



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년04월23일
(11) 등록번호 10-1851380
(24) 등록일자 2018년04월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/46 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/468 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0142181
(22) 출원일자 2015년10월12일
심사청구일자 2015년10월12일
(65) 공개번호 10-2017-0042943
(43) 공개일자 2017년04월20일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020140067944 A*
KR1020130135866 A*
J. Microbiol. Biotechnol. 24(3): 408-420
(2014.03.28.)*
J. Biol. Chem. 285(25): 19637-19646
(2010.04.16.)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
아주대학교산학협력단
경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)
(72) 발명자
김용성
경기도 수원시 팔달구 권광로 246, 110동 1703호
(인계동, 래미안 노블클래스)
최혜지
경상북도 구미시 문장로10길 20, 청우자연빌103동
202호(도량동, 청우자연빌)
하지희
경기도 수원시 영통구 월드컵로193번길 7, 502호
(원천동)
(74) 대리인
이처영, 장제환, 김순용

전체 청구항 수 : 총 24 항

심사관 : 조경주

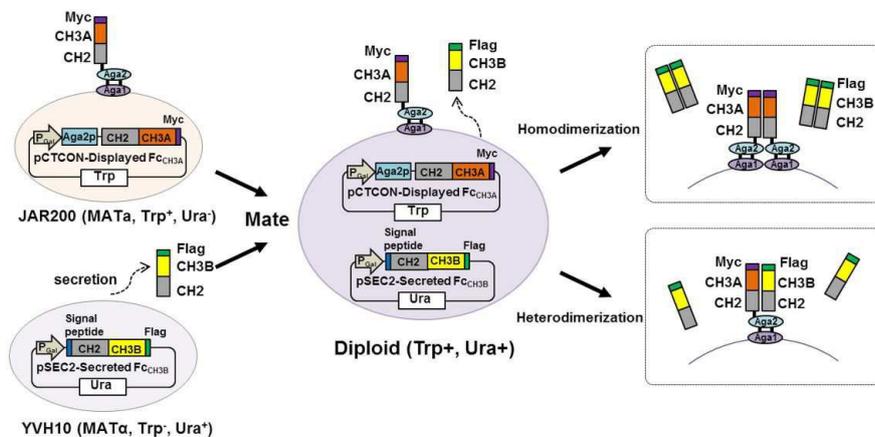
(54) 발명의 명칭 효모접합을 이용한 항체 CH3 도메인 이중이중체 돌연변이쌍 제조 방법 및 이에 의하여 제조된 CH3 돌연변이체 쌍

(57) 요약

본 발명은 인간 항체의 이중이중체 중쇄불변부위 형성 수율 증진을 위해 인간 항체 중쇄불변부위 돌연변이 쌍 조합 라이브러리로부터 이중이중체 고효율 형성을 유도하는 돌연변이체를 평가 및 선별하는 방법 및 이에 의한 이중이중체 중쇄불변부위 (heterodimeric F) 라이브러리에 관한 것이다.

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



또한, 본 발명은 상기 라이브러리에서 이중이중체 중쇄불변부위의 형성이 선호되는 CH3 도메인 돌연변이 쌍, 상기 CH3 돌연변이 쌍을 포함하는 이중이중체 중쇄불변부위 쌍, 이중 특이성 항체, 및 융합 단백질 및 이들의 용도에 관한 것이다.

본 발명에 따른 CH3 도메인 돌연변이체 쌍은 이중이중체 중쇄불변부위를 80~90 % 이상의 고수율로 형성할 뿐 아니라, 열안정성이 뛰어나고, 중쇄불변부위 수용체 (FcRn)에 대한 결합능이 유지되어 있다. 본 발명의 CH3 도메인 돌연변이체 쌍 및 이를 포함하는 이중특이적 항체, 또는 항체불변부위 융합 단백질은 타겟 항원 또는 타겟 단백질 관련 질병의 치료 또는 예방에 유용하게 적용할 수 있다.

(52) CPC특허분류

- C12N 15/81** (2013.01)
- C07K 2317/31** (2013.01)
- C07K 2317/526** (2013.01)
- C07K 2317/56** (2013.01)
- C07K 2317/622** (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

- 과제고유번호 NRF-2014M3C1A3051470
- 부처명 미래창조과학부
- 연구관리전문기관 한국연구재단
- 연구사업명 미래유망융합기술 파이오니어 사업 (세포내 단백질 제어 항체 융합연구단)
- 연구과제명 세포내 단백질 상호작용 제어 항체 기술
- 기 여 율 60/100
- 주관기관 아주대학교 산학협력단
- 연구기간 2014.09.15 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

- 과제고유번호 2013M3A6A4043874
- 부처명 미래창조과학부
- 연구관리전문기관 한국연구재단
- 연구사업명 글로벌프런티어사업 (혁신형의약바이오 컨버전스)
- 연구과제명 ARS 타겟 다기능 항체 개발
- 기 여 율 30/100
- 주관기관 아주대학교 산학협력단
- 연구기간 2013.09.01 ~ 2016.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

- 과제고유번호 2009-0093826
- 부처명 교육부
- 연구관리전문기관 한국연구재단
- 연구사업명 이공분야 중점연구소지원사업
- 연구과제명 신개념 그린융합소재 발굴 및 확보
- 기 여 율 10/100
- 주관기관 아주대학교 산학협력단
- 연구기간 2009.09.01 ~ 2018.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

(1) 아미노산 변이를 포함하는 제1 CH3 도메인을 포함하는 효모 세포 표면 발현 벡터 및 아미노산 변이를 포함하는 제2 CH3 도메인을 포함하는 효모 세포 외 분비 벡터를 준비하는 단계;

(2) 상기 단계 (1)의 벡터를 접합타입이 다른 효모에 각각 형질감염시키는 단계;

(3) 상기 단계 (2)의 효모접합 타입이 다른 두 효모를 효모접합하여 효모 표면에 이종이중체 중쇄불변부위 (heterodimeric Fc)를 형성시키는 단계; 및

(4) 상기 단계 (3)의 접합된 효모 표면에 형성된 이종이중체 중쇄불변부위에서 효모 세포 외 분비 벡터에 포함된 제2 CH3 도메인을 탐지하는 단계를 포함하는,

항체 CH3 도메인의 이종이중체 형성 평가 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 항체 CH3 도메인의 이종이중체는 하기의 변이를 포함하는 것인, 방법.

(A1) 제1 CH3 도메인의 K370 위치에서의 아미노산의 치환; 및

제2 CH3 도메인의 E357 및/또는 S364 위치에서의 아미노산의 치환; 또는

(B1) 제1 CH3 도메인의 D399 위치에서의 아미노산의 치환; 및

제2 CH3 도메인의 K392 및/또는 K409 위치에서의 아미노산의 치환.

(단, 상기 위치는 EU index에 따름)

청구항 3

제1 CH3 도메인을 포함하는 효모 세포 표면 발현 벡터 및 제2 CH3 도메인을 포함하는 효모 세포 외 분비 벡터를 접합타입이 다른 효모에 각각 형질감염시키고, 두 효모를 접합하여 접합된 효모세포 표면에 생성되는 하기의 변이를 포함하는 항체 CH3 도메인의 이종이중체 라이브러리:

(A1) 제1 CH3 도메인의 K370 위치에서의 글루탐산 (E), 메티오닌 (M) 또는 아스파르트산 (D)으로의 치환; 및

제2 CH3 도메인의 E357 위치에서의 아스파라진 (N), 이소류신 (I) 또는 메티오닌 (M)으로의 치환 및/또는 S364 위치에서의 트레오닌 (T) 또는 트립토판 (W)으로의 치환; 또는

(B1) 제1 CH3 도메인의 D399 위치에서의 글루탐산 (E) 또는 류신 (L)으로의 치환; 및

제2 CH3 도메인의 K392 위치에서의 글루탐산 (E), 세린 (S) 또는 글리신 (G)으로의 치환 및/또는 K409 위치에서의 류신 (L) 또는 메티오닌 (M)으로의 치환.

(단, 상기 위치는 EU index에 따름)

청구항 4

하기의 단계를 포함하는 이종이중체 중쇄불변부위의 형성이 선호되는 CH3 도메인 변이체 (heterodimeric CH3) 쌍의 선별 및 제조 방법:

(1') 제1 CH3 도메인의 K370 위치에서 글루탐산 (E), 메티오닌 (M) 또는 아스파르트산 (D)으로 치환하고, 제2 CH3 도메인의 E357 위치에서 아스파라진 (N), 이소류신 (I) 또는 메티오닌 (M)으로 치환 및/또는 S364 위치에서 트레오닌 (T) 또는 트립토판 (W)으로 치환하는 단계; 또는

(1'') 제1 CH3 도메인의 D399 위치에서 글루탐산 (E) 또는 류신 (L)으로 치환하고, 제2 CH3 도메인의 K392 위치에서 글루탐산 (E), 세린 (S) 또는 글리신 (G)으로 치환 및/또는 K409 위치에서 류신 (L) 또는 메티오닌 (M)으로

로 치환하는 단계; 및

(2) 상기 제1 CH3 도메인 돌연변이 라이브러리를 포함하는 효모 세포 표면 발현 벡터 및 제2 CH3 도메인 돌연변이 라이브러리를 포함하는 효모 세포 외 분비 벡터를 접합타입이 다른 효모에 각각 형질전환한 후에, 두 효모의 접합을 통해 효모세포 표면에 이중이중체 중쇄불변부위 라이브러리를 발현하는 단계 후에, 제2 CH3 도메인을 탐지하여 이중이중체 중쇄불변부위의 형성이 선호되는 CH3 도메인 변이체 (heterodimeric CH3) 쌍을 선별하는 제조 방법.

청구항 5

하기의 변이를 포함하는 항체 CH3 도메인의 이중이중체:

(A1-1) 제1 CH3 도메인의 K370은 글루탐산 (E)으로, 제2 CH3 도메인의 E357은 아스파라진 (N)으로 치환;

(A1-2) 제1 CH3 도메인의 K370은 글루탐산 (E)으로, 제2 CH3 도메인의 E357은 이소류신 (I)으로, S364는 트레오닌 (T)으로 치환;

(A1-3) 제1 CH3 도메인의 K370은 메티오닌 (M)으로, 제2 CH3 도메인의 E357은 메티오닌 (M)으로, S364는 트립토판 (W)으로 치환; 또는

(A1-4) 제1 CH3 도메인의 K370은 아스파르트산 (D)으로, 제2 CH3 도메인의 E357은 메티오닌 (M)으로 치환;

또는

(B1-1) 제1 CH3 도메인의 D399는 글루탐산 (E)으로, 제2 CH3 도메인의 K392는 글루탐산 (E)으로 치환;

(B1-2) 제1 CH3 도메인의 D399는 류신 (L)으로, 제2 CH3 도메인의 K392는 세린 (S)으로, K409는 류신 (L)으로 치환; 또는

(B1-3) 제1 CH3 도메인의 D399는 류신 (L)으로, 제2 CH3 도메인의 K392는 글리신 (G)으로, K409는 메티오닌 (M)으로 치환.

(단, 상기 위치는 EU index에 따름)

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

청구항 5에 있어서, (A1-1) 내지 (A1-4)의 이중이중체는 하기의 변이를 추가로 포함하는 것인, 항체 CH3 도메인의 이중이중체:

제1 CH3 도메인의 K409의 트립토판 (W)으로 치환; 및

제2 CH3 도메인의 D399의 발린(V)으로, F405의 트레오닌 (T)으로 치환.

청구항 11

청구항 5에 있어서, (A1-1)의 이중이중체는 하기의 변이를 추가로 포함하는 것인, 항체 CH3 도메인의 이중이중체:

(A2) 제1 CH3 도메인의 E357 및 S364 위치에서의 아미노산의 치환.

(단, 상기 위치는 EU index에 따름)

청구항 12

청구항 11에 있어서, A2 변이에서

제1 CH3 도메인의 E357은 아스파르트산 (D), 알라닌 (A), 글리신 (G), 또는 아스파라진 (N)으로 치환; 및/또는

제1 CH3 도메인의 S364은 트립토판 (W) 또는 타이로신 (Y)으로 치환되는 것인, 항체 CH3 도메인의 이종이중체.

(단, 상기 위치는 EU index에 따름)

청구항 13

청구항 12에 있어서, 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 변이를 포함하는 것인, 항체 CH3 도메인의 이종이중체:

(A2-1) 제1 CH3 도메인의 E357은 아스파르트산 (D)으로, 제1 CH3 도메인의 S364는 트립토판 (W)으로 치환;

(A2-2) 제1 CH3 도메인의 E357은 알라닌 (A)으로, 제1 CH3 도메인의 S364는 타이로신 (Y)으로, 치환;

(A2-3) 제1 CH3 도메인의 E357은 글리신 (G)으로, 제1 CH3 도메인의 S364는 트립토판 (W)으로 치환; 및

(A2-4) 제1 CH3 도메인의 E357은 아스파라진 (N)으로, 제1 CH3 도메인의 S364는 트립토판 (W)으로 치환.

(단, 상기 위치는 EU index에 따름)

청구항 14

청구항 5에 있어서, (B1-3)의 이종이중체는 하기의 변이를 추가로 포함하는 것인, 항체 CH3 도메인의 이종이중체:

제1 CH3 도메인의 K392 및/또는 K409 위치에서의 아미노산의 치환; 및

제2 CH3 도메인의 D399 위치에서의 아미노산의 치환.

(단, 상기 위치는 EU index에 따름)

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 (B1-3)의 이종이중체에서,

제1 CH3 도메인의 K392는 이소류신 (I), 아르기닌 (R), 시스테인 (C), 류신 (L), 세린 (S), 또는 아스파라진 (N)으로 치환; 및/또는

제1 CH3 도메인의 K409는 아르기닌 (R)으로 치환; 및

제2 CH3 도메인의 D399는 글리신 (G), 트립토판 (W), 시스테인 (C), 세린 (S), 또는 발린 (V)으로 치환되는 것인, 항체 CH3 도메인의 이종이중체.

(단, 상기 위치는 EU index에 따름)

청구항 16

청구항 14에 있어서, 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 변이를 포함하는 것인, 항체 CH3 도메인의 이종이중체:

(B2-1) 제1 CH3 도메인의 K392는 이소류신 (I)으로, 제2 CH3 도메인의 D399는 글리신 (G)으로 치환;

(B2-2) 제1 CH3 도메인의 K392는 아르기닌 (R)으로, K409는 아르기닌 (R)으로, 제2 CH3 도메인의 D399는 트립토판 (W)으로 치환;

(B2-3) 제1 CH3 도메인의 K392는 시스테인 (C)으로, 제2 CH3 도메인의 D399는 시스테인 (C)으로 치환;

(B2-4) 제1 CH3 도메인의 K392는 류신 (L)으로, 제2 CH3 도메인의 D399는 세린 (S)으로 치환;
 (B2-5) 제1 CH3 도메인의 K392는 세린 (S)으로, 제2 CH3 도메인의 D399는 글리신 (G)으로 치환; 및
 (B2-6) 제1 CH3 도메인의 K392는 아스파라진 (N)으로, 제2 CH3 도메인의 D399는 발린 (V)으로 치환.
 (단, 상기 위치는 EU index에 따름)

청구항 17

청구항 5에 있어서, 상기 항체 CH3 도메인의 이종이중체는 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE로 이루어진 군으로부터 선택된 면역글로불린의 Fc 부분에 포함되는 것을 특징으로 하는, 항체 CH3 도메인의 이종이중체.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 IgG는 인간 IgG인 것을 특징으로 하는, 항체 CH3 도메인의 이종이중체.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 상기 인간 IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 항체 CH3 도메인의 이종이중체.

청구항 20

청구항 5의 CH3 도메인의 이종이중체를 포함하는 이종이중체 중쇄불변부위 (heterodimeric Fc) 쌍.

청구항 21

청구항 5의 CH3 도메인의 이종이중체를 포함하는, 이중 특이성 항체.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 상기 항체는 scFv-Fc, scIgG(scFab-Fc), (Fv)2-Fc, 및 mAb-Fv으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 이중특이성 항체.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 상기 scFv-Fc는 이종이중체 중쇄불변부위 쌍의 N-말단 또는 C-말단에 항원 특이성이 다른 2종의 항체 절편 scFv가 융합된 것인, 이중특이성 항체.

청구항 24

청구항 22에 있어서, 상기 scIgG(scFab-Fc)는 2종의 scFab가 융합된 것인, 이중특이성 항체.

청구항 25

청구항 22에 있어서, 상기 (Fv)2-Fc는 항원 결합 Fv를 이루는 중쇄가변부위(VH) 및 경쇄가변부위(VL) 쌍의 2종이 이종이중체 중쇄불변부위 쌍의 N-말단 및 C-말단에 각각 융합된 것인, 이중특이성 항체.

청구항 26

청구항 22에 있어서, 상기 mAb-Fv는 이종이중체 중쇄불변부위 쌍으로 이루어진 IgG의 중쇄 C-말단에 가변 단일 항원 결합도메인 (VH 또는 VL)이 각각 융합된 이중특이성 가변 부위 융합 단일 항체의 형태인 것인, 이중특이성 항체.

청구항 27

청구항 20의 이종이중체 중쇄불변부위 쌍을 포함하는 1가 항원 결합 항체로서, 상기 항체는 이종이중체 중쇄불변부위 쌍의 N-말단 또는 C-말단에 단일 항원에 결합하는 중쇄가변부위 (VH) 및 경쇄가변부위 (VL)을 융합하여 단일 항원에 1가(monovalent)로 결합할 수 있는 Fv-Fc 형태인 것인, 항체.

청구항 28

청구항 20의 이중이중체 중쇄불변부위 쌍의 N-말단 또는 C-말단에 2종의 단백질이 융합된 융합 단백질.

청구항 29

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 효모 세포 표면 발현 (yeast surface display) 및 효모 접합 (yeast mating)을 이용한 항체 CH3 도메인의 이중이중체 형성 평가 방법 및 이를 이용한 인간 항체 (immunoglobulin G, IgG)의 이중이중체 중쇄불변부위 (heterodimeric F) 라이브러리를 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0002] 또한, 본 발명은 상기 라이브러리 및 상기 라이브러리를 통하여 이중이중체 중쇄불변부위의 형성이 선호되는 CH3 도메인 돌연변이체 쌍을 선별하는 방법에 관한 것이다.
- [0003] 또한, 본 발명은 이중이중체 중쇄불변부위의 형성이 선호되는 CH3 도메인 돌연변이 쌍, 상기 CH3 돌연변이 쌍을 포함하는 이중이중체 중쇄불변부위 쌍, 이중 특이성 항체, 및 융합 단백질에 관한 것이다.
- [0004] 또한, 본 발명은 상기 이중이중체, 이를 포함하는 이중이중체 중쇄불변부위 쌍, 이중 특이성 항체, 및 융합 단백질을 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0005] 19세기 말 비-치사량의 디프테리아와 과상풍이 투여된 실험동물의 혈청을 다른 동물에게 투여함으로써 디프테리아와 과상풍으로부터 보호받을 수 있다는 사실이 발견된 이후 혈청 치료, 즉 항체 치료의 개념이 점차적으로 임상에 활용되기 시작하였다. 하지만, 초기의 항체 치료는 고순도의 항체 및 혈액 유래 전염성 매개체의 오염 등의 문제점으로 인하여 실용성이 극히 제한되었다. 이러한 전통적인 항체치료의 문제점은 1975년에 개발된 하이브리도마 융합 기술 (hybridoma fusion technique)로 인해 순수한 형태의 설치류 기원 단클론 항체를 비교적 저렴한 가격으로 대량 생산할 수 있게 되어 새로운 전환점을 맞이하게 되었으나, 생쥐 기원의 단클론 항체가 인체 투여 시 일으키는 짧은 반감기, 항-생쥐 항체에 대한 면역반응, 효능저하, 치명적인 알레르기 반응 등 여러 단점 및 부작용으로 인해 임상에서의 사용이 제한되었다.
- [0006] 1980년대 바이오혁명의 시발점이 된 유전자 재조합 기술의 등장으로 생쥐 단클론 항체를 유전자 조작을 통해 인간화시키는 인간화 항체 (humanized antibody)의 제작을 가능케 했으며, 환자 투여 시 발생했던 다양한 면역적 부작용을 최소화시켜 치료용 항체가 임상에 적극적으로 활용될 수 있는 기틀을 마련하였다. 한편, 1990년 중반부터 파지 디스플레이 (phage display) 기술 혹은 유전자 이식 생쥐를 사용하여 완전한 인간 단클론 항체를 만들 수 있는 원천기술이 개발되었으며, 현재 국내외 많은 제약사들이 사활을 걸고 항체를 이용한 신약 개발에 막대한 연구와 투자를 진행하고 있다. 현재 약 40개의 항체 신약이 미국 식약청의 허가를 받아 전 세계적으로 시판되고 있으며, 300개 이상의 치료용 항체가 임상실험 단계에 있어 제약산업에서의 항체의 중요성을 잘 증명해 주고 있다. 한편 최근 들어 표적선택성을 지닌 항체와 표적특이성이 없는 화학요법 치료제를 병행투여 함으로써 부작용을 억제하고 치료 효과가 개선된다는 전임상 및 임상실험 결과가 도출되고 있어 항암치료에 있어서 항체의 유용성이 더욱 확대될 예정이다.
- [0007] 한편, 현재의 항체 신약은 암, 자가면역질환 등을 주요 타겟으로 개발되었는데, 특히 고형암 (solid tumor)의 경우 IgG 혹은 순수한 항체 형태의 항체 신약이 만족할 만한 치료 효과를 보이지 않고, 항체 생산의 고비용 문제 등이 항체 신약 개발에 걸림돌이 되고 있어, 기존 항체보다 생물학적 효능이 개선된 재조합 단백질 형태의 새로운 항체 신약 개발 시도가 꾸준히 진행되어 왔다. 그 중 하나가 특히 항암 치료에 활용하고자 1980년대 중반부터 연구가 시작된 한 개의 항체가 최소한 두 개 이상의 표적분자와 결합할 수 있는 이중특이성 항체라고 할 수 있다.
- [0008] 자연에 존재하는 항체 (Immunoglobulin G (IgG), IgM, IgD, IgE, IgA)는 동일한 아미노산 서열을 가진 두 개의 중쇄와 동일한 서열을 가진 두 개의 경쇄가 조합 (assembly)된 형태로 존재한다. 이때, 동일한 두 개의 중쇄간의 동중이중체 (homodimer)는 항체의 불변영역 (Fc, crystallizable fragment)의 마지막 도메인 (즉 IgG의 경

우 CH3 도메인, IgM의 경우 CH4 도메인, IgD의 경우 CH3도메인, IgE의 경우 CH2 및 CH4도메인, IgA의 경우 CH3 도메인) 간의 비공유결합 (non-covalent interaction)을 통해 형성이 유도되고, 이어서 힌지 (hinge) 영역간의 이황화 결합 (disulfide bond)이 유도되어, 견고한 중쇄간의 동종이중체가 형성된다. 구체적으로, 인간 IgG1에 있어서 중쇄와 경쇄의 조합은 중쇄 힌지 영역의 5번째 Cys와 kappa 경쇄의 107번째 Cys 간의 이황화 결합에 의해 유도된다. 상기 항체 사슬의 아미노산 숫자는 EU 넘버링에 의한 것이다 (Cunningham, Pflumm et al. 1969).

[0009] 이때, 상기 용어 "비공유결합 (non-covalent interaction)"은 원자 또는 분자가 공유결합 이외의 상호작용에 의해 집합체를 형성할 때 결합력이 약한 상호작용을 의미하는 것으로, 정전기적 결합 (electrostatic interaction), 소수성 결합 (hydrophobic interaction), 수소 결합 (hydrogen bonding), 양이온- π 결합 (cation- π interaction), 반데르발스 결합(Van Der Waals interaction)에 의한 상호작용을 포함한다. 또한, 상기 용어 "정전기적 결합(electrostatic interaction)"은 반대 전하를 갖는 이온 사이의 전기적 인력에 의존하는 결합을 의미하고, 상기 용어 "소수성 결합 (hydrophobic interaction)"은 극성 용매와의 상호작용을 피하고 열역학적으로 안정화하기 위한 소수성 분자들의 경향에 따른 결합을 의미하며, 상기 용어 "수소 결합 (hydrogen bonding)"은 수소와 플루오린, 산소, 질소가 만나 생긴 극성 공유 결합 분자 사이에 생기는 쌍극자 쌍극자간 상호작용을 의미하며, 상기 용어 "양이온- π 결합 (cation- π interaction)"은 양전하를 가지는 분자와 전자가 풍부한 방향족 고리가 포함된 분자 간의 상호작용을 의미한다. 또한, 상기 용어 "반데르발스 결합(Van Der Waals interaction)"은 Van Der Waals 힘에 의해 분자에 극성이 생겨 상호간에 인력과 척력의 작용으로 이루어지는 결합을 의미한다. 또한, 상기 용어 "동종이중체"는 동일한 아미노산 서열을 지닌 항체 도메인 또는 이를 포함하는 항체의 일부 또는 전체의 이중체를 의미하며, 구체적으로 인간 항체의 중쇄불변부위의 CH3 도메인간의 이중체 또는 이 동일한 CH3 도메인을 포함한 항체 중쇄불변부위 이중체를 의미한다.

[0010] 따라서, 자연에 존재하는 단일클론항체 (monoclonal antibody, mAb)는 1종의 항원에 대해 이가 (bivalent)의 형태로 결합하는 특성을 보인다. 반면에 이중특이성 항체 (bispecific antibody)는 하나의 단일분자 형태의 항체로 2종의 항원을 동시에 (simultaneously) 또는 교차적으로 (alternatively) 결합할 수 있는 항체를 의미한다. 이러한 이중특이성 항체는 2개 이상의 항원과 결합할 수 있는 이중- 또는 다중특이적 항체와 같은 조작된 단백질로 당 업계에 공지되어 있으며, 세포 융합, 화학적 접합, 재조합 DNA 기술을 사용하여 제작할 수 있다.

[0011] 기존의 이중특이성 항체는 목적하는 특이성을 가지는 쥐 단일클론 항체를 발현하는 2개의 상이한 하이브리도마 (hybridoma) 세포주의 체세포 융합을 이용한 쿼드로마 (quadroma) 기술을 사용하여 제조되었는데 (Milstein and Cuello, 1983), 이 경우 쿼드로마 세포주 내에서 각기 다른 두 개의 경쇄가 무작위적으로 쌍을 이루어 최대 10 가지 정도의 다양한 항체가 만들어지며, 이 항체 혼합물로부터 원하는 단 한가지의 이중특이성 항체를 분리 정제하는 것이 매우 어렵다는 단점이 있었다. 따라서 잘못된 쌍을 형성한 부산물 및 감소된 생산 수율에 의해 목적하는 이중항체만을 얻기 위해서는 복잡한 정제 과정들이 요구되었다 (Morrison et al., 2007).

[0012] 이러한 문제를 해결하기 위한 하나의 방법으로, 경쇄와 중쇄의 항원결합부위 절편을 다양한 사슬로 연결하여 단일 구조체 (single constructs)로 발현하는 형태의 이중특이성 항체가 개발되었으며, 이러한 형태에는 단일사슬 다이아바디 (single chain diabodies), 탠덤 (tandem) 단일사슬항체절편 (scFv) 등의 형태가 포함된다 (Holliger and Hudson, 2005). 또한, 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단 또는 C-말단에 추가의 항원결합 항체 절편을 융합한 Ig와 유사한 형태의 이중특이성 항체 또한 제조되었다 (Miller, Meng et al., 2003; Lu, Zhang et al., 2004).

[0013] 그러나, 이러한 항체 절편 조합에 기반한 이중특이성 항체는 낮은 안정성으로 인한 발현 양의 감소, 항체 응집 (aggregation) 형성 및 이로 인해 증가된 면역원성의 문제점이 존재한다 (Chan and Carter, 2010). 또한, 항체 절편 조합에만 기반한 이중특이성 항체는 항체의 중쇄불변부위 (Fc)가 없어, 중쇄불변부위와 연관되어 증가되는 안정성, 증가된 크기와 Fc 수용체 (neonatal Fc receptor, FcRn)와 결합으로 인한 혈청 내 반감기의 증가 (long serum half-life), 정제과정에서의 결합부위 보존 (protein A and protein G)의 이점, 항체-의존성 세포 세포독성 (antibody-dependent cellular cytotoxicity), 보체-의존성 세포독성 (complement-dependent cellular cytotoxicity)이 부재한 문제점이 있다 (Chan and Carter, 2010).

[0014] 따라서, 이상적으로는 자연발생적 항체 (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE) 와 구조가 매우 유사하고, 서열에 있어 최소의 편차를 가진 이중특이성 항체를 개발하는 것이 요구되고 있다.

[0015] 이 문제를 해결하기 위해, 이중이중체 중쇄불변부위를 이용한 이중특이성 항체의 개발이 시도되었다. 이 기술은 유전자 조작을 통해 각기 다른 두 개의 항체 중쇄의 CH3 도메인에 돌연변이를 유도하여, 두 개의 중쇄가 이중이

중체를 형성하도록 유도하는 것이다 (미국특허 US 7695936 B2; 대한민국 등록특허 10-1522954).

- [0016] 야생형의 IgG 항체의 경우, CH3 도메인의 동종이중체는 CH3 도메인 상호작용면의 중심(소수성 코어)에 위치하는 소수성 결합을 유도하는 잔기 (L351, T366, L368, Y407)들과 그 주위의 대칭적인 정전기적 결합을 유도하는 잔기 (E357, K370, K392, D399, K409)들에 의해 형성되는 것이 알려져 있다 (Gunasekaran et al., 2010; Choi et al., 2013). 따라서 지금까지 알려진 이종이중체 형성을 유도하는 CH3 도메인 돌연변이체는 대부분 CH3 도메인 상호작용면에 항체의 구조 기반 rational design에 의한 비대칭적 돌연변이 쌍을 도입함으로써 제조되었다 (Spreter Von Kreudenstein et al., 2014).
- [0017] 상기한 방법 중 하나는 knob-into-hole (knob-into-hole) 기술을 이용한 것이다. knob-into-hole 기술은 CH3 도메인 상호작용면의 소수성 코어에 위치하는 잔기들에 대하여, 한쪽 CH3 도메인에는 측쇄의 크기가 큰 소수성아미노산 잔기들을 측쇄가 작은 소수성 아미노산으로 치환하여 hole 구조로 만들고 (T366S, L368A, Y407V), 다른 CH3 도메인에는 측쇄의 크기가 작은 소수성 아미노산 잔기를 측쇄가 큰 소수성 아미노산으로 치환하여 knob 구조를 만들어 (T366W), 돌연변이 쌍이 도입된 중쇄불변부위를 공동 발현하였을 때, 공간보완적인 소수성 결합이 형성되어 이종이중체 형성이 선호되게 한 것이다 (Ridgway et al., 1996). 이와 유사한 전략을 이용하여 제조된 CH3 도메인 돌연변이체로는 HA-TF (Moore GL et al., 2011), ZW1 (Von Kreudenstein et al., 2013), SEEDBody (Davis JH et al., 2010)이 보고되어있다.
- [0018] 이종이중체의 형성을 증진한 다른 방법으로 CH3 도메인 상호작용면에 존재하는 전하를 띠는 아미노산에 돌연변이를 유도하여, 한쪽 CH3 도메인은 모두 양전하를 갖는 측쇄 아미노산으로, 다른 쪽 CH3 도메인은 모두 음전하를 갖는 측쇄 아미노산으로 돌연변이를 유도하여 정전기적 반발력에 의해 동종이중체 형성은 저해되고 정전기적 인력에 의해 이종이중체의 형성을 증진시킬 수 있다. 이러한 전략을 이용하여 제조된 CH3 도메인 돌연변이체로는 DD-KK (Gunasekaran et al., 2010), EEE-RRR (Strop P et al., 2012)이 보고되어 있다.
- [0019] 이종이중체의 형성을 증진한 또 다른 방법으로 CH3 도메인 상호작용면의 소수성 코어는 보존하고 전하를 띠는 아미노산에 돌연변이를 유도하여 공간보완적인 소수성 결합이 형성되게 하고 (K409W_{CH3A}-D399V/F405T_{CH3B}), CH3 도메인 상호작용면의 가장자리에 추가적인 장거리 정전기적 결합이 형성되도록 하여 (K360E_{CH3A}-Q347R_{CH3B}) 이종이중체의 형성을 증진시킨 방법이 있다 (Choi et al., 2013; 대한민국 등록특허 10-1522954)
- [0020] 하지만 상기 개발된 CH3 도메인 돌연변이체 쌍을 포함하는 이종이중체 중쇄불변부위의 열역학적 안정성 (thermodynamic stability)과 발현 수율 (expression yield)은 야생형 항체와 비교하여 낮은 결과를 보여주고 있다.
- [0021] 따라서, 가능한 높은 이종이중체 형성수율을 나타내면서, 야생형과 비교하여 열역학적 안정성과 발현 수율이 비슷하거나 향상된 이종이중체 중쇄불변부위의 개발에 대한 필요성이 대두되고 있으나, 아직까지 이를 충족시킬 만한 보고는 이루어지지 않고 있는 실정이다.
- [0022] 또한 지금까지의 이종이중체 형성 증진을 위한 전략으로 항체의 구조 기반 rational design을 이용하여 CH3 도메인 상호작용면에 공간보완적 소수성 결합 또는 정전기적 결합을 도입하였기 때문에, 새로운 종류의 비공유결합을 지니는 CH3 도메인 돌연변이체의 개발에 대한 필요성이 요구된다.
- [0023] 따라서 본 발명자는 효모 세포 표면 발현 시스템을 이용한 이종이중체 중쇄불변부위의 형성능을 평가하는 시스템을 제작하였으며, 이를 활용하여 인간 항체 이종이중체 중쇄불변부위 라이브러리를 구축 후 고속선별을 통해 이종이중체 형성능이 높은 CH3 도메인 돌연변이체를 선별하였다. 또한 선별된 CH3 도메인 돌연변이체들이 수소 결합 및 양이온- π 결합과 같은 새로운 종류의 비공유결합에 의해 이종이중체의 형성이 선호됨을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0024] (비특허문헌 0001) Atwell, S., J. B. Ridgway, et al. (1997). "Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library." J Mol Biol 270(1): 26-35.
- (비특허문헌 0002) Baek et al. (2014) "Construction of a large synthetic human Fab antibody library on

yeast cell surface by optimized yeast mating." J Microbiol Biotechnol 24:408-420.

(비특허문헌 0003) Chan, A. C. and P. J. Carter (2010). "Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation." Nat Rev Immunol 10(5): 301-316.

(비특허문헌 0004) Choi et al. (2013) "A heterodimeric Fc-based bispecific antibody simultaneously targeting VEGFR-2 and Met exhibits potent anti-tumor activity." Mol Cancer Ther 12:2748-2759.

(비특허문헌 0005) Choi et al. (2015) "Crystal structures of immunoglobulin Fc heterodimers reveal the molecular basis for heterodimer formation." Mol Immunol 65:377-383.

(비특허문헌 0006) Cunningham, B. A., M. N. Pflumm, et al. (1969). "Subgroups of amino acid sequences in the variable regions of immunoglobulin heavy chains." Proc Natl Acad Sci U S A 64(3): 997-1003.

(비특허문헌 0007) Davis, J. H., C. Aperlo, et al. (2010). "SEEDbodies: fusion proteins based on strand-exchange engineered domain (SEED) CH3 heterodimers in an Fc analogue platform for asymmetric binders or immunofusions and bispecific antibodies." Protein Eng Des Sel 23(4): 195-202.

(비특허문헌 0008) Feng Y. et al. (2011). "Design, expression and characterization of a soluble single-chain functional human neonatal Fc receptor." Protein Expression and Purification 79(1):66-71.

(비특허문헌 0009) Gunasekaran, K., M. Pentony, et al. (2010). "Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering effects: applications to bispecific molecules and monovalent IgG." J Biol Chem 285(25): 19637-19646.

(비특허문헌 0010) Holliger, P. and P. J. Hudson (2005). "Engineered antibody fragments and the rise of single domains." Nat Biotechnol 23(9): 1126-1136.

(비특허문헌 0011) Kim et al. (2007). "Comparative analyses of complex formation and binding sites between human tumor necrosis factor- α and its three antagonists elucidate their different neutralizing mechanisms." J Mol Biol 374:1374-88

(비특허문헌 0012) Lu, D., H. Zhang, et al. (2004). "Simultaneous blockade of both the epidermal growth factor receptor and the insulin-like growth factor receptor signaling pathways in cancer cells with a fully human recombinant bispecific antibody." J Biol Chem 279(4): 2856-2865.

(비특허문헌 0013) Miller, K., G. Meng, et al. (2003). "Design, construction, and in vitro analyses of multivalent antibodies." J Immunol 170(9): 4854-4861.

(비특허문헌 0014) Milstein, Cuello et al. (1983). "Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry." Nature 305:537-540.

(비특허문헌 0015) Moore, G. L., C. Bautista, et al. (2011). "A novel bispecific antibody format enables simultaneous bivalent and monovalent co-engagement of distinct target antigens." MAbs 3(6): 546-557.

(비특허문헌 0016) Ridgway, J. B., L. G. Presta, et al. (1996). "'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization." Protein Eng 9(7): 617-621.

(비특허문헌 0017) Strop, P et al. (2012) "Generating bispecific human IgG1 and IgG2 antibodies from any antibody pair." J Mol Biol 420:204-219.

(비특허문헌 0018) Spreter Von Kreudenstein et al. (2014) "Protein engineering and the use of molecular modeling and simulation: the case of heterodimeric Fc engineering." Methods 65:77-94.

(비특허문헌 0019) Von Kreudenstein et al. (2013) "Improving biophysical properties of a bispecific antibody scaffold to aid developability: quality by molecular design." mAbs 5:646-654.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0025] 본 발명은 상기와 같이 인간 항체의 이중이중체 중쇄불변부위 형성 수율을 90% 이상으로 안정적으로 증진시키는 기술을 개발하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 일 양상은 이중이중체 중쇄불변부위 라이브러리 및 효모접합을 통한 항체 CH3 도메인의 이중이중체 형성 평가 방법을 제공하는 것이다.
- [0026] 또한, 본 발명의 다른 양상은 이중이중체 중쇄불변부위의 형성이 선호되는 CH3 도메인 변이체 (heterodimeric CH3) 쌍의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0027] 또한, 본 발명의 다른 일 양상은 상기 평가방법에 의하여 이중이중체 중쇄불변부위 라이브러리를 통해 선별된, 이중이중체의 형성 수율이 증진된 CH3 도메인 돌연변이 쌍을 제공하는 것이다.
- [0028] 또한, 본 발명의 또 다른 양상은 상기 제조된 이중이중체 중쇄불변부위 쌍을 포함하는 단백질을 세포에서 발현 생산하여, 원래 야생형 항체의 발현, 생산수율 (production yield) 및 열역학적 안정성 (thermodynamic stability)과 비슷하거나, 향상된 특징을 보이는 이중특이성 항체 또는 항체불변부위 융합 단백질을 제공하는 것이다.
- [0029] 아울러, 본 발명의 또 다른 양상은 상기 제조된 이중이중체 중쇄불변부위 쌍을 포함하는 단백질을 세포에서 발현 생산하여, 원래 야생형 항체가 지니는 중쇄불변부위의 고유기능, 즉 FcRn (neonatal Fc receptor) 과의 결합 능력이 유지되어 혈액 내 긴 반감기 (long serum half-life)를 가지게 되고 효과 기능 (effector function)을 유지하면서, 정제과정에서의 결합부위 (protein A 및 protein G)가 보존되는 항체 또는 항체불변부위 융합 단백질을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0030] 본 발명의 일 양상은 하기의 단계를 포함하는 항체 CH3 도메인의 이중이중체 형성 평가 방법을 제공한다:
- [0031] (1) 제1 CH3 도메인을 포함하는 효모 세포 표면 발현 벡터 및 제 2 CH3 도메인을 포함하는 효모 세포의 분비 벡터를 준비하는 단계;
- [0032] (2) 상기 단계 (1)의 벡터를 각각 효모에 형질감염시키는 단계;
- [0033] (3) 상기 단계 (2)의 각각의 효모를 효모접합하는 단계; 및
- [0034] (4) 상기 단계 (3)의 접합된 효모 표면에 효모 세포 외 분비 벡터에 포함된 제2 CH3 도메인을 탐지하는 단계.
- [0035] 본 발명에 대하여 이하 상세히 설명한다.
- [0036] 본 명세서에서 사용하는 용어 "이중이중체"는 아미노산 서열이 서로 다른 2종의 항체 도메인 또는 이를 포함하는 항체의 일부 또는 전체로 이루어진 이중체를 의미하며, 구체적으로 인간 항체의 중쇄불변부위의 서열이 다른 CH3 도메인 쌍의 이중체 또는 서열이 다른 CH3 도메인 쌍을 포함하는 항체의 일부 또는 전체로 이루어진 이중체를 의미한다.
- [0037] 또한, 상기 용어 "이중이중체 중쇄불변부위 (heterodimeric Fc)"는 아미노산 서열이 다른 CH3A, CH3B를 각각 포함하는 중쇄불변부위 (hinge-CH2-CH3)간의 이중체를 의미한다.
- [0038] 또한, 상기 용어 "이중이중체 중쇄불변부위 형성 수율"은 CH3 도메인 돌연변이 쌍이 포함된 중쇄불변부위 쌍을 HEK293F 동물세포에 동시에 형질전환하여 발현하고 정제하였을 때, 전체 중쇄불변부위 이중체 (homodimer, heterodimer) 또는 단일체 (monomer)의 합에서 이중이중체로 형성된 중쇄불변부위의 비율을 백분율로 나타낸 것을 의미한다.
- [0039] 본 발명의 일 실시예에서는 CH3 도메인 간 상호작용에 기여하는 아미노산 잔기를 변형하여, 제1 CH3 도메인 (CH3A), 제2 CH3 도메인 (CH3B)가 비공유결합을 통해 서로 선택적으로 상호작용할 수 있는 쌍 (CH3A:CH3B)의 형

성을 유도함으로써, CH3 돌연변이 쌍이 힌지(hinge)-CH2의 C-말단에 융합된 중쇄불변부위 쌍, 즉 hinge-CH2-CH3A 및 hinge-CH2-CH3B 사이에 이중이중체 중쇄불변부위가 형성되는 수율을 증진시키고자 예의 노력하였으며, 이로부터, 각각의 CH3 도메인 상의 특정 위치의 아미노산 치환이 이중이중체 중쇄불변부위의 형성 수율을 증진 시킴을 확인하였다.

[0040] 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에서 directed evolution을 이용하여 이중이중체를 고수율로 형성하는 CH3 도메인 돌연변이체 쌍을 선별하기 위하여 이중이중체 형성수율을 정량적으로 평가하는 시스템을 구축하였다.

[0041] 본 발명의 일 실시예에서는 효모 접합 (yeast mating)을 이용하여 인간항체 이중이중체 중쇄불변부위를 효모 세포 표면에 발현하였으며, CH3A 도메인이 포함된 중쇄 (displayed Fc_{CH3A})를 효모 세포 표면 발현백터에, CH3B 도메인이 포함된 중쇄 (secreted Fc_{CH3B})를 효모 세포 외 분비백터에 구축하여 각각 접합 타입이 다른 효모 균주인 JAR200 (MATa, Trp⁺, Ura⁻)와 YVH10 (MATα, Trp⁻, Ura⁺)에 형질전환 하여 선별 배양한 후 두 균주를 효모 접합 하여 이배체 (diploid)만 선별하였다. 선별된 이배체는 displayed Fc_{CH3A}와 secreted Fc_{CH3B}의 발현을 유도하였다. 이 때 세포 외로 분비된 secreted Fc_{CH3B}는 효모 세포 표면에 발현된 displayed Fc_{CH3A}와 비공유결합 을 통해 조합됨으로써 이중이중체 중쇄불변부위가 효모 세포 표면에 형성된다.

[0042] 상기 기술한 이중이중체 중쇄불변부위의 효모 세포 표면 발현 시스템은 이배체가 발현한 중쇄불변부위의 이중이중체 형성 수율을 평가하는 데 이용될수 있다. 구체적으로 이배체가 발현하는 이중이중체 중쇄불변부위 형성이 동종이중체 형성보다 우세할 경우에는 효모 세포 외로 분비된 secreted Fc_{CH3B}가 효모 세포 표면에 발현된 displayed Fc_{CH3A}와 조합되어 세포 표면에 고정되므로 효모 세포 표면에서 secreted Fc_{CH3B}가 탐지된다. 반면 이배체가 발현하는 중쇄불변부위의 동종이중체 형성이 이중이중체 형성보다 우세할 경우에는 secreted Fc_{CH3B}는 효모 세포 표면에 고정되지 못하고 배지 상으로 배출되므로 효모 세포 표면에서 탐지되지 않는다. 따라서 효모 세포 표면에 고정된 secreted Fc_{CH3B}의 탐지레벨을 통해 이배체가 발현하는 중쇄불변부위의 이중이중체 수율을 비교할 수 있다.

[0043] 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 기술한 이중이중체 형성 수율 평가 시스템을 확인하기 위하여 이중이중체 중쇄불변부위 형성 수율이 각기 다른 CH3 도메인 돌연변이체 쌍을 상기한 방법으로 이배체를 제작한 후 효모 세포 표면에 고정된 secreted Fc_{CH3B}의 탐지레벨을 측정하였으며, 효모 세포 표면의 secreted Fc_{CH3B}의 탐지 정도와 이중이중체 중쇄불변부위 형성 수율 간의 상관관계가 있는 것을 확인하였으며, 이는 이중이중체 중쇄불변부위 효모 표면 발현 시스템을 이용하여 이중이중체 중쇄불변부위의 형성 수율을 평가할 수 있음을 의미한다.

[0044] 본 발명의 다른 일 실시예에서, CH3 도메인 상호작용면에 돌연변이를 도입한 이중이중체 중쇄불변부위 돌연변이 쌍 조합 라이브러리를 구축하였다. 구체적으로 Fc 단백질의 안정성에 영향을 주는 소수성 코어 부위 (L351, T366, L368, Y407)는 보존하고, 소수성 코어 부위 가장자리에 위치한 2 쌍의 정전기적 결합 쌍 (K370-E357/S364와 D399-K392/K409)에 돌연변이 쌍이 도입된 이중이중체 중쇄불변부위 돌연변이 쌍 조합라이브러리를 제작하였다. 상기의 2쌍의 정전기적 인력은 야생형 Fc의 이중체 형성에 기여한다고 알려져 있다 (Gunasekaran et al., 2010; Choi et al., 2013). 따라서 상기의 정전기적 인력을 가지는 잔기를 CH3A 도메인과 CH3B 도메인 간의 선택적인 상호작용을 유도하는 잔기로 치환함으로써, 이중이중체 중쇄불변부위 형성 수율을 증진시키고자 하였다.

[0045] 또한, 상기 제1 CH3 도메인 및 제2 CH3 도메인은 CH3 도메인이 포함된 중쇄불변부위의 형태로 백터에 포함될 수 있다.

[0046] 또한, 상기 백터는 인간 항체 중쇄의 hinge-CH2-CH3 부분을 포함하고 있으며 (잔기 225-447, EU number), 동종 이중체화를 피하기 위하여 hinge 부분 (THICPPCP)의 Cys가 Ser으로 치환 (THISPPSP)될 수 있다. 또한 효모 발현 시 과도한 글라이코실화를 막기 위하여 중쇄불변부위의 N-글라이코실화 부분인 Asn297을 Gln으로 치환 (Asn297Gln)될 수 있다.

[0047] 상기 항체 CH3 도메인의 이중이중체 형성 평가 방법에 있어서, 상기 항체 CH3 도메인의 이중이중체는 하기의 변이를 포함한 것일 수 있다:

[0048] (A1) 제1 CH3 도메인의 K370 위치에서의 아미노산의 치환; 및

- [0049] 제2 CH3 도메인의 E357 및/또는 S364 위치에서의 아미노산의 치환; 또는
- [0050] (B1) 제1 CH3 도메인의 D399 위치에서의 아미노산의 치환; 및
- [0051] 제2 CH3 도메인의 K392 및/또는 K409 위치에서의 아미노산의 치환.
- [0052] 또한, 상기 항체 CH3 도메인의 이중이중체 형성 평가 방법은 이중이중체 중쇄 형성이 선호되는 변이체의 스크리닝, 변이체의 선별, 이중이중체 중쇄 형성의 수율의 평가, 및 이중이중체 중쇄 형성이 선호되는 변이체의 라이브러리의 제조에 이용될 수 있다.
- [0053] 또한, 본 발명의 일 양상은 하기의 변이를 포함하는 항체 CH3 도메인의 이중이중체 라이브러리를 제공한다:
- [0054] (A1) 제1 CH3 도메인의 K370 위치에서의 아미노산의 치환; 및
- [0055] 제2 CH3 도메인의 E357 및/또는 S364 위치에서의 아미노산의 치환; 또는
- [0056] (B1) 제1 CH3 도메인의 D399 위치에서의 아미노산의 치환; 및
- [0057] 제2 CH3 도메인의 K392 및/또는 K409 위치에서의 아미노산의 치환.
- [0058] 바람직하게는 상기 (A1) 변이에서,
- [0059] K370는 글루탐산 (E), 메티오닌 (M) 또는 아스파르트산 (D)으로 치환될 수 있으며;
- [0060] E357는 아스파라진 (N), 이소류신 (I), 또는 메티오닌 (M)으로 치환으로 치환될 수 있으며;
- [0061] S364는 트레오닌 (T) 또는 트립토판 (W)로 치환될 수 있다.
- [0062] 더욱 바람직하게는 상기 (A1) 변이에서
- [0063] (A1-1) K370는 글루탐산 (E)으로, E357는 아스파라진 (N)으로 치환;
- [0064] (A1-2) K370는 글루탐산 (E)으로, E357는 이소류신 (I)으로, S364는 트레오닌 (T)으로 치환;
- [0065] (A1-3) K370는 메티오닌 (M)으로, E357는 메티오닌 (M)으로, S364는 트립토판 (W)으로 치환; 또는
- [0066] (A1-4) K370는 아스파르트산 (D)으로, E357는 메티오닌 (M)으로 치환될 수 있다.
- [0067] 바람직하게는 상기 (B1) 변이에서
- [0068] D399는 글루탐산 (E) 또는 류신 (L)로 치환될 수 있으며;
- [0069] K392는 글루탐산 (E), 세린 (S), 또는 글리신 (G)으로 치환될 수 있으며;
- [0070] K409는 류신 (L) 또는 메티오닌 (M)으로 치환될 수 있다.
- [0071] 더욱 바람직하게는 상기 (B1) 변이에서
- [0072] (B1-1) D399는 글루탐산 (E)으로, K392는 글루탐산 (E)으로 치환;
- [0073] (B1-2) D399는 류신 (L)으로, K392는 세린 (S)으로, K409는 류신 (L)으로 치환; 또는
- [0074] (B1-3) D399는 류신 (L)으로, K392는 글리신 (G)으로, K409는 메티오닌 (M)으로 치환될 수 있다.
- [0075] 상기 항체 CH3 도메인의 이중이중체 라이브러리는
- [0076] 제1 CH3 도메인의 K409가 트립토판 (W)으로 치환되고;
- [0077] 제2 CH3 도메인의 D399가 발린(V)으로, F405가 트레오닌 (T)으로 치환된 변이를 추가로 포함할 수 있다.

- [0078] 또한, 본 발명의 다른 일 실시예에서, 상기 이중이중체 중쇄불변부위 돌연변이 쌍 조합 라이브러리에서 선별된 돌연변이체 쌍의 이중이중체 형성 수율을 향상시키기 위하여 추가적인 2차 라이브러리를 구축하였다. 구체적으로, 선별된 돌연변이체가 지닌 돌연변이 부위의 대칭적인 위치에 존재하는 정전기 쌍 (E357/S364-K370과 K392/K409-D399)에 돌연변이를 도입하여 라이브러리를 제작하였다. 따라서 동중이중체 형성 시, 기존 라이브러리에서 도입된 돌연변이 쌍과 상호작용하는 잔기에 돌연변이를 도입함으로써, 선별된 돌연변이체의 이중이중체 형성 수율을 추가적으로 증진시키고자 하였다.
- [0079] 따라서, 상기 항체 CH3 도메인의 이중이중체 라이브러리는 하기의 변이를 추가로 포함한 것일 수 있다:
- [0080] (A2) 제1 CH3 도메인의 E370 및 S364 위치에서의 아미노산의 치환, 또는
- [0081] 제2 CH3 도메인의 E257 위치에서의 아미노산의 치환.
- [0082] 또한, 바람직하게 상기 A2 변이에서
- [0083] E370은 아스파르트산 (D), 알라닌 (A), 글리신 (G), 또는 아스파라진 (N)으로 치환될 수 있으며;
- [0084] S364은 트립토판 (W) 또는 타이로신 (Y)으로 치환될 수 있으며;
- [0085] E357은 아스파라진 (N)으로 치환될 수 있다.
- [0086] 또한, 더욱 바람직하게는 상기 A2 변이에서
- [0087] (A2-1) E370은 아스파르트산 (D)으로, S364은 트립토판 (W)으로, E357은 아스파라진 (N)으로 치환;
- [0088] (A2-2) E370은 알라닌 (A)으로, S364은 타이로신 (Y)으로, E357은 아스파라진 (N)으로 치환;
- [0089] (A2-3) E370은 글리신 (G)으로, S364은 트립토판 (W)으로 치환; 또는
- [0090] (A2-4) E370은 아스파라진 (N)으로, S364은 트립토판 (W)으로 치환된 것일 수 있다.
- [0091] 또한, 상기 항체 CH3 도메인의 이중이중체는 하기의 변이를 추가로 포함할 수 있다:
- [0092] (B2) 제1 CH3 도메인의 K392 및/또는 K409 위치에서의 아미노산의 치환; 및
- [0093] 제2 CH3 도메인의 D399 위치에서의 아미노산의 치환.
- [0094] 바람직하게 상기 B2 변이에서
- [0095] K392는 이소류신 (I), 아르기닌 (R), 시스테인 (C), 류신 (L), 세린 (S), 또는 아스파라진 (N)으로 치환될 수 있으며;
- [0096] K409는 아르기닌 (R)으로 치환될 수 있고;
- [0097] D399는 글리신 (G), 트립토판 (W), 시스테인 (C), 세린 (S), 또는 발린 (V)으로 치환될 수 있다.
- [0098] 더욱 바람직하게는 상기 B2 변이에서
- [0099] (B2-1) K392는 이소류신 (I)으로, D399는 글리신 (G)으로 치환;
- [0100] (B2-2) K392는 아르기닌 (R)으로, K409는 아르기닌 (R)으로, D399는 트립토판 (W)으로 치환;
- [0101] (B2-3) K392는 시스테인 (C)으로, D399는 시스테인 (C)으로 치환;
- [0102] (B2-4) K392는 류신 (L)으로, D399는 세린 (S)으로 치환;
- [0103] (B2-5) K392는 세린 (S)으로, D399는 글리신 (G)으로 치환; 또는
- [0104] (B2-6) K392는 아스파라진 (N)으로, D399는 발린 (V)으로 치환될 수 있다.
- [0105] 상기 항체 사슬의 아미노산 숫자는 EU 넘버링에 의한 것이다 (Cunningham, Pflumm et al. 1969).
- [0106] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 이중이중체 중쇄불변부위의 형성이 선호되는 CH3 도메인 변이체 (heterodimeric CH3)의 제조방법을 제공한다:

- [0107] (1') 제1 CH3 도메인의 K370 위치에서 아미노산을 치환하고, 제2 CH3 도메인의 E357 및/또는 S364 위치에서의 아미노산의 치환하는 단계; 또는
- [0108] (1'') 제1 CH3 도메인의 D399 위치에서 아미노산을 치환하고, 제2 CH3 도메인의 K392 및/또는 K409 위치에서 아미노산을 치환하는 단계; 및
- [0109] (2) 상기 제1 CH3 도메인 및 제2 CH3 도메인을 결합하는 단계.

- [0110] 또한, 본 발명의 일 양상에서는 하기의 변이를 포함하는 항체 CH3 도메인의 이중이중체를 제공한다:
- [0111] (A1) 제1 CH3 도메인의 K370 위치에서의 아미노산의 치환; 및
- [0112] 제2 CH3 도메인의 E357 및/또는 S364 위치에서의 아미노산의 치환; 또는
- [0113] (B1) 제1 CH3 도메인의 D399 위치에서의 아미노산의 치환; 및
- [0114] 제2 CH3 도메인의 K392 및/또는 K409 위치에서의 아미노산의 치환.

- [0115] 바람직하게는 상기 (A1) 변이에서,
- [0116] K370는 글루탐산 (E), 메티오닌 (M) 또는 아스파르트산 (D)으로 치환될 수 있으며;
- [0117] E357는 아스파라긴 (N), 이소류신 (I), 또는 메티오닌 (M)으로 치환으로 치환될 수 있으며;
- [0118] S364는 트레오닌 (T) 또는 트립토판 (W)로 치환될 수 있다.
- [0119] 더욱 바람직하게는 상기 (A1) 변이에서
- [0120] (A1-1) K370는 글루탐산 (E)으로, E357는 아스파라긴 (N)으로 치환;
- [0121] (A1-2) K370는 글루탐산 (E)으로, E357는 이소류신 (I)으로, S364는 트레오닌 (T)으로 치환;
- [0122] (A1-3) K370는 메티오닌 (M)으로, E357는 메티오닌 (M)으로, S364는 트립토판 (W)으로 치환; 또는
- [0123] (A1-4) K370는 아스파르트산 (D)으로, E357는 메티오닌 (M)으로 치환될 수 있다.

- [0124] 바람직하게는 상기 (B1) 변이에서
- [0125] D399는 글루탐산 (E) 또는 류신 (L)로 치환될 수 있으며;
- [0126] K392는 글루탐산 (E), 세린 (S), 또는 글리신 (G)으로 치환될 수 있으며;
- [0127] K409는 류신 (L) 또는 메티오닌 (M)으로 치환될 수 있다.
- [0128] 더욱 바람직하게는 상기 (B1) 변이에서
- [0129] (B1-1) D399는 글루탐산 (E)으로, K392는 글루탐산 (E)으로 치환;
- [0130] (B1-2) D399는 류신 (L)으로, K392는 세린 (S)으로, K409는 류신 (L)으로 치환; 또는
- [0131] (B1-3) D399는 류신 (L)으로, K392는 글리신 (G)으로, K409는 메티오닌 (M)으로 치환될 수 있다.

- [0132] 상기 항체 CH3 도메인의 이중이중체는
- [0133] 제1 CH3 도메인의 K409가 트립토판 (W)으로 치환되고;
- [0134] 제2 CH3 도메인의 D399가 발린(V)으로, F405가 트레오닌 (T)으로 치환된 변이를 추가로 포함할 수 있다.

- [0135] 또한, 상기 항체 CH3 도메인의 이중이중체는 하기의 변이를 추가로 포함할 수 있다:

- [0136] (A2) 제1 CH3 도메인의 E370 및 S364 위치에서의 아미노산의 치환, 또는
- [0137] 제2 CH3 도메인의 E257 위치에서의 아미노산의 치환.
- [0138] 또한, 바람직하게 상기 A2 변이에서
- [0139] E370은 아스파르트산 (D), 알라닌 (A), 글리신 (G), 또는 아스파라진 (N)으로 치환될 수 있으며;
- [0140] S364은 트립토판 (W) 또는 타이로신 (Y)으로 치환될 수 있으며;
- [0141] E357은 아스파라진 (N)으로 치환될 수 있다.
- [0142] 또한, 더욱 바람직하게는 상기 A2 변이에서
- [0143] (A2-1) E370은 아스파르트산 (D)으로, S364은 트립토판 (W)으로, E357은 아스파라진 (N)으로 치환;
- [0144] (A2-2) E370은 알라닌 (A)으로, S364은 타이로신 (Y)으로, E357은 아스파라진 (N)으로 치환;
- [0145] (A2-3) E370은 글리신 (G)으로, S364은 트립토판 (W)으로 치환; 또는
- [0146] (A2-4) E370은 아스파라진 (N)으로, S364은 트립토판 (W)으로 치환된 것일 수 있다.
- [0147] 또한, 상기 항체 CH3 도메인의 이중이중체는 하기의 변이를 추가로 포함할 수 있다:
- [0148] (B2) 제1 CH3 도메인의 K392 및/또는 K409 위치에서의 아미노산의 치환; 및
- [0149] 제2 CH3 도메인의 D399 위치에서의 아미노산의 치환.
- [0150] 바람직하게 상기 B2 변이에서
- [0151] K392는 이소류신 (I), 아르기닌 (R), 시스테인 (C), 류신 (L), 세린 (S), 또는 아스파라진 (N)으로 치환될 수 있으며;
- [0152] K409는 아르기닌 (R)으로 치환될 수 있고;
- [0153] D399는 글리신 (G), 트립토판 (W), 시스테인 (C), 세린 (S), 또는 발린 (V)으로 치환될 수 있다.
- [0154] 더욱 바람직하게는 상기 B2 변이에서
- [0155] (B2-1) K392는 이소류신 (I)으로, D399는 글리신 (G)으로 치환;
- [0156] (B2-2) K392는 아르기닌 (R)으로, K409는 아르기닌 (R)으로, D399는 트립토판 (W)으로 치환;
- [0157] (B2-3) K392는 시스테인 (C)으로, D399는 시스테인 (C)으로 치환;
- [0158] (B2-4) K392는 류신 (L)으로, D399는 세린 (S)으로 치환;
- [0159] (B2-5) K392는 세린 (S)으로, D399는 글리신 (G)으로 치환; 또는
- [0160] (B2-6) K392는 아스파라진 (N)으로, D399는 발린 (V)으로 치환될 수 있다.
- [0161] 상기 항체 사슬의 아미노산 숫자는 EU 넘버링에 의한 것이다 (Cunningham, Pflumm et al. 1969).
- [0162] 또한, 상기 항체 CH3 도메인의 이중이중체는 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE로 이루어진 군으로부터 선택된 면역글로불린의 Fc 부분에 포함되는 것을 특징으로 하는, 항체 CH3 도메인의 이중이중체가 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 IgG는 인간 IgG인 것을 특징으로 하는, 항체 CH3 도메인의 이중이중체가 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 인간 IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 항체 CH3 도메인의 이중 이중체가 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0163] 또한, 본 발명은 상기 CH3 도메인의 이중이중체를 포함하는 이중이중체 중쇄불변부위 (heterodimeric Fc) 쌍 및 상기 CH3 도메인의 이중이중체를 포함하는 이중 특이성 항체를 제공한다.

- [0164] 상기 이중특이적 항체는 scFv-Fc, scIgG(scFab-Fc), (Fv)₂-Fc, mAb-Fv 및 Fv-Fc로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 형태인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않고, 상기 융합 단백질은 Protein-Fc 형태인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0165] 본 발명에 따른 항체의 중쇄불변부위 CH3 도메인에 돌연변이가 유도된 CH3 이중이중체 중쇄불변부위 쌍 단백질을 구성할 수 있으며, 상기 이중이중체 중쇄불변부위 쌍 단백질은 항원 특이성이 다른 항체를 중쇄가변부위(VH), 경쇄가변부위(VL), 단일사슬항체절편(scFv) 또는 단일사슬항체절편(scFab) 형태로 융합하여 두 가지 다른 항원에 동시에 결합할 수 있는 이중특이성 항체 및 전형적인 IgG의 중쇄 C-말단에 가변단일항원결합도메인 (VH, VL)을 각각 융합한 이중특이성 가변부위융합단일항체 (mAb-Fv)의 다양한 형태의 이중특이성 항체, 또는 단일항원에 결합하는 중쇄가변부위(VH) 및 경쇄가변부위(VL)을 융합하여 단일 항원에 1가(monovalent)로 결합할 수 있는 항체(Fv-Fc), 특정 단백질과 결합할 수 있는 세포막 수용체 세포의 도메인, 펩타이드, 단일도메인 항체, 리간드, 독소 등을 융합하여, 1종 또는 2종의 단백질을 특이적으로 인지할 수 있는 항체불변부위 융합 단백질(Protein-Fc)의 형태일 수 있다.
- [0166] 이때, 상기 용어 "단일사슬항체절편(scFv)"는 1 개의 VH와 1 개의 VL 을 12잔기 이상의 적당한 펩타이드 링커 (L)를 사용하여 연결한 VH-L-VL 내지 VL-L-VH 폴리펩타이드로, 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편을 의미한다.
- [0167] 또한, 상기 용어 단일사슬항체절편(scFab)는 1 개의 VH부터 CH1까지 발현된 중쇄절편과, 1개의 VL과 CL 부분이 포함된 경쇄에 34잔기 이상의 적당한 펩타이드 링커(L)를 사용하여 연결한 VL-CL-L-VH-CH1 내지는 VH-CH1-L-VL-CL 폴리펩타이드로, 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편을 의미한다.
- [0168] 또한, Fv는 완전한 항원 결합 부위를 포함하는 최소 항체 단편을 의미하며, 본 발명에서 사용된 상기 용어 "Fv-Fc"는 단일 항원에 결합하는 중쇄가변부위(VH) 및 경쇄가변부위(VL)을 이중이중체 중쇄불변부위 쌍 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 융합하여 단일 항원에 1가(monovalent) 형태로 결합할 수 있는 항체를 의미한다.
- [0169] 또한, 본 발명에서 사용된 상기 용어 "mAb-Fv"는 전형적인 형태의 IgG 중쇄 C-말단에 중쇄가변부위(VH) 및 경쇄가변부위(VL)이 각각 융합하여, 항원에 3가(trivalent) 형태로 결합할 수 있는 항체, 또는 mAb항원에 2가로 Fv 항원에 1가로 결합할 수 있는 이중특이성 항체를 의미한다.
- [0170] 또한, 본 발명에서 사용된 상기 용어 "항체불변부위 융합 단백질(Protein-Fc)"은 본 발명에 따른 이중이중체 중쇄불변부위 쌍 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 특정 단백질과 결합할 수 있는 세포막 수용체 세포의 도메인, 펩타이드, 단일도메인 항체, 리간드, 독소 등이 융합되어, 1종 또는 2종의 단백질을 특이적으로 인지할 수 있는 융합 단백질을 의미한다.
- [0171] 또한, 본 발명의 일 양상은 상기 이중이중체 중쇄불변부위 쌍, 이중특이성 항체, 1가 항원 결합 항체 또는 융합 단백질을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0172] 본 발명에 의해 제조된 이중특이성 항체 또는 융합 단백질은 종양, 혈관신생 관련 질환 또는 면역질환과 관련된 항원 또는 단백질을 특이적으로 표적할 수 있으므로, 상기 질환을 치료 또는 예방할 수 있는 약학적 조성물에 유용하게 쓰일 수 있다.
- [0173] 이때, 본 발명에 의해 제조된 이중특이성 항체 또는 융합 단백질을 포함하는 약학적 조성물은 하나의 단백질에 의해 발병 기전이 유도되는 것이 아닌, 여러 단백질이 중복적, 우회적, 단계적으로 작용하여, 발생하는 종양 또는 면역질환과 관련된 2종의 항원을 동시에 표적할 수 있으므로, 1종의 표적 단백질만 표적하는 단일클론항체를 포함하는 약학적 조성물에 비해 질환의 치료 효과를 높일 수 있다.
- [0174] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명의 조성물의 투여에 의해 질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0175] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 암, 혈관신생관련 질환 또는 면역질환의 치료 또는 예방에 이용될 수 있다.
- [0176] 암의 경우, 그 종류에 제한은 없으나, 예를 들어, 편평상피세포암, 소세포폐암, 비소세포폐암, 폐의 선암, 폐의 편평상피암, 복막암, 피부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 간세포암, 위장암, 췌장암,

교아증, 경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 유방암, 결장암, 대장암, 자궁내막 또는 자궁암, 침샘암, 신장암, 간암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 간암 또는 두경부암일 수 있다.

[0177] 상기 혈관신생 관련 질병은 그 종류에는 제한이 없으나, 예를 들어, 당뇨병성 망막증, 황반변성, 노인성 황반변성, 미숙아 망막증, 각막이식 거부, 신생혈관성 녹내장 및 후수정체 섬유증식증, 유행성 각결막염, 비타민 A 결핍, 콘택트 렌즈 과도착용, 아토피성 각막염, 상각막윤부 각막염, 익상편 건선 각막염, 쇼그렌 증후군, 홍반성 여드름, 플릭텐성 각결막염, 매독, 마이코박테리아 감염, 지방 변성증, 화학적 화상, 세균성 궤양, 진균성 궤양, 허피스 단순포진 감염, 대상포진 감염, 원충 감염, 카포시 육종, 무렌 궤양, 테리엔 변연성 각막변성증주 변성 각질용해증, 정신적 외상, 류마티스성 관절염, 전신성 홍반, 다발성 동맥염, 베게너 유육종증, 공막염, 스티브 존슨병, 주변반흔성 방사상 각막절개술 또는 각막 이식 거부등 일 수 있다.

[0178] 면역질환은 장기이식 합병증, 류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis), 다발성 화증((Multiple Sclerosis), 중증 근무력증(Myasthenia gravis), 그레이브스 병(Grave' s Disease), 하시모토씨 갑상선염(Hashimoto' s Thyroiditis), 애디슨병(Addison' s Disease), 백반증(Vitilligo), 경피증(Scleroderma), 굿패스처 신드롬(Goodpasture syndrome), 베제트병(Becet' s Disease), 크론병(Crohn' s Disease), 강직성 척추염(Ankylosing Spondylitis), 포도막염(Uveitis), 혈소판 감소성 자반증 (Thrombocytopenic purpura), 심상성 천포창(Pemphigus vulgaris), 소아당뇨병(Diabetes), 자가면역성 용혈성 빈혈(Autoimmune Anemia), 크라이로글로불린증(Cryoglobulinemia), 부신백질이영양증(ALD), 전신성 홍반성 낭창(Systemic Lupus Erythematosus, SLE) 등일 수 있으며, 그 종류에 제한은 없다.

[0179] 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물을 제제화할 경우, 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.

[0180] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명으로 표시되는 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스 또는 락토오스 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0181] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다.

[0182] 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0183] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0184] 본 발명에 따른 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학 적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0185] 구체적으로, 본 발명에 따른 화합물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 당 0.01g 내지 100 mg, 바람직하게는 0.01 g 내지 10 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3 회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

- [0186] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 이중이중체 중쇄불변부위 쌍 ((hinge-CH2-CH3A) × (hinge-CH2-CH3B)) 단백질을 제조하는 방법을 제공할 수 있다:
- [0187] 1) 상기 제조된 CH3 도메인 변이체 쌍을 항체 중쇄불변부위 야생형 힌지 (hinge)-CH2 도메인의 C-말단에 각각 융합한 핵산 (nucleic acids)을 클로닝한 재조합 중쇄불변부위 쌍 단백질 발현백터를 제조하는 단계;
- [0188] 2) 상기 제조된 발현백터를 세포에 공동 형질전환하여 재조합 중쇄불변부위 쌍 단백질을 발현하는 단계; 및
- [0189] 3) 상기 공동 발현된 재조합 중쇄불변부위 쌍 단백질을 정제 및 회수하는 단계.
- [0190] 또한, 본 발명은 상기 방법을 통해 제조된 이중이중체 중쇄불변부위 쌍((hinge-CH2-CH3A) × (hinge-CH2-CH3B)) 단백질을 제공할 수 있다. .

발명의 효과

- [0191] 본 발명에 따른 이중이중체 중쇄 형성능 평가시스템은 효모 세포 표면 발현 시스템을 이용하여 제작된 것으로 이를 이용하여 이중이중체 중쇄 형성이 선호되는 돌연변이체의 고속선별이 가능하다.
- [0192] 또한, 본 발명에 따른 인간 항체 이중이중체 중쇄불변부위 라이브러리는 효모접합을 이용하여 각각의 CH3 도메인에서 서로 다른 돌연변이를 동시에 도입한 것으로 CH3 도메인 상호작용면에 다양한 종류의 비공유결합이 형성된 돌연변이체들을 포함하고 있다.
- [0193] 또한, 본 발명에 따른 인간 항체의 중쇄불변부위의 CH3 도메인 변이체 쌍은 인간 항체 이중이중체 중쇄불변부위 라이브러리의 고속선별을 이용하여 제작된 것으로, 동중이중체의 형성은 최소화하고, 이중이중체의 형성 수율을 80-95% 이상의 고수율로 제조할 수 있으며, 상기 CH3 도메인 변이체 쌍을 이용해 제조된 이중이중체 중쇄불변부위 쌍 단백질은 동물 세포에서 발현 생산 시, 원래 야생형 항체의 발현, 생산 수율 및 열역학적 안정성과 비슷하거나, 향상된 특성을 가지게 된다.
- [0194] 또한, 본 발명에 따른 인간 항체의 중쇄불변부위의 CH3 도메인 변이체 쌍을 이용해 제조된 이중이중체 중쇄불변부위 쌍 단백질은 원래 야생형 항체가 지니는 중쇄불변부위 (Fc)의 고유기능, 즉 FcRn (neonatal Fc receptor) 과의 결합성이 유지되어, 혈액 내 긴 반감기 (long serum half-life)를 가지게 되고, 정제과정에서의 결합부위 (protein A 및 protein G)가 보존된다는 이점이 있다.
- [0195] 또한, 본 발명에 따른 인간 항체의 중쇄불변부위의 CH3 도메인 변이체 쌍을 이용해 제조된 이중이중체 중쇄불변부위 쌍 단백질은 CH3 변이체 각각을 따로 발현하여 다시 합성하지 않고, 한 세포에서 동시에 발현하여, 고효율로 이중이중체 중쇄불변부위를 80-95% 정도 이상의 고수율로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0196] 도 1은 효모 접합을 이용하여 인간항체 이중이중체 중쇄불변부위를 효모 세포 표면에 발현시키는 전략에 대한 모식도이다.
- 도 2는 이중이중체 중쇄불변부위 효모 세포 표면 발현 시스템에 사용되는 효모 세포 표면 발현 백터의 도식도이다.
- 도 3은 이중이중체 중쇄불변부위 효모 세포 표면 발현 시스템에 사용되는 효모 세포 외 분비백터의 도식도이다.
- 도 4A는 이중이중체 중쇄불변부위 형성 수율이 각기 다른 CH3 도메인 돌연변이체 쌍을 발현하는 이배체 효모 세포 표면에 고정된 secreted Fc_{CH3B}를 탐지한 PE 신호 값을 나타낸 히스토그램이며, 도 4B는 히스토그램의 양성 피크에서의 평균형광강도를 EW-RVT CH3 도메인 돌연변이체 쌍의 PE 신호 값과 비교하여 (EW-RVT의 평균형광강도를 100%로 정규화) 정량화 한 자료이다.
- 도 5는 CH3 도메인 상호작용면에 돌연변이를 도입하여 이중이중체 형성 수율이 높은 CH3 도메인 돌연변이체 쌍을 얻기 위한 라이브러리 구축 전략을 나타낸 모식도이다.

도 6A는 LibA1 라이브러리 및 LibB1 라이브러리를 부유화한 후 효모 세포 표면에 고정된 secreted Fc_{CH3B}를 탐지한 PE 신호 값을 측정하여 평균형광강도를 EW-RVT CH3 도메인 돌연변이체 쌍의 PE 신호값과 비교하여 (EW-RVT의 평균형광강도를 100%로 정규화) 나타낸 자료이다.

도 6B는 LibA1 라이브러리에서 선별된 4개의 개별클론 (A107, A108, A109, A146) 및 LibB1 라이브러리에서 선별된 3개의 개별클론 (B121, B135, B168)의 secreted Fc_{CH3B}를 탐지한 PE 신호 값을 측정하여 평균형광강도를 EW-RVT CH3 도메인 돌연변이체 쌍의 PE 신호값과 비교하여 (EW-RVT의 평균형광강도를 100%로 정규화) 나타낸 자료이다.

도 7은 scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 동시 발현 시스템을 나타낸 모식도이다.

도 8은 LibA1 라이브러리에서 선별된 4개의 개별클론 (A107, A108, A109, A146) 및 LibB1 라이브러리에서 선별된 3개의 개별클론 (B121, B135, B168)을 포함하는 scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 이중이중체 단백질을 정제 한 후, 5 µg을 12% 비환원성 조건으로 SDS-PAGE 상에서 분석한 자료이다.

도 9는 A107 및 B168 돌연변이체 쌍에 대하여 트랜스펙션 시 첨가하는 pcDNA3.1(+)-scFv-Fc_{CH3A} 및 pcDNA3.1(+)-Fc_{CH3B} 플라스미드의 몰 비율을 다르게 하여 scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 이중이중체 단백질을 정제하여 비환원성 조건으로 SDS-PAGE 상에서 분석한 자료이다.

도 10은 W-VT 돌연변이 부위가 야생형 아미노산으로 치환된 돌연변이 쌍 4종 (A107_{w/oW-VT}, A109_{w/oW-VT}, A146_{w/oW-VT}, B168_{w/oW-VT}) 및 대조군인 W-VT, EW-RVT를 포함하는 scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 이중이중체 단백질을 정제 한 후, 5 µg을 12% 비환원성 조건으로 SDS-PAGE 상에서 분석한 자료이다.

도 11은 도 8과 도 10에서 서술된 scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 이중이중체를 반복하여 발현 정제 후, SDS-PAGE 상의 각 밴드 밀도를 분석하여 이중이중체 형성 수율을 정량적으로 나타낸 자료이다.

도 12A는 A107 돌연변이 쌍을 포함하는 돌연변이체의 CH3 도메인 상호작용면을 모델링을 통하여 예측하여 나타낸 것이다. 한쪽 CH3 도메인에서 K370E, K409W 돌연변이가 도입되었고, 다른 쪽 CH3 도메인에서 E357N, D399V, F405T 돌연변이가 도입되었다.

도 12B는 A108 돌연변이 쌍을 포함하는 돌연변이체의 CH3 도메인 상호작용면을 모델링을 통하여 예측하여 나타낸 것이다. 한쪽 CH3 도메인에서 K370E, K409W 돌연변이가 도입되었고, 다른 쪽 CH3 도메인에서 E357I, S364T, D399V, F405T 돌연변이가 도입되었다.

도 13A는 A109 돌연변이 쌍을 포함하는 돌연변이체의 CH3 도메인 상호작용면을 모델링을 통하여 예측하여 나타낸 것이다. 한쪽 CH3 도메인에서 K370M, K409W 돌연변이가 도입되었고, 다른 쪽 CH3 도메인에서 E357M, S364W, D399V, F405T 돌연변이가 도입되었다.

도 13B는 A146 돌연변이 쌍을 포함하는 돌연변이체의 CH3 도메인 상호작용면을 모델링을 통하여 예측하여 나타낸 것이다. 한쪽 CH3 도메인에서 K370D, K409W 돌연변이가 도입되었고, 다른 쪽 CH3 도메인에서 E357M, D399V, F405T 돌연변이가 도입되었다.

도 14A는 B121 돌연변이 쌍을 포함하는 돌연변이체의 CH3 도메인 상호작용면을 모델링을 통하여 예측하여 나타낸 것이다. 한쪽 CH3 도메인에서 D399E, K409W 돌연변이가 도입되었고, 다른 쪽 CH3 도메인에서 K392E, D399V, F405T 돌연변이가 도입되었다.

도 14B는 B135 돌연변이 쌍을 포함하는 돌연변이체의 CH3 도메인 상호작용면을 모델링을 통하여 예측하여 나타낸 것이다. 한쪽 CH3 도메인에서 D399L, K409W 돌연변이가 도입되었고, 다른 쪽 CH3 도메인에서 K392S, K409L, D399V, F405T 돌연변이가 도입되었다.

도 15는 B168 돌연변이 쌍을 포함하는 돌연변이체의 CH3 도메인 상호작용면을 모델링을 통하여 예측하여 나타낸 것이다. 한쪽 CH3 도메인에서 D399L, K409W 돌연변이가 도입되었고, 다른 쪽 CH3 도메인에서 K392G, K409M, D399V, F405T 돌연변이가 도입되었다.

도 16은 A107_{w/oW-VT}와 B168_{w/oW-VT} 돌연변이체 쌍을 기반으로 하여 LibA2 라이브러리 및 LibB2 라이브러리 구축 전략을 나타낸 모식도이다.

도 17A는 LibA2 라이브러리 및 LibB2 라이브러리를 부유화한 후 효모 세포 표면에 고정된 secreted Fc_{CH3B}를 탐지한 PE 신호 값을 측정한 평균형광강도를 EW-RVT CH3 도메인 돌연변이체 쌍의 PE 신호값과 비교하여 (EW-RVT의 평균형광강도를 100%로 정규화) 나타낸 자료이다.

도 17B는 LibA2 라이브러리에서 선별된 4개의 개별클론 (A205, A210, A216, A241) 및 LibB2 라이브러리에서 선별된 6개의 개별클론 (B212, B215, B235, B239, B240, B256)의 secreted Fc_{CH3B}를 탐지한 PE 신호 값을 측정한 평균형광강도를 EW-RVT CH3 도메인 돌연변이체 쌍의 PE 신호값과 비교하여 (EW-RVT의 평균형광강도를 100%로 정규화) 나타낸 자료이다.

도 18A는 LibA2 라이브러리 및 LibB2 라이브러리에서 선별된 10개의 돌연변이 쌍 및 대조군 (EW-RVT, A107_{w/oW-VT}, A107, B168_{w/oW-VT}, B168)을 포함하는 scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 이중이중체 단백질을 정제 한 후, 5 µg을 12% 비환원성 조건으로 SDS-PAGE 상에서 분석한 자료이다.

도 18B는 도 18A에서 서술된 scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 이중이중체를 반복하여 발현 정제 후, SDS-PAGE 상의 각 밴드 밀도를 분석하여 이중이중체 형성 수율을 정량적으로 나타낸 자료이다.

도 19는 A205 및 B235 돌연변이체 쌍에 대하여 트랜스펙션 시 첨가하는 pcDNA3.1(+)-scFv-Fc_{CH3A} 및 pcDNA3.1(+)-Fc_{CH3B} 플라스미드의 몰 비율을 다르게 하여 scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 이중이중체 단백질을 정제하여 비환원성 조건으로 SDS-PAGE 상에서 분석한 자료이다.

도 20A은 A205 돌연변이 쌍을 포함하는 돌연변이체의 CH3 도메인 상호작용면을 모델링을 통하여 예측하여 나타낸 것이다. 한쪽 CH3 도메인에서 E357D, S364W, K370E 돌연변이가 도입되었고, 다른 쪽 CH3 도메인에서 E357N, K370R 돌연변이가 도입되었다.

도 20B은 A210 돌연변이 쌍을 포함하는 돌연변이체의 CH3 도메인 상호작용면을 모델링을 통하여 예측하여 나타낸 것이다. 한쪽 CH3 도메인에서 E357A, S364Y, K370E 돌연변이가 도입되었고, 다른 쪽 CH3 도메인에서 E357N, K370H 돌연변이가 도입되었다.

도 21A은 A216 돌연변이 쌍을 포함하는 돌연변이체의 CH3 도메인 상호작용면을 모델링을 통하여 예측하여 나타낸 것이다. 한쪽 CH3 도메인에서 E357G, S364W, K370E 돌연변이가 도입되었고, 다른 쪽 CH3 도메인에서 E357N 돌연변이가 도입되었다.

도 21B은 A241 돌연변이 쌍을 포함하는 돌연변이체의 CH3 도메인 상호작용면을 모델링을 통하여 예측하여 나타낸 것이다. 한쪽 CH3 도메인에서 E357N, S364W, K370E 돌연변이가 도입되었고, 다른 쪽 CH3 도메인에서 E357N 돌연변이가 도입되었다.

도 22A은 B212 돌연변이 쌍을 포함하는 돌연변이체의 CH3 도메인 상호작용면을 모델링을 통하여 예측하여 나타낸 것이다. 한쪽 CH3 도메인에서 K392I, D399L 돌연변이가 도입되었고, 다른 쪽 CH3 도메인에서 D399G, K392G, K409M 돌연변이가 도입되었다.

도 22B은 B215 돌연변이 쌍을 포함하는 돌연변이체의 CH3 도메인 상호작용면을 모델링을 통하여 예측하여 나타낸 것이다. 한쪽 CH3 도메인에서 K392R, K409R, D399L 돌연변이가 도입되었고, 다른 쪽 CH3 도메인에서 D399W, K392G, K409M 돌연변이가 도입되었다.

도 23A은 B235 돌연변이 쌍을 포함하는 돌연변이체의 CH3 도메인 상호작용면을 모델링을 통하여 예측하여 나타낸 것이다. 한쪽 CH3 도메인에서 K392C, D399L 돌연변이가 도입되었고, 다른 쪽 CH3 도메인에서 D399C, K392G, K409M 돌연변이가 도입되었다.

도 23B은 B239 돌연변이 쌍을 포함하는 돌연변이체의 CH3 도메인 상호작용면을 모델링을 통하여 예측하여 나타낸 것이다. 한쪽 CH3 도메인에서 K392L, D399L 돌연변이가 도입되었고, 다른 쪽 CH3 도메인에서 D399S, K392G, K409M 돌연변이가 도입되었다.

도 24A은 B240 돌연변이 쌍을 포함하는 돌연변이체의 CH3 도메인 상호작용면을 모델링을 통하여 예측하여 나타낸 것이다. 한쪽 CH3 도메인에서 K392S, K409R, D399L 돌연변이가 도입되었고, 다른 쪽 CH3 도메인에서 D399G, K392G, K409M 돌연변이가 도입되었다.

도 24B은 B256 돌연변이 쌍을 포함하는 돌연변이체의 CH3 도메인 상호작용면을 모델링을 통하여 예측하여 나타

낸 것이다. 한쪽 CH3 도메인에서 K392N, D399L 돌연변이가 도입되었고, 다른 쪽 CH3 도메인에서 D399V, K392G, K409M 돌연변이가 도입되었다.

도 25는 열안정성 평가 및 FcRn 결합능 평가에 사용된 중쇄불변부위 이중체인 Fc_{CH3A}-Fc_{CH3B}을 모식화한 자료이다.

도 26은 야생형 중쇄불변부위와 라이브러리에서 선별된 돌연변이 쌍을 각각 포함한 중쇄불변부위 이중체 (Fc-A107, Fc-B168, Fc-A205, Fc-B235)를 생산하여 12% 비환원성 조건 및 환원성 조건에서 SDS-PAGE 상에서 분석한 자료이다.

도 27은 도 26에서 생산한 중쇄불변부위 돌연변이체를 크기배제크로마토그래피 컬럼을 이용하여 HPLC 분석을 수행한 결과이다.

도 28은 도 26에서 생산한 야생형 중쇄불변부위와 중쇄불변부위 돌연변이체의 시차주사 열용량 분석 결과와 CH2 도메인 및 CH3 도메인의 최대열용량온도를 나타낸 자료이다.

도 29는 SPR을 이용하여 도 26에서 생산한 야생형 중쇄불변부위와 중쇄불변부위 돌연변이체의 FcRn에 대한 결합능을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0197] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0198] 실시예 1: 인간항체 이중이중체 중쇄불변부위 효모 세포 표면 발현 시스템 구축

[0199] Directed evolution을 이용하여 인간 CH3도메인 이중이중체를 고수율로 형성하는 CH3 도메인 돌연변이체 쌍을 선별하기 위하여 이중이중체 형성 수율을 정량적으로 평가하는 시스템을 구축하였다. 도 1은 효모 접합을 이용하여 인간항체 이중이중체 중쇄불변부위를 효모 세포 표면에 발현시키는 전략에 대한 모식도이다. 구체적으로 CH3A 도메인이 포함된 중쇄불변부위 (displayed Fc_{CH3A})를 효모 세포 표면 발현벡터 (pCTCON) (Kim et al., 2007)에 제한효소 NheI/BamHI을 사용하여 클로닝하여 pCTCON-Displayed Fc_{CH3A} 벡터 (도 2)를 구축하였으며, CH3B 도메인이 포함된 중쇄불변부위 (secreted Fc_{CH3B})를 효모 세포 외 분비벡터 (pSEC2) (Baek et al. 2014)에 제한효소 EagI/AflIII를 사용하여 클로닝하여 pSEC2-Secreted Fc_{CH3B} 벡터 (도 3)를 구축하였다. 이 때 구축한 displayed Fc_{CH3A} 및 secreted Fc_{CH3B}는 인간 항체 중쇄의 hinge-CH2-CH3 부분을 포함하고 있으며 (잔기 225-447, EU number), 동중이중체화를 피하기 위하여 hinge 부분 (THTCPPCP)의 Cys를 Ser으로 치환 (THTSPSP)하였다. 또한 효모 발현 시 과도한 글라이코실화를 막기 위하여 중쇄불변부위의 N-글라이코실화 부분인 Asn297을 Gln으로 치환 (Asn297Gln)하였다.

[0200] 구축한 pCTCON-Displayed Fc_{CH3A} 벡터는 JAR200 (MAT_a, Trp⁺, Ura⁻) 효모균주에 전기천공법을 이용하여 형질전환하여 선택배지인 SDCAA+Ura (20 g/L glucose, 6.7 g/L yeast nitrogen base without amino acids, 5.4 g/L Na₂HPO₄, 8.6 g/L NaH₂PO₄, 5 g/L casamino acids, 0.2 mg/L uracil) (Sigma-Aldrich)에서 선별하였으며, pSEC2-Secreted Fc_{CH3B} 벡터는 YVH10 (MAT_a, Trp⁻, Ura⁺) 효모균주에 전기천공법을 이용하여 형질전환하여 선택배지인 SDCAA+Trp (20 g/L glucose, 6.7 g/L yeast nitrogen base without amino acids, 5.4 g/L Na₂HPO₄, 8.6 g/L NaH₂PO₄, 5 g/L casamino acids, 0.4 mg/L tryptophan) (Sigma-Aldrich)에서 선별하였다.

[0201] 선별 배양한 2종의 효모는 효모접합 하였다. 구체적으로 효모 접합의 경우, 선별된 두 종의 효모를 각각 1.5×10⁷ 씩 섞고, YPD (20 g/L dextrose, 20 g/L peptone, 10 g/L yeast extract, 14.7 g/L sodium citrate, 4.29 g/L citric acid, pH 4.5) (Sigma-Aldrich) 배지로 3회 세척 후, YPD 배지 100 μl로 재부유하여 YPD 플레이트에 도말 후 30℃에서 6시간 동안 배양한다. 이 후 효모 도말 부위를 선택배지인 SDCAA (20 g/L glucose, 6.7 g/L yeast nitrogen base without amino acids, 5.4 g/L Na₂HPO₄, 8.6 g/L NaH₂PO₄, 5 g/L casamino acids) (Sigma-Aldrich)로 3회 세척 후 최종 효모 농도가 1×10⁶ 이하가 되도록 SD-CAA 배지에 재부유 하여 30℃에서 24시간 동안 배양하여 접합된 이배체 (diploid)만 선별한다. 선별된 이배체는 SGCAA (20 g/L galactose, 6.7

g/L yeast nitrogen base without amino acids, 5.4 g/L Na₂HPO₄, 8.6 g/L NaH₂PO₄, 5 g/L casamino acids) (Sigma-Aldrich) 배지를 이용하여 displayed Fc_{CH3A}와 secreted Fc_{CH3B}의 발현을 유도하였다. 이 때 세포 외로 분비된 secreted Fc_{CH3B}는 효모 세포 표면에 발현된 displayed Fc_{CH3A}와 비공유결합을 통해 조합됨으로써 이중이중체 중쇄불변부위가 효모 세포 표면에 형성된다.

[0202] 상기 기술한 이중이중체 중쇄불변부위의 효모 세포 표면 발현 시스템은 이배체가 발현한 중쇄불변부위의 이중이중체 형성 수율을 평가하는 데 이용된다. 구체적으로 이배체가 발현하는 중쇄불변부위의 이중이중체 형성이 동종이중체 형성보다 우세할 경우에는 효모 세포 외로 분비된 secreted Fc_{CH3B}가 효모 세포 표면에 발현된 displayed Fc_{CH3A}와 조합되어 세포 표면에 고정되므로 효모 세포 표면에서 secreted Fc_{CH3B}가 탐지된다. 반면 이배체가 발현하는 중쇄불변부위의 동종이중체 형성이 이중이중체 형성보다 우세할 경우에는 secreted Fc_{CH3B}는 효모 세포 표면에 고정되지 못하고 배지 상으로 배출되므로 효모 세포 표면에서 탐지되지 않는다. 따라서 효모 세포 표면에 고정된 secreted Fc_{CH3B}의 탐지레벨을 통해 이배체가 발현하는 중쇄불변부위의 이중이중체 수율을 비교할 수 있다.

[0203] **실시예 2: 인간항체 이중이중체 중쇄불변부위 효모 세포 표면 발현 시스템의 평가**

[0204] 실시예 1에서 구축한 이중이중체 형성 수율 평가 시스템을 확인하기 위하여 이중이중체 중쇄불변부위 형성 수율이 각기 다른 CH3 도메인 돌연변이체 쌍을 상기한 방법으로 이배체를 제작한 후 효모 세포 표면에 고정된 secreted Fc_{CH3B}의 탐지레벨을 측정하였다 (도 4). 사용한 CH3 도메인 돌연변이체 쌍으로는 W-VT (~61%) (Choi et al., 2013), EW-RVT (~91%) (Choi et al., 2013), KiH (~86%) (Atwell et al., 1997)을 이용하였고, 대조군으로 야생형 중쇄불변부위와 KiH의 hole-hole 돌연변이체 쌍을 이용하였다. 표 1은 사용한 CH3 도메인 돌연변이체 쌍의 서열을 표기하였다.

표 1

Mutant name	Displayed Fc _{CH3A} (CH3A chain)	Secreted Fc _{CH3B} (CH3B chain)
W-VT	K409W	D399V/F405T
EW-RVT	K360E/K409W	Q347R /D399V/F405T
Hole-Hole (Genentech)	T366S/L368A/Y407V	T366S/L368A/Y407V
KiH (Genentech)	T366S/L368A/Y407V	T366W

[0205]

[0206] 이중이중체 중쇄불변부위 효모 세포 표면 발현 시스템 평가에 사용한 CH3 도메인 돌연변이체 쌍 서열

[0207] 구체적으로 이중이중체 중쇄불변부위의 발현이 유도된 이배체와 secreted Fc_{CH3B}에 포함된 Flag-tag을 인지하는 항체 (anti-Flag mouse mAb, F3165) (Sigma-Aldrich) 및 PE가 접합된 항체 (phycoerythrin conjugated anti-mouse mAb, sc-3738) (Santa Cruze biotechnology)와 반응시킨 후 유세포 분석기 (flow cytometry)로 PE 신호 값을 분석하였다. 도 4A는 각기 다른 CH3 도메인 돌연변이체 쌍의 FACS Caliber (Becton & Dickinson)를 이용하여 측정된 PE 신호 값을 나타낸 히스토그램이며, 도 4B는 히스토그램의 양성 피크에서의 평균형광강도 (MFI, mean fluorescence intensity)를 EW-RVT CH3 도메인 돌연변이체 쌍과 비교하여 (EW-RVT의 평균형광강도를 100%로 정규화) 나타낸 자료이다. 이중이중체 형성이 선호되는 돌연변이체 쌍을 발현하는 이배체는 대조군에 비해 높은 정도의 PE 신호 값을 나타내며, 기술되어있는 이중이중체 형성 수율과 비례한다. 이 결과는 효모 세포 표면의 secreted Fc_{CH3B}의 탐지 정도와 이중이중체 중쇄불변부위 형성 수율간의 상관관계가 있음을 의미 하며, 이를 통해 이중이중체 중쇄불변부위 효모 표면 발현 시스템을 이용하여 이중이중체 중쇄불변부위의 형성 수율을 평가할 수 있음을 의미한다.

[0208] 실시예 3: 인간 항체 이중이중체 중쇄불변부위 돌연변이체 쌍 조합 라이브러리 구축 전략

[0209] 상기 기술한 이중이중체 중쇄불변부위 효모 세포 표면 발현 시스템을 이용하여, CH3 도메인 상호작용면에 돌연변이를 도입한 이중이중체 중쇄불변부위 돌연변이체 쌍 조합 라이브러리를 구축하였다. 돌연변이 쌍이 도입되는 부위로는 중쇄불변부위 단백질의 안정성에 영향을 주는 소수성 코어 부위 (L351, T366, L368, Y407)는 보존하고, 소수성 코어 부위 가장자리에 위치한 2 쌍의 정전기적 결합 쌍 (K370-E357/S364와 D399-K392/K409)을 선정하였다. 상기의 2쌍의 정전기적 인력은 야생형 중쇄불변부위의 이중체 형성에 기여한다고 알려져 있다 (Gunasekaran et al., 2010; Choi et al., 2013). 따라서 상기의 정전기적 인력을 가지는 잔기를 CH3A 도메인 과 CH3B 도메인 간의 선택적인 상호작용을 유도하는 잔기로 치환함으로써, 이중이중체 중쇄불변부위 형성 수율을 증진시키고자 하였다.

[0210] 도 5는 CH3 도메인 상호작용면에 돌연변이를 도입하여 이중이중체 형성 수율이 높은 CH3 도메인 돌연변이체 쌍을 얻기 위한 라이브러리 구축 전략을 나타낸 모식도이다. 구체적으로 우선 이중이중체 형성 수율이 약 61%인 W-VT 돌연변이체 쌍 (Choi et al., 2013)을 기반으로, W-VT 돌연변이 부위 (K409_{CH3A}-D399V/F405T_{CH3B})의 반대쪽에 위치한 2쌍의 정전기적 결합 쌍 K370_{CH3A}-E357/S364_{CH3B}와 D399_{CH3A}-K392/K409_{CH3B}에 각각 돌연변이를 도입하여 2 종의 라이브러리를 디자인하였으며, K370_{CH3A}, E357_{CH3B}, S364_{CH3B}에 돌연변이를 도입한 LibA1 라이브러리와 D399_{CH3A}, K392_{CH3B}, K409_{CH3B}에 돌연변이를 도입한 LibB1 라이브러리를 구축하였다. 이 때 돌연변이 부위에 변이되는 아미노산은 DNB가 들어가도록 하였다. DNB는 첫 번째에 D (D=A, G, T), 두 번째에 N(N=A, T, C, G), 세 번째에 B(B=C, G, T)를 코딩하며, 이를 통해 55.6% 확률로 비극성아미노산 (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Cys, Met), 27.8% 확률로 비전하/극성아미노산 (Ser, Thr, Asn), 13.9% 확률로 양전하/음전하아미노산 (Asp, Glu, Lys, Arg), 2.8% 확률로 종결코돈으로 치환될 수 있으며, Pro, His, Gln으로는 치환될 수 없다.

[0211] LibA1 라이브러리 및 LibB1 라이브러리의 제작을 위해서 우선 각각 CH3A 도메인 변이체를 포함하는 displayed Fc_{CH3A} 라이브러리와 CH3B 도메인 변이체를 포함하는 secreted Fc_{CH3B} 라이브러리를 제작하였다. 각 라이브러리의 유전자는 하기 표 2의 프라이머를 사용하여 overlapping PCR을 수행해 제작하였으며, Displayed Fc_{CH3A} 라이브러리 유전자 (5 µg)는 *NheI/BamHI* 제한효소가 처리된 효모표면 발현 벡터 pCTCON-displayed Fc_{CH3A} (1 µg)와 섞어서 JAR200 (MATα) 효모균주에 형질 전환하여 상동성 접합 (homologous recombination)을 통해 구축하였다. Secreted Fc_{CH3B} 라이브러리 유전자 (5 µg)는 *EagI/AflIII* 제한효소가 처리된 효모 세포 외 분비벡터 pSEC2-secreted Fc_{CH3B} (1 µg)와 섞어서 YVH10 (MAT α) 효모균주에 형질 전환하여 상동성 접합을 통해 구축하였다.

표 2

라이브러리	목적	방향	길이	올리고뉴클레오타이드 염기서열 (5'-3')	
LibA1	Displayed Fc _{CH3A} (CH3A)	Amplifying Fc fragment 1	Forward	22	GTTCCAGACTACGCTCTGCAGG
		Amplifying Fc fragment 1	Reverse	20	GACCAGGCAGGTCAAGCTGA
		Amplifying Fc fragment 2	Forward	45	TCAGCCTGACCTGCCTGGTCDNBGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
		Amplifying Fc fragment 2	Reverse	35	TCGATTTTGTACATCTACACTGTTGTTATCAGAT
	Secreted Fc _{CH3B} (CH3B)	Amplifying Fc fragment 1	Forward	26	CTCAACCGGTTATTCTACTACCGTC
		Amplifying Fc fragment 1	Reverse	18	ATCCCGGGATGGGGCCAG
		Amplifying Fc fragment 2	Forward	63	CTGCCCATCCGGGATDNBCTGACCAAGAACCAGGTCDNBCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
		Amplifying Fc fragment 2	Reverse	33	GAACAAAGTCGATTTTGTACATCTACACTGTT
LibB1	Displayed Fc _{CH3A} (CH3A)	Amplifying Fc fragment 1	Forward	22	GTTCCAGACTACGCTCTGCAGG
		Amplifying Fc fragment 1	Reverse	18	CAGCACGGGAGGCGTGGT
		Amplifying Fc fragment 2	Forward	42	ACCACGCCTCCCGTGTGDNBCTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC
		Amplifying Fc fragment 2	Reverse	35	TCGATTTTGTACATCTACACTGTTGTTATCAGAT
	Secreted Fc _{CH3B} (CH3B)	Amplifying Fc fragment 1	Forward	26	CTCAACCGGTTATTCTACTACCGTC
		Amplifying Fc fragment 1	Reverse	58	AGGAGCCGTCGGACACCAGCACGGGAGGCGTGGTVNHGTAGTTGTTCTCCGGTGCCC
		Amplifying Fc fragment 2	Forward	57	CTGGTGTCCGACGGCTCCTTACCTCTACAGCDNBCTCACCGTGACAAGAGCAGG
		Amplifying Fc fragment 2	Reverse	33	GAACAAAGTCGATTTTGTACATCTACACTGTT

[0212]

[0213] LibA1 라이브러리 및 LibB1 라이브러리 구축에 사용된 프라이머의 올리고뉴클레오타이드 염기서열

[0214] 각각의 반수체 라이브러리간의 효모접합을 통해 LibA1 및 LibB1 돌연변이 쌍 조합 라이브러리를 제작하였으며, 이와 같은 효모접합의 자세한 방법은 실시예 1에 기술되어있다. 구축한 라이브러리 크기는 계단식 희석을 한 후 선택 배지에 자란 콜로니의 수를 측정하여 확인하였으며, LibA1은 약 3.0×10^7 , LibB1은 약 2.8×10^7 으로 모두 이론적인 라이브러리 사이즈인 5×10^3 을 초과하도록 제작되었다.

[0215] **실시예 4: 인간 항체 이중이중체 중쇄불변부위 돌연변이체 쌍 조합 라이브러리 LibA1 및 LibB1에서 이중이중체 중쇄불변부위 고효율 형성을 유도하는 CH3 도메인 돌연변이체 쌍의 선별**

[0216] 상기 구축한 라이브러리 LibA1 및 LibB1에서 이중이중체 중쇄불변부위의 고효율 형성이 유도되는 돌연변이체 쌍을 선별하기 위하여, FACS (fluorescence activated cell sorting)를 수행하여 효모 세포 표면에 secreted Fc_{CH3B}의 고정화 정도가 높은 효모를 부유화하였다. 구체적으로는 실시예 3에서 구축한 이중이중체 중쇄불변부위 라이브러리가 효모 세포 표면에 발현되도록 한 후, 일차로 생쥐 유래 항-Flag 항체 (anti-Flag mouse mAb, F3165) (Sigma-Aldrich)로 결합시키고, 이차로 PE가 접합된 항-생쥐 항체 (phycoerythrin conjugated anti-mouse mAb, sc-3738) (Santa Cruze biotechnology)와 반응시킨 후 FACS Aria II 기기 (Becton & Dickinson)를 사용하여 부유화하였다. FACS는 순차적으로 4회 수행하였다. 도 6A는 부유화한 라이브러리에 대해 효모 세포 표면에 고정된 secreted Fc_{CH3B}를 FACS Caliber (Becton & Dickinson)를 이용하여 탐지한 PE 신호 값을 측정한 평균형광감도 (MFI, mean fluorescence intensity)를 EW-RVT CH3 도메인 돌연변이체 쌍과 비교하여 (EW-RVT의 평균형광감도를 100%로 정규화) 나타낸 자료이다. 이를 통해 LibA1 및 LibB1 라이브러리의 부유화를 확인하였다.

[0217] 위와 같은 선별을 통해 효모 세포 표면에 secreted Fc_{CH3B}의 고정화 정도가 높은 클론들을 부유화한 후 개별 클론들을 얻었다. LibA1 라이브러리에서는 4개의 개별클론 (A107, A108, A109, A146)이, LibB1 라이브러리에서는 3개의 개별클론 (B121, B135, B168)이 분리되었다. 선별된 개별 클론들의 secreted Fc_{CH3B}를 탐지한 PE 신호 값을 측정한 결과 parent W-VT 돌연변이체 쌍과 비교하여 높은 PE 신호 값을 가진 것을 확인하였다 (도 6B). 선별된 개별클론들의 CH3A 및 CH3B 도메인 쌍의 서열은 효모 콜로니 PCR방법을 이용하여 동정하였으며, 콜로니 PCR 방법은 이미 발표한 논문에서 자세하게 기술되어 있다 (Baek et al. 2014). 하기 표 3는 각 LibA1과 LibB1 라이브러리에서 선별된 개별클론들에 도입된 돌연변이 쌍을 정돈한 것이다.

표 3

Mutant name		CH3A	CH3B
LibA1	A107	K370E/K409W	E357N/D399V/F405T
	A108	K370E/K409W	E357I/S364T/D399V/F405T
	A109	K370M/K409W	E357M/S364W/D399V/F405T
	A146	K370D/K409W	E357M/D399V/F405T
LibB1	B121	D399E/K409W	K392E/D399V/F405T
	B135	D399L/K409W	K392S/K409L/D399V/F405T
	B168	D399L/K409W	K392G/K409M/D399V/F405T

[0218]

[0219] LibA1 라이브러리 및 LibB1 라이브러리에서 선별된 개별클론들에 도입된 돌연변이 쌍

[0220] 실시예 5: LibA1 및 LibB1 라이브러리에서 선별된 CH3 도메인 돌연변이체 쌍의 이중이중체 중쇄불변부위 형성능 평가

[0221] 상기 실시예 4에서 선별된 CH3 도메인 돌연변이체의 이중이중체 형성 수율을 평가하기 위하여, scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 동시 발현 시스템을 사용하였다. 도 7은 scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 동시 발현 시스템을 나타낸 모식도이다. scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 동시 발현 시스템에서 정제된 항체는 scFv-Fc_{CH3A} 동중이중체 (103 kDa)와 scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 이중이중체 (78 kDa), Fc_{CH3B} 동중이중체 (53 kDa)의 분자량이 각각 다르게 나타나기 때문에, SDS-PAGE 상에서 이중이중체의 형성 정도를 비교할 수 있다.

[0222] 상기 scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 동시 발현 시스템에서 사용한 동물세포 발현백터인 pcDNA3.1(+)-scFv-hinge-CH2-CH3A (scFv-Fc_{CH3A}) 백터 및 pcDNA3.1(+)-hinge-CH2-CH3B (Fc_{CH3B}) 백터는 이미 발표한 논문에서 자세히 기술되어 있다 (Choi et al., 2013; Choi et al., 2015). 상기 실시예 4에서 선별된 개별클론들의 CH3 도메인 변이체 쌍은 CH3A 변이체는 scFv-Fc_{CH3A} 포맷으로, CH3B 변이체는 Fc_{CH3B} 포맷으로 발현되도록 동물세포 발현백터에 클로닝 하였다. 하기 표 4는 구축한 scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 돌연변이체 쌍을 나타낸 것으로, 상기 실시예 4에서 선별된 개별클론의 CH3 도메인 돌연변이 쌍을 포함하고 있으며, EW-RVT 돌연변이체 쌍을 대조군으로 사용하였다.

표 4

Mutant name		scFv-Fc _{CH3A} (CH3A chain)	Fc _{CH3B} (CH3B chain)
EW-RVT		K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
LibA1	A107	K370E/K409W	E357N/D399V/F405T
	A108	K370E/K409W	E357I/S364T/D399V/F405T
	A109	K370M/K409W	E357M/S364W/D399V/F405T
	A146	K370D/K409W	E357M/D399V/F405T
LibB1	B121	D399E/K409W	K392E/D399V/F405T
	B135	D399L/K409W	K392S/K409L/D399V/F405T
	B168	D399L/K409W	K392G/K409M/D399V/F405T

[0223]

[0224] LibA1 라이브러리 및 LibB1 라이브러리에서 선별된 돌연변이체의 이중이중체 형성능 평가를 위해 구축한 돌연변이 쌍

[0225] HEK293-F 시스템 (Invitrogen)을 사용하여 상기 구축된 pcDNA3.1(+)-scFv-Fc_{CH3A} 및 pcDNA3.1(+)-Fc_{CH3B} 동물세포 발현백터를 일시적 트랜스펙션 (transient transfection)을 이용하여 항체를 생산하여 이중이중체 형성능을 비교하였다. 구체적으로 진탕 플라스크 (Corning)에서 무혈청 FreeStyle 293 발현 배지 (Invitrogen)에서 부유 성장하는 HEK293-F 세포 (Invitrogen)에 발현백터와 폴리에틸렌이민 (Polyethylenimine, PEI) (Polyscience)의 혼합물로 트랜스펙션 하였다. 진탕 플라스크에 30 ml 트랜스펙션 시, HEK293-F 세포를 1.0×10⁶ 세포/ml의 밀도로 배지 30 ml에 과중하고, 125 rpm, 8% CO₂에서 배양하였다. 같은 몰 비율로 상기 구축한 pcDNA3.1(+)-scFv-Fc_{CH3A} 및 pcDNA3.1(+)-Fc_{CH3B} 플라스미드 DNA를 FreeStyle 293 발현 배지 (Invitrogen)에 총 75 µg (각 1.25 µg/ml)으로 희석하여, PEI 225 µg (7.5 µg/ml)을 희석한 3 ml의 배지와 혼합하여 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 그 후 반응시킨 혼합배지를 앞서 30 ml로 과중한 세포에 넣어 125 rpm, 8% CO₂에서 6일동안 배양하였다. 표준 프로토콜을 참조하여 채취한 세포 배양 상등액을 단백질 A 세파로오스 컬럼 (Protein A Sepharose column) (GE healthcare)에 적용하여 PBS (pH 7.4)로 세척하였으며, 0.1 M 글라이신 완충액을 이용하여 pH 3.0에서 항체를 용리한 후 1 M Tris 완충액을 이용하여 항체를 즉각적으로 중화하였다. 용리한 항체 분획은 Dextran

Desalting Column (Thermo Scientific Pierce)를 이용하여 PBS (pH7.4)로 완충액을 교환한 후, Amicon Ultra (MILLIPORE) 원심분리 농축기를 사용하여 농축하였다. 정제된 항체는 BCA 기법을 통해 양을 정량 하였다.

[0226] 도 8은 상기 정제된 항체 5 μ g을 12% 비환원성 조건으로 SDS-PAGE 상에서 분석한 자료이다. scFv-Fc_{CH3A} 동종이 중체는 103 kDa, Fc_{CH3B} 동종이중체는 53 kDa, Fc_{CH3B} 단량체는 25 kDa에서 관찰되었으며, scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 이종 이중체는 78 kDa에서 관찰되었다. 선별된 클론들은 약 68~93 %의 이종이중체 형성능을 지닌 것을 확인하였다 (표 5). 라이브러리 LibA1에서 선별된 돌연변이체 중 A107은 약 93%의 수율로 대조군인 EW-RVT (~91%) 보다도 높은 정도의 이종이중체 형성능을 지니고 있으며, LibB1에서 선별된 돌연변이체 중 B168은 약 78%의 수율로 높은 이종이중체 형성능을 지니고 있다. 또한 A107 및 B168 돌연변이체 쌍의 이종이중체 형성은 트랜스펙션 시 첨가하는 pcDNA3.1(+)-scFv-Fc_{CH3A} 및 pcDNA3.1(+)-Fc_{CH3B} 플라스미드의 몰 비율에 따라 영향 받는 것을 확인하였다 (도 9).

[0227] 선별된 개별 클론들은 W-VT 돌연변이 부위 (K409W_{CH3A}-D399V/F405T_{CH3B})를 포함하고 있기 때문에, 비교적 높은 이종이중체 형성능을 지닌 4개의 돌연변이체 (A107, A109, A146, B168)에 대하여 라이브러리 선별을 통해 도입된 돌연변이 쌍 단독의 이종이중체 형성능을 상기한 scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 동시 발현 시스템을 이용하여 분석하였다 (도 10). 이를 위하여 W-VT 돌연변이 부위가 야생형 아미노산으로 치환된 돌연변이 쌍 4종 (A107_{w/oW-VT}, A109_{w/oW-VT}, A146_{w/oW-VT}, B168_{w/oW-VT})을 구축하였으며, 하기 표 5는 W-VT 돌연변이 부위가 야생형 아미노산으로 치환된 돌연변이 쌍의 서열을 나타낸 것이다.

표 5

Mutant name		scFv-Fc _{CH3A} (CH3A chain)	Fc _{CH3B} (CH3B chain)
W-VT		K409W	D399V/F405T
EW-RVT		K360E/K409W	Q347R /D399V/F405T
W-VT 돌연변이 부위가 야생형으로 치환된 변이체	A107 _{w/oW-VT}	K370E	E357N
	A109 _{w/oW-VT}	K370M	E357M/S364W
	A146 _{w/oW-VT}	K370D	E357M
	B168 _{w/oW-VT}	D399L	K392G/K409M

[0228]

[0229] W-VT 돌연변이 부위가 야생형 아미노산으로 치환된 돌연변이체 4종의 이종이중체 형성능 평가를 위해 구축한 돌연변이 쌍

[0230] 도 11 및 표 6은 선별된 돌연변이체 및 W-VT 돌연변이 부위가 야생형 아미노산으로 치환된 돌연변이체가 포함된 scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 이종이중체를 반복하여 발현 정제 후, Image J (Wayne Rasband, NIH) 프로그램을 이용하여 SDS-PAGE 상의 각 밴드의 밀도를 분석하여 이종이중체 형성 수율을 정량적으로 나타낸 자료이다. 대조군으로 W-VT 및 EW-RVT 돌연변이체를 사용하였으며, 결과 값은 3회 이상의 독립적인 실험을 수행한 후 평균±표준편차로 나타내었다.

표 6

Mutant name		(scFv-Fc) ₂ (homodimer)(%)	(scFv-Fc)(Fc) (heterodimer)(%)	(Fc) ₂ (homodimer)(%)	Fc monomer (%)
W-VT		1.4 ± 0.1	60.8 ± 3.0	27.8 ± 0.4	10.0 ± 3.3
EW-RVT		0.5 ± 0.6	91.4 ± 1.2	1.6 ± 0.6	6.5 ± 1.3
LibA1	A107	4.2 ± 0.3	93.4 ± 1.1	2.4 ± 1.2	ND
	A108	ND	70.5 ± 3.3	13.0 ± 1.1	16.5 ± 1.1
	A109	0.5 ± 0.4	90.5 ± 2.7	5.8 ± 1.3	3.2 ± 2.1
	A146	ND	74.5 ± 3.4	14.6 ± 1.8	10.9 ± 2.6
LibB1	B121	1.5 ± 1.0	73.3 ± 5.3	25.2 ± 4.0	ND
	B135	4.1 ± 0.8	67.8 ± 3.2	27.9 ± 2.1	0.2 ± 0.1
	B168	1.2 ± 0.3	77.7 ± 4.5	21.1 ± 6.4	ND
W-VT 돌연변이 부위가 야생형으로 치환된 변이체	A107 _{w/oW-VT}	21.3 ± 0.4	78.2 ± 4.2	0.5 ± 2.3	ND
	A109 _{w/oW-VT}	5.6 ± 0.2	61.6 ± 4.5	32.8 ± 4.4	ND
	A146 _{w/oW-VT}	4.6 ± 1.4	71.0 ± 3.7	24.4 ± 2.5	ND
	B168 _{w/oW-VT}	1.6 ± 0.8	60.9 ± 2.4	37.5 ± 2.6	ND

[0231]

[0232]

라이브러리에서 선별된 돌연변이체 및 W-VT 돌연변이 부위가 야생형 아미노산으로 치환된 돌연변이체의 이중이중체 형성 수율 (SDS-PAGE 결과 분석)

[0233]

표 7은 선별된 돌연변이체의 정제 수율을 나타낸 자료이다. 표 4 및 표 5에 기술한 이중이중체를 상기한 방법으로 발현 및 정제하였을 때의 수율을 대조군인 EW-RVT 돌연변이 쌍을 지니는 이중이중체의 정제 수율을 100%로 하여 정규화하여 계산하였다. EW-RVT 이중이중체의 정제수율은 HEK293-F 세포에서 3.1±0.7 mg/트랜스팩션 100 ml 이며, 이중이중체 중쇄불변부위의 발현 및 정제는 3회 이상 반복하여 수행하여 평균±표준편차로 나타내었다. 그 결과 Fc 돌연변이체가 포함된 이중이중체는 대조군과 유사한 정도의 수율을가지고 있었으며, 이를 통해 라이브러리를 통해 선별된 돌연변이 쌍의 도입은 중쇄불변부위 단백질의 안정성을 크게 저해하지 않는다고 판단되었다.

표 7

Mutant name		Final product after buffer change (EW-RVT variant의 수율로 normalization)(%)
EW-RVT		100
LibA1	A107	108 ± 51.1
	A108	125 ± 78.1
	A109	102 ± 27.7
	A146	127 ± 22.7
LibB1	B121	127 ± 29.3
	B135	104 ± 31.4
	B168	119 ± 24.8
W-VT 돌연변이 부위가 야생형으로 치환된 변이체	A107 _{w/oW-VT}	103 ± 49.0
	A109 _{w/oW-VT}	86.9 ± 2.1
	A146 _{w/oW-VT}	89.5 ± 13.5
	B168 _{w/oW-VT}	96.9 ± 18.4

[0234]

[0235]

라이브러리에서 선별된 돌연변이체 및 W-VT 돌연변이 부위가 야생형 아미노산으로 치환된 돌연변이체의 정제 수율 (HEK293-F 세포, ~6 days expression)

[0236] 실시예 6: LibA1 및 LibB1 라이브러리에서 선별된 CH3 도메인 돌연변이체 쌍의 구조분석

[0237] LibA1 및 LibB1 라이브러리를 통해 선별된 CH3 도메인 돌연변이체 쌍의 이중이중체 형성이 선호되는 이유를 확인하기 위하여 알려진 CH3 도메인 돌연변이체 쌍인 EW-RVT의 단백질 구조 (Choi et al., 2015)를 이용하여 CH3 도메인 상호작용면을 모델링하여 분석하였다.

[0238] ○ A107 [CH3A (K370E/K409W) : CH3B (E357N/D399V/F405T)]

[0239] 야생형의 CH3 도메인 상호작용면에서 한 도메인의 K370은 다른 도메인의 E357 및 S364와 인접해있다. 이 중 K370과 다른 도메인의 E357간의 정전기적 인력은 CH3 도메인의 이중체 형성에 기여한다. LibA1 라이브러리에서 선별된 A107 돌연변이체는 CH3A 도메인과 CH3B 도메인간의 정전기적 결합이 수소결합으로 치환되어 이중이중체의 형성을 안정화시킨다 (K370E_{CH3A}-E357N_{CH3B}, K370E_{CH3A}-S364_{CH3B}, Y349_{CH3A}-E357N_{CH3B}). 또한 CH3A 도메인 동중이중체 형성 시, 정전기적 반발력 (E357_{CH3A}-K370E_{CH3A})에 의해 형성이 저해되며, CH3B 도메인 동중이중체 형성 시에는 눈에 띄는 반발력은 없지만 기존의 동중이중체 형성에 기여하는 상호작용이 결여되어 있다. 이를 통해 이중이중체의 형성이 동중이중체의 형성보다 열역학적으로 안정되어 이중이중체의 형성이 선호되게 된다 (도 12A).

[0240] ○ A108 [CH3A (K370E/K409W) : CH3B (E357I/S364T/D399V/F405T)]

[0241] 야생형의 CH3 도메인 상호작용면에서 한 도메인의 K370은 다른 도메인의 E357 및 S364와 인접해있다. 이 중 K370과 다른 도메인의 E357간의 정전기적 인력은 CH3 도메인의 이중체 형성에 기여한다. LibA1 라이브러리에서 선별된 A108 돌연변이체는 CH3A 도메인과 CH3B 도메인간의 정전기적 결합이 비대칭적 정전기적 결합으로 치환되어 이중이중체의 형성을 안정화시킨다 (K370E_{CH3A}-K409_{CH3B}). 또한 CH3A 도메인 동중이중체 형성 시, 정전기적 반발력 (E357_{CH3A}-K370E_{CH3A})에 의해 형성이 저해되며, CH3B 도메인 동중이중체 형성 시에는 눈에 띄는 반발력은 없지만 기존의 동중이중체 형성에 기여하는 상호작용이 결여되어 있다. 이를 통해 이중이중체의 형성이 동중이중체의 형성보다 열역학적으로 안정되어 이중이중체의 형성이 선호되게 된다 (도 12B).

[0242] ○ A109 [CH3A (K370M/K409W) : CH3B (E357M/S364W/D399V/F405T)]

[0243] 야생형의 CH3 도메인 상호작용면에서 한 도메인의 K370은 다른 도메인의 E357 및 S364와 인접해있다. 이 중 K370과 다른 도메인의 E357간의 정전기적 인력은 CH3 도메인의 이중체 형성에 기여한다. LibA1 라이브러리에서 선별된 A109 돌연변이체는 CH3A 도메인과 CH3B 도메인간의 정전기적 결합이 공간보완적인 소수성결합으로 치환되어 이중이중체의 형성을 안정화시킨다 (K370M_{CH3A}-E357M/S364W_{CH3B}). 또한 CH3A 도메인 동중이중체 형성 시, 쌍을 이루지 못하고 단독으로 존재하는 전하를 지닌 잔기 (E357_{CH3A})가 존재하며, CH3B 도메인 동중이중체 형성 시에는 인접한 잔기간의 측쇄에 의해 CH3 도메인 상호작용면내의 공간배치가 어려워진다 (K370_{CH3B}-S364W_{CH3B}). 이를 통해 이중이중체의 형성이 동중이중체의 형성보다 열역학적으로 안정되어 이중이중체의 형성이 선호되게 된다 (도 13A).

[0244] ○ A146 [CH3A (K370D/K409W) : CH3B (E357M/D399V/F405T)]

[0245] 야생형의 CH3 도메인 상호작용면에서 한 도메인의 K370은 다른 도메인의 E357 및 S364와 인접해있다. 이 중 K370과 다른 도메인의 E357간의 정전기적 인력은 CH3 도메인의 이중체 형성에 기여한다. LibA1 라이브러리에서 선별된 A146 돌연변이체는 CH3A 도메인과 CH3B 도메인간의 정전기적 결합이 비대칭적 정전기적 결합으로 치환되어 이중이중체의 형성을 안정화시킨다 (K370D_{CH3A}-K409_{CH3B}). 또한 CH3A 도메인 동중이중체 형성 시, 정전기적 반발력 (E357_{CH3A}-K370D_{CH3A})에 의해 형성이 저해되며, CH3B 도메인 동중이중체 형성 시에는 눈에 띄는 반발력은 없지만 기존의 동중이중체 형성에 기여하는 상호작용이 결여되어 있다. 이를 통해 이중이중체의 형성이 동중이중체의 형성보다 열역학적으로 안정되어 이중이중체의 형성이 선호되게 된다 (도 13B).

[0246] ○ B121 [CH3A (D399E/K409W) : CH3B (K392E/D399V/F405T)]

[0247] 야생형의 CH3 도메인 상호작용면에서 한 도메인의 D399는 다른 도메인의 K392 및 K409와 인접해있으며, 이 잔기간의 정전기적 인력은 CH3 도메인의 이중체 형성에 기여한다. LibB1 라이브러리에서 선별된 B121 돌연변이체는 CH3A 도메인과 CH3B 도메인간의 정전기적 결합이 비대칭적 정전기적 결합으로 치환되어 이중이중체의 형성을 안정화시킨다 (D399E_{CH3A}-K409_{CH3B}). 또한 CH3A 도메인 동중이중체 형성 시, 음이온- π 반발력 (D399E_{CH3A}-K409W_{CH3A})에 의해 형성이 저해되며, CH3B 도메인 동중이중체 형성 시에는 쌍을 이루지 못하고 단독으로 존재하는 전하를

지닌 잔기 (K392E_{CH3B}, K409_{CH3B})가 존재한다. 이를 통해 이중이중체의 형성이 동중이중체의 형성보다 열역학적으로 안정되어 이중이중체의 형성이 선호되게 된다 (도 14A).

[0248] ○ B135 [CH3A (D399L/K409W) : CH3B (K392S/K409L/D399V/F405T)]

[0249] 야생형의 CH3 도메인 상호작용면에서 한 도메인의 D399는 다른 도메인의 K392 및 K409와 인접해있으며, 이 잔기 간의 정전기적 인력은 CH3 도메인의 이중체 형성에 기여한다. LibB1 라이브러리에서 선별된 B135 돌연변이체는 CH3A 도메인과 CH3B 도메인간의 정전기적 결합이 공간보완적인 소수성결합으로 치환되어 이중이중체의 형성을 안정화시킨다 (D399L_{CH3A}-K392S/K409L_{CH3B}). 또한 CH3A 도메인 동중이중체 형성 시, 쌍을 이루지 못하고 단독으로 존재하는 전하를 지닌 잔기 (K392_{CH3A})가 존재하며, CH3B 도메인 동중이중체 형성 시에는 측쇄의 크기가 작은 잔기가 상호작용면에 위치함에 따른 도메인간 상호작용의 결여 (hole-hole 상호작용면)가 관찰된다. 이를 통해 이중이중체의 형성이 동중이중체의 형성보다 열역학적으로 안정되어 이중이중체의 형성이 선호되게 된다 (도 14B).

[0250] ○ B168 [CH3A (D399L/K409W) : CH3B (K392G/K409M/D399V/F405T)]

[0251] 야생형의 CH3 도메인 상호작용면에서 한 도메인의 D399는 다른 도메인의 K392 및 K409와 인접해있으며, 이 잔기 간의 정전기적 인력은 CH3 도메인의 이중체 형성에 기여한다. LibB1 라이브러리에서 선별된 B168 돌연변이체는 CH3A 도메인과 CH3B 도메인간의 정전기적 결합이 공간보완적인 소수성결합으로 치환되어 이중이중체의 형성을 안정화시킨다 (D399L_{CH3A}-K392G/K409M_{CH3B}). 또한 CH3A 도메인 동중이중체 형성 시, 쌍을 이루지 못하고 단독으로 존재하는 전하를 지닌 잔기 (K392_{CH3A})가 존재하며, CH3B 도메인 동중이중체 형성 시에는 hole-hole 상호작용면이 관찰된다. 이를 통해 이중이중체의 형성이 동중이중체의 형성보다 열역학적으로 안정되어 이중이중체의 형성이 선호되게 된다 (도 15).

[0252] **실시예 7: LibA1 및 LibB1 라이브러리에서 선별된 돌연변이체 쌍을 기반으로 한 2차 돌연변이체 쌍 조합 라이브러리 구축 전략**

[0253] LibA1 및 LibB1 라이브러리에서 선별된 돌연변이체 쌍의 이중이중체 형성수율을 향상시키기 위하여 추가적인 2차 라이브러리를 구축하였다. 도 16은 상기 실시예 5에서 확인된 W-VT 돌연변이 부위 없이도 높은 이중이중체 형성수율을 지닌 A107_{w/oW-VT}와 B168_{w/oW-VT} 돌연변이체 쌍을 기반으로 한 2차 라이브러리 구축 전략을 나타낸 모식도이다. 돌연변이 쌍이 도입되는 부위로는 실시예 3에서 구축한 라이브러리에 포함된 돌연변이 부위인 2쌍의 정전기적 결합 쌍의 대칭적인 위치에 있는 정전기 쌍 (E357/S364-K370과 K392/K409-D399)을 선정하였다. 구체적으로 LibA1에서 선별된 돌연변이 쌍을 포함한 A107_{w/oW-VT} 변이체 (K370E_{CH3A}-E357N_{CH3B})의 E357/S364_{CH3A}-K370_{CH3B} 부위에 돌연변이를 도입한 LibA2 라이브러리와 B168_{w/oW-VT} 변이체 (D399L_{CH3A}-K392G/K409M_{CH3B})의 K392/K409_{CH3A}-D399_{CH3B} 부위에 돌연변이를 도입한 LibB2 라이브러리를 구축하였다. 이 때 돌연변이 부위에 변이되는 아미노산은 NNK가 들어가도록 하였다. NNK는 첫 번째와 두 번째에 N(N=A, T, C, G), 세 번째에 K(B=G, T)를 코딩하며, 이를 통해 53.1% 확률로 비극성아미노산 (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Cys, Met), 21.9% 확률로 비전하/극성아미노산 (Ser, Thr, Asn, Gln), 21.9% 확률로 양전하/음전하아미노산 (Asp, Glu, His, Lys, Arg), 3.1% 확률로 종결코돈으로 치환될 수 있다.

[0254] LibA2 라이브러리 및 LibB2 라이브러리의 제작을 위해서 우선 CH3A 도메인 변이체를 포함하는 displayed Fc_{CH3A} 라이브러리와 CH3B 도메인 변이체를 포함하는 secreted Fc_{CH3B} 라이브러리를 제작하였으며, 하기 표 8의 프라이머를 사용하여 라이브러리 유전자를 증폭하였다.

표 8

라이브러리		목적	방향	길이	올리고뉴클레오타이드 염기서열 (5'-3')
LibA2	Displayed Fc _{CH3A} (CH3A)	Amplifying Fc fragment 1	Forward	22	GTTCAGACTACGCTCTGCAGG
		Amplifying Fc fragment 1	Reverse	18	ATCCCGGGATGGGGGCGAG
		Amplifying Fc fragment 2	Forward	63	CTGCCCCATCCCGGATNNKCTGACCAAGAACCAGGTCNNKCTGACC TGCTGGTCGAGGGC
		Amplifying Fc fragment 2	Reverse	35	TCGATTTTGTACATCTACACTGTTGTTATCAGAT
	Secreted Fc _{CH3B} (CH3B)	Amplifying Fc fragment 1	Forward	26	CTCAACCGGTTATTTCTACTACCGTC
		Amplifying Fc fragment 1	Reverse	20	GACCAGGCAGGTCAGGCTGA
		Amplifying Fc fragment 2	Forward	45	TCAGCCTGACCTGCCTGGTCNNKGGCTTCTATCCAGCGACATCG
		Amplifying Fc fragment 2	Reverse	33	GAACAAAGTCGATTTTGTACATCTACACTGTT
LibB2	Displayed Fc _{CH3A} (CH3A)	Amplifying Fc fragment 1	Forward	22	GTTCAGACTACGCTCTGCAGG
		Amplifying Fc fragment 1	Reverse	58	AGGAGCCGTCGGACAACAGCACGGGAGGCGTGGTMNNGTAGTTGTTCC TCCGGCTGCC
		Amplifying Fc fragment 2	Forward	57	CTGTTGTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCANNKCTCACCGTGACA AGAGCAGG
		Amplifying Fc fragment 2	Reverse	35	TCGATTTTGTACATCTACACTGTTGTTATCAGAT
	Secreted Fc _{CH3B} (CH3B)	Amplifying Fc fragment 1	Forward	26	CTCAACCGGTTATTTCTACTACCGTC
		Amplifying Fc fragment 1	Reverse	18	CAGCACGGGAGGCGTGGT
		Amplifying Fc fragment 2	Forward	42	ACCACGCCTCCCGTCTGNNKCCGACGGCTCCTTCTCTCTC
		Amplifying Fc fragment 2	Reverse	33	GAACAAAGTCGATTTTGTACATCTACACTGTT

[0255]

[0256]

LibA2 라이브러리 및 LibB2 라이브러리 구축에 사용된 프라이머의 올리고뉴클레오타이드 염기서열

[0257]

LibA2 및 LibB2의 반수체 라이브러리의 제작 및 효모접합을 이용한 이배체 라이브러리의 제작방법은 실시예 3에 기술한 방법을 사용하였다. 구축한 이배체 라이브러리의 크기는 계단식 희석을 한 후 선택배지에 자란 콜로니의 수를 측정하여 확인하였으며, LibA2는 약 3.3×10^7 , LibB2는 약 3.0×10^7 으로 모두 이론적인 라이브러리 사이즈인 8×10^3 을 초과하도록 제작되었다.

[0258]

실시예 8: 2차 돌연변이체 쌍 조합 라이브러리 LibA2 및 LibB2에서 이중이중체 중쇄불변부위 고효율 형성을 유도하는 CH3 도메인 돌연변이체 쌍의 선별

[0259]

상기 실시예 7에서 구축한 라이브러리 LibA2 및 LibB2에서 이중이중체 중쇄불변부위의 고효율 형성이 유도되는 돌연변이체 쌍을 선별하기 위하여, FACS를 수행하여 효모 세포 표면에 secreted Fc_{CH3B}의 고정화 정도가 높은 효모를 부유화하였다. 구체적으로는 LibA2 및 LibB2 라이브러리가 효모 세포 표면에 발현되도록 한 후, 일차로 생쥐 유래 항-Flag 항체 (anti-Flag mouse mAb, F3165) (Sigma-Aldrich)로 결합시키고, 이차로 PE가 접합된 항-생쥐 항체 (phycoerythrin conjugated anti-mouse mAb, sc-3738) (Santa Cruze biotechnology)와 반응시킨 후 FACS Aria II 기기 (Becton & Dickinson)를 사용하여 부유화하였다. FACS는 순차적으로 4회 수행하였다. 도 17A는 부유화한 라이브러리에 대해 효모 세포 표면에 고정된 secreted Fc_{CH3B}를 FACS Caliber (Becton & Dickinson)를 이용하여 탐지한 PE 신호 값을 측정된 평균형광강도를 EW-RVT CH3 도메인 돌연변이체 쌍과 비교하여 (EW-RVT의 평균형광강도를 100%로 정규화) 나타낸 자료이다. 이를 통해 LibA2 및 LibB2 라이브러리의 부유화를 확인하였다. 상기한 선별과정을 통해 효모 세포 표면에 secreted Fc_{CH3B}의 고정화 정도가 높은 클론들을 부유화한 후 개별클론들을 얻었다. LibA2 라이브러리에서는 4개의 개별클론 (A205, A210, A216, A241)이, LibB2 라이브러리에서는 6개의 개별클론 (B212, B215, B235, B239, B240, B256)이 분리되었다. 선별된 개별 클론들의 secreted Fc_{CH3B}를 탐지한 PE 신호 값을 측정된 결과 parent 돌연변이체 쌍인 A107_{w/oF-VT} 및 B168_{w/oF-VT}와 비교하여 높은 PE 신호 값을 가진 것을 확인하였다 (도 6B). LibA2 및 LibB2 라이브러리로부터 선별된 개별클론들의 CH3A 및 CH3B 도메인 쌍의 서열은 효모 콜로니 PCR방법을 이용하여 동정하였으며, 콜로니 PCR 방법은 이미 발표한 논문에서 자세하게 기술되어 있다 (Baek et al. 2014). 하기 표 9는 각 LibA2 및 LibB2 라이브러리에서 선별된 개별 클론들에 도입된 돌연변이 쌍을 정리한 것이다.

표 9

Mutant name		CH3A	CH3B
LibA2	A205	E357D/S364W/K370E	E357N/K370R
	A210	E357A/S364Y/K370E	E357N/K370H
	A216	E357G/S364W/K370E	E357N
	A241	E357N/S364W/K370E	E357N
LibB2	B212	K392I/D399L	D399G/K392G/K409M
	B215	K392R/K409R/D399L	D399W/K392G/K409M
	B235	K392C/D399L	D399C/K392G/K409M
	B239	K392L/D399L	D399S/K392G/K409M
	B240	K392S/K409R/D399L	D399G/K392G/K409M
	B256	K392N/D399L	D399V/K392G/K409M

[0260]

[0261]

LibA2 라이브러리 및 LibB2 라이브러리에서 선별된 개별클론들에 도입된 돌연변이 쌍

[0262]

실시예 9: LibA2 및 LibB2 라이브러리에서 선별된 CH3 도메인 돌연변이체 쌍의 이중이중체 중쇄불변부위 형성능 평가

[0263]

상기 실시예 8에서 선별된 CH3 도메인 돌연변이체의 이중이중체 형성 수율을 평가하기 위해 scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 동시 발현 시스템을 사용하였다. scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 동시 발현 시스템은 상기 실시예 5에 자세하게 기술되어 있다. 상기 실시예 8에서 LibA2 및 LibB2 라이브러리로부터 선별된 개별클론들의 CH3 도메인 변이체 쌍에서 CH3A 변이체는 scFv-Fc_{CH3A} 포맷으로, CH3B 변이체는 Fc_{CH3B} 포맷으로 발현되도록 동물세포 발현벡터에 클로닝 하였다. 하기 표 10은 구축한 scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 돌연변이체 쌍을 나타낸 것으로, 상기 실시예 8에서 선별된 개별클론의 CH3 도메인 돌연변이 쌍을 포함하고 있으며, EW-RVT 및 A107_{w/oW-VT}, B168_{w/oW-VT} 돌연변이체 쌍을 대조군으로 사용하였다.

표 10

Mutant name		scFv-Fc _{CH3A} (CH3A chain)	Fc _{CH3B} (CH3B chain)
EW-RVT		K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
LibA1	A107 _{w/oW-VT}	K370E	E357N
LibA2	A205	E357D/S364W/K370E	E357N/K370R
	A210	E357A/S364Y/K370E	E357N/K370H
	A216	E357G/S364W/K370E	E357N
	A241	E357N/S364W/K370E	E357N
LibB1	B168 _{w/oW-VT}	D399L	K392G/K409M
LibB2	B212	K392I/D399L	D399G/K392G/K409M
	B215	K392R/K409R/D399L	D399W/K392G/K409M
	B235	K392C/D399L	D399C/K392G/K409M
	B239	K392L/D399L	D399S/K392G/K409M
	B240	K392S/K409R/D399L	D399G/K392G/K409M
	B256	K392N/D399L	D399V/K392G/K409M

[0264]

[0265]

LibA2 라이브러리 및 LibB2 라이브러리에서 선별된 돌연변이체의 이중이중체 형성능 평가를 위해 구축한 돌연변이 쌍

[0266]

HEK293-F 시스템 (Invitrogen)을 사용한 scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 이중이중체 항체의 발현 및 정제과정은 실시예 5에 기술된 방법과 동일하다. 정제된 항체는 BCA 기법을 통해 양을 정량 하였다. 도 18A는 상기 정제된 항체 5 µg 을 12% 비환원성 조건으로 SDS-PAGE 상에서 분석한 자료이다. scFv-Fc_{CH3A} 동중이중체는 103 kDa, Fc_{CH3B} 동중이중체는 53 kDa, Fc_{CH3B} 단량체는 25 kDa에서 관찰되었으며, scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 이중이중체는 78 kDa에서 관찰되었다. 선별된 클론들은 parent 돌연변이체 쌍인 A107_{w/oW-VT} 및 B168_{w/oW-VT}와 비교하여 높은 이중이중체 형성능을 지닌 것을 확인하였다. 라이브러리 LibA2에서 선별된 돌연변이체 중 A205는 약 89%, LibB2에서 선별된 돌연변이체 중 B235는 약 89%의 높은 이중이중체 형성수율을 지니는 것을 확인하였다.

[0267]

도 18B 및 표 11은 상기한 표 10의 scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} 이중이중체를 반복하여 발현 정제 후, Image J (Wayne Rasband, NIH) 프로그램을 이용하여 SDS-PAGE 상의 각 밴드의 밀도를 분석하여 이중이중체 형성 수율을 정량적으로 나타낸 자료이다. 대조군으로 EW-RVT 및 A107_{w/oW-VT}, B168_{w/oW-VT} 돌연변이체 쌍을 사용하였으며, 결과 값은 3회 이상의 독립적인 실험을 수행한 후 평균±표준편차로 나타내었다. 또한 선별된 개별 클론 중 높은 이중이중체 형성수율을 지니는 A205 및 B235 돌연변이체 쌍은 이중이중체의 형성은 트랜스펙션 시 첨가하는 pcDNA3.1(+)-scFv-Fc_{CH3A} 및 pcDNA3.1(+)-Fc_{CH3B} 플라스미드의 몰 비율에 따라 영향 받는 것을 확인하였다 (도 19).

표 11

Mutant name		(scFv-Fc) ₂ (homodimer)(%)	(scFv-Fc)(Fc) (heterodimer)(%)	(Fc) ₂ (homodimer)(%)	Fc monomer (%)
EW-RVT		0.5 ± 0.6	91.4 ± 1.2	1.6 ± 0.6	6.6 ± 1.3
LibA1	A107 _{w/oW-VT}	21.3 ± 0.4	78.2 ± 4.2	0.5 ± 2.3	ND
LibA2	A205	1.0 ± 0.1	88.8 ± 2.2	10.2 ± 2.3	ND
	A210	9.9 ± 6.9	80.8 ± 5.8	9.3 ± 2.9	ND
	A216	1.5 ± 0.4	80.3 ± 4.6	18.2 ± 2.7	ND
	A241	15.7 ± 3.0	81.0 ± 3.9	3.3 ± 0.8	ND
LibB1	B168 _{w/oW-VT}	1.5 ± 0.8	60.9 ± 2.4	37.6 ± 2.6	ND
LibB2	B212	0.9 ± 0.7	65.3 ± 4.3	33.8 ± 4.1	ND
	B215	1.9 ± 1.2	78.1 ± 6.9	20.0 ± 5.6	ND
	B235	3.7 ± 1.0	89.4 ± 4.1	6.9 ± 2.0	ND
	B239	3.4 ± 1.6	76.3 ± 6.8	20.3 ± 5.2	ND
	B240	4.8 ± 1.4	83.3 ± 4.7	11.9 ± 3.2	ND
	B256	3.9 ± 1.4	79.4 ± 5.2	16.7 ± 3.7	ND

[0268]

[0269]

2차 라이브러리 (LibA2 및 LibB2)에서 선별된 돌연변이체의 이중이중체 형성 수율 (SDS-PAGE 결과 분석)

[0270]

하기 표 12는 2차 라이브러리인 LibA2 및 LibB2에서 선별된 돌연변이체의 정제 수율을 나타낸 자료이다. 표 10에 기술한 이중이중체를 상기한 방법으로 발현 및 정제하였을 때의 수율을 대조군인 EW-RVT 돌연변이 쌍을 지니는 이중이중체의 정제 수율을 100%로 하여 정규화하여 계산하였다. EW-RVT 이중이중체의 정제수율은 HEK293-F 세포에서 3.1±0.7 mg/트랜스팩션 100 ml 이며, 이중이중체 중쇄불변부위의 발현 및 정제는 3회 이상 반복하여 수행하여 평균±표준편차로 나타내었다. 그 결과 중쇄불변부위 돌연변이체가 포함된 이중이중체는 대조군과 유사한 정도의 수율을가지고 있었으며, 이를 통해 라이브러리를 통해 선별된 돌연변이 쌍의 도입은 중쇄불변부위 단백질의 안정성을 크게 저해하지 않는다고 판단되었다.

표 12

Mutant name		Final product after buffer change (EW-RVT variant의 수율로 normalization)(%)
EW-RVT		100
LibA2	A205	118 ± 5.0
	A210	104 ± 9.2
	A216	92.1 ± 13.1
	A241	150 ± 49.6
LibB2	B212	123 ± 31.2
	B215	114 ± 12.9
	B235	101 ± 25.3
	B239	93.8 ± 31.2
	B240	104 ± 16.9
	B256	103 ± 11.8

[0271]

[0272]

2차 라이브러리 (LibA2 및 LibB2)에서 선별된 돌연변이체의 정제 수율 (HEK293-F 세포, ~6 days expression, EW-RVT variant의 경우 3.1 ± 0.7 mg/100 ml culture volume)

[0273]

실시예 10: LibA2 및 LibB2 라이브러리에서 선별된 CH3 도메인 돌연변이체 쌍의 구조분석

- [0274] LibA2 및 LibB2 라이브리리를 통해 선별된 CH3 도메인 돌연변이체 쌍의 이중이중체 형성이 선호되는 이유를 확인하기 위하여 알려진 CH3 도메인 돌연변이체 쌍인 EW-RVT의 단백질 구조 (Choi et al., 2015)를 이용하여 CH3 도메인 상호작용면을 모델링하여 분석하였다.
- [0275] ○ A205 [CH3A (E357D/S364W/K370E) : CH3B (E357N/K370R)]
- [0276] 야생형의 CH3 도메인 상호작용면에서 한 도메인의 E357 및 S364는 다른 도메인의 K370과 인접해있다. 이 중 E357과 다른 도메인의 K370간의 정전기적 인력은 CH3 도메인의 이중체 형성에 기여한다. LibA2 라이브리리에서 선별된 A205 돌연변이체는 CH3A 도메인과 CH3B 도메인간의 정전기적 결합이 양이온- π 결합으로 치환되어 이중이중체의 형성을 안정화시킨다 (S364W_{CH3A}-K370R_{CH3B}). 또한 CH3A 도메인 동중이중체 형성 시 음이온- π 반발력 (E357D_{CH3A}-S364W_{CH3A}) 에 의해 형성이 저해되며, CH3B 도메인 동중이중체 형성 시에는 hole-hole 상호작용면이 관찰된다. 이를 통해 이중이중체의 형성이 동중이중체의 형성보다 열역학적으로 안정되어 이중이중체의 형성이 선호되게 된다 (도 20A).
- [0277] ○ A210 [CH3A (E357A/S364Y/K370E) : CH3B (E357N/K370H)]
- [0278] 야생형의 CH3 도메인 상호작용면에서 한 도메인의 E357 및 S364는 다른 도메인의 K370과 인접해있다. 이 중 E357과 다른 도메인의 K370간의 정전기적 인력은 CH3 도메인의 이중체 형성에 기여한다. LibA2 라이브리리에서 선별된 A210 돌연변이체는 CH3A 도메인과 CH3B 도메인간의 정전기적 결합이 π - π 결합으로 치환되어 이중이중체의 형성을 안정화시킨다 (S364Y_{CH3A}-K370H_{CH3B}). 또한 CH3A 도메인 동중이중체 형성 시 음이온- π 반발력 (S364Y_{CH3A}-K370E_{CH3A}) 에 의해 형성이 저해되며, CH3B 도메인 동중이중체 형성 시에는 hole-hole 상호작용면이 관찰된다. 이를 통해 이중이중체의 형성이 동중이중체의 형성보다 열역학적으로 안정되어 이중이중체의 형성이 선호되게 된다 (도 20B).
- [0279] ○ A216 [CH3A (E357G/S364W/K370E) : CH3B (E357N)]
- [0280] 야생형의 CH3 도메인 상호작용면에서 한 도메인의 E357 및 S364는 다른 도메인의 K370과 인접해있다. 이 중 E357과 다른 도메인의 K370간의 정전기적 인력은 CH3 도메인의 이중체 형성에 기여한다. LibA2 라이브리리에서 선별된 A216 돌연변이체는 CH3A 도메인과 CH3B 도메인간의 정전기적 결합이 양이온- π 결합으로 치환되어 이중이중체의 형성을 안정화시킨다 (S364W_{CH3A}-K370_{CH3B}). 또한 CH3A 도메인 동중이중체 형성 시 음이온- π 반발력 (S364W_{CH3A}-K370E_{CH3A}) 에 의해 형성이 저해되며, CH3B 도메인 동중이중체 형성 시에는 눈에 띄는 반발력은 없지만 기존의 동중이중체 형성에 기여하는 상호작용이 결여되어 있다. 이를 통해 이중이중체의 형성이 동중이중체의 형성보다 열역학적으로 안정되어 이중이중체의 형성이 선호되게 된다 (도 21A).
- [0281] ○ A241 [CH3A (E357N/S364W/K370E) : CH3B (E357N)]
- [0282] 야생형의 CH3 도메인 상호작용면에서 한 도메인의 E357 및 S364는 다른 도메인의 K370과 인접해있다. 이 중 E357과 다른 도메인의 K370간의 정전기적 인력은 CH3 도메인의 이중체 형성에 기여한다. LibA2 라이브리리에서 선별된 A241 돌연변이체는 CH3A 도메인과 CH3B 도메인간의 정전기적 결합이 양이온- π 결합으로 치환되어 이중이중체의 형성을 안정화시킨다 (S364W_{CH3A}-K370_{CH3B}). 또한 CH3A 도메인 동중이중체 형성 시 음이온- π 반발력 (S364W_{CH3A}-K370E_{CH3A}) 에 의해 형성이 저해되며, CH3B 도메인 동중이중체 형성 시에는 눈에 띄는 반발력은 없지만 기존의 동중이중체 형성에 기여하는 상호작용이 결여되어 있다. 이를 통해 이중이중체의 형성이 동중이중체의 형성보다 열역학적으로 안정되어 이중이중체의 형성이 선호되게 된다 (도 21B).
- [0283] ○ B212 [CH3A (K392I/D399L) : CH3B (D399G/K392G/K409M)]
- [0284] 야생형의 CH3 도메인 상호작용면에서 한 도메인의 K392와 K409는 다른 도메인의 D399와 인접해있으며, 이 잔기간의 정전기적 인력은 CH3 도메인의 이중체 형성에 기여한다. LibB2 라이브리리에서 선별된 B212 돌연변이체는 CH3A 도메인과 CH3B 도메인간의 정전기적 결합이 양이온- π 결합으로 치환되어 이중이중체의 형성을 안정화시킨다 (K409_{CH3A}-F405_{CH3B}). 또한 CH3A 도메인 동중이중체 형성 시, 쌍을 이루지 못하고 단독으로 존재하는 전하를 지닌 잔기 (K409_{CH3A})가 존재하며, CH3B 도메인 동중이중체 형성 시 hole-hole 상호작용면이 관찰된다. 이를 통해 이중이중체의 형성이 동중이중체의 형성보다 열역학적으로 안정되어 이중이중체의 형성이 선호되게 된다 (도 22A).

- [0285] ○ B215 [CH3A (K392R/K409R/D399L) : CH3B (D399W/K392G/K409M)]
- [0286] 야생형의 CH3 도메인 상호작용면에서 한 도메인의 K392와 K409는 다른 도메인의 D399와 인접해있으며, 이 잔기 간의 정전기적 인력은 CH3 도메인의 이중체 형성에 기여한다. LibB2 라이브러리에서 선별된 B215 돌연변이체는 CH3A 도메인과 CH3B 도메인간의 정전기적 결합이 양이온- π 결합으로 치환되어 이중이중체의 형성을 안정화시킨다 (K392R_{CH3A}-D399W_{CH3B}, K409R_{CH3A}-D399W_{CH3B}). 또한 CH3A 도메인 동종이중체 형성 시, 쌍을 이루지 못하고 단독으로 존재하는 전하를 지닌 잔기 (K392R_{CH3A}, K409R_{CH3A})가 존재하며, CH3B 도메인 동종이중체 형성 시 인접한 잔기 간의 측쇄에 의해 CH3 도메인 상호작용면내의 공간배치가 어려워진다 (K409M_{CH3B}-D399W_{CH3B}). 이를 통해 이중이중체의 형성이 동종이중체의 형성보다 열역학적으로 안정되어 이중이중체의 형성이 선호되게 된다 (도 22B).
- [0287] ○ B235 [CH3A (K392C/D399L) : CH3B (D399C/K392G/K409M)]
- [0288] 야생형의 CH3 도메인 상호작용면에서 한 도메인의 K392와 K409는 다른 도메인의 D399와 인접해있으며, 이 잔기 간의 정전기적 인력은 CH3 도메인의 이중체 형성에 기여한다. LibB2 라이브러리에서 선별된 B235 돌연변이체는 CH3A 도메인과 CH3B 도메인간의 정전기적 결합이 이황화결합으로 치환되어 이중이중체의 형성을 안정화시킨다 (K392C_{CH3A}-D399C_{CH3B}). 또한 CH3A 도메인 동종이중체 형성 시, 쌍을 이루지 못하고 단독으로 존재하는 전하를 지닌 잔기 (K409R_{CH3A})가 존재하며, CH3B 도메인 동종이중체 형성 시 hole-hole 상호작용면이 관찰된다. 이를 통해 이중이중체의 형성이 동종이중체의 형성보다 열역학적으로 안정되어 이중이중체의 형성이 선호되게 된다 (도 23A).
- [0289] ○ B239 [CH3A (K392L/D399L) : CH3B (D399S/K392G/K409M)]
- [0290] 야생형의 CH3 도메인 상호작용면에서 한 도메인의 K392와 K409는 다른 도메인의 D399와 인접해있으며, 이 잔기 간의 정전기적 인력은 CH3 도메인의 이중체 형성에 기여한다. LibB2 라이브러리에서 선별된 B239 돌연변이체는 CH3A 도메인과 CH3B 도메인간의 정전기적 결합이 양이온- π 결합으로 치환되어 이중이중체의 형성을 안정화시킨다 (K409R_{CH3A}-F405_{CH3B}). 또한 CH3A 도메인 동종이중체 형성 시, 쌍을 이루지 못하고 단독으로 존재하는 전하를 지닌 잔기 (K409R_{CH3A})가 존재하며, CH3B 도메인 동종이중체 형성 시 hole-hole 상호작용면이 관찰된다. 이를 통해 이중이중체의 형성이 동종이중체의 형성보다 열역학적으로 안정되어 이중이중체의 형성이 선호되게 된다 (도 23B).
- [0291] ○ B240 [CH3A (K392S/K409R/D399L) : CH3B (D399G/K392G/K409M)]
- [0292] 야생형의 CH3 도메인 상호작용면에서 한 도메인의 K392와 K409는 다른 도메인의 D399와 인접해있으며, 이 잔기 간의 정전기적 인력은 CH3 도메인의 이중체 형성에 기여한다. LibB2 라이브러리에서 선별된 B240 돌연변이체는 CH3A 도메인과 CH3B 도메인간의 정전기적 결합이 양이온- π 결합으로 치환되어 이중이중체의 형성을 안정화시킨다 (K409R_{CH3A}-F405_{CH3B}). 또한 CH3A 도메인 동종이중체 형성 시, 쌍을 이루지 못하고 단독으로 존재하는 전하를 지닌 잔기 (K409R_{CH3A})가 존재하며, CH3B 도메인 동종이중체 형성 시 hole-hole 상호작용면이 관찰된다. 이를 통해 이중이중체의 형성이 동종이중체의 형성보다 열역학적으로 안정되어 이중이중체의 형성이 선호되게 된다 (도 24A).
- [0293] ○ B256 [CH3A (K392N/D399L) : CH3B (D399V/K392G/K409M)]
- [0294] 야생형의 CH3 도메인 상호작용면에서 한 도메인의 K392와 K409는 다른 도메인의 D399와 인접해있으며, 이 잔기 간의 정전기적 인력은 CH3 도메인의 이중체 형성에 기여한다. LibB2 라이브러리에서 선별된 B256 돌연변이체는 CH3A 도메인과 CH3B 도메인간의 정전기적 결합이 양이온- π 결합으로 치환되어 이중이중체의 형성을 안정화시킨다 (K409R_{CH3A}-F405_{CH3B}). 또한 CH3A 도메인 동종이중체 형성 시, 쌍을 이루지 못하고 단독으로 존재하는 전하를 지닌 잔기 (K409R_{CH3A})가 존재하며, CH3B 도메인 동종이중체 형성 시 hole-hole 상호작용면이 관찰된다. 이를 통해 이중이중체의 형성이 동종이중체의 형성보다 열역학적으로 안정되어 이중이중체의 형성이 선호되게 된다 (도 24B).
- [0295] **실시예 11: CH3 도메인 돌연변이체 쌍 라이브러리에서 선별된 돌연변이체 쌍의 발현 및 정제**
- [0296] 상기 구축한 총 4종의 CH3 도메인 돌연변이체 쌍 조합 라이브러리 (LibA1, LibB1, LibA2, LibB2) 에서 선별된

각각의 개별 클론 중 높은 이중이중체 형성 수율을 지니는 4종 (A107, B168, A205, B235)의 돌연변이체 쌍의 생화학적 특성을 분석하기 위하여 중쇄불변부위 이중체 포맷 (Fc_{CH3A}-Fc_{CH3B}) 으로 생산하였다. 하기 표 13은 중쇄불변부위 이중체 포맷으로 생산한 돌연변이체 쌍의 서열을 나타낸 자료이다. 이를 위해 각각의 CH3A 도메인 변이체 및 CH3B 도메인 변이체를 실시예 5에 기술된 pcDNA3.1(+)-Fc_{CH3} 벡터에 클로닝 하였다.

표 13

Mutant name	Fc _{CH3A} (CH3A chain)	Fc _{CH3B} (CH3B chain)
Fc-A107	K370E/K409W	E357N/D399V/F405T
Fc-B168	D399L/K409W	K392G/K409M/D399V/F405T
Fc-A205	E357D/S364W/K370E	E357N/K370R
Fc-B235	K392C/D399L	D399C/K392G/K409M

[0297]

[0298]

중쇄불변부위 이중체 포맷으로 생산한 돌연변이체 쌍

[0299]

도 25는 분석에 사용된 돌연변이체 쌍을 포함한 Fc_{CH3A}-Fc_{CH3B} 포맷을 모식화한 자료이다. 상기 구축된 pcDNA3.1(+)-Fc_{CH3A} 및 pcDNA3.1(+)-Fc_{CH3B} 동물세포 발현벡터는 HEK293-F 시스템 (Invitrogen)을 사용하여 생산하였다. 구체적으로 진탕 플라스크 (Corning)에서 무혈청 FreeStyle 293 발현 배지 (Invitrogen)에서 부유 성장하는 HEK293-F 세포 (Invitrogen)에 발현벡터와 폴리에틸렌이민 (Polyethylenimine, PEI) (Polyscience)의 혼합물로 트랜스펙션 하였다. 진탕 플라스크에 200 mL 트랜스펙션 시, HEK293-F 세포는 2.0×10⁶ 세포/ml의 밀도로 배지 100 ml에 파종하고, 125 rpm, 8% CO₂에서 배양하였다. 같은 몰 비율로 상기 구축한 pcDNA3.1(+)-Fc_{CH3A} 및 pcDNA3.1(+)-Fc_{CH3B} 플라스미드 DNA를 FreeStyle 293 발현 배지 (Invitrogen)에 총 250 μg (DNA 각 1.25 μg/ml)으로 희석하여, PEI 750 μg (7.5 μg/ml)을 희석한 5 ml의 배지와 혼합하여 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 그 후 반응시킨 혼합배지를 앞서 100 ml로 파종한 세포에 넣어 4시간 동안 125 rpm, 8% CO₂에서 배양 후, 나머지 100 ml의 FreeStyle 293 발현 배지 (Invitrogen)를 추가하여 5일동안 배양하였다. 표준 프로토콜을 참조하여 채취한 세포 배양 상등액을 단백질 A 세파로오스 컬럼 (Protein A Sepharose column) (GE healthcare)에 적용하여 PBS (pH 7.4)로 세척하였으며, 0.1 M 글라이신 완충액을 이용하여 pH 3.0에서 중쇄불변부위 돌연변이체를 용리한 후 1 M Tris 완충액을 이용하여 즉각적으로 중화하였다. 용리한 단백질 분획은 Dextran Desalting Column (Thermo Scientific Pierce)를 이용하여 PBS (pH7.4)로 완충액을 교환한 후, Amicon Ultra (MILLIPORE) 원심분리 농축기를 사용하여 농축하였다. 정제된 중쇄불변부위 돌연변이체는 BCA 기법을 통해 양을 정량 하였다.

[0300]

도 26은 상기 정제된 중쇄불변부위 이중체 단백질은 5 μg을 12% 비환원성 조건 및 환원성 조건에서 SDS-PAGE 상에서 분석한 자료이다. 정제된 중쇄불변부위 돌연변이체는 비환원성 조건에서는 약 53 kDa의 분자량을, 환원성 조건에서는 약 26 kDa의 분자량을 보여주었다. 이는 발현 정제된 중쇄불변부위 돌연변이체가 용액 상에서 자연적인 이황화결합을 통해 이중체로 존재하며, 올리고머 (oligomer)를 형성하지 않음을 보여준다.

[0301]

도 27은 정제한 중쇄불변부위 돌연변이체가 올리고머를 형성하지 않고 이중체로 존재함을 확인하기 위해 크기배제크로마토그래피 컬럼 (Size exclusion chromatography column) (Superdex™200 10/300GC, GE Healthcare)을 이용하여 HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (The Agilent 1200 Series LC Systems and Modules, Agilent) 분석을 수행한 결과이다. 용출 완충액은 PBS (pH 7.4), 유속은 0.5 ml/분이다. 단백질 크기 마커로 사용된 단백질은 alcohol dehydrogenase (150 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), cytochrome C (12.4 kDa) (Sigma-Aldrich)이다. 모든 CH3 돌연변이체 쌍이 포함된 중쇄불변부위 돌연변이체는 중쇄불변부위 이중체 단백질의 크기인 약 53 kDa에서 한 개의 극점이 측정되어 올리고머 형성 없이 이중체로 존재함을 보여준다.

[0302]

실시예 12: CH3 도메인 돌연변이체 쌍 라이브러리에서 선별된 CH3 도메인 돌연변이체 쌍의 열역학적 안정성 평

가

[0303] 상기 실시예 11에서 생산한 4종의 돌연변이체 쌍 (A107, B168, A205, B235)을 포함하는 중쇄불변부위 돌연변이체의 열역학적 안정성을 평가하기 위하여 시차주사 열용량 분석기 (Differential Scanning Calorimetry, DSC)인 MicroCal VP-DSC microcalorimeter (MicroCal, UK)를 사용하여 최대열용량 온도 (T_m)를 분석하였다. 열역학적 변성은 25°C부터 95°C까지 1.5°C/분의 속도로 측정하였으며, 중쇄불변부위 돌연변이체가 제외된 동일한 조성의 완충액을 통해 측정값을 보정하였다. 중쇄불변부위 돌연변이체의 최대열용량온도는 비열 (maximal heat capacity at constant pressure, ΔC_p)의 온도로 측정되며, 이를 전환한 것이다. 도 28 및 표 14는 야생형 중쇄불변부위와 라이브러리에서 선별된 돌연변이체 쌍을 각각 포함한 Fc-A107, Fc-B168, Fc-A205, Fc-B235 중쇄불변부위 돌연변이체의 시차주사 열용량 분석 결과와 CH2 도메인 및 CH3 도메인의 최대열용량온도를 나타낸 자료이다.

표 14

Fc proteins	T_m (CH2 도메인)(°C)	T_m (CH3 도메인)(°C)
Fc-WT	71.3±0.9	85.3±0.4
Fc-A107	72.4±0.4	76.9±0.5
Fc-B168	71.5±0.1	75.6±0.4
Fc-A205	72.2±0.6	79.5±1.0
Fc-B235	73.1±0.1	79.7±0.7

[0304]

[0305] 중쇄불변부위 이중체 포맷으로 생산한 돌연변이체 쌍의 최대열용량온도

[0306] 야생형 중쇄불변부위와 4종의 중쇄불변부위 돌연변이체의 CH2 도메인의 최대열용량온도는 비슷하였지만, CH3 도메인의 최대열용량온도는 2차 라이브러리에서 선별된 Fc-A205 (~79.5°C), Fc-B235 (~79.7°C)으로 1차 라이브러리에서 선별된 Fc-A107 (~76.9°C), Fc-B168 (~75.6°C) 및 알려진 CH3 도메인 돌연변이체인 Fc-EW-RVT (~77.4°C) (Choi et al., 2013; Choi et al., 2015), Fc-KiH (~76.2°C) (Choi et al., 2013; Atwell et al., 1997) 보다 높은 값을 가지는 것을 확인하였다. 이는 라이브러리에서 선별된 돌연변이체들이 돌연변이가 도입되었음에도 불구하고, 열역학적 안정성을 유지하는 것을 의미한다.

[0307] 실시예 13: CH3 도메인 돌연변이체 쌍 라이브러리에서 선별된 CH3 도메인 돌연변이체 쌍의 FcRn 결합능 평가

[0308] 상기 실시예 11에서 생산한 4종의 돌연변이체 쌍 (A107, B168, A205, B235)을 포함하는 중쇄불변부위 돌연변이체가 야생형 중쇄불변부위와 비교하여 FcRn에 대한 결합능을 그대로 유지하고 있는지 확인하기 위하여 SPR (Surface Plasmon Resonance)를 분석하였다. Biacore2000 기기 (GE healthcare)를 이용하여 분석하였다. 구체적으로는 FcRn (Feng et al., 2011)을 약 10 mM Na-Acetate 완충액 (pH 4.0)에 희석하여 CM5 센서칩 (GE healthcare)에 약 1000 response units (RU) 고정화하였다. 결합 및 해리 분석은 0.005% Tween20이 함유된 PBS (pH 6.0) 완충액 또는 HBS-EP 완충액 (pH 7.4)를 이용하여 30 μ l/분의 유속으로 각각 3분간 분석하였으며, 야생형 중쇄불변부위 및 중쇄불변부위 돌연변이체 4종을 312.5 nM, 0.625nM, 1.25 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M의 농도로 분석하였다. 결합 및 해리 분석 후 CM5 센서칩의 재생은 재생완충액 (10 mM NaOH, 1M NaCl, pH10.0)을 30 μ l/분의 유속으로 1.5분간 수행하였다. 도 29는 결합 및 해리 분석 후 얻어진 센서그램을 나타낸 것이며, 하기 표 15는 얻어진 센서그램을 이용하여 친화도를 계산한 결과이다. 이를 통해 라이브러리에서 선별된 돌연변이 쌍이 포함된 중쇄불변부위 돌연변이체는 야생형 중쇄불변부위와 마찬가지로 pH 의존적인 FcRn 결합능을 그대로 유지하고 있는 것을 확인하였다.

표 15

Fc proteins	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)
Fc-WT	$1.64 \pm 0.05 \times 10^3$	$5.83 \pm 0.46 \times 10^{-5}$	$3.56 \pm 0.39 \times 10^{-8}$
Fc-A107	$1.58 \pm 0.03 \times 10^3$	$1.02 \pm 0.69 \times 10^{-4}$	$6.50 \pm 0.45 \times 10^{-8}$
Fc-B168	$1.09 \pm 0.01 \times 10^3$	$1.67 \pm 0.39 \times 10^{-5}$	$1.75 \pm 0.15 \times 10^{-8}$
Fc-A205	$1.13 \pm 0.01 \times 10^3$	$1.11 \pm 0.57 \times 10^{-4}$	$1.18 \pm 0.39 \times 10^{-8}$
Fc-B235	$1.58 \pm 0.02 \times 10^3$	$8.00 \pm 0.57 \times 10^{-5}$	$5.06 \pm 0.43 \times 10^{-8}$

[0309]

[0310]

중쇄불변부위 이중체 포맷으로 생산한 돌연변이체 쌍의 FcRn에 대한 친화도 (pH 6.0 조건)

[0311]

하기 표 16은 본 발명의 CH3 도메인의 이중이중체 및 이중이중체 중쇄불변부위 쌍의 서열 정보를 나타낸다.

표 16

[0312]

CH3 도메인의 이중이중체 쌍의 서열 정보

Mutant name	CH3A (EU numbering 341~447)	CH3B (EU numbering 341~447)
Wild type	(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 1)	Wild type CH3A와 동일
W-VT	(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQ QGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 2)	(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 3)
EW-RVT	(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQ QGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 4)	(EU number 341) GQPREPRVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 5)
A107	(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQ QGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 6)	(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDNLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 7)
A108	(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQ QGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 8)	(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDILTKNQVTLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 9)
A109	(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVMGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQ QGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 10)	(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDMLTKNQVWLTVCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 11)

<p>A146</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQ QGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 12)</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDMLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 13)</p>
<p>B121</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLESDGSFFLYSWLTVDKSRWQ QGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 14)</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYETTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 15)</p>
<p>B135</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLLSDGSFFLYSWLTVDKSRWQ QGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 16)</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYSTTPPVLDSDGSFFLYSLLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 17)</p>
<p>B168</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLLSDGSFFLYSWLTVDKSRWQ QGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 18)</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYGTTTPVLDSDGSFFLYSMLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 19)</p>
<p>A205</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDDLTKNQVWLTCLVEGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 20)</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDNLTKNQVSLTCLVRGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 21)</p>
<p>A210</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDALTKNQVYLTCLVEGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 22)</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDNLTKNQVSLTCLVHGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 23)</p>
<p>A216</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDGLTKNQVWLTCLVEGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 24)</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDNLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 25)</p>
<p>A241</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDNLTKNQVWLTCLVEGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 26)</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDNLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 27)</p>
<p>B212</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYITTPVLLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 28)</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYGTTTPVLDSDGSFFLYSMLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 29)</p>

<p>B215</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYRTTPPVLLSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ QGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 30)</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYGTTTPPVLLSDGSFFLYSMLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 31)</p>
<p>B235</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYCTTPPVLLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 32)</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYGTTTPPVLLSDGSFFLYSMLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 33)</p>
<p>B239</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYLTTPPVLLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 34)</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYGTTPPVLLSDGSFFLYSMLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 35)</p>
<p>B240</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYSTTPPVLLSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ QGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 36)</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYGTTTPPVLLSDGSFFLYSMLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 37)</p>
<p>B256</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYNTTPPVLLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 38)</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYGTTTPPVLLSDGSFFLYSMLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 39)</p>
<p>A107_{w/oW-VT}</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPPVLLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 40)</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDNLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPPVLLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 41)</p>
<p>A109_{w/oW-VT}</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVMGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPPVLLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 42)</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDMLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPPVLLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 43)</p>
<p>A146_{w/oW-VT}</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPPVLLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 44)</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDMLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPPVLLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 45)</p>
<p>B168_{w/oW-VT}</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPPVLLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 46)</p>	<p>(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYGTTTPPVLLSDGSFFLYSMLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 47)</p>

KiH (Genentech)	(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 48)	(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 49)
Hole-Hole (Genentech)	(EU number 341) GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 50)	Hole-Hole CH3A와 동일
	Fc (CH3A 포함) (EU numbering 225-447)	Fc (CH3B 포함) (EU numbering 225-447)
Wild type	(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 51)	Wild type Fc (CH3A 포함)와 동일
W-VT	(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 52)	(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 53)
EW-RVT	(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 54)	(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPR VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 55)
A107	(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 56)	(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDNLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 57)
A108	(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 58)	(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDILTKNQVTLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 59)

<p>A109</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVMGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 60)</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDMLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 61)</p>
<p>A146</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVDFGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 62)</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDMLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 63)</p>
<p>B121</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLES DGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 64)</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYETTPVVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 65)</p>
<p>B135</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLLSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 66)</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYSTTPVVLVSDGSFTLYSLLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 67)</p>
<p>B168</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLLSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 68)</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYGTTPVVLVSDGSFTLYSMLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 69)</p>
<p>A205</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDDLTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 70)</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDNLTKNQVSLTCLVRGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 71)</p>

<p>A210</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDALTKNQVYL TCLVEGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 72)</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDNLTKNQVSLTCLVHGFIYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 73)</p>
<p>A216</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDGLTKNQVWL TCLVEGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 74)</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDNLTKNQVSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 75)</p>
<p>A241</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDNLTKNQVWL TCLVEGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 76)</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDNLTKNQVSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 77)</p>
<p>B212</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFIYPSDIAVE WESNGQPENNYITTPPVLLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 78)</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPE NNYGTTPPVLLSDGSFFLYSMLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 79)</p>
<p>B215</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFIYPSDIAVE WESNGQPENNYRTTPPVLLSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 80)</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPE NNYGTTPPVLLSDGSFFLYSMLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 81)</p>
<p>B235</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFIYPSDIAVE WESNGQPENNYCTTPPVLLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 82)</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPE NNYGTTPPVLLSDGSFFLYSMLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 83)</p>

<p>B239</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYLTTPPVLLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 84)</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYGTTTPVLLSDGSFFLYSMLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 85)</p>
<p>B240</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYSTTPPVLLSDGSFFLYSMLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 86)</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYGTTTPVLLSDGSFFLYSMLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 87)</p>
<p>B256</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYNTTPPVLLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 88)</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYGTTTPVLLSDGSFFLYSMLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 89)</p>
<p>A107_{w/oII-VT}</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 90)</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDNLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 91)</p>
<p>A109_{w/oII-VT}</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVMGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 92)</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDMLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 93)</p>
<p>A146_{w/oII-VT}</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVDGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 94)</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDMLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 95)</p>

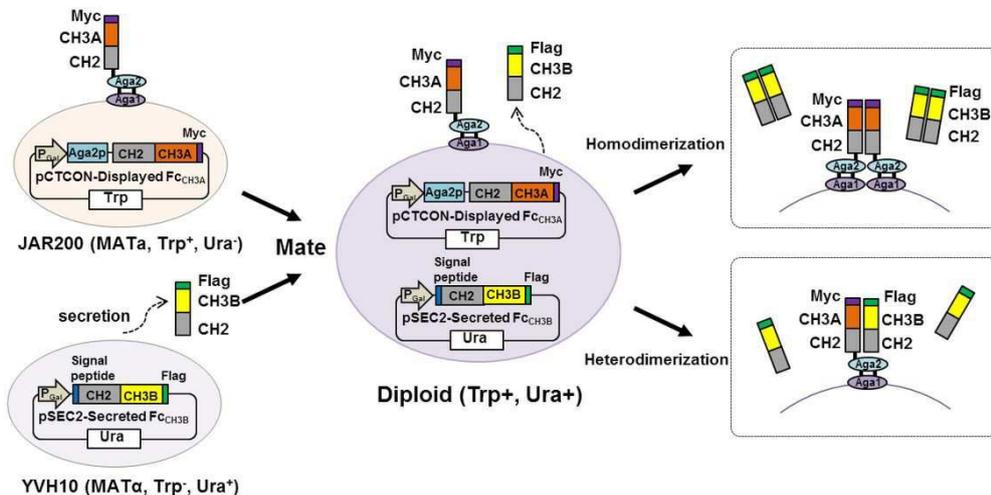
<p>B168_{u/oW-VT}</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLLSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 96)</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYGTTTPVLLSDGSFFLYSMLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH EALHNHYTQKLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 97)</p>
<p>KiH (Genentech)</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLLSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 98)</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH EALHNHYTQKLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 99)</p>
<p>Hole-Hole (Genentech)</p>	<p>(EU number 225) TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLLSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSPGK (EU number 447) (서열번호 100)</p>	<p>Hole-Hole Fc (CH3A 포함)와 동일</p>

[0313] CH3 도메인의 이중이중체 쌍의 서열 정보

[0314] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해되어야 한다.

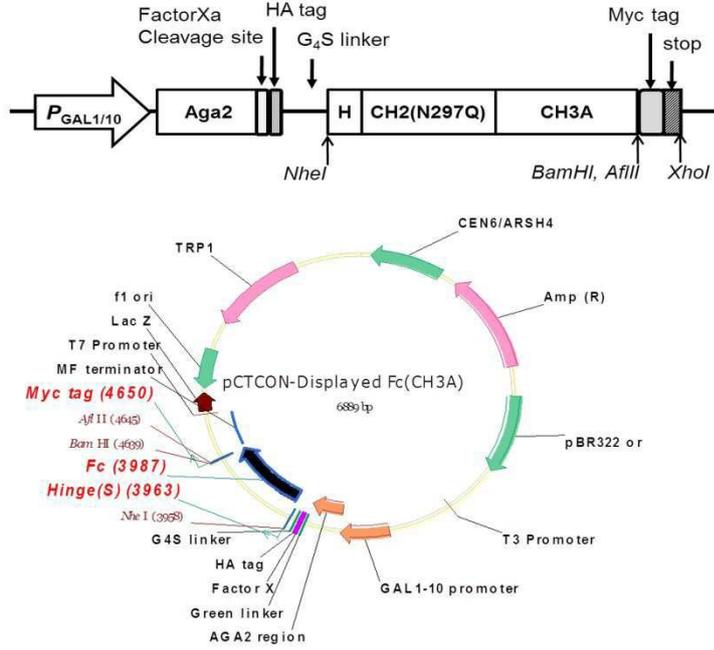
도면

도면1



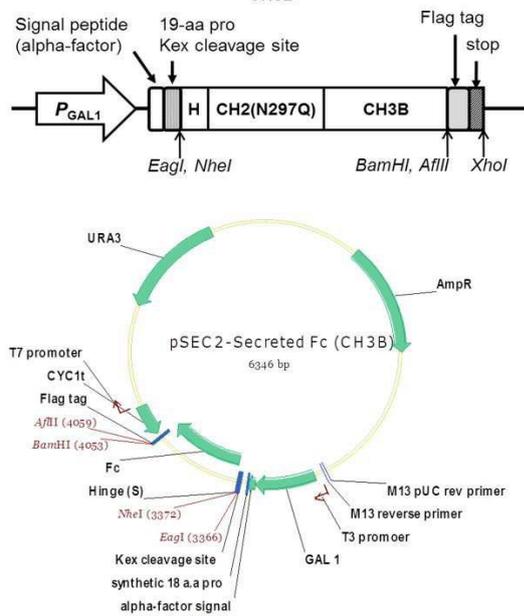
도면2

pCTCON - Displayed Fc_{CH3A}

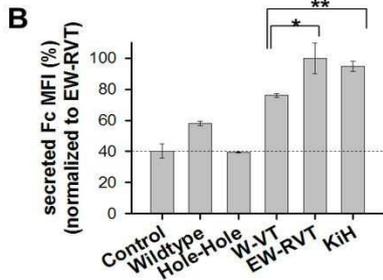
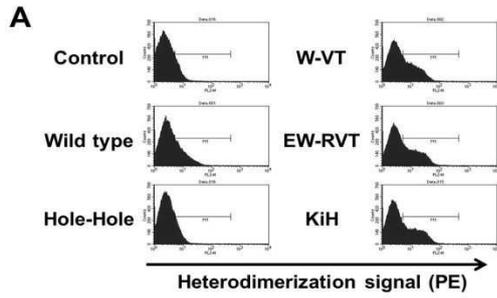


도면3

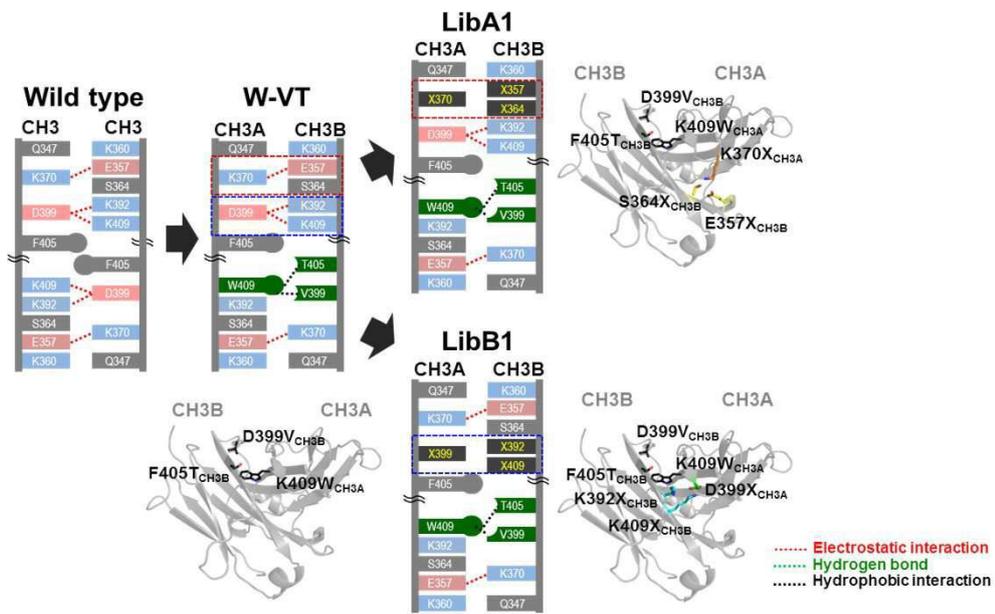
pSEC2 - Secreted Fc_{CH3B}



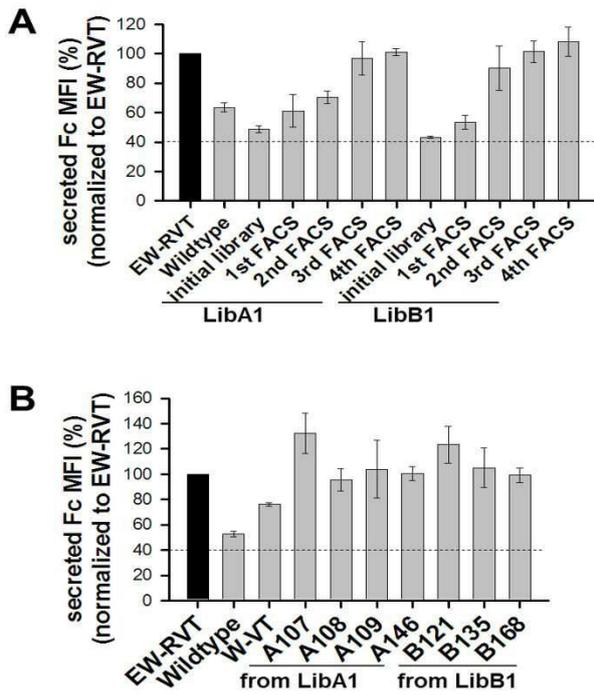
도면4



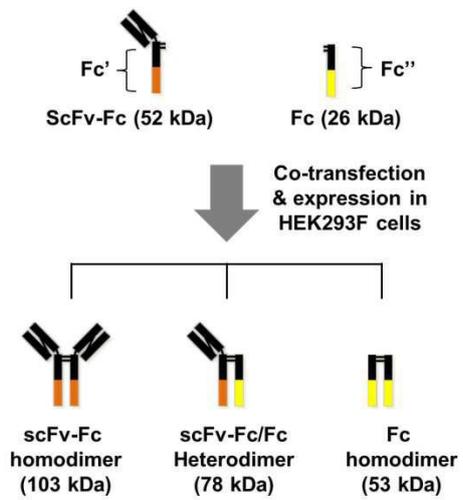
도면5



도면6



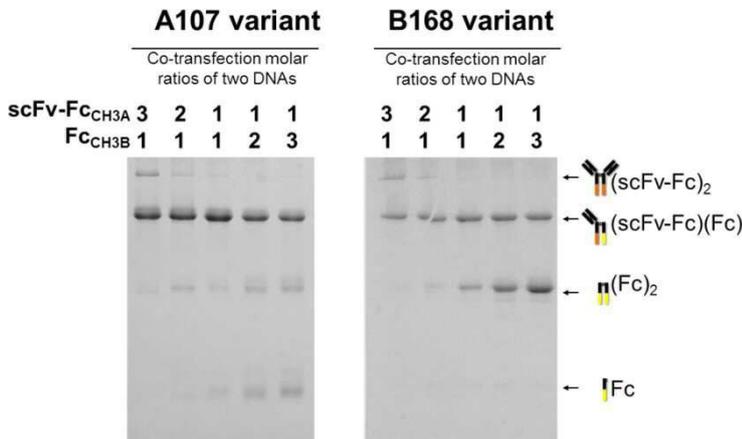
도면7



도면8



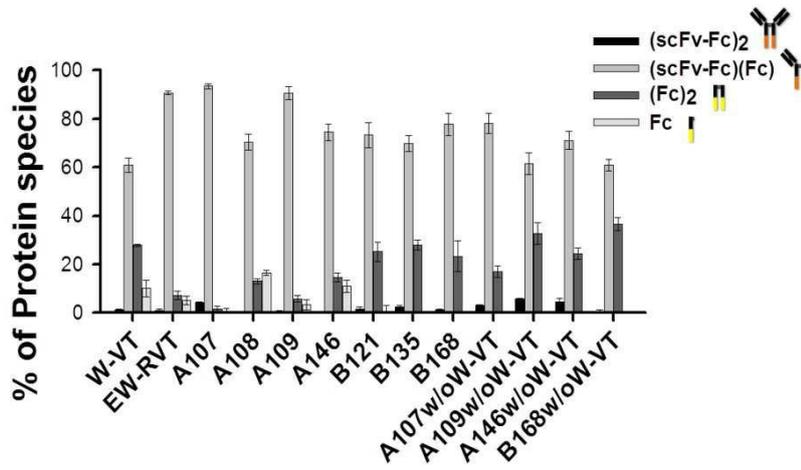
도면9



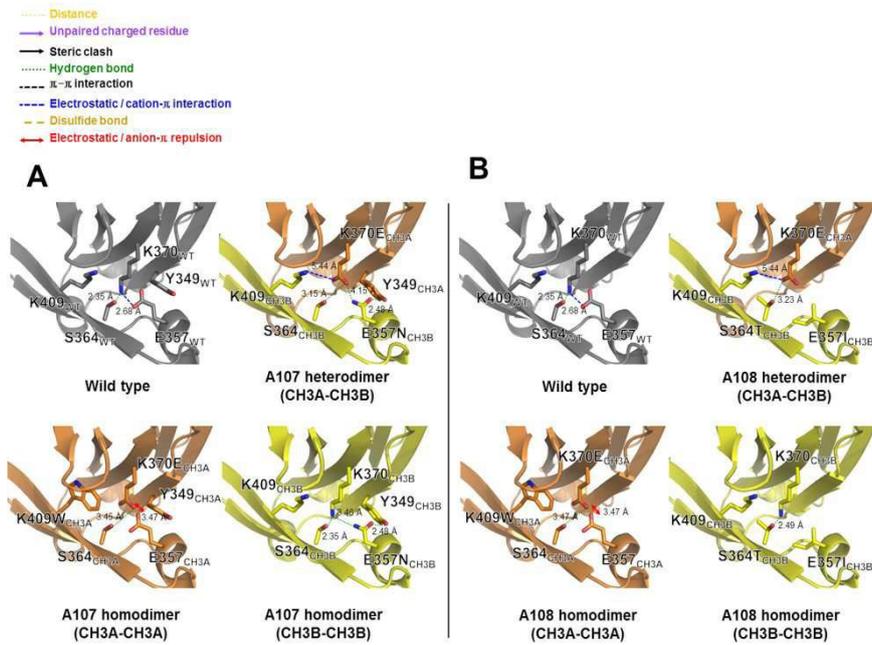
도면10



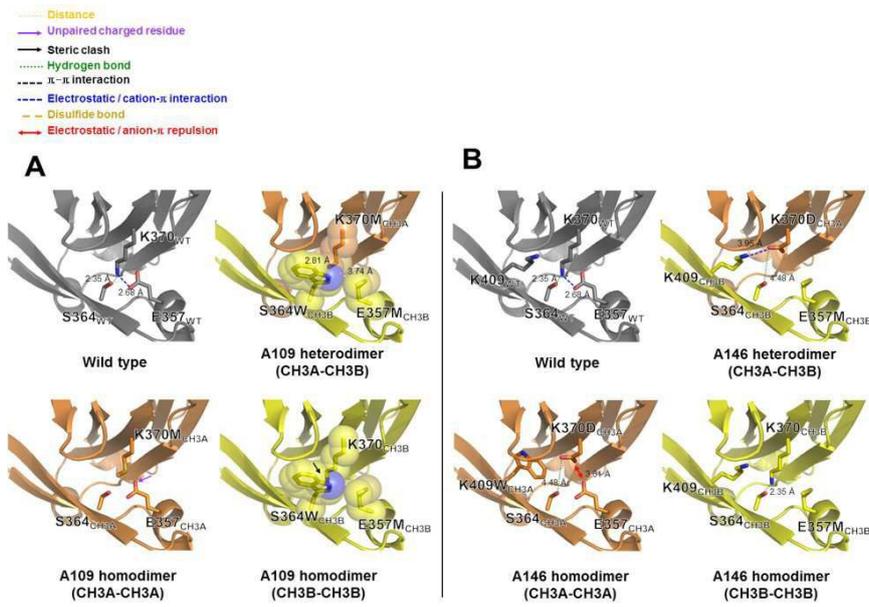
도면11



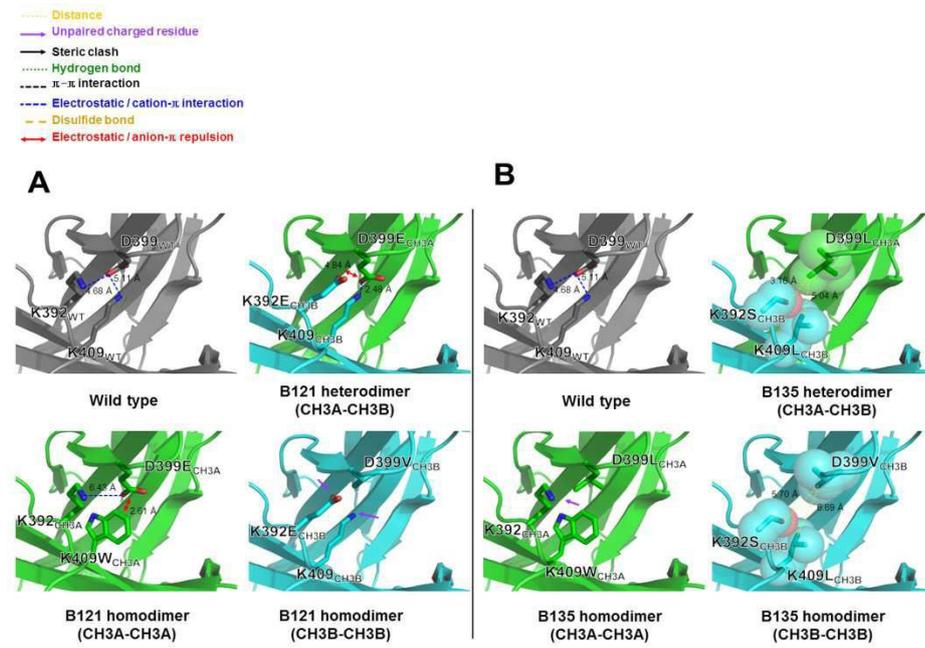
도면12



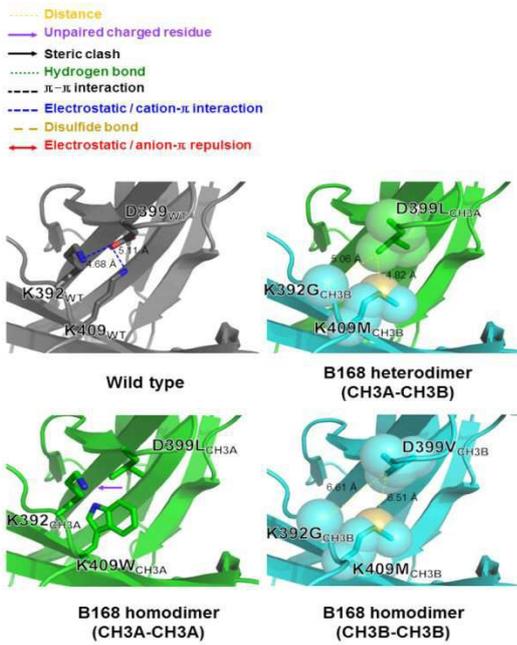
도면13



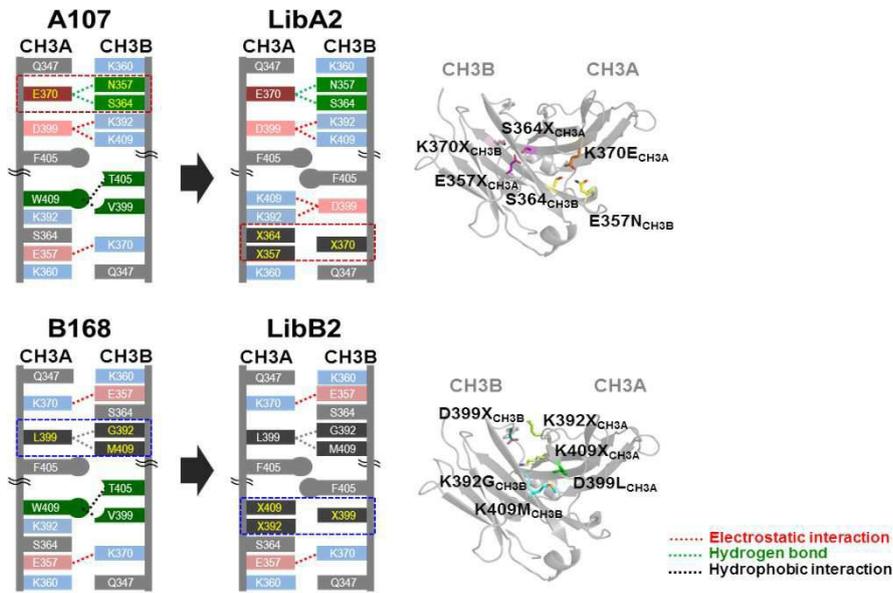
도면14



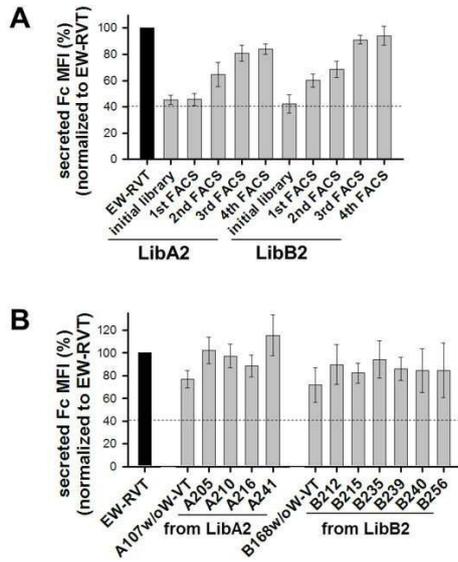
도면15



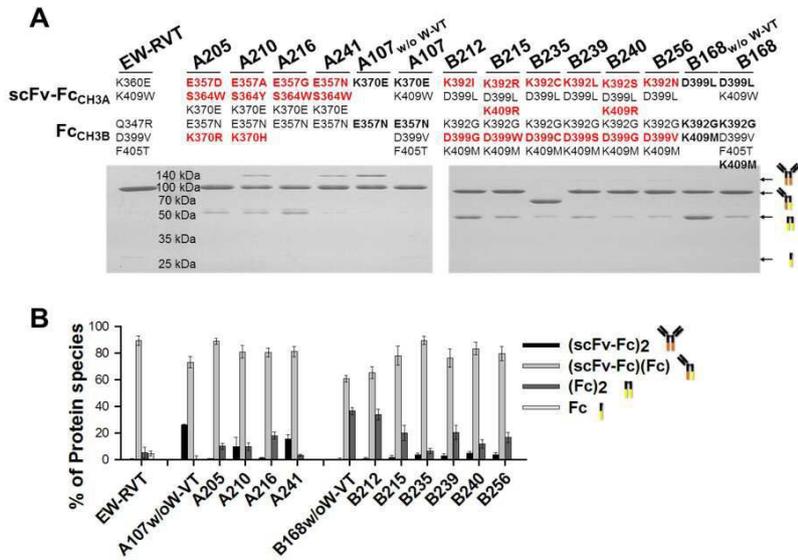
도면16



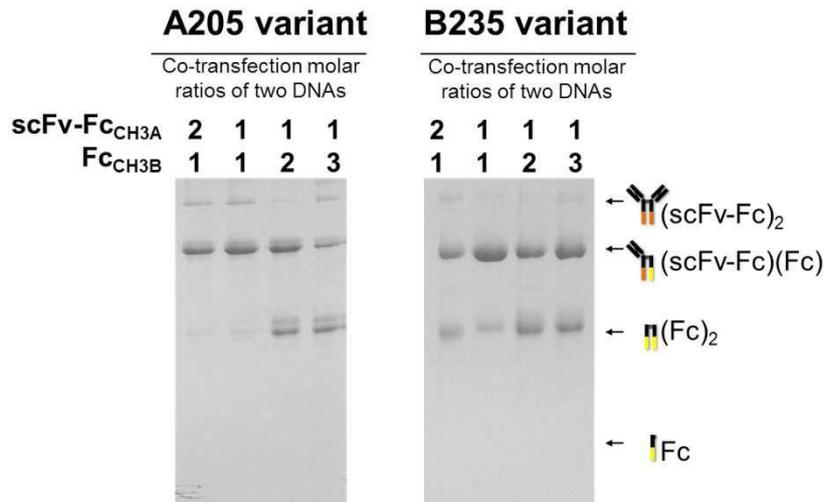
도면17



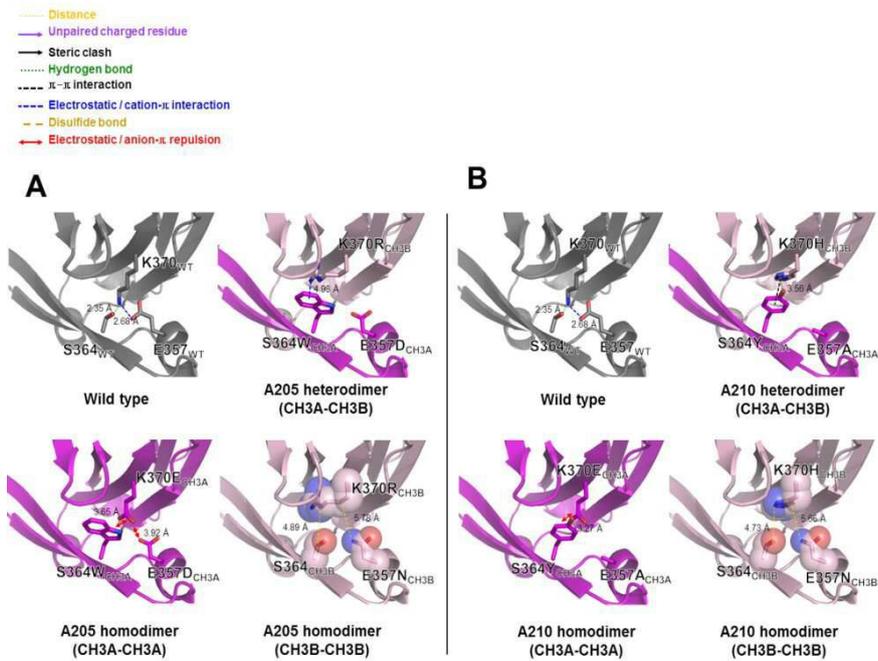
도면18



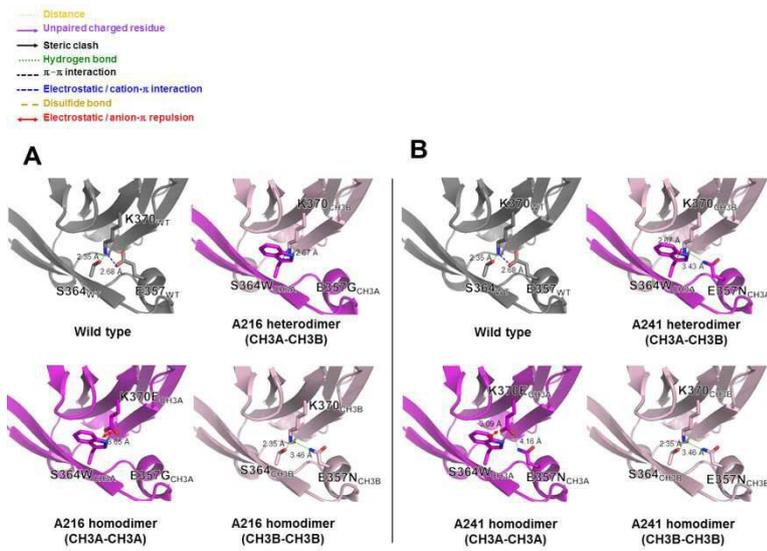
도면19



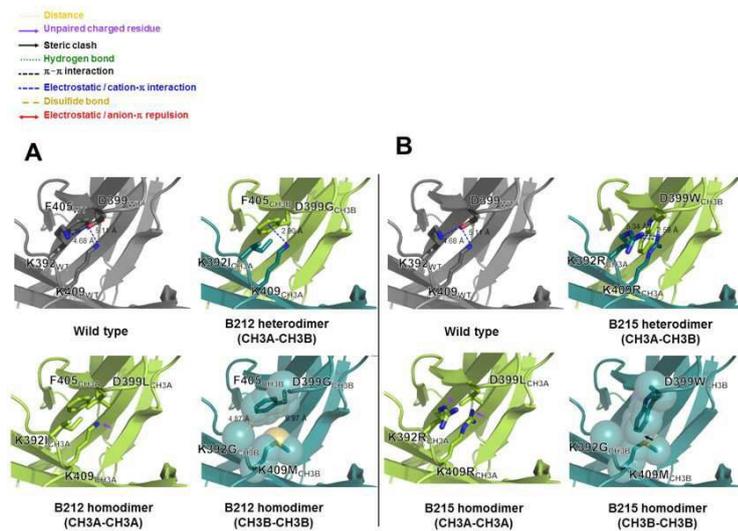
도면20



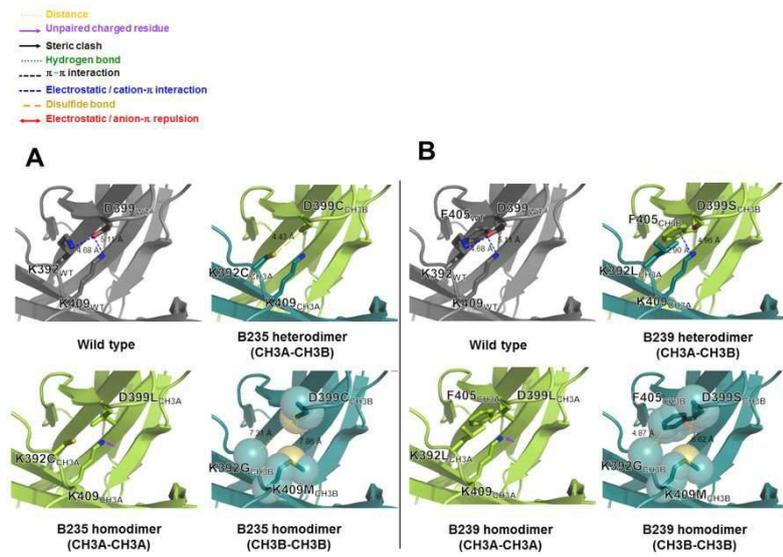
도면21



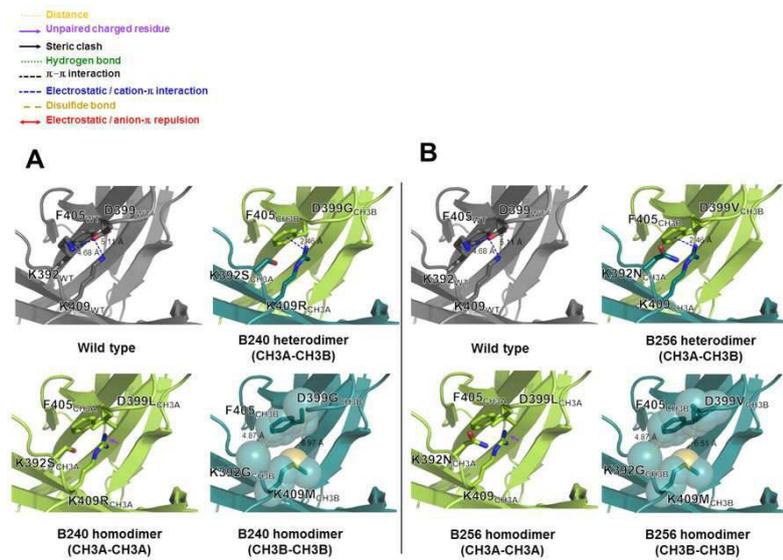
도면22



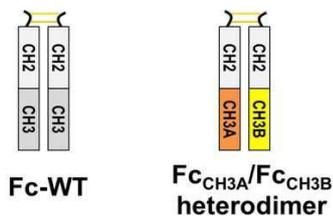
도면23



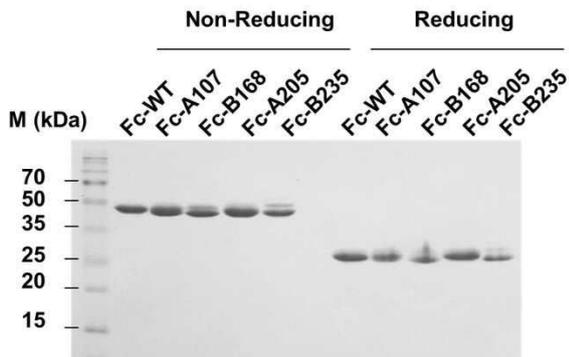
도면24



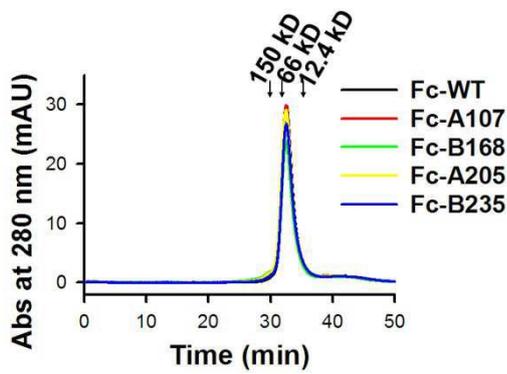
도면25



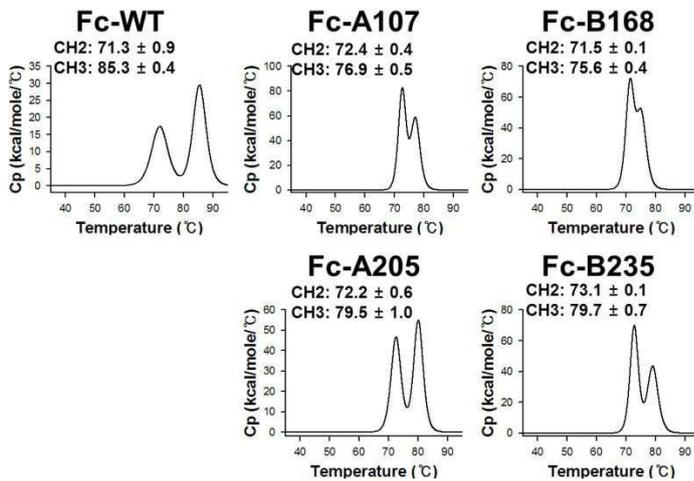
도면26



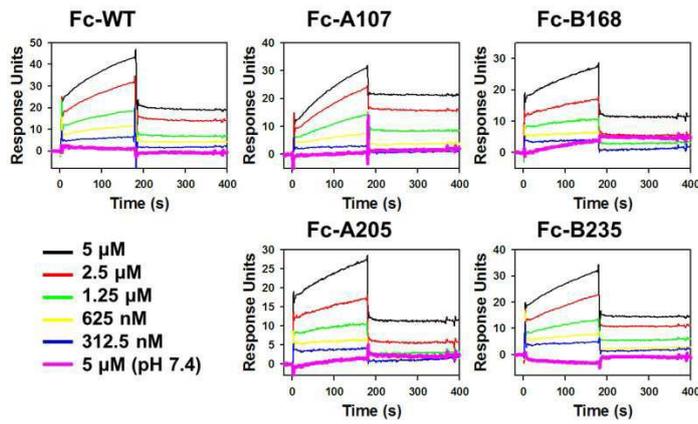
도면27



도면28



도면29



서열목록

- <110> AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION
- <120> Method to generate CH3 domain mutant pairs of heterodimeric Fc using yeast mating and CH3 domain mutant pairs thereby
- <130> 1-70p
- <160> 100
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Wild type CH3A
- <400> 1

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

85

90

95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100

105

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> W-VT CH3A

<400> 2

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100

105

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> W-VT CH3B

<400> 3

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

1

5

10

15

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

20 25 30
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45

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

50 55 60
 Thr Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80

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

85 90 95
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EW-RVT CH3A

<400> 4

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15

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

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60

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

65 70 75 80
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

85 90 95
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 5

<211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EW-RVT CH3B
 <400> 5
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Arg Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15

 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Val Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60
 Thr Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 6
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> A107 CH3A
 <400> 6
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Glu Gly Phe
 20 25 30

 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

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

100 105

<210> 7
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> A107 CH3B
<400> 7

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

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

100 105

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213>
> Artificial Sequence
<220><223> A108 CH3A

<400> 8

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

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

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> A108 CH3B

<400> 9

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

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

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

85 90 95
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105
 <210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> A109 CH3A
 <400> 10
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Met Gly Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60
 Phe Leu Tyr Ser Trp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105
 <210> 11
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> A109 CH3B
 <400> 11
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15
 Met Leu Thr Lys Asn Gln Val Trp Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> A146 CH3A

<400> 12

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

1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Asp Gly Phe

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> A146 CH3B

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B121 CH3A

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Trp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

 85 90 95
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 15
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> B121 CH3B
 <400> 15

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

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Glu Thr Thr Pro Pro Val Leu Val Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60

Thr Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 16
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> B135 CH3A
 <400> 16

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

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

<210> 17

<211> 107

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> B135 CH3B

<400> 17

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B168 CH3A

<400> 18

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B168 CH3B

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 20
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> A205 CH3A
 <400> 20

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15
 Asp Leu Thr Lys Asn Gln Val Trp Leu Thr Cys Leu Val Glu Gly Phe
 20 25 30

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 21
 <211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> A205 CH3B

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> A210 CH3A

<400> 22

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

1 5 10 15

Ala Leu Thr Lys Asn Gln Val Tyr Leu Thr Cys Leu Val Glu Gly Phe

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 23

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> A210 CH3B

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 24

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> A216 CH3A

<400> 24

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15
 Gly Leu Thr Lys Asn Gln Val Trp Leu Thr Cys Leu Val Glu Gly Phe
 20 25 30

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

 100 105

- <210> 25
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> A216 CH3B
- <400> 25

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

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> A241 CH3A

<400> 26

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

1 5 10 15

Asn Leu Thr Lys Asn Gln Val Trp Leu Thr Cys Leu Val Glu Gly Phe

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 27

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> A241 CH3B

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 28

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B212 CH3A

<400> 28

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

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B212 CH3B

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Met Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 30

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B215 CH3A

<400> 30

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

<210> 31
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> B215 CH3B
 <400> 31

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

65 70 75 80
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 32
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> B235 CH3A
 <400> 32

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

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

 85 90 95
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 33
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> B235 CH3B
 <400> 33

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105
 <210> 34
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> B239 CH3A
 <400> 34

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

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

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

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

165 170 175

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

180 185 190

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

195 200 205

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

210 215 220

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B240 CH3A

<400> 36

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B240 CH3B

<400> 37

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15

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

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45

Asn Asn Tyr Gly Thr Thr Pro Pro Val Leu Gly Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Met Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 38

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B256 CH3A

<400> 38

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15

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

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45

Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Val Leu Leu Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 39

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B256 CH3B

<400> 39

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Met Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 40

<211> 107

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> A107w/oW-VT CH3A

<400> 40

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

1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Glu Gly Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

 50 55 60
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105
 <210> 41
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> A107w/oW-VT CH3B
 <400>
 > 41
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15
 Asn Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

 65 70 75 80
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 42
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> A109w/oW-VT CH3A
 <400> 42

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15

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

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 43
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> A109w/oW-VT CH3B
 <400> 43

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15

Met Leu Thr Lys Asn Gln Val Trp Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45

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

100 105
 <210> 44
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> A146w/oW-VT CH3A
 <400> 44

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

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

100 105
 <210> 45
 <211> 107
 <212> PRT
 <
 213> Artificial Sequence

<220><223> A146w/oW-VT CH3B

<400> 45

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B168w/oW-VT CH3A

<400>

> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B168w/oW-VT CH3B

<400> 47

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15

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

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45

Asn Asn Tyr Gly Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Met Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 48

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KiH (Genentech) CH3A

<400> 48

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe

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

100 105
 <210> 49
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KiH (Genentech) CH3B
 <400> 49

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 50

<211> 107

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> Hole-Hole (Genentech) CH3A

<400> 50

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

1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 51

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Wild type Fc (CH3A included)

<400> 51

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

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

 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 100 105 110
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 115 120 125
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Val Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Thr Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220
 <210> 54
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EW-RVT Fc (CH3A included)

<400> 54
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 35 40 45
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 50 55 60
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 85 90 95
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 100 105 110
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 115 120 125
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Glu Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Trp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220
 <210> 55
 <211> 223
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EW-RVT Fc (CH3B included)

<400> 55

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160

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

Asp Gly Ser Phe Thr Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

<210> 56

<211> 223
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> A107 Fc (CH3A included)
 <400> 56
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 35 40 45
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 50 55 60
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 85 90 95
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 100 105 110
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 115 120 125
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 130 135 140
 Val Glu Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Trp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Val Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Thr Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220
 <210> 60
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> A109 Fc (CH3A included)

<400> 60
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 35 40 45
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 50 55 60
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 85 90 95
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 100 105 110
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 115 120 125
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 115 120 125
 Pro Ser Arg Asp Met Leu Thr Lys Asn Gln Val Trp Leu Thr Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Val Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Thr Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220
 <210> 62
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> A146 Fc (CH3A included)
 <400> 62
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 35 40 45
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 50 55 60
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

85 90 95

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

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

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

Val Asp Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160

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

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

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

- <210> 63
- <211> 223
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> A146 Fc (CH3B included)

<400> 63
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 35 40 45
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

115 120 125

Pro Ser Arg Asp Met Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

195 200 205

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

210 215 220

<210> 64

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B121 Fc (CH3A included)

<400> 64

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 100 105 110
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 115 120 125
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Glu Thr Thr Pro Pro Val Leu Val Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Thr Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220
 <210> 66
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> B135 Fc (CH3A included)

<400> 66
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 35 40 45
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 50 55 60
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 85 90 95
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 100 105 110
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 115 120 125
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Leu Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Trp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

<210> 67

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B135 Fc (CH3B included)

<400> 67

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160

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

Asp Gly Ser Phe Thr Leu Tyr Ser Leu Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

<210> 68

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B168 Fc (CH3A included)

<400> 68

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

195 200 205

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

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220
 <210> 72
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> A210 Fc (CH3A included)

<400> 72
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 35 40 45
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 50 55 60
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 85 90 95
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 100 105 110
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 115 120 125
 Pro Ser Arg Asp Ala Leu Thr Lys Asn Gln Val Tyr Leu Thr Cys Leu

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 115 120 125
 Pro Ser Arg Asp Asn Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 130 135 140
 Val His Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220
 <210> 74
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> A216 Fc (CH3A included)
 <400> 74
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 35 40 45
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 50 55 60
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

85 90 95

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

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

Pro Ser Arg Asp Gly Leu Thr Lys Asn Gln Val Trp Leu Thr Cys Leu
 130 135 140

Val Glu Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160

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

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

<210> 75

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> A216 Fc (CH3B included)

<400> 75

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30

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

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

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

115 120 125

Pro Ser Arg Asp Asn Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

195 200 205

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

210 215 220

<210> 76

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> A241 Fc (CH3A included)

<400> 76

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 100 105 110
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 115 120 125
 Pro Ser Arg Asp Asn Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220
 <210> 78
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> B212 Fc (CH3A included)

<400> 78

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30

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

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

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

65 70 75 80

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

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

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

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

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Ile Thr Thr Pro Pro Val Leu Leu Ser
 165 170 175

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205

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

210 215 220

<210> 79

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B212 Fc (CH3B included)

<400> 79

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160

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

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Met Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

<210> 80

<211> 223
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> B215 Fc (CH3A included)
 <400> 80
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 35 40 45
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 50 55 60
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 85 90 95
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 100 105 110
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 115 120 125
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Val Leu Leu Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210 215 220

<210> 81

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B215 Fc (CH3B included)

<400> 81

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

 210 215 220
 <210> 82
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> B235 Fc (CH3A included)
 <400> 82
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 35 40 45

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

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

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Gly Thr Thr Pro Pro Val Leu Cys Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Met Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220
 <210> 84
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> B239 Fc (CH3A included)

<400> 84
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 35 40 45
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 50 55 60
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 85 90 95
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 100 105 110
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 115 120 125
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 115 120 125
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Gly Thr Thr Pro Pro Val Leu Ser Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Met Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220
 <210> 86
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> B240 Fc (CH3A included)
 <400> 86
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 35 40 45
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 50 55 60
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

85 90 95

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

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

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

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160

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

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

<210> 87

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B240 Fc (CH3B included)

<400> 87

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30

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

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

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

195 200 205

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

210 215 220

<210> 88

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B256 Fc (CH3A included)

<400> 88

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 100 105 110
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 115 120 125
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Gly Thr Thr Pro Pro Val Leu Val Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Met Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220
 <210> 90
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> A107w/oW-VT Fc (CH3A included)

<400> 90
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 35 40 45
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 50 55 60
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 85 90 95
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 100 105 110
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 115 120 125
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 130 135 140
 Val Glu Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220
 <210> 91
 <211> 223
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> A107w/oW-VT Fc (CH3B included)

<400> 91

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160

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

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

<210> 92

<211> 223
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> A109w/oW-VT Fc (CH3A included)
 <400> 92
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 35 40 45
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 50 55 60
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 85 90 95
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 100 105 110
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 115 120 125
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 130 135 140
 Val Met Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220
 <210> 96
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> B168w/oW-VT Fc (CH3A included)

<400> 96
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 35 40 45
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 50 55 60
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 85 90 95
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 100 105 110
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 115 120 125
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

130 135 140
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Leu Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210 215 220
 <210> 97
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> B168w/oW-VT Fc (CH3B included)
 <400> 97
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 35 40 45

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

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 115 120 125
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Gly Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Met Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190

 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220
 <210> 98
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KiH (Genentech) Fc (CH3A included)
 <400> 98
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 35 40 45
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 50 55 60
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

85 90 95

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

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

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

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160

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

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

<210> 99

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KiH (Genentech) Fc (CH3B included)

<400> 99

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30

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

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

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 85 90 95
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 100 105 110
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 115 120 125
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220
 <210> 100
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Hole-Hole (Genentech) Fc (CH3A included)
 <400> 100
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

