 및 B7-2 [Schwartz et al., 2001, Nature 410:604-608] 사이의 컴플렉스의 고-분해능 (high-resolution) 구조는 입수할 수 있다. 디자인된 변이체의 라이브러리는 다음과 같이 제공된다: A29K, A29N, A29E, A29W, A29F, A29Y, A29H, A29Q, A29R, T30D, T30V, T30A, T30N, T30E, T30H, T30R, E31I, E31M, E31T, E31V, E31D, R33F, R33T, R33M, R33W, R33I, R33Y, R33L, R33E, R33Q, T35E, T35V, T35M, T35D, T35F, T35Y, A49T, A49F, A49Y, A49W, A49D, A49E, T51V, T51L, T51N, T51H, T51Q, T51E, T51S, T51R, T51D, M53E, M53Q, M53Y, M53W, M53F, M53H, T59V, T59L, T59N, T59Y, T59H, T59Q, T59I, L61D, L61E, L61I, L61A, L61F, L61G, L61H, L61K, L61M, L61N, L61P, L61Q, L61R, L61S, L61T, L61V, L61W, L61Y, D63E, S64K, S64R, S64Y, K93D, K93E, K93F, K93H, K93Q, K93R, K93T, K93V, K93W, K93Y, K93N, K93S, E95D, E95Q, E95Y, E95H, E95L, M97F, M97D, M97N, M97I, M97V, Y98F, Y98W, Y102F, Y102W, Y103F, Y103W, Y103H, Y103D, Y103E, Y103N, Y103Q, L104D, L104E, L104V, L104M, L104Y, L104W, L104F, L104H, G105D, G105E, I106E, 및 I106Y.

[0155] CTLA4 단백질을 코드화한 유전자는 상업적으로 합성되었으며 (Blue Heron Biotechnologies, Bothell, WA), 인간 IgG 불변 영역을 함유하는 포유동물 발현 벡터 pTT5 [Durocher Y, et al., 2002, Nucleic Acids Res 30[2]: E9] 내에 서브클로닝되었다. 아미노산 변형은 퀵체인지 (QuikChange®) 부위-지시된 돌연변이유발 방법 (Stratagene, La Jolla CA)을 사용하는 부위-지시된 돌연변이유발을 사용하여 아바타셋트 CTLA4-Ig(ab) 구조물의 상부에서 구성되었다. 벨라타셋트 CTLA4(A29Y/L104E)-Ig(ab)는 또한 대조군으로써 구성되었다. 모든 DNA는 서열의 적합성을 확인하기 위하여 서열 결정하였다. CTLA4-Ig 유전자를 함유하는 플라스미드를 6-웰 플레이트 체제에서 작은 (3 ml) 규모로 리포펙타민 (lipofectamine™) (Invitrogen, Carlsbad CA)을 사용하여 293E 세포 [Durocher Y, et al., 2002, Nucleic Acids Res 30[2]: E9; Biotechnology Research Institute, National Research Council Canada] 내로 형질감염시키고, 프리스타일 (FreeStyle™) 293 배지 (Invitrogen, Carlsbad CA) 내에서 성장시켰다. 성장의 5일 후에, 변이체 단백질을 상등액으로부터 직접 표적 결합에 대해서 선별하였다. 성장의 5일 후에, 단백질을 맵셀렉트 (MabSelect™) 수지 (GE Healthcare)를 사용하여 단백질 A 친화성에 의해 배양 상등액으로부터 정제하였다.

[0156] 변이체 CTLA4-Ig Fc 융합 단백질은 표면 플라즈몬 공명을 사용하여 B7-1 및 B7-2에 대한 결합에 관해 선별하였다. 결합 측정은 비아코어 (Biacore™) 3000 장치 (Biacore)를 사용하여 수행되었다. 센서 칩을 안티-His-태그 mAb에 이어서 1.5 분 동안 각각 100 nM 및 200 nM의 B7-1-Ig 또는 B7-2-Ig (둘 다 R&D Systems으로부터)를 포획시킴으로써 유도체화시켰다. HBS-EP 완충액 (Biacore) 내의 변이체 및 대조군 CTLA4-Ig 단백질을 1 분 동안 주입하고, 이어서 2 분 동안 해리시켰다. 데이터는 수용체의 주입 전의 시간 및 반응을 제로화하고, 적절한 비특이적 시그널 (참고 채널 및 유동 (running) 완충액의 주입의 반응)을 제외시킴으로써 처리하였다. 해리 센서 그래프는 비아이벨류에이션 (BIAevaluation) 소프트웨어를 사용하여 해리 속도 상수 (오프-율 (off-rate) 또는 k_d 또는 k_{off})를 획득하도록 설치하였다. 3개의 별개의 결합 실험으로부터의 결과는 두 가지 항원에 대한 결합에 관한 오프-율에서의 개선 또는 감소 폴드 (fold)와 함께 표 1에 제공하였다.

[0157] [표 1]

[0158] B7-1 및 B7-2에 대한 CTLA4-Ig 변이체의 결합에 관한 오프-율 (k_{off})

변이체	B7-1 (k_{off})	B7-2 (k_{off})	폴드 B7-1	폴드 B7-2
실험 1				
아바타셉트 (WT)	9.32E-04	5.53E-03	1.00	1.00
벨라타셉트	2.92E-04	1.30E-03	3.19	4.25
A29K	6.35E-04	1.77E-03	1.47	3.12
T30D	1.03E-03	5.79E-03	0.90	0.96
E31I	2.26E-03	4.27E-03	0.41	1.30
R33F	NB	NB	0.00	0.00
T35E	NB	NB	0.00	0.00
A49T	4.18E-03	1.60E-02	0.22	0.35
T51V	9.52E-04	6.40E-03	0.98	0.86
M53E	1.00E-03	6.20E-03	0.93	0.89
T59V	1.04E-03	5.77E-03	0.90	0.96
L61D	1.02E-03	2.48E-03	0.91	2.23
D63E	1.05E-03	6.51E-03	0.89	0.85
S64K	7.51E-04	6.94E-03	1.24	0.80
K93D	NB	NB	0.00	0.00
E95D	NB	NB	0.00	0.00
M97F	3.33E-03	NB	0.28	0.00
Y98F	1.11E-03	NB	0.84	0.00
Y102F	3.67E-03	NB	0.25	0.00
Y103F	1.47E-03	4.35E-03	0.63	1.27
L104D	3.16E-04	4.62E-03	2.95	1.20
G105D	NB	NB	0.00	0.00
실험 2				
아바타셉트 (WT)	1.01E-03	5.19E-03	1.00	1.00
벨라타셉트	3.46E-04	1.32E-03	3.19	4.25
A29K	8.87E-04	2.07E-03	1.14	2.51
A29N	1.71E-03	5.16E-03	0.59	1.01
A29E	9.53E-04	6.04E-03	1.06	0.86
A29W	8.37E-04	2.38E-03	1.21	2.18
A29F	1.16E-03	0.0107	0.87	0.49
A29Y	7.56E-04	3.11E-03	1.34	1.67
A29H	6.63E-04	1.92E-03	1.52	2.70
T30V	1.26E-03	5.80E-03	0.80	0.89
T30A	1.60E-03	5.39E-03	0.63	0.96
T30N	1.10E-03	4.10E-03	0.92	1.27
T30E	1.01E-03	3.83E-03	1.00	1.36
T30H	1.18E-03	4.17E-03	0.86	1.24

[0159]

변이체	B7-1 (k_{off})	B7-2 (k_{off})	폴드 B7-1	폴드 B7-2
T30R	1.34E-03	4.12E-03	0.75	1.26
E31M	7.65E-04	NB	1.32	0.00
E31T	9.65E-04	NB	1.05	0.00
E31V	1.49E-03	NB	0.68	0.00
E31D	5.61E-03	0.0243	0.18	0.21
R33T	NB	NB	0.00	0.00
R33M	NB	NB	0.00	0.00
R33W	NB	NB	0.00	0.00
R33I	NB	NB	0.00	0.00
R33Y	NB	NB	0.00	0.00
R33L	NB	NB	0.00	0.00
R33E	NB	NB	0.00	0.00
R33Q	9.34E-03	NB	0.11	0.00
T35V	NB	NB	0.00	0.00
T35M	NB	NB	0.00	0.00
T35D	NB	NB	0.00	0.00
T35F	NB	NB	0.00	0.00
T35Y	NB	NB	0.00	0.00
A49F	2.49E-03	0.031	0.41	0.17
A49Y	1.98E-03	0.0379	0.51	0.14
A49W	3.86E-03	6.38E-03	0.26	0.81
A49D	3.10E-03	0.0337	0.33	0.15
A49E	4.06E-03	NB	0.25	NB
T51L	1.47E-03	NB	0.69	NB
T51N	1.85E-03	2.42E-03	0.55	2.14
T51H	2.81E-03	0.0475	0.36	0.11
M53Q	1.49E-03	4.71E-03	0.68	1.10
M53Y	7.01E-04	4.66E-03	1.44	1.11
T59L	9.54E-04	5.14E-03	1.06	1.01
T59N	1.11E-03	5.18E-03	0.91	1.00
T59Y	1.05E-03	5.29E-03	0.96	0.98
T59H	1.15E-03	5.51E-03	0.88	0.94
T59Q	1.20E-03	5.18E-03	0.84	1.00
T59I	1.14E-03	5.50E-03	0.89	0.94
L61E	1.03E-03	3.48E-03	0.98	1.49
L61I	1.18E-03	6.30E-03	0.86	0.82
L61A	8.66E-04	3.79E-03	1.17	1.37
L61F	1.04E-03	5.86E-03	0.97	0.89
실험 3				
아바타셉트 (WT)	1.16E-03	5.45E-03	1.00	1.00
벨라타셉트	3.98E-04	1.41E-03	2.91	3.87
L61G	9.66E-04	2.11E-03	1.20	2.58
L61H	8.67E-04	4.39E-03	1.34	1.24
L61K	1.29E-03	2.63E-03	0.90	2.07
L61M	1.07E-03	5.01E-03	1.08	1.09
L61N	1.33E-03	2.68E-03	0.87	2.03

[0160]

변이체	B7-1 (k_{off})	B7-2 (k_{off})	폴드 B7-1	폴드 B7-2
L61P	8.55E-04	2.79E-03	1.36	1.95
L61Q	1.87E-04	6.98E-03	6.20	0.78
L61R	1.06E-03	3.10E-03	1.09	1.76
L61S	9.81E-04	3.18E-03	1.18	1.71
L61T	1.29E-03	3.20E-03	0.90	1.70
L61V	1.33E-03	6.09E-03	0.87	0.89
L61W	9.37E-04	3.74E-03	1.24	1.46
L61Y	8.76E-04	4.79E-03	1.32	1.14
S64R	1.08E-03	7.22E-03	1.07	0.75
S64Y	NB	NB	0.00	0.00
K93E	NB	NB	0.00	0.00
K93F	NB	NB	0.00	0.00
K93H	NB	NB	0.00	0.00
K93Q	4.72E-04	3.68E-03	2.46	1.48
K93R	3.06E-04	6.06E-03	3.79	0.90
K93T	NB	NB	0.00	0.00
K93V	1.67E-04	4.77E-03	6.95	1.14
K93W	NB	NB	0.00	0.00
K93Y	NB	NB	0.00	0.00
E95Q	NB	NB	0.00	0.00
E95Y	NB	NB	0.00	0.00
E95H	NB	NB	0.00	0.00
E95L	NB	NB	0.00	0.00
M97D	NB	NB	0.00	0.00
M97N	5.32E-03	NB	0.22	0.00
M97I	5.60E-03	NB	0.21	0.00
M97V	0.0527	NB	0.02	0.00
Y98W	3.25E-03	NB	0.36	0.00
Y102W	NB	NB	0.00	0.00
Y103W	2.21E-03	0.0499	0.52	0.11
Y103H	2.51E-03	4.19E-03	0.46	1.30
Y103D	5.88E-04	2.46E-03	1.97	2.22
Y103E	7.30E-04	9.16E-04	1.59	5.95
Y103N	1.03E-03	7.40E-04	1.13	7.36
Y103Q	4.35E-04	7.52E-04	2.67	7.25
L104E	4.96E-04	3.08E-03	2.34	1.77
L104V	1.04E-03	3.75E-03	1.12	1.45
L104M	1.57E-03	4.16E-03	0.74	1.31
L104Y	8.54E-04	5.03E-03	1.36	1.08
L104W	8.42E-04	5.38E-03	1.38	1.01
L104F	1.13E-03	5.85E-03	1.03	0.93
L104H	5.94E-04	6.70E-03	1.95	0.81
G105E	NB	NB	0.00	0.00
I106E	7.81E-04	5.35E-03	1.49	1.02
I106Y	2.24E-03	4.29E-03	0.52	1.27

[0161]

[0162]

오프-율 (k_{off})은 E 지수 표기법 (scientific E notation)으로 표시되며, 여기에서 E는 파워 (power)까지 상승된 10의 배수를 나타낸다; 폴드 B7-1 = B7-1에 대한 결합에 관한 k_{off} (아바타셉트)/ k_{off} (변이체); 폴드 B7-2 = B7-2에 대한 결합에 관한 k_{off} (아바타셉트)/ k_{off} (변이체; NB = 결합이 관찰되지 않았다.

[0163]

아바타셉트에 대비한 폴드(k_{off})의 플롯은 도 6에 나타낸다. 표 1 및 도 6으로부터 볼 수 있는 바와 같이, 다수의 치환은 아바타셉트 모 단백질보다 더 느린 해리 (더 큰 결합)을 나타내었다.

[0164]

아바타셉트보다 더 느린 B7-1 및/또는 B7-2에 대한 해리 속도를 갖는 변이체를 더 큰 규모로 재발현시키고, 상술한 바와 같이 정제하였다. 단백질 농도는 280 nm에서의 흡광도에 의해서 결정하였다. B7-1 및 B7-2에 대한 결합 친화성은 CTLA4-Ig 단백질의 농도 시리즈를 사용하여 비아코어 (Biacore™)로 측정하였다. 모든 변이체 CTLA4-Ig 단백질은 단백질 A 결합에 의해 1 μ M 및 그 다음에는 QCd에 대해서 표준화하였다. 안티-His-침을 상기한 바와 같이 생성시키고, B7-1 및 B7-2는 각각 50 nM에서 1 분 및 100 nM에서 2 분 동안 고정화시켰다. CTLA4-Ig 단백질을 50, 25, 12.5 및 6.25 nM에서 출발하여 2배 계열로 희석하고, 1 분 동안 주입시킨 다음에 2 분 해리시켰다. 동적 데이터 (kinetic data)는 비아이벨류에이션 소프트웨어를 사용하여 1:1 결합 모델

(Langmuir)에 맞추어 해리 속도 상수 (k_d 또는 k_{off}), 결합 속도 상수 (k_a 또는 k_{on}), 및 평형 해리 상수 (K_D 또는 K_D)를 제공하였다. 결합 친화성은 표 2 (B7-1) 및 표 3 (B7-2)에 제공된다.

[0165] [표 2]

[0166] CTLA4-Ig 변이체의 B7-1 결합 친화성 및 동적 상수

변이체	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)	폴드 K_D
아바타셉트	2.38E+06	1.64E-03	6.91E-10	1.00
벨라타셉트	2.16E+06	7.75E-04	3.59E-10	1.92
A29K	9.18E+05	1.39E-03	1.52E-09	0.45
A29W	1.97E+06	1.42E-03	7.22E-10	0.96
A29Y	3.07E+06	1.26E-03	4.09E-10	1.69
A29H	2.34E+06	1.08E-03	4.62E-10	1.50
T51N	1.95E+06	3.16E-03	1.62E-09	0.43
M53Y	2.64E+06	1.18E-03	4.45E-10	1.55
L61D	3.26E+06	2.04E-03	6.26E-10	1.10
L61E	2.63E+06	1.65E-03	6.25E-10	1.11
L61G	2.76E+06	1.52E-03	5.49E-10	1.26
L61K	2.24E+06	1.85E-03	8.27E-10	0.84
L61N	2.60E+06	2.03E-03	7.82E-10	0.88
K93Q	2.57E+06	8.75E-04	3.40E-10	2.03
K93R	1.16E+06	1.47E-03	1.26E-09	0.55
K93V	1.15E+06	7.54E-04	6.55E-10	1.05
Y103D	2.01E+06	0.0105	5.24E-09	0.13
Y103E	2.45E+06	0.0143	5.85E-09	0.12
Y103N	2.14E+06	0.0188	8.77E-09	0.08
Y103Q	1.83E+06	8.17E-03	4.48E-09	0.15
L104D	5.57E+05	2.11E-03	3.79E-09	0.18
L104E	2.47E+06	8.90E-04	3.60E-10	1.92
L104V	2.54E+06	1.54E-03	6.05E-10	1.14

[0167]

[0168] k_{on} = 온-율 (on-rate); k_{off} = 오프-율; K_D = 평형 해리 상수; 폴드 K_D = K_D (아바타셉트)/ K_D (변이체)

[0169] [표 3]

[0170] CTLA4-Ig 변이체의 B7-2 결합 친화성 및 동적 상수

변이체	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)	폴드 K_D
아바타셉트	3.64E+06	1.66E-02	4.55E-09	1.00
벨라타셉트	3.35E+06	2.18E-03	6.52E-10	6.98
A29K	1.55E+06	3.96E-03	2.55E-09	1.78
A29W	3.28E+06	4.74E-03	1.44E-09	3.16
A29Y	4.45E+06	6.29E-03	1.41E-09	3.23
A29H	3.35E+06	3.42E-03	1.02E-09	4.46
T51N	2.86E+06	5.07E-03	1.77E-09	2.57
M53Y	3.90E+06	1.17E-02	3.01E-09	1.51
L61D	4.51E+06	1.55E-02	3.44E-09	1.32
L61E	4.18E+06	1.30E-02	3.11E-09	1.46
L61G	3.54E+06	2.05E-02	5.79E-09	0.79
L61K	2.63E+06	2.76E-02	1.05E-08	0.43
L61N	3.45E+06	2.01E-02	5.81E-09	0.78
K93Q	3.80E+06	8.43E-03	2.22E-09	2.05
K93R	1.79E+06	1.71E-02	9.55E-09	0.48
K93V	1.68E+06	1.22E-02	7.30E-09	0.62
Y103D	1.11E+06	9.28E-03	8.38E-09	0.54
Y103E	1.26E+06	8.38E-03	6.64E-09	0.69
Y103N	1.54E+06	0.0143	9.27E-09	0.49
Y103Q	1.53E+06	7.46E-03	4.89E-09	0.93
L104D	8.37E+05	1.75E-02	2.09E-08	0.22
L104E	3.93E+06	6.25E-03	1.59E-09	2.86
L104V	3.47E+06	1.47E-02	4.22E-09	1.08

[0171]

[0172] k_{on} = 온-율; k_{off} = 오프-율; K_D = 평형 해리 상수; 폴드 K_D = $K_D(\text{아바타셉트})/K_D(\text{변이체})$

[0173] 단일 치환 선별의 결과를 기초로 하여, 조합 변이체 및 추가의 단일 치환 변이체의 라이브러리를 디자인하였다. 새로운 변이체는 표 4 및 5에 열거하였다. 변이체는 상술한 바와 같이 구성하고, 발현시키고, 정제하였다. B7 표적에 대한 결합은 상술한 바와 같이 측정하고, 적합한 동적 속도 상수 및 친화성은 표 4 (B7-1) 및 표 5 (B7-2)에 제공된다.

[0174] [표 4]

[0175] CTLA4-Ig 변이체의 B7-1 결합 친화성 및 동적 상수

변이체	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)	폴드 K_D 아바타셉트
아바타셉트	2.26E+07	1.32E-03	5.85E-11	1.00
벨라타셉트 (A29Y/L104E)	2.21E+07	5.57E-04	2.52E-11	2.32
A29H/T51N/M53Y/L61E/K93Q	2.71E+07	6.11E-04	2.25E-11	2.60
A29H/T51N/M53Y/K93Q	1.72E+07	6.87E-04	4.01E-11	1.46
A29H/T51N/M53Y/L61E	3.20E+07	1.10E-03	3.43E-11	1.71
A29H/T51N/L61E/K93Q	3.16E+07	5.18E-04	1.64E-11	3.57
A29H/M53Y/L61E/K93Q	3.35E+07	6.09E-04	1.82E-11	3.21
T51N/M53Y/L61E/K93Q	2.72E+07	6.90E-04	2.53E-11	2.31
A29H/M53Y/K93Q	1.95E+07	6.45E-04	3.31E-11	1.77
A29H/L61E/K93Q	2.48E+07	6.45E-04	2.60E-11	2.25
A29H/T51N/L61E	3.53E+07	1.03E-03	2.92E-11	2.00
A29H/M53Y/L61E	3.30E+07	7.92E-04	2.40E-11	2.44
T51N/M53Y/L61E	1.86E+07	1.99E-03	1.07E-10	0.55
M53Y/L61E/K93Q	2.13E+07	6.85E-04	3.22E-11	1.82
T51N/L61E/K93Q	2.14E+07	7.63E-04	3.57E-11	1.64
A29H/T51N	2.12E+07	1.64E-03	7.75E-11	0.75
A29H/M53Y	1.97E+07	7.62E-04	3.87E-11	1.51
A29H/K93Q	2.26E+07	6.35E-04	2.81E-11	2.08
T51N/M53Y	1.53E+07	3.56E-03	2.32E-10	0.25
T51N/K93Q	1.76E+07	7.94E-04	4.50E-11	1.30
T51Q	1.11E+07	0.0137	1.22E-09	0.05
T51E	1.31E+07	0.0474	3.62E-09	0.02
T51S	1.20E+07	1.29E-03	1.07E-10	0.55
T51R	7.08E+06	0.0181	2.56E-09	0.02
T51D	9.86E+06	0.0359	3.64E-09	0.02
M53W	1.28E+07	2.21E-03	1.72E-10	0.34
M53F	1.12E+07	1.08E-03	9.57E-11	0.61
M53H	1.51E+07	1.48E-03	9.80E-11	0.60
K93N	NB			
K93S	1.16E+04	3.42E-04	2.96E-08	0.00
A29Q	4.33E+06	2.12E-03	4.91E-10	0.12
A29R	1.04E+06	2.22E-03	2.13E-09	0.03

[0176]

[0177] k_{on} = 온-율; k_{off} = 오프-율; K_D = 평형 해리 상수; 폴드 K_D = $K_D(\text{아바타셉트})/K_D(\text{변이체})$; NB = 검출된 결합이 없음.

[0178] [표 5]

[0179] CTLA4-Ig 변이체의 B7-2 결합 친화성 및 동적 상수

변이체	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)	폴드 K_D 아바타셉트
아바타셉트	3.10E+07	0.0135	4.37E-10	1.00
벨라타셉트 (A29Y/L104E)	3.21E+07	2.18E-03	6.79E-11	6.44
A29H/T51N/M53Y/L61E/K93Q	3.59E+07	1.20E-03	3.35E-11	13.04
A29H/T51N/M53Y/K93Q	3.55E+07	1.31E-03	3.70E-11	11.81
A29H/T51N/M53Y/L61E	5.11E+07	2.50E-03	4.89E-11	8.94
A29H/T51N/L61E/K93Q	4.68E+07	1.07E-03	2.28E-11	19.17
A29H/M53Y/L61E/K93Q	4.86E+07	1.43E-03	2.94E-11	14.86
T51N/M53Y/L61E/K93Q	4.75E+07	2.39E-03	5.05E-11	8.65
A29H/M53Y/K93Q	3.86E+07	1.34E-03	3.48E-11	12.56
A29H/L61E/K93Q	4.86E+07	1.53E-03	3.14E-11	13.92
A29H/T51N/L61E	3.77E+07	2.32E-03	6.14E-11	7.12
A29H/M53Y/L61E	3.40E+07	2.47E-03	7.27E-11	6.01
T51N/M53Y/L61E	4.31E+07	4.64E-03	1.08E-10	4.05
M53Y/L61E/K93Q	5.38E+07	5.11E-03	9.50E-11	4.60
T51N/L61E/K93Q	5.68E+07	2.29E-03	4.04E-11	10.82
A29H/T51N	3.33E+07	2.56E-03	7.69E-11	5.68
A29H/M53Y	3.27E+07	2.41E-03	7.36E-11	5.94
A29H/K93Q	3.06E+07	1.73E-03	5.65E-11	7.73
T51N/M53Y	3.37E+07	5.54E-03	1.64E-10	2.66
T51N/K93Q	3.50E+07	2.20E-03	6.29E-11	6.95
T51Q	1.29E+07	0.15	1.16E-08	0.04
T51E	NB	NB		0.00
T51S	1.41E+07	4.59E-03	3.26E-10	1.34
T51R	1.07E+07	0.0343	3.21E-09	0.14
T51D	NB	NB		0.00
M53W	1.89E+07	7.46E-03	3.95E-10	1.11
M53F	2.41E+07	9.40E-03	3.90E-10	1.12
M53H	1.31E+07	0.0132	1.01E-09	0.43
K93N	NB	NB		0.00
K93S	NB	NB		0.00
A29Q	7.92E+06	0.0164	2.07E-09	0.21
A29R	1.57E+06	0.0112	7.15E-09	0.06

[0180]

[0181] k_{on} = 온-율; k_{off} = 오프-율; K_D = 평형 해리 상수; 폴드 K_D = $K_D(\text{아바타셉트})/K_D(\text{변이체})$; NB = 검출된 결합이 없음.

[0182]

아바타셉트 및 벨라타셉트와 비교한 모든 변이체에 대한 CD80 및 CD86의 플롯은 도 7에 나타내었다. 다수의 결합된 조합 변이체는 아바타셉트 모 CTLA4-Ig에 비해 B7-1 (CD80) 및 B7-2 (CD86) 둘 다에 더 단단하게 결합하여 B7-1에 대한 3.6배까지의 결합 개선 및 B7-2에 대한 19.2배까지의 결합 개선을 제공하였다. B7-2 결합에 대한 최상의 삼중 치환 변이체는 T51N/L61E/K93Q (NEQ로 칭함)였으며, 이것은 437 pM로부터 40 pM까지 B7-2 친화성을 개선하고, 59 pM으로부터 36 pM까지 B7-1 친화성을 개선하였다. B7-2 결합에 대한 최상의 4중 치환 변이체는 A29H/T51N/L61E/K93Q (HNEQ로 칭함)였으며, 이것은 437 pM로부터 23 pM까지 B7-2 친화성을 개선하고, 59 pM로부터 16 pM까지 B7-1 친화성을 개선하였다. 아바타셉트 및 벨라타셉트와 비교한 HNEQ 변이체에 대한 최고 CTLA4-Ig 농도로부터의 센서그램의 플롯은 도 8에 나타내었다. 이들 CTLA4 변이체 및 CTLA4-Ig 변이체 단백질의 아미노산 서열은 도 9에 제공된다.

[0183]

실시예 2. 조작된 CTLA4-Ig 변이체는 시험관내에서 더 큰 T-세포 억제활성을 갖는다.

[0184]

NEQ 및 HNEQ 변이체 CTLA4-Ig 단백질은 T-세포 증식을 억제하는 그들의 능력에 대하여 세포-기본시험에서 시험하였다. 아바타셉트, 벨라타셉트, 및 B7-1 또는 B7-2에 대한 특이성이 없는 안티-RSV IgG1 항체 (음성 대조군)를 대조군으로 처리하였다. 이 시험에서, T 세포 활성화 및 증식은 안티-CD3 항체 OKT3 및 재조합체 B7-2 Fc 용합물 (R & D Systems)을 사용하여 자극하였다. U 형상 조직 배양 플레이트를 4°C에서 밤새 PBS 중의 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CD86-Fc 및 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 안티-OKT3로 코팅하였다. 플레이트를 PBS로 3 회 세척하였다. 인간 말초혈액 단핵구 세포 (PBMC)를 피콜-파크 플러스 (Ficoll-Paque™ Plus) 밀도 구배 (Amersham Biosciences, Newark, NJ)를 사용하여 의명의 건강한 지원자 (HemaCare, VanNuys, CA)의 백혈구분리반출술 (leukapheresis)로부터 정제하였다. T 세포는 이지셉 (EasySep®) CSFE (10 μM)와 함께 인간 T 세포 풍부화 (Enrichment) 키트 (StemCell

Technologies) 및 표지된 T 세포를 사용하여 PBMC로부터 분리시켰다. CTLA4-Ig 단백질 변이체 및 대조군을 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 최고 농도로 하여 8 가지 농도에 걸쳐 4배 희석액으로 첨가하였다. 샘플은 이중으로 처리하였다. 약 500,000 T 세포를 코팅된 플레이트에 첨가하고, 37°C에서 4일 동안 배양하였다. 대조군 조건은 CD86-Fc/OKT3 코팅된 웰 상의 세포 및 세포만 (코팅 없음)을 사용하여 수행하였다. 4일의 배양 후에, 샘플을 FACSCanto2™를 사용하여 FITC 염색 (CSFE)에 대해서 분석하였다. 도 10에서의 데이터는 시험한 CTLA4-Ig 변이체 T51N/L61E/K93Q 및 A29H/T51N/L61E/K93Q가 그들의 개선된 B7-1 및 B7-2 친화성과 일치하는 것으로 모 CTLA4-Ig 아바타셉트보다 탁월함을 나타낸다. 또한, T51N/L61E/K93Q 및 A29H/T51N/L61E/K93Q 변이체는 둘 다 그들의 더 큰 B7-2 친화성과 일치하는 것으로 벨라타셉트에 비해 더 큰 억제활성을 나타내었다.

[0185] 실시예 3. 연장된 생체내 반감기 동안 FcRn에 대한 증진된 결합을 갖는 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신

[0186] CTLA4-Ig 단백질의 Fc 영역을 생체내 혈청 반감기를 개선시키는 것을 목적으로 하여 신생아 Fc 수용체 FcRn에 대한 친화성을 증진시키도록 조작하였다. FcRn 결합을 개선시키고 증진된 약력학적 특성을 제공할 수 있는 Fc 변이체에는 예를 들어, 259I, 307Q, 308F, 311I, 311V, 378V, 378T, 426V, 428L, 434S, 434H, 434F, 434Y, 434M, 436I, 및 436V [USSN 12/341,769, 2008년 12월 22일에 출원, 본 발명에 명백히 참고로 포함됨]을 포함하는 것으로서 (단, 이들로 제한되지 않는다) 위치 259, 307, 308, 311, 378, 426, 428, 434, 및 436에서의 치환이 포함되나 이들로 제한되지 않는다. FcRn에 대한 Fc 결합을 증가시킨 그 밖의 다른 변이체에는 다음의 변이체가 포함되나 이들로 제한되지 않는다: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L [Hinton et al., 2004, J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216, Hinton et al., 2006, Journal of Immunology 176:346-356], 256A, 272A, 286A, 305A, 307A, 311A, 312A, 376A, 378Q, 380A, 382A, 434A [Shields et al., Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(9):6591-6604; 이것은 온전히 참고로 포함됨], 252F, 252T, 252Y, 252W, 254T, 256S, 256R, 256Q, 256E, 256D, 256T, 309P, 311S, 433R, 433S, 433I, 433P, 433Q, 434H, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H, 및 308T/309P/311S [Dall'Acqua et al., Journal of Immunology, 2002, 169:5171-5180, Dall'Acqua et al., 2006, The Journal of Biological Chemistry 281:23514-23524; 이들은 온전히 참고로 포함됨].

[0187] 증진된 FcRn 친화성 및 연장된 반감기를 제공하는 치환 M428L 및 N434S를 아바타셉트 CTLA4-Ig(ab), CTLA4-Ig(G2), 벨라타셉트, 및 CTLA4(HNEQ) 및 CTLA4(NEQ) 변이체의 Ig(G2-ELLG) 버전의 Fc 영역으로 조작하였다. 이들 CTLA4-Ig 변이체 단백질의 아미노산 서열은 도 11에 제공하였다.

[0188] CTLA4-Ig 변이체 단백질을 상술한 바와 같이 구성하고, 발현시키고, 정제하였다. pH 6.0에서 FcRn에 대한 이들 변이체의 친화성은 비아코어 (Biacore™) 3000 장치 (Biacore™)를 사용하는 항원 매개된 이뮤노어드헤신 포획/인간 FcRn 피분석물 체제와 함께 비아코어를 사용하여 측정하였다. B7-1 및 B7-2를 표준 아민 커플링 방법을 사용하여 각각 6500 및 8400 RUs의 밀도로 CM5 칩 상에 고정시켰다. 리간드를 pH 4.0 아세트이트 완충액 중에서 각각 200 nM로 희석하였다. 표면을 4 분 동안 전체-강도 1-에틸-3-[3-디메틸아미노프로필]카보디이미드 하이드로클로라이드 (EDC) + N-하이드록시설포석신이미드 (설포-NHS)로 활성화시키고, 이어서 B7-1 또는 B7-2 Fc 용합 리간드 (R&D Systems)를 15 분 동안 2 μL /분으로 주입하였다. 마지막으로, 표면을 에탄올아민으로 차단하였다. CTLA4-Ig 단백질의 포획은 20 nM (WT IgG1 Fc) 또는 10 nM (M428L/N434S 변이체 Fc)로 2 분 동안 pH 6.0 포스페이트 완충액 중에서 수행하여 각각 1500 또는 700의 RUs를 달성하였다. 그 후, 농도 500, 250, 및 125 nM에서 인간 FcRn 피분석물 용액을 지시된 콘 (cones)에서 주입하고, 이어서 다음 주기 전에 B7 표면을 pH 4.0 아세트이트 + 500 mM NaCl 완충액으로 재생시켰다. B7 상에 존재하는 Fc-용합으로 인하여, 여기에서는 표면에 대한 직접적인 hFcRn 결합의 큰 백그라운드 있었으며, 따라서 hFcRn의 농도 시리즈를 비-고정화된 (비어있는) 표면상에 주입하여 비아이셀류레이션 분석 중에 이 배경을 수동으로 제거하였다. 배경/드리프트 (drift) 삭제 및 축제로화 (axis-zeroing) 후에, 센서그램은 비아이셀류레이션 소프트웨어 (Biacore™)를 사용하여 1:1 랑무어 (Langmuir) 결합 모델에 대해 전체적으로 적응시켰다.

[0189] 아바타셉트 CTLA4-Ig(ab) 및 Fc 조작된 버전 CTLA4-Ig(ab-LS) (LS = 428L/434S)의 결합에 대한 대표적인 센서그램은 도 12에 나타내었다. Fc 조작된 버전 CTLA4-Ig(ab-LS) 및 CTLA4-Ig(G2-LS)와 함께 아바타셉트 CTLA4-Ig(ab) 및 CTLA4-Ig(G2)에 의한 FcRn에 대한 결합에 관한 적합한 친화성은 표 6에 제공하고, 도 13에 도시하였다. 결과는 CTLA4-Ig 단백질의 Fc 조작된 버전의 FcRn에 관한 증진된 친화성, 및 따라서 더 긴 생체내 반감기 동안의 Fc 변이체 버전의 잠재력을 입증한다.

[표 6]

[0191] pH 6.0에서 인간 FcRn에 대한 CTLA4-Ig 단백질의 결합 친화성

어뮤노어드헤신	K _D (uM)	폴드
아바타셉트 CTLA4-Ig(ab)	3.4	1.0
CTLA4-Ig(ab-428L/434S)	0.28	12
CTLA4-Ig(G2)	5.0	1.0
CTLA4-Ig(G2-428L/434S)	0.23	22

[0192]

[0193] **실시예 4. 혼합 림프구 반응에서 증진된 T 세포 억제활성을 갖는 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신**

[0194]

FcRn에 대한 증진된 결합을 갖는 선택된 CTLA4-Ig 변이체를 그들의 T-세포 억제활성에 대해서 시험하였다. CTLA4-Ig 단백질을 상술한 세포-기본 시험에서 시험하였으며, 여기에서 T-세포 증식은 안티-CD3 항체 및 B7-2 Fc 융합물을 사용하여 자극하였다. 도 14의 데이터는 FcRn 친화성-증진 Fc 변이체 (M428L/N434S)와 커플링된 B7 친화성-증진된 CTLA4 변이체 (T51N/L61E/K93Q 및 A29H/T51N/L61E/K93Q)의 강력하고 탁월한 억제활성을 나타낸다.

[0195]

CTLA4-Ig 변이체의 T-세포 억제활성은 이들을 혼합-림프구 반응 (또한, 혼합-백혈구 반응 또는 MLR로도 공지됨)에서 시험함으로써 더 측정하였다. MLR은 T 헬퍼 (TH) 세포 증식을 시험하고, 세포독성 T 림프구 (CTLs)의 집단을 생성시키는 시험관내 방법이다. 동종이계 (상이한 MHC 할로타입) 림프구를 함께 배양하는 경우에, TH 세포 집단은 팽창하고, 이어서 CTL 집단이 팽창하였다. MHC/TCR 및 B7/CD28 공동-자극성 경로는 동종이계 반응에 중요하며, 인터류킨-2 (IL-2) 분비는 T 세포 활성화를 모니터링하기 위해서 사용하였다. 두개의 별도의 실험에서 2 가지 상이한 세트의 인간 PBMC를 피콜-파크 플러스 (Ficoll-Paque™ Plus) 밀도 구배 (Amersham Biosciences, Newark, NJ)를 사용하여 2 명의 상이한 의명의 건강한 지원자 (HemaCare, VanNuys, CA)의 백혈구 분리분출술로부터 정제하였다. PBMC를 각각의 웰당 $\sim 1.2 \times 10^6$ 로 300 μ l RPMI1640/10% FBS와 혼합시켰다. 두개의 실험 중의 하나에서는, 공여체 2336 및 3070으로부터의 PBMC를 혼합시키고, 다른 실험에서는 공여체 3070 및 3995로부터의 PBMC를 혼합시켰다. CTLA4-Ig 단백질 및 안티-RSV IgG1 음성 대조군은 10.4×희석 시리즈에서 제조하고, 지시된 최종 농도에서 혼합 PBMC에 첨가하였다. PBMC 단독 (별개로)을 또한 대조군으로 처리하였다. 플레이트를 6일 동안 배양하였다. 상등액을 수거하고, IL-2의 농도는 IL-2 ELISA 레전드맥스 (LegendMax™) 키트 (BioLegend)를 사용하여 측정하였다. 시험의 결과는 도 15에 제공하였다.

[0196]

도 15의 데이터는 CTLA4-Ig 변이체의 강력한 억제활성뿐만 아니라 오렌시아 (Orencia®) (아바타셉트)에 대비한 그들의 우월성을 지지한다. 놀랍게도, B7-1 및 B7-2 둘 다에 대한 HNEQ 변이체의 더 큰 친화성에도 불구하고 NEQ 변이체가 HNEQ 변이체보다 성능이 우수하였다 (표 4 및 5). HNEQ 변이체는 아바타셉트에 비해서 B7-1 친화성을 3.6배, 및 B7-2 친화성을 19.2배 개선시키는 반면에, NEQ 변이체는 아바타셉트에 비해서 B7-1 친화성을 1.6배, 및 B7-2 친화성을 10.8배 개선시킨다. NEQ 변이체의 더 큰 T-세포 억제활성은 면역반응에 있어서의 B7-1 및 B7-2의 상이한 생물학적 역할을 반영할 수 있다. 최근의 연구는 B7-2가 CD28의 우성 리간드인 반면에, B7-1은 CTLA4의 우성 리간드이고, 또한 B7-2는 CTLA-4를 면역 시냅스에 보충할 수 없는 것을 입증하였다 [Collins et al., 2002, Immunity 17:201-210; Jansson et al., 2005, J Immunol 175:1575-1585]. T 세포를 하향조절하는데 있어서의 내인성 CTLA4의 역할 [Alegre et al., 2001, Nat Rev Immunol 1:220-8]뿐만 아니라 면역반응의 조절성 T 세포 (Treg) 매개된 억제에 있어서의 그의 역할 [Sakaguchi et al., 2009, International Immunology 21[10]:1105-1111]로 인하여, 내인성 CTLA4를 선택적으로 차지하는 B7-1에 관한 증가된 친화성은 천연 억제제를 억제함으로써 T-세포 활성화를 촉진시킬 수 있다. 이러한 견지에서, 치료학적 목적에서 B7-2는 억제하는데 더 중요한 리간드일 수 있고, 따라서 CTLA4 최적화를 위한 최적의 변이체는 B7-1에 비해서 B7-2에 대한 친화성에 있어서의 증진에 선택적일 수 있다. B7-1에 비해서 B7-2에 대한 친화성을 선택적으로 개선시키는 치환에는 예를 들어, A29H, A29K, T51N, L61E, 및 Y103Q가 포함된다. 실험적 목적에서 이 선택성 가설을 시험하는 것은 반대 선택성, 즉 B7-2에 비해서 B7-1에 대해 개선된 결합을 제공하는, 예를 들어, K93V, L61Q, 및 L104H를 포함하는 변이체로부터의 이익을 얻을 수 있음을 주목하여야 한다. 전반적으로, 결과는 NEQ 조합 변이체 T51N/L61E/K93Q가 선택성에 관한 최적의 변이체이며, 이것은 B7-2에 대한 10.8배 친화성 증진뿐만 아니라 B7-1에 대한 한계적으로 (1.6배) 더 큰 결합을 제공한다는 것을 나타낸다. 이 친화성 및 선택성 프로파일은 친화성을 B7-2에 대해 단지 6.5-7배 및 B7-1에 대한 2.3배 개선시킨 벨라타셉트보다 탁월하다 (표 2-5).

[0197]

실시예 5. 신규한 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 생체내 활성

- [0198] 마우스에서의 생체내 실험은 조작된 CTLA4-Ig 변이체의 활성을 시험하기 위해서 수행하였다. 과상풍에 대한 인간 면역반응을 억제하는 CTLA4-Ig의 능력은 인간 말초혈액 백혈구 (PBLs)로 생착된 중증 복합 면역결핍증 (SCID) 마우스에서 수행하였다. SCID 마우스는 면역타협되고, 인간 PBMC의 생착을 수용할 것이기 때문에, 이들 마우스를 이 연구를 위한 동물 모델로 선택하였다. 생체내 연구를 위한 CTLA4-Ig 단백질은 상술한 바와 같이 CHO 세포 (Biotechnology Research Institute, National Research Council Canada)에서 발현시키고 정제하였다.
- [0199] 인간 말초혈액 단핵구 세포 (PBMC)는 무작위 공여체 (Hemacare, Van Nuys, CA)로부터 수집된 류코팩 (leukopak)으로부터 수득하였다. PBMC는 피콜 (Ficoll) 밀도 구배 원심분리 (Ficoll-Paque™ Plus, GE Healthcare)에 의해서 정제하고, RPMI 1640 (Mediatech) 내에 재현탁시키고, 3×10^7 세포의 용량으로 복강내 (i.p.) 주사하였다. PBMC 주사하기 1일 전에, 마우스에게 100 μ l의 안티-아시알로 GM (Wako, Richmond, VA)을 i.p. 주사하여 쥐 NK 세포를 고갈시켰다. 다음날, 마우스에게 0.5 ml 용적 중의 3×10^7 PBMC를 i.p. 주사하였다. 총 약 70 마리의 마우스에게 주사하였다. 세포를 주사한 날은 연구 제0일로 정의하였다. 모든 동물에게는 같은 날에 PBMC를 주사하였다.
- [0200] PBMC를 주사한 후에, 마우스를 무작위로 그룹 지정하고, 중량을 측정하였다. PBMC 주사한 후 제7일에, 인간 IgG 레벨의 결정을 위해서 혈액을 안와-후방 동/총 (retro-orbital sinus/plexus; OSP) 천자를 통해 모든 마우스로부터 수집하였다 (hlgG ELISA, ZeptoMetrix, Buffalo, NY). 혈액 수집 (제7일) 후 같은 날에, 마우스에게 1 mg/kg 시험 제품 또는 음성 대조군으로서 PBS를 i.p. 주사하였다. 마우스에게 연구 전체에 걸쳐 매 3 또는 4일마다 주사를 계속하였다. 시험 제품은 가장 최근의 체중 측정치를 사용하여 mg/kg의 기준으로 주사하였다. 제9일에 마우스에게 15 μ g 과상풍 독소이드 (List Biological Labs, Campbell, CA, catalog # 191 B) 또는 PBS를 i.p. 주사하였다. 제21일 (항원 백신접종 후 12일)에, 인간 IgG 및 항-과상풍 IgG의 결정을 위해서 혈액을 모든 마우스로부터 수집하였다.
- [0201] 혈액 샘플 (25-50 μ l)을 안와-후방 동/총 (OSP)을 사용하여 PBMC 생착 후 제7 및 21일에 수집하였다 (국소 프로파라카인 마취제 및 흡입제 이소플루란을 사용). 혈액 샘플을 혈청 분리기 튜브에 옮기고, 30 분-1 시간 동안 정치시켜 혈액이 응고되도록 한 다음에, 원심분리기에서 회전시켰다 (30 분 동안 3500 rpm). 생성된 혈청을 연구 번호, 동물 번호, 날짜, 수집 시점으로 표지된 폴리프로필렌 튜브에 옮겼다. 혈청 샘플을 -20℃에서 저장하였다. 항-과상풍 항체 (안티-TT IgG)의 혈청 농도는 표준 항과상풍 ELISA 키트 (IBL-America)를 사용하여 측정하였다.
- [0202] 도 16에서의 결과는 PBS+과상풍 단독인 경우에 비해 친화성-증진된 NEQ 변이체 CTLA4-Ig 이뮤노어드헤신의 활성을 입증한다. 또한, 데이터는 NEQ 변이체가 모 CTLA4-Ig 아바타셉트보다 더 강력한 억제활성을 가졌음을 나타낸다. 이들 데이터는 면역 관련된 장애를 치료하기 위한 본 발명에 기술된 CTLA4-Ig 변이체의 용도를 뒷받침한다.
- [0203] 모든 인용된 문헌들은 본 명세서에 명백하게 온전히 참고로 포함된다. 본 발명의 특별한 구체예가 설명을 목적으로 상기에 기술되어 있는 반면에, 상세한 사항의 다수의 변형이 첨부된 특허청구범위에 기술된 바와 같은 발명을 벗어남이 없이 만들어질 수 있다는 것은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 이해될 것이다.

도면

도면1

인간 CTLA4-Ig (SEQ ID NO: 5)

MACLGFRHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIPVFCKAMHVAQPAVWLASSRGIASFVCEYAS
PGKATEVRVTVLQRADSQVTEVCAATYMMGNELTFLLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMD
TGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDSDFLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSL
KMLKKRSPLTTGVYVKMPPTPECEKQFQPYFIPIN

인간 CTLA4 ECD (순차적 numbering 1-124) (SEQ ID NO: 6)

MHVAQPAVWLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLQRADSQVTEVCAATYMMGNELTF
LDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPD
D

벨라타셉트 CTLA4(29Y/104E) (순차적 numbering 1-124) (SEQ ID NO: 7)

MHVAQPAVWLASSRGIASFVCEYASPGKYTEVRVTVLQRADSQVTEVCAATYMMGNELTF
LDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYEGINGTQIYVIDPEPCPD
D

공통 서열 (순차적 numbering 1-124) (SEQ ID NO: 8)

MHVAQPAVWLASSRGIASFVCEYASPGK(A/H)TEVRVTVLQRADSQVTEVCAA(T/N)Y(M/Y)
MGNELTF(L/E)DDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYIC(K/Q)VELMYPPPYLIGINGT
QIYVIDPEPCPDSD

굵은 아미노산은 어느 하나의 아미노산이 그 위치에 존재할 수 있음을 의미한다.

도면2

Fc(IgG1) (EU 넘버링 230-447) (SEQ ID NO: 9)

PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc(IgG2) (EU 넘버링 230-447) (SEQ ID NO: 10)

PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc(IgG3) (EU 넘버링 230-447) (SEQ ID NO: 11)

PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMLDSGDSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNHRTQKSLSLSPGK

Fc(IgG4) (EU 넘버링 230-447) (SEQ ID NO: 12)

PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Fc(IgG1-238S) (aka abatacept Fc) (EU 넘버링 230-447) (SEQ ID NO: 13)

PAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc(IgG2-233E/234L/235L/236G) (EU 넘버링 230-447) (SEQ ID NO: 14)

PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc(IgG2-233E/234L/235L/236G/238S) (EU 넘버링 230-447) (SEQ ID NO: 15)

PAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

도면3

링커 (IgG1) (EU 번호 216-229) (SEQ ID NO: 16)
 EPKSCDKTHTCPPC
링커 (IgG2) (EU 번호 216-229) (SEQ ID NO: 17)
 ERKCCVECPPC
링커 (IgG3) (EU 번호 216-229) (SEQ ID NO: 18)
 ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPR
 C
링커 (IgG4) (EU 번호 216-229) (SEQ ID NO: 19)
 ESKYGPPCPSC
링커 (IgG1-220S/226S/229S) (EU 번호 216-229) (SEQ ID NO: 20)
 EPKSSDKTHTSPPS
링커 (IgG2-219S/220S/226S/229S) (SEQ ID NO: 21)
 ERKSSVESPPS
링커 (Q-IgG1-220S/226S/229S) (aka 아바타셋 링커) (SEQ ID NO: 22)
 QEPKSSDKTHTSPPS
링커 (Q-IgG2-219S/220S/226S/229S) (SEQ ID NO: 23)
 QERKSSVESPPS

도면4

Ig(ab) [링커 (Q-IgG1-220S/226S/229S)+Fc(IgG1-238S)] (SEQ ID NO: 24)
 QEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
 NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
 VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Ig(ab-238P) [링커 (Q-IgG1-220S/226S/229S)+Fc(IgG1)] (SEQ ID NO: 25)
 QEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
 NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
 VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Ig(G2) [링커 (Q-IgG2-219S/220S/226S/229S)+Fc(IgG2)] (SEQ ID NO: 26)
 QERKSSVESPPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Ig(G2-ELIG) [링커 (Q-IgG1-220S/226S/229S)+Fc(IgG2-233E/234L/235L/236G)] (SEQ ID NO: 27)
 QEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQF
 NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI
 SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
 MLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

도면5

아바타셉트 CTLA4-Ig(ab) (XENP8420) (SEQ ID NO: 28)

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTF
LDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDS
DQEPKSSDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

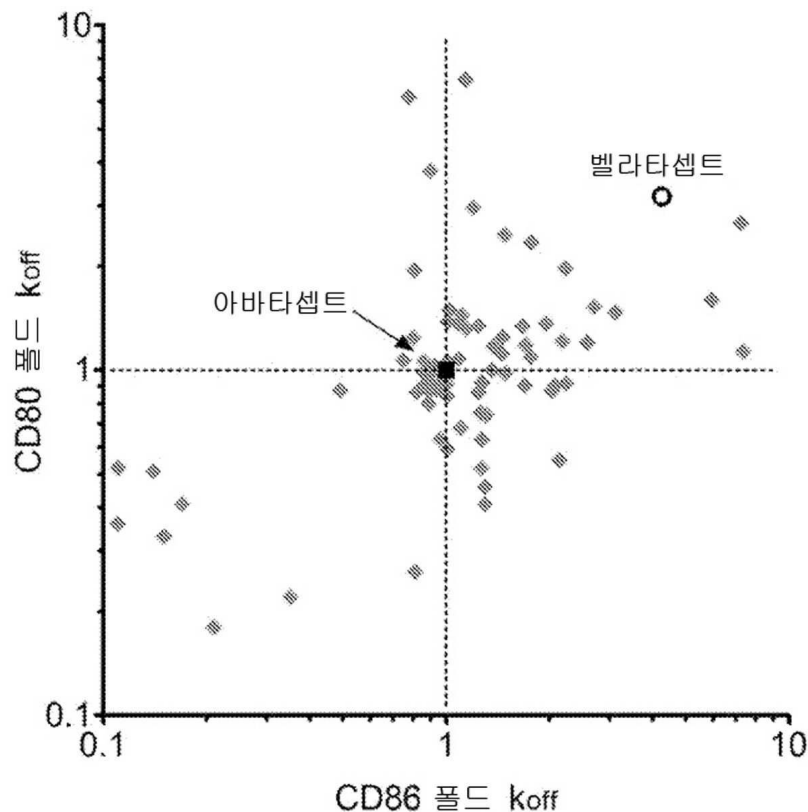
CTLA4-Ig(G2) (XENP8445) (SEQ ID NO: 29)

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTF
LDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDS
DQERKSSVESPPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPMLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

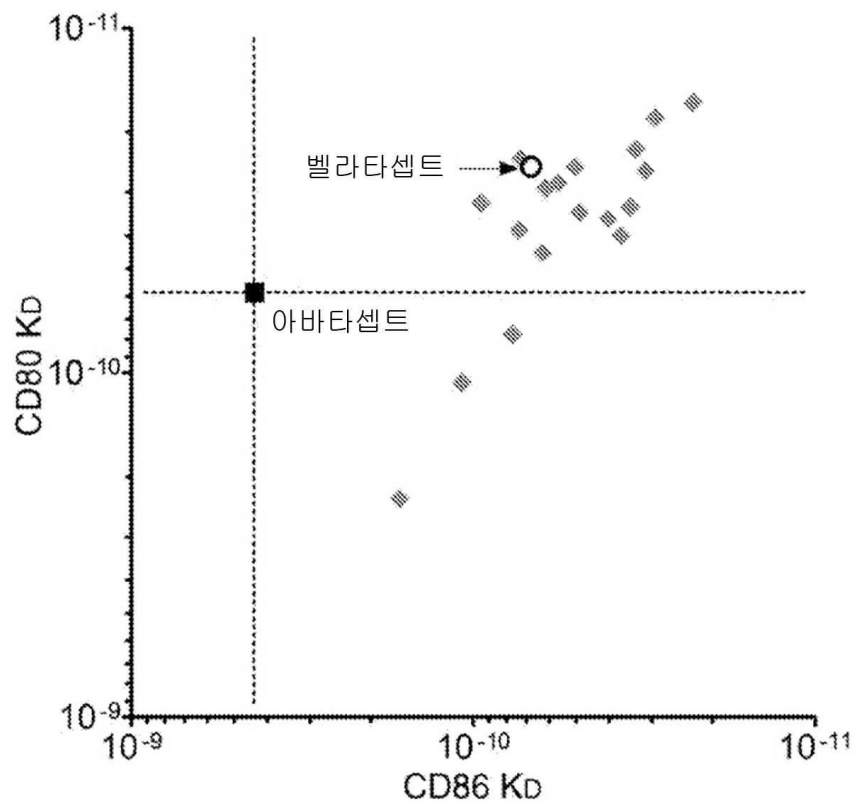
벨라타셉트 CTLA4(29Y/104E)-Ig(ab) (XENP8448) (SEQ ID NO: 30)

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKYTEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTF
LDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYEGINGTQIYVIDPEPCPDS
DQEPKSSDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

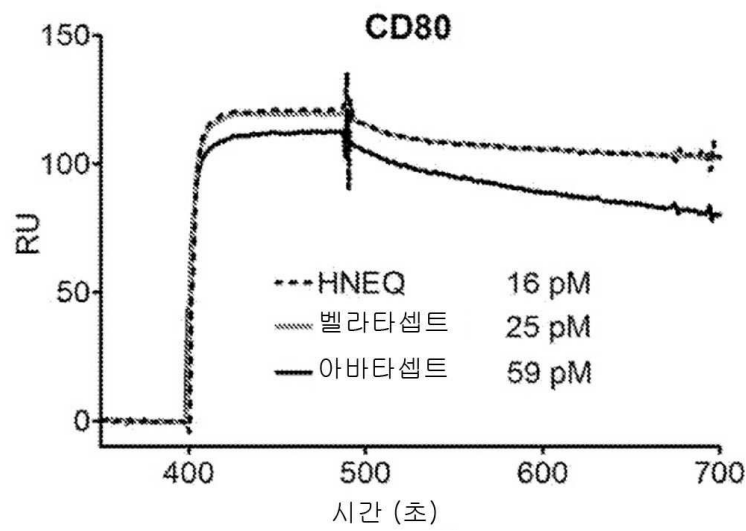
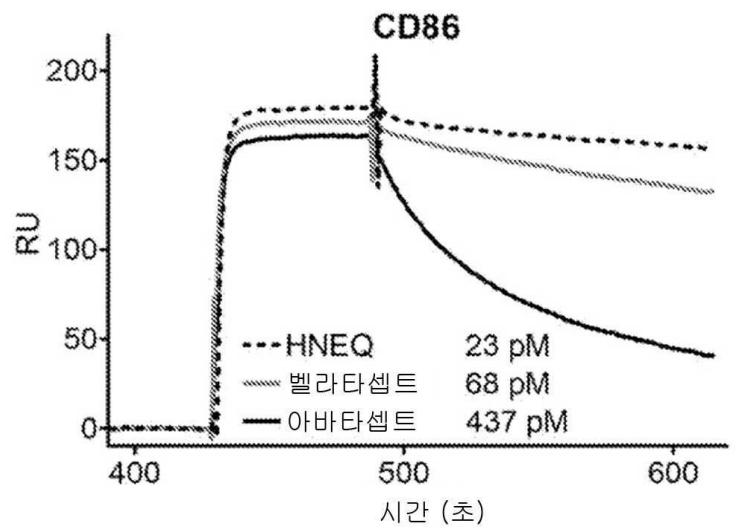
도면6



도면7



도면8



도면9

CTLA4(HNEQ) (29H/51N/61E/93Q) (H1.135) (SEQ ID NO: 31)

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKHTEVRVTVLRQADSQVTEVCAANYMMGNELTF
EDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICQVELMYPPPYLIGIGNGTQIYVIDPEPCPD
SD

CTLA4(NEQ) (51N/61E/93Q) (H1.144) (SEQ ID NO: 32)

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAANYMMGNELTF
EDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICQVELMYPPPYLIGIGNGTQIYVIDPEPCPD
SD

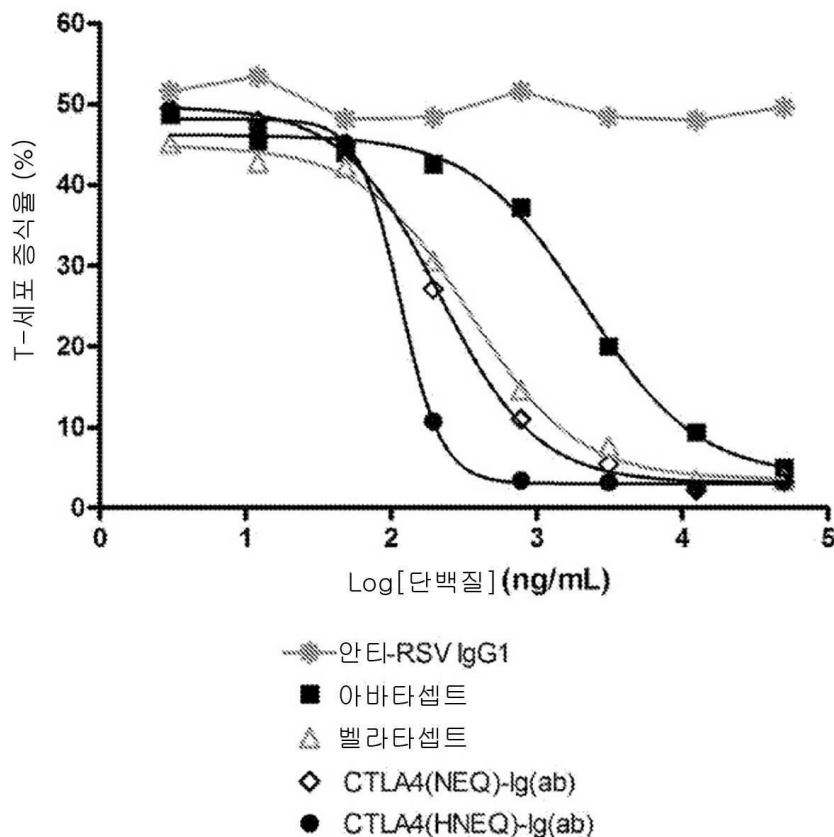
CTLA4(HNEQ)-Ig(ab) (XENP9360) (SEQ ID NO: 33)

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKHTEVRVTVLRQADSQVTEVCAANYMMGNELTF
EDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICQVELMYPPPYLIGIGNGTQIYVIDPEPCPD
SDQEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

CTLA4(NEQ)-Ig(ab) (XENP9369) (SEQ ID NO: 34)

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAANYMMGNELTF
EDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICQVELMYPPPYLIGIGNGTQIYVIDPEPCPD
SDQEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

도면10



도면11

아바타셉트CTLA4-Ig(ab-428L/434S) (XENP8441) (SEQ ID NO: 35)

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTF
LDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDS
DQEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

CTLA4-Ig(G2-428L/434S) (XENP8447) (SEQ ID NO: 36)

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTF
LDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDS
DQERKSSVESPPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

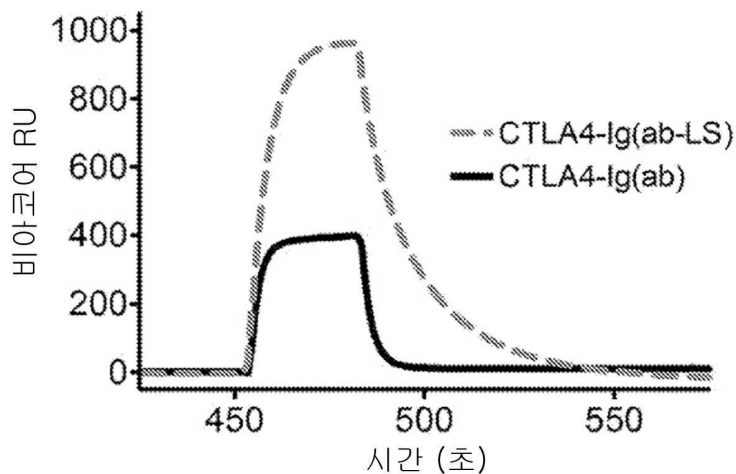
CTLA4(HNEQ)-Ig(G2-ELLG-428L/434S) (XENP9523) (SEQ ID NO: 37)

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKHTEVRVTVLRQADSQVTEVCAANYMMGNELTF
EDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICQVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPD
SDQEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE
KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

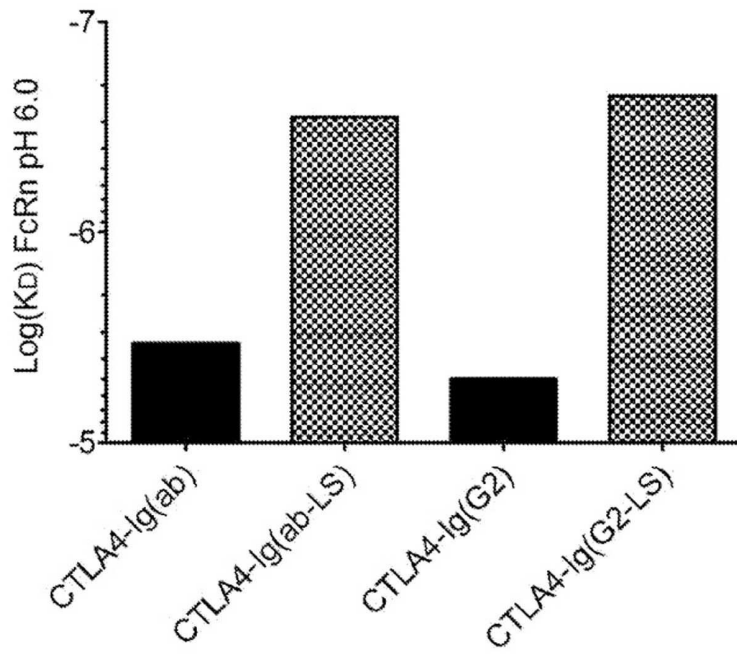
CTLA4(NEQ)-Ig(G2-ELLG-428L/434S) (XENP9524) (SEQ ID NO: 38)

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAANYMMGNELTF
EDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICQVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPD
SDQEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE
KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

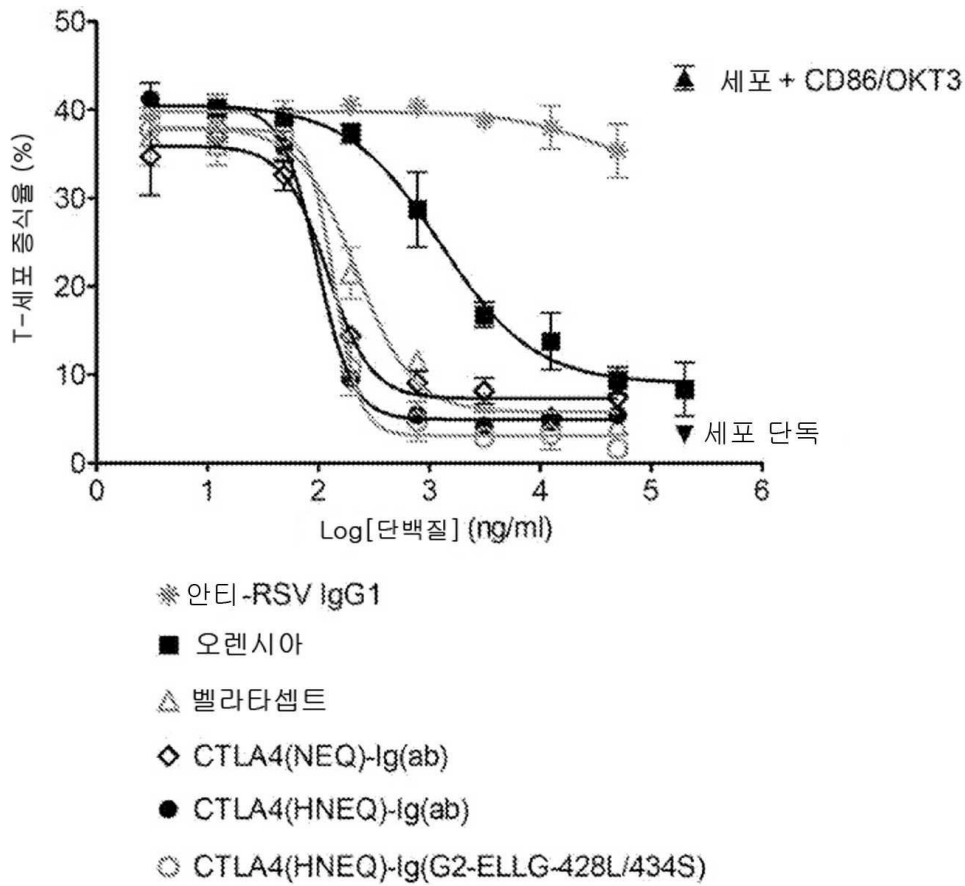
도면12



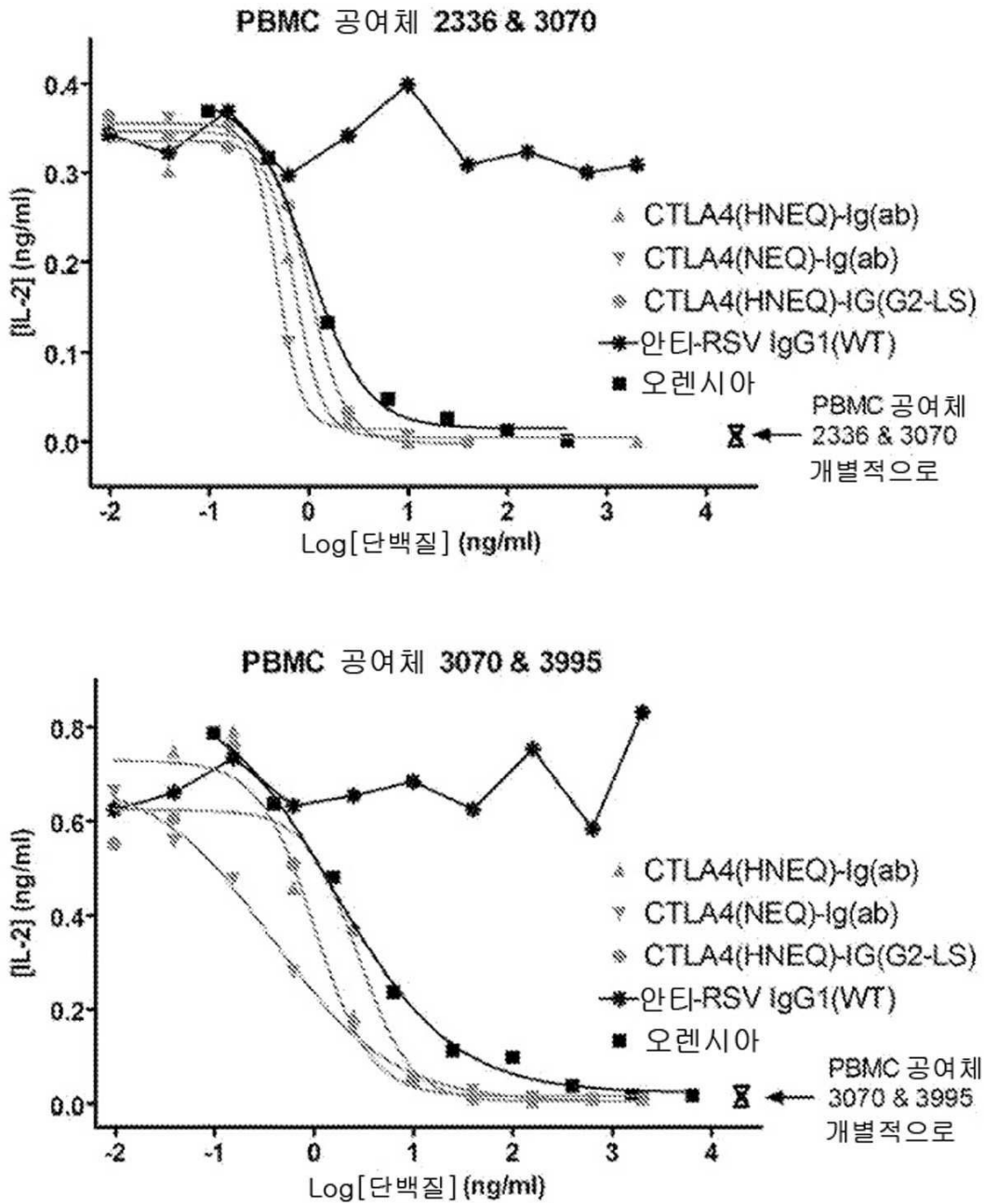
도면13



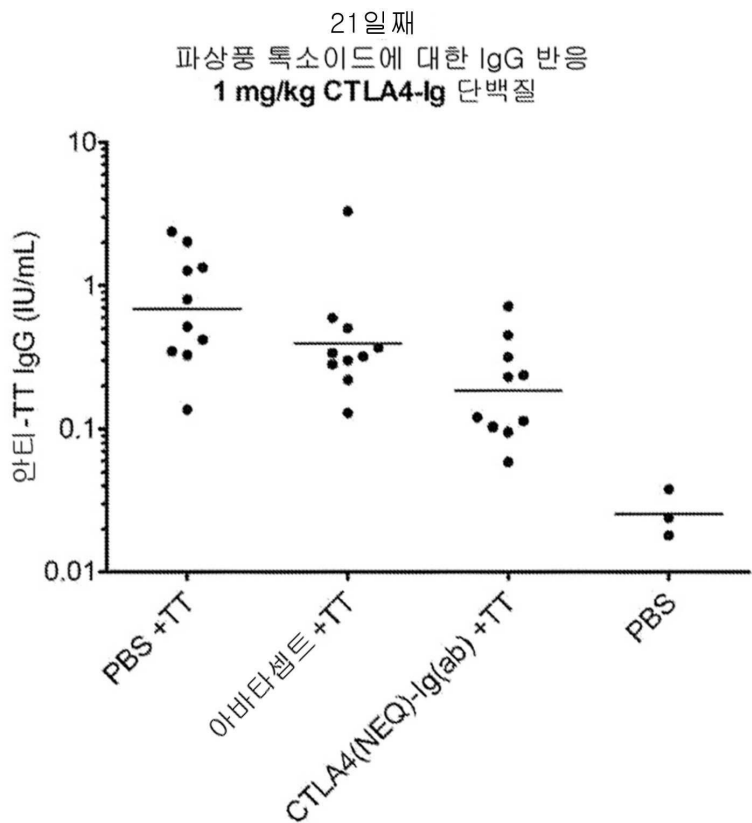
도면14



도면15



도면16



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Lazar, Gregory A.
Bennett, Matthew J.

<120> Novel CTLA4-IG Immunoadhesins

<130> 067461-5149-W0

<140> PCT/US2011/025747

<141> 2011-02-22

<150> US 61/412,309

<151> 2010-11-10

<150> US 61/334,806

<151> 2010-05-14

<150> US 61/306,311

<151> 2010-02-19

<160> 41

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> First Domain of a Variant human CTLA4
 <220><

221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> where Xaa is alanine or histidine
 <220><221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> where Xaa is threonine or asparagine
 <220><221> misc_feature
 <222> (53)..(53)
 <223> where Xaa is methionine or tyrosine
 <220><221> misc_feature
 <222> (61)..(61)
 <223> where Xaa is leucine or glutamic acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (93)..(93)
 <223> where Xaa is lysine or glutamine
 <400> 1

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

1	5	10	15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Xaa Thr Glu Val			
20	25	30	
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys			
35	40	45	
Ala Ala Xaa Tyr Xaa Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Xaa Asp Asp Ser			
50	55	60	
Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln			
65	70	75	80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Xaa Val Glu Leu			
85	90	95	

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120
<210> 2
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> First domain of a variant human CTLA4
<220><221> misc_feature
<222> (51)..(51)
<223> where Xaa is threonine or asparagine
<220><221> misc_feature
<222> (53)..(53)
<223> where Xaa is methionine or tyrosine
<220><221> misc_feature
<222> (61)..(61)
<223> where Xaa is leucine or glutamic acid
<220><221> misc_feature
<222> (93)..(93)
<223> where Xaa is lysine or glutamine
<400> 2
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys His Thr Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Ala Xaa Tyr Xaa Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Xaa Asp Asp Ser
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Xaa Val Glu Leu

85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115 120

<210> 3

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> First domain of a variant human CTLA4

<220><221> misc_feature

<222> (29)..(29)

<223> where Xaa is alanine or histidine

<220

><221> misc_feature

<222> (53)..(53)

<223> where Xaa is methionine or tyrosine

<220><221> misc_feature

<222> (61)..(61)

<223> where Xaa is leucine or glutamic acid

<220><221> misc_feature

<222> (93)..(93)

<223> where Xaa is lysine or glutamine

<400> 3

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Xaa Thr Glu Val

20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

Ala Ala Asn Tyr Xaa Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Xaa Asp Asp Ser

50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Xaa Val Glu Leu
 85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
 100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
 115 120

<210> 4

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> First domain of a variant human CTLA4

<220><221> misc_feature

<222> (29)..(29)

<223> where Xaa is alanine, glutamic acid, phenylalanine, histidine,
lysine, asparagine, glutamine, or arginine

<220><221> misc_feature

<222> (30)..(30)

<223> where Xaa is threonine, histidine or valine

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> where Xaa is glutamic acid, aspartic acid, isoleucine,
methionine, threonine, or valine

<220><221> misc_feature

<222> (33)..(33)

<223> where Xaa is arginine, glutamic acid, phenylalanine, isoleucine,
leucine, methionine, glutamine, threonine, tryptophan, or
tyrosine

<220><221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> where Xaa is threonine, aspartic acid, glutamic acid,

phenylalanine, methionine, valine or tyrosine

<220><221> misc_feature

<222> (49)..(49)

<223> where Xaa is alanine, aspartic acid, glutamic acid,
phenylalanine, threonine, tryptophan, or tyrosine

<220><221> misc_feature

<222> (51)..(51)

<223> where Xaa is threonine, aspartic acid, glutamic acid, histidine,
leucine, asparagine, glutamine, arginine, serine, or valine

<220><221> misc_feature

<222> (53)..(53)

<223> where Xaa is methionine, glutamic acid, phenylalanine, histidine,

glutamine, tryptophan, or tyrosine

<220><221> misc_feature

<222> (59)..(59)

<223> where Xaa is threonine, histidine, isoleucine, leucine,
asparagine, glutamine, valine, or tyrosine

<220><221> misc_feature

<222> (61)..(61)

<223> where Xaa is leucine, alanine, glutamic acid, phenylalanine,
glycine, histidine, isoleucine, lysine, methionine, asparagine,
proline, glutamine, arginine, serine, threonine, valine,
tryptophan, or tyrosine

<220><221> misc_feature

<222> (63)..(63)

<223> where Xaa is aspartic acid or glutamic acid

<220><221> misc_feature

<222> (64)..(64)

<223> where Xaa is serine, lysine, arginine or tyrosine

<220><221> misc_feature

<222> (93)..(93)

<223> where Xaa is lysine, aspartic acid, glutamic acid, phenylalanine,
histidine, asparagine, glutamine, arginine, serine, threonine,

valine, tryptophan, or tyrosine

<220><221> misc_feature

<222> (95)..(95)

<223> where Xaa is glutamic acid, aspartic acid, histidine, leucine,

glutamine, or tyrosine

<220><221> misc_feature

<222> (97)..(97)

<223> where Xaa is methionine, aspartic acid, phenylalanine,

isoleucine, asparagine, or valine

<220><221> misc_feature

<222> (98)..(98)

<223> where Xaa is tyrosine, phenylalanine, or tryptophan

<220><221> misc_feature

<222> (102)..(102)

<223> where Xaa is tyrosine, phenylalanine, or tryptophan

<220><221> misc_feature

<222> (103)..(103)

<223> where Xaa is tyrosine, aspartic acid, glutamic acid,

phenylalanine, histidine, asparagine, glutamine, or tryptophan

<220><221> misc_feature

<222> (104)..(104)

<223> where Xaa is leucine, phenylalanine, histidine, methionine,

valine, or tyrosine

<220><221> misc_feature

<222> (105)..(105)

<223> where Xaa is glycine, aspartic acid, or glutamic acid

<220><221> misc_feature

<222> (106)..(106)

<223> where Xaa is isoleucine, glutamic acid, or tyrosine

<400> 4

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Xaa Xaa Xaa Val
20 25 30
Xaa Val Xaa Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Xaa Ala Xaa Tyr Xaa Met Gly Asn Glu Leu Xaa Phe Xaa Asp Xaa Xaa
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Xaa Val Xaa Leu
85 90 95
Xaa Xaa Pro Pro Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120
<210> 5
<211> 223
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5
Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
1 5 10 15
Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
20 25 30
Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
35 40 45
Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
50 55 60
Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
65 70 75 80
Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
85 90 95
Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val

100 105 110
 Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
 115 120 125
 Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly

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

 195 200 205
 Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
 210 215 220
 <210> 6
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1 5 10 15
 Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
 20 25 30

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

85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115 120

<210> 7

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val

20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu

85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115 120

<210> 8

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Consensus sequence

<220><221> misc_feature

<222> (29)..(29)

<223> where Xaa is alanine or histidine

<220><221> misc_feature

<222> (51)..(51)

<223> where Xaa is threonine or asparagine

<220><221> misc_feature

<222> (53)..(53)

<223> where Xaa is methionine or tyrosine

<220><221> misc_feature

<222> (61)..(61)

<223> where Xaa is leucine or glutamic acid

<220><221> misc_feature

<222> (93)..(93)

<223> where Xaa is lysine or glutamine

<400> 8

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Xaa Thr Glu Val

20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

Ala Ala Xaa Tyr Xaa Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Xaa Asp Asp Ser

50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Xaa Val Glu Leu

85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115 120

<210> 9

<211> 218

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210 215

<210> 10

<211> 217

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210

215

<210> 11

<211> 218

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

165

170

175

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

180

185

190

Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr

195 200 205
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 12
 <211> 218
 <212
 > PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 1 5 10 15
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 20 25 30
 Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 35 40 45
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 50 55 60

 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 65 70 75 80
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 85 90 95
 Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 100 105 110
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
 115 120 125

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

				180						185									190
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr				
			195					200					205						
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys										
			210				215												
<210>		13																	
<211>		218																	
<212>		PRT																	
<213>		Homo sapiens																	
<400>		13																	
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Ser	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro				
1				5					10					15					
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys				
			20					25				30							
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp				
			35				40					45							
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu				
			50				55					60							
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu				
65					70					75					80				
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn				
				85					90					95					
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly				
			100					105					110						
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu				
			115					120					125						
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr				
			130				135					140							
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn				
145					150					155					160				
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe				

165 170 175
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 180 185 190
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 195 200 205
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 14
 <211> 218
 <212>
 > PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 1 5 10 15
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 20 25 30
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 35 40 45
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 50 55 60

 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
 65 70 75 80
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 85 90 95
 Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
 100 105 110
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 115 120 125

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

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
165 170 175

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
180 185 190

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
195 200 205

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

<210> 15

<211> 218

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
1 5 10 15

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
20 25 30

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
35 40 45

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

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
65 70 75 80

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

Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
100 105 110

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
115 120 125

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

 180 185 190

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

 195 200 205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

 210 215

<210> 16

<211> 14

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker(IgG1) (EU numbering 216-229)

<400> 16

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

1 5 10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker(IgG2) (EU numbering 216-229)

<400> 17

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys

1 5 10

<210> 18

<211> 61

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Linker(IgG3) (EU numbering 216-229)

<400> 18

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

1 5 10 15
 Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 20 25 30
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
 35 40 45
 Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
 50 55 60

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker(IgG4) (EU numbering 216-229)

<400> 19

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys

1 5 10

<210> 20

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker(IgG1-220S/226S/229S) (EU numbering 216-229)

<400> 20

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser

1 5 10

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LINKER(IGG2-219S/220S/226S/229S)

<400> 21

Glu Arg Lys Ser Ser Val Glu Ser Pro Pro Ser

1 5 10

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker(Q-IgG1-220S/226S/229S) (aka abatacept linker)

<400> 22

Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser

1 5 10 15

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker(Q-IgG2-219S/220S/226S/229S)

<400> 23

Gln Glu Arg Lys Ser Ser Val Glu Ser Pro Pro Ser

1 5 10

<210> 24

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ig(ab) [Linker(Q-IgG1-220S/226S/229S)+Fc(IgG1-238S)]

<400> 24

Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 165 170 175
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 180 185 190
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 195 200 205
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 210 215 220

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 25

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ig(ab-238P) [Linker(Q-IgG1-220S/226S/229S)+Fc(IgG1)]

<400> 25

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

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
65 70 75 80
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
85 90 95
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
100 105 110
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
115 120 125
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
130 135 140
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
145 150 155 160
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
165 170 175
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
180 185 190
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
195 200 205
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
210 215 220
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 26

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ig(G2) [Linker(Q-IgG2-219S/220S/226S/229S)+Fc(IgG2)]

<400> 26

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

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

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Pro Gly Lys
225

<210> 27

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Ig(G2-ELLG)

[Linker(Q-IgG1-220S/226S/229S)+Fc(IgG2-233E/234L/235L/236G)]

<400> 27

Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

<210> 28

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Abatacept CTLA4-Ig(ab) (XENP8420)

<400> 28

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu

85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys

115 120 125

Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

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

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

 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 325 330 335
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 340 345 350
 Leu Ser Pro Gly Lys
 355
 <210> 29
 <211> 353
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CTLA4-Ig(G2) (XENP8445)
 <400> 29
 Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1 5 10 15

 Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
 20 25 30
 Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35	40	45	
Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser			
50	55	60	
Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln			
65	70	75	80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu			
85	90	95	
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile			
100	105	110	
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Arg Lys			
115	120	125	
Ser Ser Val Glu Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro			
130	135	140	
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
145	150	155	160
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
165	170	175	
Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
180	185	190	
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val			
195	200	205	
Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
210	215	220	
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys			
225	230	235	240
Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
245	250	255	
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			
260	265	270	
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
275	280	285	

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

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 340 345 350

Lys

<210> 30

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Belatacept CTLA4(29Y/104E)-Ig(ab) (XENP8448)

<400> 30

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

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser
 50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
 65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
 85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
 100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys
 115 120 125

Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu
130 135 140

Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
145 150 155 160

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
165 170 175

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
180 185 190

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
195 200 205

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
210 215 220

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
225 230 235 240

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
245 250 255

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
260 265 270

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
275 280 285

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
290 295 300

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
305 310 315 320

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
325 330 335

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
340 345 350

Leu Ser Pro Gly Lys
355

<210> 31

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTLA4(HNEQ) (29H/51N/61E/93Q) (H1.135)

<400> 31

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys His Thr Glu Val

20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

Ala Ala Asn Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Glu Asp Asp Ser

50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu

85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115 120

<210> 32

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTLA4(NEQ) (51N/61E/93Q) (H1.144)

<400> 32

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45
Ala Ala Asn Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Glu Asp Asp Ser
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115 120

<210> 33

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTLA4(HNEQ)-Ig(ab) (XENP9360)

<400> 33

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

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Ala Asn Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Glu Asp Asp Ser
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu
85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys

115	120	125	
Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu			
130	135	140	
Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr			
145	150	155	160
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val			
165	170	175	
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val			
180	185	190	
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser			
195	200	205	
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu			
210	215	220	
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala			
225	230	235	240
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro			
245	250	255	
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln			
260	265	270	
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala			
275	280	285	
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr			
290	295	300	
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu			
305	310	315	320
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser			
325	330	335	
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser			
340	345	350	
Leu Ser Pro Gly Lys			
355			

<210> 34

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTLA4(NEQ)-Ig(ab) (XENP9369)

<400> 34

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

Ala Ala Asn Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Glu Asp Asp Ser

50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu

85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys

115 120 125

Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 210 215 220
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 225 230 235 240

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

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

Leu Ser Pro Gly Lys
 355

<210> 35

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Abatacept CTLA4-Ig(ab-428L/434S) (XENP8441)

<400> 35

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

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50

55

60

Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65

70

75

80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu

85

90

95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100

105

110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys

115

120

125

Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

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

225

230

235

240

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

245

250

255

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

260

265

270

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

275

280

285

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

290 295 300
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu

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

355

<210> 36

<211> 353

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTLA4-Ig(G2-428L/434S) (XENP8447)

<400> 36

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

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

65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Arg Lys
115 120 125

Ser Ser Val Glu Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

180 185 190

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

195 200 205

Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

260 265 270

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

275 280 285

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu

290 295 300

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

305 310 315 320

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu

325 330 335

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

340 345 350

Lys

<210> 37

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTLA4(HNEQ)-Ig(G2-ELLG-428L/434S) (XENP9523)

<400> 37

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys His Thr Glu Val

20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

Ala Ala Asn Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Glu Asp Asp Ser

50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu

85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys

115 120 125

Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Leu Ser Pro Gly Lys

355

<210> 38

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTLA4(NEQ)-Ig(G2-ELLG-428L/434S) (XENP9524)

<400> 38

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35	40	45
Ala Ala Asn Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Glu Asp Asp Ser		
50	55	60
Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln		
65	70	75
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu		
85	90	95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile		
100	105	110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys		
115	120	125
Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu		
130	135	140
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
145	150	155
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
165	170	175
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
180	185	190
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser		
195	200	205
Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu		
210	215	220
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala		
225	230	235
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
245	250	255
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
260	265	270
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
275	280	285

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 290 295 300
 Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 305 310 315 320
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 325 330 335
 Val Leu His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 340 345 350

Leu Ser Pro Gly Lys
 355

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glycine-serine polymer linker

<400> 39

Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glycine-serine polymer linker

<400> 40

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 41

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glycine-serine polymer linker

<400> 41

Gly Gly Gly Ser

