



등록특허 10-2748986



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년01월02일  
(11) 등록번호 10-2748986  
(24) 등록일자 2024년12월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07K 16/42* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C07K 16/4241* (2013.01)  
*A61P 35/00* (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7024432
- (22) 출원일자(국제) 2019년01월25일  
심사청구일자 2022년01월25일
- (85) 번역문제출일자 2020년08월25일
- (65) 공개번호 10-2020-0115568
- (43) 공개일자 2020년10월07일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2019/015204
- (87) 국제공개번호 WO 2019/147973  
국제공개일자 2019년08월01일
- (30) 우선권주장  
62/622,468 2018년01월26일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문현  
KR1020170078677 A\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문현

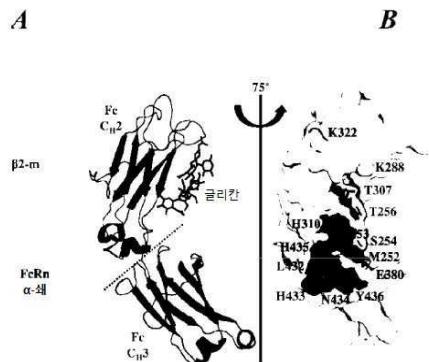
전체 청구항 수 : 총 49 항

심사관 : 윤소라

(54) 발명의 명칭 FcRn에 대한 증진된 결합 및 연장된 반감기를 갖는 Fc 변이체

**(57) 요약**

본 개시는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항체 및 면역어드헤신)를 제공한다. 본 개시는 또한 결합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산, 이러한 결합 폴리펩티드를 제조하기 위한 재조합 밸현 벡터, 및 숙주 세포를 제공한다. 질환을 치료하기 위해 본원에서 개시된 결합 폴리펩티드를 이용하는 방법이 또한 제공된다.

**대 표 도**

(52) CPC특허분류

*A61K 2039/505* (2013.01)

*C07K 2317/524* (2013.01)

*C07K 2317/526* (2013.01)

*C07K 2317/72* (2013.01)

*C07K 2317/90* (2013.01)

*C07K 2317/94* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- a) 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 434에서 페닐알라닌(F),
  - b) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y) 및 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D),
  - c) 아미노산 위치 307에서 트립토판(W) 및 아미노산 위치 434에서 페닐알라닌(F), 또는
  - d) 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q) 및 아미노산 위치 434에서 페닐알라닌(F)
- 을 포함하는 변형된 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드이며, 이때 아미노산 위치는 EU 넘버링에 따른 것인, 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 2

변형된 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드이며, 이때 변형된 인간 IgG Fc 도메인의 FcRn-결합 친화도를 함께 증가시키는 야생형 인간 IgG Fc 도메인에 비한 변형은

- a) 아미노산 위치 256에서 글루탐산(E) 및 아미노산 위치 434에서 페닐알라닌(F),
- b) 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y);
- c) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y) 및 아미노산 위치 256에서 글루탐산(E),
- d) 아미노산 위치 307에서 트립토판(W) 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y),
- e) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y) 및 아미노산 위치 307에서 트립토판(W),
- f) 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q) 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y), 또는
- g) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y) 및 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q)

으로 구성되며, 이때 아미노산 위치는 EU 넘버링에 따른 것인, 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 3

변형된 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드이며, 이때 야생형 인간 IgG Fc 도메인에 비해 변형된 인간 IgG Fc 도메인의 유일한 변형은

- a) 아미노산 위치 256에서 글루탐산(E) 및 아미노산 위치 434에서 페닐알라닌(F),
- b) 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y);
- c) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y) 및 아미노산 위치 256에서 글루탐산(E),
- d) 아미노산 위치 307에서 트립토판(W) 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y),
- e) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y) 및 아미노산 위치 307에서 트립토판(W),
- f) 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q) 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y), 또는
- g) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y) 및 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q)

으로 구성되며, 이때 아미노산 위치는 EU 넘버링에 따른 것인, 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 4

- a) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y) 및 아미노산 위치 307에서 트립토판(W)(이때 티로신(Y)은 아미노산 위치 434에 있지 않음);
- b) 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307에서 트립토판(W)(이때 티로신(Y)은 아미노산

위치 434에 있지 않음);

- c) 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q)(이때 티로신(Y)은 아미노산 위치 434에 있지 않음);
- d) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D), 및 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q)(이때 티로신(Y)은 아미노산 위치 434에 있지 않음); 및
- e) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 글루탐산(E), 및 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q)(이때 트레오닌(T)은 아미노산 위치 254에 있지 않고, 히스티딘(H)은 아미노산 위치 311에 있지 않고, 티로신(Y)은 아미노산 위치 434에 있지 않음)

으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 잔기의 조합을 포함하는 변형된 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드이며, 이때 아미노산 치환은 EU 넘버링에 따른 것인, 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 5

- a) M252Y/T256D, M252Y/T307Q, M252Y/T307W, T256D/T307Q, T256D/T307W, T256E/T307Q, 및 T256E/T307W로 구성된 군으로부터 선택된 이중 아미노산 치환이며, 이때 트레오닌(T)은 아미노산 위치 254에 있지 않고, 히스티딘(H)은 아미노산 위치 311에 있지 않고, 티로신(Y)은 아미노산 위치 434에 있지 않는 것인 이중 아미노산 치환; 또는
  - b) M252Y/T256D/T307Q, M252Y/T256D/T307W, M252Y/T256E/T307Q, 및 M252Y/T256E/T307W로 구성된 군으로부터 선택된 삼중 아미노산 치환이며, 이때 트레오닌(T)은 아미노산 위치 254에 있지 않고, 히스티딘(H)은 아미노산 위치 311에 있지 않고, 티로신(Y)은 아미노산 위치 434에 있지 않는 것인 삼중 아미노산 치환
- 을 포함하는 변형된 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드이며, 이때 아미노산 치환은 EU 넘버링에 따른 것인, 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 6

변형된 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드이며, 이때 변형된 인간 IgG Fc 도메인의 FcRn-결합 친화도를 함께 증가시키는 야생형 인간 IgG Fc 도메인에 비한 변형은, EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q)으로 구성되는 것인, 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 7

변형된 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드이며, 이때 변형된 인간 IgG Fc 도메인은, EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307에서 트립토판(W)을 포함하는 것인, 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 8

변형된 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드이며, 이때 변형된 인간 IgG Fc 도메인의 FcRn-결합 친화도를 함께 증가시키는 야생형 인간 IgG Fc 도메인에 비한 변형은, EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 252에서 티로신(Y) 및 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D)으로 구성되는 것인, 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 야생형 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 증가된 혈청 반감기를 갖는 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 야생형 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, FcRn은 인간 FcRn인 단리된 결합 폴리펩티드.

**청구항 12**

제10항에 있어서, 야생형 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는 단리된 결합 폴리펩티드.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 산성 pH는 6.0인 단리된 결합 폴리펩티드.

**청구항 14**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 비 산성 pH에서 결합 폴리펩티드의 FcRn 결합 친화도와 비교하여 산성 pH에서 더 높은 FcRn 결합 친화도를 갖는 단리된 결합 폴리펩티드.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 산성 pH는 6.0이고, 비 산성 pH는 7.4인 단리된 결합 폴리펩티드.

**청구항 16**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 야생형 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 변경된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는 단리된 결합 폴리펩티드.

**청구항 17**

제16항에 있어서, Fc $\gamma$ RIIIa는 인간 Fc $\gamma$ RIIIa인 단리된 결합 폴리펩티드.

**청구항 18**

변형된 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드이며, 이때 변형된 인간 IgG Fc 도메인은

- a) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D), 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q), 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y);
- b) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 글루탐산(E), 아미노산 위치 307에서 트립토판(W), 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y);
- c) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D), 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q), 및 아미노산 위치 434에서 폐닐알라닌(F);
- d) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D), 아미노산 위치 307에서 트립토판(W), 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y);
- e) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D), 아미노산 위치 307에서 트립토판(W), 및 아미노산 위치 434에서 폐닐알라닌(F);
- f) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 글루탐산(E), 아미노산 위치 307에서 트립토판(W), 및 아미노산 위치 434에서 폐닐알라닌(F); 및
- g) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 글루탐산(E), 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q), 및 아미노산 위치 434에서 폐닐알라닌(F)

으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기의 조합을 포함하며, 이때 아미노산 위치는 EU 넘버링에 따른 것인, 단리된 결합 폴리펩티드.

**청구항 19**

- a) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D), 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q), 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y);
- b) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 글루탐산(E), 아미노산 위치 307에서 트립토판(W), 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y);

- c) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D), 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q), 및 아미노산 위치 434에서 페닐알라닌(F);
- d) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D), 아미노산 위치 307에서 트립토판(W), 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y); 및
- e) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D), 아미노산 위치 307에서 트립토판(W), 및 아미노산 위치 434에서 페닐알라닌(F)

으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 잔기의 조합을 포함하는 변형된 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드이며, 이때 아미노산 치환은 EU 넘버링에 따른 것인, 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 20

변형된 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드이며, 이때 변형된 인간 IgG Fc 도메인의 FcRn-결합 친화도를 함께 증가시키는 야생형 인간 IgG Fc 도메인에 비한 변형은 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 글루탐산(E), 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q), 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y)으로 구성되는 것인, 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 21

M252Y/T256D/T307Q/N434Y,

M252Y/T256E/T307W/N434Y,

M252Y/T256D/T307Q/N434F,

M252Y/T256D/T307W/N434Y, 및

M252Y/T256D/T307W/N434F

로 구성된 군으로부터 선택된 사중 아미노산 치환을 포함하는 변형된 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드이며, 이때 아미노산 치환은 EU 넘버링에 따른 것인, 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 22

EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D), 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q), 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y)을 포함하는 변형된 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 23

EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 글루탐산(E), 아미노산 위치 307에서 트립토판(W), 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y)을 포함하는 변형된 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 24

변형된 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드이며, 이때 변형된 인간 IgG Fc 도메인의 FcRn-결합 친화도를 함께 증가시키는 야생형 인간 IgG Fc 도메인에 비한 변형은, EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 글루탐산(E), 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q), 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y)으로 구성된 것인, 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 25

EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D), 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q), 및 아미노산 위치 434에서 페닐알라닌(F)을 포함하는 변형된 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 26

EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D), 아미노산 위치 307에서 트립토판(W), 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y)을 포함하는 변형된 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드.

### 청구항 27

- a) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D), 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y), 또는
- b) 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D), 아미노산 위치 307에서 트립토판(W), 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y)

을 포함하는 변형된 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드이며, 이때 아미노산 위치는 EU 넘버링에 따른 것인, 단리된 결합 폴리펩티드.

### 청구항 28

M252Y/T256D/N434Y 및

T256D/T307W/N434Y

로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 치환의 조합을 포함하는 변형된 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드이며, 이때 아미노산 치환은 EU 넘버링에 따른 것인, 단리된 결합 폴리펩티드.

### 청구항 29

제18항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 인간 IgG Fc 도메인은 야생형 인간 IgG Fc 도메인과 비교하여 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도 및 비 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는 것인 단리된 결합 폴리펩티드.

### 청구항 30

제29항에 있어서, 산성 pH는 6.0이고, 비 산성 pH는 7.4인 단리된 결합 폴리펩티드.

### 청구항 31

제29항에 있어서, FcRn은 인간 FcRn인 단리된 결합 폴리펩티드.

### 청구항 32

제18항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 인간 IgG Fc 도메인은 5개의 아미노산 치환 M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F을 포함하는 인간 IgG Fc 도메인과 비교하여 산성 pH에서 증진된 인간 FcRn 결합 친화도 및 비 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는 단리된 결합 폴리펩티드.

### 청구항 33

제32항에 있어서, 산성 pH는 6.0이고, 비 산성 pH는 7.4인 단리된 결합 폴리펩티드.

### 청구항 34

제18항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 인간 IgG Fc 도메인은 야생형 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 감소된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는 것인 단리된 결합 폴리펩티드.

### 청구항 35

제34항에 있어서, Fc $\gamma$ RIIIa는 인간 Fc $\gamma$ RIIIa인 단리된 결합 폴리펩티드.

### 청구항 36

제18항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 인간 IgG Fc 도메인은 5개의 아미노산 치환 M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F를 포함하는 인간 IgG Fc 도메인과 비교하여 감소된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를

갖는 것인 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 37

제36항에 있어서, Fc γ RIIIa는 인간 Fc γ RIIIa인 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 38

제1항 내지 제8항 및 제18항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 인간 IgG Fc 도메인은 변형된 인간 IgG1 Fc 도메인인, 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 39

제1항 내지 제8항 및 제18항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 결합 폴리펩티드는 인간 FcRn 결합 친화도를 갖는 것인 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 40

제1항 내지 제8항 및 제18항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 결합 폴리펩티드는 랫트 FcRn 결합 친화도를 갖는 것인 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 41

제1항 내지 제8항 및 제18항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 인간 표적과 특이적으로 결합하는 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 42

제1항 내지 제8항 및 제18항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 단일클론 항체인 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 43

제42항에 있어서, 항체는 키메라, 인간화, 또는 인간 항체인, 단리된 결합 폴리펩티드.

#### 청구항 44

제1항 내지 제8항 및 제18항 내지 제28항 중 어느 한 항의 단리된 결합 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자.

#### 청구항 45

제44항의 단리된 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.

#### 청구항 46

제45항의 발현 벡터를 포함하는, 세포주로부터 유래된 숙주 세포.

#### 청구항 47

제46항에 있어서, 포유류 세포주로부터 유래된 숙주 세포.

#### 청구항 48

단리된 결합 폴리펩티드의 생산 방법으로서,

제47항의 숙주 세포를 결합 폴리펩티드의 발현을 허용하는 조건 하에서 배양하는 단계, 및 배양물로부터 결합 폴리펩티드를 단리하는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 49

제1항 내지 제8항 및 제18항 내지 제28항 중 어느 한 항의 단리된 결합 폴리펩티드 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[관련 출원]

[0002] 본 출원은 2018년 1월 26일자 출원된 미국 특허 출원 제62/622,468호에 대한 우선권을 주장하며, 이의 전체 개시 내용은 본원에 참조로 포함된다.

#### 배경 기술

[0003] 신생아 Fc 수용체(FcRn)와 항체의 상호 작용은 항체 및 기타 Fc 유래 치료제의 혈청 반감기를 유지하고 연장하는 결정 요인이다. FcRn은 MHC 부류 I 유사  $\alpha$ -도메인과  $\beta 2$ -마크로글로불린( $\beta 2-m$ ) 서브유닛의 이종이량체로, 다른 Fc $\gamma$  수용체들(Fc $\gamma$ R)과는 상이한 항체 Fc 중쇄의 영역들을 인식한다. FcRn은 다양한 조직에서 발현되지만, 혈관 내피, 신장 및 혈액 농장벽에서 주로 작용하여, 각각 IgG 분해, 배설 및 염증 반응의 유발을 예방하는 것으로 생각된다.

[0004] FcRn에 대한 항체 결합은 매우 pH 의존적이며, 상호 작용은 낮은 pH( $pH < 6.5$ )에서 높은 친화도(높은 나노몰 내지 낮은 마이크로몰)로만 발생하지만, 생리적 pH( $pH$  약 7.4)에서는 발생하지 않는다. 엔도솜을 6.5 미만의 pH로 산성화하면, IgG와 FcRn 사이의 상호 작용이 매우 유리해지며, FcRn 결합 항체의 분해를 억제하고 세포 표면으로의 재순환을 촉진하는 직접적인 역할을 한다. pH의 증가는 상호 작용을 약화시키고, 항체의 혈류로의 방출을 촉진한다.

[0005] 고처리량 돌연변이 유발 접근법을 이용하는 Fc 공학이 FcRn 결합 친화도를 증진시키는 변이체를 확인하기 위하여 광범위하게 추구되었는데, 증진된 결합은 아마도 야생형 IgG 항체에 비해 연장된 혈청 반감기의 직접적인 결과로서 치료 항체에 대한 효능 증가 및 투여 빈도의 감소로 이어질 것이기 때문이다. 그러나 FcRn 결합 친화도를 증진시키는 변이체는 예상치 못한 결과를 가져올 수 있다. 예를 들어, 특히, N434W 또는 P257I/Q311I와 같은, pH 6.0에서 FcRn 친화도의 큰 증가를 나타내는 특정 IgG 변이체는 시노몰구스 원숭이 및 인간 FcRn(hFcRn) 형질전환 마우스 연구에서 야생형 또는 심각하게 감소된 혈청 반감기를 갖는다(예를 들어, Kuo et al. 2011, 위의 문헌; Datta-Mannan et al. 2007, *J. Biol. Chem.* 282:1709-1717; 및 Datta-Mannan et al. 2007, *Metab. Dispos.* 35: 86-94 참조). T250Q/M428L(QL) 변이체는 동물 모델에서 IgG 백본 특이적 결과를 보여주었다(예를 들어, Datta-Mannan et al. 2007, *J. Biol. Chem.* 282:1709-1717; 및 Hinton et al. 2006, *J. Immunol.* 176:346-356 참조). M252Y/S254T/T256E(YTE, EU 넘버링) 변이체는 생체 외에서 10배의 증진을 보여주었으나, Fc $\gamma$ RIIIa 수용체에 대한 친화도의 2배의 감소로 인해 생체 내에서는 감소된 항체 의존적 세포 매개성 세포독성(ADCC)을 나타낸다(예를 들어, Dall' Acqua et al. 2002, 위의 문헌 참조).

[0006] 따라서, FcRn에 대한 증진된 결합 및 연장된 순환 반감기를 보유하는 대안적인 Fc 변이체의 필요성은 여전하다.

#### 발명의 내용

[0007] 본 발명은 다음의 특징 중 하나 이상을 갖는 신규한 IgG 항체의 발견을 기초로 한다: 야생형 IgG 항체와 비교하여, 증가된 혈청 반감기, 증진된 FcRn 결합 친화도, 산성 pH에서의 증진된 FcRn 결합 친화도, 증진된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도, 및 비슷한 열 안정성.

[0008] 따라서, 특정 양태에서, 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D) 또는 글루탐산(E) 및/또는 아미노산 위치 307에서 트립토판(W) 또는 글루타민(Q)을 포함하고, 이때, 아미노산 위치 254는 트레오닌(T)이 아니며, 아미노산 위치 434에서 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y), 또는 아미노산 위치 252에서 티로신(Y)을 더 포함하는 변형된 Fc 도메인을 포함하며, 이때, 아미노산 위치는 EU 넘버링에 따른 것인 단리된 결합 폴리펩티드가 제공된다.

[0009] 특정 예시적 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 변형된 인간 Fc 도메인이다. 특정 예시적 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 변형된 IgG1 Fc 도메인이다.

[0010] 특정 예시적 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 인간 FcRn 결합 친화도, 랙트 FcRn 결합 친화도, 또는 인간 및 랙

트 FcRn 결합 친화도를 갖는다.

[0011] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 변경된 혈청 반감기를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 증가된 혈청 반감기를 갖는다.

[0012] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 변경된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 상승된 비 산성 pH에서의 결합 폴리펩티드의 FcRn 결합 친화도와 비교하여 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 증진된 FcRn 결합 친화도는 감소된 FcRn 결합 해리 속도를 포함한다.

[0013] 특정 예시적 구현예에서, 산성 pH는 약 6.0이다. 특정 예시적 구현예에서, 산성 pH는 약 6.0이고, 비 산성 pH는 약 7.4이다.

[0014] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 변경된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 감소된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 증진된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는다.

[0015] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 대략 동일한 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는다.

[0016] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 대략 동일한 열 안정성을 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 EU 넘버링에 따른 삼중 아미노산 치환 M252Y/S254T/T256E을 갖는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 대략 동일한 열 안정성을 갖는다.

[0017] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 항체, 예를 들어, 단일클론 항체이다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 항체는 키메라, 인간화, 또는 인간 항체이다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 항체는 전장 항체이다.

[0018] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 하나 이상의 인간 표적과 특이적으로 결합한다.

[0019] 다른 양태에서, 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서의 아미노산 치환의 조합을 포함하는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드:

[0020] a) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y) 및 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D), b) 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 434에서 페닐알라닌(F), c) 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y), d) 아미노산 위치 307에서 트립토판(W) 및 아미노산 위치 434에서 페닐알라닌(F), e) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y) 및 아미노산 위치 307에서 트립토판(W)(이때, 티로신(Y)은 아미노산 위치 434에 있지 않음), f) 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307에서 트립토판(W)(이때, 티로신(Y)은 아미노산 위치 434에 있지 않음), g) 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q)(이때, 티로신(Y)은 아미노산 위치 434에 있지 않음), h) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D), 및 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q)(이때, 티로신(Y)은 아미노산 위치 434에 있지 않음), 및 i) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 글루탐산(E), 및 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q)(이때, 트레오닌(T)은 아미노산 위치 254에 있지 않고, 히스티딘(H)은 아미노산 위치 311에 있지 않고, 티로신(Y)은 아미노산 위치 434에 있지 않음),

[0021]로서, 이때, 아미노산 치환은 EU 넘버링에 따른 것인, 단리된 결합 폴리펩티드가 제공된다.

[0022] 특정 예시적 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 변형된 인간 Fc 도메인이다. 특정 예시적 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 변형된 IgG1 Fc 도메인이다.

[0023] 특정 예시적 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 인간 FcRn 결합 친화도, 랫트 FcRn 결합 친화도, 또는 인간 및 랫

트 FcRn 결합 친화도를 갖는다.

[0024] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 변경된 혈청 반감기를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 증가된 혈청 반감기를 갖는다.

[0025] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 변경된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 상승된 비 산성 pH에서의 결합 폴리펩티드의 FcRn 결합 친화도와 비교하여 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 증진된 FcRn 결합 친화도는 감소된 FcRn 결합 해리 속도를 포함한다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 EU 넘버링에 따른 이중 아미노산 치환 M428L/N434S를 갖는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드보다 비 산성 pH에서 더 적은 FcRn 결합 친화도를 갖는다.

[0026] 특정 예시적 구현예에서, 산성 pH는 약 6.0이다. 특정 예시적 구현예에서, 산성 pH는 약 6.0이고, 비 산성 pH는 약 7.4이다.

[0027] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 변경된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 감소된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 증진된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는다.

[0028] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 대략 동일한 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는다.

[0029] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 대략 동일한 열 안정성을 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 EU 넘버링에 따른 삼중 아미노산 치환 M252Y/S254T/T256E를 갖는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 대략 동일한 열 안정성을 갖는다.

[0030] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 항체, 예를 들어, 단일클론 항체이다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 항체는 키메라, 인간화, 또는 인간 항체이다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 항체는 전장 항체이다.

[0031] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 하나 이상의 인간 표적과 특이적으로 결합한다.

[0032] 다른 양태에서, a) M252Y/T256D, M252Y/T256E, M252Y/T307Q, M252Y/T307W, T256D/T307Q, T256D/T307W, T256E/T307Q, 및 T256E/T307W로 구성된 군으로부터 선택된 이중 아미노산 치환(이때, 트레오닌(T)은 아미노산 위치 254에 있지 않고, 히스티딘(H)은 위치 311에 있지 않고, 티로신(Y)은 아미노산 위치 434에 있지 않음), 또는 b) M252Y/T256D/T307Q, M252Y/T256D/T307W, M252Y/T256E/T307Q, 및 M252Y/T256E/T307W로 구성된 군으로부터 선택된 삼중 아미노산 치환(이때, 트레오닌(T)은 아미노산 위치 254에 있지 않고, 히스티딘(H)은 위치 311에 있지 않고, 티로신(Y)은 아미노산 위치 434에 있지 않음)을 포함하는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 펩티드로서, 이때, 아미노산 치환은 EU 넘버링에 따른 것인, 단리된 결합 폴리펩티드가 제공된다.

[0033] 특정 예시적 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 변형된 인간 Fc 도메인이다. 특정 예시적 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 변형된 IgG1 Fc 도메인이다.

[0034] 특정 예시적 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 인간 FcRn 결합 친화도, 랫트 FcRn 결합 친화도, 또는 인간 및 랫트 FcRn 결합 친화도를 갖는다.

[0035] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 변경된 혈청 반감기를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 증가된 혈청 반감기를 갖는다.

[0036] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여

변경된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 상승된 비 산성 pH에서의 결합 폴리펩티드의 FcRn 결합 친화도와 비교하여 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 증진된 FcRn 결합 친화도는 감소된 FcRn 결합 해리 속도를 포함한다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 EU 넘버링에 따른 이중 아미노산 치환 M428L/N434S를 갖는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드보다 비 산성 pH에서 더 적은 FcRn 결합 친화도를 갖는다.

[0037] 특정 예시적 구현예에서, 산성 pH는 약 6.0이다. 특정 예시적 구현예에서, 산성 pH는 약 6.0이고, 비 산성 pH는 약 7.4이다.

[0038] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 변경된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 감소된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 증진된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는다.

[0039] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 대략 동일한 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는다.

[0040] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 대략 동일한 열 안정성을 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 EU 넘버링에 따른 삼중 아미노산 치환 M252Y/S254T/T256E을 갖는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 대략 동일한 열 안정성을 갖는다.

[0041] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 항체, 예를 들어, 단일클론 항체이다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 항체는 키메라, 인간화, 또는 인간 항체이다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 항체는 전장 항체이다.

[0042] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 하나 이상의 인간 표적과 특이적으로 결합한다.

[0043] 특정 양태에서, 변형된 Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드로서, 이때, 변형된 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 256의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307의 글루타민(Q)을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드가 제공된다.

[0044] 특정 예시적 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 변형된 인간 Fc 도메인이다. 특정 예시적 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 변형된 IgG1 Fc 도메인이다.

[0045] 특정 예시적 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 인간 FcRn 결합 친화도 또는 랫트 FcRn 결합 친화도, 또는 인간 및 랫트 FcRn 결합 친화도를 갖는다.

[0046] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 증가된 혈청 반감기를 갖는다.

[0047] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 상승된 비 산성 pH에서의 결합 폴리펩티드의 FcRn 결합 친화도와 비교하여 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 증진된 FcRn 결합 친화도는 감소된 FcRn 결합 해리 속도를 포함한다.

[0048] 특정 예시적 구현예에서, 산성 pH는 약 6.0이다. 특정 예시적 구현예에서, 산성 pH는 약 6.0이고, 비 산성 pH는 약 7.4이다.

[0049] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 변경된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는다.

[0050] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 단일클론 항체이다. 특정 예시적 구현예에서, 항체는 키메

라, 인간화, 또는 인간 항체이다.

[0051] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 하나 이상의 인간 표적과 특이적으로 결합한다.

[0052] 특정 양태에서, 단리된 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 단리된 핵산 분자가 제공된다.

[0053] 특정 양태에서, 단리된 핵산 분자를 포함하는 벡터가 제공된다. 특정 예시적 구현예에서, 벡터는 발현 벡터이다. 특정 양태에서, 단리된 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터가 제공된다.

[0054] 특정 양태에서, 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 특정 양태에서, 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.

[0055] 특정 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 진핵생물 또는 원핵생물 기원의 숙주 세포이다. 특정 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 포유류 기원의 숙주 세포이다. 특정 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 박테리아 기원의 숙주 세포이다.

[0056] 특정 양태에서, 단리된 결합 폴리펩티드를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.

[0057] 특정 양태에서, 단리된 항체를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.

[0058] 특정 양태에서, 변형된 Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드로서, 이때, 변형된 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 256의 아스파르트산(D) 및 아미노산 위치 307의 트립토판(W)을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드가 제공된다.

[0059] 특정 예시적 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 변형된 인간 Fc 도메인이다. 특정 예시적 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 변형된 IgG1 Fc 도메인이다.

[0060] 특정 예시적 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 인간 FcRn 결합 친화도 또는 랫트 FcRn 결합 친화도, 또는 인간 및 랫트 FcRn 결합 친화도를 갖는다.

[0061] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 증가된 혈청 반감기를 갖는다.

[0062] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 상승된 비 산성 pH에서의 결합 폴리펩티드의 FcRn 결합 친화도와 비교하여 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 증진된 FcRn 결합 친화도는 감소된 FcRn 결합 해리 속도를 포함한다.

[0063] 특정 예시적 구현예에서, 산성 pH는 약 6.0이다. 특정 예시적 구현예에서, 산성 pH는 약 6.0이고, 비 산성 pH는 약 7.4이다.

[0064] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 변경된 Fc $\gamma$ RIIa 결합 친화도를 갖는다.

[0065] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 단일클론 항체이다. 특정 예시적 구현예에서, 항체는 키메라, 인간화, 또는 인간 항체이다.

[0066] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 하나 이상의 인간 표적과 특이적으로 결합한다.

[0067] 특정 양태에서, 단리된 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 단리된 핵산 분자가 제공된다.

[0068] 특정 양태에서, 단리된 핵산 분자를 포함하는 벡터가 제공된다. 특정 예시적 구현예에서, 벡터는 발현 벡터이다. 특정 양태에서, 단리된 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터가 제공된다.

[0069] 특정 양태에서, 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 특정 양태에서, 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.

[0070] 특정 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 진핵생물 또는 원핵생물 기원의 숙주 세포이다. 특정 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 포유류 기원의 숙주 세포이다. 특정 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 박테리아 기원의 숙주 세포이다.

- [0071] 특정 양태에서, 단리된 결합 폴리펩티드를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.
- [0072] 특정 양태에서, 단리된 항체를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.
- [0073] 특정 양태에서, 변형된 Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드로서, 이때, 변형된 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 252의 티로신(Y) 및 아미노산 위치 256의 아스파르트산(D)을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드가 제공된다.
- [0074] 특정 예시적 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 변형된 인간 Fc 도메인이다. 특정 예시적 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 변형된 IgG1 Fc 도메인이다.
- [0075] 특정 예시적 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 인간 FcRn 결합 친화도 또는 랫트 FcRn 결합 친화도, 또는 인간 및 랫트 FcRn 결합 친화도를 갖는다.
- [0076] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 증가된 혈청 반감기를 갖는다.
- [0077] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 상승된 비 산성 pH에서의 결합 폴리펩티드의 FcRn 결합 친화도와 비교하여 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 증진된 FcRn 결합 친화도는 감소된 FcRn 결합 해리 속도를 포함한다.
- [0078] 특정 예시적 구현예에서, 산성 pH는 약 6.0이다. 특정 예시적 구현예에서, 산성 pH는 약 6.0이고, 비 산성 pH는 약 7.4이다.
- [0079] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 변경된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는다.
- [0080] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 단일클론 항체이다. 특정 예시적 구현예에서, 항체는 키메라, 인간화, 또는 인간 항체이다.
- [0081] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 하나 이상의 인간 표적과 특이적으로 결합한다.
- [0082] 특정 양태에서, 단리된 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 단리된 핵산 분자가 제공된다.
- [0083] 특정 양태에서, 단리된 핵산 분자를 포함하는 벡터가 제공된다. 특정 예시적 구현예에서, 벡터는 발현 벡터이다. 특정 양태에서, 단리된 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터가 제공된다.
- [0084] 특정 양태에서, 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 특정 양태에서, 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.
- [0085] 특정 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 진핵생물 또는 원핵생물 기원의 숙주 세포이다. 특정 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 포유류 기원의 숙주 세포이다. 특정 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 박테리아 기원의 숙주 세포이다.
- [0086] 특정 양태에서, 단리된 결합 폴리펩티드를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.
- [0087] 특정 양태에서, 단리된 항체를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.
- [0088] 특정 양태에서, 변형된 Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드로서, 이때, 변형된 Fc 도메인은 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D) 또는 글루탐산(E) 및 아미노산 위치 307에서 트립토판(W) 또는 글루타민(Q)을 포함하는 적어도 4개의 아미노산 치환의 조합을 포함하고, 이때, 아미노산 위치 254는 트레오닌(T)이 아니며, 아미노산 위치 434에서 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y); 및 아미노산 위치 252에서 티로신(Y)을 더 포함하고, 이때, 아미노산 위치는 EU 넘버링에 따른 것인, 단리된 결합 폴리펩티드가 제공된다.
- [0089] 특정 양태에서, 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서의 아미노산 치환의 조합을 갖는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드: a) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D), 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q), 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y); b) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 글루탐산(E), 아미노산 위치 307에서 트립토판(W), 및 아미노산 위치 434에

서 티로신(Y); c) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 글루탐산(E), 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q), 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y); d) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D), 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q), 및 아미노산 위치 434에서 페닐알라닌(F); 또는 e) 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D), 아미노산 위치 307에서 트립토판(W), 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y).

[0090]로서, 이때, 아미노산 치환은 EU 넘버링에 따른 것인, 단리된 결합 폴리펩티드가 제공된다.

[0091]특정 양태에서, M252Y/T256D/T307Q/N434Y, M252Y/T256E/T307W/N434Y, M252Y/T256E/T307Q/N434Y, M252Y/T256D/T307Q/N434F, 및 M252Y/T256D/T307W/N434Y로 구성된 군으로부터 선택된 사중 아미노산 치환을 포함하는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드로서, 아미노산 치환은 EU 넘버링에 따른 것인, 단리된 결합 폴리펩티드가 제공된다.

[0092]특정 예시적 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 변형된 인간 Fc 도메인이다. 특정 예시적 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 변형된 IgG1 Fc 도메인이다.

[0093]특정 예시적 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 인간 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 랫트 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 인간 및 랫트 FcRn 결합 친화도를 갖는다.

[0094]특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 변경된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다.

[0095]특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F를 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다.

[0096]특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 비 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F를 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 비 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다.

[0097]특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도 및 비 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F를 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도 및 비 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다.

[0098]특정 예시적 구현예에서, 산성 pH는 약 6.0이다. 특정 예시적 구현예에서, 비 산성 pH는 약 7.4이다.

[0099]특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 변경된 혈청 반감기를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 감소된 혈청 반감기를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F를 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 감소된 혈청 반감기를 갖는다.

[0100]특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 변경된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 감소된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F를 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 감소된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는다.

[0101]특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 감소된 열 안정성을 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F를 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 감소된 열 안정성을 갖는다.

[0102]특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 항체이다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 단일클론 항체이다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 항체는 키메라, 인간화, 또는 인간 항체이다. 특정

예시적 구현예에서, 단리된 항체는 전장 항체이다.

[0103] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 하나 이상의 표적과 특이적으로 결합한다.

[0104] 특정 양태에서, 단리된 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 단리된 핵산 분자가 제공된다.

[0105] 특정 양태에서, 단리된 핵산 분자를 포함하는 백터가 제공된다.

[0106] 특정 예시적 구현예에서, 백터는 발현 백터이다.

[0107] 특정 양태에서, 백터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.

[0108] 특정 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 진핵생물 또는 원핵생물 기원의 숙주 세포이다. 특정 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 포유류 기원의 숙주 세포이다. 특정 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 박테리아 기원의 숙주 세포이다.

[0109] 특정 양태에서, 단리된 결합 폴리펩티드를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.

[0110] 특정 양태에서, 단리된 항체를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.

[0111] 특정 양태에서, EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D), 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q), 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y)을 포함하는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드가 제공된다.

[0112] 특정 양태에서, EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 글루탐산(E), 아미노산 위치 307에서 트립토판(W), 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y)을 포함하는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드가 제공된다.

[0113] 특정 양태에서, EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 글루탐산(E), 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q), 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y)을 포함하는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드가 제공된다.

[0114] 특정 양태에서, EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D), 아미노산 위치 307에서 글루타민(Q), 및 아미노산 위치 434에서 페닐알라닌(F)을 포함하는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드가 제공된다.

[0115] 특정 양태에서, EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 252에서 티로신(Y), 아미노산 위치 256에서 아스파르트산(D), 아미노산 위치 307에서 트립토판(W), 및 아미노산 위치 434에서 티로신(Y)을 포함하는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드가 제공된다.

[0116] 특정 예시적 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 변형된 인간 Fc 도메인이다. 특정 예시적 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 변형된 IgG1 Fc 도메인이다.

[0117] 특정 예시적 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 인간 FcRn 결합 친화도를 갖는다.

[0118] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 감소된 혈청 반감기를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F를 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 감소된 혈청 반감기를 갖는다.

[0119] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도 및 비 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F를 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도 및 비 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다.

[0120] 특정 예시적 구현예에서, 산성 pH는 약 6.0이고, 비 산성 pH는 약 7.4이다.

[0121] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 감소된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F를 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 감소된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는다.

[0122] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여

감소된 열 안정성을 갖는다. 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F를 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 감소된 열 안정성을 갖는다.

[0123] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 단일클론 항체이다. 특정 예시적 구현예에서, 항체는 키메라, 인간화, 또는 인간 항체이다.

[0124] 특정 예시적 구현예에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 하나 이상의 표적과 특이적으로 결합한다.

[0125] 특정 양태에서, 단리된 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 단리된 핵산 분자가 제공된다.

[0126] 특정 양태에서, 단리된 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터가 제공된다.

[0127] 특정 양태에서, 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.

[0128] 특정 양태에서, 단리된 결합 폴리펩티드를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.

[0129] 특정 양태에서, 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체의 질환 또는 장애의 치료 방법으로, 대상체에게 치료적 유효량의 단리된 결합 폴리펩티드를 투여하는 단계, 또는 대상체에게 치료적 유효량의 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0130] 특정 예시적 구현예에서, 질환 또는 장애가 암이다. 특정 예시적 구현예에서, 암은 종양이다.

[0131] 특정 예시적 구현예에서, 질환 또는 장애는 자가면역 장애이다.

[0132] 특정 양태에서, 암의 치료를 필요로 하는 대상체의 암의 치료 방법으로, 대상체에게 치료적 유효량의 단리된 결합 폴리펩티드를 투여하는 단계, 또는 대상체에게 치료적 유효량의 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0133] 특정 양태에서, 자가면역 장애의 치료를 필요로 하는 대상체의 자가면역 장애의 치료 방법으로, 대상체에게 치료적 유효량의 단리된 결합 폴리펩티드를 투여하는 단계, 또는 대상체에게 치료적 유효량의 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

## 도면의 간단한 설명

[0134] 본 발명의 상기 및 다른 특징 및 이점은 첨부 도면과 함께 아래의 예시적인 구현예의 상세한 설명으로부터 보다 충분히 이해될 것이다.

**도 1의 A 및 B**는 IgG1 Fc 영역과 상호 작용하는 FcRn의 구조를 도시한 것이다. 도 1의 A는  $\alpha$ -도메인(회색) 및  $\beta$  2-m(연회색) hFcRn 서브유닛과 복합체를 이룬, "글리칸"으로 표지된 막대로 제시된 글리코실화를 포함하여, 하나의 Fc 단량체(진회색 리본)를 보여주는 IgG1 Fc(pdb: 4n0u)와 hFcRn 사이의 상호 작용을 도시한 것이다. FcRn과의 상호 작용에 참여한 항체 잔기들 대부분은 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 계면(접선)에 바로 인접하고 글리코실화 부위와 반대쪽의 루프에 위치한다. 도 1의 B는 도 1의 A에 대해 75° 회전된 IgG1 Fc 결정 구조(pdb: 5d4q)의 표면 묘사를 도시한 것이다. FcRn 결합 계면은 C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3 도메인의 잔기들로 이루어진다. M252; I253; S254; T256; K288; T307; K322; E380; L432; N434 및 Y436으로 표시된 바와 같이, 막대로 제시된 11개의 위치에서 포화 라이브리리를 구축하였다. 이들 잔기 모두는 FcRn과 매우 근접하거나 직접 접촉한다. pH 의존성을 담당하는 결정적인 히스티딘 잔기들(H310, H433, H435)의 표면이 관심 위치 근처에서 모이며, 표시된 바와 같다.

**도 2a 내지 도 2d**는 옥텟(Octet) 스크리닝 분석 및 결과를 도시한 것이다. **도 2a**는 옥텟 스크리닝 분석을 개략적으로 나타낸 것이다. NiNTA 바이오센서가 히스티딘 태그가 붙은 항원을 포획하고, 이후, 랙트 FcRn(rFcRn) 결합 동역학을 위해 항체 변이체를 포획한다. 도 2b는 rFcRn 결합 단계의 기점으로 정렬한 야생형(실선), T307A/E380A/N434A (AAA) 변이체(짧은 대시), LS(단일 점이 개재된 짧은 대시),YTE(긴 대시), H435A(단일 점이 개재된 긴 대시) 및 H310A/H435Q(두 개의 점이 개재된 긴 대시) 항체의 pH 6.0에서의 rFcRn 결합 동역학 프로파일을 도시한 것이다. H435A 및 H310A/H435Q 변이체는 FcRn 결합이 거의 또는 전혀 나타나지 않았다.YTE 변이체는 옥텟 rFcRn 결합 분석에서 조사된 가장 느린 FcRn 해리 속도를 갖는다. 도 2c는 옥텟 스크린으로부터 수득된 돌연변이체의 서브세트에 의한 pH 6.0에서의 FcRn 결합 동역학의 정규화를 그래프로 도시한 것이다. 대부분의 돌연변이체는 rFcRn에 대한 상당한 결합을 유지했지만, 일부는 모의 대조군(접선)과 유사하여, 모든 rFcRn 결합의 손실을 나타냈다(접선(모의) 아래에 위치한 긴 대시). 2개의 변이체(실선)는 야생형 항체(굵은 긴 대시)보다 느린 rFcRn 해리 속도를 가졌다. 도 2d는 모든 점 돌연변이에 대한 rFcRn 해리 속도의 산점도 분석을 도시한 것으로, 관찰 가능한 rFcRn 결합 동역학은 잔기 위치에 의해 분리된다. 포화 변이체는 다음의 4개의

rFcRn 해리 속도 체제 중 하나에 속한다: 결합 없음(미도시), 빠른 결합(검은색), 야생형 유사 결합(흰색), 느린 결합(회색). 18개의 돌연변이체는 야생형 항체(검은색 파선)보다 rFcRn으로부터 현저히 느린 해리 속도를 나타내었다.

도 3은 pH 6.0 및 pH 7.4에서 인간 및 랫트 FcRn을 이용한 기준 및 야생형 변이체의 비아코어(Biacore) 동역학을 그래프로 도시한 것이다. 야생형(왼쪽 상단), AAA 변이체(오른쪽 상단), M428/N434S(LS) 변이체(왼쪽 하단) 및 M252Y/S254T/T256E(YTE) 변이체(오른쪽 하단)의 농도 계열에 대한 모든 FcRn 결합 곡선을 pH 6.0(첫째 및 셋째 행) 및 pH 7.4(둘째 및 넷째 행)에서 각각의 인간(첫째 및 셋째 열) 및 랫트(둘째 및 넷째 열) FcRn에 대해 표시하였다. AAA, LS 및 YTE 변이체는 야생형 항체보다 FcRn으로부터 더 느린 해리 속도를 나타내었다. 일반적으로, 항체는 야생형과 비교하여 대략 10배의 증가된 친화도로 rFcRn과 결합한다. LS 변이체는 pH 7.4에서 가장 긴밀한 친화도를 가졌고, pH 7.4에서 hFcRn에 대해 가장 큰 잔류 결합을 가진 반면, rFcRn은 YTE 변이체와 가장 긴밀하게 결합하였다.

도 4a는 pH 6.0에서 인간 및 랫트 FcRn을 이용한 리드 포화 변이체의 비아코어 동역학을 그래프로 도시한 것이다. 18개의 리드 포화 변이체에 대한 농도 계열의 FcRn 결합 동역학 자취를 도시하였다. M252Y, T256D, T256E, N434F, N434P, N434Y, T307A, T307E, T307F, T307Q 및 T307W는 인간 및 랫트 FcRn으로부터 더 느린 해리 속도를 가졌다. 나머지 변이체는 랫트 FcRn에 대해서만 특이적이었다.

도 4b는 pH 6.0에서 인간 FcRn과의 WT, 기준 및 리드 단일 포화 변이체의 FcRn 결합 동역학을 그래프로 도시한 것이다. pH 6.0에서 인간 FcRn과의 WT, LS, YTE 및 18개의 포화 변이체의 농도 계열의 FcRn 결합 센서그램. 조합 라이브러리에 사용되는 단일 포화 변이체는 밑줄과 굵은 글자체로 표시하였다.

도 5a 내지 도 5d는 pH 6.0에서 인간 및 랫트 FcRn으로부터의 더 느린 해리 속도를 갖는 여러 변이체를 보여주는 데이터를 도시한 것이다. 도 5a 및 도 5b는 다양한 변이체의 비아코어 센서그램을 도시한 것이다. 도 5a는 YTE 변이체(단일 점이 개재된 긴 대시), LS 변이체(두 개의 점이 개재된 긴 대시), 야생형(WT; 점선), 및 리드 포화 변이체(리드; 다양한 음영의 실선)에 대한 pH 6.0에서의 인간 FcRn의 해리 속도를 도시한 것이다. 도 5a에서, WT와 비교하여 개선된 hFcRn 해리 속도를 보여주는 정규화된 센서그램이 도시되었다. 도 5b는 AAA 변이체(점선), LS 변이체(두 개의 점이 개재된 대시), YTE 변이체(단일 점이 개재된 대시), 야생형(실선) 및 리드 포화 변이체(다양한 빈도와 두께의 파선)에 대한 pH 6.0에서의 랫트 FcRn의 해리 속도를 도시한 것이다. 11개의 리드 항체 각각의 대표적인 주입을 명확성을 위해 표시하였다. 이들 리드 단일 변이체는 야생형과 비교하여 인간 및 랫트 FcRn으로부터 개선된 해리 속도를 보여주었다. 도 5c 및 도 5d는 비아코어 동역학 측정으로부터 얻은 결합 속도 및 해리 속도를 이용한 인간(도 5c) 및 랫트(도 5d)에 대한 리드 포화(흰색 원형) 및 야생형(검은색 원형) 항체 변이체에 대한 결합 친화도 플롯을 도시한 것이다. 기준 변이체를 다음과 같이 표시하였다: AAA(오른쪽 아래를 향한 사선), LS(점선) 및 YTE(왼쪽 아래를 향한 사선). FcRn 해리 속도의 개선에도 불구하고, 대다수 변이체는 더 느린 결합 동역학으로 인해, 인간 또는 랫트 FcRn에 대해 더 긴밀한 친화도를 갖지 않았다. 11개의 변이체는 두 종의 FcRn으로부터 더 느린 해리 속도를 가졌다.

도 6a 내지 도 6d는 리드 포화 돌연변이의 조합이 FcRn 해리 속도 및 결합 친화도를 더 개선하였음을 보여주는 데이터를 도시한 것이다. 도 6a 및 도 6b는 각각 인간 및 랫트 FcRn에 대한 FcRn 해리 속도를 보여주는 대표적인 비아코어 센서그램을 도시한 것이다. 도 6a는 야생형(점선) 및 LS 변이체(두 개의 점이 개재된 긴 대시)와 비교한, 단일(파선), 이중(연회색 실선), 삼중(회색 실선) 및 사중(검은색 실선) 조합 변이체의 대표적인 변이체의 인간 FcRn에 대한 정규화된 센서그램을 도시한 것이다. 도 6b는 야생형(점선) 및 YTE 변이체(실선)와 비교한, 단일(두 개의 점이 개재된 긴 대시), 이중(단일 점이 개재된 긴 대시), 삼중(긴 대시), 및 사중(짧은 대시) 조합 변이체의 대표적인 랫트 FcRn에 대한 정규화된 센서그램을 도시한 것이다. 다중 돌연변이의 혼입은 기준 변이체보다 더 큰 정도로 해리 속도를 감소시키고 FcRn에 대한 결합 친화도를 증진시켰다. 도 6c 및 도 6d는 인간(도 6c) 또는 랫트(도 6d)에 대한 해리 속도의 함수로서 결합 속도를 보여주는 조합 포화 변이체의 플롯을 도시한 것으로, 이는 대다수의 변이체가 기준 변이체와 비교하여 pH 6.0에서 FcRn에 대한 증진된 결합을 가짐을 보여주었다. 인간 및 랫트 FcRn에 대한 가장 긴밀한 결합 변이체는 각각 사중 및 이중 조합이었다.

도 7a 내지 도 7d는 pH 6.0에서의 증진된 FcRn 결합이 상호 작용의 pH 의존성을 방해함을 보여주는 데이터를 도시한 것이다. 도 7a 및 도 7b는 야생형(점선), 및 LS 변이체(도 7a, 실선) 및 YTE 변이체(도 7b, 실선)과 비교한, 단일(두 개의 점이 개재된 긴 대시), 이중(단일 점이 개재된 긴 대시), 삼중(긴 대시), 및 사중(짧은 대시) 조합 변이체의 pH 7.4에서의 비아코어 FcRn 결합 동역학의 대표적인 센서그램을 도시한 것이다. FcRn 결합 증진 돌연변이의 수를 증가시키자 생리적 pH에서 더 큰 잔류 결합이 초래되었으며, 대부분의 이중, 삼중 및 사중 변

이체는 두 종의 FcRn에 대해 강력한 결합을 보여주었다. 도 7c 및 도 7d는 pH 6.0에서의 결합 친화도의 함수로서 pH 7.4에서의 인간(도 7c) 또는 랫트(도 7d) FcRn에 대한 모든 포화 변이체의 정상 상태

$$RU = \frac{R_{max} - 오프셋}{[항체] + K_{d,app}}$$
 (방정식 2))의 플롯을 도시한 것이다. 도 7c에서, pH 6.0에서의 FcRn 결합 친화도와 pH 7.4에서의 잔류 FcRn 결합을 비교한 것이 표시되었다. 개선된 FcRn 결합 특성을 갖는 리드 조합이 LS 기준 변이체(다이아몬드)로 정의된 왼쪽 하단의 사분면을 차지한다. 도 7d에서, LS(다이아몬드) 및 YTE(삼각형) 변이체가 각각 리드 확인을 위한 컷오프로 작용한다. 이들 두 변이체는 각각 인간 및 랫트 FcRn에 대해 pH 6.0에서 가장 긴밀한 결합 친화도 및 pH 7.4에서 가장 큰 잔류 결합을 가졌다. 도 7c 및 도 7d에서, 단일(흰색 원형), 이중(연회색 원형), 삼중(진회색 원형), 및 사중(검은색 원형) 변이체뿐만 아니라, YTE 변이체(삼각형)가 표시되었다.

도 8a 내지 도 8c는 기준 변이체의 FcRn 친화도 크로마토그래피 및 시차 주사 형광측정법(DSF)으로부터 수득한 데이터를 도시한 것이다. 도 8a는 WT(검은색 실선), AAA(점선), LS(두 개의 점이 개재된 긴 대시), YTE(단일 점이 개재된 긴 대시), H435A(연회색 실선) 및 H310A/H435Q(AQ; 진회색 실선) 변이체에 대한 정규화된 용리 프로파일을 도시한 것이다. pH를 그래프 상단에 표시하였다. FcRn 결합이 없는 변이체(H435A, H310A/H435Q)는 컬럼에 결합하지 않고, 통과액(<10 mL)으로 용리된다. AAA, LS 및 YTE 변이체는 WT 항체보다 더 높은 pH에서 용리된다. 도 8b는 WT(검은색), LS(회색) 및 YTE(진회색) 변이체의 DSF 프로파일을 도시한 것이다. YTE는 WT 및 LS와 비교하여 불안정해졌다. 도 8c는 WT 및 LS 변이체(수직 점선)와 비교한, 조합 변이체에 사용된 7개의 리드 단일 변이체의 FcRn 친화도 컬럼 용리 프로파일을 도시한 것이다. 두 개의 변이체(N434F/Y)는 LS보다 더 높은 pH에서 용리되며, 이들 돌연변이를 함유하는 변이체에 대한 FcRn과의 상호 작용에 대한 감소된 pH 의존성을 의미한다.

도 9a 내지 도 9d는 조합 변이체가 pH 의존성 및 열 안정성을 상당히 교란시켰음을 보여주는 데이터를 도시한 것이다. 도 9a는 단일(두 개의 점이 개재된 긴 대시), 이중(단일 점이 개재된 긴 대시), 삼중(긴 대시), 및 사중(짧은 대시)의 대표적인 FcRn 친화도 크로마토그램을 도시한 것이다. FcRn 결합을 증진시키는 돌연변이의 수를 증가시키자, 더 높은 pH 값; LS 변이체(작은 수직 점선)로 용리가 이동되었다. 도 9b는 단일(흰색 원형), 이중(수평선), 삼중(수직선) 및 사중(체크무늬) 돌연변이체를 포함한, 리드 포화 및 조합 변이체에 대한 용리 pH의 박스 플롯을 도시한 것으로, FcRn 증진 돌연변이의 수가 증가함에 따라 더 높은 pH 값으로의 경향을 나타내었다. 도 9c는 FcRn 친화도 크로마토그래피로부터의 용리 pH와 비아코어를 이용한 hFcRn 해리 속도 사이의 높은 상관관계( $R^2 = 0.94$ )가, 개선된 FcRn 해리 동역학을 갖는 항체-FcRn 상호 작용의 pH 의존성 상실을 나타낸다. AAA(오른쪽 아래를 향한 사선), LS(점선) 및 YTE(왼쪽 아래를 향한 사선) 변이체는 이중 변이체와 비슷한 hFcRn 해리 속도 및 용리 pH 값을 가졌다. 도 9d는 추가 FcRn 결합 증진 돌연변이가 WT, 단일 또는 기준 변이체와 비교하여 항체를 불안정화시킴을 보여주는 조합 포화 변이체의 DSF로부터 얻은  $T_m$ 의 박스 플롯을 도시한 것이다.

도 10a 및 도 10b는 7개의 리드 변이체의 FcRn 친화도 크로마토그래피 및 DSF으로부터 수득한 데이터를 도시한 것이다. 도 10a는 M252Y(실선), T256D(단일 점이 개재된 짧은 대시), T256E(긴 대시), T307Q(단일 점이 개재된 긴 대시), T307W(두 개의 점이 개재된 긴 대시), N434F(점선) 및 N434Y(짧은 대시) 변이체의 FcRn 친화도 크로마토그래피를 도시한 것이다. 크로마토그램은 야생형 및 LS 항체(수직 점선)와 비교하여 용리 pH의 이동을 보여주었다. N434F 및 N434Y는 LS 변이체(수직 점선)보다 더 높은 용리 pH(약 8.3의 pH)를 가졌다. 참고를 위하여 특정 용리 부피에서의 pH를 위의 크로마토그램에 표시하였다. 도 10b는 7개의 리드 변이체의 DSF 프로파일을 도시한 것으로, 이는 7개의 리드 단일 변이체 중 어느 것도 YTE 변이체(수직 점선)와 동일한 정도로 항체를 불안정화시키지 않음을 보여주었다. T307Q(단일 점이 개재된 긴 대시)를 제외한 모든 변이체가 WT(수직 점선)와 비교하여 불안정해졌다.

도 11a 내지 도 11c는 Fc $\gamma$ RIIIa 결합이 M252Y를 함유하는 조합 변이체에서 감소되었음을 보여주는 데이터를 도시한 것이다. 도 11a는 WT(검은색), LS(회색) 및 YTE(진회색) 변이체의 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 센서그램이 YTE 변이체에 의한 감소된 결합 반응을 나타냈음을 보여준다. 도 11b는 표시된 바와 같이, 기준, 단일 및 조합 변이체의 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 반응의 박스 플롯을 도시한 것이다. 사중 변이체 전부를 비롯한 M252Y 돌연변이가 있는 변이체는 Fc $\gamma$ RIIIa에 대해 감소된 결합 반응을 함유한다. N434F/Y와의 조합은 전형적으로 Fc $\gamma$ RIIIa와의 증가된 반응을 보여준다. 도 11c는 WT 및 YTE 변이체(수평 점선)와 비교한 7개의 리드 단일 변이체의 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 반응을 도시한 것이다. M252Y 돌연변이는 WT와 비교하여 감소된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합을 보여주었으나, 여섯 개는 이 수용체에 대해 WT와 유사하거나 증가된 결합을 보여준다.

도 12a 내지 도 12d는 7개의 리드 조합 변이체의 FcRn 친화도 크로마토그래피, DSF, 및 Fc $\gamma$ RIIIa 결합으로부터 수득한 데이터를 도시한 것이다. 도 12a는 야생형 항체 및 LS 변이체(각각 수직 점선 및 수직 실선)와 비교한, 7개의 리드 조합 변이체의 FcRn 친화도 크로마토그램을 도시한 것이다. 각각의 리드 변이체는 LS 변이체 근처에서 용리 pH를 가졌다. 도 12b는YTE 및 야생형 변이체(표시된 바와 같은 수직 점선)와 비교한, 리드 조합 변이체의 DSF 프로파일을 보여준다. 7개의 리드 변이체 중 6개는YTE 변이체: MDWN(두 개의 점이 개재된 긴 대시); YTWN(긴 대시); YDTN(실선); YETN(단일 점이 개재된 긴 대시); YDQN(점선); YEQN(단일 점이 개재된 짧은 대시)와 비슷하거나 더 불안정해진  $T_m$ 을 가졌다. MDQN 변이체는 야생형 항체(짧은 대시)와 비슷한  $T_m$ 을 가졌다. 도 12c는 야생형(큰 점선) 및YTE 변이체(굵은 긴 대시)와 비교한 7개의 리드 변이체의 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 동역학의 비아코어 센서그램을 도시한 것이다. M252Y 함유 변이체인 YDTN(실선), YDQN(단일 점이 개재된 짧은 대시), YTWN(긴 대시), YETN(단일 점이 개재된 긴 대시) 및 YEQN(작은 점선) 각각은YTE와 비슷한 방식으로 감소된 정상 상태 RU를 보유하였다. (D)는 7개의 리드 변이체, 야생형 및YTE 변이체의 정상 상태 RU를 보여준다. MDWN 및 MDQN 변이체만이 Fc $\gamma$ RIIIa에 대해 야생형 항체와 유사한 친화도를 보유하였다.

도 12e 내지 도 12h는 3개의 리드 변이체가 핵심 항체 속성 범위를 나타냄을 보여주는 데이터를 도시한 것이다. 도 12e는 WT 및 LS(수직 점선)와 비교한, DQ(실선), DW(점선) 및 YD(파선) 변이체의 FcRn 친화도 크로마토그래피 용리 프로파일을 보여준다. 각각의 이중 변이체는 WT와 LS 사이에서 용리를 나타내었다. 도 12f는 YD(파선) 및 DW(점선)이YTE와 비교하여 약간 불안정해졌지만, DQ(실선)는WT와 비슷하였다는 점을 보여준YTE 및 WT 변이체(수직 점선)와 비교한 3개의 변이체의 DSF 형광 프로파일을 도시한 것이다. 도 12g는WT 및YTE(수평 점선)와 비교한 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 센서그램을 도시한 것이다. YD(파선)는YTE와 비슷한 결합 반응을 보여주었으나, DQ(실선) 및 DW(점선)는WT와 비교하여 약간의 감소를 보여주었다. 도 12h는 3개의 리드 변이체 및YTE가LS와 달리 현저히 감소된 또는WT와 유사한 RF 결합을 보여준다는 점을 나타내는 균질한 가교 RF ELISA를 보여주는 데이터를 도시한 것이다. \*\*p<0.001, \*p<0.01.

도 13a 내지 도 13d는 pH 6.0 및 pH 7.4에서의 리드 조합 변이체의 FcRn 결합 동역학의 비교를 보여주는 결과를 도시한 것이다. 도 13a 및 도 13b는 pH 6.0에서 야생형(점선) 및 LS(hFcRn, 도 13a, 굵고 긴 대시) 또는YTE(rFcRn, 도 13b, 굵고 긴 대시)와 비교한, 인간 FcRn(도 13a) 또는 랫트 FcRn(도 13b)에 대해 리드 조합 변이체의 비아코어 FcRn 결합 센서그램을 보여준다. 각각의 조합 변이체는 변경된 결합 속도 및 해리 속도에도 불구하고 각각의 FcRn에 대해 전반적으로 더 긴밀한 결합 친화도를 가졌다. 도 13c 및 도 13d는 pH 7.4에서의 비아코어 FcRn 센서그램을 보여준다. 각각의 hFcRn 리드 변이체는 LS 변이체와 비교하여 비슷하거나 감소된 정상 상태 FcRn 결합 반응을 가졌다. MDQN 및 MDWN 변이체만이 pH 7.4에서YTE 변이체보다 더 적은 rFcRn 결합을 보여주었다.

도 14는 특정 구현예에 따른 포화 라이브러리의 옥텟 rFcRn 결합 해리 속도를 도시한 표이다. 야생형(WT) 및 야생형 유사(WT 유사) 종은 흰색 직사각형으로 표시하였고, WT 종은 표시된 바와 같다. 야생형과 비교하여 rFcRn 결합이 거의 또는 전혀 없는 변이체는 진회색 직사각형으로 표시하였다. 야생형과 비교하여 더 빠른 rFcRn 해리 속도를 갖는 변이체는 연회색 직사각형으로 표시하였고, 야생형과 비교하여 더 느린 rFcRn 해리 속도를 갖는 변이체는 검은색 직사각형으로 표시하였다.

도 15a 내지 도 15c는 CM5 센서 칩을 이용하여 개발된 새로운 결합 분석법을 도시한 것이다. 도 15a는 분석법의 개략도이다. 도 15b는 FcRn의 직접적인 고정화를 보여준다. 도 15c는 비오틴 부착된 FcRn의 스트렙타비딘 포획을 보여준다.

도 16a 및 도 16b는 pH 6.0에서의 항체-2의 FcRn 결합을 도시한 것이다. 도 16a는 인간 FcRn을 도시한 것이다. 도 16b는 마우스 FcRn을 도시한 것이다.

도 17a 및 도 17b는 pH 7.4에서의 항체-2의 FcRn 결합을 도시한 것이다. 도 17a는 인간 FcRn을 도시한 것이다. 도 17b는 마우스 FcRn을 도시한 것이다.

도 18은 다양한 항체-2 변이체의 pH 의존성을 그래프로 도시한 것이다. 리드 변이체는 pH 6에서 LS보다 더 높은 결합 친화도를 유지하였고, pH 7.4에서 더 낮은 잔류 결합을 유지하였다.

도 19는 항체-1 및 항체-2의 백분율을 이용하여 FcRn 결합 pH 의존성을 비교한 것을 도시한 것이다.

도 20은 항체-1 및 항체-2의 백분율을 이용하여 열 안정성을 비교한 것을 도시한 것이다.

도 21은 항체-1 및 항체-2의 백분율을 이용하여 Fc $\gamma$ RIIIa 결합을 비교한 것을 도시한 것이다.

도 22의 a 내지 i는 DQ, DW 및 YD 변이체가 IgG1 백본 중에서 전이 가능함을 보여주는 다수의 플롯을 도시한 것이다. 플롯 a 내지 c는 낮은 pH에서 비슷한 동역학을 보여주는 WT(연회색), LS(진회색), DQ(검은색 실선), DW(점선) 및 YD(파선) 변이체가 있는 세 개의 IgG1 백본의 pH 6.0에서의 정규화된 FcRn 결합 센서그램을 도시한 것이다. 이들 세 개의 변이체 DQ, DW 및 YD는 LS 변이체보다 약간 더 빠른 결합 속도 및 해리 속도를 보유하였으나, 더 긴밀한 FcRn 결합 친화도를 유지하였다. 플롯 d 내지 f는 pH 7.4에서의 FcRn 결합 센서그램을 도시한 것이다; LS 기준 변이체(검은색 실선). 플롯 g 내지 i는 WT(회색), LS(진회색), DQ(검은색 실선), DW(빈 기호) 및 YD(빈 사각형) 변이체가 있는 각각의 항체 백본에 대한 pH 6.0에서의 결합 친화도와 비교한 pH 7.4에서의 FcRn 결합 반응을 도시한 것이다. DQ, DW 및 YD는 pH 6.0에서 증진된 결합 및 pH 7.4에서 최소한의 결합과 함께, 개선된 FcRn 특성을 보여준다.

도 23a 내지 도 23c는 mAb2 백본의 3개의 리드 변이체가 시노몰구스 FcRn에 대한 결합을 비슷하게 개선함을 보여준다. 도 23a는 hFcRn과 비슷한 결합 동역학 및 친화도를 보여주는 WT(회색), LS(진회색), DQ(검은색 실선), DW(점선) 및 YD(파선)의 pH 6.0에서의 정규화된 cFcRn 결합 센서그램을 도시한 것이다. 도 23b는 3개의 변이체에 대한 cFcRn 결합 반응이 생리학적 pH에서 극적으로 감소된다는 점; 그러나 LS(진회색)는 hFcRn과 비슷한 방식으로 WT(회색)보다 더 큰 결합을 보여주었음을 도시한 것이다. 도 23c는 모든 3개의 변이체가 hFcRn으로 관찰된 개선된 FcRn 결합 특성을 유지하였음을 보여주는 WT(회색), LS(진회색), DQ(검은색 실선), DW(빈 기호) 및 YD(빈 사각형)의 pH 6.0에서의 cFcRn 결합 친화도와 pH 7.4에서의 잔류 cFcRn 결합 반응의 비교를 도시한 것이다.

도 24a 및 도 24b는 리드 변이체가 항체 혈청 반감기를 연장시켰음을 보여준다. WT(검은색 실선이 있는 검은색 원형), LS(검은색 파선이 있는 흰색 원형), DQ(연회색 실선이 있는 연회색 원형), DW(진회색 실선이 있는 진회색 원형) 및 YD(검은색 점선이 있는 검은색 원형) 항체의 시노몰구스 원숭이(도 24a) 및 hFcRn 형질전환 마우스(도 24b)에서 혈장 항체 농도의 시간의 함수로서의 약동학 프로파일. 모든 3개의 리드 변이체는 WT와 비교하여 항체 반감기를 연장시킨다.

도 25는 pH 6.0에서의 결합 친화도의 함수로서 pH 7.4에서의 인간 FcRn에 대한 모든 포화 변이체의 정상 상태 RU의 플롯을 도시한 것이다. pH 6.0에서의 FcRn 결합 친화도와 pH 7.4에서의 잔류 FcRn 결합의 비교를 표시하였다. pH 6.0 및 pH 7.4에서 개선된 FcRn 결합 특성을 갖는 사중 조합을 플롯의 오른쪽 위의 사분면에 표시하였다. 단일(흰색 원형), 이중(연회색 원형), 삼중(진회색 원형), 및 사중(검은색 원형) 변이체뿐만 아니라, 기준 AAA, LS, YTE 변이체(표시된 바와 같음)를 표시하였다.

도 26은 비오틴 부착된 FcRn을 포획하는 데 사용되는 비오틴 포획 방법의 개략도를 도시한 것이다.

도 27은 YTEKF 기준 및 표시된 바와 같은 조합 변이체의 pH 6.0에서의 인간 FcRn 결합 동역학을 보여주는 플롯을 도시한 것이다.

도 28a 및 도 28b는 pH 6.0(도 28a) 및 pH 7.4(도 28b)에서의 YTEKF 기준과 비교한, 조합 변이체의 FcRn 결합 동역학을 보여준다. 야생형은 검은색 실선(WT)으로 표시하였고, YTEKF 기준은 점선으로 표시하였다.

도 29는 YTEKF 기준과 비교하여 pH 6.0에서의 결합 친화도의 함수로서 pH 7.4에서의 인간 FcRn에 대한 선택 변이체의 정상 상태 RU의 플롯을 도시한 것이다. 몇몇 변이체(리드 사중 변이체)가 YTEKF 기준에 비해 pH 6.0 및 pH 7.4에서 인간 FcRn에 대한 증진된 결합 친화도를 나타내었다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0135] 본 개시는 변경된 Fc 신생아 수용체(FcRn) 결합 친화도를 갖는 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항체)를 제공한다. 특정 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 야생형(예를 들어, 비 변형된) Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 FcRn 결합 친화도를 증진시키는 변형된 Fc 도메인을 포함한다. 본 개시는 또한 결합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산, 결합 폴리펩티드를 제조하기 위한 재조합 발현 백터 및 숙주 세포, 및 본원에서 개시된 결합 폴리펩티드를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 질환을 치료하기 위해 본 개시의 결합 폴리펩티드를 이용하는 방법이 또한 제공된다.

[0136] 면역글로불린의 Fc 도메인은 비 항원 결합 기능에 관여하며, 효과기 분자의 결합, 예를 들어, FcRn의 결합에 의해 매개되는 몇몇 효과기 기능을 갖는다. 도 1의 A에 예시된 바와 같이, Fc 도메인은 CH<sub>2</sub> 도메인 및 CH<sub>3</sub> 도메인으로 구성된다. FcRn과의 상호 작용에 참여한 잔기들 대부분은 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 계면(도 1의 A, 점선)에 바로 인접하고 글리코실화 부위와 반대쪽의 루프에 위치한다. 도 1의 B는 IgG1 Fc 결정 구조(pdb: 5d4q)의 표면 표사를 예시한

것으로, FcRn 결합 계면을 포함하는 CH2 및 CH3 도메인의 잔기를 보여준다. 본 개시는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드를 제공한다. 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드는 항체, 또는 면역어드헤신, 또는 Fc 융합 단백질일 수 있다.

[0137] 특정 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 항체의 항원 독립적 효과기 기능, 특히, 결합 폴리펩티드의 순환 반감기 (예를 들어, 혈청 반감기)를 변경시키는 아미노산 치환을 포함하는 변형된 Fc 도메인을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 야생형(즉, 비 변형된) Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드에 비해, 결합 폴리펩티드의 혈청 반감기를 변경시키는 아미노산 치환을 포함하는 변형된 Fc 도메인을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 야생형(즉, 비 변형된) Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드에 비해, 결합 폴리펩티드의 혈청 반감기를 증가시키는 아미노산 치환을 포함하는 변형된 Fc 도메인을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 야생형(즉, 비 변형된) Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드에 비해, 결합 폴리펩티드의 혈청 반감기를 감소시키는 아미노산 치환을 포함하는 변형된 Fc 도메인을 포함할 수 있다.

[0138] 특정 구현예에서, 순환 반감기(예를 들어, 혈청 반감기)를 변경시키는(즉, 증가시키거나 감소시키는) 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드는 순환 반감기를 변경시키는 돌연변이(들) 이외에 하나 이상의 돌연변이를 더 함유한다. 특정 구현예에서, 순환 반감기를 변경시키는 돌연변이(들) 이외의 하나 이상의 돌연변이는, 예를 들어, 대략 동일한 면역원성 등의 완전한 비변경된 항체와 비교할 때, 감소되거나 증진된 효과기 기능, 비 공유적으로 이량체화하는 능력, 종양 부위에서 국소화하는 증가된 능력, 감소된 혈청 반감기, 증가된 혈청 반감기 중 하나 이상과 같은, 하나 이상의 원하는 생화학적 특징을 제공한다.

[0139] 본원에서 기술된 결합 폴리펩티드는 이러한 치환이 결여된 결합 폴리펩티드와 비교할 때, 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 증가되거나 감소된 결합을 나타낼 수 있으며, 따라서 각각 증가되거나 감소된 혈청 반감기를 가질 수 있다. FcRn에 대한 개선된 친화도를 가지는 Fc 도메인은 더 긴 혈청 반감기를 가질 것으로 예상되며, 이러한 분자들은 예를 들어, 만성 질환이나 장애를 치료하기 위해 투여되는 항체의 긴 반감기가 요구되는 포유동물의 치료 방법에 유용하게 적용된다. 반대로, 감소된 FcRn 결합 친화도를 가지는 Fc 도메인은 더 짧은 혈청 반감기를 가질 것으로 예상되며, 이러한 분자들은 또한 예를 들어, 단축된 순환 시간이 유리할 수 있는 포유동물에 대한 투여, 예컨대 생체 내 진단 영상화 또는 출발 항체가 연장된 기간 동안 순환계에 존재하는 경우 독성 부작용을 가지는 상황에 유용하다. FcRn에 대한 결합 친화도가 감소된 Fc 도메인은 태반을 가로지를 가능성도 적으므로, 임신부에서 질환이나 장애를 치료하는 데에도 유용하다. 추가로, 감소된 FcRn 결합 친화도가 바람직 할 수 있는 다른 적용예는 뇌, 신장 및/또는 간으로 국소화되는 적용예를 포함한다.

[0140] 이 개시에서 기술된 방법은 이러한 방법 및 조건이 변할 수 있으므로 본원에서 개시된 특정 방법 및 실험 조건에 한정되지 않음을 이해해야 한다. 본원에서 사용된 용어가 오직 특정 구현예를 기술하기 위한 목적을 위한 것이며, 제한하는 것으로 의도되지 않음이 또한 이해되어야 한다.

[0141] 나아가, 본원에서 기술된 실험은, 달리 지시되지 않는 한, 당해 기술 분야 내의 통상적인 분자 및 세포 생물학적 및 면역학적 기술을 사용한다. 이러한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 문헌에 충분히 설명되어 있다. 예를 들어, 문헌[Ausubel, et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2008)(모든 보충판 포함)], 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition) by MR Green and J. Sambrook and Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Chapter 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (2013, 2<sup>nd</sup> edition)] 참조.

[0142] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 과학적 및 기술적 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 의미를 갖는다. 임의의 잠재적인 모호성이 있는 경우, 본원에서 제공된 정의가 임의의 사전적 또는 외부의 정의보다 우선한다. 문맥에 의해 달리 요구되지 않는 한, 단수형 용어는 복수형을 포함할 것이고, 복수형 용어는 단수형을 포함할 것이다. "또는"의 사용은 달리 진술되지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 용어 "포함하는"뿐만 아니라, 다른 형태, 예컨대 "포함한다" 및 "포함된"의 사용은 한정하는 것이 아니다.

[0143] 일반적으로, 본원에서 기술된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질 및 핵산화학 및 혼성화에 관해 사용되는 명명법은 당해 분야에 널리 알려져 있고, 통상적으로 사용되는 것이다. 본원에서 제공된 방법 및 기술은 달리 지시되지 않는 한 본 명세서 전반에서 인용되고 논의된 다양한 일반적인 참조 및 더 구체적인 참조에 기술된 대로 일반적으로 당해 분야에서 주지된 통상의 방법에 따라 수행된다. 효소 반응 및 정제 기술은 당해 분야에서 일반적으로 수행되는 바와 같거나 본원에서 기술된 바와 같이 제조사의 명세서에 따라 수행된다. 본원에서 기재된 분석 화학, 합성 유기 화학, 및 의약 및 제약 화학과 관련하여 이용되는 명명법 및 이들의 실험실 절차 및 기술은 당해 분야에서 잘 알려져 있고, 통상적으로 사용되는 것들이다. 화학

합성, 화학 분석, 약학적 제제, 제형, 및 전달, 및 환자의 치료를 위해 표준 기법이 사용된다.

[0144] 본 개시가 더욱 용이하게 이해될 수 있게 하는 선택된 용어가 아래에서 정의된다.

[0145] 용어 "폴리펩티드"는 아미노산의 임의의 중합체 사슬을 지칭하고, 문맥상 달리 모순되지 않는 한, 천연 또는 인공 단백질, 폴리펩티드 유사체 또는 단백질 서열의 변이체, 또는 이의 단편을 포함한다. 폴리펩티드는 단량체 또는 중합체일 수 있다. 폴리펩티드 단편은 예를 들어 적어도 약 5개의 인접 아미노산, 적어도 약 10개의 인접 아미노산, 적어도 약 15개의 인접 아미노산, 또는 적어도 약 20개의 인접 아미노산을 포함한다.

[0146] 용어 "단리된 단백질" 또는 "단리된 폴리펩티드"는 그 기원 또는 유래 원천으로 인해, 그의 원 상태에서 수반되는 천연의 연관된 성분과 연관되지 않거나; 동일한 종으로부터의 다른 단백질이 실질적으로 없거나; 상이한 종으로부터의 세포에 의해 발현되거나; 자연에서 발생하지 않는, 단백질 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 따라서, 화학적으로 합성되거나 천연 유래되는 세포와 상이한 세포계에서 합성되는 단백질 또는 폴리펩티드는 그의 천연의 연관된 성분으로부터 "단리될" 것이다. 단백질 또는 폴리펩티드는 또한 당해 분야에 널리 알려진 단백질 정제 기법을 사용하여, 단리에 의해 천연의 연관된 성분이 실질적으로 없도록 될 수 있다.

[0147] 본원에서 사용되는 용어 "결합 단백질" 또는 "결합 폴리펩티드"는 관심 표적 항원(예를 들어, 인간 표적 항원)에 선택적으로 결합하는 것을 담당하는 적어도 하나의 결합 부위를 함유하는 단백질 또는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 또는 면역어드헤신)를 지칭할 것이다. 예시적 결합 부위는 항체 가변 도메인, 수용체의 리간드 결합 부위, 또는 리간드의 수용체 결합 부위를 포함한다. 특정 양태에서, 결합 단백질 또는 결합 폴리펩티드는 다수의 (예를 들어, 2개, 3개, 4개, 또는 그보다 더 많은) 결합 부위를 포함한다. 특정 양태에서, 결합 단백질 또는 결합 폴리펩티드는 치료 효소가 아니다.

[0148] 용어 "리간드"는 또 다른 물질에 결합할 수 있거나, 결합될 수 있는 임의의 물질을 지칭한다. 유사하게, 용어 "항원"은 이에 대해 항체가 생성될 수 있는 임의의 물질을 지칭한다. 항체 결합 기질과 관련하여 "항원"이 일반적으로 사용되고 수용체 결합 기질을 지칭할 때 "리간드"가 종종 사용되지만, 이들 용어는 서로 구별되지 않으며, 광범위한 중첩되는 화학적 개체를 포함한다. 의심의 여지를 없애기 위해, 항원과 리간드는 본원 전체에서 상호 교환적으로 사용된다. 항원/리간드는 웨티드, 폴리펩티드, 단백질, 암타мер, 다당류, 당 분자, 탄수화물, 지질, 올리고뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 합성 분자, 무기 분자, 유기 분자, 및 이의 임의의 조합일 수 있다.

[0149] 본원에서 사용되는 용어 "특이적으로 결합한다"는 최대 약  $1 \times 10^{-6}$  M, 약  $1 \times 10^{-7}$  M, 약  $1 \times 10^{-8}$  M, 약  $1 \times 10^{-9}$  M, 약  $1 \times 10^{-10}$  M, 약  $1 \times 10^{-11}$  M, 약  $1 \times 10^{-12}$  M, 또는 그 미만의 해리 상수(Kd)로 항원에 결합하고/하거나, 비특이적 항원에 대한 친화도보다 적어도 약 2배 더 큰 친화도로 항원에 결합하는 항체 또는 면역어드헤신의 능력을 지칭한다.

[0150] 본원에서 사용되는 용어 "항체"는 관심 항원(예를 들어, 종양 관련 항원)에 대한 유의한 공지된 특이적 면역반응 활성을 갖는 이러한 조립체(예를 들어, 온전한 항체 분자, 면역어드헤신, 또는 이의 변이체)를 지칭한다. 항체 및 면역글로불린은 경쇄와 중쇄 사이에 사슬간 공유 결합을 갖거나 갖지 않는 경쇄 및 중쇄를 포함한다. 척추동물계에서의 기본 면역글로불린 구조는 비교적 잘 이해되어 있다.

[0151] 아래에서 보다 상세히 논의될 바와 같이, 일반 용어 "항체"는 생화학적으로 구별될 수 있는 항체의 5개의 별개의 부류를 포함한다. 항체의 모든 5개의 부류가 본 개시의 범위 내에 명백히 속하지만, 다음의 논의는 일반적으로 면역글로불린 분자의 IgG 부류에 관한 것일 것이다. IgG와 관련하여, 면역글로불린은 분자량이 약 23,000달톤인 두 개의 동일한 경쇄 및 분자량이 53,000 내지 70,000인 두 개의 동일한 중쇄를 포함한다. 4개의 사슬은 "Y" 형태로 이황화 결합에 의해 연결되며, 이때, 경쇄는 "Y"의 입구에서 시작하여 가변 영역을 통해 이어지는 중쇄를 묶는다.

[0152] 면역글로불린의 경쇄는 카파(κ) 또는 람다(λ)로 분류된다. 각각의 중쇄 부류는 카파 또는 람다 경쇄와 함께 결합될 수 있다. 일반적으로, 경쇄 및 중쇄는 서로 공유 결합되고, 2개의 중쇄의 "꼬리" 부분은 면역글로불린이 하이브리도마, B 세포, 또는 유전자 조작된 숙주 세포에 의해 생성되는 경우, 공유 이황화 결합 또는 비 공유 결합에 의해 서로 결합된다. 중쇄에서, 아미노산 서열은 Y 형태의 갈라진 말단의 N 말단으로부터 각각의 사슬의 하부의 C 말단으로 이어진다. 당업자는 중쇄가 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ), 또는 엡실론(ε)과 이들 중 일부 하위 부류(예를 들어, γ1 내지 γ4)로 분류된다는 점을 인지할 것이다. 각각 IgG, IgM, IgA IgG, 또는 IgE로 항체의 "부류"를 결정하는 것이 이 사슬의 특성이다. 면역글로불린 이소형 하위 부류(예를 들어, IgG1,

IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 등)는 특성이 잘 규명되어 있으며, 기능적 전문화를 제공하는 것으로 알려져 있다. 이들 부류 및 이소형 각각의 변형된 형태는 본 개시에 비추어 당업자가 용이하게 식별할 수 있으며, 따라서, 본 개시의 범위에 속한다.

[0153] 경쇄 및 중쇄 둘 모두는 구조적 및 기능적 상동성의 영역으로 나누어진다. 용어 "영역"은 면역글로불린 또는 항체 사슬의 부분 또는 일부를 나타내며, 불변 영역 또는 가변 영역뿐만 아니라 상기 영역의 더욱 별개의 부분 또는 일부를 포함한다. 예를 들어, 경쇄 가변 영역은 본원에서 정의되는 바와 같은 "프레임워크 영역" 또는 "FR" 사이에 산재된 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"을 포함한다.

[0154] 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄의 영역은 "불변 영역"의 경우에서 다양한 부류의 일원의 영역 내의 서열 변화의 상대적 결핍, 또는 "가변 영역"의 경우에서 다양한 부류의 일원의 영역 내의 유의한 변화를 기초로 하여 "불변"(C) 영역 또는 "가변"(V) 영역으로 정의될 수 있다. 용어 "불변 영역" 및 "가변 영역"은 또한 기능적으로 사용될 수 있다. 이와 관련하여, 면역글로불린 또는 항체의 가변 영역이 항원 인지 및 특이성을 결정하는 것이 인지될 것이다. 역으로, 면역글로불린 또는 항체의 불변 영역은 중요한 효과기 기능, 예를 들어, 분비, 태반경유 이동, Fc 수용체 결합, 보체 결합 등을 제공한다. 다양한 면역글로불린 부류의 불변 영역의 서브유닛 구조 및 3차원 형태가 널리 공지되어 있다.

[0155] 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 불변 및 가변 영역은 도메인으로 풀딩된다. 용어 "도메인"은, 예를 들어,  $\beta$ -병풍 구조 및/또는 사슬내 이황화 결합에 의해 안정화된 웨티드 루프(예를 들어, 3 내지 4개의 웨티드 루프를 포함함)를 포함하는 중쇄 또는 경쇄의 구상 영역을 나타낸다. 면역글로불린의 경쇄 상의 불변 영역 도메인은 "경쇄 불변 영역 도메인", "CL 영역" 또는 "CL 도메인"으로 상호 교환적으로 언급된다. 중쇄 상의 불변 도메인(예를 들어, 힌지, CH1, CH2 또는 CH3 도메인)은 "중쇄 불변 영역 도메인", "CH" 영역 도메인 또는 "CH 도메인"으로 상호 교환적으로 언급된다. 경쇄 상의 가변 도메인은 "경쇄 가변 영역 도메인", "VL 영역 도메인" 또는 "VL 도메인"으로 상호 교환적으로 언급된다. 중쇄 상의 가변 도메인은 "중쇄 가변 영역 도메인", "VH 영역 도메인" 또는 "VH 도메인"으로 상호 교환적으로 언급된다.

[0156] 관례적으로, 가변 불변 영역 도메인의 아미노산의 넘버링은 이들이 항원 결합 부위 또는 면역글로불린 또는 항체의 아미노 말단으로부터 더 멀어질수록 증가한다. 각 중쇄 및 경쇄 면역글로불린의 N 말단은 가변 영역이고 C 말단은 불변 영역이다. CH3 및 CL 도메인은 각각 중쇄 및 경쇄의 카르복시 말단을 포함한다. 따라서, 경쇄 면역글로불린의 도메인은 VL-CL 배향으로 정렬되는 반면, 중쇄의 도메인은 VH-CH1-힌지-CH2-CH3 배향으로 정렬된다.

[0157] 각 가변 영역 도메인에 대한 아미노산의 할당은 문헌[Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991)]의 정의에 따른다. Kabat은 또한 상이한 중쇄 가변 영역 사이 또는 상이한 경쇄 가변 영역 사이의 상응하는 잔기가 동일한 번호로 할당되는, 널리 사용되는 넘버링 규칙(Kabat 넘버링)을 제공한다. VL 도메인의 CDR 1, 2 및 3은 또한 각각 본원에서 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3으로 지칭된다. VH 도메인의 CDR 1, 2 및 3은 또한 각각 본원에서 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3으로 지칭된다. 그렇게 명시된 경우, CDR의 할당은 Kabat 대신 IMGT®(문헌[Lefranc et al., Developmental & Comparative Immunology 27:55-77; 2003])에 따를 수 있다. 중쇄 불변 영역의 넘버링은 Kabat(문헌[Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991])에 기재된 바와 같이 EU 인덱스를 통한 것이다.

[0158] 본원에서 사용되는 용어 "VH 도메인"은 면역글로불린 중쇄의 아미노 말단 가변 도메인을 포함하고, 용어 "VL 도메인"은 면역글로불린 경쇄의 아미노 말단 가변 도메인을 포함한다.

[0159] 본원에서 사용되는 용어 "CH1 도메인"은, 예를 들어, Kabat 넘버링 시스템에서 위치 약 114 내지 223(EU 위치 118 내지 215)에 걸쳐 있는 면역글로불린 중쇄의 첫 번째(가장 아미노 말단)의 불변 영역 도메인을 포함한다. CH1 도메인은 VH 도메인에 인접하여 있고, 면역글로불린 중쇄 분자의 힌지 영역에 대해 아미노 말단에 있으며, 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 부분을 형성하지 않는다.

[0160] 본원에서 사용되는 용어 "힌지 영역"은 CH1 도메인을 CH2 도메인에 연결시키는 중쇄 분자의 일부를 포함한다. 힌지 영역은 약 25개의 잔기를 포함하고, 가요성이어서, 2개의 N 말단 항원 결합 영역이 독립적으로 움직이는 것을 가능케 한다. 힌지 영역은 세 개의 구별되는 도메인으로 세분될 수 있다: 상부, 중앙, 및 하부 힌지 도메인(문헌[Roux et al. J. Immunol. 1998, 161:4083]).

[0161] 본원에서 사용되는 용어 "CH2 도메인"은, 예를 들어, Kabat 넘버링 시스템에서 위치 약 244 내지 360(EU 위치 231 내지 340)에 걸쳐 있는 중쇄 면역글로불린 분자의 일부를 포함한다. CH2 도메인은 또 다른 도메인과 밀접하

게 쌍을 이루지 않는다는 점에서 독특하다. 오히려, 2개의 N 결합된 분지형 탄수화물 사슬은 온전한 자연 IgG 분자의 2개의 CH2 도메인 사이에 개재되어 있다. 일 구현예에서, 본 개시의 결합 폴리펩티드는 IgG1 분자(예를 들어, 인간 IgG1 분자)로부터 유래된 CH2 도메인을 포함한다.

[0162] 본원에서 사용되는 용어 "CH3 도메인"은, 예를 들어, Kabat 넘버링 시스템의 위치 약 361 내지 476(EU 위치 341 내지 445)과 같이 CH2 도메인의 N 말단으로부터의 약 110개의 잔기에 걸쳐있는 중쇄 면역글로불린 분자의 일부를 포함한다. CH3 도메인은 통상적으로 항체의 C 말단 일부를 형성한다. 그러나 일부 면역글로불린에서, 추가 도메인이 CH3 도메인으로부터 연장되어 분자의 C 말단 일부(예를 들어, IgM의  $\mu$  사슬 및 IgE의 e 사슬 내 CH4 도메인)를 형성할 수 있다. 일 구현예에서, 본 개시의 결합 폴리펩티드는 IgG1 분자(예를 들어, 인간 IgG1 분자)로부터 유래된 CH3 도메인을 포함한다.

[0163] 본원에서 사용되는 용어 "CL 도메인"은, 예를 들어, Kabat 위치 약 107A 내지 Kabat 위치 약 216에 걸쳐 있는 면역글로불린 경쇄의 불변 영역 도메인을 포함한다. CL 도메인은 VL 도메인에 인접하여 있다. 일 구현예에서, 본 개시의 결합 폴리펩티드는 카파 경쇄(예를 들어, 인간 카파 경쇄)로부터 유래된 CL 도메인을 포함한다.

[0164] 본원에서 사용되는 용어 "Fc 영역"은 파파인 절단 부위(즉, IgG 내의 잔기 216, 중쇄 불변 영역의 첫 번째 잔기는 114로 간주함)의 바로 상류의 힌지 영역에서 시작하여 항체의 C 말단에서 종료되는 중쇄 불변 영역의 일부로 정의된다. 따라서, 완전한 Fc 영역은 적어도 힌지 도메인, CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 포함한다.

[0165] 본원에서 사용되는 용어 "자연 Fc" 또는 "야생형 Fc"는 단량체 형태이든지 다량체 형태이든지 간에 항체의 분해로부터 발생하거나 다른 수단에 의해 생성된 비 항원 결합 단편의 서열을 포함하는 분자를 나타내며, 힌지 영역을 함유할 수 있다. 자연 Fc의 본래의 면역글로불린 공급원은 전형적으로 인간 기원이며, 임의의 면역글로불린, 예를 들어 IgG1 및 IgG2일 수 있다. 자연 Fc 분자는 공유(즉, 이황화 결합) 및 비 공유 회합에 의해 이량체 또는 다량체 형태로 연결될 수 있는 단량체 폴리펩티드로 구성된다. 자연 Fc 분자의 단량체 서브유닛 사이의 분자 간 이황화 결합의 수는 부류(예를 들어, IgG, IgA, 및 IgE) 또는 하위 부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, 및 IgGA2)에 따라 1 내지 4의 범위이다. 자연 Fc의 한 예는 IgG의 파파인 소화로부터 생성되는 이황화 결합된 이량체이다. 본원에서 사용되는 용어 "자연 Fc"는 단량체, 이량체, 및 다량체 형태의 총칭이다.

[0166] 본원에서 사용되는 용어 "Fc 변이체" 또는 "변형된 Fc"는 자연/야생형 Fc로부터 변형되었지만, FcRn에 대한 결합 부위를 여전히 포함하는 분자 또는 서열을 나타낸다. 따라서, 용어 "Fc 변이체"는 비 인간 자연 Fc 유래의 인간화된 분자 또는 서열을 포함할 수 있다. 또한, 자연 Fc는 제거될 수 있는 영역을 포함하는데, 이는 이러한 영역이 본원에서 기술된 항체 유사 결합 폴리펩티드에 필요하지 않은 구조적 특징 또는 생물학적 활성을 제공하기 때문이다. 따라서, 용어 "Fc 변이체"는 하나 이상의 자연 Fc 부위 또는 잔기가 결여되어 있거나 또는 하나 이상의 Fc 부위 또는 잔기가 변형된 분자 또는 서열을 포함하고, 이는: (1) 이황화 결합 형성, (2) 선택된 숙주 세포와의 부적합성, (3) 선택된 숙주 세포에서의 발현 시의 N 말단 이종성, (4) 글리코실화, (5) 보체와의 상호 작용, (6) 재생 수용체(salvage receptor) 이외의 Fc 수용체에 대한 결합, 또는 (7) 항체 의존적 세포성 세포독성(ADCC)에 영향을 미치거나 이에 관여한다.

[0167] 특정 예시적 구현예에서, 본원의 특징이 되는 Fc 변이체는 야생형 Fc를 포함하는 IgG 항체와 비교하여, 증가된 혈청 반감기, 증진된 FcRn 결합 친화도, 산성 pH에서의 증진된 FcRn 결합 친화도, 증진된 Fc  $\gamma$ RIIIa 결합 친화도, 및/또는 비슷한 열 안정성 중 하나 이상을 갖는다.

[0168] 본원에서 사용되는 용어 "Fc 도메인"은 위에서 정의된 바와 같은 자연/야생형 Fc 및 Fc 변이체 및 서열을 포함한다. Fc 변이체 및 자연 Fc 분자와 같이, 용어 "Fc 도메인"은 전체 항체로부터 분해되었든 다른 수단에 의해 생성되었든 간에 단량체 또는 다량체 형태의 분자를 포함한다.

[0169] 위에서 기재된 바와 같이, 항체의 가변 영역은 항체가 항원 상의 에피토프를 선택적으로 인지하고 특이적으로 결합하는 것을 가능케 한다. 즉, 항체의 VL 도메인 및 VH 도메인은 조합되어 3차원 항원 결합 부위를 규정하는 가변 영역(Fv)을 형성한다. 이러한 4차 항체 구조는 Y의 각각의 아암(arm) 말단에 제공되는 항원 결합 부위를 형성한다. 더욱 구체적으로, 항원 결합 부위는 각각의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 상의 3개의 상보성 결정 영역(CDR)에 의해 규정된다. 본원에서 사용되는 용어 "항원 결합 부위"는 항원(예를 들어, 세포 표면 또는 가용성 항원)과 특이적으로 결합(면역반응)하는 부위를 포함한다. 항원 결합 부위는 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 이를 가변 영역에 의해 형성된 결합 부위는 항체의 특이성을 결정한다. 항원 결합 부위는 항체마다 다양한 가변 영역에 의해 형성된다. 본 개시의 변경된 항체는 적어도 하나의 항원 결합 부위를 포함한다.

- [0170] 특정 구현예에서, 본 개시의 결합 폴리펩티드는 결합 폴리펩티드와 선택된 항원의 회합을 제공하는 적어도 2개의 항원 결합 도메인을 포함한다. 항원 결합 도메인은 동일한 면역글로불린 분자로부터 유래될 필요는 없다. 이와 관련하여, 가변 영역은 체액성 반응을 개시시키고, 원하는 항원에 대한 면역글로불린을 발생시키기 위해 유도될 수 있는 임의의 유형의 동물의 가변 영역일 수 있거나 이로부터 유래될 수 있다. 이와 같이, 결합 폴리펩티드의 가변 영역은, 예를 들어, 포유동물 기원일 수 있고, 예를 들어, 인간, 뮤린, 랙트, 염소, 양, 비 인간 영장류(예를 들어, 시노몰구스 원숭이, 짧은꼬리 원숭이 등), 이리, 또는 낙타과(예를 들어, 낙타, 라마 및 관련 종) 기원일 수 있다.
- [0171] 자연 발생 항체에서, 각각의 단량체 항체 상에 존재하는 6개의 CDR은 특이적으로 위치되어 항체가 수성 환경에서 이의 3차원 형태를 취함에 따라 항원 결합 부위를 형성하는 짧은 비연속적인 아미노산 서열이다. 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 나머지는 아미노산 서열에 있어서 더 적은 분자간 가변성을 나타내며, 프레임워크 영역으로 지칭된다. 프레임워크 영역은 주로  $\beta$ -시트 형태를 채택하며, CDR은  $\beta$ -시트 구조를 연결하고, 일부 경우에는  $\beta$ -시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 따라서, 이들 프레임워크 영역은 사슬간 비공유 상호 작용에 의해 정확한 배향으로 6개의 CDR의 위치결정을 제공하는 스캐폴드를 형성시키는 작용을 한다. 위치결정된 CDR에 의해 형성된 항원 결합 도메인은 면역반응성 항원 상의 에피토프에 상보적인 표면을 규정한다. 이러한 상보적 표면은 면역반응성 항원 에피토프에 대한 항체의 비 공유 결합을 촉진한다.
- [0172] 예시적 결합 폴리펩티드는 항체 변이체를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "항체 변이체"는 항체가 자연 발생이 아니도록 변경된 항체의 합성 및 조작된 형태, 예를 들어, 적어도 2개의 중쇄 부분을 포함하나, 2개의 완전한 중쇄가 아닌 항체(예를 들어, 도메인 결실된 항체 또는 미니바디); 2개 이상의 상이한 항원 또는 단일 항원 상의 다양한 에피토프에 결합하도록 변경된 항체의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적, 삼중특이적 등) 형태); scFv 분자에 연결된 중쇄 분자 등을 포함한다. 또한, 용어 "항체 변이체"는 동일한 항원의 3개, 4개 이상의 카페에 결합하는 항체인 다가 형태의 항체, 예를 들어, 3가, 4가 등의 항체를 포함한다.
- [0173] 본원에서 사용되는 용어 "결합가"는 폴리펩티드 내의 잠재적 표적 결합 부위의 수를 나타낸다. 각각의 표적 결합 부위는 하나의 표적 분자 또는 표적 분자 상의 특정 부위에 특이적으로 결합한다. 폴리펩티드가 1개 초과의 표적 결합 부위를 포함하는 경우, 각각의 표적 결합 부위는 동일하거나 상이한 분자에 특이적으로 결합할 수 있다(예를 들어, 상이한 리간드 또는 상이한 항원, 또는 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다). 본 결합 폴리펩티드는 전형적으로 인간 항원 분자에 특이적인 적어도 하나의 결합 부위를 갖는다.
- [0174] 용어 "특이성"은 제공된 표적 항원(예를 들어, 인간 표적 항원)에 특이적으로 결합(예를 들어, 면역반응)하는 능력을 나타낸다. 결합 폴리펩티드는 단일특이적일 수 있고, 표적에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 결합 부위를 함유할 수 있거나, 폴리펩티드는 다중특이적일 수 있고, 동일하거나 상이한 표적과 특이적으로 결합하는 2개 이상의 결합 부위를 함유할 수 있다. 특정 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 동일한 표적의 2개의 상이한(예를 들어, 중첩되지 않는) 부분에 대해 특이적이다. 특정 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 1개 초과의 표적에 대해 특이적이다. 종양 세포 상에서 발현되는 항원에 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 예시적 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항체)는 당해 분야에 공지되어 있으며, 이러한 항체로부터의 하나 이상의 CDR이 본원에 기재된 항체에 포함될 수 있다.
- [0175] 본원에서 사용되는 용어 "항원" 또는 "표적 항원"은 결합 폴리펩티드의 결합 부위에 의해 결합될 수 있는 분자 또는 분자의 일부를 나타낸다. 표적 항원은 하나 이상의 에피토프를 가질 수 있다.
- [0176] 용어 "약" 또는 "대략"은 주어진 값 또는 범위의 약 20% 이내, 예컨대 약 10% 이내, 약 5% 이내, 또는 약 1% 이하 이내를 의미한다.
- [0177] 본원에서 사용되는 "투여하다" 또는 "투여"는 예컨대, 폐(예를 들어, 흡입), 점막(예를 들어, 비내), 피내, 정맥 내, 근육 내 전달 및/또는 본원에서 기술되었거나 당해 분야에 공지된 임의의 기타 물리적 전달 방법에 의해 (그러나 이에 한정되지 않음), 신체 밖에 존재하는 물질(예를 들어, 본원에서 제공된 단리된 결합 폴리펩티드)을 환자 내로 주사하는 행위 또는 다르게는 물리적으로 전달하는 행위를 지칭한다. 질환 또는 이의 증상이 관리 중 또는 치료 중에 있을 때, 물질의 투여는 전형적으로 질환 또는 이의 증상의 발병 후에 일어난다. 질환 또는 이의 증상이 예방 중에 있을 때, 물질의 투여는 전형적으로 질환 또는 이의 증상의 발병 전에 일어나고, 질환 관련 증상의 외관 또는 규모를 지연시키거나 감소시키기 위하여 만성적으로 지속될 수 있다.
- [0178] 본원에서 사용되는 용어 "조성물"은 선택적으로, 명시된 양으로 특정 성분(예를 들어, 본원에서 제공된 단리된 결합 폴리펩티드)을 함유하는 제품뿐만 아니라, 선택적으로, 명시된 양으로 명시된 성분들의 조합으로부터 직접

적으로 또는 간접적으로 생기는 임의의 제품을 포함하는 것으로 의도된다.

[0179] "유효량"은 활성인 약학적 작용제를 필요로 하는 개체에서 원하는 생리적 결과를 유발하기에 충분한 이러한 작용제(예를 들어, 본 개시의 단리된 결합 폴리펩티드)의 양을 의미한다. 유효량은 치료되는 개체의 건강 및 신체 상태, 치료되는 개체의 분류학적 군, 조성물의 제형, 개체의 의학적 상태의 평가, 및 기타 관련 인자에 따라 개체마다 다를 수 있다.

[0180] 본원에서 사용되는 용어 "대상체" 및 "환자"는 상호 교환적으로 사용된다. 본원에서 사용되는 대상체는 포유류, 예컨대 비 영장류(예를 들어, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 랙트 등) 또는 영장류(예를 들어, 원숭이 및 인간)일 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에서 사용되는 용어 "대상체"는 척추동물, 예컨대, 포유류를 지칭한다. 포유류는 인간, 비 인간 영장류, 야생 동물, 야생으로 돌아간 동물, 농장 동물, 스포츠 동물, 및 애완동물을 제한 없이 포함한다.

[0181] 본원에서 사용되는 용어 "치료법"은 질환 또는 이와 관련된 증상의 예방, 관리, 치료 및/또는 개선에 사용될 수 있는 임의의 프로토콜, 방법 및/또는 작용제를 지칭한다. 용어 "치료법"은 대상체의 감염 또는 이와 관련된 증상에 대한 면역 반응의 조절에 사용될 수 있는 임의의 프로토콜, 방법 및/또는 작용제를 지칭한다. 특정 구현예에서, 용어 "치료법들" 및 "치료법"은 당업자, 예를 들어 의료인에게 알려져 있는 질환 또는 이와 관련된 증상의 예방, 관리, 치료 및/또는 개선에 유용한 생물학적 치료법, 지지 요법 및/또는 기타 치료법을 지칭한다. 다른 구현예에서, 용어 "치료법들" 및 "치료법"은 당업자, 예를 들어 의료인에게 알려져 있는 대상체의 감염 또는 이와 관련된 증상에 대한 면역 반응의 조절에 유용한 생물학적 치료법, 지지 요법 및/또는 기타 치료법을 지칭한다.

[0182] 본원에서 사용되는 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 하나 이상의 치료법의 투여(본원에서 제공된 단리된 결합 폴리펩티드와 같은, 하나 이상의 예방제 또는 치료제의 투여를 포함하나 이에 한정되지 않음)로부터 야기되는 질환 또는 이와 관련된 증상의 진행, 중증도, 및/또는 지속기간의 감소 또는 개선을 지칭한다. 본원에서 사용되는 용어 "치료하는"은 또한 치료되는 대상체의 질환 경과를 변경시키는 것을 지칭할 수 있다. 치료의 치료적 효과는 질환의 발생 또는 재발 방지, 증상(들)의 완화, 질환의 직접적 또는 간접적 병리학적 결과의 감소, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 개선 또는 경감, 및 관해 또는 개선된 예후를 제한 없이 포함한다.

### 결합 폴리펩티드

[0184] 일 양태에서, 본 개시는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항체, 면역어드헤신, 항체 변이체, 및 융합 단백질)를 제공한다. 본원에서 개시된 결합 폴리펩티드는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 임의의 결합 폴리펩티드를 포함한다. 특정 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 항체, 또는 이의 면역어드헤신 또는 유도체이다. 임의의 공급원 또는 종으로부터의 임의의 항체가 본원에서 개시된 결합 폴리펩티드에서 이용될 수 있다. 적합한 항체는 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체를 제한 없이 포함한다. 적합한 항체는 단일클론 항체, 다클론 항체, 전장 항체, 또는 단일 사슬 항체를 제한 없이 포함한다.

[0185] 임의의 면역글로불린 부류(예를 들어, IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE) 및 종으로부터의 Fc 도메인이 본원에서 개시된 결합 폴리펩티드에서 사용될 수 있다. 상이한 종 또는 Ig 부류로부터의 Fc 도메인의 일부를 포함하는 키메라 Fc 도메인이 또한 이용될 수 있다. 특정 구현예에서, Fc 도메인은 인간 Fc 도메인이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인이다. 다른 구현예에서, Fc 도메인은 IgG4 Fc 도메인이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 인간 IgG1 또는 IgG4 Fc 도메인이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 인간 IgG1 Fc 도메인이다. 다른 종 및/또는 Ig 부류 또는 이소형의 Fc 도메인의 경우, 당업자는 본원에서 기술된 임의의 아미노산 치환이 이에 따라 조정될 수 있다는 점을 인정할 것이다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 M252, I253, S254, T256, K288, T307, K322, E380, L432, N434, 또는 Y436, 및 이의 임의의 조합으로부터 선택된 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 M252, I253, S254, T256, K288, T307, K322, E380, L432, N434, 및 Y436으로부터 선택된 임의의 2개의 아미노산 위치에서의 이중 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 M252, I253, S254, T256, K288, T307, K322, E380, L432, N434, 및 Y436으로부터 선택된 임의의 3개의 아미노산 위치에서의 삼중 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 M252, I253, S254, T256, K288, T307, K322, E380, L432, N434, 및 Y436으로부터 선택된 임의의 4개의 아미노산 위치에서의 사중 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인이 EU 넘버링에 따른 M252, I253, S254, T256, K288, T307, K322, E380, L432, 또는 Y436, 및 이의 임의의 조합으로부터 선택된 임의의 아미노산 위치에서의 아미노산 치환을 포함하는 것이 바람직할 수 있으며, 이때, 아미노산 위치 N434는 치환되지 않는다(즉, 아미노산 위치

N434는 야생형임).

[0186]

일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 EU 네마팅에 따른 M252Y(즉, 아미노산 위치 252에서 티로신), T256D, T256E, K288D, K288N, T307A, T307E, T307F, T307M, T307Q, T307W, E380C, N434F, N434P, N434Y, Y436H, Y436N, 또는 Y436W, 및 이의 임의의 조합으로부터 선택된 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 EU 네마팅에 따른 M252(이때, 치환은 M252Y임); T256(이때, 치환은 T256D 또는 T256E임); K288(이때, 치환은 K288D 또는 K288N임); T307(이때, 치환은 T307A, T307E, T307F, T307M, T307Q, 또는 T307W임); E380(이때, 치환은 E380C임); N434(이때, 치환은 N434F, N434P, 또는 N434Y임); Y436(이때, 치환은 Y436H, Y436N, 또는 Y436W임)으로부터 선택된 이중 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 EU 네마팅에 따른 M252(이때, 치환은 M252Y임); T256(이때, 치환은 T256D 또는 T256E임); K288(이때, 치환은 K288D 또는 K288N임); T307(이때, 치환은 T307A, T307E, T307F, T307M, T307Q, 또는 T307W임); E380(이때, 치환은 E380C임); N434(이때, 치환은 N434F, N434P, 또는 N434Y임); Y436(이때, 치환은 Y436H, Y436N, 또는 Y436W임)으로부터 선택된 삼중 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 EU 네마팅에 따른 M252(이때, 치환은 M252Y임); T256(이때, 치환은 T256D 또는 T256E임); K288(이때, 치환은 K288D 또는 K288N임); T307(이때, 치환은 T307A, T307E, T307F, T307M, T307Q, 또는 T307W임); E380(이때, 치환은 E380C임); N434(이때, 치환은 N434F, N434P, 또는 N434Y임); Y436(이때, 치환은 Y436H, Y436N, 또는 Y436W임)으로부터 선택된 사중 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인이 EU 네마팅에 따른 M252Y, T256D, T256E, K288D, K288N, T307A, T307E, T307F, T307M, T307Q, T307W, E380C, Y436H, Y436N, 또는 Y436W, 및 이의 임의의 조합으로부터 선택된 임의의 아미노산 위치에서의 아미노산 치환을 포함하는 것이 바람직할 수 있으며, 이때, 아미노산 위치 N434는 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)으로 치환되지 않는다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인이 EU 네마팅에 따른 M252Y, T256D, T256E, K288D, K288N, T307A, T307E, T307F, T307M, T307Q, T307W, E380C, Y436H, Y436N, 또는 Y436W, 및 이의 임의의 조합으로부터 선택된 임의의 아미노산 위치에서의 아미노산 치환을 포함하는 것이 바람직할 수 있으며, 이때, 아미노산 위치 N434는 티로신(Y)으로 치환되지 않는다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인이 EU 네마팅에 따른 M252Y, T256D, T256E, K288D, K288N, T307A, T307E, T307F, T307M, T307Q, T307W, E380C, Y436H, Y436N, 또는 Y436W, 및 이의 임의의 조합으로부터 선택된 임의의 아미노산 위치에서의 아미노산 치환을 포함하는 것이 바람직할 수 있으며, 이때, 아미노산 위치 N434는 치환되지 않는다(즉, 아미노산 위치 N434는 야생형임).

[0187]

특정 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 EU 네마팅에 따른 M252, T256, T307, 또는 N434, 및 이의 임의의 조합으로부터 선택된 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 EU 네마팅에 따른 M252, T256, T307, 및 N434로부터 선택된 임의의 2개의 아미노산 위치에서의 이중 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 EU 네마팅에 따른 M252, T256, T307, 및 N434로부터 선택된 임의의 3개의 아미노산 위치에서의 삼중 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 EU 네마팅에 따른 아미노산 위치 M252, T256, T307, 및 N434에서의 사중 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인이 EU 네마팅에 따른 M252, T256, 또는 T307, 및 이의 임의의 조합으로부터 선택된 아미노산 치환을 포함하는 것이 바람직할 수 있으며, 이때, 아미노산 위치 N434는 치환되지 않는다(즉, 아미노산 위치 N434는 야생형임).

[0188]

예시적인 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 EU 네마팅에 따른 M252(이때, 치환은 M252Y임); T256(이때, 치환은 T256D 또는 T256E임); T307(이때, 치환은 T307Q 또는 T307W임); 또는 N434(이때, 치환은 N434F 또는 N434Y임), 및 이의 임의의 조합으로부터 선택된 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 EU 네마팅에 따른 M252(이때, 치환은 M252Y임); T256(이때, 치환은 T256D 또는 T256E임); T307(이때, 치환은 T307Q 또는 T307W임); 또는 N434(이때, 치환은 N434F 또는 N434Y임)로부터 선택된 임의의 2개의 아미노산 위치에서의 이중 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 EU 네마팅에 따른 M252(이때, 치환은 M252Y임); T256(이때, 치환은 T256D 또는 T256E임); T307(이때, 치환은 T307Q 또는 T307W임); 또는 N434(이때, 치환은 N434F 또는 N434Y임)로부터 선택된 임의의 3개의 아미노산 위치에서의 삼중 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 EU 네마팅에 따른 M252(이때, 치환은 M252Y임); T256(이때, 치환은 T256D 또는 T256E임); T307(이때, 치환은 T307Q 또는 T307W임); 또는 N434(이때, 치환은 N434F 또는 N434Y임)로부터 선택된 아미노산 위치에서의 사중 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 EU 네마팅에 따른 M252Y, T256D, T256E, T307Q, 또는 T307W, 및 이의 임의의 조합으로부터 선택된 아미노산 치환을 포함하는 것이 바람직할 수 있으며, 이때, 아미노산 위치 N434는 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)으로 치환되지 않는다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 EU 네마팅에 따른 M252Y, T256D, T256E, T307Q, 또는 T307W, 및 이의 임의의 조합으로부터 선택된 아미노산 치환을 포함하는 것이 바람직할 수 있으며,

이때, 아미노산 위치 N434는 티로신(Y)으로 치환되지 않는다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인이 EU 넘버링에 따른 M252Y, T256D, T256E, T307Q, 또는 T307W, 및 이의 임의의 조합으로부터 선택된 아미노산 치환을 포함하는 것이 바람직할 수 있으며, 이때, 아미노산 위치 N434는 치환되지 않는다(즉, 아미노산 위치 N434는 야생형임).

[0189] 특정 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 T256D, 또는 T256E, 및/또는 T307W, 또는 T307Q로부터 선택된 아미노산 치환을 포함할 수 있고, N434F, 또는 N434Y, 또는 M252Y로부터 선택된 아미노산 치환을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인이 EU 넘버링에 따른 T256D, 또는 T256E, 및/또는 T307W, 또는 T307Q로부터 선택된 아미노산 치환을 포함하고, 아미노산 치환 M252Y를 더 포함하는 것이 바람직할 수 있으며, 이때, 아미노산 위치 N434는 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)으로 치환되지 않는다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인이 EU 넘버링에 따른 T256D, 또는 T256E, 및/또는 T307W, 또는 T307Q로부터 선택된 아미노산 치환을 포함하고, 아미노산 치환 M252Y를 더 포함하는 것이 바람직할 수 있으며, 이때, 아미노산 위치 N434는 티로신(Y)으로 치환되지 않는다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인이 EU 넘버링에 따른 T256D, 또는 T256E, 및/또는 T307W, 또는 T307Q로부터 선택된 아미노산 치환을 포함하고, 아미노산 치환 M252Y를 더 포함하는 것이 바람직할 수 있으며, 이때, 아미노산 위치 N434는 치환되지 않는다(즉, 아미노산 위치 N434는 야생형임).

[0190] 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 M252Y/T256D, M252Y/T256E, M252Y/T307Q, M252Y/T307W, M252Y/N434F, M252Y/N434Y, T256D/T307Q, T256D/T307W, T256D/N434F, T256D/N434Y, T256E/T307Q, T256E/T307W, T256E/N434F, T256E/N434Y, T307Q/N434F, T307Q/N434Y, T307W/N434F, 및 T307W/N434Y로부터 선택된 이중 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 M252Y/T256D/T307Q, M252Y/T256D/T307W, M252Y/T256D/N434F, M252Y/T256D/N434Y, M252Y/T256E/T307Q, M252Y/T256E/T307W, M252Y/T256E/N434F, M252Y/T256E/N434Y, M252Y/T307Q/N434Y, M252Y/T307W/N434F, M252T/T307W/N434Y, T256D/307Q/N434F, T256D/307W/N434F, T256D/307Q/N434Y, T256D/307W/N434Y, T256E/307Q/N434F, T256E/307W/N434F, T256E/307Q/N434Y, 및 T256E/307W/N434Y로부터 선택된 삼중 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[0191] 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 M252Y/T256D/T307Q/N434F, M252Y/T256E/T307Q/N434F, M252Y/T256D/T307W/N434F, M252Y/T256E/T307W/N434F, M252Y/T256D/T307Q/N434Y, M252Y/T256E/T307Q/N434Y, 및 M252Y/T256D/T307W/N434Y, 및 M252Y/T256E/T307W/N434Y로부터 선택된 사중 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[0192] 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인이 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 N434에서 야생형 아미노산을 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 일부 구현예에서, Fc 도메인이 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 N434에서 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)을 포함하지 않는 것이 바람직할 수 있다. 일부 구현예에서, Fc 도메인이 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 N434에서 티로신(Y)을 포함하지 않는 것이 바람직할 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 M252Y/T256D, M252Y/T256E, M252Y/T307Q, M252Y/T307W, T256D/T307Q, T256D/T307W, T256E/T307Q, 및 T256E/T307W로부터 선택된 이중 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 M252Y/T256D/T307Q, M252Y/T256D/T307W, M252Y/T256E/T307Q, 및 M252Y/T256E/T307W로부터 선택된 삼중 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[0193] 일 구현예에서, 변경된 FcRn 결합을 갖는 결합 폴리펩티드는 본원에서 개시된 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 Fc 도메인을 포함한다. 일 구현예에서, 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는 결합 폴리펩티드는 본원에서 개시된 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 Fc 도메인을 포함한다. 일 구현예에서, 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는 결합 폴리펩티드는 본원에서 개시된 2개 이상의 아미노산 치환을 갖는 Fc 도메인을 포함한다. 일 구현예에서, 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는 결합 폴리펩티드는 본원에서 개시된 3개 이상의 아미노산 치환을 갖는 Fc 도메인을 포함한다.

[0194] 일부 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 종 특이적인 FcRn 결합 친화도를 나타낼 수 있다. 일 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 인간 FcRn 결합 친화도를 나타낼 수 있다. 일 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 랫트 FcRn 결합 친화도를 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 교차 종 FcRn 결합 친화도를 나타낼 수 있다. 이러한 결합 폴리펩티드는 하나 이상의 상이한 종에 걸쳐 교차 반응성이라고 한다. 일 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 인간 및 랫트 FcRn 결합 친화도를 나타낼 수 있다.

[0195] 신생아 Fc 수용체(FcRn)는 항체의 Fc 영역과 상호 작용하여 정상적인 리소좀 분해의 구조를 통해 재순환을 촉진 시킨다. 이 과정은 산성 pH(예를 들어, pH 6.5 미만)에서 엔도솜에서 발생하지만 혈류의 생리적 pH 조건(예를 들어, 비 산성 pH)에서는 발생하지 않는 pH 의존적 과정이다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인을 포함하는

본 개시의 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 pH 7 미만, 예를 들어, 약 pH 6.5, 약 pH 6.0, 약 pH 5.5, 약 pH 5.0에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드는 상승된 비 산성 pH에서 결합 폴리펩티드의 FcRn 결합 친화도와 비교하여 pH 7 미만, 예를 들어, 약 pH 6.5, 약 pH 6.0, 약 pH 5.5, 약 pH 5.0에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는다. 상승된 비 산성 pH는 예를 들어, pH 7 초과, 약 pH 7, 약 pH 7.4, 약 pH 7.6, 약 pH 7.8, 약 pH 8.0, 약 pH 8.5, 약 pH 9.0일 수 있다.

[0196] 특정 구현예에서, 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드가 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비 산성 pH에서 대략 동일한 FcRn 결합 친화도를 나타내는 것이 바람직할 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드가 EU 넘버링에 따른 이중 아미노산 치환 M428L/N434S를 갖는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드보다 비 산성 pH에서 더 적은 FcRn 결합 친화도를 나타내는 것이 바람직 할 수 있다. 따라서, 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드가 pH 의존적인 FcRn 결합에 대해 최소한의 교란을 나타내는 것이 바람직할 수 있다.

[0197] 일부 구현예에서, 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 감소된(즉, 더 느린) FcRn 해리 속도를 갖는다. 일부 구현예에서, 상승된 비 산성 pH에서 결합 폴리펩티드의 FcRn 결합 친화도와 비교하여 산성 pH에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 갖는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드는, 상승된 비 산성 pH에서 결합 폴리펩티드의 FcRn 해리 속도와 비교하여 산성 pH에서 더 느린 FcRn 해리 속도를 갖는다.

[0198] 일부 구현예에서, 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 비 산성 pH에서 더 높은 FcRn 결합 친화도를 나타내는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드가 제공된다. 일부 구현예에서, 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 산성 pH에서 더 높은 FcRn 결합 친화도를 나타내는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드가 제공된다. 일부 구현예에서, 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 비 산성 pH에서 더 높은 FcRn 결합 친화도를 나타내고, 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 산성 pH에서 더 높은 FcRn 결합 친화도를 나타내는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드가 제공된다. 따라서, 특정 구현예에서, pH 의존적 FcRn 결합의 손실을 나타내는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드가 제공된다.

[0199] 특정 구현예는 변경된 FcRn 결합 친화도를 나타내는 본원에서 기술된 Fc 돌연변이 이외에, 결실되었거나 그렇지 않으면 변경되어, 대략 동일한 면역원성 등의 완전한 비변경된 항체와 비교할 때, 예를 들어, 감소되거나 증진된 효과기 기능, 비 공유적으로 이량체화하는 능력, 종양 부위에서 국소화하는 증가된 능력, 감소된 혈청 반감기, 증가된 혈청 반감기와 같은 원하는 생화학적 특징을 제공하는, 하나 이상의 불변 영역 도메인 중 적어도 하나의 아미노산 및/또는 하나 이상의 가변 영역 도메인 중 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 항체를 포함한다.

[0200] 특정한 다른 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 상이한 항체 이소형으로부터 유래된 불변 영역(예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 중 2개 이상으로부터의 불변 영역)을 포함한다. 다른 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 키메라 헌지(즉, 상이한 항체 이소형의 헌지 도메인, 예를 들어, IgG4 분자로부터의 상부 헌지 도메인 및 IgG1 중간 헌지 도메인으로부터 유래된 헌지 부분을 포함하는 헌지)를 포함한다.

[0201] 특정 구현예에서, Fc 도메인은 당해 분야에 공지된 기술을 이용하여 효과기 기능을 증가시키거나 감소시키도록 돌연변이될 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인을 포함하는 본 개시의 결합 폴리펩티드는 Fc 수용체에 대해 변경된 결합 친화도를 갖는다. 몇몇의 상이한 유형의 Fc 수용체가 있는데, 이는 그들이 인식하는 항체의 유형을 기반으로 하여 분류된다. 예를 들어, Fc-감마 수용체(Fc $\gamma$ R)는 IgG 부류의 항체에 결합하고, Fc-알파 수용체(Fc $\alpha$ R)는 IgA 부류의 항체에 결합하고, Fc-엡실론 수용체(Fc $\epsilon$ R)는 IgE 부류의 항체에 결합한다. Fc $\gamma$ R는 몇몇 일원, 예를 들어, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb, Fc $\gamma$ RIIIa, 및 Fc $\gamma$ RIIIb를 포함하는 패밀리에 속한다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 변경된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 감소된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 증진된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 비교하여 대략 동일한 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 갖는다.

- [0202] 다른 구현예에서, 본원에서 기술된 진단 및 치료 방법에서 사용하기 위한 결합 폴리펩티드는 글리코실화를 감소시키거나 제거하기 위해 변경되는 불변 영역, 예를 들어, IgG1 중쇄 불변 영역을 갖는다. 예를 들어, 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항체 또는 면역어드헤신)는 항체 Fc의 글리코실화를 변경시키는 아미노산 치환을 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 변형된 Fc 도메인은 감소된 글리코실화(예를 들어, N- 또는 O-연결된 글리코실화)를 가질 수 있다.
- [0203] 감소되거나 변경된 글리코실화를 부여하는 예시적인 아미노산 치환은 본원에 참조로서 그 전문이 포함되는 국제 PCT 공개 제W005/018572호에 개시되어 있다. 일부 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 글리코실화를 제거하기 위해 변형된다. 이러한 결합 폴리펩티드는 "어글리(agly)" 결합 폴리펩티드(예를 들어, "어글리" 항체)라 지칭될 수 있다. 이론에 얹매이지 않으면서, "어글리" 결합 폴리펩티드는 개선된 생체 내 안전성 및 안정성 프로파일을 가질 수 있는 것으로 여겨진다. 어글리 결합 폴리펩티드는 임의의 이소형 또는 이의 하위 부류, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4일 수 있다. 다수의 당해 분야에 인지된 방법이 "어글리" 항체 또는 변경된 글리칸이 있는 항체를 제조하는 데 이용될 수 있다. 예를 들어, 변형된 글리코실화 경로(예를 들어, 글리코실-전달효소 결실)가 있는 유전자 조작된 숙주 세포(예를 들어, 변형된 효모, 예를 들어, 피치아(Picchia) 또는 CHO 세포)가 이러한 항체를 생산하는 데 사용될 수 있다.
- [0204] 특정 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 하나 이상의 효과기 기능을 매개하는 항체 불변 영역(예를 들어, IgG 불변 영역, 예를 들어, 인간 IgG 불변 영역, 예를 들어, 인간 IgG1 불변 영역)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체 불변 영역에 대한 C1-복합체의 결합은 보체계를 활성화시킬 수 있다. 보체계의 활성화는 세포 병원체의 융소년화 및 용해에 중요하다. 보체계의 활성화는 또한 염증성 반응을 자극하고 또한 자가면역 과민증과 관련될 수 있다. 또한, 항체는 세포 상의 Fc 수용체(FcR)에 결합하는 Fc 도메인(항체 Fc 영역 상의 Fc 수용체 결합 자리)을 통해 다양한 세포 상의 수용체에 결합한다. IgG(감마 수용체), IgE(엡실론 수용체), IgA(알파 수용체) 및 IgM(뮤 수용체)을 포함하는 상이한 부류의 항체에 대해 특이적인 다수의 Fc 수용체가 존재한다. 세포 표면 상의 Fc 수용체에 대한 항체의 결합은 항체로 코팅된 입자의 흡입 및 파괴, 면역 복합체의 제거, 살상 세포에 의한 항체로 코팅된 표적 세포의 용해(항체 의존적 세포 매개성 세포독성, 또는 ADCC로 불림), 염증성 매개체의 방출, 태반 이동 및 면역글로불린 생산 제어를 포함하는 다수의 중요하고 다양한 생물학적 반응을 유발한다. 일부 구현예에서, 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항체 또는 면역어드헤신)은 Fc-감마 수용체에 결합한다. 대안적 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 하나 이상의 효과기 기능(예를 들어, ADCC 활성)이 결여되고/되거나 Fc<sub>γ</sub> 수용체에 결합할 수 없는 불변 영역을 포함할 수 있다.
- [0205] 낮은 열역학적 안정성을 갖는, 항체를 비롯한 단백질은 잘못 접힘 및 응집의 경향이 증가하고, 유용한 치료제로서의 단백질의 활성, 효능, 및 가능성을 제한하거나 방해할 것이다. 특정 구현예에서, 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 대략 동일한 열 안정성을 갖는다. 일부 구현예에서, 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드는 삼중 아미노산 치환 M252Y/S254T/T256E(YTE)을 갖는 변형된 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드와 대략 동일한 열 안정성을 갖는다.
- [0206] 변형의 결과적인 생리학적 프로파일, 생물학적 이용 가능성 및 기타 생화학적 효과, 예를 들면, 종양 국소화, 생물학적 분배, 및 혈청 반감기는 과도한 실험 없이 잘 알려진 면역학적 기술을 사용하여 쉽게 측정되고 정량화될 수 있다.
- [0207] 특정 구현예에서, 본 개시의 결합 폴리펩티드는 항체의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다. 용어 "항원 결합 단편"은 항원에 결합하거나, 항원 결합(즉, 특이적 결합)에 대해 온전한 항체(즉, 항원 결합 단편이 유래되는 온전한 항체)와 경쟁하는 면역글로불린 또는 항체의 폴리펩티드 단편을 지칭한다. 항원 결합 단편은 당해 분야에 잘 알려져 있는 재조합 또는 생화학적 방법에 의해 생산될 수 있다. 예시적인 항원 결합 단편은 Fv, Fab, Fab', 및 (Fab')2를 포함한다. 예시적인 구현예에서, 본 개시의 결합 폴리펩티드는 항원 결합 단편 및 변형된 Fc 도메인을 포함한다.
- [0208] 일부 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 단일 사슬 가변 영역 서열(ScFv)을 포함한다. 단일 사슬 가변 영역 서열은 하나 이상의 항원 결합 부위, 예를 들어, 가요성 링커에 의해 VH 도메인에 연결된 VL 도메인을 갖는 단일 폴리펩티드를 포함한다. ScFv 분자는 VH-링커-VL 배향 또는 VL-링커-VH 배향으로 구축될 수 있다. 항원 결합 부위를 구성하는 VL 및 VH 도메인을 연결하는 가요성 힌지는 약 10 내지 약 50개의 아미노산 잔기를 포함한다. 연결하는 웨이드는 당해 분야에 공지되어 있다. 결합 폴리펩티드는 적어도 하나의 scFv 및/또는 적어도 하나의 불변 영역을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시의 결합 폴리펩티드는 변형된 Fc 도메인에 연결되거나 융합된 적어도 하나의 scFv를 포함할 수 있다.

- [0209] 일부 구현예에서, 본 개시의 결합 폴리펩티드는 항체를 암호화하는 DNA 서열을 ScFv 분자(예를 들어, 변형된 ScFv 분자)와 융합시킴으로써 생성되는 다가(예를 들어, 4가)의 항체이다. 예를 들어, 일 구현예에서, 이러한 서열은 ScFv 분자(예를 들어, 변형된 ScFv 분자)가 이의 N 말단 또는 C 말단에서 가요성 링커(예를 들어, gly/ser 링커)를 통해 항체의 Fc 단편에 연결되도록 조합된다. 또 다른 구현예에서, 본 개시의 4가 항체는 변형된 Fc 도메인에 융합된 연결 웹티드에 ScFv 분자를 융합시켜 ScFv-Fab 4가 분자를 구축함으로써 제조될 수 있다.
- [0210] 또 다른 구현예에서, 본 개시의 결합 폴리펩티드는 변형된 미니바디이다. 본 개시의 변형된 미니바디는 연결 웹티드를 통해 변형된 Fc 도메인에 융합된 ScFv 분자를 각각 포함하는 두 개의 폴리펩티드 사슬로 구성된 이량체 분자이다. 미니바디는 당해 분야에 기재된 방법(예를 들어, 미국 특허 제5,837,821호 또는 WO 94/09817A1호 참조)을 이용하여 ScFv 구성요소를 구축하고, 웹티드 구성요소를 연결시킴으로써 제조될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 4가의 미니바디가 구축될 수 있다. 4가의 미니바디는 2개의 ScFv 분자가 가요성 링커를 이용하여 연결되는 것을 제외하고는 미니바디와 동일한 방식으로 구축될 수 있다. 연결된 scFv-scFv 구축물은 이후 변형된 Fc 도메인에 연결된다.
- [0211] 또 다른 구현예에서, 본 개시의 결합 폴리펩티드는 디아바디를 포함한다. 디아바디는 scFv 분자와 유사한 폴리펩티드를 각각 갖지만, 보통 둘 모두의 가변 도메인을 연결하는 짧은(10개 미만, 예를 들어 약 1 내지 약 5개의) 아미노산 잔기의 링커를 가져, 동일한 폴리펩티드 사슬 상의 VL 및 VH 도메인이 상호 작용할 수 없는 4가의 이량체 분자이다. 대신, 하나의 폴리펩티드 사슬의 VL 및 VH 도메인은 제2 폴리펩티드 사슬 상의 VH 및 VL 도메인과(각각) 상호 작용한다(예를 들어, WO 02/02781 참조). 본 개시의 디아바디는 변형된 Fc 도메인에 융합된 scFv 유사 분자를 포함한다.
- [0212] 다른 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 동일한 폴리펩티드 사슬 상에 하나 이상의 가변 도메인을 연속하여 포함하는 다중특이적 또는 다가 항체, 예를 들어, 직렬 가변 도메인(tandem variable domain, TVD) 폴리펩티드를 포함한다. 예시적인 TVD 폴리펩티드는 미국 특허 제5,989,830호에 기술된 "더블 헤드" 또는 "이중-Fv" 형태를 포함한다. 이중-Fv 형태에서, 2개의 상이한 항체의 가변 도메인은 2개의 별개의 사슬(하나의 중쇄 및 하나의 경쇄) 상에서 직렬 배향으로 발현되고, 여기서 하나의 폴리펩티드 사슬은 웹티드 링커에 의해 분리된 2개의 VH 도메인을 연속하여 갖고(VH1-링커-VH2), 나머지 폴리펩티드 사슬은 웹티드 링커에 의해 연속하여 연결된 상보적인 VL 도메인으로 구성된다(VL1-링커-VL2). 교차하는 더블 헤드 형태에서, 2개의 상이한 항체의 가변 도메인은 2개의 별개의 폴리펩티드 사슬(하나의 중쇄 및 하나의 경쇄) 상에서 직렬 배향으로 발현되고, 여기서 하나의 폴리펩티드 사슬은 웹티드 링커에 의해 분리된 2개의 VH 도메인을 연속하여 갖고(VH1-링커-VH2), 나머지 폴리펩티드 사슬은 반대 배향으로 웹티드 링커에 의해 연속하여 연결된 상보적인 VL 도메인으로 구성된다(VL2-링커-VL1). "이중-Fv" 포맷을 기초로 한 추가의 항체 변이체는 이중-가변-도메인 IgG(DVD-IgG) 이중특이적 항체(미국 특허 제7,612,181호 참조) 및 TBTI 포맷(US 2010/0226923 A1호 참조)을 포함한다. 일부 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 변형된 Fc 도메인에 융합된 동일한 폴리펩티드 사슬 상에 하나 이상의 가변 도메인을 연속하여 포함하는 다중특이적 또는 다가 항체를 포함한다.
- [0213] 또 다른 예시적 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 "더블 헤드" 형태를 기초로 한 교차 이중 가변 도메인 IgG(CODV-IgG) 이중특이적 항체를 포함한다(전문이 참조로서 본원에 포함되는 US20120251541 A1 참조).
- [0214] 또 다른 예시적 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 면역어드헤신이다. 본원에서 사용되는 "면역어드헤신"은 면역글로불린 불변 도메인(즉, Fc 영역)에 연결된 (예를 들어, 수용체, 리간드, 또는 세포 부착 분자로부터의) 하나 이상의 결합 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드를 지칭한다(예를 들어, 문헌[Ashkenazi et al. 1995, *Methods* 8(2): 104-115], 및 문헌[Isaacs (1997) *Brit. J. Rheum.* 36:305] (이는 그 전문이 본원에 참조로 포함됨) 참조). 면역어드헤신은 이의 국제일반명(INN)에서 접미사 "-셉트(-cept)"로 확인된다. 항체와 마찬가지로, 면역어드헤신은 긴 순환 반감기를 갖고, 친화도 기반 방법에 의해 용이하게 정제되며, 2가성에 의해 부여되는 결합력의 이점이 있다. 상업적으로 이용 가능한 치료적 면역어드헤신의 예는 에타너셉트(엔브렐(ENBREL®)), 아바타셉트(오렌시아(ORENCIA®)), 릴로나셉트(아르칼리스트(ARCALYST®)), 애플리버셉트(잘트랩(ZALTRAP®)/아일리아(EYLEA®)), 및 벨라타셉트(눌로직스(NULOJIX®))를 포함한다.
- [0215] 특정 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 면역글로불린 유사 도메인을 포함한다. 적합한 면역글로불린 유사 도메인은 피브로넥틴 도메인(예를 들어, 전문이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Koide et al. (2007), *Methods Mol. Biol.* 352-109] 참조), DARPin(예를 들어, 전문이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Stumpp et al. (2008) *Drug Discov. Today* 13 (15-16): 695-701] 참조), 단백질 A의 Z 도메인(전문이 참조로서 본원에 포함되는 문헌

[Nygren et al. (2008) *FEBS J.* 275 (11): 2668-76] 참조), 리포칼린(예를 들어, 전문이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Skerra et al. (2008) *FEBS J.* 275 (11): 2677-83] 참조), 어필린(Affilin)(예를 들어, 전문이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Ebersbach et al. (2007) *J. Mol. Biol.* 372 (1): 172-85] 참조), 어피틴(Affitin)(예를 들어, 전문이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Krechenbrink et al. (2008) *J. Mol. Biol.* 383 (5): 1058-68] 참조), 아비머(Avimer)(예를 들어, 전문이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Silverman et al. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23 (12): 1556-61] 참조), 피노머(Fynomer)(예를 들어, 전문이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Grabulovski et al. (2007) *J Biol Chem* 282 (5): 3196-3204] 참조), 및 쿠니츠(Kunitz) 도메인 웹티드(예를 들어, 전문이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Nixon et al. (2006) *Curr Opin Drug Discov Devel* 9 (2): 261-8] 참조)를 제한 없이 포함한다.

[0216] 본 개시의 결합 폴리펩티드 및 면역어드헤신의 경우, 사이토카인과 같은 가용성 인자와 막 결합 인자 둘 모두, 및 막관통 수용체를 포함하는, 단백질, 서브유닛, 도메인, 모티프 및/또는 표적 항원의 에피토프를 포함하나 이에 한정되지 않는, 실질적으로 임의의 항원이 결합 폴리펩티드에 의해 표적화될 수 있다.

[0217] 본원에서 기술된 변형된 Fc 도메인을 포함하는 본 개시의 결합 폴리펩티드는 공지된 "모" 항체의 CDR 서열 또는 가변 도메인 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 모 항체 및 본 개시의 항체는 본원에서 개시된 Fc 도메인에 대한 변형을 제외하고, 유사하거나 동일한 서열을 공유할 수 있다.

#### 핵산 및 발현 벡터

[0219] 일 양태에서, 본 발명은 본원에서 개시된 결합 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 이러한 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 단계를 포함하는 결합 폴리펩티드의 제조 방법이 또한 제공된다.

[0220] 본원에서 개시된 결합 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 전형적으로 청구된 항체 또는 면역어드헤신의 원하는 양을 생산하기 위해 사용될 수 있는 숙주 세포로의 도입을 위한 발현 벡터로 삽입된다. 따라서, 특정 양태에서, 본 발명은 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 이러한 벡터 및 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0221] 용어 "벡터" 또는 "발현 벡터"는 세포에서 원하는 유전자를 내부로 도입하고 발현시키기 위한 벡터를 의미하도록, 본 명세서 및 청구범위의 목적상 본원에서 사용된다. 당업자에게 공지된 바와 같이, 이러한 벡터는 플라스미드, 파지, 바이러스 및 레트로바이러스로 구성된 군으로부터 쉽게 선택될 수 있다. 일반적으로, 벡터는 선택 마커, 원하는 유전자의 클로닝을 돋기에 적절한 제한 부위 및 진핵 또는 원핵 세포로 진입하고/하거나 복제하는 능력을 포함할 것이다.

[0222] 다수의 발현 벡터 시스템이 이용될 수 있다. 예를 들어, 한 부류의 벡터는 소 유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 배클로바이러스, 레트로바이러스(RSV, MMTV 또는 MOMLV) 또는 SV40 바이러스와 같은 동물 바이러스로부터 유래된 DNA 요소를 이용한다. 다른 것들은 내부 리보솜 결합 부위를 갖는 폴리시스트론 시스템의 사용을 수반한다. 추가적으로, DNA가 세포의 염색체 내로 통합된 세포는 형질감염된 숙주 세포를 선택할 수 있게 하는 하나 이상의 마커를 도입함으로써 선택될 수 있다. 이러한 마커는 영양요구성 숙주에 독립영양을 제공하거나, 살생물제(예를 들어, 항생제) 내성, 또는 구리와 같은 중금속에 대한 내성을 제공할 수 있다. 선택 가능한 마커 유전자는 발현될 DNA 서열에 직접 연결되거나 공동 형질전환에 의해 동일한 세포 내로 도입될 수 있다. 추가적인 요소가 또한 mRNA의 최적의 합성을 위해 필요할 수 있다. 이러한 요소들은 신호 서열, 스플라이싱 신호, 전사 프로모터, 인핸서, 및 종결 신호를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 클로닝된 가변 영역 유전자는 위에서 논의된 바와 같이 합성된 중쇄 및 경쇄 불변 영역 유전자(예컨대 인간 유전자)를 따라 발현 벡터 내에 삽입된다.

[0223] 다른 구현예에서, 본원에서 기술된 결합 폴리펩티드는 폴리시스트론 구축물을 이용하여 발현될 수 있다. 이러한 발현 시스템에서, 다수의 관심 유전자 생성물, 예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄가 단일 폴리시스트론 구축물로부터 생성될 수 있다. 이러한 시스템은 유리하게는 진핵 숙주 세포 내에서 비교적 높은 수준의 폴리펩티드를 제공하기 위해 내부 리보솜 유입 부위(IRES)를 사용한다. 상용 가능한 IRES 서열은 미국 특허 제6,193,980호에 개시되어 있으며, 이는 본원에 참고로 포함된다. 당업자는 이러한 발현 시스템이 본 출원에 개시된 전체 범위의 폴리펩티드를 효과적으로 생성하기 위해 이용될 수 있음을 인지할 것이다.

[0224] 더욱 일반적으로, 본 개시의 결합 폴리펩티드를 암호화하는 벡터 또는 DNA 서열이 제조되었으면, 발현 벡터는 적절한 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 즉, 숙주 세포가 형질전환될 수 있다. 숙주 세포 내로의 플라스미드의 도입은 당업자에게 잘 알려진 다양한 기술에 의해 달성될 수 있다. 이는 형질감염(전기영동 및 전기천공을 포함

함), 원형질 융합, 인산칼슘 침전법, 세포와 엔벨로핑된(enveloped) DNA의 융합, 미세주입, 및 온전한 바이러스를 이용한 감염을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 문헌[Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Chapter 24.2, pp. 470-472 Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988)] 참조. 형질전환된 세포를 경쇄 및 종쇄의 생성에 적절한 조건 하에 성장시키고, 종쇄 및/ 또는 경쇄 단백질 합성에 대해 분석한다. 예시적인 분석 기술은 효소 결합 면역흡착 분석법(ELISA), 방사선 면역분석법(RIA), 또는 형광 활성화 세포 분류 분석법(FACS), 면역조직화학법 등을 포함한다.

[0225] 본원에서 사용된 용어 "형질전환"은 유전형을 바꾸고 결과적으로 수여 세포의 변화를 야기하는 수여 숙주 세포 내로의 DNA의 도입을 지칭하는 넓은 의미로 사용되어야 한다.

[0226] 동일한 세포주들을 따라, "숙주 세포"는 재조합 DNA 기술을 사용하여 구축되고 적어도 하나의 이종 유전자를 암호화하는 벡터로 형질전환된 세포를 지칭한다. 재조합 숙주로부터 폴리펩티드의 단리를 위한 과정의 기술에서, 용어 "세포" 및 "세포 배양물"은 달리 명확하게 명시되지 않는 한, 항체의 공급원을 나타내기 위해, 상호 교환적으로 사용된다. 다시 말해, "세포"로부터의 폴리펩티드의 회수는 스핀다운된 전체 세포로부터 또는 배지 및 혼탁된 세포를 모두 함유하는 세포 배양물로부터를 의미할 수 있다.

[0227] 일 구현예에서, 결합 폴리펩티드의 발현에 사용되는 숙주 세포주는 진핵세포 또는 원핵세포 기원의 세포주이다. 일 구현예에서, 결합 폴리펩티드의 발현에 사용되는 숙주 세포주는 박테리아 기원의 세포주이다. 일 구현예에서, 결합 폴리펩티드의 발현에 사용되는 숙주 세포주는 포유류 기원이며, 당업자는 숙주 세포에서 발현되는 원하는 유전자 생성물에 가장 적합한 특정 숙주 세포주를 결정할 수 있다. 예시적인 숙주 세포주는 DG44 및 DUXB11(중국 햄스터 난소 세포주, DHFR 마이너스), HELA(인간 자궁경부 암종), CVI(원숭이 신장 세포주), COS(SV40 T 항원을 갖는 CVI의 유도체), R1610(중국 햄스터 섬유모세포) BALBC/3T3(마우스 섬유모세포), HAK(햄스터 신장 세포주), SP2/0(마우스 골수종), BFA-1c1BPT(소 내피 세포), RAJI(인간 림프구), 293(인간 신장)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일 구현예에서, 세포주는 세포주(예를 들어, PER.C6.RTM. (Cruce11) 또는 FUT8-녹아웃 CHO 세포주(POTELLIGENT™ 세포)(Biowa, 미국 뉴저지 주 프린스턴 소재))에서 발현된 항체의 변경된 글리코실화, 예를 들어, 비푸코실화를 제공한다. 일 구현예에서, NS0 세포가 사용될 수 있다. 숙주 세포주는 전형적으로 상업적 서비스인 아메리칸 티슈 컬쳐 컬렉션(American Tissue Culture Collection) 또는 공개된 문헌으로부터 이용 가능하다.

[0228] 시험관 내 생성은 많은 양의 원하는 결합 폴리펩티드를 제공하도록 규모 확대를 가능하게 한다. 조직 배양 조건 하에서의 포유동물 세포 배양을 위한 기술은 당해 분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, 공기부양 반응기 또는 연속 교반 반응기 중에서의 균일 혼탁 배양, 또는, 예를 들어, 중공 섬유, 마이크로캡슐 내, 아가로스 마이크로비드 또는 세라믹 카트리지 상에서의 고정되거나 포획된 세포 배양을 포함한다. 필요한 경우 및/또는 원하는 경우, 폴리펩티드의 용액은 통상적인 크로마토그래피 방법, 예를 들어, 젤 여과, 이온 교환 크로마토그래피, DEAE-셀룰로스 상에서의 크로마토그래피 및/또는 (면역-)친화도 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다.

[0229] 결합 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 유전자는 또한 비 포유동물 세포, 예를 들어, 박테리아 또는 효모 또는 식물 세포에서 발현될 수 있다. 이와 관련하여, 다양한 단세포 비 포유동물 미생물, 예컨대, 박테리아, 즉, 배양물에서 성장시킬 수 있거나 발효될 수 있는 미생물이 또한 형질전환될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 형질전환이 잘 되는 박테리아는 장내세균과의 일원, 예컨대, 에스체리키아 콜라이 또는 살모넬라 균주; 간균과, 예컨대, 바실러스 서브틸리스; 폐렴구균; 연쇄구균, 및 헤모필리스 인플루엔자의 주를 포함한다. 또한, 박테리아에서 발현되는 경우, 폴리펩티드가 봉입체의 일부가 될 수 있음이 인지될 것이다. 폴리펩티드는 단리되어야 하고, 정제되어야 하고, 그 후 기능성 분자로 조립되어야 한다.

[0230] 원핵생물에 더하여, 진핵생물 미생물이 또한 사용될 수 있다. 다수의 다른 균주가 일반적으로 이용 가능하지만, 사카로마이세스 세레비지에 또는 통상적인 제빵 효모가 진핵 미생물 중에서 가장 흔하게 사용된다. 사카로마이세스에서의 발현을 위해, 플라스미드 YRp7, 예를 들어, 문헌[Stinchcomb *et al.*, *Nature*, 282:39 (1979)]; 문헌[Kingsman *et al.*, *Gene*, 7:141 (1979)]; 문헌[Tschemper *et al.*, *Gene*, 10:157 (1980)]에서의 플라스미드 YRp7이 일반적으로 사용된다. 이러한 플라스미드는 이미 트립토판에서 성장하는 능력이 결여된 효모의 돌연변이주, 예를 들어, ATCC 번호 44076 또는 PEP4-1에 대한 선택 마커를 제공하는 TRP1 유전자를 함유한다(문헌 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)]). 효모 숙주 세포 계놈의 특징으로서의 trp1 손상의 존재는 이후에 트립토판의 부재 하에서의 성장에 의해 형질전환을 검출하기 위한 효과적인 환경을 제공한다.

[0231] 치료 방법

- [0232] 일 양태에서, 본 발명은 유효량의 본원에 개시된 결합 폴리펩티드를 투여하는 단계를 포함하는, 치료 또는 진단을 필요로 하는 환자를 치료하거나 진단하는 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, 본 개시는 치료를 필요로 하는 포유동물 대상체에서 장애, 예를 들어, 신생물 장애의 진단 및/또는 치료를 위한 키트 및 방법을 제공한다. 특정 예시적 구현예에서, 대상체는 인간이다.
- [0233] 본 개시의 결합 폴리펩티드는 다수의 상이한 적용에서 유용하다. 예를 들어, 일 구현예에서, 본 결합 폴리펩티드는 결합 폴리펩티드의 결합 도메인에 의해 인지되는 에피토프를 갖는 세포를 감소시키거나 제거하는 데 유용하다. 또 다른 구현예에서, 본 결합 폴리펩티드는 순환 중의 가용성 항원의 농도를 감소시키거나 가용성 항원을 제거하는 데 효과적이다. 또 다른 구현예에서, 본 결합 폴리펩티드는 T 세포 인게이저(engager)로서 효과적이다. 일 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 종양 크기를 감소시키고/감소시키거나, 종양 성장을 억제하고/억제하거나, 종양을 갖는 동물의 생존 기간을 연장시킬 수 있다. 따라서, 본 개시는 또한 효과적인 비독성 양의 변형된 항체를 인간 또는 다른 동물에게 투여함으로써 이러한 인간 또는 동물에서 종양을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0234] 일 구현예에서, 본 결합 폴리펩티드는 질환 또는 장애의 치료에 유용하다. 예를 들어, 본 결합 폴리펩티드는 항체 관련 장애, 또는 항체 반응성 장애, 병태, 또는 질환의 치료에 유용하다. 본원에서 사용되는 용어 "항체 관련 장애" 또는 "항체 반응성 장애" 또는 "병태" 또는 "질환"은 본 개시의 항체 또는 결합 폴리펩티드를 포함하는 약학적 조성물의 투여에 의해 개선될 수 있는 질환 또는 장애를 지칭하거나 기술한다.
- [0235] 일 구현예에서, 본 결합 폴리펩티드는 암의 치료에 유용하다. 본원에서 사용되는 용어 "암" 또는 "암성"은 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장을 특징으로 하는 생리적 상태를 지칭하거나 기술한다. 암의 예는 암종, 림프종, 모세포종, 육종(지방육종 포함), 신경내분비 종양, 중피종, 신경초종, 수막종, 선암종, 흑색종, 및 백혈병 또는 림프양 악성 종양을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 암의 더욱 특별한 예는 편평세포암(예를 들어, 상피 편평세포암), 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평암종을 포함한 폐암, 복막암, 간세포암, 위장관암을 포함한 위암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 침샘 암종, 신장암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간세포 암종, 항문 암종, 음경 암종, 고환암, 식도암, 담도 종양 및 두경부암을 포함한다.
- [0236] 또 다른 구현예에서, 본 결합 폴리펩티드는 감염성 질환, 자가면역 장애, 염증성 장애, 폐 질환, 신경 또는 신경변성 질환, 간 질환, 척추 질환, 자궁 질환, 우울 장애 등을 제한 없이 포함하는 기타 장애의 치료에 유용하다. 감염성 질환의 비 제한적인 예는 RNA 바이러스(예를 들어, 오르토믹소 바이러스(예를 들어, 인플루엔자), 파라믹소 바이러스(예를 들어, 호흡기 세포융합 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 메타뉴모바이러스), 핵도바이러스(예를 들어, 광견병 바이러스), 코로나 바이러스, 알파 바이러스(예를 들어, 치쿤구니야 바이러스) 렌티바이러스(예를 들어, HIV) 등) 또는 DNA 바이러스에 의해 유발되는 것들을 포함한다. 감염성 질환의 예는 또한 제한 없이, 예를 들어, 황색 포도상구균, 표피 포도상구균, 장구균, 연쇄상구균, 대장균에 의해 유발되는 박테리아 감염성 질환, 및 예를 들어, 칸디다 알비坎스에 의해 유발되는 것들을 포함한 기타 감염성 질환을 포함한다. 기타 감염성 질환은 제한 없이 말라리아, 사스, 황열병, 라임병, 레슈마니아증, 탄저병 및 수막염을 포함한다. 예시적인 자가면역 장애는 건선, 류마티스 관절염, 쇼그렌 증후군, 이식 거부, 그레이브병, 중증 근무력증 및 루푸스(예를 들어, 전신 홍반성 루푸스)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 따라서, 본 개시는 예를 들어, 증진된 반감기를 갖는 대상 결합 폴리펩티드를 사용함으로써 이익을 얻을 다양한 병태를 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0237] 당업자는 악성 종양을 치료하기 위한 목적에 부합하는 효과적인 비독성 양의 변형된 결합 폴리펩티드를 통상적인 실험에 의해 결정할 수 있을 것이다. 예를 들어, 본 개시의 결합 폴리펩티드의 치료적 유효량은 질환 병기(예를 들어, 단계 I 대 단계 IV), 대상체의 연령, 성별, 의학적 합병증(예를 들어, 면역억제 병태 또는 질환) 및 체중, 및 대상체에서 원하는 반응을 유도하는 변형된 항체의 능력과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 투여 요법은 최적의 치료 반응을 제공하기 위하여 조절될 수 있다. 예를 들어, 몇몇의 분할된 용량이 매일 투여될 수 있거나, 치료 상황의 급박함에 의해 지시되는 바에 비례하여 용량이 감소될 수 있다.
- [0238] 일반적으로, 본 개시에 제공된 조성물은 변형된 항체에 의한 암성 세포의 표적화를 가능케 하는 항원성 마커를 포함하는 임의의 신생물을 예방적 또는 치료적으로 치료하기 위해 사용될 수 있다.
- [0239] **약학적 조성물 및 이의 투여**
- [0240] 본원의 결합 폴리펩티드의 제조 방법 및 이의 대상체에 대한 투여 방법은 당업자에게 잘 알려져 있거나 당업자

에 의해 쉽게 결정된다. 본 개시의 결합 폴리펩티드의 투여 경로는 경구, 비경구, 흡입 또는 국소일 수 있다. 본원에서 사용된 비경구라는 용어는 정맥 내, 동맥 내, 복강 내, 근육 내, 피하, 직장 또는 질 투여를 포함한다. 이러한 모든 형태의 투여가 본 개시의 범위 내인 것으로 명백히 고려되나, 투여를 위한 형태는, 특히 정맥 내 또는 동맥 내 주사 또는 점적 주입을 위한 주사용수일 것이다. 보통, 주사에 적합한 약학적 조성물은 완충제(예컨대, 아세트산, 인산, 또는 시트르산 완충제), 계면활성제(예컨대, 폴리소르베이트), 선택적으로 안정화제(예컨대, 인간 알부민) 등을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 유해한 세포 집단의 부위에 직접적으로 전달됨으로써 치료제에 대한 병든 조직의 노출을 증가시킬 수 있다.

[0241] 비경구 투여를 위한 제형은 멸균 수용액 또는 비 수용액, 혼탁액 및 유화액을 포함한다. 비수용성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일 및 에틸 올레산과 같은 주사용 유기 에스테르이다. 수성 담체는 염수 및 완충 배지를 비롯한 물, 알코올성/수성 용액, 유화액 또는 혼탁액을 포함한다. 본 개시의 조성물 및 방법에서, 약학적으로 허용 가능한 담체는 0.01 내지 0.1 M, 예를 들어, 0.05 M의 인산 완충액, 또는 0.8%의 염수를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 다른 흔한 비경구 비히클은 인산나트륨 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화나트륨, 젖산화 링거액, 또는 고정유를 포함한다. 정맥 내 비히클은 링거 텍스트로스에 기반한 것 등과 같은 전해질 보충물, 유체 및 영양 보충물 등을 포함한다. 예를 들어, 항미생물제, 항산화제, 퀼레이트화제 및 불활성 기체 등과 같은 보존제 및 기타 첨가제가 또한 존재할 수 있다. 더욱 특별하게는, 주사용으로 적합한 약학적 조성물은 멸균 수용액(수용성) 또는 분산액 및 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 조제를 위한 멸균 분말을 포함한다. 이러한 경우에, 조성물은 반드시 멸균되어야 하고, 용이한 주사 가능성이 존재하는 정도의 유체여야 한다. 조성물은 제조 및 저장 조건 하에서 안정적이어야 하고, 전형적으로 박테리아 및 진균류와 같은 미생물의 오염 작용으로부터 보존될 것이다. 담체는, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 코팅, 예를 들어, 레시틴의 사용, 분산액의 경우에서 필요한 입자 크기의 유지 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.

[0242] 미생물의 작용의 예방은 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우, 등장화제, 예를 들어, 당류, 폴리알코올, 예를 들어, 만니톨, 소르비톨 또는 염화나트륨이 조성물 중에 포함될 것이다. 주사용 조성물의 흡수 연장은 조성물 내에 흡수를 저연시키는 작용제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함시킴으로써 발생될 수 있다.

[0243] 임의의 경우, 멸균 주사용 용액은 본원에 열거된 성분 중 하나 또는 본원에 열거된 성분의 조합물을 갖는 적절한 용매에 필요량의 활성 화합물을 (예를 들어, 변형된 결합 폴리펩티드를 단독으로 또는 다른 활성제와 조합하여) 혼입시킨 후, 필요에 따라 여과 멸균에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산 매질 및 위에서 열거된 성분으로부터 필요한 기타 성분을 함유하는 멸균 비히클에 활성 화합물을 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균 주사용 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 예시적인 제조 방법은 활성 성분 + 이전에 멸균 여과된 용액으로부터의 임의의 추가의 원하는 성분의 분말을 생성하는 진공 건조 및 동결 건조를 포함한다. 주사용 제제는 당해 분야에 공지된 방법에 따라 무균 조건 하에서 처리되고, 용기, 예컨대 앰풀, 백, 병, 시린지 또는 바이알 내로 충전되고, 밀봉된다. 나아가, 제제는 포장될 수 있고, 키트의 형태로 판매될 수 있다. 이러한 제조 물품은 전형적으로 관련 조성물이 자가면역 또는 신생물성 장애를 앓고 있거나 자가면역 또는 신생물성 장애에 걸리기 쉬운 대상체의 치료에 유용함을 나타내는 라벨 또는 포장 삽입물을 가질 것이다.

[0244] 위에서 기술된 형태의 치료를 위한 본 개시의 조성물의 유효량은 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리적 상태, 환자가 인간인지 동물인지, 투여되는 기타 의약, 및 치료가 예방적인지 치료적인지를 포함하는 많은 상이한 인자에 따라 달라진다. 대개, 환자는 인간이지만, 형질전환 포유동물을 비롯한 비 인간 포유동물 또한 치료될 수 있다. 안전성 및 효능을 최적화하기 위해, 당업자에게 공지된 통상적인 방법을 사용하여 치료 투여량이 적정될 수 있다.

[0245] 본 개시의 결합 폴리펩티드는 여러 차례 투여될 수 있다. 단일 투여 사이의 간격은 매주, 매월 또는 매년일 수 있다. 간격은 또한 환자에서 변형된 결합 폴리펩티드 또는 항원의 혈중 수준을 측정하여 나타나는 바에 따라 불규칙할 수 있다. 일부 방법에서, 투여량은 1 내지 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  및 일부 방법에서 25 내지 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 혈장 변형된 결합 폴리펩티드 농도를 달성하도록 조정된다. 대안적으로, 결합 폴리펩티드는 지속 방출 제형으로 투여될 수 있으며, 이러한 경우 빈도가 덜한 투여가 필요하다. 항체의 경우, 투여량 및 빈도는 환자에서 항체의 반감기에 따라 달라진다. 일반적으로, 인간화 항체가 가장 긴 반감기를 나타내고, 다음으로 키메라 항체 및 비 인간 항체가 뒤따른다.

[0246]

투여의 빈도 및 투여량은 치료가 예방적인지 또는 치료적인지에 따라 달라질 수 있다. 예방적인 적용에서, 본 항체 또는 이의 칙테일을 함유하는 조성물은 환자의 저항성을 향상시키기 위해 아직 질환 상태가 아닌 환자에게 투여된다. 이러한 양은 "예방적 유효량"으로 정의된다. 이러한 용도에서, 정확한 양은, 다시, 환자의 건강 상태 및 일반적인 면역에 따라 다르지만, 일반적으로 용량당 약 0.1 내지 약 25 mg, 특히 용량당 약 0.5 내지 약 2.5 mg의 범위이다. 긴 기간에 걸쳐서 상대적으로 낮은 투여량이 상대적으로 덜 잣은 간격으로 투여된다. 일부 환자는 그들의 남은 일생 동안 계속해서 치료를 받는다. 치료적 적용에서, 질환의 진행이 감소되거나 종결되거나, 또는 환자가 질환 증상의 부분적 또는 완전한 개선을 나타낼 때까지 상대적으로 짧은 간격의 상대적으로 높은 투여량(예컨대, 용량당 약 1 내지 400 mg/kg의 항체, 보다 일반적으로 약 5 내지 25 mg의 투여량이 방사면역접합체에 사용되고 세포독성-약물 변형된 항체를 위해서는 더 높은 용량이 사용됨)이 때때로 요구된다. 이후, 환자에게 예방적 요법이 투여될 수 있다.

[0247]

본 개시의 결합 폴리펩티드는 선택적으로 치료(예를 들어, 예방적 또는 치료적 치료)를 필요로 하는 장애 또는 병태를 치료하는 데 효과적인 기타 작용제와 조합하여 투여될 수 있다. 본 개시의  $^{90}\text{Y}$  표지된 변형된 항체의 유효한 단일 치료 투여량(즉, 치료적 유효량)은 약 5 내지 약 75 mCi, 예컨대 약 10 내지 약 40 mCi의 범위이다.  $^{131}\text{I}$ -변형된 항체의 유효한 단일 치료 비 골수 절제 투여량은 약 5 내지 약 70 mCi, 또는 약 5 내지 약 40 mCi의 범위이다.  $^{131}\text{I}$  표지된 항체의 유효한 단일 치료 절제 투여량(즉, 자가유래 골수 이식이 요구될 수 있음)은 약 30 내지 약 600 mCi, 예컨대, 약 50 내지 약 500 mCi 미만의 범위이다. 키메라 항체와 함께, 뮤린 항체와 비교하여 더 긴 순환 반감기로 인해, 요오드-131 표지된 키메라 항체의 유효한 단일 치료 비 골수 절제 투여량은 약 5 내지 약 40 mCi, 예컨대 약 30 mCi 미만의 범위이다. 예컨대,  $^{111}\text{In}$  표지에 대한 영상화 기준은 전형적으로 약 5 mCi 미만이다.

[0248]

결합 폴리펩티드는 바로 위에 기재된 바와 같이 투여될 수 있으나, 다른 구현예에서 결합 폴리펩티드는 건강한 환자에게 제1선 치료법으로서 투여될 수 있음이 강조되어야 한다. 이러한 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 정상 또는 평균 적색 골수 예비력을 갖는 환자 및/또는 다른 치료를 받은 적이 없고 다른 치료를 받고 있지 않는 환자에게 투여될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같은, 보조 요법과 함께 또는 보조 요법과 조합된 변형된 항체 또는 면역어드헤신의 투여는 요법 및 개시된 항체의 연속, 동시, 동일 시공간, 동반, 공존 또는 동시발생 투여 또는 적용을 의미한다. 당업자는 조합된 치료 요법의 다양한 구성요소의 투여 또는 적용이 치료의 전체 효과를 증진시키도록 시기가 지정될 수 있음을 인지할 것이다.

[0249]

이전에 논의된 바와 같이, 본 개시의 결합 폴리펩티드, 이의 면역어드헤신 또는 재조합물은 포유동물 장애의 생체 내 치료를 위해 약학적 유효량으로 투여될 수 있다. 이와 관련하여, 개시된 결합 폴리펩티드가 투여를 돋고 활성제의 안정성을 촉진하도록 제형화될 것이라는 점이 인지될 것이다.

[0250]

본 개시에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 비독성의 멀균 담체, 예를 들어, 생리 식염수, 비독성 완충제, 보존제 등을 포함할 수 있다. 본 출원의 목적을 위해, 치료제에 접합되거나 접합되지 않은 결합 폴리펩티드, 이의 면역어드헤신 또는 재조합물의 약학적 유효량은 항원에 대한 유효한 결합을 달성하고, 이점을 달성하고, 예를 들어, 질환 또는 장애의 증상을 개선하거나 물질 또는 세포를 검출하기에 충분한 양을 의미하도록 유지될 것이다. 종양 세포의 경우, 변형된 결합 폴리펩티드는 신생물 또는 면역반응성 세포 상의 선택된 면역반응성 항원과 상호 작용할 수 있고, 이러한 세포 사멸의 증가를 제공할 수 있다. 물론, 본 개시의 약학적 조성물은 약학적 유효량의 변형된 결합 폴리펩티드를 제공하기 위해 단일 용량 또는 다용량으로 투여될 수 있다.

[0251]

본 개시의 범위와 일치하게, 본 개시의 결합 폴리펩티드는 치료 또는 예방 효과를 낳기에 충분한 양으로 전술된 치료 방법에 따라 인간 또는 기타 동물에게 투여될 수 있다. 본 개시의 결합 폴리펩티드는 공지된 기술에 따라 본 개시의 항체와 통상적인 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제를 조합하여 제조된 통상적인 투여 형태로 이러한 인간 또는 기타 동물에게 투여될 수 있다. 당업자는 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제의 형태 및 특성이 조합될 유효 성분의 양, 투여 경로 및 기타 잘 알려진 변수들에 의해 좌우된다는 점을 인식할 것이다. 당업자는 본 개시에서 기재된 결합 폴리펩티드의 하나 이상의 종을 포함하는 칙테일이 특히 효과적이라고 증명할 수 있음을 추가로 인지할 것이다.

[0252]

본원에 언급되거나 인용된 기사, 특히 및 특허 출원, 그리고 모든 기타 문서 및 전자적으로 이용 가능한 정보의 내용은 각 개별 간행물이 구체적으로 그리고 개별적으로 포함된 것으로 표시된 것과 동일한 정도로 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 출원인은 임의의 이러한 기사, 특히, 특허 출원, 또는 기타 물리적 및 전자 문서의 일

체의 자료 및 정보를 이 출원에 물리적으로 포함할 권리를 보유한다.

[0253] 본 발명은 이의 특정 구현예를 참조하여 설명되었지만, 본 발명의 진정한 사상 및 범위를 벗어나지 않고 다양한 변경이 이루어질 수 있고 균등물이 대체될 수 있음을 당업자는 이해해야 한다. 본원에 기술된 방법의 기타 적합한 변형 및 개조가 본원에 개시된 구현예의 범위를 벗어나지 않고도 적절한 균등물을 이용하여 이루어질 수 있음은 당업자에게 명백할 것이다. 또한, 특정 상황, 재료, 물질의 조성, 공정, 공정 단계 또는 단계들을 본 발명의 목적, 사상 및 범위에 적응시키기 위해 많은 변형이 이루어질 수 있다. 이러한 모든 변형은 본원에 첨부된 청구항의 범위 내에 있는 것으로 의도된다. 지금까지 특정 구현예를 상세하게 기술하였는데, 단지 예시의 목적으로 포함된 것으로, 한정하도록 의도된 것이 아닌 다음의 실시예를 참조함으로써 이를 더욱 명확하게 이해할 수 있을 것이다.

#### 실시예

[0255] 본 발명은 하기의 실시예에 의해 더 예시되며, 이는 추가의 제한으로 이해되어서는 안 된다.

#### 실시예 1: 재료 및 방법

##### 단백질 시약:

[0258] 다음의 단백질을 발현시키고 단리하였다: C 말단의 8x히스티딘 태그가 있는 항원; rFcRn(UniProt: P1359, p51 서브유닛: 잔기 23~298; UniProt: P07151,  $\beta$ 2-m: 잔기 21~119); 비오틴 부착된 시노몰구스 FcRn(UniProt: Q8SPV9, p51 서브유닛: C 말단의 Avi-태그가 있는 잔기 24~297; UniProt: Q8SPW0,  $\beta$ 2-m: 잔기 21~119); 비오틴 부착된 hFcRn(UniProt: P55899, p51 서브유닛: C 말단의 Avi-태그가 있는 잔기 24~297; UniProt: P61769,  $\beta$ 2-m: 잔기 21~119); 인간 CD16a(UniProt: P08637, Fc $\gamma$ RIIIa: C 말단의 HPC4 태그 및 위치 158에 발린(V158)이 있는 잔기 17~208). H435A 및 H310A/H435Q 중쇄 변이체를 HEK293 조정 배지로부터 얻었다. Evitria에 의해 mAb2 변이체를 클로닝하고, mAbSelect SuRe 친화도 컬럼(GE Healthcare)을 이용하여 혼탁액 CHO K1 조정 배지로부터 정제하고, 후속 실험을 위해 인산염 완충 식염수(PBS)(pH 7.4)로 완충액 교환하였다.

##### 포화 라이브러리 구축:

[0260] 리더 DNA 서열이 있는 WT IgG1 mAb1 항체 중쇄 및 경쇄를 NcoI 및 HindIII 제한 효소 부위를 이용하여 각각 pBH6414 및 pBH6368 포유류 발현 플라스미드 내로 혼입시켰다. 다음의 위치에 모든 가능한 아미노산을 도입하기 위하여 Lightning 부위 특이적 돌연변이 유발 키트(Agilent) 및 NNK(N= A/C/G/T, K = G/T) 및 WWC(W = A/T) 프라이머(IDT Technologies)를 이용하여 포화 라이브러리를 생성하였다: M252, I253, S254, T256, K288, T307, K322, E380, L432, N434 및 Y436(Eu 넘버링). mAb1 백본의 3개의 제어 변이체의 중쇄 DNA 서열 AAA(T307A/E380A/N434A), LS(M428L/N434S) 및YTE(M252Y/S254T/T256E)를 LakePharma의 pBH6414 벡터로 구축하였다.

[0261] PCR 반응의 WT 및 M252Y 주형과 함께 T256D, T256E, T307Q, T307W, N434F 및 N434Y 프라이머와 Q5 돌연변이 유발 키트(NEBiolabs)를 이용하여 mAb1 중쇄의 부위 특이적 돌연변이 유발을 통해 조합 포화 라이브러리를 얻었다. Ab3 백본으로의 돌연변이 혼입은 M252Y, T256D, T307Q 및 T307W 프라이머와 함께 Q5 돌연변이 유발 키트(NEBiolabs)를 이용하여 수행하였다. Sanger 시퀀싱(Genewiz, Inc.)을 통해 모든 Fc 변이체의 생성을 확인하였다.

##### 제조합 항체 발현 및 정제:

[0263] 조정 배지 스크리닝을 위해, mAb1의 돌연변이체 중쇄 및 야생형 경쇄를 함유하는 DNA를 제조사의 설명서에 따라 발현을 위한 Expi293 포유류 세포(Invitrogen) 1 mL에 형질감염시켰다. 세포를 2 mL의 96웰 플레이트(Greiner Bio-One)에서 분당 900회 회전(RPM)으로 진탕하면서 37°C, 5%의 이산화탄소 및 80%의 습도에서 인큐베이션하고 폭기막으로 밀봉하였다. 조정 배지를 형질감염 5일 후에 수집하고, 사용할 때까지 -80°C에서 보관하였다. mAb1 및 Ab3 백본의 리드 변이체를 0.2  $\mu$ m 벤트 캡(vented cap)이 있는 125 mL의 플라스크(Corning)에서 30 mL 규모로 발현시켰다. 125 mL의 배양 플라스크를 전체 발현 기간 동안 125 RPM으로 진탕하였다. 조정 배지를 형질감염 5일 후 수집하고, 0.22  $\mu$ m, 50 mL의 원뿔형 필터(Corning)로 여과하고, 정제할 때까지 4°C에서 보관하였다.

[0264] mAb1 및 Ab3의 단리를 1 mL의 mAbSelect SuRe HiTrap 컬럼(GE Healthcare)을 이용하여 수행하였다. 10의 컬럼 부피에 대한 PBS pH 7.4의 세척 단계 후, 항체를 5의 컬럼 부피의 0.1 M 시트르산 pH 3.0(Sigma)으로 용리시키고, 0.5 mL의 1 M의 트리스 염기 pH 9.0(Sigma)으로 중화시켰다. 용리된 항체를 PBS pH 7.4에 대해 완충액 교

환하고, 후속 연구를 위해 30 kDa의 MWCO Amicon 농축기(Millipore)를 사용하여  $> 1 \text{ mg mL}^{-1}$  까지 농축하였다. 정제된 항체의 농도를 적절한 흡광 계수를 사용하여 280 nm(UV<sub>280</sub>)에서 이의 UV 흡광도로부터 결정하였다.

[0265] 옥텟 조정 배지 스크리닝 및 분석:

[0266] mAb1 변이체를 함유하는 조정 배지의 스크리닝을 Ni-NTA 바이오센서(PALL Life Sciences)가 있는 Octet QK 384에서 수행하였다. His 태그가 부착된 항원을 PBS, 0.1% 소 혈청 알부민(BSA, Sigma) 및 0.01%의 트윈-20(Sigma) pH 7.4(PBST-BSA 7.4)에서 300초 동안  $15 \text{ \mu g mL}^{-1}$ 에서 포획한 다음, PBST-BSA pH 7.4로 20초의 세척을 수행하였다. 항체를 PBST-BSA pH 7.4로 1:1 희석된 조정 배지에서 200초 동안 포획하였다. pH 6.0의 완충액에서 완충액 세척 단계 후, pH 6.0에서 각각 150초 및 200초의 결합 및 해리 시간 동안 200 nM의 rFcRn을 사용하여 FcRn 결합 동역학을 얻었다. 옥텟 스크리닝 동안의 모든 단계에서, 온도는 30°C였고, 진탕 속도는 1000 RPM이었다. rFcRn 결합 동역학 프로파일을 FcRn 결합 단계의 개시점으로 보정하였고, Octet 7.1 분석 소프트웨어를 사용하여 1:1 결합 모델로 모델링하였다.

[0267] FcRn 결합 동역학:

[0268] pH 6.0 및 pH 7.4에서 FcRn 결합 동역학은 FcRn의 직접 고정화 또는 비오틴 CAPture 키트(GE Healthcare)와 함께 변형된 프로토콜을 이용하여 비아코어 T200 기기(GE Healthcare)를 사용하여 측정하였다(예를 들어, 문헌 [Abdiche et al., *mAbs* (2015) 7:331-343]; 문헌[Karlsson et al., *Anal. Biochem.* (2016) 502:53-63] 참조). 직접 고정화를 위해,  $20 \text{ \mu g mL}^{-1}$  농도의 비오틴 부착된 FcRn을  $10 \text{ mM}$ 의 아세트산 나트륨 pH 4.5(GE Healthcare)에서  $10 \text{ \mu L}$  분<sup>-1</sup>에서 180초 동안 C1 센서 칩의 표면에 아민 커플링 화학(GE Healthcare)을 통해 약 20 RU까지 고정시켰다. 비오틴 CAPture 키트를 사용하여, CAPture 시약을 CAP 칩 표면에  $>2,000 \text{ RU}$ 의 결합 RU까지 포획한 후, 적절한 채널의  $0.1 \text{ \mu g mL}^{-1}$ 의 FcRn을  $30 \text{ \mu L}$  분<sup>-1</sup>에서 24초 동안 약 2 RU의 최종 결합 RU까지 포획하였다. FcRn 결합 동역학 실험을 위한 러닝 완충액은 pH 6.0 또는 7.4의 0.05%의 계면활성제 P-20이 함유된 PBS(PBS-P+, GE Healthcare)였다. 1000 nM 항체로부터 농도 계열의 4배 연속 희석을, 0 nM의 대조군을 포함하여, 각 변이체에 대해 4회 반복하여 수행하였다.  $10 \text{ \mu L}$  분<sup>-1</sup>의 유속에서 각각 180초 및 300초의 결합 및 해리 시간에 대해 동역학 측정치를 얻었다. C1 및 CAP 센서 칩을 각각, 30초 동안  $50 \text{ \mu L min}^{-1}$ 에서  $10 \text{ mM}$ 의 나트륨 테트라보레이트, 1 M의 NaCl pH 8.5(GE Healthcare)로, 또는 120초 동안  $50 \text{ \mu L}$  분<sup>-1</sup>에서 6 M의 구아니딘 염산염, 250 mM의 수산화나트륨(GE Healthcare)으로 재생시킨 후, PBS-P+ pH 6.0에서 추가의 60~90초의 안정화 단계를 수행하였다. FcRn의 포획 수준을 두 방법 모두에 대해 10 내지 20배 증가시킨 점을 제외하고는, 동일한 C1 또는 CAP 센서 칩 및 위에 기술된 동역학 매개변수를 이용하여 3회 반복하여 1000 nM의 모든 변이체에 대해 pH 7.4에서의 정상 상태 RU 측정치를 얻었다.

[0269] 결합력 효과로 인해 비아코어 T200 평가 소프트웨어를 사용하여 pH 6.0에서 농도 계열에 대한 동역학 매개변수를 2가 모델에 대해 적합화하였다. 예를 들어, 문헌[Suzuki et al., *J. Immunol.* (2010) 184: 1968-1976] 참조. 평균 결합 및 해리 속도와 결합 친화도를 얻기 위하여 각 농도 계열을 독립적으로 적합화하였다. 2가 모델의 첫 번째 결합 및 해리 속도로부터 결보기 결합 친화도를 계산하였다. 반응 비교를 위해 동시에 3회 반복하여 1000 nM의 각 항체를 이용하여 pH 7.4에서 잔류 결합을 측정하였다. 평균과 표준 편차를 얻기 위해 각 반복의 정상 상태 반응의 평균을 냈다.

[0270] FcRn 친화도 크로마토그래피:

[0271] 한 실험에서, 문헌[Schlothauer et al. 2013, *mAbs* 5: 576-586]으로부터 개조한 프로토콜로부터 FcRn 친화도 컬럼을 생성하였다. 1 mL의 스트렙타비딘 HP HiTrap 컬럼(GE Healthcare)을 5의 컬럼 부피에 대해 1 mL 분<sup>-1</sup>의 결합 완충액(20 mM의 인산나트륨(Sigma) pH 7.4, 150 mM의 염화나트륨(NaCl; Sigma))으로 평형화시킨 다음, 4 mg의 비오틴 부착된 cynoFcRn을 주입하였다. 컬럼을 결합 완충액으로 세척하고, 사용할 때까지 4°C에서 보관하였다.

[0272] 300  $\mu \text{g}$ 의 각 항체를 주입하기 전에 FcRn 친화도 컬럼을 5의 컬럼 부피에 대해 낮은 pH의 완충액(20 mM의 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산(MES; Sigma) pH 5.5; 150 mM NaCl)으로 평형화시켰다. 항체 용액의 pH를 낮은 pH의 완충액으로 pH 5.5로 조정하였다. 낮은 pH의 완충액으로 10 컬럼 부피의 세척 후, 1 mL 분획 중 1 mL 분<sup>-1</sup>으로 30 컬럼 부피에 걸쳐 높은 pH의 완충액(20 mM의 1,3-비스(트리스(하이드록시메틸)메틸아미노)프로판 (비스 트리스

프로판; Sigma) pH 9.5; 150 mM NaCl)을 이용하여 선형 pH 구배에 의해 항체를 용리시키고, UV<sub>280</sub>을 모니터링하였다. 후속 실행을 위한 낮은 pH 완충액 또는 저장을 위한 결합 완충액 10 컬럼 부피로 FcRn 친화도 컬럼을 재평형화시켰다. 모든 변이체를 3회 반복하여 수행하였다.

[0273] UV<sub>280</sub> 최대값에서 용리 부피를 결정하기 위하여 SigmaPlot 11(Systat Software, Inc.)의 방정식 1을 이용하여 단일 가우스 분포에 대해 각 변이체에 대한 FcRn 친화도 컬럼 용리 프로파일을 모델링하였다.

$$UV_{280} = y_0 + a \cdot \exp \frac{-(x-x_0)^2}{2b}$$

(방정식 1)

[0275] 여기서, x<sub>0</sub>은 UV<sub>280</sub> 피크 최대값에서의 용리 부피이고, y<sub>0</sub>은 기준선 UV<sub>280</sub> 흡광도이고, a 및 b는 분포의 절반 최대값에서의 전폭과 관련이 있다. 각 분획의 pH를 Corning Pinnacle 540 pH 미터로 측정하고, 선형 회귀를 이용하여 용리 부피에 대해 관련시켰다.

[0276] 또 다른 실험에서, FcRn 친화도 컬럼을 1 mL의 스트렙타비딘 HP HiTrap 컬럼(GE Healthcare) 상에서 비오틴 부착된 hRcRn을 이용하여 문헌[Schlothauer et al. 2013, *mAbs* 5: 576-586]으로부터 개조하였다. AKTA Pure 시스템(AKTA) 상에서 낮은 pH의 완충액(20 mM 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산(MES; Sigma) pH 5.5; 150 mM NaCl) 중 300 µg의 각 항체를 컬럼에 주입하였다. 0.5 mL 분<sup>-1</sup>으로 30 컬럼 부피에 걸쳐 낮은 pH 및 높은 pH의 완충액(20 mM 1,3-비스(트리스(하이드록시메틸)메틸아미노)프로판 (비스 트리스 프로판; Sigma) pH 9.5; 150 mM NaCl)을 이용하여 생성된 선형 pH 구배로 항체를 용리시키고, 흡광도와 pH를 모니터링하였다. 후속 실행을 위해 낮은 pH의 완충액으로 컬럼을 재평형화시켰다. 모든 변이체를 3회 반복하여 수행하였다. UV<sub>280</sub> 최대값에서 용리 부피 및 pH를 결정하기 위하여 SigmaPlot 11(Systat Software, Inc.)에서 단일 가우스 분포에 대해 FcRn 친화도 컬럼 용리 프로파일을 적합화하였다.

[0277] 시차 주사 형광측정법:

[0278] 20 µL의 반응물에 대해 BioRad CFX96 실시간 시스템 열 순환기(BioRad)에서 시차 주사 형광측정법(DSF) 실험을 수행하였다. 항체 샘플 및 사이프로 오렌지(Sypro Orange) 염료(Invitrogen)의 5000x 모액을 PBS pH 7.4 중에 각각 0.4 mg mL<sup>-1</sup> 및 10x로 희석하였다. 항체와 사이프로 오렌지를 96웰 PCR 플레이트에서 1:1 비율로 혼합하고, 최종 농도 0.2 mg mL<sup>-1</sup>의 각 항체 및 5x의 사이프로 오렌지 염료까지 접착 마이크로셀(BioRad)로 밀봉하였다. 모든 항체 변이체를 3회 반복하여 수행하였다. 열 순환기 프로그램은 20°C에서 2분의 평형화 단계에 이어 최종 온도 100°C까지 0.5°C/5초의 일정한 온도 상승 속도로 구성되었다. 사이프로 오렌지 형광에 적합한 FAM 여기 과장(485 nm) 및 ROX 방출(625 nm) 검출기를 사용하여 각 웰의 형광 측정치를 획득하였다(예를 들어, 문헌 [Biggar et al. 2012, *Biotechniques* 53: 231-238] 참조). DSF 형광 강도 프로파일과 1차 도함수를 BioRad CFX Manager에서 내보내기 하고, SigmaPlot 11에서 분석하였다. T<sub>m</sub>은 형광 강도 프로파일에서 첫 번째 전이의 중간 점으로 정의되었다.

[0279] Fc γRIIIa 결합 동역학:

[0280] 비아코어 T200 기기(GE Healthcare)를 이용하여 결합 동역학 및 친화도를 측정하였다(문헌[Zhou et al. 2008 *Biotechnol. Bioeng.* 99: 652-665]). 아세트산염 pH 4.5 중 50 µg mL<sup>-1</sup>의 항-HPC4 항체(Roche)를 CM5 센서 칩의 표면에 10 µl 분<sup>-1</sup>에서 600초 동안 아민 화학을 이용하여 >20,000 RU의 최종 밀도로 결합시켰다. Fc γRIIIa 결합 동역학 실험을 위한 러닝 완충액은 pH 7.4의, 0.05% 계면활성제 P-20이 함유된 HEPES 완충 식염수(HBS-P+, GE Healthcare) 및 2 mM의 염화칼슘(CaCl<sub>2</sub>, Fluka)이었다. 각 동역학 자취를 5 µl 분<sup>-1</sup>에서 30초 동안 1.25 µg mL<sup>-1</sup>의 HPC4 태그가 부착된 Fc γRIIIa-V158의 포획으로 초기화하였다. 300 nM의 각 변이체에서 결합 및 해리 동역학을 각 변이체에 대해 5 µl 분<sup>-1</sup>로 각 단계에 대해 120 내지 180초 동안 측정하였다. 동역학 측정이 완료되면 CM5 칩을 10 mM EDTA(Ambion)가 보충된 HBS-P+ 완충액으로 재생시켰다. 다음 동역학 측정 전, CM5 칩을 CaCl<sub>2</sub>를 함유한 HBS-P+로 120초 동안 세척하였다.

[0281] 한 실험에서, pH 7.4에서 FcRn 결합에 대해 기술한 것과 유사한 방식으로 Fc γRIIIa 동역학 실험을 분석하였다. WT, 기준, 리드 단일 및 조합 변이체의 경우, Fc γRIIIa에 대한 결합 친화도를 결정하기 위해 1000 nM에서부터 일련의 3배 연속 희석에서 동역학을 얻었다. 각 농도 및 반복 실험에서의 정상 상태 RU를 결정하고, 항체 농도

의 함수로 플롯을 작성하고, 방정식 2에 제시된 바와 같이 정상 상태 모델로 적합화하였다.

$$RU = \frac{R_{\max} - 오프셋}{[항체] + K_{D,app}} \quad (방정식 2)$$

[0283] 여기서, 오프셋은 0 nM의 항체에서의 기준선 RU이고,  $R_{\max}$ 는 높은 항체 농도에서의 평탄역의 RU이고, [항체]는 항체의 농도이고,  $K_{D,app}$ 은 변이체와 FcγRIIIa 사이의 상호 작용의 겉보기 결합 친화도이다.

[0284] 또 다른 실험에서, 평균 정상 상태 결합 반응을 이용하여 pH 7.4에서 FcRn 결합에 대해 기술한 것과 유사한 방식으로 FcγRIIIa 동역학 실험을 분석하였다. 모든 변이체에 대해, 300 nM의 항체의 정상 상태 RU를 3회 반복하여 결정하고, 평균을 냈다. 각 백본에서 변이체 간 비교를 위해 WT 대비 반응 변화의 배수 변화(반응 배수 변화)를 결정하였다.

#### 등전점 전기영동

[0285] 리드 변이체의 등전점(pI)은 Maurice C(Protein Simple)에서 모세관 전기영동을 사용하여 결정하였다. 각 200 μL의 샘플은 0.35%의 메틸 셀룰로스(Protein Simple), 4%의 파말라이트(pharmalyte) 3 - 10(GE Healthcare), 10 mM의 아르기닌(Protein Simple), 0.2 mg mL<sup>-1</sup>의 항체, 4.05 및 9.99 pI의 마커(Protein Simple)를 함유하였다. 샘플을 1500 V에서 1분 동안 모세관에 로딩한 다음, 3000 V에서 6분 동안 분리 단계를 수행하고, 트립토판 형광을 이용하여 모니터링하였다. 각 변이체에 대한 pI를 Maurice C 소프트웨어를 사용하여 결정하였고, 주요 종에 대한 최대 형광에서 pH로 정의하였다.

#### 균질 가교형성(homogeneous bridging) 류마티스 인자(RF) ELISA

[0286] 항체를 제조사의 설명서에 따라 EZ-링크 술포-NHS-LC-비오틴 및 Mix-n-Stain™ 디곡시게닌 항체 표지화 키트 (Biotium)를 이용하여 비오틴을 부착시키고, 디곡시게닌 표지를 부착시켰다. 각 변이체에 대해 4 μg mL<sup>-1</sup>의 비오틴 부착 및 디곡시게닌 표지된 항체를 함유하는 모액을 제조하고, 300 U/mL의 RF(Abcam)와 1:1 비율로 혼합하였다. 실온에서 20시간 동안 인큐베이션한 후, 100 μL의 각 항체-RF 혼합물을 스트렙타웰 플레이트(Sigma-Aldrich)에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 0.05%의 트윈-20을 함유한 PBS pH 7.4로 3회 세척하고, HRP가 접합된 항-디곡시게닌 2차 항체(Abcam)의 1:2000 희석액 100 μL를 각 웰에 첨가하였다. 실온에서 2시간 인큐베이션한 후, 웰을 세척하고, 실온에서 15분 동안 100 μL의 TMB 기질(Abcam)로 처리하였다. 반응을 100 μL의 중지 용액(Abcam)으로 중지시키고, SpectraMax 플레이트 판독기에서 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항체-RF 혼합물을 함유하지 않는 웰이 블랭크 차감을 제공하였고, 실험을 3 회 반복하였다. P-값은 스튜던트의 t-검정을 이용하여 결정하였다.

#### 생체 내 약동학

[0287] 시노몰구스 원숭이 및 hFcRn 형질전환 마우스(Tg32 주, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에서 약동학 연구를 수행하였다. 원숭이 연구에서 mAb2 백본의 WT, LS, DQ, DW 및 YD 변이체를 3마리의 치료 미경험 수컷 시노몰구스에게 1.5 mL/kg의 용량 부피로 완두정맥 내로 2.5 mg/kg의 단일 정맥 내 용량으로 투여하였다. 투여 후 다음의 8회의 샘플링 시간에 복제 정맥의 정맥 천자에 의해 혈액 샘플(0.5 mL)을 수집하였다: 0.0035, 0.17, 1, 3, 7, 14, 21 및 28일. 수집한 후, 혈액 샘플을 1500 g에서 10분 동안 4°C에서 원심분리하고, -80°C에 보관하였다.

[0288] hFcRn 마우스에서 항체 변이체를 5 mL/kg의 용량 부피로 꼬리 정맥 내로 2.5 mg/kg의 단일 정맥 내 용량으로 투여하였다. 각 시점에서 사전 충전된 헤파린 모세관을 이용하여 복제 정맥에서 20 μL의 혈액을 수집하였다. 수집된 혈액 샘플을 마이크로튜브로 옮기고, 1500 g에서 10분 동안 4°C에서 원심분리하였다. 혈장 샘플을 수집하고, 각 시점에 대해 모으고(6마리의 마우스/샘플), 분석 전에 -80°C에서 보관하였다.

[0289] 모든 생체 내 연구는 Sanofi 기관 동물 관리 정책에 따라 수행하였다. 원숭이와 마우스 연구는 프랑스의 "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche"와 독일의 "Regierungspraesidium Darmstadt"의 승인을 받았다.

[0290] 각 시점의 각 mAb2 변이체의 농도를 상향식 LC-MS/MS 분석에 의해 결정하였다. 혈장 분취액의 침전 후, 대리 펩티드 분석 전에 혈장 펠릿을 대상으로 단백질 변성, 환원, 알킬화, 트립신 소화 및 고체상 추출을 수행하였다. mAb2 변이체를 혈장에 1.00, 2.00, 5.00, 10.0, 20.0, 50.0, 100, 200 및 400 μg mL<sup>-1</sup>로 스파이킹하여 보정 표

준물질을 제조하였다. 물 중 0.1%의 포름산 및 아세토니트릴 중 0.1%의 포름산의 단계적 구배에서 300  $\mu$ L 분<sup>-1</sup>의 유속으로 역상 XBridge BEH C18 컬럼(2.1x150 mm, 3.5  $\mu$ M, 300Å, Waters)을 이용하여 Waters Acuity UPLC 시스템에서 웨티드 분리를 수행하였다. 검출을 위해, Sciex API5500 질량 분석기를 양이온 모드, 700°C의 소스 온도, 5500 V의 이온분무 전압, 40의 커튼 및 분무기 가스, 및 중간의 충돌 가스로 사용하였다. 체류 시간은 20 ms였고, 진입 전위는 각 전이에 대해 10 V였다. mAb2 백분의 2개의 고유한 대리 웨티드에 대한 다중 반응 모니터링 전이를 Analyst 소프트웨어의 MQIII 통합 알고리즘의 피크 영역을 사용하는 표준물질 및 대조군에 대한 농도 결정에 사용하였다. Phoenix 소프트웨어(Certara)를 사용하여 항체 농도의 비 구획 모델로부터 청소율 및 혈청 반감기를 시간의 함수로서 얻었다. 농도의 급격한 감소를 보여주는 모든 시점은 임의의 이론에 구속되지 않고, 추정된 표적 매개 약물 배치(TMDD) 및/또는 항-약물 항체(ADA) 간섭으로 인해, 평균 혈장 농도로부터 제외되었다.

#### [0294] 실시예 2: 조정 배지에서 포화 점 돌연변이의 옥텟 스크리닝

FcRn은 대부분의 Fc 수용체에 공통적인, MHC 부류 I 유사  $\alpha$ -도메인과  $\beta$ 2-마크로글로불린( $\beta$ 2-m) 서브유닛의 이종이량체(도 1의 A)이며, 다른 Fc $\gamma$ R과는 상이한 항체 중쇄의 영역들을 인식한다(예를 들어, 문헌[Oganessian et al. 2014 *J. Biol. Chem.* 289: 7812-7824]; 및 [Shields et al. 2001, 위의 문헌] 참조).

WT 항체보다 느린 FcRn 해리 속도를 갖는 변이체를 확인하기 위해, 바이오층 간섭법(biolayer interferometry, BLI) 기반의 분석을 설계하여 고처리량 방식으로 조정 배지에서 항체 변이체를 스크리닝하였다(도 2a). 이 분석 법은 WT 항체와 비교하여 pH 6.0에서 FcRn에 대한 친화도를 증진(AAA, LS 및 YTE) 또는 감소(H435A, H310A/H435Q)시키는 몇몇 기준 변이체를 사용하여 개발하였다. NiNTA 바이오센서는 his 태그가 부착된 항원을 포획한 다음, pH 7.4에서 각 항체 변이체를 포획하여 조정 배지를 모방하였다(도 2a). 인간 IgG1으로부터 약 25 배 더 느린 해리 속도를 가지며 인간 FcRn(hFcRn)보다 옥텟 연구에 더 적합한, pH 6.0에서 랫트 FcRn(rFcRn)에 대한 결합 동역학을 6개 변이체 각각에 대해 측정하였다(도 2b). H435A(도 2b, 단일 점이 개재된 긴 대시) 및 H310A/H435Q(도 2b, 두 개의 점이 개재된 긴 대시) 변이체는 FcRn 결합 동역학을 거의 또는 전혀 보여주지 않는다(또한, 예를 들어, [Shields et al. 2001, 위의 문헌]; [Medesan et al. 1997, 위의 문헌]; 및 [Raghavan et al. 1995, 위의 문헌] 참조). AAA(도 2b, 짧은 대시), LS(도 2b, 단일 점이 개재된 짧은 대시) 및 YTE(도 2b, 긴 대시) 변이체는 모두 FcRn 해리 속도가 2 내지 7.3배 감소하여 WT(도 2b, 실선)와 비교하여 느린 해리 동역학을 나타내었다. 이는 옥텟 스크리닝이 교란된 rFcRn 해리 동역학을 갖는 변이체를 구별하는 데 적합하다는 점을 증명하였다.

IgG1 항체인 mAb1은 감소된 FcRn 해리 속도를 갖는 돌연변이체를 스크리닝하기 위한 포화 돌연변이 유발 라이브러리를 생성하는 모델 시스템으로 작용하였다. FcRn 계면에 대한 근접성 또는 직접적인 기여도를 기초로 mAb1의 Fc 영역의 11개의 위치를 선택하였다(도 1의 A 및 B)(예를 들어, [Oganessian et al. 2014, 위의 문헌]; 및 [Shields et al. 2001, 위의 문헌] 참조). 이러한 위치에서 모든 점 돌연변이를 부위 특이적 돌연변이 유발을 이용하여 구축하였으며, 발현을 위해 Expi293 세포에서 형질감염시켰다. 위에서 기술된 바와 같이 포화 라이브러리 돌연변이체에 대해 조정 배지 스크리닝을 수행하였다. 변이체의 서브세트에 대한 정규화된 FcRn 결합 옥텟 센서그램을 도 2c(긴 대시)에 야생형(도 2c, 긁고 긴 대시) 및 모의-음성 대조군(도 2c, 점선)과 함께 도시하였다. 모의는 관찰 가능한 FcRn 결합의 결여를 보여주었다. 동역학 프로파일에서 신호 변화가 거의 또는 전혀 관찰되지 않았기 때문에(도 2c, 점선(모의) 아래에 위치한 긴 대시), 몇몇 돌연변이체는 rFcRn의 결합을 명확하게 교란시켰다. 개선된 FcRn 해리 속도를 갖는 변이체에 대한 컷오프는 WT 항체의 평균보다 낮은 3개의 표준 편차로 정의되었다. 도 2c에 도시된 돌연변이의 하위세트에서, 2개(도 2c, 실선)는 야생형 항체(도 2c, 긁고 긴 대시)에 비해 현저히 감소된 해리 속도를 가졌지만, 나머지 변이체는 비슷하거나(도 2c, 단일 점이 개재된 짧은 대시) 더 빠른(도 2c, 점선(모의) 위의 긴 대시) rFcRn 해리 속도를 나타냈다.

모든 단일 점 돌연변이에 대한 rFcRn 해리 속도를 위치 및 돌연변이에 의해 도 2d 및 도 14에 도시하였다. 도 14에서, 데이터를 야생형과 비교한 rFcRn 해리 속도의 배수 변화에 따라 네 개의 카테고리 중 하나로 분류하였으며, 야생형 좋은 검은색 사각형으로 표시하였다.

도 14에서, 포화 라이브러리의 11개 위치에서 가능한 모든 치환에 대한 rFcRn 해리 속도의 배수 변화를 WT 항체의 평균으로 정규화시키고, 색깔로 구분하였다. 모든 돌연변이체는 다음 네 개의 카테고리 중 하나에 속한다: 결합이 거의 또는 전혀 없음(진회색), 더 빠른 rFcRn 해리 속도(회색), WT 유사 rFcRn 해리 속도(수평선) 및 더 느린 rFcRn 해리 속도(격자무늬). 다중 변이체는 WT 항체(격자무늬)보다 느린 rFcRn 해리 속도를 보유하였다.

[0300]

도 14에서 진회색으로 채색된 돌연변이체는 모의(도 2c, 점선)와 비슷한 방식으로 rFcRn에 대해 거의 또는 전혀 결합하지 않았으며, M252, I253 및 S254 루프로 국소화되었다. I253에서 유일한 돌연변이는 메티오닌과 발린이었고, 둘 다 rFcRn 해리 속도를 현저히 증가시켜, FcRn 상호 작용에 대한 I253의 중요성을 더욱 뒷받침하였다. 또 다른 120개의 변이체(도 2d 및 도 14, 연회색의 직사각형)는 rFcRn과의 상호 작용을 불안정화시켰는데, 약 50%는 각각 C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3 도메인에 위치하였다. 25개의 돌연변이체는 WT와 유사한 해리 속도(도 2d 및 도 14, 흰색 직사각형)를 나타내며, 11개 위치 중 8개가 적어도 하나의 WT 유사 돌연변이(도 14, 흰색 직사각형)를 보유한다. 다음의 돌연변이는 야생형에 비해 현저히 감소된 rFcRn 해리 속도를 나타내었다(도 2d 및 도 14, 검은색 직사각형): M252Y, T256D/E, K288D/N, T307A/E/F/M/Q/W, E380C, N434F/P/Y 및 Y436H/N/W. M252Y, N434F 및 N434Y 돌연변이는 WT 항체보다 2배가 넘는 느린 해리 속도를 보유하였다(도 2d). 추가의 시험관 내 FcRn 동역학 특성화를 위하여 이들 돌연변이를 발현시키고, 단백질 A 크로마토그래피로 정제하였다.

[0301]

### 실시예 3: pH 6.0에서의 비아코어 FcRn 결합 동역학

[0302]

AAA, LS 및 YTE 변이체는 pH 6.0에서 인간 및 랫트 FcRn에 대해 비아코어를 이용한 FcRn 결합 동역학 측정에서 양성 대조군으로 작용하였다. FcRn에 대한 농도 의존적 결합은 야생형, 기준(도 3) 및 리드(도 4a 및 도 4b)를 비롯한 모든 변이체에 대해 관찰되었으며, 인간 및 랫트 FcRn의 단일 주사의 결합 프로파일을 각각 도 5a 및 도 5b에 도시하였다. 야생형 항체는 인간 및 랫트 FcRn에 대해 각각 2380 ± 470 nM 및 207 ± 43 nM의 친화도의 결합 친화도를 나타내었다(표 1).

[0303]

[표 1]

[0304]

mAb1에 대한 정제된 리드 항체의 시험관 내 특성화 매개변수.

돌연변이체	옥텟 pH 6.0 rFcRn 해리 속도	FcRn 친화도 컬럼	DSF T <sub>m</sub> (°C)	비아코어 pH 6.0					비아코어 pH 7.4		
				hFcRn			rFcRn		hFcRn	rFcRn	
				결합 속도	해리 속도	K <sub>D,app</sub>	결합 속도	해리 속도	K <sub>D,app</sub>	정상 상태 RU	정상 상태 RU
E380C	2.08 ± 0.18	7.18 ± 0.11	64.7 ± 0.5	1.73 ± 0.39	4.57 ± 1.50	>10,000 ± 0.25	1.71 ± 1.06	6310 ± 880	5.7 ± 0.1	27.7 ± 4.0	
K288D	3.79 ± 0.06	7.33 ± 0.10	65.8 ± 0.1	3.31 ± 1.10	5.13 ± 0.75	>10,000 ± 3.01	6.61 ± 0.60	8.43 ± 63	149 ± 0.2	3.8 ± 0.2	21.9 ± 3.1
K288N	4.11 ± 0.08	7.39 ± 0.02	66.7 ± 0.3	4.12 ± 1.42	4.54 ± 0.34	>10,000 ± 2.80	6.42 ± 0.73	10.7 ± 0.9	190 ± 0.2	3.9 ± 0.2	20.4 ± 2.7
M252Y	0.95 ± 0.03	7.88 ± 0.03	64.4 ± 0.2	5.50 ± 1.83	1.43 ± 0.23	3100 ± 1500	10.6 ± 3.1	2.64 ± 0.62	25 ± 3	8.6 ± 0.9	57.7 ± 10.7
N434F	1.18 ± 0.05	8.30 ± 0.05	67.8 ± 0.2	35.4 ± 15.3	0.50 ± 0.08	165 ± 73	12.6 ± 1.4	3.36 ± 1.79	26 ± 13	20.1 ± 3.4	54.9 ± 9.1
N434P	3.80 ± 0.08	7.56 ± 0.02	63.6 ± 0.5	2.42 ± 0.54	3.35 ± 1.10	>10,000 ± 0.07	3.44 ± 0.18	6.67 ± 0.18	194 ± 9	3.5 ± 0.4	4.3 ± 0.6
N434Y	1.33 ± 0.04	8.46 ± 0.02	67.3 ± 0.5	35.9 ± 9.6	0.52 ± 0.10	137 ± 33	14.5 ± 1.82	3.46 ± 1.86	23 ± 12	22.6 ± 4.2	47.0 ± 6.3
T256D	2.24 ± 0.03	7.82 ± 0.07	64.7 ± 0.2	4.41 ± 1.72	2.51 ± 0.65	6700 ± 3540	6.09 ± 1.84	4.84 ± 0.08	86 ± 27	5.8 ± 0.6	30.4 ± 3.4
T256E	3.26 ± 0.04	7.63 ± 0.06	66.3 ± 0.6	3.90 ± 2.37	3.38 ± 0.28	>10,000 ± 1.59	6.29 ± 0.97	6.94 ± 0.97	113 ± 15	4.8 ± 0.5	23.0 ± 2.7
T307A	2.98 ± 0.06	7.61 ± 0.03	68.0 ± 0.4	2.85 ± 0.72	2.91 ± 0.46	>10,000 ± 2.72	6.09 ± 0.67	7.08 ± 0.67	132 ± 48	5.2 ± 0.6	23.1 ± 2.8
T307E	3.29 ± 0.08	7.58 ± 0.03	70.2 ± 0.5	4.37 ± 1.63	2.98 ± 0.37	8130 ± 5070	5.55 ± 2.82	6.03 ± 0.20	141 ± 65	5.7 ± 0.7	21.5 ± 2.6
T307F	2.80 ± 0.07	7.61 ± 0.03	70.2 ± 0.3	2.70 ± 0.83	2.92 ± 0.13	>10,000 ± 2.83	5.69 ± 0.14	6.15 ± 0.14	131 ± 63	4.9 ± 0.7	21.9 ± 2.7

[0305]

T307M	3.47 ± 0.13	7.40 ± 0.08	70.0 ± 0.4	4.08 ± 0.83	3.87 ± 0.28	>10,000	6.81 ± 2.34	17.1 ± 4.0	279 ± 140	4.4 ± 0.7	15.3 ± 1.9
T307Q	1.84 ± 0.05	7.86 ± 0.06	70.3 ± 0.6	3.96 ± 1.10	2.15 ± 0.22	5720 ± 1530	7.35 ± 2.15	4.04 ± 0.28	58 ± 16	6.4 ± 0.8	24.3 ± 3.0
T307W	2.42 ± 0.08	7.75 ± 0.07	63.0 ± 0.5	3.33 ± 0.83	2.77 ± 0.29	8740 ± 2440	7.11 ± 2.29	7.37 ± 0.41	111 ± 32	5.8 ± 0.7	19.2 ± 3.3
Y436H	3.22 ± 0.08	7.33 ± 0.05	68.7 ± 0.3	2.59 ± 0.78	6.06 ± 1.00	>10,000	5.06 ± 0.13	7.30 ± 0.88	131 ± 9	3.6 ± 0.5	16.3 ± 1.8
Y436N	5.25 ± 0.22	7.22 ± 0.05	65.8 ± 0.5	4.60 ± 2.36	7.37 ± 3.34	>10,000	10.1 ± 4.9	20.3 ± 3.1	233 ± 86	3.6 ± 0.4	17.4 ± 2.0
Y436W	5.18 ± 0.18	7.39 ± 0.03	68.6 ± 0.7	2.84 ± 1.90	4.62 ± 0.92	>10,000	3.44 ± 2.18	23.7 ± 7.7	1140 ± 950	3.7 ± 0.4	10.3 ± 1.2
WT	5.01 ± 0.45	7.37 ± 0.05	69.0 ± 0.2	16.2 ± 2.9	3.86 ± 0.38	2380 ± 470	7.26 ± 1.01	15.2 ± 0.23	207 ± 43	4.3 ± 1.0	12.2 ± 0.5
AAA	3.77 ± 1.03	7.94 ± 0.06	61.3 ± 0.6	8.37 ± 1.82	1.44 ± 0.04	1780 ± 380	15.7 ± 3.3	11.7 ± 1.1	77 ± 18	13.9 ± 3.1	23.6 ± 4.9
LS	3.38 ± 0.23	8.29 ± 0.03	68.5 ± 0.3	19.3 ± 3.5	0.52 ± 0.03	272 ± 40	9.08 ± 1.58	6.58 ± 0.39	74 ± 9	18.3 ± 4.6	24.8 ± 4.8
YTE	0.66 ± 0.17	8.14 ± 0.03	61.2 ± 0.3	14.3 ± 4.4	0.45 ± 0.07	342 ± 117	6.52 ± 0.46	1.21 ± 0.21	18 ± 2	13.2 ± 3.5	53.9 ± 1.2

[0306] 표 1에 제시된 모든 데이터는 각 열의 상단에 표시된 실험 기술을 이용하여 얻었다.

[0307] 정제된 단백질을 이용하는 옥텟에 의한 rFcRn 해리 속도를 조정 배지 내 스크리닝에서 얻은 동역학 상수와 비교하여 측정하였다. 용리 pH를 3회 반복하여( $n = 3$ ) FcRn 친화도 크로마토그래피에 의해 결정하였고, DSF는 열 안정성을 3회 반복하여( $n = 3$ ) 조사하였다. 인간 및 랫트 FcRn에 대한 FcRn 결합 동역학을 일련의 항체 농도를 이용한 비아코어로부터 2회 반복하여( $n = 2$ ) 수득하였고, 독립적으로 적합화하였다. pH 7.4에서 인간 및 랫트 FcRn에 대한 각 변이체의 정상 상태 결합 반응(RU)을 비아코어를 이용하여 3회 반복하여( $n = 3$ ) 1000 nM의 항체로 측정하였다. 각 측정의 단위는 다음과 같다: 옥텟 pH 6.0 rFcRn 해리 속도( $\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ); 용리 pH(단위 없음); DSF  $T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ ); 비아코어 pH 6.0 hFcRn 결합 속도( $\times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), 해리 속도( $\times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) 및  $K_{D,app}$ ( $\times 10^9 \text{ M}$ ); 비아코어 pH 6.0 rFcRn 결합 속도( $\times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), 해리 속도( $\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) 및  $K_{D,app}$ ( $\times 10^9 \text{ M}$ ); 및 비아코어 pH 7.4 정상 상태 결합 반응(RU).

[0308] 도 5b에서, AAA(점선), LS(2개의 점이 개재된 대시) 및 YTE(단일 점이 개재된 대시) 변이체는 WT와 비교하여 1.6 내지 10.4배 증진된 결합 친화도를 나타냈다. 가장 긴밀한 FcRn 친화도를 나타내는 기준 변이체의 정체성은 종 특이 적이었는데, LS는 hFcRn에 대해 가장 긴밀한 친화도를 나타낸 반면, rFcRn은 YTE에 대해 더 긴밀한 친화도를 나타냈기 때문이다(표 2A).

[0309] [표 2A]

[0311] mAb1에 대한 정제된 이중 조합 항체의 시험관 내 특성화 매개변수.

변이체	FcRn 친화도 컬럼	DSF T <sub>m</sub> (°C)	비아코어 pH 6.0						비아코어 pH 7.4		
			hFcRn			rFcRn			hFcRn	rFcRn	정상 상태 RU
			결합 속도	해리 속도	K <sub>D,app</sub>	결합 속도	해리 속도	K <sub>D,app</sub>			
<u>MDQN</u>	7.92 ± 0.06	67.9 ± 0.4	3.76 ± 0.38	8.72 ± 0.10	232 ± 24	1.33 ± 0.22	1.27 ± 0.07	9.54 ± 1.66	10.7 ± 1.0	39.1 ± 4.5	
<u>MDTF</u>	8.41 ± 0.07	62.3 ± 0.2	9.68 ± 0.64	2.90 ± 0.04	29.9 ± 2.0	2.18 ± 0.20	0.39 ± 0.01	1.78 ± 0.17	29.2 ± 4.0	63.0 ± 6.0	
<u>MDTY</u>	8.45 ± 0.04	61.5 ± 0.2	18.3 ± 0.6	2.85 ± 0.01	15.6 ± 0.5	4.13 ± 0.15	0.25 ± 0.35	0.60 ± 0.85	37.1 ± 5.0	71.6 ± 6.6	
<u>MDWN</u>	7.92 ± 0.04	57.8 ± 0.4	5.29 ± 0.14	8.92 ± 0.32	169 ± 8	1.57 ± 0.12	1.29 ± 0.01	8.24 ± 0.85	12.2 ± 1.3	42.1 ± 4.7	
<u>MEQN</u>	7.84 ± 0.06	68.0 ± 0.5	2.87 ± 0.01	14.3 ± 0.2	499 ± 6	1.46 ± 0.25	1.56 ± 0.94	10.7 ± 6.7	5.8 ± 0.6	23.4 ± 3.1	
<u>METE</u>	8.23 ± 0.03	64.1 ± 0.7	5.36 ± 1.41	4.19 ± 0.03	78.2 ± 20.5	1.08 ± 0.11	0.81 ± 0.07	7.53 ± 1.03	23.3 ± 3.2	59.0 ± 5.6	
<u>METY</u>	8.38 ± 0.04	63.5 ± 0.6	6.28 ± 1.62	3.93 ± 0.02	62.6 ± 16.2	1.27 ± 0.11	0.98 ± 0.07	7.71 ± 0.84	26.8 ± 3.7	62.2 ± 6.3	
<u>MEWN</u>	7.78 ± 0.04	58.2 ± 0.4	4.32 ± 0.36	14.0 ± 0.1	323 ± 27	1.81 ± 0.01	1.92 ± 0.05	10.6 ± 0.26	7.7 ± 0.9	33.0 ± 4.2	
<u>MTQE</u>	8.56 ± 0.14	69.3 ± 0.2	5.74 ± 1.05	2.46 ± 0.05	42.9 ± 7.9	1.04 ± 0.07	0.40 ± 0.01	3.89 ± 0.26	34.2 ± 4.6	62.5 ± 7.6	
<u>MTQY</u>	8.68 ± 0.15	69.2 ± 0.2	6.22 ± 1.38	2.02 ± 0.06	32.4 ± 7.3	1.16 ± 0.06	0.48 ± 0.01	4.11 ± 0.23	38.4 ± 5.2	63.0 ± 7.7	
<u>MTWE</u>	8.61 ± 0.06	60.9 ± 0.2	7.87 ± 0.31	3.01 ± 0.08	38.2 ± 1.8	2.11 ± 0.06	0.57 ± 0.01	2.70 ± 0.08	30.5 ± 4.2	65.1 ± 6.4	
<u>MTWY</u>	8.62 ± 0.14	62.1 ± 0.5	14.8 ± 0.8	3.17 ± 0.03	21.5 ± 1.2	4.80 ± 0.07	0.30 ± 0.04	0.62 ± 0.08	37.2 ± 4.9	69.6 ± 7.0	
<u>YDTN</u>	8.29 ± 0.06	59.6 ± 0.9	6.33 ± 1.23	5.93 ± 0.20	93.6 ± 18.4	2.85 ± 0.11	1.67 ± 0.16	5.86 ± 0.61	9.7 ± 1.8	56.0 ± 5.6	
<u>YETN</u>	7.83 ± 0.06	60.7 ± 0.7	5.92 ± 0.05	7.57 ± 0.30	128 ± 5	3.24 ± 0.07	2.73 ± 0.02	8.43 ± 0.20	9.8 ± 1.2	55.1 ± 6.1	
<u>YTQN</u>	7.87 ± 0.06	63.1 ± 0.1	3.45 ± 0.29	9.60 ± 0.01	278 ± 23	2.55 ± 0.24	1.05 ± 0.63	4.11 ± 2.51	10.6 ± 2.5	49.2 ± 5.6	
<u>YTTE</u>	8.56 ± 0.09	62.2 ± 0.1	12.7 ± 0.7	2.30 ± 0.01	18.0 ± 1.0	4.03 ± 0.06	0.12 ± 0.02	0.29 ± 0.04	43.8 ± 5.8	79.3 ± 9.9	
<u>YTYY</u>	8.95 ± 0.02	62.0 ± 0.1	20.6 ± 0.6	1.71 ± 0.02	8.32 ± 0.2	5.40 ± 0.07	0.14 ± 0.04	0.26 ± 0.08	54.1 ± 7.1	67.9 ± 7.9	
<u>YTWN</u>	8.14 ± 0.02	59.3 ± 0.2	4.83 ± 0.20	5.70 ± 0.03	118 ± 5	2.08 ± 0.07	1.09 ± 0.03	5.21 ± 0.22	15.9 ± 1.7	66.1 ± 7.1	

[0312]

[0313] 인간 및 랫트 FcRn 둘 다에 대한 대부분의 리드 변이체(도 5a 및 도 5b, 다양한 음영의 실선)는 WT 또는 기준 변이체보다 현저히 느린 결합 속도를 나타냈다(>2배)(표 1). N434F 및 N434Y 돌연변이는 두 종의 FcRn 모두에 대해 증진된 속도를 나타낸 유일한 변이체였다. 어떤 이론에도 구속되지 않고, hFcRn과의 더 느린 결합 동역학의 결과로서, 리드 변이체의 겉보기 결합 친화도는 rFcRn과 달리 일반적으로 WT보다 약했다(도 5c 및 도 5d, 표 1). rFcRn에 대한 친화도는 YTE보다 약했다(도 5d, 왼쪽 아래를 향한 사선, 표 2A). 어떤 이론에도 구속되지 않고, 이러한 결과는 단일 돌연변이가 LS 및 YTE 변이체를 능가하도록 친화도를 증진시키기에 충분하지 않음을 나타냈다. (hFcRn에 대한 변이체의 약한 결합 친화도로 인한) FcRn 해리 속도의 순위를 매기자, 인간 및 랫트 FcRn 둘 다에 대해 감소된 해리 속도를 갖는 서브세트가 밝혀졌다: M252Y, N434F/P/Y, T256D/E 및 T307A/E/F/Q/W(표 2A). 기준 변이체를 능가하도록 Fc 영역의 FcRn 결합 능력을 더욱 개선하기 위한 조합에서 이러한 변이체는 추가적인 관심의 대상이다.

[0314] 리드 변이체에 대한 시험관 내 특성화 매개변수를 표 2B에 제시하였다.

[0315]

[표 2B]

[0316]

리드 변이체의 시험관 내 특성화 매개변수

mAb1	FcRn 친화도 컬럼	DSF	비아코어	비아코어 pH 6.0			비아코어 pH 7.4		
			FcγRIIIa V158	hFcRn		rFcRn	hFcRn	rFcRn	
변이체	pH	T <sub>m</sub> (°C)	친화도 배수 변화	결합 속도	해리 속도	K <sub>D,app</sub>	K <sub>D,app</sub>	정상 상태 RU	정상 상태 RU
WT	7.37	69.0 ± 0.2	1.00	16.2 ± 2.9	3.9 ± 0.4	2380 ± 470	207 ± 43	4.2 ± 0.9	13.0 ± 3.2
LS	8.29	68.5 ± 0.3	1.04 ± 0.04	1.9 ± 0.4	5.0 ± 0.1	272 ± 40	74 ± 9	18.3 ± 4.6	24.8 ± 4.8
YTE	8.14	61.2 ± 0.3	0.52 ± 0.03	1.4 ± 0.4	4.7 ± 0.1	342 ± 117	18 ± 2	13.2 ± 3.5	53.9 ± 1.2
M252Y	7.88	64.4 ± 0.2	0.46 ± 0.03	5.5 ± 1.8	1.4 ± 0.2	>3,000	25 ± 3	8.6 ± 1.0	50.5 ± 5.6
N434F	8.30	67.8 ± 0.2	1.16 ± 0.08	35 ± 15	0.5 ± 0.1	165 ± 73	26 ± 13	22.2 ± 2.6	61.5 ± 6.5
N434Y	8.46	67.3 ± 0.5	1.41 ± 0.06	36 ± 10	0.5 ± 0.1	137 ± 33	23 ± 12	25.5 ± 2.9	66.0 ± 7.1
T256D	7.82	64.7 ± 0.2	0.92 ± 0.04	4.4 ± 1.7	2.5 ± 0.7	>3,000	86 ± 27	5.8 ± 0.5	23.2 ± 2.8
T256E	7.63	66.3 ± 0.6	0.89 ± 0.04	3.9 ± 2.4	3.4 ± 0.2	>3,000	113 ± 15	4.5 ± 0.4	17.0 ± 2.1
T307Q	7.86	70.3 ± 0.6	1.00 ± 0.04	4.0 ± 1.1	2.2 ± 0.2	>3,000	58 ± 16	6.6 ± 0.7	31.3 ± 3.7
T307W	7.75	63.0 ± 0.5	0.97 ± 0.04	3.3 ± 0.8	2.8 ± 0.3	>3,000	111 ± 32	5.6 ± 0.7	21.9 ± 2.8
DQ	7.92	67.9 ± 0.4	0.73 ± 0.03	3.8 ± 0.4	8.7 ± 0.1	232 ± 24	9.5 ± 1.7	10.7 ± 1.0	39.1 ± 4.5
DW	7.92	57.8 ± 0.4	0.89 ± 0.04	5.3 ± 0.1	8.9 ± 0.3	169 ± 8	8.2 ± 0.9	12.2 ± 1.3	42.1 ± 4.7
YD	8.29	59.6 ± 0.9	0.48 ± 0.02	6.3 ± 1.2	5.9 ± 0.20	94 ± 18	5.9 ± 0.6	9.7 ± 1.8	56.0 ± 5.6

[0317]

[0318]

표 2B에서, 모든 데이터는 각 열의 상단의 실험 기술을 이용하여 얻었다. FcRn 친화도 크로마토그래피, DSF 및 FcγRIIIa 결합을 3회 반복하여( $n = 3$ ) 수행하였다. 인간 및 랫트 FcRn에 대한 FcRn 결합 동역학을 4회 반복하여 수득하였고, 독립적으로 적합화하였다. 단위: DSF T<sub>m</sub>(°C); FcγRIIIa 결합(WT에 대한 배수 변화), 비아코어 pH 6.0 hFcRn 결합 속도( $\times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), 해리 속도( $\times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) 및 K<sub>D,app</sub>( $\times 10^{-9} \text{ M}$ ); 비아코어 pH 6.0 rFcRn K<sub>D,app</sub>( $\times 10^{-9} \text{ M}$ ); 비아코어 pH 7.4 hFcRn 및 rFcRn 정상 상태 RU(RU).

#### 실시예 4: 조합 변이체는 FcRn 결합 해리 속도를 더 감소시킨다

[0320]

다중 리드 돌연변이는 T307 및 N434와 같은 단일 위치에 위치했으며(도 14, 검은색 직사각형), 여기서 각각 6개 및 3개의 돌연변이가 더 느린 FcRn 해리 동역학을 나타내는 것으로 확인되었다. 이를 위치에서 hFcRn에 대해 가장 느린 FcRn 해리 속도를 갖는 돌연변이만을 조합 변이체의 생성에 사용하였다. 이 경우, T307Q, T307W, N434F 및 N434Y를 M252Y, T256D 및 T256E와 혼합하여, 혼합 프라이머 PCR 및 부위 특이적 돌연변이 유발을 이용하여 이중, 삼중 및 사중 변이체를 얻었다. 전체적으로, 조합 라이브러리는 7개의 리드 싱글, 18개의 이중, 20개의 삼중, 8개의 사중 변이체 및 WT 항체를 포함하여, 54개의 변이체로 구성되었다. 이들 변이체의 명명법은 다음과 같다: 야생형 배경은 M252, T256, T307 및 N434를 함유하며, MTTN으로 다시 표지하였다. 따라서, 삼중 변이체 YTQY는 위치 256에서 WT 트레오닌을 유지하면서, M252Y, T307Q 및 N434Y 돌연변이를 함유한다.

[0321]

단일 돌연변이와 마찬가지로, 비아코어를 이용한 pH 6.0에서의 FcRn 결합 동역학을 이용하여 어떤 조합 변이체가 친화도를 개선하였는지를 결정하였다. 각각의 종의 FcRn에 대한 가장 긴밀한 친화도를 갖는 WT(점선) 및 기준 변이체(hFcRn: LS (두 개의 점이 개재된 긴 대시); rFcRn: YTE (실선))와 비교한, 각각의 단일(두 개의 점이 개재된 긴 대시), 이중(단일 점이 개재된 긴 대시), 삼중(긴 대시) 및 사중(짧은 대시)의 대표적인 FcRn 결합 동역학 자취를 도 6a 및 도 6b에 도시하였다. hFcRn 결합 및 해리 속도(도 6c)는 2개의 단일, 15개의 이중, 18개의 삼중 및 8개의 사중 변이체가 LS 변이체보다 증진된 결합 친화도를 나타냈음을 보여주었다(도 6c, 점선). 마찬가지로, 하나의 삼중 변이체를 제외한 모든 조합은 YTE보다 rFcRn에 대해 더 긴밀한 친화도를 나타냈다(도 6d, 왼쪽 아래를 향한 사선). hFcRn의 경우, 추가의 FcRn 증진 돌연변이는 결합 친화도를 더욱 증가시켰다(도 6c). hFcRn에 대한 가장 긴밀한 친화도를 갖는 5개의 조합은 모두 사중 변이체였는데(도 6c, 체크무늬), 결합 친화도가 야생형보다 약 500배 더 컸다. 비슷한 현상은 rFcRn에서는 발생하지 않았는데(도 6d), 가장 높은 친화도를 갖는 변이체가 이중 변이체였기 때문이다(도 6d, 수평선). 삼중(도 6d, 수직선) 및 사중(도 6d, 체크무늬)

변이체는 전형적으로 해리 속도의 약간의 감소만을 보여주었지만(2배 미만), 또한 감소된 결합 속도를 나타내었다(도 6d). 어떠한 이론에도 구속되지 않고, 이러한 결과는 hFcRn이 아닌 rFcRn으로 달성된 FcRn 결합 친화도(약 0.5 nM)와 관련하여, 하한이 존재할 수 있음을 시사한다(도 6b). 전체적으로, 40개가 넘는 조합 변이체가 기준 변이체보다 더 긴밀한 친화도를 나타냈으며, 생체 내 연구에 유리한 특성을 가진 조합을 선택하기 위하여 추가 특성화가 필요하다.

#### [0322] 실시예 5: 조합 변이체는 생리적 pH에서 상당한 결합을 유지한다

pH 6.0에서 현저히 개선된 FcRn 친화도의 결과로서, pH 7.4에서 FcRn 친화도 크로마토그래피 및 비아코어 정상 상태 측정을 이용하여 pH 의존성에 대한 영향을 조사하였다. FcRn 친화도 크로마토그래피는 선형 pH 구배를 사용하여 돌연변이에 의한 pH 의존성의 교란을 직접 측정한다. 약한 FcRn 결합을 나타내는 변이체인 H435A 및 H310A/H435Q는 pH와 관계없이 컬럼에 결합하지 않았다(도 8a). WT는 생리적 pH 근처(pH 7.37 ± 0.05)에서 용리된 반면, AAA, LS 및 YTE는 더 높은 pH를 필요로 했다(표 2B). 모든 조합 변이체와 7개의 리드 단일 변이체는 WT보다 친화도 컬럼으로부터 용리되기 위해 더 높은 pH를 필요로 했다(도 8a 및 도 8c). N434F/Y 변이체는 LS보다 더 높은 pH에서 용리되었고(표 2B), 이는 과학적 이론에 구속되고자 함이 없이, 이를 변이체가 단독으로 및 조합하여 pH 의존성을 교란시켰음을 나타낸다. 대표적인 크로마토그램은 돌연변이 수에 따라 더 높은 용리 pH로의 명확한 이동을 보여주었다(도 9a 및 도 9b). 용리 pH와 hFcRn 해리 속도(도 9c) 사이의 강한 상관관계( $R^2 = 0.94$ )는 pH 6.0에서 더 느린 FcRn 해리 속도가 FcRn 변이체에 대한 증가된 용리 pH에 직접적으로 기여했음을 나타낸다.

[0324] FcRn 결합 동역학 실험을 생리적 조건 하에서 잔류 결합 활성을 측정하기 위해 비아코어를 사용하여 pH 7.4에서 수행하였다. 일부 변이체는 신뢰할 수 없는 동역학을 나타내었고, 이 pH에서 결합을 거의 또는 전혀 나타내지 않았기 때문에, 정상 상태 RU를 잔류 FcRn 결합 친화도의 척도로 사용하였다. 단일(두 개의 점이 개재된 긴 대시), 이중(단일 점이 개재된 긴 대시), 삼중(긴 대시) 및 사중(짧은 대시) 변이체의 대표적인 동역학 자취를 LS(도 7a, 실선) 및 YTE(도 7b, 실선)와 비교하여 도 7a 및 도 7b에 도시하였다. 이를 2개의 변이체는 pH 7.4에서 각각 인간 및 랫트 FcRn에 대한 가장 큰 잔류 결합을 나타냈다. N434F/Y 돌연변이를 제외하고, 대다수의 리드 단일 변이체는 WT(4.3 ± 1.0 RU)와 비교하여 약간 상승된 FcRn 결합을 나타냈지만, AAA(13.1 ± 1.7 RU), LS(18.5 ± 2.6 RU) 및 YTE(13.1 ± 1.6 RU)보다 낮았다(표 2A 및 2B). 조합 변이체는 또한 pH 7.4(도 7a 및 도 7b)에서 두 종의 FcRn에 대해 N434F/Y보다 훨씬 더 큰 정도로 상당한 잔류 결합을 보유하였다. 어떠한 이론에도 구속되지 않고, 생체 내 연구에 이상적인 후보는 낮은 pH에서 증가된 FcRn 결합을 갖지만, WT와 비슷한 방식으로, 상승된 pH에서 낮은 수준의 결합을 유지하는 변이체(예컨대, AAA, LS 및 YTE 변이체)이다. 도 7c 및 도 7d에 도시된 플롯에서, 이들 조합은 각각 인간 및 랫트 FcRn에 대해 각각의 pH에서 LS 및 YTE 변이체의 친화도로 지정된 원쪽 하단의 사분면을 차지할 것이다.

#### [0325] 실시예 6: FcRn 친화도 크로마토그래피

[0326] 조합 변이체는 pH 6.0에서의 결합 친화도와 pH 7.4에서의 정상 상태 RU 사이에 중간 정도의 양의 상관관계( $hFcRn: R^2 = 0.69$ ,  $rFcRn: R^2 = 0.71$ )를 나타냈다(도 7c 및 도 7d). 어떠한 이론에도 구속되지 않고, 이러한 결과는 pH 6.0에서 더 높은 친화도가 전형적으로 pH 7.4에서 더 큰 잔류 FcRn 결합으로 해석된다는 점을 나타낸다. 이러한 변이체는 혈류에서 FcRn에 결합된 채로 남아 있을 수 있으며, 높은 FcRn 친화도의 abdeg 돌연변이와 유사하게 짧은 혈청 반감기를 가질 수 있고/있거나 제거를 촉진할 수 있다(예를 들어, [Swiercz et al. 2014, 위의 문헌]; 및 [Vaccaro et al. 2005, 위의 문헌] 참조). 항체-FcRn 상호 작용은 pH 의존적이며, 낮은 pH(<pH 6.5)에서만 발생하기 때문에, 포화 돌연변이는 소수성 또는 전하 유래 기여를 통한 상호 작용을 강화할 수 있으며, 이는 결정적인 히스티딘 잔기의 탈양성자화를 교란시킬 수 있고(도 1의 B, 표시된 바와 같음), 생리적 pH에서 이러한 상호 작용을 약화시킬 수 있다.

[0327] FcRn 친화도 크로마토그래피는 선형 pH 구배를 사용하여 FcRn 상호 작용 pH 의존성의 교란을 직접 측정한다(예를 들어, [Schlothauer et al. 2013, 위의 문헌] 참조). AAA, LS, YTE, H435A 및 H310A/H435Q 변이체를 이용한 FcRn 친화도 크로마토그래피는 H435A(도 8a, 연회색의 실선) 및 H310A/H435Q(도 8a, AQ, 진회색의 실선)가 pH 5.5에서도 FcRn에 결합하지 않고, 통과액으로 용리됨을 보여주었다. 야생형 항체는 생리적 pH 근처(pH 7.37 ± 0.05)에서 용리된 반면, 옥텟(도 2) 및 비아코어(도 3)에 의해 야생형보다 더 느린 해리 속도 및 더 긴밀한 FcRn 결합 친화도를 갖는 AAA, LS 및 YTE는 컬럼으로부터 해리되기 위하여 상당히 더 높은 pH를 필요로 하였다(AAA: 7.94 ± 0.06; LS: 8.29 ± 0.03; YTE: 8.14 ± 0.03). 용리 프로파일은 조합 라이브러리의 모든 변이체가 야생형보다 친화도 컬럼으로부터 용리되기 위해 더 높은 pH를 필요로 한다는 점을 보여주었다. 단일(두 개의

점이 개재된 긴 대시), 이중(단일 점이 개재된 긴 대시), 삼중(긴 대시) 및 사중(짧은 대시) 변이체에 대한 평균 용리 pH에서 대표적인 크로마토그램을 도 9a에 도시하였다. 7개의 리드 단일 변이체는 WT와 비교하여 컬럼으로부터 해리되기 위해 더 높은 pH를 필요로 한 반면(도 10a, 표 3), hFcRn에 대해 야생형 유사 동역학을 나타내는 것들(K288D/N, Y436H/H/W)은 모두 야생형과 비슷한 pH에서 용리되었다.

[0328]

[표 3]

리드 항체 변이체의 시험관 내 특성화 매개변수

변이체	pH	T <sub>m</sub> (°C)	비아코어 pH 6.0					
			hFcRn			rFcRn		
			결합 속도 (x10 <sup>4</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	해리 속도 (x10 <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	K <sub>D,app</sub> (x10 <sup>9</sup> M)	결합 속도(x10 <sup>4</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	해리 속도 (x10 <sup>-3</sup> s <sup>-1</sup> )	K <sub>D,app(x10<sup>9</sup> M)</sub>
WT	7.37	69.0 ± 0.2	16.2 ± 2.9	3.9 ± 0.4	2380 ± 470	7.3 ± 1.0	15.2 ± 0.2	207 ± 43
E380C	7.18	64.7 ± 0.5	1.7 ± 0.4	4.6 ± 1.5	>10,000	1.7 ± 0.25	106 ± 1	6310 ± 880
K288D	7.33	65.8 ± 0.1	3.3 ± 1.1	5.1 ± 0.8	>10,000	6.6 ± 3.0	8.4 ± 0.6	149 ± 63
K288N	7.39	66.7 ± 0.3	4.1 ± 1.4	4.5 ± 0.3	>10,000	6.4 ± 2.8	10.7 ± 0.9	190 ± 73
M252Y	7.88	64.4 ± 0.2	5.5 ± 1.8	1.4 ± 0.2	3100 ± 1500	10.6 ± 3.1	2.6 ± 0.6	25 ± 3
N434F	8.30	67.8 ± 0.2	35 ± 15	0.5 ± 0.1	165 ± 73	12.6 ± 1.4	3.4 ± 1.8	26 ± 13
N434P	7.56	63.6 ± 0.5	2.4 ± 0.5	3.4 ± 1.1	>10,000	3.4 ± 0.1	6.7 ± 0.2	194 ± 9
N434Y	8.46	67.3 ± 0.5	36 ± 10	0.5 ± 0.1	137 ± 33	14.5 ± 1.8	3.5 ± 1.9	23 ± 12
T256D	7.82	64.7 ± 0.2	4.4 ± 1.7	2.5 ± 0.7	6700 ± 3540	6.1 ± 1.8	4.8 ± 0.1	86 ± 27
T256E	7.63	66.3 ± 0.6	3.9 ± 2.4	3.4 ± 0.2	>10,000	6.3 ± 1.6	6.9 ± 1.0	113 ± 15
T307A	7.61	68.0 ± 0.4	2.9 ± 0.7	2.9 ± 0.5	>10,000	6.1 ± 2.7	7.1 ± 0.7	132 ± 48
T307E	7.58	70.2 ± 0.5	4.4 ± 1.6	3.0 ± 0.4	8130 ± 5070	5.6 ± 2.8	6.0 ± 0.2	141 ± 65
T307F	7.61	70.2 ± 0.3	2.7 ± 0.8	2.9 ± 0.1	>10,000	5.7 ± 2.8	6.2 ± 0.1	131 ± 63
T307M	7.40	70.0 ± 0.4	4.1 ± 0.8	3.9 ± 0.3	>10,000	6.8 ± 2.3	17.1 ± 4.0	279 ± 140
T307Q	7.86	70.3 ± 0.6	4.0 ± 1.1	2.2 ± 0.2	5720 ± 1530	7.4 ± 2.2	4.0 ± 0.3	58 ± 16
T307W	7.75	63.0 ± 0.5	3.3 ± 0.8	2.8 ± 0.3	8740 ± 2440	7.1 ± 2.3	7.4 ± 0.4	111 ± 32
Y436H	7.33	68.7 ± 0.3	2.6 ± 0.8	6.1 ± 1.0	>10,000	5.1 ± 0.1	7.3 ± 0.9	131 ± 9
Y436N	7.22	65.8 ± 0.5	4.6 ± 2.4	7.4 ± 3.3	>10,000	10.1 ± 4.9	20.3 ± 3.1	233 ± 86
Y436W	7.39	68.6 ± 0.7	2.8 ± 1.9	4.6 ± 0.9	>10,000	3.4 ± 2.2	23.7 ± 7.7	1140 ± 950

[0330]

모든 데이터는 각 열의 상단의 실험 기술을 이용하여 얻었다. 용리 pH를 3회 반복하여(n = 3) FcRn 친화도 크로마토그래피에 의해 결정하였고, DSF는 열 안정성을 3회 반복하여(n = 3) 조사하였다. 인간 및 랙트 FcRn에 대한 FcRn 결합 동역학을 일련의 항체 농도를 이용한 비아코어로부터 수득하였고(n = 4), 독립적으로 적합화하였다. 각 측정의 단위는 다음과 같다: 용리 pH(단위 없음); DSF T<sub>m</sub>(°C); 비아코어 pH 6.0 hFcRn 결합 속도(x10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>), 해리 속도(x10<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) 및 K<sub>D,app</sub>(x10<sup>9</sup> M); 비아코어 pH 6.0 rFcRn 결합 속도(x10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>), 해리 속도(x10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>) 및 K<sub>D,app</sub>(x10<sup>9</sup> M).

[0332]

N434F/Y 변이체는 둘 다 LS 변이체보다 더 높은 pH에서 용리되었고(N434F: 8.30 ± 0.05; N434Y: 8.46 ± 0.02), pH 7.4에서 상당한 FcRn 결합을 나타내었다(표 4). 이러한 결과는 이러한 변이체만으로도 pH 의존성을 교란시킬 수 있음을 나타낸다. 일반적으로, 평균 용리 pH는 FcRn 결합 증진 돌연변이의 수가 증가함에 따라 증가하였다(도 9b). 강한 상관관계( $R^2 = 0.94$ )가 hFcRn 해리 속도와 비교하여 용리 pH와 관련하여 나타났다(도 9c); 어떠한 이론에도 구속되지 않고, 상호 작용의 pH 의존성의 교란이 pH 6.0에서 조합 라이브러리에 대해 판

찰된 더 느린 FcRn 해리 속도에 직접적으로 기여함을 나타낸다.

[0333] **실시예 7: 열 안정성**

낮은 열역학적 안정성을 갖는, 항체를 비롯한 대부분의 단백질은 잘못 접힘 및 응집의 경향이 증가하고, 신규한 치료제로서의 이들의 활성, 효능, 및 가능성을 제한하거나 방해할 것이다. 각 변이체의 열 안정성을 DSF를 이용하여 결정하였고, 보고된 용융 온도( $T_m$ )는 사이프로 오렌지 형광 강도 프로파일의 첫 번째 전이의 중간점으로 정의하였다.  $69.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 의  $T_m$ 을 갖는 WT와 비교하여, LS 변이체는 WT와 유사하며( $68.5 \pm 0.3^\circ\text{C}$ ), AAA 및 YTE는 약  $8^\circ\text{C}$ 만큼 열적으로 불안정하다(AAA:  $61.3 \pm 0.6^\circ\text{C}$ ; YTE:  $61.2 \pm 0.3^\circ\text{C}$ )(도 8b, 9b, 및 10b; 및 표 2B, 3 및 4). WT 및  $69.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 의  $T_m$ 을 갖는 LS와 비교하여, AAA 및 YTE 변이체는 DSF에 의해 약  $8^\circ\text{C}$ 만큼 더 낮은 열 안정성을 나타냈다.

[표 4]

[0336] 기준 및 리드 조합의 시험관 내 특성화 매개변수

변이체	FcRn 친화도 컬럼	pH	$T_m$ ( $^\circ\text{C}$ )	비아코어 pH 6.0						비아코어 pH 7.4					
				hFcRn			rFcRn			hFcRn			rFcRn		
				결합 속도 ( $\times 10^4$ $\text{M}^{-1}$ $\text{s}^{-1}$ )	해리 속도 ( $\times 10^{-1}$ $\text{s}^{-1}$ )	$K_{D,\text{app}}$ ( $\times 10^9$ $\text{M}$ )	결합 속도( $\times 10^4$ $\text{M}^{-1}$ $\text{s}^{-1}$ )	해리 속도 ( $\times 10^{-3}$ $\text{s}^{-1}$ )	$K_{D,\text{app}}(\times 10^9$ $\text{M}$ )	정상 상태 RU	정상 상태 RU	$K_{D,\text{app}}(\times 10^9$ $\text{M}$ )	정상 상태 RU	정상 상태 RU	$K_{D,\text{app}}(\times 10^9$ $\text{M}$ )
WT	7.37	$69.0 \pm 0.2$	$16.2 \pm 2.9$	$3.9 \pm 0.4$	$2380 \pm 470$	$7.3 \pm 1.0$	$15.2 \pm 0.2$	$207 \pm 43$	$4.2 \pm 0.9$	$13.0 \pm 3.2$	$467 \pm 99$				
AAA	7.94	$61.3 \pm 0.6$	$8.4 \pm 1.8$	$1.4 \pm 0.1$	$1780 \pm 380$	$15.7 \pm 3.3$	$11.7 \pm 1.1$	$77 \pm 18$	$13.9 \pm 3.1$	$23.6 \pm 4.9$	$450 \pm 19$				
LS	8.29	$68.5 \pm 0.3$	$19.3 \pm 3.5$	$0.5 \pm 0.1$	$272 \pm 40$	$9.1 \pm 1.6$	$6.6 \pm 0.4$	$74 \pm 9$	$18.3 \pm 4.6$	$24.8 \pm 4.8$	$369 \pm 19$				
YTE	8.14	$61.2 \pm 0.3$	$14.3 \pm 4.4$	$0.5 \pm 0.1$	$342 \pm 117$	$6.5 \pm 0.5$	$1.2 \pm 0.2$	$18 \pm 2$	$13.2 \pm 3.5$	$53.9 \pm 1.2$	$1040 \pm 160$				
MDQN	7.92	$67.9 \pm 0.4$	$3.8 \pm 0.4$	$8.7 \pm 0.1$	$232 \pm 24$	$1.3 \pm 0.2$	$1.3 \pm 0.1$	$9.5 \pm 1.7$	$10.7 \pm 1.0$	$39.1 \pm 4.5$	$600 \pm 4$				
MDWN	7.92	$57.8 \pm 0.4$	$5.3 \pm 0.1$	$8.9 \pm 0.3$	$169 \pm 8$	$1.6 \pm 0.1$	$1.3 \pm 0.1$	$8.2 \pm 0.9$	$12.2 \pm 1.3$	$42.1 \pm 4.7$	$512 \pm 30$				
YDTN	8.29	$59.6 \pm 0.9$	$6.3 \pm 1.2$	$5.9 \pm 0.2$	$94 \pm 18$	$2.9 \pm 0.1$	$1.7 \pm 0.2$	$5.9 \pm 0.6$	$9.7 \pm 1.8$	$56.0 \pm 5.6$	$1060 \pm 60$				
YETN	7.83	$60.7 \pm 0.7$	$5.9 \pm 0.1$	$7.6 \pm 0.3$	$128 \pm 5$	$3.2 \pm 0.1$	$2.7 \pm 0.1$	$8.4 \pm 0.2$	$9.8 \pm 1.2$	$55.1 \pm 6.1$	$878 \pm 101$				
YTWN	8.14	$59.3 \pm 0.2$	$4.8 \pm 0.2$	$5.7 \pm 0.1$	$118 \pm 5$	$2.1 \pm 0.1$	$1.1 \pm 0.1$	$5.2 \pm 0.2$	$15.9 \pm 1.7$	$66.1 \pm 7.1$	$896 \pm 53$				
YDQN	8.51	$60.5 \pm 0.1$	$2.5 \pm 0.2$	$2.8 \pm 0.1$	$115 \pm 7$	$0.5 \pm 0.1$	$0.3 \pm 0.1$	$5.1 \pm 0.3$	$19.8 \pm 2.7$	$65.2 \pm 6.6$	$1060 \pm 50$				
YEQN	8.12	$61.9 \pm 0.8$	$1.9 \pm 0.1$	$4.1 \pm 0.1$	$218 \pm 6$	$0.5 \pm 0.1$	$0.4 \pm 0.1$	$7.8 \pm 0.4$	$15.2 \pm 2.1$	$61.8 \pm 6.4$	$1620 \pm 210$				

[0337] [0338] 야생형 백본에 도입된 돌연변이는 굵은 글자체와 밑줄로 표시하였다. 모든 데이터는 각 열의 상단에 표시된 실험 기술을 이용하여 얻었다. 용리 pH 및  $T_m$ 은 3회 반복하여( $n = 3$ ) 결정하였다. pH 6.0에서 인간 및 랫트 FcRn에 대한 FcRn 결합 동역학을 비아코어로부터 수득하였고( $n = 4$ ), 독립적으로 적합화하였다. pH 7.4에서 정상 상태 FcRn 결합 반응을 단일 항체 농도에서 3회 반복하여 비아코어를 이용하여 측정하였다. 비아코어를 이용하여 일련의 항체 농도로부터 2회 반복하여 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도를 결정하였다. 각 측정의 단위는 다음과 같다: 용리 pH(단위 없음); DSF  $T_m$ ( $^\circ\text{C}$ ); 비아코어 pH 6.0 hFcRn 결합 속도( $\times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ), 해리 속도( $\times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) 및  $K_{D,\text{app}}(\times 10^9 \text{ M})$ ; 비아코어 pH 6.0 rFcRn 결합 속도( $\times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ), 해리 속도( $\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) 및  $K_{D,\text{app}}(\times 10^9 \text{ M})$ ; 비아코어 pH 7.4 정상 상태 결합 반응(RU) 및 Fc $\gamma$ RIIIa  $K_{D,\text{app}}(\times 10^9 \text{ M})$ .

[0339] 18개의 리드 포화 변이체 중 12개는 야생형과 비교하여 감소된  $T_m$ 을 가졌고, 몇몇 T307 돌연변이체(T307E/F/M/Q)는 약간의 안정화를 보여주었다(표 4). 조합에 사용된 7개의 단일 변이체(도 10b 및 표 4) 중 어느 것도 YTE에 비해 유의하게 불안정하지 않았다(도 8b 및 표 5). 이중(도 9d, 수평선), 삼중(도 9d, 수직선) 및 사중(도 9d, 체크무늬) 변이체의 추가는 단일 변이체(도 9d, 흰색 원형)와 비교하여 전체적인 열 안정성의 추가적인 감소를 초래하였다. 다중 변이체는 AAA 또는 YTE( $61.2 \pm 0.^\circ\text{C}$ )보다 낮은  $T_m$ 을 나타냈고,  $>60\%$ 의 이

러한 변이체는 T307W를 함유한다. 사중 변이체(도 9d, 체크무늬)는 용융 온도의 뚜렷한 이정점 분포를 보여주었고, T307Q를 함유하는 조합은 T307W를 보유하는 것들보다 약 6°C 더 높은 열 안정성을 나타냈다(도 9d).

[0340] **실시예 8: Fc 변이체는 Fc γRIIIa와의 결합 상호 작용을 변경시킨다**

[0341] FcRn과의 상호 작용 이외에도, Fc 영역 헌지 및 C<sub>H</sub>2 도메인은 Fc γRIIIa를 포함한 다른 Fc 수용체와의 상호 작용을 담당한다. 조합 포화 라이브러리의 구축에 사용되는 7개의 단일 변이체 중 5개가 C<sub>H</sub>2 도메인 내에 위치하므로, 상호 작용 계면에서 멀리 떨어진 위치에도 불구하고, 이러한 수용체와 상호 작용하는 능력은 야생형에 비해 손상될 수 있다. pH 7.4에서 FcRn 결합과 유사한 방식으로 비아코어를 사용하여 Fc γRIIIa 결합을 측정한 결과, YTE(도 11a, 진회색) 변이체는 야생형과 비교하여 대략 50%의 결합 반응의 감소가 나타났다(도 11a, 검은색). 어떠한 이론에도 구속되지 않고, YTE에 대한 감소된 Fc γRIIIa 결합은 M252Y 돌연변이의 결과로(도 11b, 가장 낮은 흰색 원형), 이 변이체는 단독으로 이 수용체에 대해 상당히 감소된 친화도를 나타내기 때문이다. 다른 단일 돌연변이는 이 감소된 친화도를 공유하지 않았고(도 11b, 흰색 원형), N434F/Y 변이체 단독은 결합을 16 내지 40% 증진시켰다. 이러한 효과는 해당하는 조합의 전부는 아니지만 대부분으로 전달되었다. 예를 들어, M252Y 함유 조합은 Fc γRIIIa 결합에서 17% 내지 72%의 감소를 나타냈다(표 5).

[0342] [표 5]

[0343] 조정 배지 내 포화 라이브러리 변이체의 농도

위치	농도( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )										
	M252	I253	S254	T256	K288	T307	K322	E380	L432	N434	Y436
돌연변이체											
A	89.4	3.4	99.5	4.5	106	< 0.1	110	206	173	108	22.0
C	< 0.1	0.2	108	< 0.1	< 0.1	< 0.1	323	< 0.1	138	31.8	< 0.1
D	22.7	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	169	127	133	< 0.1	2.2
E	< 0.1	136	93.0	163	< 0.1	23.5	167	WT	2.7	65.9	8.9
F	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	154	127	118	< 0.1	< 0.1
G	46.7	< 0.1	172	106	< 0.1	4.9	124	146	107	< 0.1	< 0.1
H	< 0.1	< 0.1	< 0.1	207	< 0.1	7.0	229	103	124	< 0.1	173
I	< 0.1	WT	< 0.1	193	53.9	< 0.1	63.0	60.2	182	16.3	< 0.1
K	1.2	4.1	< 0.1	3.2	WT	88.8	WT	69.2	25.0	< 0.1	67.0
L	< 0.1	< 0.1	103	124	< 0.1	< 0.1	181	169	WT	77.7	< 0.1
M	WT	80.0	1.5	122	< 0.1	< 0.1	112	76.8	97.3	30.5	90.1
N	< 0.1	< 0.1	89.6	46.8	< 0.1	126	231	190	235	WT	18.9
P	0.7	< 0.1	18.5	2.7	92.6	< 0.1	1.3	175	< 0.1	120	< 0.1
Q	176	35.7	20.9	123	1.0	14.0	216	197	188	55.4	96.9
R	0.8	< 0.1	< 0.1	189	< 0.1	1.5	209	9.1	142	102	25.0
S	< 0.1	71.1	WT	141	< 0.1	88.8	99.3	153	106	< 0.1	3.0
T	19.7	12.5	< 0.1	WT	83.8	WT	218	176	114	75.2	34.1
V	63.6	89.9	67.1	150	< 0.1	< 0.1	88.9	239	114	68.0	18.0
W	2.8	< 0.1	< 0.1	2.9	4.9	< 0.1	66.8	171	< 0.1	21.6	128
Y	0.7	< 0.1	150	117	< 0.1	1.1	143	11.3	26.1	< 0.1	WT

[0344] [0345] 하나의 변이체 MDQF(도 11b, 삼중 변이체 카테고리에서 가장 높음)는 Fc γRIIIa 결합에서 극적인 140%의 증가를 보여주었다. 따라서, 조합 포화 라이브러리는 특정한 효과기 기능이 있는 치료적 항체를 맞춤화하는 데 활용될 수 있는 광범위한 Fc 수용체 기능이 있는 변이체를 제공하였다.

[0346] 도 11c는 WT 및 YTE 변이체와 비교한 7개의 리드 단일 변이체의 Fc γRIIIa 결합 반응의 박스 플롯을 보여준다.

[0347] **실시예 9: 7개의 리드 조합은 FcRn 상호 작용의 pH 의존성의 균형을 잡는다**

[0348] 어떠한 이론에도 구속되지 않고, 생체 내에서 추가 연구를 위한 후보 변이체는 도 7c 및 도 7d에 도시된 플롯의 왼쪽 하단의 사분면을 차지하였다. 7개의 변이체는 hFcRn에 대한 이러한 기준을 충족하였고, 5개의 이중 및 2개

의 삼중 조합(MDQN, MDWN, YDTN, YETN, YTWN, YDQN 및 YEQN)으로 구성되었고, N434 위치에 돌연변이를 함유하지 않았다(표 3). 각각의 이러한 조합은 AAA(pH 7.94 ± 0.06)와 LS(pH 8.29 ± 0.03) 사이에서 FcRn 친화도 커럼으로부터 용리되었으며, YDQN은 8.51 ± 0.14의 가장 높은 pH에서 용리되어(도 12a, 표 5), pH 의존성의 단지 약간의 교란 및 pH 7.4에서의 더 큰 잔류 결합을 나타내었다(표 2A). 변이체 중 하나(MDQN)는 야생형과 유사한 열 안정성을 보유하였고, 6개는 YTE 변이체와 비교하여 유사하거나 감소된 T<sub>m</sub>을 나타냈다(도 12b, 표 4). Fc γRIIIa 결합 분석에서, 5개의 조합 변이체는 YTE와 유사한 감소를 보여주었다(표 4). 단일 돌연변이를 이용한 추가 조사는 M252Y가 Fc γRIIIa 결합에 유의하게 영향을 미쳤으며, 어떠한 이론에도 구속되지 않고, 이 효과를 이 돌연변이와의 조합으로 해석한다는 점을 보여주었다. 나머지 6개의 단일 돌연변이는 WT와 유사하였거나, 또는 이 수용체에 대해 약간 개선된 결합을 보유하였다.

[0349] FcRn 결합 특성, 열 안정성 및 Fc γRIIIa 결합을 기반으로 추가 연구를 위해 세 개의 조합 변이체를 선택하였다. DQ(T256D/T307Q), DW(T256D/T307W) 및 YD(M252Y/T256D) 각각은 LS 변이체처럼 최적의 FcRn 결합 특성(표 2B)을 제공하였다(도 12e). 각 변이체는 다양한 기능을 제공한 다양한 열 안정성 및 Fc γRIIIa 결합 특성(도 12f 및 도 12g, 표 2B)을 제공한다. 도 12h는 균질 가교형성 RF의 플롯이다.

[0350] LS(도 13a, 굵고 긴 대시) 및 YTE 변이체(도 13b, 굵고 긴 대시)와 비교하여 pH 6.0에서 인간 및 랫트 FcRn에 대한 겉보기 결합 친화도의 증진은 각각 결합 속도와 해리 속도 사이의 절충안이었다(도 13a 및 도 13b, 표 4). 전형적으로, 더 빠른 해리 속도를 갖는 조합은 또한 더 빠른 결합 속도를 보유하였으며, 그 반대의 경우도 마찬가지였다. 이러한 관찰은 인간 및 랫트 FcRn 사이에서 유지되었다(표 4). 나아가, 이러한 모든 변이체는 pH 7.4에서 hFcRn에 대해 LS 변이체(도 13c, 굵고 긴 대시)보다 낮은 정상 상태 반응을 나타냈다. 이러한 결과는 rFcRn과 일치하지 않았는데, 5개의 M252Y 함유 변이체인 YDTN, YETN, YTWN, YDQN 및 YEQN은 YTE와 비교하여 pH 7.4에서 상승된 FcRn 결합을 나타냈기 때문이다(도 13, 표 5). MDQN 및 MDWN 변이체는 인간 및 랫트 FcRn 사이에서 교차 반응성인 유일한 조합이었다. 더욱이, 이들 두 변이체는 M252Y 함유 변이체와 비슷한 정도로 Fc γRIIIa와의 상호 작용을 교란시키지 않았다(도 12c 및 도 12d 및 표 5; MDQN: 600 ± 4 nM; MDWN: 512 ± 30 nM; WT: 467 ± 99 nM). 따라서, 핵심 FcRn 상호 작용 위치에서 포화 및 조합 돌연변이 유발은, 상호 작용의 pH 의존성을 균형있게 조정하였고 Fc 수용체와의 기능성을 유지하였고 생체 내에서 FcRn 기능을 증진시킬 수 있고 치료적 항체의 혈청 반감기를 연장시킬 수 있는 리드 변이체의 확인을 가져왔다.

#### 실시예 10: 리드 조합 변이체의 류마티스 인자 결합 특성

[0351] 이러한 돌연변이는 항체 표면 전하와 면역원성을 변경할 수 있기 때문에, 리드 변이체의 등전점 및 RF 결합을 조사하였다. 더 산성인 항체가 항체 약동학을 연장시키는 것으로 여겨졌다. WT 및 LS 대조군과 비교하여, 세 가지 리드 모두 T256D 치환의 결과로서 pI에서 약 0.2 pH 단위의 감소를 초래하였다. FcRn 증진 돌연변이는 중첩되는 상호 작용 계면으로 인해, 류마티스 인자(RF)와 같은, 숙주 항체에 대한 결합을 동시에 변경할 수 있다. 균질 가교형성 ELISA를 조정하여 리드 변이체에 대한 RF 결합의 변화를 측정하였다. 흥미롭게도, LS 및 YTE는 WT와 비교하여 RF 결합에서 완전히 반대되는 이동을 보여주었다(도 12h). LS는 RF 결합을 상당히 유의하게 증가시킨 반면, YTE는 유의한 감소를 보였주었다( $p < 0.001$ ). YD( $p < 0.001$ ) 및 DW( $p < 0.01$ )도 RF 결합을 유의하게 감소시켰지만, DQ는 WT와 비슷한 반응을 생성하였다. 어떠한 이론에도 구속되지 않고, 이러한 결과는 DQ, DW 및 YD가 LS와 비교하여 면역원성 이점을 제공할 수 있음을 나타낸다. YD, DW 및 DQ 변이체는 기준 YTE 및 LS 변이체에 비해 개선된 FcRn 결합 특성과 함께 활용될 수 있는 다양한 핵심 항체 특성을 나타낸다.

#### 실시예 11: 리드 조합 변이체는 다른 항체로 전이 가능하다

[0352] 도 15a에 묘사된 바와 같이, CM5 센서 칩을 이용하는 새로운 결합 분석법을 개발하였다. 결합 분석법은 필요에 따라 보충되는, 비오틴이 부착된 FcRn을 약 30 RU까지 포획하기 위해, CM5 센서 칩에 스트렙타비딘을 고정시키는 단계를 포함한다. 항체 결합 동역학을 pH 6.0 및 7.4, 그리고 재생을 위해 pH 8.5에서 측정하였다. 도 15b 및 도 15c는 각각 새로운 결합 분석법을 사용한 FcRn의 직접적인 고정화 및 비오틴 부착된 FcRn의 스트렙타비딘 포획을 보여준다.

[0353] pH 6.0에서 항체-2의 FcRn 결합: 마우스 FcRn의 경우, 리드 항체-2 변이체는 LS 변이체(대시) 및 야생형(검은색)보다 느린 해리 속도를 보여준다(도 16a). 인간 FcRn의 경우, 리드 변이체는 모두 더 빠른 결합 속도를 나타내지만, LS(대시)와 비슷한 해리 속도를 갖는다(도 16b).

[0354] pH 7.4에서 항체-2의 FcRn 결합: 모든 리드 변이체가 LS(대시)와 비교하여 pH 7.4에서 감소된 인간 FcRn 결합을 보여주었다(도 17a). 항체-1 배경에서와 같이, DW(MDWN) 및 DQ(MDQN) 변이체는 pH 7.4에서 마우스(랫트) FcRn

에 대해 더 낮은 잔류 결합을 보여주었다(도 17b).

[0357] 리드 변이체는 LS와 비교하여 pH 6.0에서 더 높은 결합 친화도를 유지하였고, pH 7.4에서 더 낮은 잔류 결합을 유지하였다(도 18). 중요하게도, 변이체들은 FcRn 결합에 거의 영향을 미치지 않으면서 상이한 IgG1 배경 사이에서 전이 가능한 것으로 밝혀졌다. 도 19에서 도시된 바와 같이, LS는 배경과 관계없이 유사한 용리 pH를 가졌다. 항체-2 배경에서 WT, DQ 및 DW는 항체-1 배경에서보다 더 높은 용리 pH를 보여주었는데, 항체-2 배경의 pH 6.0에서 더 긴밀한 결합의 결과일 수 있다.

[0358] 항체-2 배경의 변이체는 모두 도 20에 도시된 바와 같이, 약간 증가된 열 안정성을 보여주었다.

[0359] 도 21에서 도시된 바와 같이, 항체-1 배경과 유사하게, YD(YDTN)는 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 반응(왼쪽)과 친화도(오른쪽)의 감소를 보여주었다. DQ(연회색) 및 DW(진회색)는 항체-2 배경에서 WT(검은색)와 유사한 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 특성을 보여주었다. LS에 대한 Fc $\gamma$ RIIIa 결합에 대한 효과는 항체-1과 항체-2 사이에서 일치한다.

[0360] 따라서, 항체-2 배경의 리드 변이체는 항체-1 배경의 동일한 리드 변이체와 비교하여, FcRn 결합, pH 의존성, 열 안정성, 또는 Fc $\gamma$ RIIIa 결합에 유의한 영향을 미치지 않는다.

[0361] DQ(T256D/T307Q), DW(T256D/T307W) 및 YD(M252Y/T256D) 변이체를 추가 IgG1 항체 및 재조합 Fc 단편에 통합하였다: mAb2는 mAb1로부터의 상이한 항원을 인식하고, Ab3은 Fc 단편이다. 각각의 경우에, pH 의존적 FcRn 결합 동역학(도 22)은 용리 pH, 열 안정성 및 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화도에 대하여 매우 유사하였다(표 2B 및 표 6). 어떤 이론에도 구속되지 않고, 이러한 결과는 DQ, DW 및 YD 변이체가 Fc 도메인으로 구성된 단백질에 개선된 FcRn 결합 특성을 부여하였음을 나타낸다.

[0362] [표 6]

[0363] 조정 배지 내 포화 라이브러리 변이체의 농도

		FcRn 친화도 컬럼	DSF	비아코어 Fc $\gamma$ RIIIa V158	비아코어 pH 6.0		비아코어 pH 7.4			
					hFcRn	cFcRn	mFcRn	hFcRn	cFcRn	mFcRn
Ab	변이체	pH	T <sub>m</sub>	친화도 배수 변화	*K <sub>D,app</sub>	*K <sub>D,app</sub>	*K <sub>D,app</sub>	정상 상태 RU	정상 상태 RU	정상 상태 RU
2	WT	7.61	69.3 ± 0.1	1.0	678 ± 97	1440 ± 360	107 ± 9	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.3	92 ± 8
2	LS	8.32	69.0 ± 0.1	1.23 ± 0.02	113 ± 22	210 ± 43	20 ± 9	44 ± 4	38 ± 6	285 ± 8
2	DQ	8.06	69.3 ± 0.1	1.05 ± 0.01	97 ± 33	110 ± 42	24 ± 11	14 ± 1	11 ± 1	248 ± 5
2	DW	8.11	58.1 ± 0.1	1.15 ± 0.01	69 ± 25	99 ± 9	13 ± 5	18 ± 2	15 ± 1	257 ± 8
2	YD	8.25	60.5 ± 0.1	0.58 ± 0.01	99 ± 49	120 ± 6	10 ± 3	27 ± 2	22 ± 3	394 ± 11
3	WT	7.62	67.5 ± 0.2	1.0	717 ± 23		61 ± 1	2.2 ± 0.3		72 ± 2
3	LS	8.32	66.6 ± 0.2	1.11 ± 0.03	51 ± 2		16 ± 2	32 ± 2		103 ± 1
3	DQ	8.07	63.8 ± 0.2	0.87 ± 0.02	51 ± 1		24 ± 1	19 ± 2		89 ± 1
3	DW	8.12	57.1 ± 0.2	0.93 ± 0.02	39 ± 6		23 ± 1	22 ± 2		99 ± 1
3	YD	8.23	59.5 ± 0.1	0.73 ± 0.02	54 ± 1		0.5 ± 0.2	28 ± 3		125 ± 2

[0364] [0365] 실시예 12: 리드 변이체는 생체 내 혈장 항체 제거 반감기를 연장시켰다

[0366] DQ, DW 및 YD 변이체의 약동학(PK)을 시노몰구스 원숭이 및 hFcRn 형질전환 마우스(주 Tg32)를 이용하여 항체 순환 반감기에 미치는 이들의 영향을 WT 및 LS 대조군과 비교하여 조사하였다(예를 들어, 문헌[Avery et al. Mabs (2016) 8: 1064-1078] 참조). 시노몰구스 FcRn을 이용한 FcRn 결합 연구는 hFcRn에 대해 유사한 결합 친화도를 보여주었다(도 23a 및 도 23b; 표 6). 각 동물에게 WT, LS, DQ, DW 또는 YD 변이체를 정맥 내 주사하였고, 항체 농도를 질량 분석 접근법을 통해 정량화하여 원숭이(도 24a) 및 hFcRn 형질전환 마우스(도 24b)의 청소율 및 혈청 반감기를 결정하였다. 항체 농도의 비 구획 모델로부터 청소율 및 혈청 반감기를 시간의 함수로서 얻었다. 세 개의 모든 리드 변이체와 LS는 원숭이와 마우스 둘 다에서 WT와 비교하여 유의하게 감소된 청소율을 보여주었다( $p<0.001$ ). WT 항체의 혈장 반감기는 원숭이와 마우스에서 각각 9.9 ± 0.5 및 11.7일이었다.

더욱이, LS 기준 및 확인된 변이체들은 두 종에서 야생형과 비교하여 제거 반감기의 유의한 증가를 나타냈다(원숭이와 마우스에서 각각 2.5배 및 1.7배 증가)(표 7). DQ, DW 및 YD는 LS 기준과 비교하여 유사한 반감기 연장을 보여주었다(표 7). 포화 돌연변이 유발을 통해 본원에서 확인된 DQ, DW 및 YD 돌연변이는 마우스 및 비 인간 영장류 동물 모델 둘 다에서 이들의 WT 대응물보다 유의하게 연장된 혈장 반감기를 보여주었다.

[0367] [표 7]

[0368] 기준 및 리드 변이체의 청소율 및 혈청 반감기

mAb2	시노몰구스 원숭이(n = 3)				hFcRn Tg32 마우스(n = 6)			
	청소율 (mL 일-1 kg-1)	t <sub>1/2</sub> (일)			청소율 (mL 일-1 kg-1)	t <sub>1/2</sub> (일)		
		평균	평균 ± SD	t <sub>1/2</sub> (일)		평균	평균 ± SD	t <sub>1/2</sub> (일)
WT	5.6 ± 0.5	9.9 ± 0.5	1.0	0.4	7.4	11.7	1.0	0.6
LS	2.1**	22.5 ± 2.4	2.3	1.0	4.6	19.5	1.7	1.0
DQ	3.4*	20.8	2.1	0.9	3.2	24.5	2.1	1.3
DW	2.5 ± 0.2	20.4 ± 0.9	2.1	0.9	3.5	20.1	1.7	1.0
YD	2.4 ± 0.3	23.5 ± 2.1	2.4	1.0	4.5	17.5	1.5	0.9

[0369]

표 7에서, 청소율과 혈장 반감기는 mAb2를 이용하여 결정되었다. 각각의 청소율 및 반감기는 시노몰구스 원숭이의 경우 n = 3의 평균이었고, n=6의 hFcRn 형질전환 마우스의 풀로부터의 단일 평가였다. WT 대비 배수 및 LS 대비 배수는 각각 WT 및 LS와 비교한 혈청 반감기의 상대적 개선을 보여준다. \* n = 2(ADA 형성으로 인함), \*\* n = 2(부분 피하 투여 경로로 인함)

[0370] 실시예 13: pH 6.0 및 pH 7.4에서 증진된 FcRn 결합을 갖는 조합 변이체

[0371] 실시예 2에 기재된 옥텟 스크리닝(BLI 기반 스크리닝)에 기초하여, 다양한 단일, 이중, 삼중 및 사중 변이체를 생성하였고, pH 6.0 및 pH 7.4에서 FcRn에 대한 이들의 결합을 평가하였다(표 8).

[0372] [표 8]

[0374] 변이체의 결합 친화도(pH 6.0) 및 정상 상태 결합(pH 7.4)

변이체	유형	결합 친화도(M <sup>-1</sup> )	결합 친화도 오차(M <sup>-1</sup> )	정상 상태 결합, pH 7.4(RU)	정상 상태 결합 오차, pH 7.4 (RU)	비율(pH 6.0 / pH 7.4)	비율(pH 6.0 / pH 7.4)
WT (MTTN)	기준	420000	83000	4.2	0.9	100000	1.00E-05
AAA	기준	562000	120000	13.9	3.1	40432	2.47E-05
LS	기준	3680000	541000	18.3	4.6	201093	4.97E-06
YTE	기준	2920000	1000000	13.2	3.5	221212	4.52E-06
MDQN	이중	4310000	446000	10.7	1	402804	2.48E-06
MDTF	이중	33400000	2240000	29.2	4	1143836	8.74E-07
MDTY	이중	64100000	2050000	37.1	5	1727763	5.79E-07
MDWN	이중	5920000	280000	12.2	1.3	485246	2.06E-06
MEQN	이중	2000000	24100	5.8	0.6	344828	2.90E-06
METF	이중	12800000	3350000	23.3	3.2	549356	1.82E-06
METY	이중	16000000	4130000	26.8	3.7	597015	1.68E-06
MEWN	이중	3100000	259000	7.7	0.9	402597	2.48E-06
MTQF	이중	23300000	4290000	34.2	4.6	681287	1.47E-06
MTQY	이중	30900000	6950000	38.4	5.2	804688	1.24E-06
MTWF	이중	26200000	1230000	30.5	4.2	859016	1.16E-06
MTWY	이중	46500000	2600000	37.2	4.9	1250000	8.00E-07
YDTN	이중	10700000	2100000	9.7	1.8	1103093	9.07E-07
YETN	이중	7810000	305000	9.8	1.2	796939	1.25E-06
YTQN	이중	3600000	298000	10.6	1.2	339623	2.94E-06
YTTF	이중	55600000	3090000	43.8	5.8	1269406	7.88E-07
YTTY	이중	120000000	2890000	54.1	7.1	2218115	4.51E-07

[0375]

YTWN	이중	8470000	359000	15.9	1.7	532704	1.88E-06
MDQF	삼중	6620000	1840000	55.3	11.2	119711	8.35E-06
MDQY	삼중	36900000	4360000	49.4	6.7	746964	1.34E-06
MDWF	삼중	28100000	2840000	47.1	6.4	596603	1.68E-06
MDWY	삼중	84000000	9890000	59	7.9	1423729	7.02E-07
MEQF	삼중	142000	6490	8.6	0.8	16512	6.06E-05
MEQY	삼중	23800000	2660000	38.6	5.2	616580	1.62E-06
MEWF	삼중	56200000	8520000	41.9	5.6	1341289	7.46E-07
MEWY	삼중	70400000	7440000	46.6	6.3	1510730	6.62E-07
YDQN	삼중	8700000	560000	19.8	2.7	439394	2.28E-06
YDTF	삼중	29600000	2540000	57.7	7.7	512998	1.95E-06
YDTY	삼중	90100000	812000	65.4	8.9	1377676	7.26E-07
YDWN	삼중	10100000	1540000	25.9	3.6	389961	2.56E-06
YEQN	삼중	4590000	126000	15.2	2.1	301974	3.31E-06
YETY	삼중	33400000	3580000	22.6	2.9	1477876	6.77E-07
YEWN	삼중	6410000	904000	69.6	9.3	92098	1.09E-05
YTQF	삼중	56500000	1280000	59.9	8	943239	1.06E-06
YTQY	삼중	63300000	4010000	71.5	9.6	885315	1.13E-06
YTWF	삼중	65400000	2990000	62.6	8.2	1044728	9.57E-07
YTWY	삼중	106000000	10600000	75.1	9.8	1411451	7.08E-07
YDQF	사중	111000000	4320000	68.6	10	1618076	6.18E-07
YDQY	사중	235000000	6060000	80.2	12	2930175	3.41E-07
YDWF	사중	166000000	3050000	71.8	9.9	2311978	4.33E-07
YDWY	사중	266000000	19100000	88.5	11.7	3005650	3.33E-07

[0376]

[0377] 표 8에서, 다양한 단일, 이중, 삼중 및 사중 돌연변이체뿐만 아니라 기준 변이체(AAA, LS, YTE)에 대한 pH 6.0에서 FcRn에 대한 결합 친화도 및 pH 7.4에서 FcRn에 대한 정상 상태 결합이 제시된다.

[0378]

이러한 값은 도 25에 표시되어 있다. 도 25는 pH 6.0에서의 결합 친화도와 pH 7.4에서의 RU의 비교를 보여준다. 도시된 바와 같이, 기준 변이체 LS는 시험한 기준 변이체(AAA, LS, YTE)의 pH 6.0에서 가장 긴밀한 결합 친화도와 pH 7.4에서 가장 큰 잔류 결합을 갖는다.

[0379]

도 25에 도시된 여러 조합 변이체는 pH 6.0 및 pH 7.4에서 증진된 FcRn 결합 친화도를 나타내는 것으로 결정되었다. 임의의 조합 변이체가 pH 6.0 및 pH 7.4에서 MST-HN 변이체(본원에서 "YTEKF 기준"으로 지칭되며, Met252, Ser254, Thr256, His433 및 Asn434 내지 Tyr252, Thr254, Glu256, Lys433 및 Phe434에서 돌연변이를 함유함)보다 더 긴밀한 결합을 보여주는지를 조사하기 위하여, 다음의 방법을 수행하였다. 비오틴 부착된 인간, 시노몰구스 및 마우스 FcRn의 포획을 비오틴 CAPture 방법을 통해 수행하였다(개략도는 도 26 참조). pH 6.0의 경우, 1000 nM로부터의 농도 계열(5 pts)을 2회 반복하여 수행하였다. pH 7.4의 경우, 단일 농도(1000 nM) 주입을 3회 반복하여 수행하였다(각 FcRn의 포획 수준을 이 pH에서 결합을 관찰하기 위해 10배 증가시켰다). 결합: 180초; 해리: 300초.

[0380]

YTEKF 기준 및 다양한 조합 변이체의 pH 6.0에서의 인간 FcRn 결합 동역학을 도 27에 도시하였다. 도 27에 도시된 바와 같이, 조사한 모든 변이체는 야생형(WT)과 비교하여 인간 FcRn에 대해 두 자릿수의 더 긴밀한 친화도를 보여주었다.

[0381]

도 28a 및 도 28b는 pH 6.0(도 28a) 및 pH 7.4(도 28b)에서의 YTEKF 기준과 비교한, 조합 변이체의 FcRn 결합 동역학을 보여준다. 도 28a에서, 대다수의 변이체는 YTEKF 기준보다 느린 해리 속도를 나타냈으며, 비슷하거나 더 느린 결합 속도를 나타냈다. 도 28b에서, YTEKF는 pH 7.4에서 유의한 결합을 나타내고, 4개의 변이체는 더 높은 잔류 결합을 나타낸다.

[0382]

[표 9]

[0383] 선택 변이체의 결합 친화도(pH 6.0) 및 정상 상태 결합(pH 7.4)

인간 FcRn	pH 6.0		pH 7.4	
	KD(M)	SD	RU	SD
YDQY	2.7	0.1	103.1	0.6
YEWY	8.3	0.5	98.2	0.9
YEQY	4.8	0.2	93.6	0.8
YDQF	4.7	0.1	91.7	0.6
YDWY	5.2	0.2	91.2	0.5
YTEKF	14.8	0.3	89.9	1.3
YWY	10.0	0.4	77.1	0.3
YDWF	11.0	0.4	75.7	0.5
YDY	15.1	0.8	69.7	0.4
DWY	18.1	1.1	59.8	0.8
YY	22.9	0.9	54.4	0.1
WT	1288	201	0.4	0.1

[0384]

[0385] 표 9에서, 선택된 조합 변이체뿐만 아니라YTEKF 기준 및 WT에 대한 pH 6.0에서의 FcRn에 대한 결합 친화도 및 pH 7.4에서의 FcRn에 대한 정상 상태 결합이 제시된다.

[0386]

도 29는 표 9에 나타낸 바와 같은 선택된 조합 변이체에 대한 pH 6.0에서의 결합 친화도와 pH 7.4에서의 RU의 비교를 보여준다. 표 9 및 도 29에 제시된 바와 같이, 4개의 사중 변이체는YTEKF 기준과 비교하여 FcRn에 대해 pH 6.0 및 pH 7.4에서 더 높은 친화도를 갖는 것으로 밝혀졌다. 4개의 사중 변이체는 T256D, T307Q 및 N434Y 돌연변이를 선호하였다. 이를 사중 변이체는 WT 및YTEKF에 비해 각각 약 500배 및 3배의 (pH 6.0에서의) 친화도 개선을 나타냈다.

[0387]

다른 특성화 매개변수, 예를 들어, 열 안정성, Fc $\gamma$ RIIIa에 대한 결합, 및 용리 pH를 결정하고, 표 10에 나타내었다.

[0388]

[표 10]

[0389]

리드 사중 변이체의 기타 특성화 매개변수

변이체	친화도, pH 6.0(nM)	정상 상태 RU, pH 7.4	Tm(°C)	Fc $\gamma$ RIIIa 결합(RU)	용리 pH
YDQY	2.7	103.1	59.0	119	9.2
YEWY	8.3	98.2	52.7	92	9.3
YEQY	4.8	93.6	59.5	108	9.1
YDQF	4.7	91.7	59.1	93.2	8.8
YDWY	5.2	91.2	52.5	104	9.5
WT	약 1500	<1	69.0	142	7.37
YTEKF	14.8	89.9	N.P.*	N.P.*	N.P.

\* 이론에 구속되고자 함이 없이,YTEKF에 "YTE"가 존재하기 때문에, 열 안정성 및 Fc $\gamma$ RIIIa 결합은 리드 사중 변이체와 유사할 것으로 예상된다.

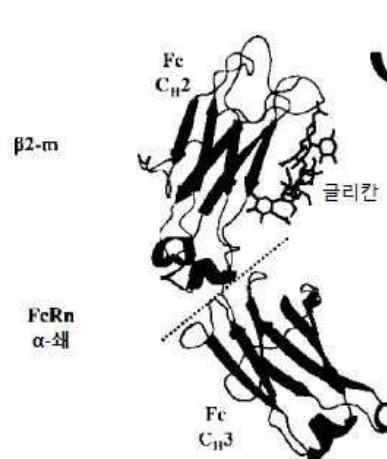
[0390]

[0391] 표 10에 제시된 바와 같이, 모든 리드 사중 변이체는 열적으로 불안정해지는 것으로 밝혀졌고, 감소된 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 능력을 나타냈다.

도면

도면1

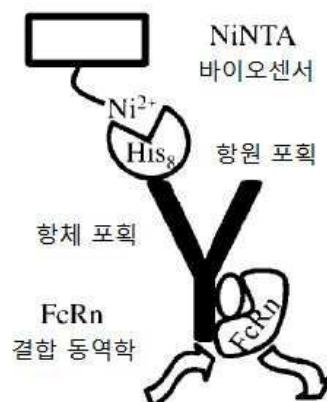
**A**



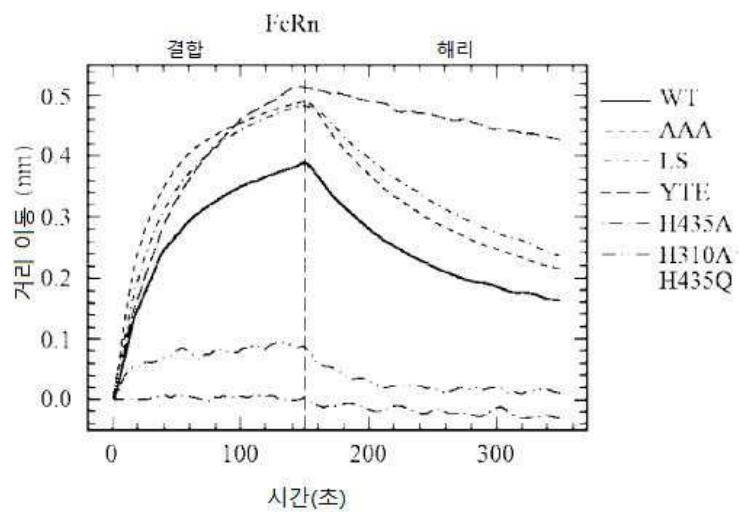
**B**



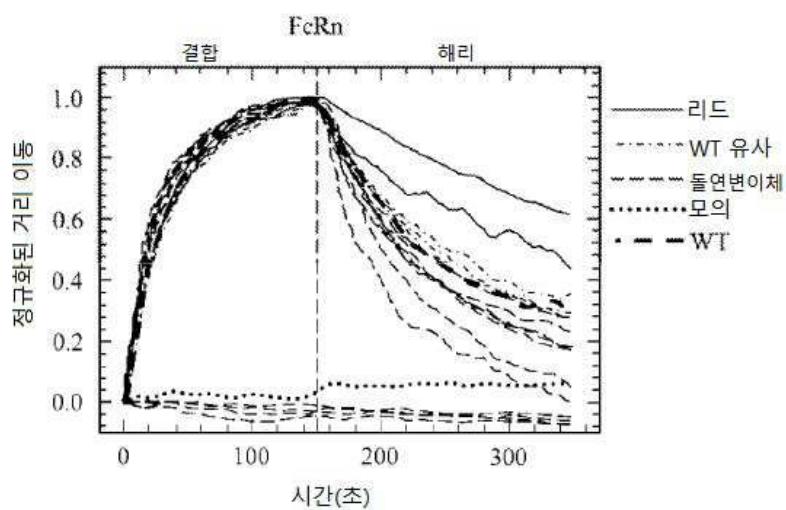
도면2a



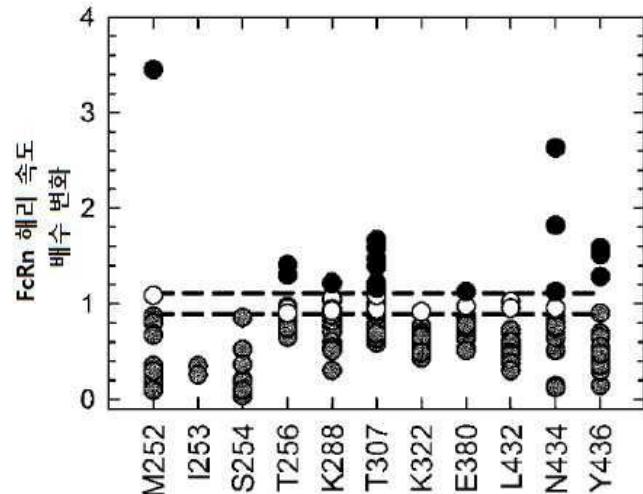
도면2b



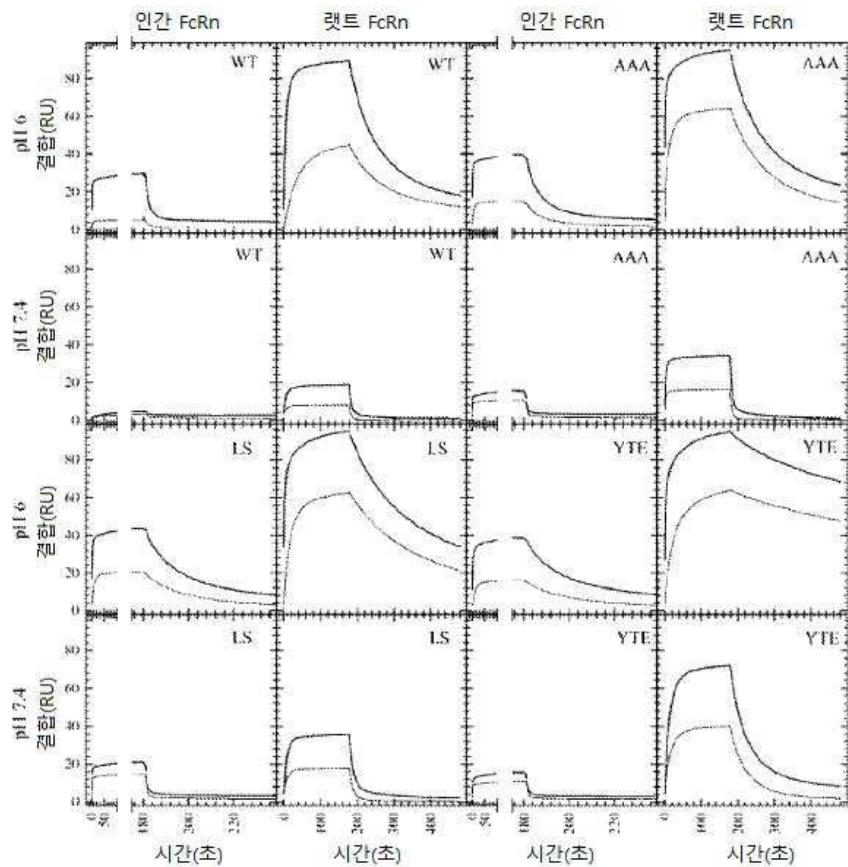
도면2c



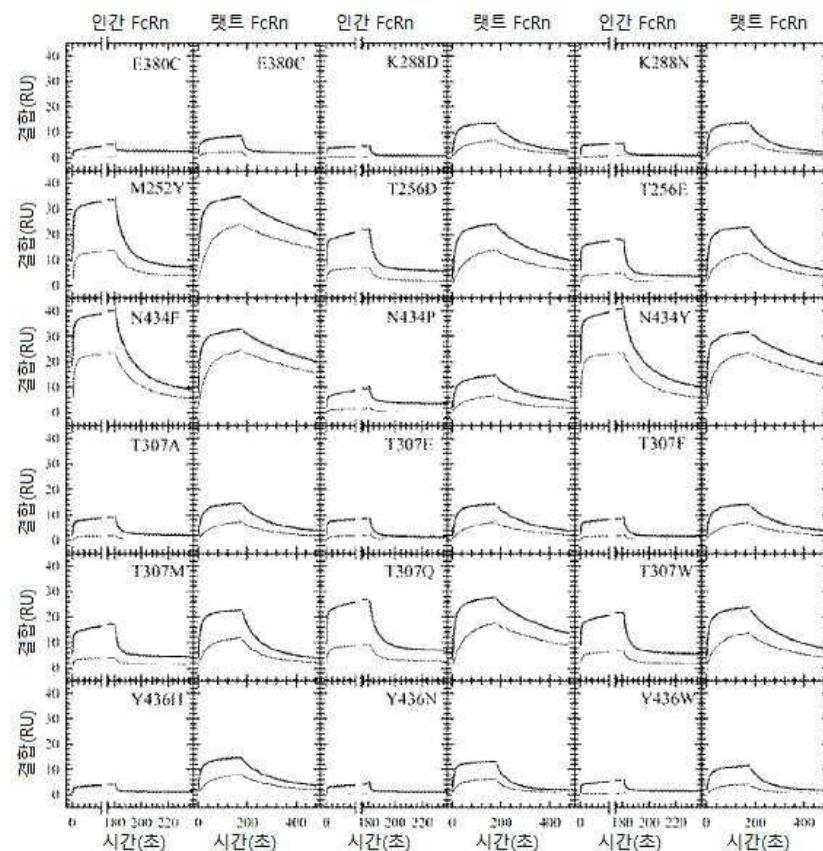
도면2d



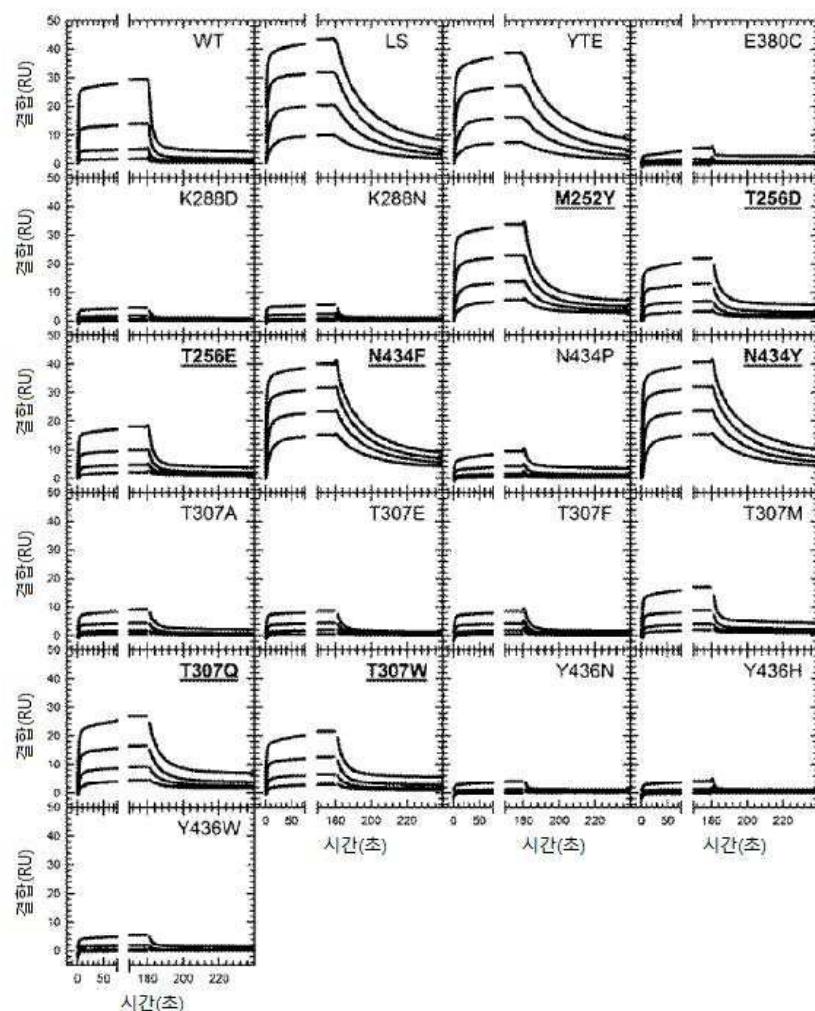
## 도면3



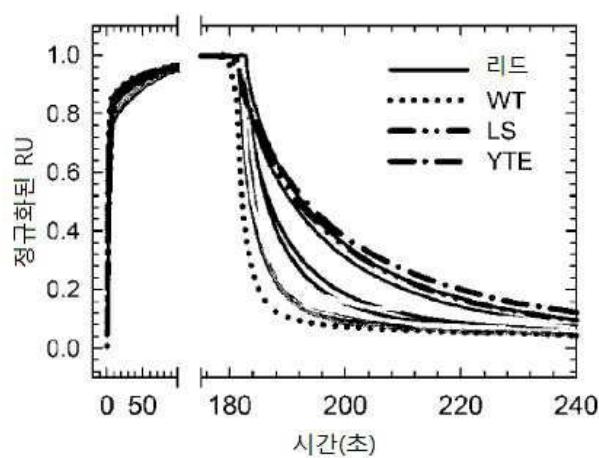
## 도면4a



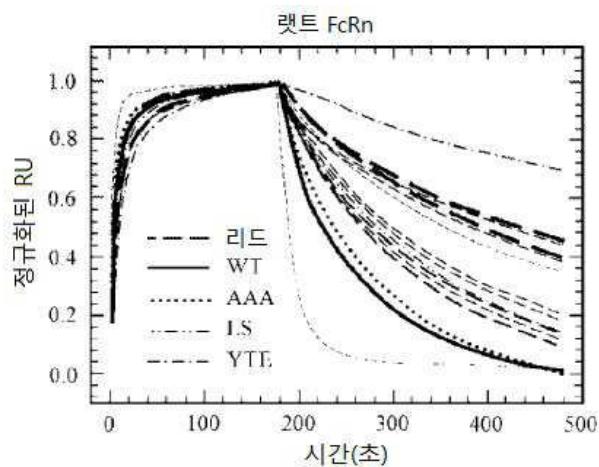
도면4b



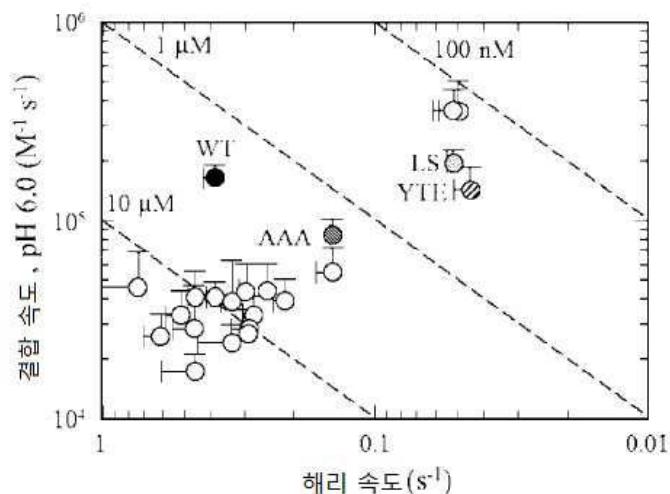
도면5a



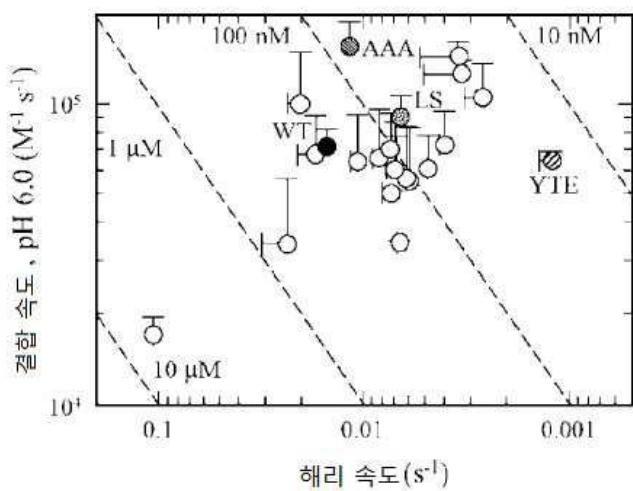
도면5b



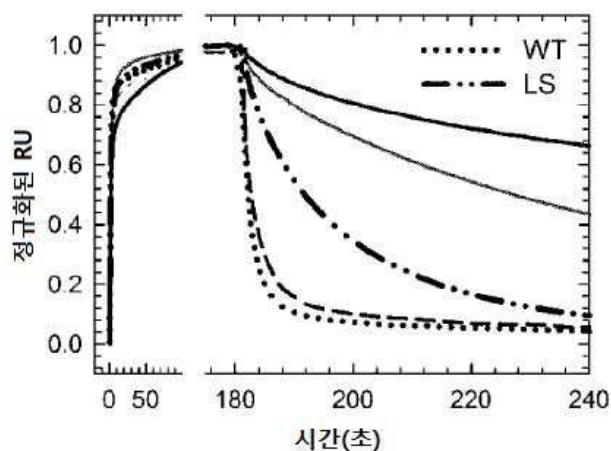
도면5c



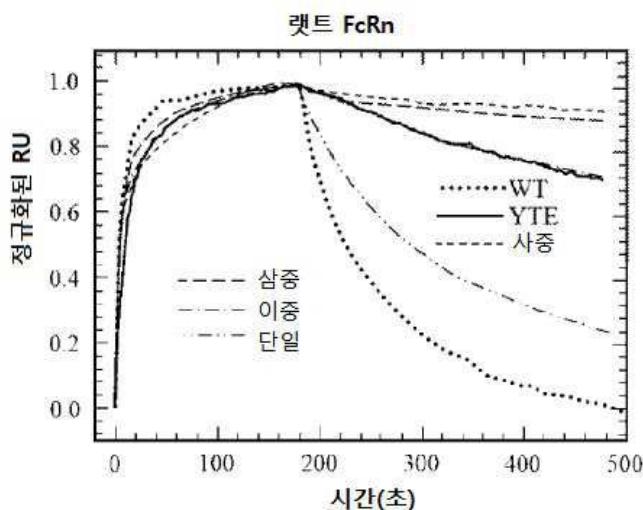
도면5d



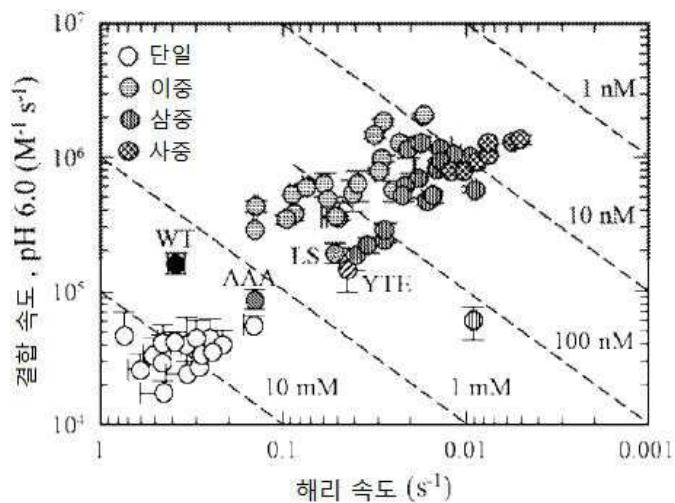
도면 6a



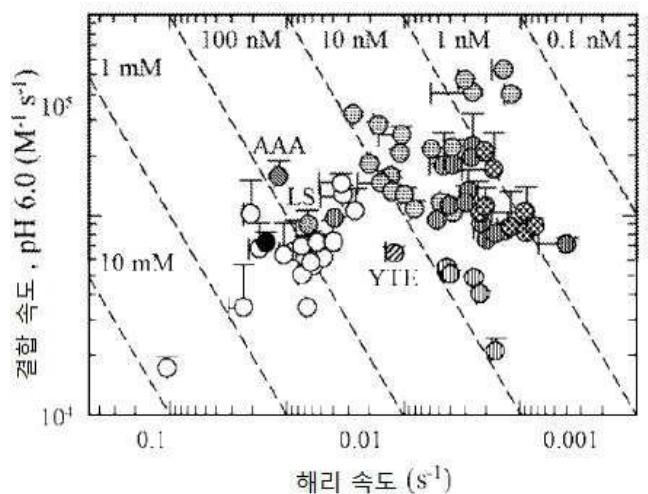
도면 6b



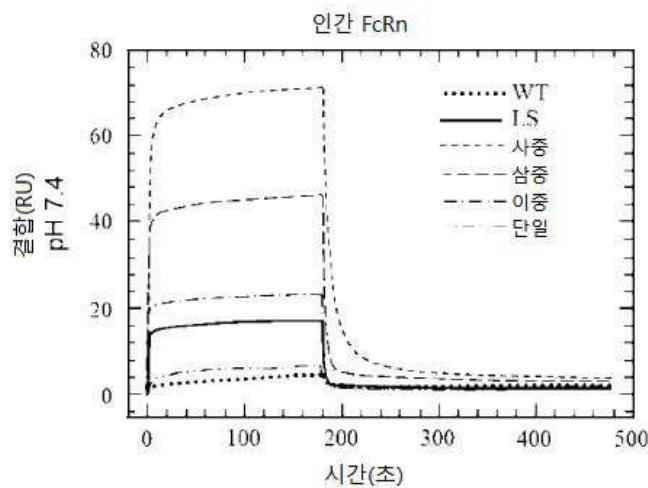
도면 6c



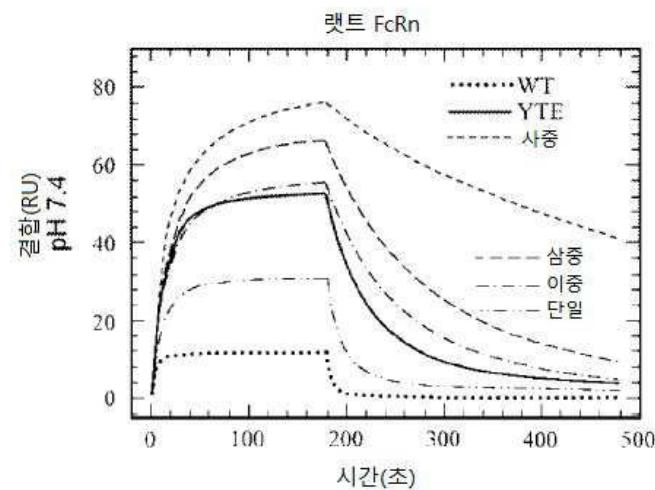
도면6d



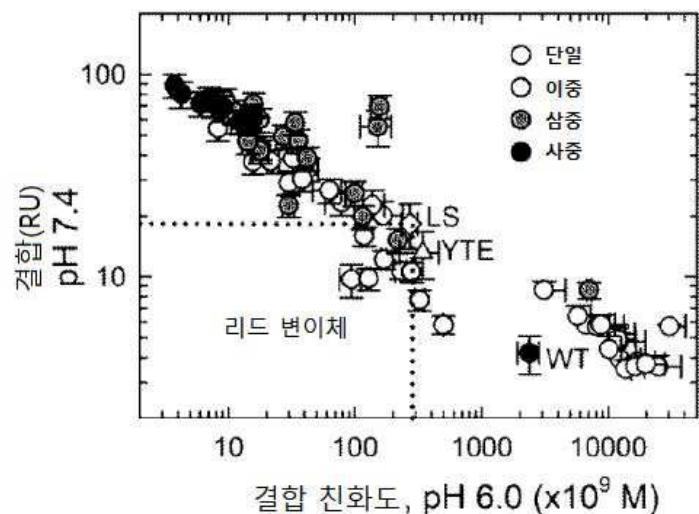
도면7a



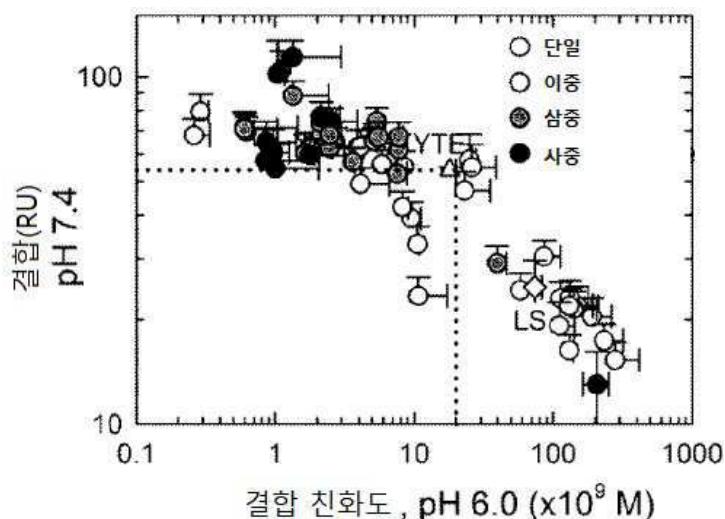
도면7b



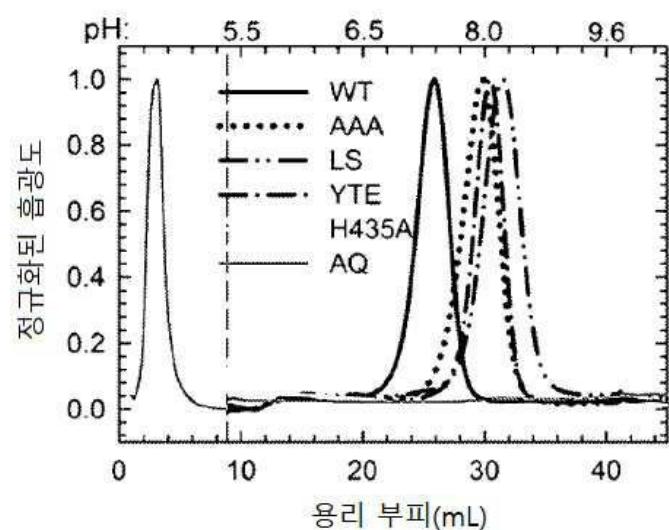
도면7c



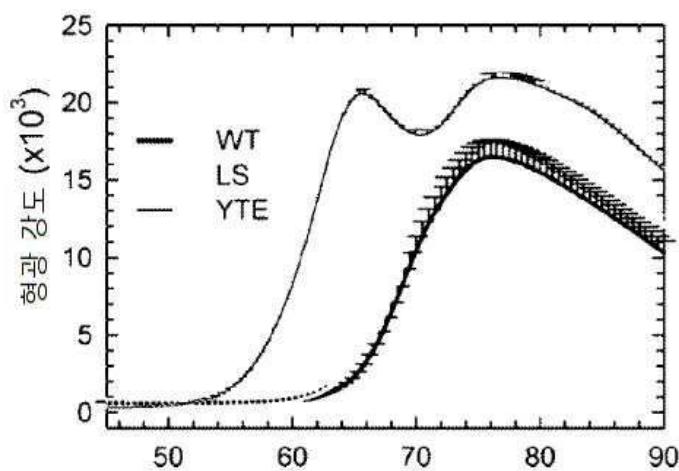
도면7d



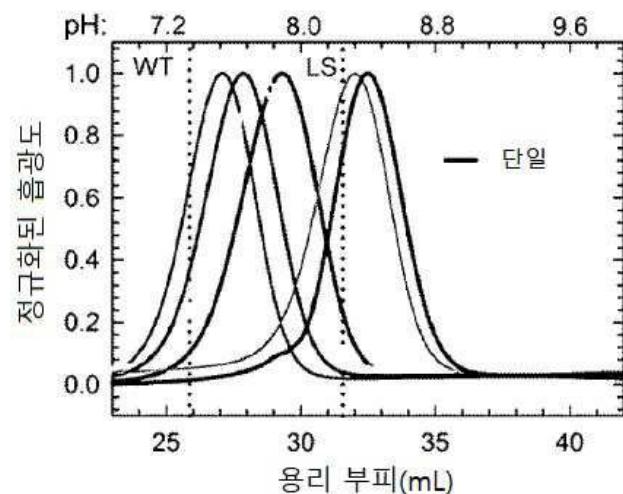
도면8a



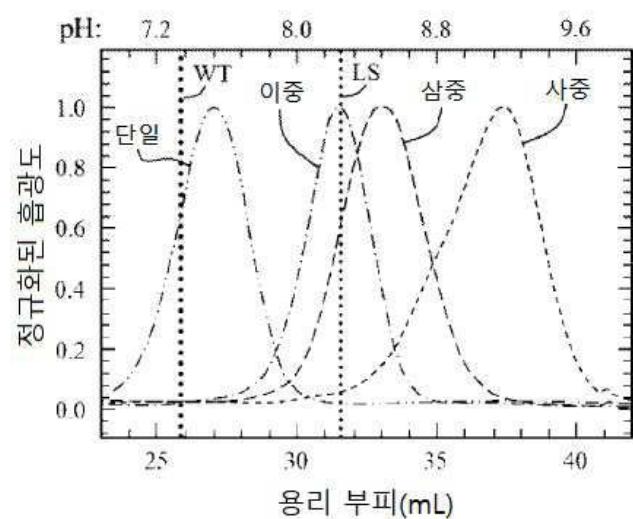
도면8b



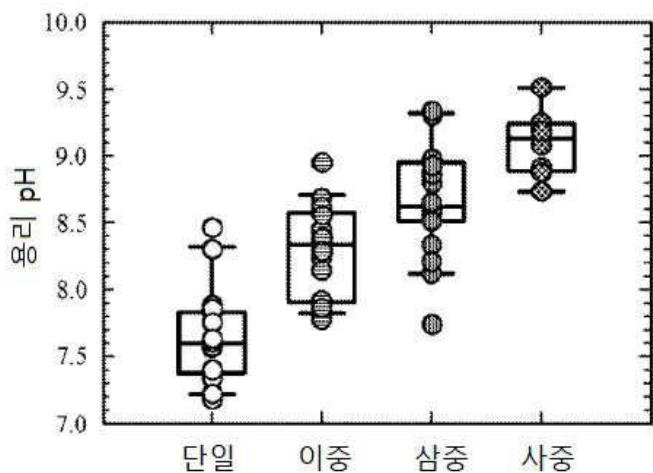
도면8c



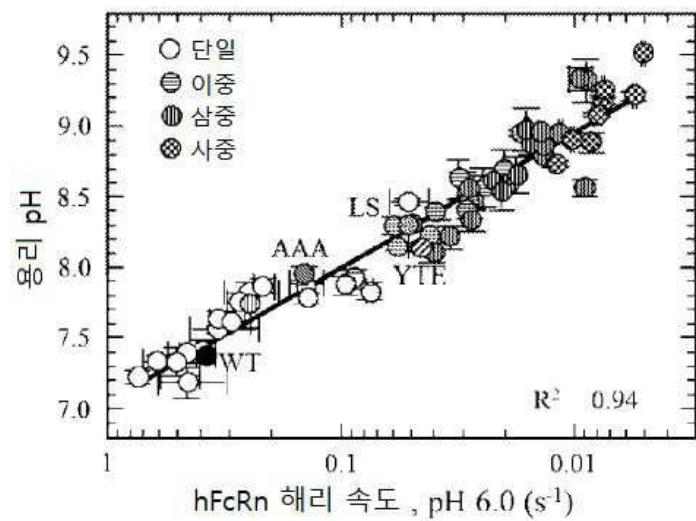
도면9a



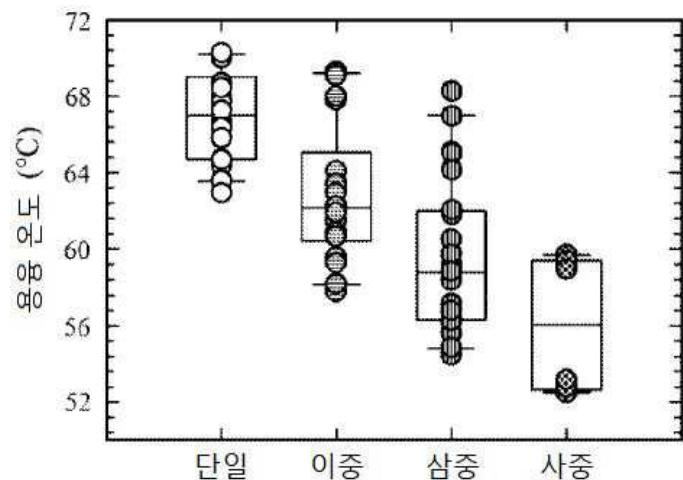
도면9b



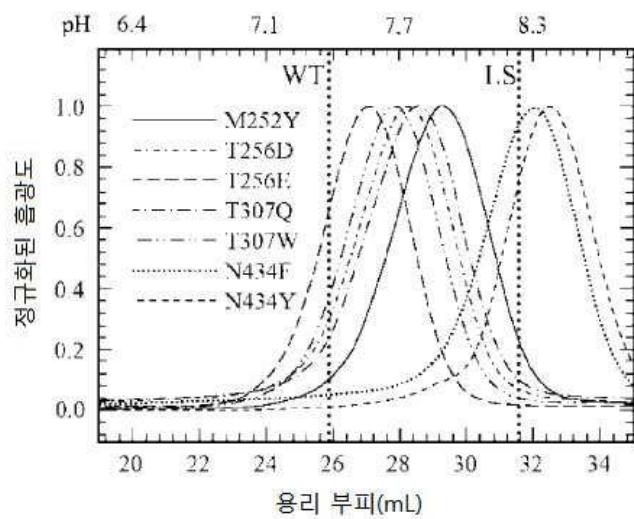
도면9c



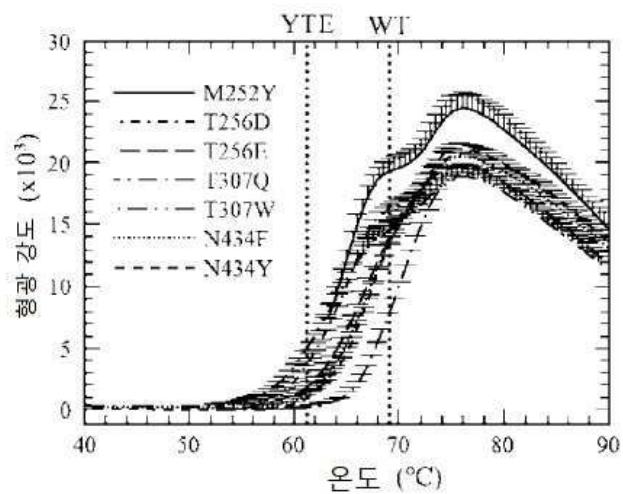
도면9d



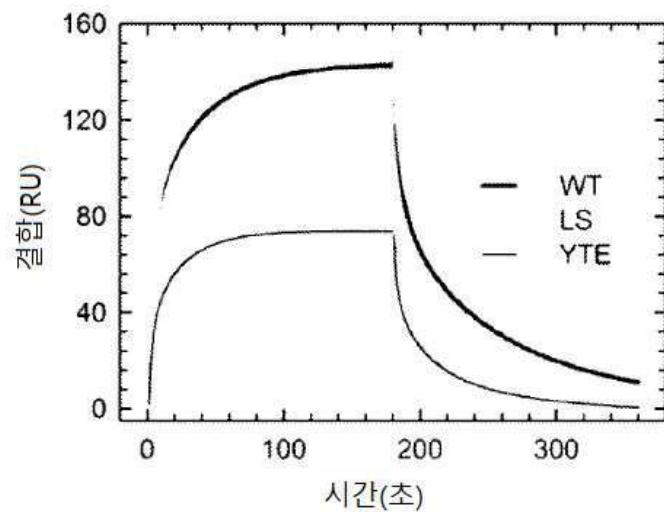
도면10a



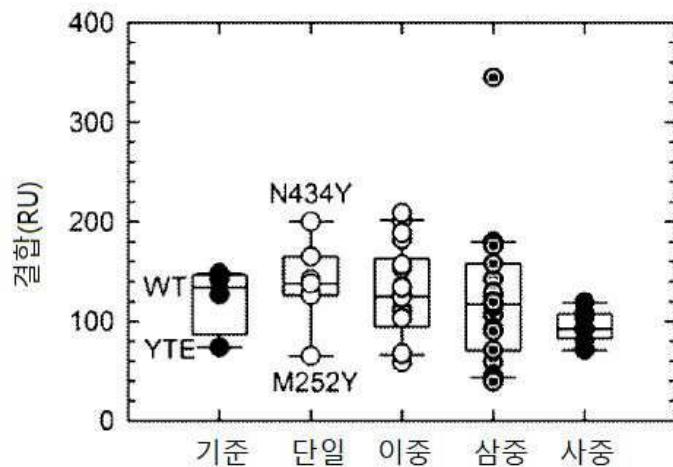
도면10b



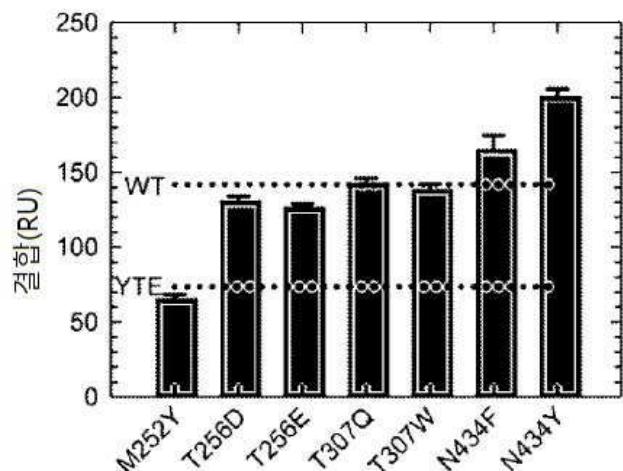
도면11a



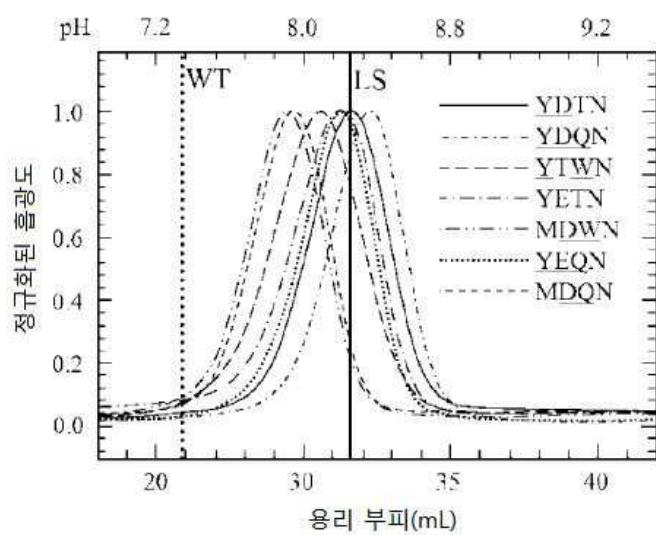
도면11b



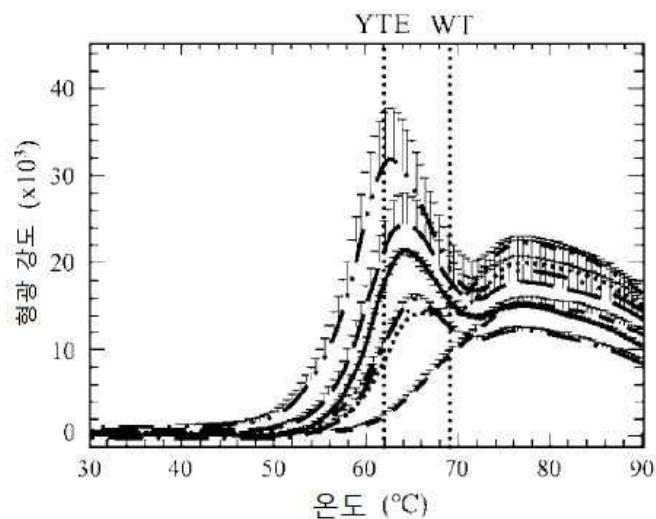
도면11c



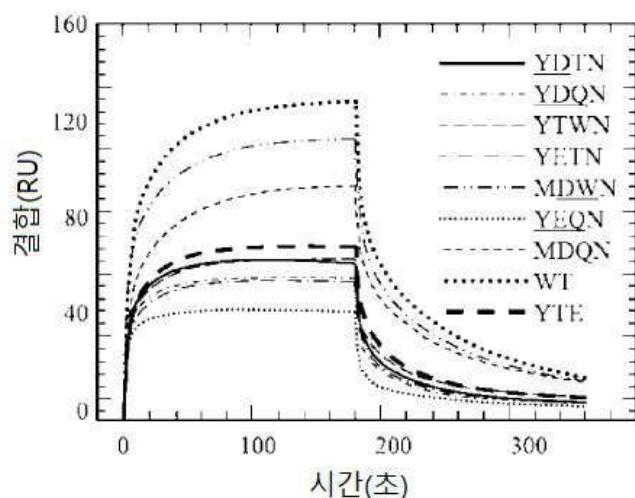
도면12a



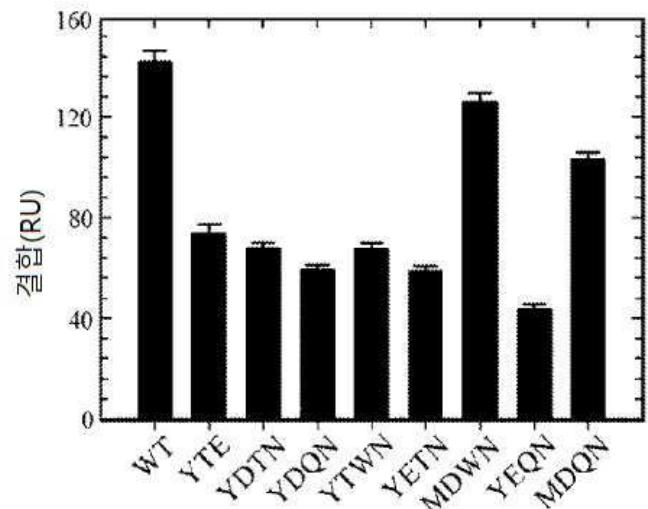
도면 12b



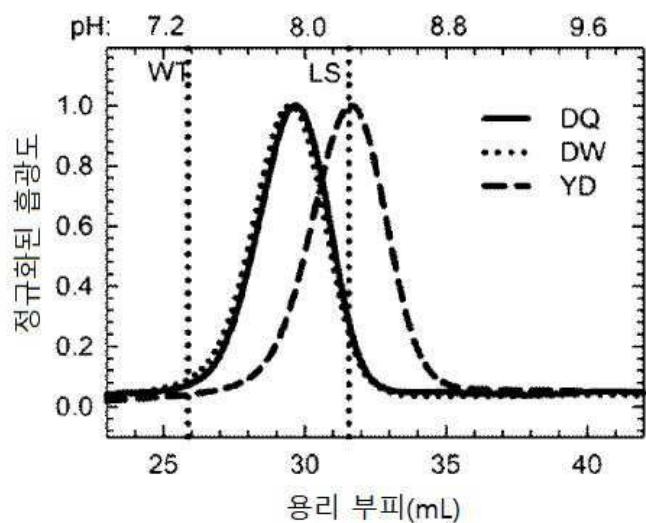
도면 12c



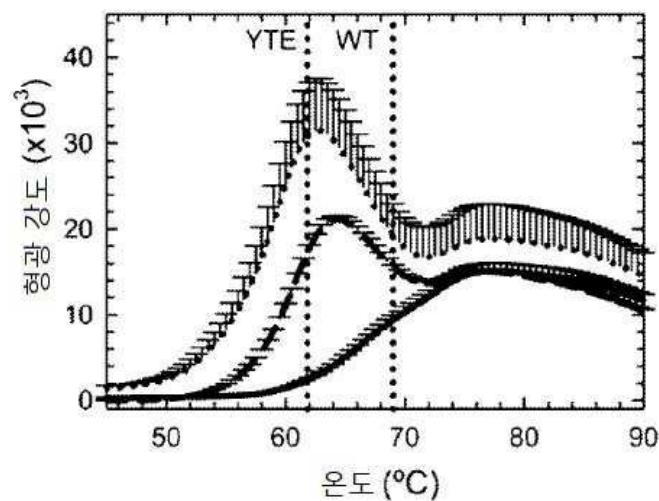
도면 12d



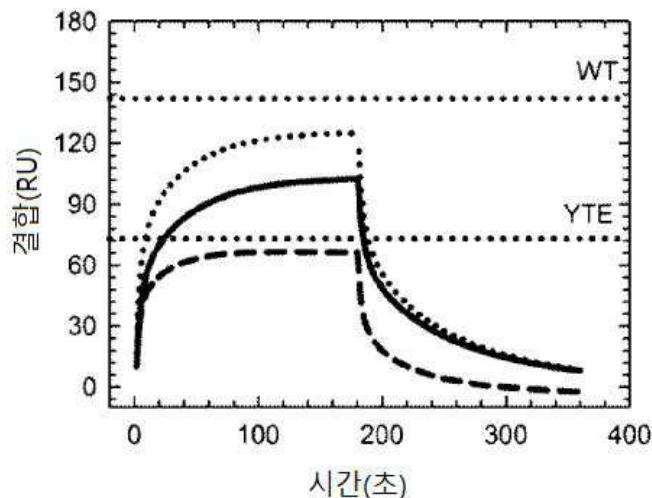
도면12e



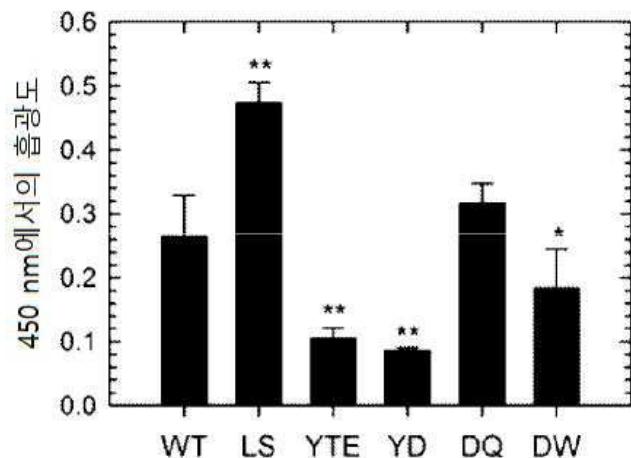
도면12f



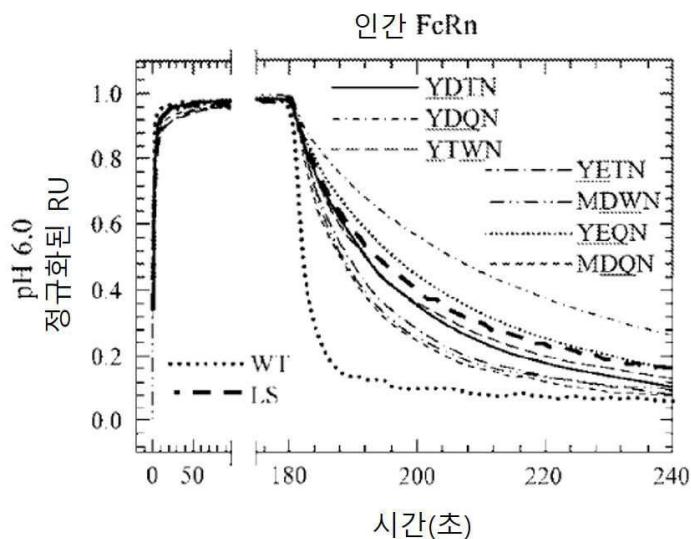
도면12g



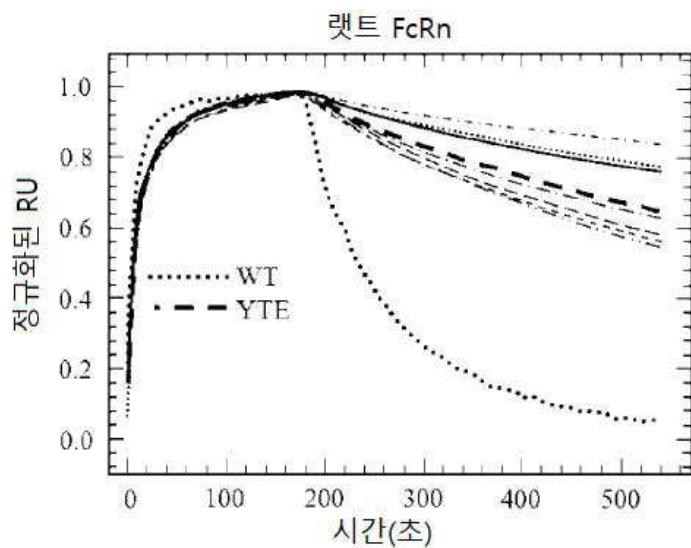
도면 12h



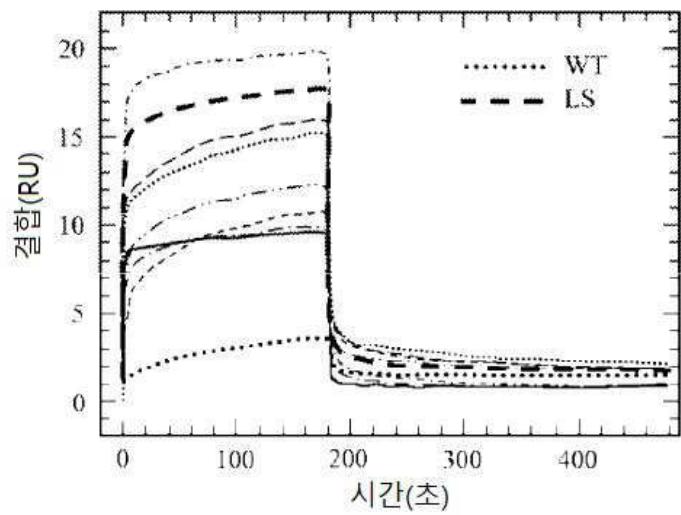
도면 13a



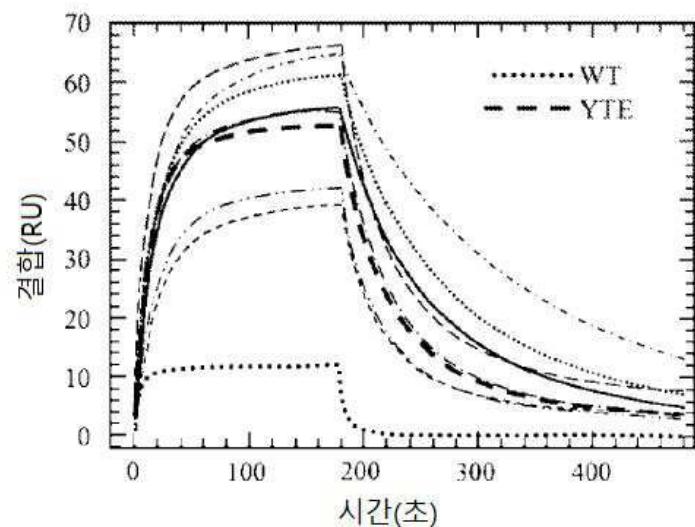
도면 13b



도면 13c



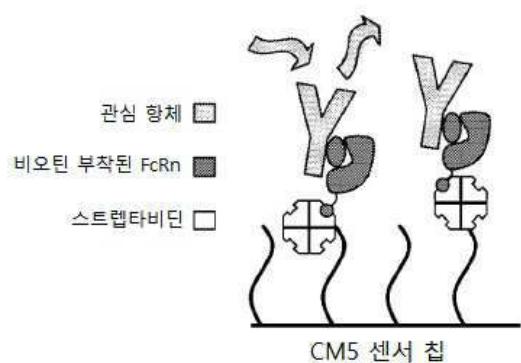
도면 13d



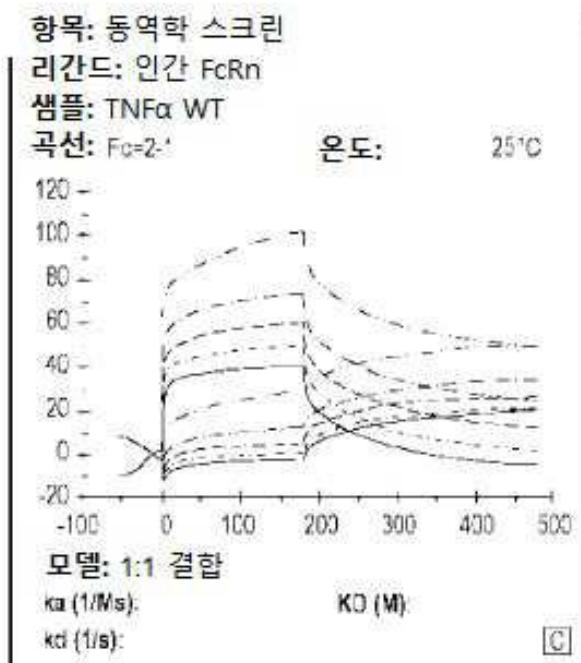
도면14

돌연변이체	위치									
	M252	I253	S254	T256	K288	T307	K322	E380	L432	N434
FcRn 해리 속도의 배수 변화										
A										
C										
D										
E										
F										
G										
H										
I										
J										
K										
L										
M	WT									
N										WT
P										
Q										
R										
S			WT							
T				WT		WT				
V										
W										
Y										WT

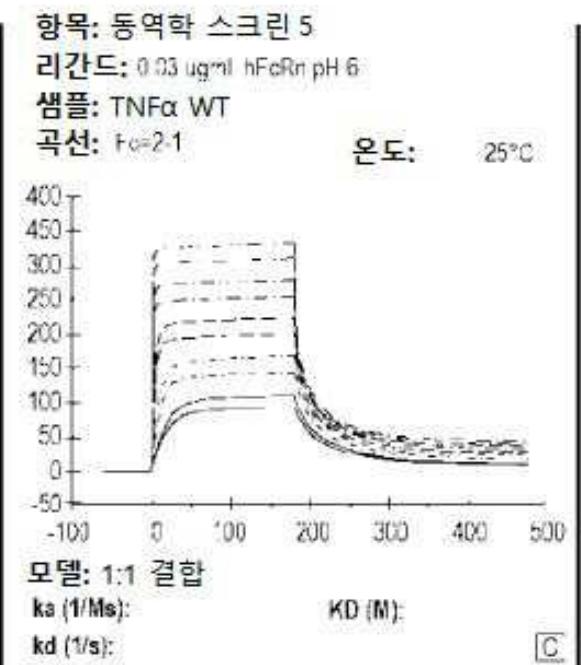
도면15a



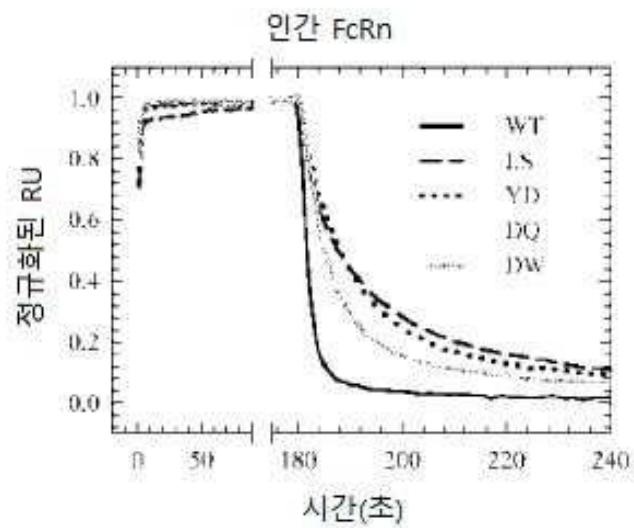
도면 15b



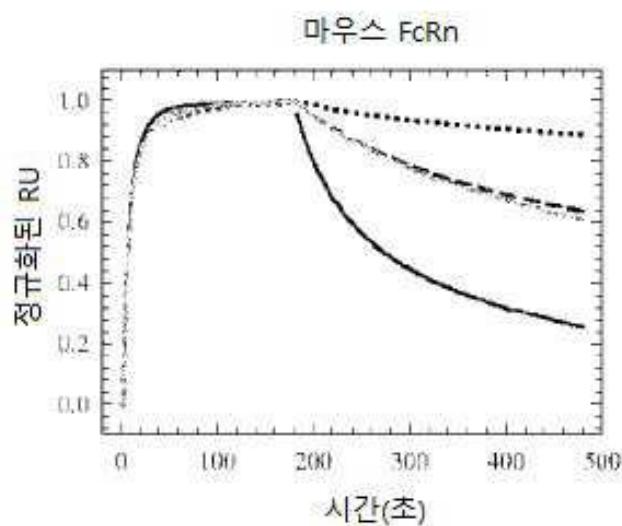
도면 15c



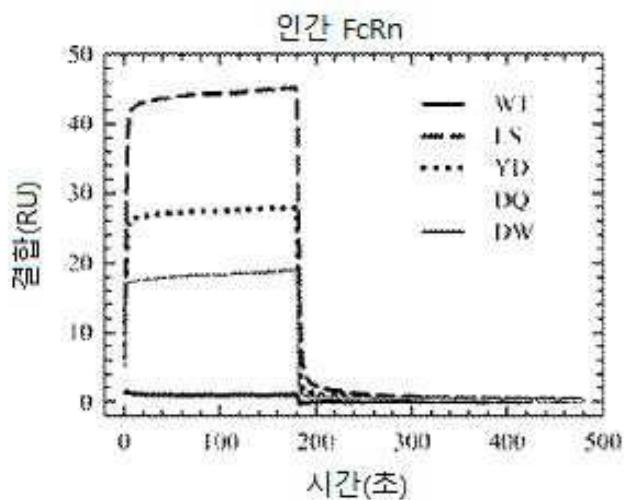
도면 16a



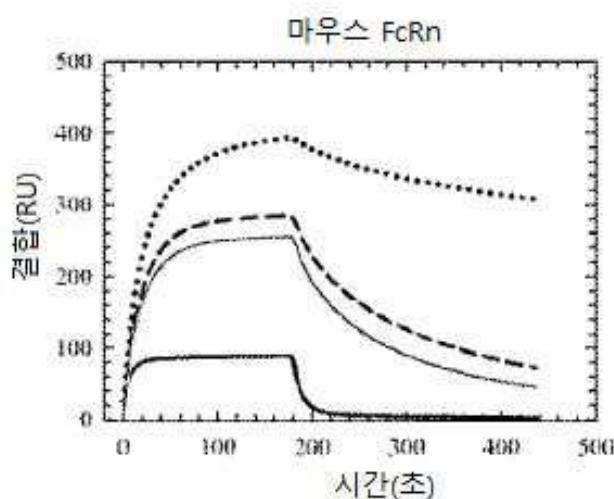
도면 16b



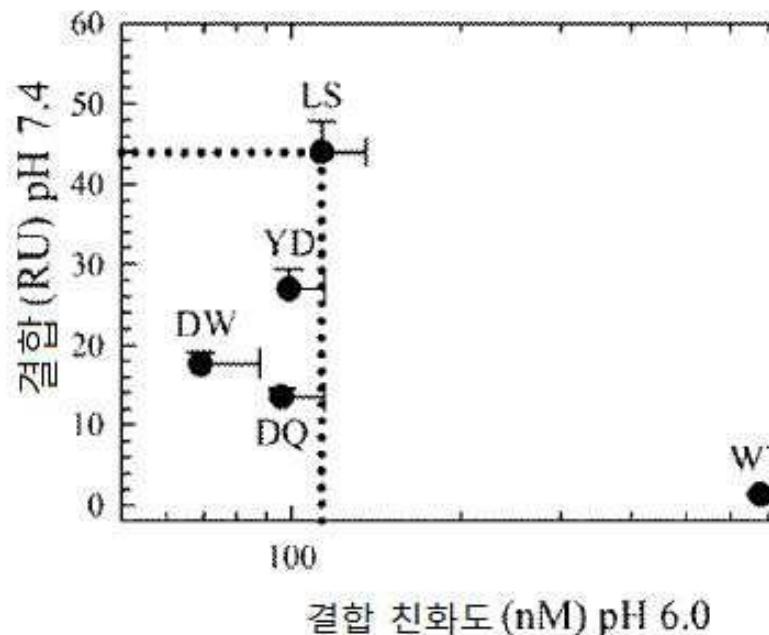
도면17a



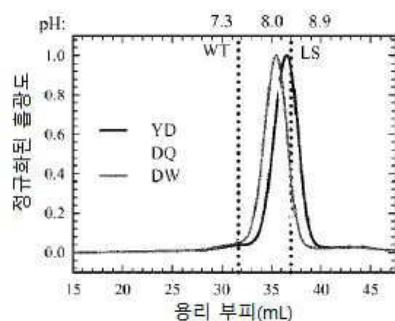
도면17b



도면18

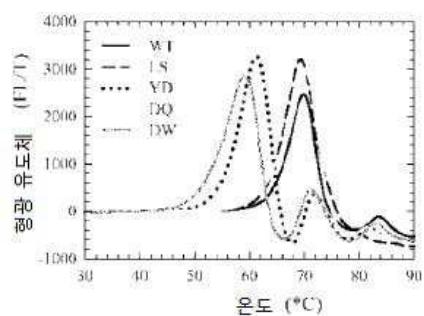


도면19



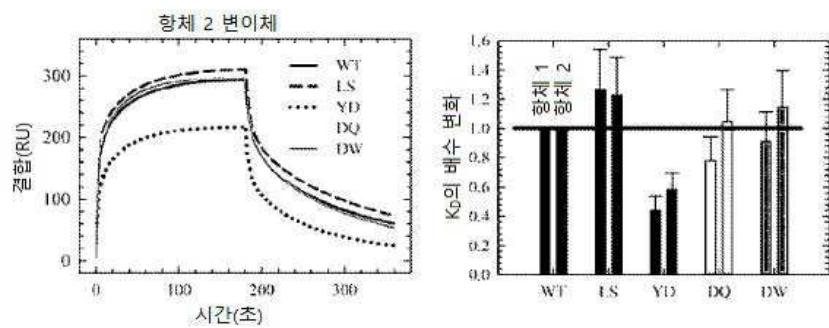
변이체	항체 1	항체 2
WT	7.37	7.61
LS	8.29	8.32
YD	8.29	8.25
DQ	7.92	8.06
DW	7.92	8.11

도면20

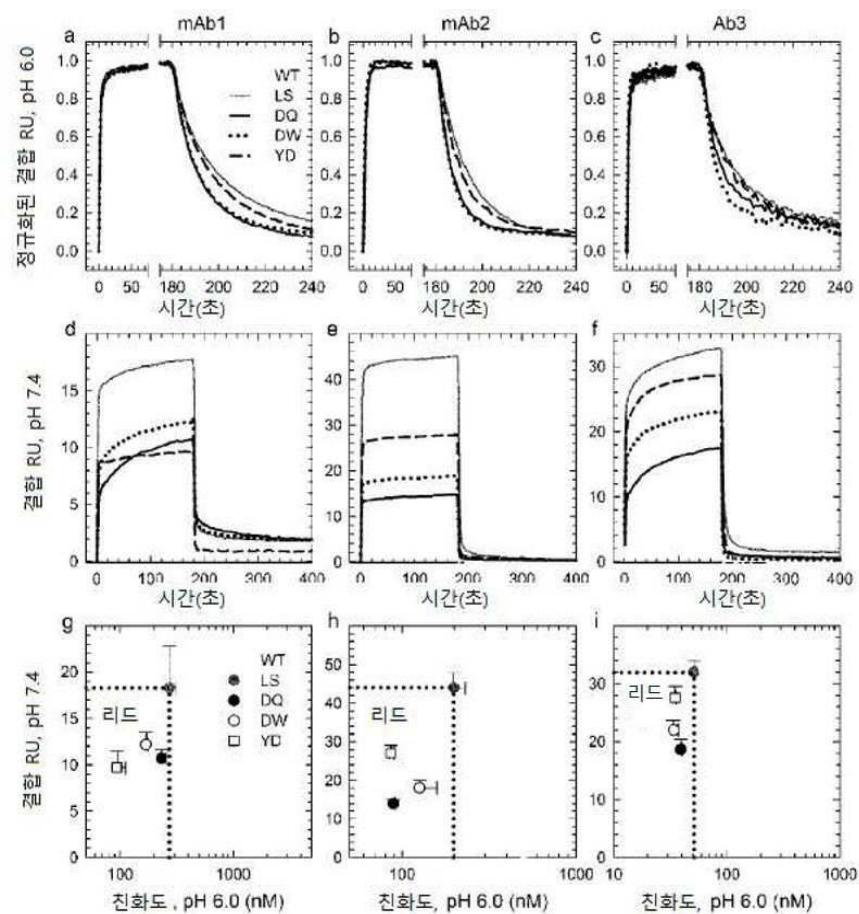


변이체	항체 1	항체 2
WT	69.0	69.3
LS	68.5	69.0
YD	59.6	60.5
DQ	67.9	69.3
DW	57.8	58.1

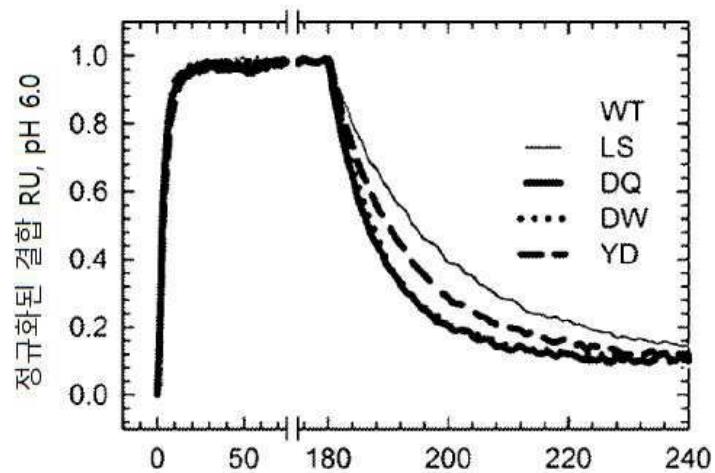
도면21



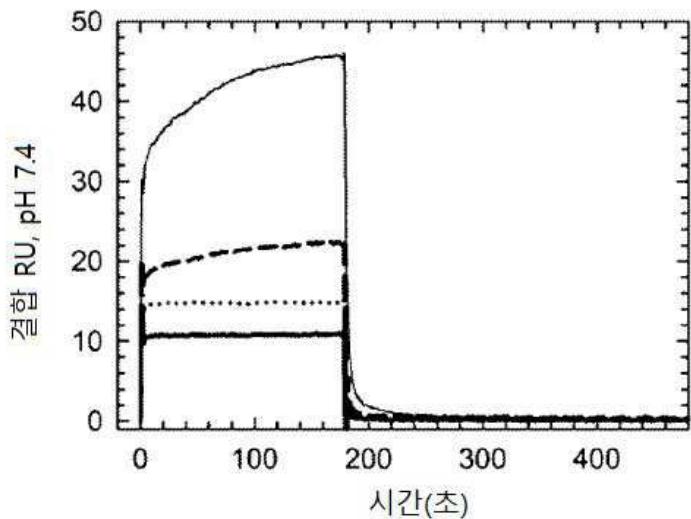
도면22



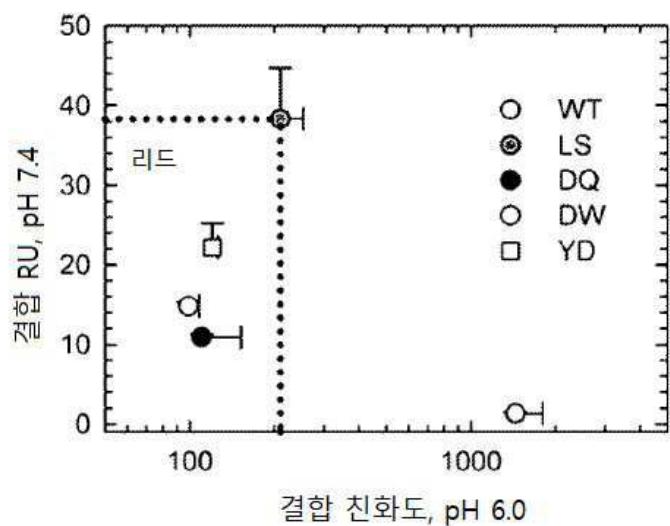
도면23a



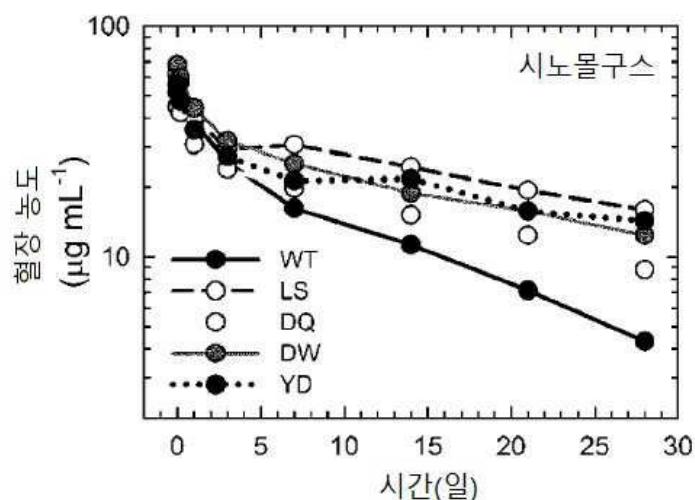
도면23b



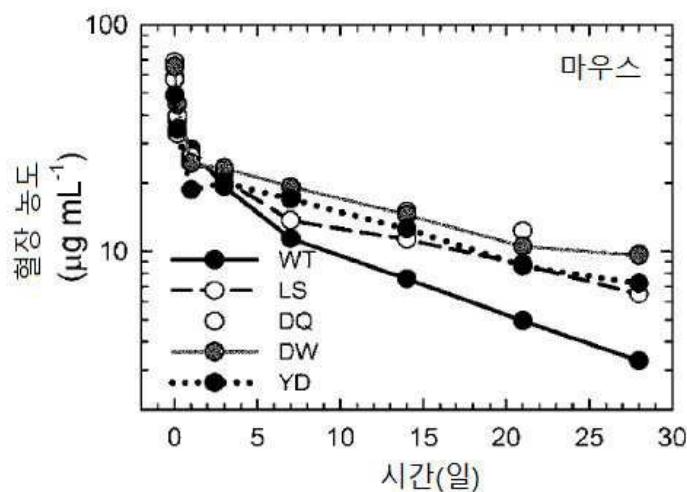
도면23c



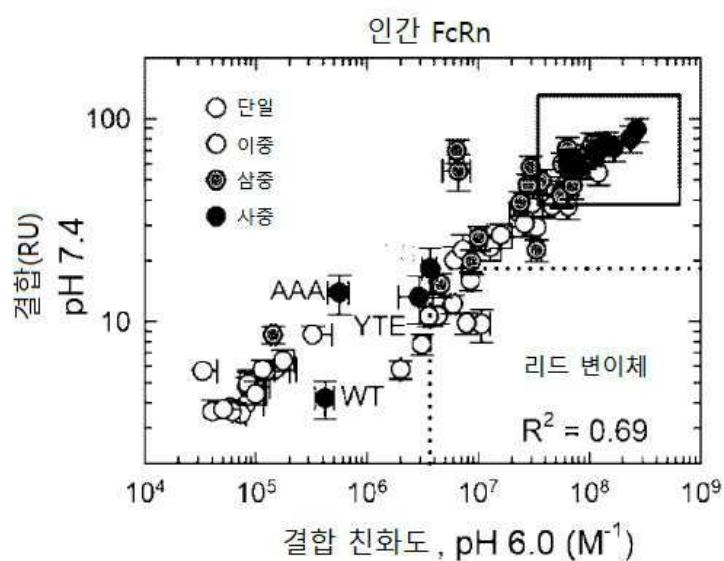
도면24a



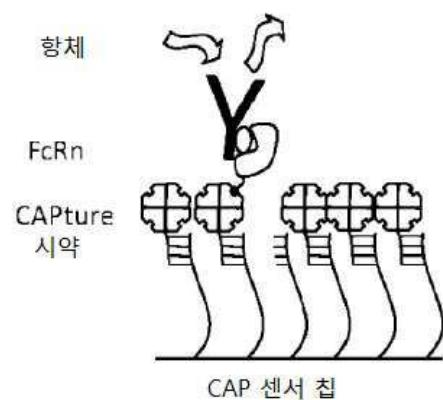
도면24b



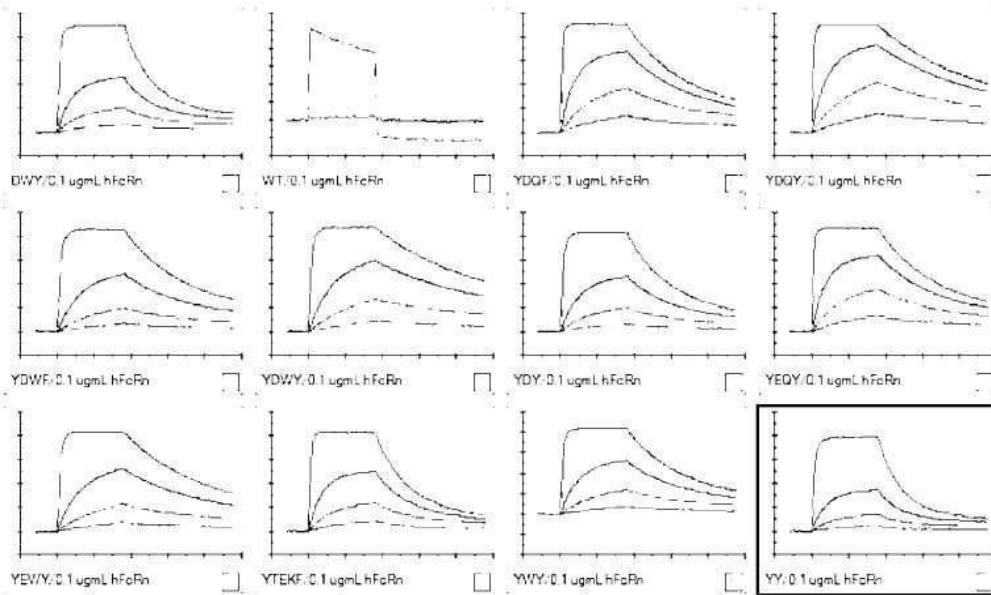
도면25



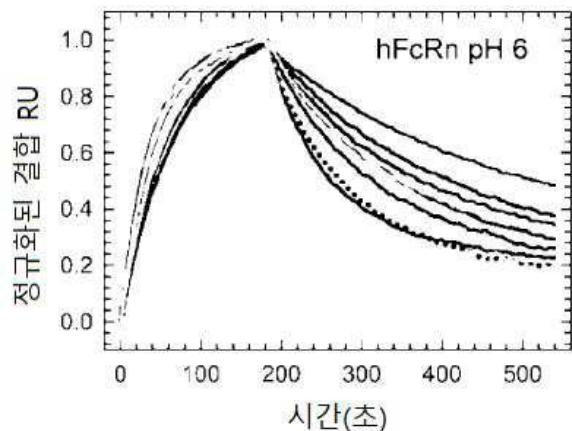
도면26



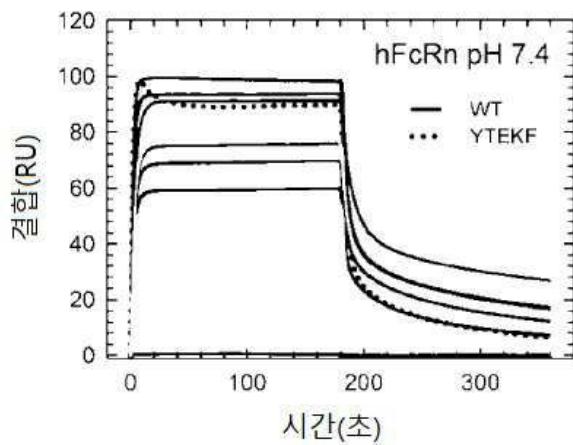
도면27



도면28a



도면28b



도면29

