

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)**(11) 공개번호** 10-2021-0006293
(43) 공개일자 2021년01월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/735 (2006.01) **A23L 33/18** (2016.01)
A61K 38/00 (2006.01) **A61K 9/70** (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 14/70535 (2013.01)
A23L 33/18 (2016.08)

(21) 출원번호 **10-2020-0083486**
(22) 출원일자 **2020년07월07일**
심사청구일자 **2020년07월07일**

(30) 우선권주장
1020190082217 2019년07월08일 대한민국(KR)

(71) 출원인
(주)지아이이노베이션
서울특별시 송파구 송파대로 167, 에이동 1116호
(문정동)

(72) 발명자
장명호
서울특별시 서대문구 북아현로1길 50, 101동 902호
(북아현동, 신촌푸르지오)

양보기
서울특별시 서대문구 북아현로1길 50, 101동 902호
(북아현동, 신촌푸르지오)

이경화
경기도 의왕시 내손로 13, 109동 503호(내손동,
포일자이아파트)

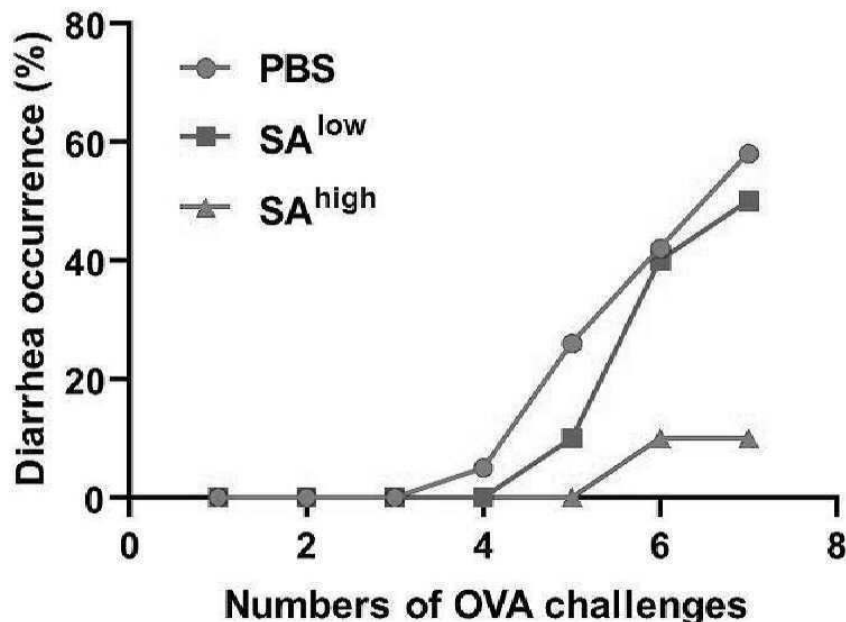
(74) 대리인
류중우, 한윤호, 이내영

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인을 포함하는 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체 및 이를 포함하는 약학적 조성물**(57) 요약**

본 발명은 시알산 함량이 높은 변형된 IgE Fc 수용체 및 이를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 기존에 사용되는 항-IgE 항체에 비하여 체내 지속성 및 안전성이 우수할 뿐만 아니라, IgE와 강하게 결합하므로, 투여 주기를 늘릴 수 있는 장점이 있다. 또한, 본 발명에 따른

(뒷면에 계속)

대표도 - 도12

시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 IgE 단일표적 물질로서, IgG1의 Fc가 적용된 기존의 항-IgE 항체와는 다르게 Fc gamma 수용체와는 결합하지 않는다. 이로 인해 비만세포 표면의 Fc gamma 수용체와의 결합에 의한 매개자 방출을 억제할 수 있어, IgG1과 비만세포의 Fc gamma 수용체 III와의 결합에 의해 유발될 수 있는 아나필락시스 등의 부작용을 최소화할 수 있다. 뿐만 아니라, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 피하 투여의 경우에도 높은 혈중 농도를 유지할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 알러지 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 38/00 (2013.01)

A61K 9/7023 (2013.01)

A61P 37/08 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/304 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

C07K 2319/30 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(Fc ϵ RIa-ECD)을 포함하는 단량체 두 개를 포함하는 폴리펩티드 이량체로서,

상기 단량체는 Fc 영역을 포함하며,

상기 Fc 영역과 Fc ϵ RIa-ECD는 힌지를 통해 결합되고,

상기 폴리펩티드 이량체는 시알산/폴리펩티드 이량체의 몰 비율이 적어도 8인 것인, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 Fc 영역은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것인, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 힌지는 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체인 것인, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 시알산은 N-아세틸뉴라민산인 것인, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 폴리펩티드 이량체는 시알산/폴리펩티드 이량체의 몰 비율이 적어도 10인 것인, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 폴리펩티드 이량체는 시알산/폴리펩티드 이량체의 몰 비율이 12 내지 25인 것인, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체는 적어도 하나의 시스테인을 포함하는 것인, 시

알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체.

청구항 9

제4항에 있어서,

상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체는

Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Xaa1 Xaa2 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro(서열번호 17),

이때, Xaa1은 Lys 또는 Gly이며, Xaa2는 Glu, Gly 또는 Ser인; 또는

Ala Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Xaa3 Xaa4 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro (서열번호 18),

이때, Xaa3은 Lys 또는 Gly이며, Xaa4는 Glu, Gly 또는 Ser인,

시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체.

청구항 10

제4항에 있어서,

상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체가 서열번호 3, 서열번호 4 및 서열번호 19로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체를 포함하는 알러지 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 피하 주사제용인 것인, 알러지 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 알러지 질환은 식품 알러지, 아토피 피부염(atopic dermatitis), 천식(asthma), 알러지성 비염(allergic rhinitis), 알러지성 결막염(allergic conjunctivitis), 알러지성 피부염(allergic dermatitis), 만성 특발성 두드러기(Chronic idiopathic urticarial) 및 알러지성 접촉성 피부염(allergic contact dermatitis)으로 구성된 군에서 선택된 하나인 것인, 알러지 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

제11항의 약학적 조성물을 포함하는 경피 패치(transdermal patch).

청구항 15

제11항의 약학적 조성물을 포함하는 국소 패치(topical patch).

청구항 16

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체를 포함하는 알러지 증상 개선 또는 완화용 식품 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체를 인간을 제외한 동물에 투여하는 단계를 포함하는 알러지 질환 치료 또는 예방 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 IgE Fc 수용체를 포함하고 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체 및 이를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현대사회가 산업화되고 식습관이 서구화되면서 천식을 비롯한 알러지성 비염, 아토피 피부염, 식품 알러지 등 알러지 질환의 발병률이 증가하고 있다. 중증 알러지 질환인 아나필락시스(anaphylaxis)의 발병률도 증가하고 있다. 이러한 알러지 질환은 개인 삶의 질을 떨어트리며, 경제적 비용도 증가시키고 있어, 이를 극복하기 위한 대책이 절실한 실정이다.

[0003] 대부분의 알러지 질환은 면역글로불린 E(IgE)의 과잉 면역반응에 의해 유발된다. IgE는 정상적인 상태에서는 혈액 내 아주 낮은 농도로 존재하는 항체이다. IgE는 일반적으로 무해한 항원에 의해서 생성되기도 하며, 특별한 자극 없이도 IgE가 증가되는 경우가 있다. 이러한 경우 알러지 질환이 야기될 수 있다. 비정상적으로 증가된 IgE는 비만세포(mast cell)와 호염기성 과립구(basophils) 등의 표면에 발현되는 고친화성 IgE 수용체(high-affinity IgE receptor, 이하, FcεRI)에 결합할 수 있다. 이러한 결합에 의해 비만세포나 호염기성 과립구는 히스타민, 류코트리엔, 프로스타글란딘, 브라디키닌 및 혈소판-활성화 인자 등 화학 매개자를 방출한다. 방출된 화학 매개자에 의해 알러지 증상이 나타나게 된다. 즉, 알러지 질환은 IgE와 FcεRI의 결합으로 인해 증상이 악화될 수 있다. 또한, 알러지 환자에서 FcεRI를 발현하는 세포가 증가된다고 알려져 있다.

[0004] 현재, 알러지 질환을 치료하기 위해 알레르겐 회피, 항알러지 약물 투여, 체내 IgE 합성 조절, 항-IgE 항체 등의 방법이 제안되었다. 그러나, 약제의 효능이 불충분하거나 심각한 부작용이 발생하는 등의 문제점이 남아있다. 최근, IgE 및 FcγRIIb에 고친화성으로 결합하며, 막에 고정된 IgE를 발현하는 세포를 억제할 수 있는 조성물이 연구된 바 있다. 이러한 조성물은 알러지 및 천식을 포함하여 IgE가 매개된 질환을 치료하는데 유용하다고 보고된 바 있다(KR10-1783272B).

[0005] 특히, IgE의 Fc부분을 표적으로 하는 오말리주맵(Omalizumab, 상품명: 졸레어(Xolair))이 개발되어 난치성 중증 천식과 난치성 두드러기 치료제로 사용되고 있다. 하지만, 효과를 유지하기 위해서는 오말리주맵을 고용량으로 투여하여야 하기 때문에 비용부담이 크고, 혈관부종, 아나필락시스 반응 등의 부작용이 있다는 것이 보고되었다(The Journal of Clinical Investigation Volume 99, Number 5, March 1997, 915-925). 그뿐 아니라, 시판 후 알러지성 육아종 혈관염, 특발성 중증 혈소판감소증 등의 심각한 이상반응이 보고되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) KR 10-1783272 B

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) The Journal of Clinical Investigation Volume 99, Number 5, March 1997, 915-925

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명자들은 안전하고 효과적인 알러지 질환 치료제를 개발하기 위해 연구하였다. 그 결과, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인을 포함하는 단량체(FcεRI α-ECD) 두 개를 포함하는 폴리펩티드 이량체의 시알산 함량이 높을 경우, 상기 폴리펩티드 이량체가 IgE와의 결합능이 우수할 뿐 아니라, 혈중 농도가 높게 유지되는 것을 발견하였다. 특히, 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체를 피하로 투여할 경우에도 체내로

효과적인 전달이 가능함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명의 일 측면은, 시알산/폴리펩티드 이량체의 몰 비율이 적어도 8인, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIα-ECD)을 포함하는 단량체 두 개를 포함하는 폴리펩티드 이량체를 제공한다.
- [0010] 본 발명의 다른 측면은, 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체를 포함하는 알러지 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 약학적 조성물을 포함하는 경피 패치를 제공한다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 약학적 조성물을 포함하는 국소 패치를 제공한다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체를 포함하는 알러지 증상 개선 또는 완화용 식품 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체를 인간을 제외한 동물에 투여하는 단계를 포함하는 알러지 질환 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명에 따른 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 기존에 사용되는 항-IgE 항체에 비하여 체내 지속성 및 안전성이 우수할 뿐만 아니라, IgE와 강하게 결합하므로, 투여 주기를 늘릴 수 있는 장점이 있다. 또한, 본 발명에 따른 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 IgE 단일표적 물질로서, IgG1의 Fc가 적용된 기존의 항-IgE 항체와는 다르게 Fc gamma 수용체와는 결합하지 않는다. 이로 인해 비만세포 표면의 Fc gamma 수용체와의 결합에 의한 매개자 방출을 억제할 수 있어, IgG1과 비만세포의 Fc gamma 수용체 III와의 결합에 의해 유발될 수 있는 아나필락시스 등의 부작용을 최소화할 수 있다. 뿐만 아니라, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 피하 투여의 경우에도 높은 혈중 농도를 유지할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 알러지 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 각 세포주에서 생산된 폴리펩티드 이량체를 SDS-PAGE로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 2는 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체의 비환원된 형태 및 환원된 형태의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 3은 오말리주맙의 IgE에 대한 결합능을 나타내는 도면이다.
- 도 4는 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체(IgE_{TRAP})의 IgE에 대한 결합능을 나타낸 도면이다.
- 도 5a는 일 구체예인 폴리펩티드 이량체(IgE_{TRAP}) 또는 오말리주맙과 IgG Fc gamma 수용체I(FcγRI)의 결합능을 나타낸 도면이다.
- 도 5b는 일 구체예인 폴리펩티드 이량체(IgE_{TRAP}) 또는 오말리주맙과 IgG Fc gamma 수용체IIA(FcγRIIA)의 결합능을 나타낸 도면이다.
- 도 5c는 일 구체예인 폴리펩티드 이량체(IgE_{TRAP}) 또는 오말리주맙과 IgG Fc gamma 수용체IIB(FcγRIIB)의 결합능을 나타낸 도면이다.
- 도 5d는 일 구체예인 폴리펩티드 이량체(IgE_{TRAP}) 또는 오말리주맙과 IgG Fc gamma 수용체IIIA(FcγRIIIA)의 결합능을 나타낸 도면이다.
- 도 5e는 일 구체예인 폴리펩티드 이량체(IgE_{TRAP}) 또는 오말리주맙과 IgG의 Fc gamma 수용체IIIB(FcγRIIIB)의 결합능을 나타낸 도면이다.
- 도 6은 일 구체예인 폴리펩티드 이량체(IgE_{TRAP}) 또는 오말리주맙과 IgG의 Fc gamma 수용체들의 결합력을 수치화한 그래프이다.

도 7은 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체의 농도에 따른 IgE와 결합 정도를 나타낸 도면이다.

도 8은 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체 단백질(IgE_{TRAP}) 및 졸레어(오말리주맵)의 농도에 따른 인간 FcεRI 발현 마우스 유래 비만세포의 활성 억제력을 비교한 도면이다.

도 9는 식품 알러지 모델에서 설사 발생 빈도 측정을 통해 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체의 항알러지 효과를 확인한 도면이다.

도 10은 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체(SA^{low}, SA^{medi} 및 SA^{high})의 비환원된 형태 및 환원된 형태의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 도면이다.

도 11은 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체(SA^{low}, SA^{medi} 및 SA^{high})의 등전점을 확인한 도면이다.

도 12는 식품 알러지 모델에서 설사 발생 빈도 측정을 통해 일 구체예의 폴리펩티드 이량체(SA^{low} 및 SA^{high})의 피하 주사에 따른 항알러지 효과를 확인한 도면이다.

도 13은 식품 알러지 모델에서 혈중 IgE 농도 측정을 통해 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체(SA^{low} 및 SA^{high})의 항알러지 효과를 확인한 도면이다.

도 14는 식품 알러지 모델에서 혈중 MCPT-1 농도 측정을 통해 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체(SA^{low} 및 SA^{high})의 항알러지 효과를 확인한 도면이다.

도 15는 마우스 모델에서 시알산 함량에 따른 일 구체예인 폴리펩티드 이량체의 약동학 프로파일 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 16은 수동성 전신적 아나필락시스 마우스 모델에서 체온 측정을 통해 일 구체예인 폴리펩티드 이량체의 시알산 함량에 따른 항알러지 효과를 확인한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] **시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체**
- [0018] 본 발명의 일 측면은, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIα-ECD)을 포함하는 단량체 두 개를 포함하는 폴리펩티드 이량체로서, 상기 단량체는 Fc 영역을 포함하며, 상기 Fc 영역과 FcεRIα-ECD는 힌지를 통해 결합되고, 상기 폴리펩티드 이량체는 시알산/폴리펩티드 이량체의 몰 비율이 적어도 8인 것을 특징으로 하는 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체를 제공한다.
- [0019] 본 발명에서 사용하는 용어 "IgE"란, 면역글로불린 E로 알려진 항체를 의미한다. IgE는 비만세포나 호염기구 등에 친화성을 가진다. 또한, IgE와 그것에 대응하는 항원(알레르겐)이 반응하면 염증반응을 일으킨다. 또한, IgE는 아나필락시스(anaphylaxis)를 일으키는 주된 원인으로 알려져 있다.
- [0020] 본 발명에서 사용하는 용어 "IgE Fc 수용체"란, Fcε 수용체라고도 불리며, IgE의 Fc 부분과 결합하는 수용체를 의미한다. 상기 수용체는 2개의 종류가 존재한다. IgE의 Fc에 대해 고친화성인 수용체는 Fcε 수용체I(FcεRI)라고 한다. IgE의 Fc에 대해 저친화성인 수용체는 Fcε 수용체II(FcεRII)라고 한다. FcεRI는 비만세포와 호염기구에서 발현된다. FcεRI에 결합한 IgE 항체가 다가 항원에 의해 가교되면, 비만세포 또는 호염기구에서 탈과립이 생겨 히스타민 등의 여러 화학물질을 방출한다. 이러한 방출에 의해 즉시형 알러지 반응이 일어난다.
- [0021] 상기 FcεRI는 하나의 α사슬과 한 개의 β사슬 및 2황화 결합한 2개의 γ사슬로 구성된 막단백질이다. 이 중에서 IgE가 결합하는 부분은 α사슬(FcεRIα)로서, FcεRIα는 60 kDa 정도의 크기를 가지며, 세포막 안에 존재하는 소수성 도메인과 세포막 외부에 존재하는 친수성 도메인으로 구성된다. 특히, α사슬의 세포외 도메인에 IgE가 결합하게 된다. 상기 FcεRIα는 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛으로 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0022] 구체적으로, 상기 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛은 NP_001992.1에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIα-ECD)은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다. 상기 FcεRIα-ECD는 IgE와 결합할 수 있는 한, FcεRIα-ECD의 단편 또는 이의 변이체일 수 있다. 또한, 서열번호 1의 FcεRIα-ECD는 서열번호 5로 표시되는 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 것일

수 있다.

- [0023] 상기 변이체는 FcεRIα-ECD의 기능을 변형시키지 않는 한, 야생형 FcεRIα-ECD에서 하나 이상의 아미노산을 치환, 결실 또는 추가하는 방법을 통하여 수행될 수 있다. 상기 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성을 갖는 것일 수 있다.
- [0024] 이때, 상기 Fc 영역은 야생형 Fc 영역 또는 변형된 Fc 영역일 수 있다. 또한, 본 발명에서 사용하는 용어 "변형된 Fc 영역"이란, 항체의 Fc 부분 중 일부가 변형된 영역을 의미한다. 이때, 상기 Fc 영역은 면역글로불린의 중쇄 불변 영역 2(CH2) 및 중쇄 불변 영역 3(CH3)을 포함하며, 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 및 경쇄 불변 영역 1(CH1)은 포함하지 않는 단백질을 말한다. 특히, 변형된 Fc 영역은 Fc 영역 중 일부 아미노산이 치환되거나, 서로 다른 종류의 Fc 영역을 조합하여 제조된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 변형된 Fc 영역은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 서열번호 2의 변형된 Fc 영역은 서열번호 6으로 표시되는 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 것일 수 있다.
- [0025] 또한, 상기 변형된 Fc 영역은 천연형 당쇄 또는 천연형에 비해 증가된 당쇄 일 수 있다. 화학적 방법, 효소적 방법 및 미생물을 사용한 유전공학적 엔지니어링 방법 등과 같이 통상적인 방법으로 면역글로불린 Fc 당쇄를 변형시킬 수 있다. 또한, 상기 변형된 Fc 영역은 Fc gamma 수용체(FcγR) 또는 C1q(complement component 1q)에 대한 결합 부위를 갖지 않음으로 ADCC(antibody dependent Cellular Cytotoxicity) 및 CDC(Complement dependent Cytotoxicity) 기능이 결여된 것일 수 있다.
- [0026] 일 구체예로, 상기 변형된 Fc 영역은 FcεRIα-ECD와 IgD의 힌지를 통해 결합될 수 있다. 상기 힌지는 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체일 수 있다. 천연형 IgD의 힌지 영역은 64개 아미노산으로 이루어져 있다. 상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체는 20 내지 60개의 연속된 아미노산, 25 내지 50개의 연속된 아미노산 또는 30 내지 40개의 아미노산으로 이루어진 것일 수 있다. 이때, 상기 힌지 변이체는 단백질 생산 과정에서 절단형 발생을 최소화하기 위해 IgD의 힌지 영역의 아미노산 서열의 일부를 변형한 것일 수 있다.
- [0027] 일 구체예로, 상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체는 30개 또는 49개의 아미노산으로 이루어진 것일 수 있다. 상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체는 적어도 하나의 시스테인을 포함할 수 있다.
- [0028] 일 실시예로, 상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체는 다음과 같은 서열을 포함할 수 있다:
- [0029] Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Xaa1 Xaa2 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro (서열번호 17), 이때, Xaa1은 Lys 또는 Gly일 수 있으며, Xaa2는 Glu, Gly 또는 Ser일 수 있다. 구체적으로, 상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체는 서열번호 3 및 서열번호 19의 아미노산 서열을 가질 수 있고, 이를 통해 단백질 생산 과정에서 절단형 발생을 최소화할 수 있다.
- [0030] 또한, 다른 실시예로, 상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체는 다음과 같은 서열을 포함할 수 있다:
- [0031] Ala Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Xaa3 Xaa4 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro (서열번호 18)이며, 이때, Xaa3은 Lys 또는 Gly이며, Xaa4는 Glu, Gly 또는 Ser일 수 있다. 구체적으로, 상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체는 서열번호 4의 아미노산 서열을 가질 수 있고, 이를 통해 단백질 생산 과정에서 절단형 발생을 최소화할 수 있다.
- [0032] 특히, 서열번호 4로 표시되는 아미노산으로 이루어진 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체에 있어서, 트레오닌(Thr) 중 적어도 하나는 당화(glycosylation)될 수 있다. 구체적으로, 서열번호 18로 표시되는 아미노산 서열 중, 13번째, 14번째, 18번째 및 19번째의 트레오닌이 당화될 수 있다. 바람직하게, 상기 4개의 트레오닌이 모두 당화될 수 있다. 이때, 상기 당화는 0-당화(0-glycosylation)일 수 있다.
- [0033] 당단백질 의약품에 부착되어 있는 당사슬은 치료 효능, 체내 지속성, 타겟팅 및 면역반응 등에 있어서 중요한 역할을 수행하기에 품질을 결정하는 주요 인자 중 하나이다. 당사슬의 말단이 시알산으로 끝나지 않은 폴리펩티드 이량체는 체내에서 빠르게 제거됨을 확인하였다.
- [0034] 본 발명에서 사용하는 용어 "시알산"은 하기 화학식 1의 N-아세틸뉴라민산(Neu5Ac) 및 화학식 2의 N-글리코틸뉴

100배, 20 내지 90배, 20 내지 70배, 30 내지 70배 또는 40 내지 70배 높은 IgE 결합력을 나타내며, 바람직하게는 오말리주맙 대비 약 70배 높은 IgE 결합력을 나타낼 수 있다.

- [0048] 본 발명의 다른 측면은, 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체를 포함하는 알러지 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0049] 상기 폴리펩티드 이량체는 상술한 바와 동일하다. 특히, 상기 약학적 조성물은 피하 주사제용인 것을 특징으로 할 수 있다. 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체의 경우에는 피하 주사시에 시알산 함량이 낮은 폴리펩티드 이량체에 비해 알러지 질환의 치료 및/또는 예방에 효과가 있음을 확인하였다.
- [0050] 본 발명에서 사용하는 용어 "알러지 질환"이란, 비만세포의 탈과립 등 비만세포의 활성화가 매개된 알러지 반응으로 인하여 초래되는 병리적 증상을 의미한다. 예를 들어, 상기 알러지 질환은 식품 알러지, 아토피 피부염(atopic dermatitis), 천식(asthma), 알러지성 비염(allergic rhinitis), 알러지성 결막염(allergic conjunctivitis), 알러지성 피부염(allergic dermatitis), 만성 특발성 두드러기(chronic idiopathic urticarial) 및 알러지성 접촉성 피부염(allergic contact dermatitis)으로 구성된 군에서 선택된 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 특히, 상기 알러지 질환은 IgE에 의해 매개되는 질환일 수 있다.
- [0051] 상기 약학적 조성물 내에서 폴리펩티드 이량체는 항알러지 활성을 나타낼 수 있는 한, 용도, 제형, 배합 목적 등에 따라 임의의 양(유효량)으로 포함될 수 있는데, 통상적인 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001 중량% 내지 20.0 중량% 범위에서 결정될 수 있다. 상기 유효량은 항알러지 효과를 유도할 수 있는 양을 의미한다. 이러한 유효량은 당업자에 의해 결정될 수 있다.
- [0052] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가적으로 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 약학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하여 당업계에 공지된 통상의 방법으로 투여 경로에 따라 경구용 제형 또는 비경구용 제형으로 제조될 수 있다.
- [0053] 상기 약학적 조성물이 경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 현탁액, 웨이퍼 등의 제형으로 제조될 수 있다. 이때, 약제학적으로 허용되는 적합한 담체의 예로서는 락토스, 글루코스, 슈크로스, 텍스트로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨 등의 당류, 옥수수 전분, 감자 전분, 밀 전분 등의 전분류, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 등의 셀룰로오스류, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 맥아, 젤라틴, 탈크, 폴리올, 식물성유 등을 들 수 있다. 제제화할 경우 필요에 따라 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 및/또는 부형제를 포함하여 제제화할 수 있다.
- [0054] 상기 약학적 조성물이 비경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 주사제, 경피 투여제, 국소 투여제, 비강 흡입제 및 좌제의 형태로 제제화될 수 있다. 주사제로 제제화할 경우 적합한 담체로서는 멸균수, 에탄올, 글리세롤이나 프로필렌 글리콜 등의 폴리올 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline)나 주사용 멸균수, 5% 텍스트로스 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다.
- [0055] 상기 약학적 조성물의 제제화와 관련하여서는 당업계에 공지되어 있으며, 구체적으로 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)] 등을 참조할 수 있다.
- [0056] 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 성별, 연령, 환자의 중증도, 투여 경로에 따라 1일 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 10 g/kg 범위, 바람직하게는 0.01 mg/kg 내지 1 g/kg 범위일 수 있다. 상기 약학적 조성물은 1일 1회 또는 투여량이 많은 경우에는 하루에 수회에 걸쳐 투여될 수 있다.
- [0057] 상기 약학적 조성물이 적용(처방)될 수 있는 대상은 포유동물이며, 예를 들어, 사람, 개 및 고양이일 수 있고, 특히 사람인 경우가 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 약학적 조성물은 항알러지 활성의 상승 또는 보강을 위해, 이미 안전성이 검증되고 항알러지 활성을 갖는 공지된 임의의 화합물이나 천연 추출물을 추가로 포함할 수 있다.
- [0058] 본 발명자들은 안전하고 효과적인 알러지 질환 치료제를 개발하기 위해 연구한 결과, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체가 시알산 함량이 낮은 폴리펩티드 이량체보다 IgE와의 결합능이 우수한 것을 확인하였다(표 3). 또한, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체를 알러지 질환을 앓고 있는 개체에게 피하 투여하는 경우, 시알산 함량이 낮은 폴리펩티드 이량체보다 혈액 내 IgE 및 MCPT-1 농도를 효과적으로 감소시키며, 소정의 시간이 지난

후에도 그 효과가 지속되는 것을 확인하였다(도 13 및 도 14).

- [0059] 이에 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 약학적 조성물을 포함하는 경피 패치(transdermal patch)를 제공한다. 또한, 본 발명의 또 다른 측면은, 약학적 조성물을 포함하는 국소 패치(topical patch)를 제공한다.
- [0060] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체를 포함하는 알러지 증상 개선 또는 완화용 식품 조성물을 제공한다.
- [0061] 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 상술한 바와 동일하다. 또한, 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 장내로 효율적인 전달을 위해 적절한 전달 수단과 결합될 수 있다.
- [0062] 또한, 상기 식품 조성물은 어떠한 형태로도 제조될 수 있으며, 예컨대 차, 주스, 탄산음료, 이온음료 등의 음료류, 우유, 요구르트 등의 가공 유류, 정제, 캡슐, 환, 과립, 액상, 분말, 편상, 페이스트상, 시럽, 젤, 젤리, 바 등의 건강기능식품 제제류 등으로 제조될 수 있다.
- [0063] 상기 식품 조성물은 법률상·기능상의 구분에 있어서 제조·유통 시점의 시행 법규에 부합하는 한 임의의 제품으로 구분될 수 있다. 예컨대 건강기능식품에 관한 법률에 따른 건강기능식품이거나, 식품위생법의 식품공전(식약처 고시, 식품의 기준 및 규격)상 각 식품유형에 따른 과자류, 두류, 다류, 음료류, 특수용도식품 등일 수 있다. 상기 식품 조성물에 포함될 수 있는 기타의 식품 첨가물과 관련해서는 식품위생법에 따른 식품공전이나 식품첨가물 공전을 참조할 수 있다.
- [0064] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 알러지 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 상술한 바와 동일하다.
- [0065] 상기 개체는 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간, 개 또는 고양이일 수 있다. 이때, 투여는 경구 또는 비경구를 통하여 투여할 수 있다. 이때, 비경구는 피하 투여, 정맥 투여, 점막 투여, 근육 투여 등의 방법으로 수행될 수 있다.
- [0066] 상기 알러지 질환은 식품 알러지, 아토피 피부염(atopic dermatitis), 천식(asthma), 알러지성 비염(allergic rhinitis), 알러지성 결막염(allergic conjunctivitis), 알러지성 피부염(allergic dermatitis), 만성 특발성 두드러기(chronic idiopathic urticarial) 및 알러지성 접촉성 피부염(allergic contact dermatitis)으로 구성된 군에서 선택된 하나일 수 있다.
- [0067] 본 발명의 또 다른 측면은 알러지 질환을 예방하거나 치료하기 위한 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체의 용도를 제공한다.
- [0068] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.
- [0069] **실시예 1. FcεRIα-ECD과 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드의 제조**
- [0070] IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIα ECD)의 C-말단이 변형된 폴리펩티드는 미국 특허 7,867,491에 개시된 방법에 따라 제조하였다.
- [0071] 먼저, 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 FcεRI의 α사슬의 세포외 도메인과 서열번호 2의 변형된 면역글로불린 Fc가 각각, 서열번호 19의 링커로 연결된 단백질(FcεRIαECD-Fc1), 서열번호 3의 링커로 연결된 단백질(FcεRIαECD-Fc2) 및 서열번호 4의 링커로 연결된 단백질(FcεRIαECD-Fc3)을 발현시키기 위하여, 각각의 단백질을 코딩하는 유전자를 연결한 카세트를 pAD15 벡터(체넥신)에 클로닝하여, FcεRIαECD-Fc 단백질 발현 벡터를 제작하였다. 그 후, 상기 발현 벡터를 각각 CHO DG44(from Dr. Chasin, Columbia University, USA) 세포에 형질주입하였다.
- [0072] 이때, 세포주에 형질 주입시 pCI Hygro 벡터(Invitrogen)에 α-2,6-시알산 전이효소 유전자가 클로닝된 발현 벡터를 동시에 형질주입하여, 시알산이 부가된 FcεRIαECD-Fc2ST 및 FcεRIαECD-Fc3ST 단백질을 발현할 수 있는 세포주를 별도로 제조하였다.
- [0073] 1차 스크리닝 과정으로 HT(5-hydroxytryptamine)가 없는 10% dFBS(Gibco, USA, 30067-334), MEMα(Gibco, 12561, USA, Cat No. 12561-049), HT+(Gibco, USA, 11067-030)) 배지를 사용하여 HT 선별을 수행하였다. 이후, DHFR(dihydrofolate reductase)-시스템을 이용하여 생산성을 증폭시키기 위해, HT 선별된 클론들을 이용하여 메

토티렉사트(MTX) 증폭을 수행하였다.

[0074] MTX 증폭이 완료된 후 생산성 평가를 위한 세포 안정화를 위해 1회 내지 5회 정도 계대 배양을 진행하였다. 그 후, MTX 증폭이 된 세포의 단위 생산성 평가를 수행하였고, 그 결과는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0075]

Version	Media	MTX conc.	Productivity		
			3-day culture		Batch culture(mg/ml)
			µg/ml	µg/10 ⁶ cells	
Fc ε RI α ECD-Fc2	Ex-cell	500nM	37.23	20.9	225
Fc ε RI α ECD-Fc2+a2,6-ST	DHFR	100nM	45.4	25.1	338.2
Fc ε RI α ECD-Fc3		2µM	27.0	16.9	180.4
Fc ε RI α ECD-Fc3+a2,6-ST		1µM	17.5	10.2	101.7

[0076] 상기 표 1에 기재된 바와 같이, Fc ε RI α ECD-Fc3 세포주는 2 µM 메토티렉사트 증폭 후 16.9 µg/10⁶ cells 생산성을 나타내었다. 반면, 2,6-시알산 전이효소가 공동 형질주입된 Fc ε RI α ECD-Fc3 세포주(Fc ε RI α ECD-Fc3ST)는 1 µM 메토티렉사트 증폭 후 10.2 µg/10⁶ cells 생산성을 나타내었다. 또한, Fc ε RI α ECD-Fc2 세포주는 0.5 µM 메토티렉사트 증폭 조건에서 20.9 µg/10⁶ cells 생산성을 나타내었다. 또한, 2,6-시알산 전이효소가 공동 형질주입된 Fc ε RI α ECD-Fc2 세포주(Fc ε RI α ECD-Fc2ST)는 0.1 µM 메토티렉사트 증폭 후 25.1 µg/10⁶ cells 생산성을 나타내었다. 즉, 0.1 µM 메토티렉사트 증폭 조건에서 선별된 2,6-시알산 전이효소가 공동 형질주입된 Fc ε RI α ECD-Fc2ST 세포주가 생산성이 가장 우수한 것을 확인하였다.

[0077] 상기 Fc ε RI α ECD-Fc2 세포주로부터 생산된 폴리펩티드(Fc ε RI α ECD-Fc)를 "Fc ε RI α ECD-Fc2"로 명명하였으며, Fc ε RI α ECD-Fc2+a2,6-ST 세포주로부터 생산된 폴리펩티드를 "Fc ε RI α ECD-Fc2ST"로 명명하였다. 또한, 상기 Fc ε RI α ECD-Fc3 세포주로부터 생산된 폴리펩티드를 "Fc ε RI α ECD-Fc3"으로 명명하였으며, Fc ε RI α ECD-Fc3+a2,6-ST 세포주로부터 생산된 폴리펩티드를 "Fc ε RI α ECD-Fc3ST"로 명명하였다.

[0078] 실시예 2. 폴리펩티드(Fc ε RI α ECD-Fc)의 정제 및 순도 확인

[0079] 상기 실시예 1에서 선별된 세포주 중 i) Fc ε RI α ECD-Fc3 세포주, ii) Fc ε RI α ECD-Fc3+a2,6-ST 세포주, iii) Fc ε RI α ECD-Fc2+a2,6-ST 세포주를 60 ml 용량의 배지에서 배치배양(batch culture)하였다. 상기 배양액을 Protein-A affinity column을 이용하여 Fc ε RI α ECD-Fc를 정제한 후, 상기 정제된 Fc ε RI α ECD-Fc를 SE-HPLC(Size-Exclusion High performance liquid chromatography) 및 SDS-PAGE를 수행하여 폴리펩티드의 순도를 확인하였다.

[0080] 구체적으로, SDS-PAGE는 비환원(non-reducing) 조건으로 진행하였다. 상기 비환원 조건은 각각의 정제된 폴리펩티드를 비환원 샘플 버퍼(Non-Reducing sample buffer)와 혼합한 후, Mini-Protean TGX™ gels(Bio-Rad)에서 TGS(Tris Glycine SDS) 버퍼, 200V 조건에서 30분 동안 전기영동하였다. 전기영동 후, 단백질을 쿠마시 브릴리언트블루(Coomassie Brilliant Blue) 용액으로 염색하였다. 그 결과를 표 2 및 도 1에 나타내었다.

표 2

[0081]

Lane #	Sample	Purification	Purity (SE-HPLC)	Sample condition	
M	Protein standard	One-step (Protein-A affinity column) Purification	-	-	-
1	Fc ε RI α ECD-Fc3		94.5%	-	Freezing/ Thawing test
2	Fc ε RI α ECD-Fc3ST		93.7%		
3	Fc ε RI α ECD-Fc2ST		93.2%		
4	Fc ε RI α ECD-Fc3		94.5%		
5	Fc ε RI α ECD-Fc3ST		93.7%		
6	Fc ε RI α ECD-Fc2ST	93.2%			

[0082] 상기 표 2에서 나타난 바와 같이, SE-HPLC 방법으로 정제된 각각의 폴리펩티드의 순도는 모두 93% 이상인 것을

확인하였다. 비환원 조건(Non-reducing condition)에서 절단된 형태 등의 불순물이 나타나지 않았으며, 특히, 해동(thawing)/냉동(freezing)의 과정을 거친 후에도 모두 순도가 93% 이상이었고 불순물이 없는 것을 확인하였다.

[0083] **실험예 1. 폴리펩티드(FcεRIα ECD-Fc)의 이량체 형성 확인**

[0084] 상기 실시예 1에서 선별된 세포주 중 i) FcεRIα ECD-Fc3 세포주, ii) FcεRIα ECD-Fc3+a2,6-ST 세포주, iii) FcεRIα ECD-Fc2+a2,6-ST 세포주를 60 ml 용량의 배지에서 배지배양하였다. 그 후, 배양 상등액과 Protein-A affinity column을 이용하여 폴리펩티드를 정제한 정제물을 SE-HPLC 및 SDS-PAGE를 수행하였다. 이때, 배양 상등액 및 정제물을 비환원 조건 및 환원 조건에서 각각 수행하였다.

[0085] 상기 비환원 조건은 실시예 2와 동일하게 진행하였다. 한편, 환원(reducing) 조건은 각각의 정제된 폴리펩티드를 2-메르캅토에탄올(Mercaptoethanol)을 포함하는 환원 샘플 버퍼(reducing sample buffer)와 혼합한 후, 100 °C 온도에서 5분 동안 변성(denature)시켰다. 그 후 Mini-Protean TGX™ gels(Bio-Rad)에서 TGS 버퍼를 사용하여 200V 조건에서 30분 동안 전기영동하였다. 전기영동 후, 단백질을 쿠마시 브릴리언트블루(Coomassie Brilliant Blue) 용액으로 염색하였다.

[0086] 그 결과, 비환원 조건에서 약 150 kDa 크기의 폴리펩티드가 검출되었고, 환원 조건에서 약 75 kDa 크기의 폴리펩티드가 검출되었다. 이를 통해 폴리펩티드가 이량체를 형성하고 있음을 확인하였다(도 2). 특히, 인풋(Input)에 해당하는 배양 상등액에서도 폴리펩티드 이량체의 순도가 높은 것을 알 수 있고, 이 배양 상등액을 친화성 컬럼(affinity column)을 통과시켜 얻은 샘플(FT; Flow Through)에는 폴리펩티드가 전혀 검출되지 않지만 용출된 샘플에서는 검출되었다. 또한, 용출된 샘플이 pH가 낮아 1 M Tris buffer(pH 9.0)로 금방 중화를 시킨 샘플(Elute_N)과 그렇지 않은 샘플(Elute)을 비교했을 경우에도 큰 차이는 관찰되지 않았다(도 2).

[0087] 또한, 정제물에서 매우 높은 순도(98% 이상)의 폴리펩티드가 정제되었을 뿐 아니라, 배양 상등액에서도 매우 높은 순도로 폴리펩티드가 발견되어 있는 것을 확인하였다. 이는 상기 세포주들에서 발견된 폴리펩티드를 의약품으로 개발하는데 있어, 공정 개발 단계가 간소화될 수 있고 결과적으로 의약품으로의 개발 비용이 현저한 절감될 수 있는 가능성이 매우 높음을 의미한다.

[0088] **실험예 2. 폴리펩티드 이량체의 IgE 결합능 확인**

[0089] 실시예 1에서 생산된 i) FcεRIα ECD-Fc2, ii) FcεRIα ECD-Fc2ST, iii) FcεRIα ECD-Fc3 및 iv) FcεRIα ECD-Fc3ST의 폴리펩티드들을 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 정제한 정제물과 시중에 판매되고 있는 항-IgE 항체인 오말리주맙(Omalizumab, 상품명: 졸레어(Xolair))에 대하여 IgE 결합력을 비교 측정하였다.

[0090] 구체적으로, IgE 결합력은 Protein GLC sensor chip(Bio-Rad, Cat #. 176-5011)의 채널에 IgE를 코팅하고, 오말리주맙 또는 각각의 FcεRIα ECD-Fc 단백질을 여러 농도로 30 μl/min의 속도로 흘려주었다. 이때, 재생버퍼인 25 mM 농도의 수산화나트륨 용액을 이용하여 제로-베이스(zero-base)를 확인한 후, 상기 단계를 반복하여 측정하였다. 그 후, 단백질 결합 분석기기(Proteon XPR36, BIO-RAD, USA)를 이용하여 결합곡선을 확인하였으며, 그 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3

[0091]

Samples Items	FcεRIα ECD-Fc	오말리주맙	비교
Drug type	Fc 융합 단백질	Anti-IgE Ab	

Binding affinity	ka (Association rate)	Fc2	2.14×10^5	4.05×10^5	오말리주맙 대비 1.9배 약함
		Fc2ST	2.64×10^5		오말리주맙 대비 1.5배 약함
		Fc3	1.98×10^5		오말리주맙 대비 2.0배 약함
		Fc3ST	2.40×10^5		오말리주맙 대비 1.7배 약함
	kd (Dissociation rate)	Fc2	8.29×10^{-5}	6.02×10^{-3}	오말리주맙 대비 73배 좋음
		Fc2ST	5.69×10^{-5}		오말리주맙 대비 106배 좋음
		Fc3	1.33×10^{-4}		오말리주맙 대비 45배 좋음
		Fc3ST	1.49×10^{-4}		오말리주맙 대비 40배 좋음
	KD (kd/ka)	Fc2	3.88×10^{-10}	1.49×10^{-8}	오말리주맙 대비 38배 좋음
		Fc2ST	2.16×10^{-10}		오말리주맙 대비 69배 좋음
		Fc3	6.72×10^{-10}		오말리주맙 대비 22배 좋음
		Fc3ST	6.21×10^{-10}		오말리주맙 대비 24배 좋음

[0092] 상기 표 3에 나타난 바와 같이, 본 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체와 IgE의 결합상수(Association rate, ka) 값은 오말리주맙과 비교하여 1.5 내지 2.0배 작은 것으로 측정되었다. 즉, IgE 외의 물질과의 결합력이 오말리주맙에 비해 1.5 내지 2.0배 정도 낮은 것을 알 수 있었다. 또한, 본 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체의 해리상수(Dissociation rate, kd) 값은 오말리주맙과 비교하여 40 내지 106배 큰 것으로 측정되었다.

[0093] 결과적으로, 본 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체의 평형상수(Equilibrium dissociation constant, KD <kd/ka>) 값은 오말리주맙과 비교하여 22 내지 69배 높은 것을 알 수 있다. 이를 통해, 본 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체는 오말리주맙과 비교하여 IgE에 대한 결합능이 현저히 증가한 것을 알 수 있다. 특히, 시알산이 부가된 폴리펩티드 이량체(Fc ε RI α ECD-Fc2ST)가 오말리주맙 대비 69배로 IgE 결합력이 가장 우수한 것을 확인하였다.

[0094] 또한, 도 3 및 도 4에서 나타난 바와 같이, 오말리주맙은 IgE와 결합한 후 일정 시간이 지나면 결합이 떨어지는 반면, 본 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체(Fc ε RI α ECD-Fc2ST, IgE_{TRAP})는 일단 IgE와 결합한 후에는 IgE와 떨어지지 않는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 본 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체는 IgE와 쉽게 분리되지 않고, 결합된 상태로 유지되는 능력이 오말리주맙에 비해 월등히 좋은 것을 확인하였다.

[0095] **실험예 3. 폴리펩티드 이량체와 IgG 수용체의 결합능 확인**

[0096] 본 발명의 일 실시예에 따른 폴리펩티드 이량체(Fc ε RI α ECD-Fc2ST, IgE_{TRAP}) 또는 오말리주맙(omalizumab, Xolair)의 IgG의 Fc gamma 수용체와의 결합능을 Octet RED384 시스템(Pall ForteBio, CA, USA)을 이용하여 확인하였다.

[0097] 구체적으로, 활성화된 AR2G 바이오 센서에 Fc gamma 수용체인 Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIIA 또는 Fc γ RIIIB 재조합 단백질(R & D 시스템, 5 μg/ml)을 300 mM 아세테이트 완충액(pH 5)에 고정화 하였다. 이때, 0.1% Tween-20 및 1% BS(bovine serum)가 포함된 PBS를 러닝버퍼(Running buffer)로 사용하였다. 모든 측정은 샘플 플레이트 셰이커 1,000 rpm 속도로 30℃ 온도에서 진행하였다. 상기 측정 결과를 도 5a 내지 도 5e에 나타내었고, 오말리주맙과 폴리펩티드 이량체의 IgG Fc gamma 수용체와의 결합능을 수치화하여 도 6에 나타내었다.

[0098] 그 결과, 오말리주맙은 IgG의 Fc gamma 수용체와 높은 결합능을 나타낸 반면, 폴리펩티드 이량체는 IgG의 Fc gamma 수용체와의 결합능이 현저히 낮은 것을 확인하였다. 이를 통해, 폴리펩티드 이량체가 IgG의 Fc gamma 수용체와 결합하지 않는 것을 확인하였다.

[0099] **실험예 4. 마우스 골수 유래 비만세포에서 베타-헥소사미니다제 어세이를 통한 폴리펩티드 이량체의 활성 확인**

[0100] 본 발명의 일 실시예에 따른 폴리펩티드 이량체들의 *in vitro* 활성을 분석하기 위하여 베타-헥소사미니다제 분

석을 수행하였다.

- [0101] 구체적으로, 본 발명의 일 구체예에 폴리펩티드 이량체(Fc εRI αECD-Fc2)를 농도별로 IgE(1 μg/ml)와 혼합하여, 20°C 온도에서 30분간 인큐베이션(incubation)시켜 시료를 준비하였다. 또한, 비만세포 활성화를 위해 배양중인 마우스 골수 유래 비만세포(mast cell)를 HBSS(Hank's balanced salt solution) 버퍼로 세척하여 배지를 제거하였으며, 세포수를 측정 한 후, 5x10⁵ 개의 세포들을 40 μl의 HBSS 버퍼에 재부유시켰다.
- [0102] 상기 준비한 시료 50 μl를 활성화된 비만세포에 첨가하였다. 그 후, 37°C 온도에서 30분간 5% CO₂ 배양기에서 30분 동안 배양하였다. 이후, 외래 항원(DNP(2,4-dinitrophenol), 100 ng/ml)을 10 μl씩 첨가한 후, 다시 37°C 온도에서 30분간 5% CO₂ 배양시킨 다음 상층액을 30 μl 분리하였다.
- [0103] 분리된 상층액 30 μl와 기질(4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide, 5.84 mM) 30 μl를 잘 혼합한 후, 37°C 온도에서 20분간, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 그 후, 정지용액(Stop solution)인 0.1 M 소듐 카보네이트 버퍼(sodium carbonate buffer, pH 10) 140 μl를 넣고 반응을 종결시켰다. 이후, 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 활성화된 비만세포에서 외래 항원에 의해 분비되는 베타-헥소사미니다제(β-hexosaminidase)의 분비량을 확인하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0104] 도 7에 나타난 바와 같이, IgE와 본 발명의 폴리펩티드 이량체의 농도가 1:1인 경우부터 IgE의 활성이 크게 억제되는 것을 확인하였다. 즉, 본 발명의 일 구체예의 폴리펩티드 이량체가 IgE와 동일한 농도가 있을 때에도 반응하는 것을 확인하였다.
- [0105] **실험예 5. 인간 Fc εRI 발현 마우스 골수 유래 비만세포에서 베타-헥소사미니다제 어세이를 이용한 폴리펩티드 이량체 및 인간 항-IgE 항체의 활성 비교**
- [0106] 본 발명의 일 실시예에 따른 폴리펩티드 이량체(Fc εRI αECD-Fc2ST, IgE_{TRAP})와 인간 항-IgE 항체인 졸레어(Xolair, omalizumab)의 활성을 비교하기 위해, 베타-헥소사미니다제 분석을 진행하였다.
- [0107] 각각의 폴리펩티드 이량체와 졸레어를 농도별로 준비한 후, 인간 IgE(1 μg/ml)와 혼합한 후 상온에서 30분간 인큐베이션시켜 시료를 준비하였다. 또한, 인간 Fc εRI 유전자가 도입되고, 마우스 Fc εRI 유전자가 제거된 마우스의 골수로부터 유래 및 분화된 비만세포를 준비하였다. 준비한 비만세포들을 HBSS 버퍼로 세척해준 후, 5x10⁵ 개의 세포들을 60 μl의 HBSS 버퍼에 재부유시켰다.
- [0108] 그 후, 상기 준비한 시료 20 μl를 비만세포에 첨가한 후 37°C 온도에서 30분간 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이후 인간 항-IgE 항체(Biolegend, Cat No. 325502, 0.5 μg/ml)를 20 μl 첨가한 후, 다시 37°C 온도에서 30분간 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이후 1,500 rpm 및 4°C 온도 조건에서 원심분리를 한 후, 상층액 30 μl를 분리하였다. 분리한 상층액 30 μl와 기질(4-Nitrophenyl N-acetyl-β-glucosaminide, 5.84 mM) 30 μl를 잘 혼합한 후, 37°C 온도에서 25분간 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 그 후, 0.1 M 소듐 카보네이트 버퍼(sodium carbonate buffer, pH10) 140 μl를 넣고 반응을 종결시켰다. 이후, 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하여, 분비된 베타-헥소사미니다제(β-hexosaminidase)의 상대량을 비교하여 각 시료의 농도에 따른 비만세포 억제효과를 확인하였다. 그 결과는 도 8에 나타내었다.
- [0109] 도 8에 나타난 바와 같이, 폴리펩티드 이량체의 IC₅₀은 대략 11.16 ng/ml로 측정되었고, 졸레어의 IC₅₀은 대략 649.8 ng/ml로 측정되었다. 따라서, 폴리펩티드 이량체가 졸레어에 비해 58배 정도 높은 비만세포 활성 억제력이 있음을 확인하였다.
- [0110] **실험예 6. 식품 알러지 모델에서 *in vivo* 에세이를 통한 폴리펩티드 이량체의 활성 확인**
- [0111] Balb/c 마우스(오리엔트바이오)들에 대하여 OVA(ovalbumin) 50 μg 및 알룸(Alum) 1 mg을 14일 간격으로 2회 복강 투여하여 감작(sensitization)을 유발하였다. 이후, 28, 30, 32, 34, 36일째, 총 5회에 걸쳐 OVA 50 mg을 경구 투여하여 장에 음식물 알러지를 유발하였다.
- [0112] 상기 OVA를 2회 경구 투여한 후, 31일째에 상기 마우스를 7마리씩 3개의 그룹으로 분류하였다. 제1그룹인 폴리펩티드 이량체(Fc εRI αECD-Fc2ST)를 고농도(200 μg)로 투여하는 군, 제2그룹인 저농도(20 μg)로 투여하는 군 및 제3그룹인 투여하지 않는 군으로 분류하였다.

- [0113] 상기 OVA를 경구 투여하면서 음식물 알러지 유발에 따라 설사 발생 여부를 확인하였다. 또한, 37일째 상기 마우스를 희생시켜 각 그룹에 속한 마우스에 대하여 소장 내 비만세포의 수, 혈중 IgE 농도 및 혈중 비만세포의 탈과립 효소 농도(MCPT-1, Mast cell protease-1)를 분석하였다.
- [0114] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 제3그룹의 마우스는 2번째 OVA를 경구 투여한 후부터 설사가 발생하였다. 반면, 제1그룹 및 제2그룹의 마우스는 3번째 OVA를 경구 투여한 후부터 설사가 발생하였다. 특히, 제1그룹의 마우스는 제2그룹의 마우스보다 설사 발생 빈도가 낮았으며, 이를 통해, 폴리펩티드 이량체의 농도에 비례하여 식품 알러지 효과가 증가하는 것을 확인하였다.
- [0115] **실험예 7. 폴리펩티드 이량체의 시알산 함량 분석**
- [0116] 상기 실시예 1에서 제조한 FcεRIαECD-Fc2+a2,6-ST 세포주로부터 생산된 폴리펩티드의 생산율이 가장 높고, 실험예 4 내지 6에서 폴리펩티드 이량체(FcεRIαECD-Fc2ST)의 항알러지 효과가 우수하다는 점에서 착안하여, 시알산 함량에 따른 폴리펩티드 이량체의 항알러지 효능에 대해 알아보하고자 폴리펩티드 이량체(FcεRIαECD-Fc2ST)의 시알산 함량을 분석하였다.
- [0117] 구체적으로, 상기 실시예 1에서 제조한 FcεRIαECD-Fc2+a2,6-ST 세포주로부터 생산된 폴리펩티드 이량체(FcεRIαECD-Fc2ST)의 글리칸(glycan) 구조에 포함된 시알산 함량을 측정하기 위해, 먼저 시알산 분해 효소인 시알리데이즈(sialidase)를 처리하여 시알산을 분리시켰다. 그 후, 분리된 시알산을 HPLC(waters, alliance e2659)를 이용하여 시알산을 분리, 검출 및 정량하였다.
- [0118] 상기 폴리펩티드 이량체를 pH 그라디언트(gradient)에 따라 3개의 샘플로 구분하여 분리 및 정제하였다. 3개의 시료를 AmiconUltra 10K(Millipore, UFC501096) 필터에 넣고, 13,000 rpm, 4℃ 온도의 조건으로 10분 동안 원심분리하였으며, 5회 반복하여 농축액을 탈이온수로 교환하고 농축하였다. 시료의 농도는 280 nm 파장에서 측정하였을 때, 10 mg/ml 이상이 되도록 하였다.
- [0119] 그 후, 각각의 시료들을 0.5 mg씩 취하여 EP 튜브에 넣고 시알리데이즈 (Roche, 10 269 611 001) 1 μl와 10 mM 농도의 인산 나트륨(sodium phosphate) 완충액(pH 7.0) 40 μl을 넣은 후, 최종 부피가 100 μl가 되도록 탈이온수를 넣었다. 각각의 시료를 2 μl씩 취하여 280 nm 파장에서 농도를 측정하여 확인된 농도 값을 최종 분석 농도로 사용하였다.
- [0120] 상기 시료를 37℃ 인큐베이터에서 18시간 동안 반응시킨 후, AmiconUltra 10K 필터에 넣고, 13,000 rpm, 4℃ 조건으로 15분간 원심분리하여 필터를 빠져나온 여과액을 분석에 사용하였다. HPLC 분석 조건은 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0121] 분석컬럼	RHM-monosaccharide H+ (8%) 300 X 7.8 mm (Rezex); 분석컬럼 RHM-monosaccharide H+ (8%) 50 X 7.8 mm (Rezex); 가드컬럼
표준물질	NGNA: 2 ~ 40 μM NANA: 100 ~ 2000 μM
유량	0.55 ml/min
컬럼 온도	50℃
검출(Detection)	206 nm
주입량	5 μl
이동상	5 mN sulfuric acid in water
그라디언트/시간(Gradient / time)	등용매용리 / 45 분

- [0122] 시알산 함량 계산을 위한 표준물질은 N-아세틸뉴라민산(N-acetylneuraminic acid, 이하 NANA라 함)과 N-글리코릴뉴라민산(N-glycolylneuraminic acid, 이하 NGNA라 함) 혼합물로 표준 곡선에 대한 선형 회귀식을 구하여 분석시료의 NGNA와 NANA의 몰농도를 계산하였다. 사용된 혼합물은 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

[0123] 혼합물	1	2	3	4	5
NANA (μM)	2,000	1,000	500	300	200
NGNA (μM)	40	20	10	6	4

[0124] NANA 함량을 이용하여 시료의 NANA 시알산 함량을 계산하였다. 시료의 시알산 함량은 시알산/시료 몰 비율 (mol/mol)로 나타내었다.

[0125] **[수학식 1]**

[0126] 시료의 시알산 함량=(시료의 NANA 몰농도)/(시료의 몰농도)

[0127] 또한, NGNA 함량을 이용하여 시료의 NGNA의 함량을 계산하였다. 시료의 NGNA의 함량은 NGNA/분석시료 몰 비율 (mol/mol)로 나타내었다.

[0128] **[수학식 2]**

[0129] 시료의 NGNA의 함량=(분석시료의 NGNA 몰농도)/(분석시료의 몰농도)

[0130] 그 결과를 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

[0131]

시료		NGNA/Protein (mol/mol)	NANA/Protein (mol/mol)
Fc ε RI αECD-Fc2ST	시료 1 (SA ^{low})	0.13	7.7
	시료 2 (SA ^{medi})	0.17	12.0
	시료 3 (SA ^{high})	0.27	19.1

[0132] 표 6에 나타난 바와 같이, pH 그래디언트에 따라 3개의 샘플로 구분하여 분리 및 정제한 시료들의 시알산 함량이 모두 다르게 측정되었다. 시알산 함량에 따른 항알러지 효능을 비교하기 위해, 시알산 함량 순으로 "SA^{low}", "SA^{medi}" 및 "SA^{high}"로 명명하였다.

[0133] **실험예 8. 시알산 함량에 따른 폴리펩티드의 이량체 형성 변화 확인**

[0134] 시알산 함량에 따라 폴리펩티드의 이량체 형성 변화가 있는지 확인하기 위해, 실시예 9에서 분리한 SA^{low}, SA^{medi} 및 SA^{high}를 실험예 1과 동일한 방법으로 비환원 조건 및 환원 조건에서 SDS-PAGE 분석을 수행하였다.

[0135] 그 결과, SA^{low}, SA^{medi} 및 SA^{high} 모두 비환원 조건에서 약 150 kDa 크기의 폴리펩티드가 검출되었고, 환원 조건에서 약 75 kDa 크기의 폴리펩티드가 검출되었다. 이를 통해 폴리펩티드가 이량체를 형성하고 있음을 확인하였다(도 10).

[0136] **실험예 9. 시알산 함량에 따른 폴리펩티드의 이량체 등전점 확인**

[0137] 시알산 함량에 따라 폴리펩티드의 이량체 등전점이 변하는지 확인하기 위해, 실험예 7에서 분리한 SA^{low}, SA^{medi} 및 SA^{high}를 IEF 샘플 용액과 혼합시킨 후, pH 3-7 IEF gel(Invitrogen)에 로딩(loading)하여, 100V 조건에서 1시간, 200V 조건에서 1시간, 500V 조건에서 30분 동안 순차적으로 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 후, 겔(gel)은 12% 트리클로로아세트산(Trichloroacetic acid)와 3.5% 설포살리실산(Sulfosalicylic acid)를 포함하는 고정 용액에 30분간 반응시킨 후, 증류수로 세척하였다. 단백질을 쿠마시 브릴리언트블루(Coomassie Brilliant Blue) 용액으로 염색하였다.

[0138] 그 결과, 시알산 함량에 따라 SA^{low}, SA^{medi} 및 SA^{high}의 등전점이 조금씩 상이하게 나타났으며, 각각 약 5.3, 4.9 및 4.7로 나타났다(도 11).

[0139] **실험예 10. 식품 알러지 동물모델에서 시알산 함량에 따른 폴리펩티드 이량체의 항알러지 활성 확인: 설사 빈도 측정**

[0140] 시알산 함량에 따라 폴리펩티드 이량체의 활성이 변하는지 확인하기 위해, Balb/c 마우스(오리엔트바이오)들에 대하여 OVA 50 μg 및 알럼 1 mg을 14일 간격으로 2회 복강 투여하여 감작을 유발하였다. 이후, 28, 30, 32, 34,

36, 38, 40일째, 총 7회에 걸쳐 OVA 50 mg을 경구 투여하여 음식물 알러지를 유발하였다. 이때, OVA 경구 투여는 4시간 금식 후에 시행하였다.

[0141] 상기 OVA를 2회 경구 투여한 후, 40일째에 상기 마우스를 7마리씩 3개의 그룹으로 분류하였다. 제1그룹인 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체(SA^{high})를 고농도(200 µg)로 피하 투여하는 군, 제2그룹인 시알산 함량이 낮은 폴리펩티드 이량체(SA^{low})를 고농도(200 µg)로 피하 투여하는 군 및 제3그룹인 PBS를 피하 투여한 군으로 분류하였다. 상기 OVA를 경구 투여하면서 음식물 알러지 유발에 따라 설사 발생 여부를 확인하였다.

[0142] 그 결과, 제3그룹의 마우스는 4번째 OVA를 경구 투여한 후부터 설사가 발생하였다. 제2그룹의 마우스는 5번째 OVA를 경구 투여한 후부터 설사가 발생하였다. 특히, 제2그룹의 마우스는 6번째 OVA를 경구 투여한 후부터 설사 발생 빈도가 급격히 증가하였다. 반면, 제1그룹의 마우스는 6번째 OVA를 경구 투여한 후부터 설사가 발생하였으나, 7번째 OVA 경구 투여에도 설사 발생 빈도가 증가하지 않고 유지되었다(도 12). 이를 통해, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체(SA^{high})가 시알산 함량이 낮은 폴리펩티드 이량체(SA^{low})보다 항알러지 효과가 우수한 것을 확인하였다.

[0143] **실험예 11. 식품 알러지 동물 모델에서 시알산 함량에 따른 폴리펩티드 이량체의 항알러지 활성 확인: 혈중 IgE 농도 측정**

[0144] 실험예 10의 7번의 OVA를 경구 투여한 각 그룹의 마우스에서 안와채혈법으로 혈액을 채취하였다. 상온에서 30분 동안 반응시킨 후, 4°C 온도에서 13,000 rpm 조건으로 15분 동안 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청에서의 유리된 IgE(free IgE) 농도를 측정하기 위해 mouse total IgE ELISA kit(BioLegend)를 사용하였으며, 이때, 96-웰-플레이트에 코팅된 물질이 항-IgE 항체 대신 본 발명의 일 실시예인 폴리펩티드 이량체(SA^{low} 및 SA^{high}) 사용한 점을 제외하고는 제조사의 프로토콜에 따라 ELISA를 수행하였다.

[0145] 구체적으로, 96-웰-플레이트에 PBS로 희석시킨 폴리펩티드 이량체(SA^{low} 및 SA^{high})로 코팅하고, 4°C 온도에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 다음날, 0.05% tween 20이 포함된 PBS(이하, 워싱버퍼)로 세척한 후, 블로킹 버퍼(blocking buffer, Assay diluent)를 넣어 1시간 동안 반응시켰다. 그 후, 워싱버퍼로 세척한 후, 표준용액으로 사용할 마우스 IgE와 마우스의 혈청 샘플을 1X Assay diluent에 희석하여 플레이트에 넣고 2시간 동안 반응시켰다.

[0146] 다시 워싱버퍼로 세척한 후, 비오틴(biotin)이 표지된 마우스 항-IgE 항체를 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 워싱버퍼로 세척한 후, HRP(horse radish peroxidase)가 표지된 아비딘(Avidin-HRP)을 넣고 30분 동안 반응시켰다. 워싱버퍼로 세척한 후, 기질용액(Substrate Solution)을 넣고 빛을 차단한 상태로 20분간 반응시킨 후, 정지용액(Stop solution, 1 M H₂SO₄)을 넣어 반응을 중단시켰다. 그 후, 마이크로 플레이트 리더(Epoch Microplate Spectrophotometer)로 450 nm 파장에서 흡광도 값을 측정하여 농도를 계산하였다.

[0147] 그 결과, PBS를 피하 투여한 제3그룹의 마우스의 경우, 혈중 IgE 농도가 약 8,000 ng/ml로 계산되었다. 또한, 시알산 함량이 낮은 폴리펩티드 이량체(SA^{low})를 피하 투여한 제2그룹의 마우스의 경우, 혈중 IgE 농도가 약 7,000 ng/ml로 계산되었다. 반면, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체(SA^{high})를 피하 투여한 제1그룹의 마우스의 경우, 약 4,900 ng/ml 계산되었으며, 제2그룹 및 제3그룹의 마우스의 혈중 IgE 농도값과 유의미한 차이를 나타내었다(도 13).

[0148] 이러한 결과에서 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체를 피하 투여시에, 혈중 IgE 함량이 감소함을 알 수 있었다. 또한, 이러한 혈중 IgE의 감소로, 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체가 알러지 치료에 효과가 있음을 예측할 수 있었다.

[0149] **실험예 12. 식품 알러지 동물 모델에서 시알산 함량에 따른 폴리펩티드 이량체의 항알러지 활성 확인: 혈중 MCPT-1 농도 측정**

[0150] 식품 알러지 실험이 끝나고, 2일 후에 각 그룹의 마우스에서 혈액을 채취하여 혈청을 준비하였다. 혈중 MCPT-1(Mast Cell Protease-1) 농도를 측정하기 위해, MCPT-1 ELISA kit(Invitrogen)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 진행하였다.

[0151] 구체적으로, 96-웰-면역 플레이트에 마우스 항-MCPT-1 항체를 코팅하고 4°C 온도에서 하룻밤 동안 반응시켰다.

다음날, 0.05% tween 20이 포함된 PBS(이하, 워싱버퍼)로 세척한 후, 1% BSA(Bovine serum albumin)가 포함된 PBS(이하, 블로킹 버퍼, Assay diluent)를 넣어 1시간 동안 반응시켰다. 그 후, 워싱버퍼로 세척한 후, 표준용액으로 사용할 MCPT-1와 마우스의 혈청 샘플을 1X Assay diluent에 희석하여 플레이트에 넣고 2시간 동안 반응시켰다.

[0152] 2시간 후, 비오틴이 표지된 마우스 항-MCPT-1 항체를 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 워싱버퍼로 세척한 후, HRP(horse radish peroxidase)가 표지된 아비딘(Avidin-HRP)을 넣고 30분 동안 반응시켰다. 워싱버퍼로 세척한 후, 기질용액(Substrate Solution)을 넣고 빛을 차단한 상태로 20분간 반응시킨 후, 정지용액(Stop solution, 1 M H₂SO₄)을 넣어 반응을 중단시켰다. 그 후, 마이크로 플레이트 리더(Epoch Microplate Spectrophotometer)로 450 nm 파장에서 570 nm 파장을 제외한 흡광도 값을 측정하여 농도를 계산하였다.

[0153] 그 결과, PBS를 피하 투여한 제3그룹의 마우스의 경우, 혈중 MCPT-1 농도가 약 4,000 ng/ml로 계산되었다. 또한, 시알산 함량이 낮은 폴리펩티드 이량체(SA^{low})를 피하 투여한 제2그룹의 마우스의 경우, 혈중 MCPT-1 농도가 약 4,200 ng/ml로 계산되었다. 반면, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체(SA^{high})를 피하 투여한 제1그룹의 마우스의 경우, 약 2,800 ng/ml 계산되었으며, 제2그룹 및 제3그룹의 마우스의 혈중 IgE 농도값과 유의미한 차이를 나타내었다(도 14).

[0154] **실시에 3. 정제를 통한 시알산이 고함량 포함된 폴리펩티드 이량체 제조**

[0155] 시알산 함량에 따른 폴리펩티드 이량체의 물성을 확인하기 위해, 다양한 범위의 시알산이 포함된 폴리펩티드 이량체를 수득하였다. 구체적으로, FcεRIαECD-Fc2+a2,6-ST 세포주에서 수득한 폴리펩티드 이량체를 친화성 크로마토그래피 및 음이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.

[0156] 먼저, 세포 배양액을 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)를 통해 배양액에서 나오는 1차 불순물 제거를 진행하였다. 친화성 크로마토그래피는 AmshpereTM A3 수지가 팩킹(packing)된 AmsphereTM A3 프리-팩킹 컬럼(AmsphereTM A3 pre-packed column; 베드 높이(bed height) 5 cm, 부피(volume) 5 ml)과 액체크로마토그래피 시스템인 AKTA Avant 25 장비를 이용하여 진행하였다. 이때, 용출 버퍼는 100 mM Glycine, pH 3.3를 이용하여 수행하였다.

[0157] 이 후, 음이온 교환 크로마토그래피(Anion Exchange Chromatography)는 Q 세파로스 패스트 플로우 수지(Q Sepharose Fast Flow resin)가 팩킹된 Hiscreen QFF(베드 높이(bed height) 10 cm, 부피(volume) 5 ml)와 액체크로마토그래피 시스템인 AKTA Avant 25 장비를 이용하여 진행하였다. 용출 버퍼는 20 mM Phospho-citrate, pH 3.5를 이용하였다. 이때, 세척 버퍼인 20 mM Phospho-citrate, pH 4.0의 농도를 조절하여 다양한 시알산 함량을 가지는 이량체를 수득하였다. 시알산 함량 분석은 실험예 7에서 분석한 방법으로 수행하였다. 이를 통해, 시알산 함량이 7.0 mol/mol, 10.3 mol/mol, 12.9 mol/mol, 14.9 mol/mol 및 21.4 mol/mol인 폴리펩티드 이량체를 수득하였다.

[0158] **실험예 13. 마우스 모델에서 시알산 함량에 따른 폴리펩티드 이량체의 약동학 분석**

[0159] 폴리펩티드 이량체 시알산 함량에 따른 약동학(pharmacokinetics) 분석을 수행하기 위해, 실시에 3에서 제조한 시알산 함량 7.0 mol/mol, 10.3 mol/mol, 12.9 mol/mol, 14.9 mol/mol 및 21.4 mol/mol의 폴리펩티드 이량체를 각각 10 mg/kg의 농도로 마우스에 피하 주사하였다. 폴리펩티드 이량체의 약동학 분석을 위해 물질 투여 후 0시간, 3시간, 10시간, 24시간, 72시간, 168시간, 240시간 췌에 채혈하여 아래와 같은 방법으로 분석하였다.

[0160] 1X PBS(Welgene)에 항-FcεRI 항체(Invitrogen)를 0.5 μg/ml의 농도로 희석하여 immunoplate(Thermo)에 첨가하고 4°C 조건에서 밤새 반응시켰다. 반응이 끝난 immunoplate는 1X PBST를 이용하여 세척하고 Blocking solution인 I-Block solution(invitrogen)을 well당 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. Blocking 도중 standard와 분석용 샘플을 준비하였다. 폴리펩티드 이량체를 0.19 ng/ml 내지 200 ng/ml의 농도로 마우스 blank serum이 포함된 1% BSA/PBS에 희석하여 Standard 물질로 준비하였고, 분석용 샘플 또한 blank serum이 포함된 1% BSA/PBS를 이용하여 1/20-1/300으로 희석하여 준비하였다.

[0161] Blocking이 끝난 plate는 1X PBST를 이용하여 세척하고 준비된 standard와 분석용 샘플을 well당 첨가 후 상온에서 1시간 반응시켰다. 이후 1X PBST를 이용하여 세척하고 1:10,000으로 희석된 항-인간 IgG4-HRP(Southern biotech)를 첨가한 다음 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 plate는 1X PBST를 이용하여 세척하고 TMB solution(Thermo)을 well에 넣고 반응시켰다. Microplate reader (Molecular devices)를 이용하여 650 nm 파장

에서 흡광도 값이 0.8-1.0 범위에서 측정되면 stop solution(Sigma)을 well 당 첨가하여 반응을 종결시켰다. 반응이 종결된 plate는 5분 이내에 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 수치를 분석하였다. 그 결과로 얻은 시알산 함량에 따른 폴리펩티드 이량체의 약동학 그래프와 약동학적 파라미터 결과는 도 15 및 표 7에 나타내었다.

[0162] 그 결과, 표 7에 나타난 바와 같이, 마우스에 투여한 폴리펩티드 이량체의 시알산 함량이 높을수록 혈중 농도가 증가하는 것을 확인하였다.

표 7

시알산 함량 (mol/mol)	T _{1/2} (hr)	Tmax (hr)	Cmax (μg/ml)	AUClast (hr*μg/ml)
7.0	51.3 ± 5.9	5.3 ± 3.3	1.3 ± 0.5	47.8 ± 3.2
10.3	44.5 ± 6.7	5.3 ± 3.3	1.6 ± 0.6	57.1 ± 9.6
12.9	40.0 ± 9.5	17 ± 9.9	2.0 ± 0.4	119.7 ± 5.2
14.9	35.4 ± 3.5	7.7 ± 3.3	2.6 ± 0.3	182.7 ± 7.0
21.4	38.5 ± 5.0	10.0 ± 0.0	12.1 ± 0.9	890.0 ± 64.4

[0164] 실험예 14. 수동성 전신적 아나필락시스 마우스 모델에서 폴리펩티드 이량체의 시알산 함량에 따른 효능 확인

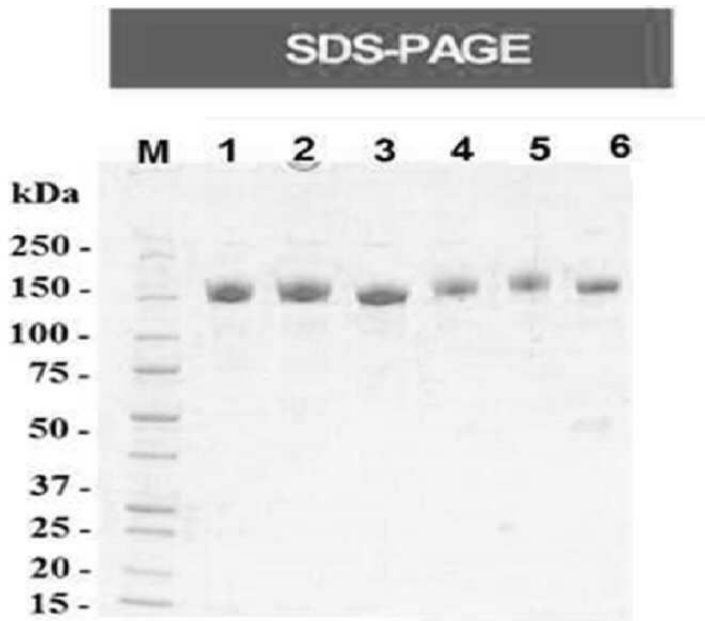
[0165] 폴리펩티드 이량체의 시알산 함량에 따른 생체 내(in vivo)에서의 항알러지 효과 차이를 확인하기 위해, 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같은 방법으로 마우스에서 수동성 전신적 아나필락시스(passive systemic anaphylaxis, PSA)를 유도하였다(Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1032, DOI 10.1007/978-1-62703-496-8_10). 아나필락시스 유도에 의해 비만세포가 활성화되고 비만세포 증가에 의해 체온이 감소되는 것으로 알려져 있다. 이를 이용하여 마우스에서 PSA를 유도하면서 시알산 함량별 폴리펩티드 이량체를 투여한 다음 체온을 측정하여 항알러지 효과를 비교하고자 하였다.

[0166] 트랜스폰더(transponder)가 삽입된 Balb/c 마우스(오리엔트바이오)에서 체온을 측정한 후 0.9% NaCl이 포함된 항-DNP IgE(Sigma) 20 μg을 복강 투여 후, 각기 다른 시알산 함량을 가진 폴리펩티드 이량체 10 mg/kg을 피하 주사하였다. 24시간 후 외래 항원 0.9% NaCl이 포함된 DNP-HAS(Sigma) 투여 전 마우스 체온을 측정하였다. 이후, 항원 1 mg을 정맥으로 투여하였다. 투여 후 10분 간격으로 1시간 동안 마우스 체온을 원격 체온측정기(Bio medic data systems)로 측정하였다. 실험 결과는 도 16에 나타내었다.

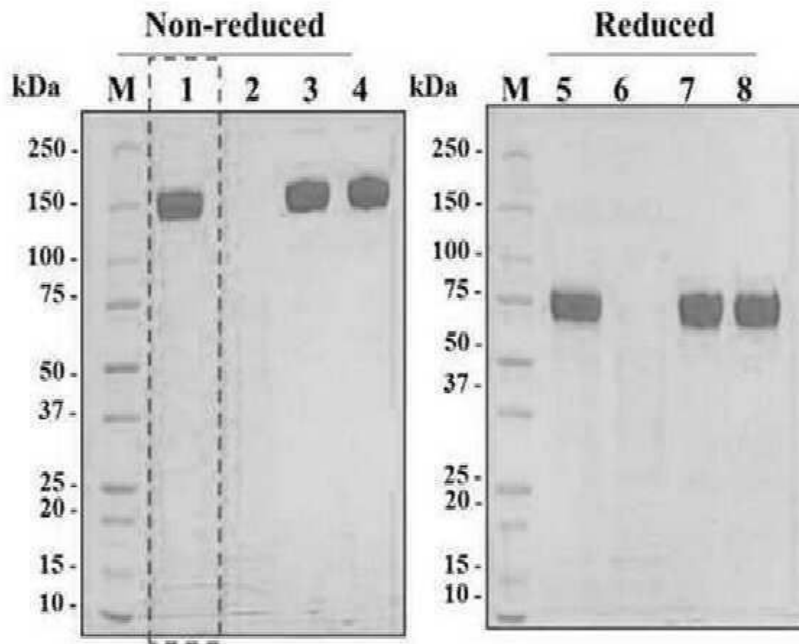
[0167] 그 결과, 비히클(vehicle)과 시알산 함량 10.3 mol/mol 폴리펩티드 이량체 투여 군에서는 마우스 체온이 감소하였으나 시알산 함량 14.9 mol/mol 이상 그룹에서는 마우스 체온이 감소하지 않음을 확인하였다. 이를 통해, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체가 시알산 함량이 낮은 이량체 보다 수동성 전신적 아나필락시스 유발을 감소시키는 효과가 우수한 것을 확인하였다.

도면

도면1

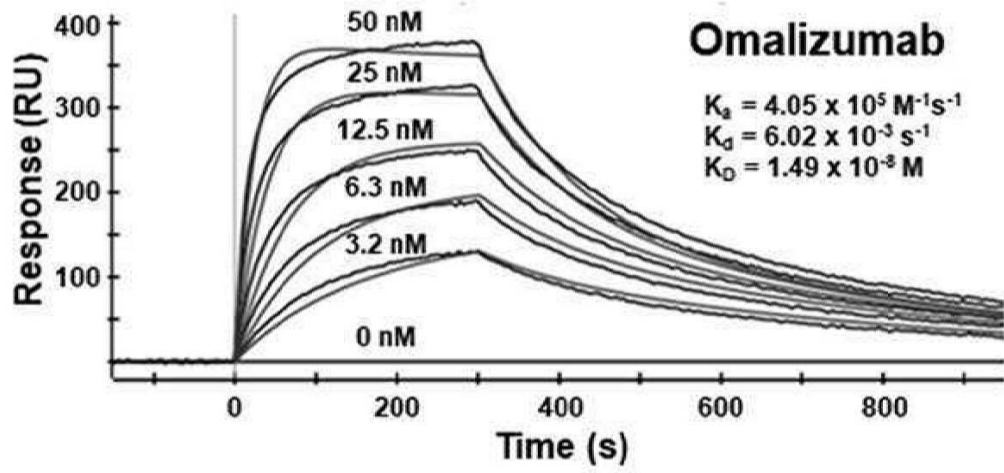


도면2

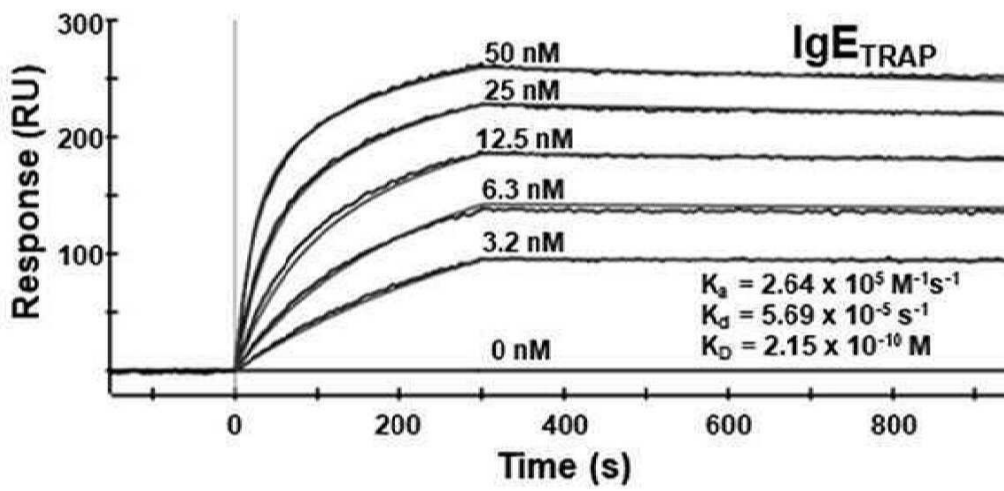


Lane	Sample name	Loading amount
M	Size Marker	3ul
1	Input	Max
2	FT	Max
3	Elute	3 ug
4	Elute_N	3 ug
M	Size Marker	3ul
5	Input	Max
6	FT	Max
7	Elute	3 ug
8	Elute_N	3 ug

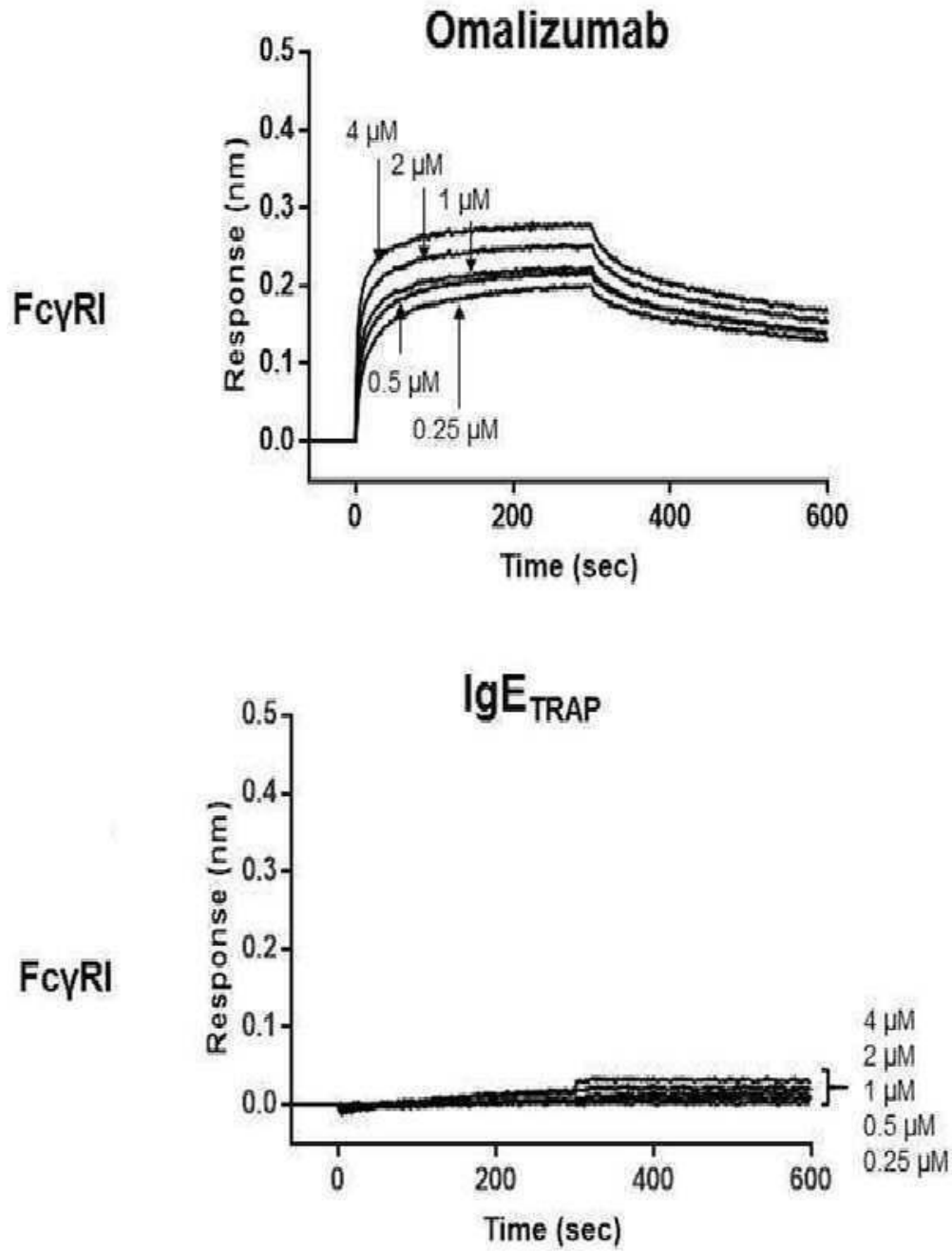
도면3



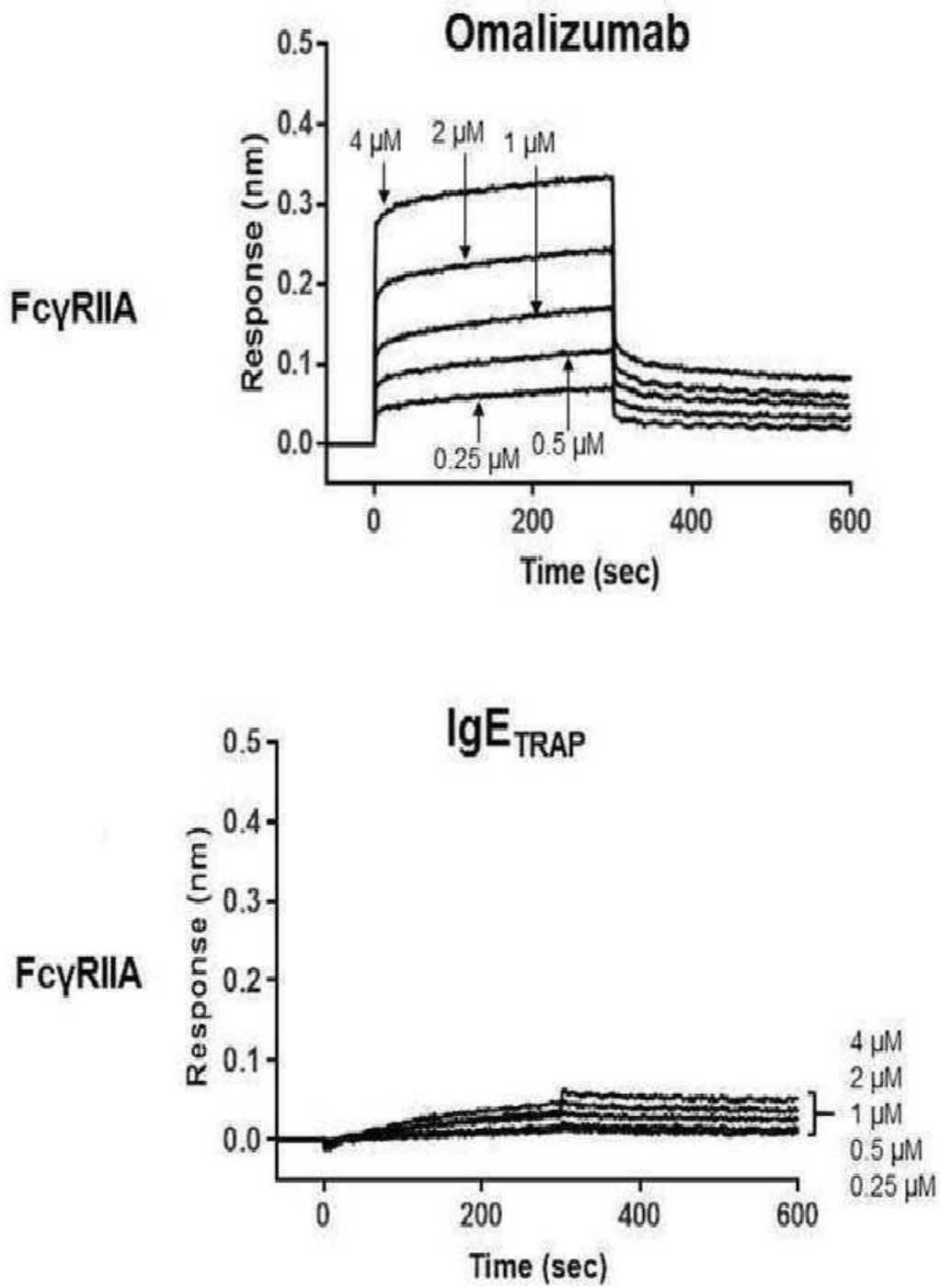
도면4



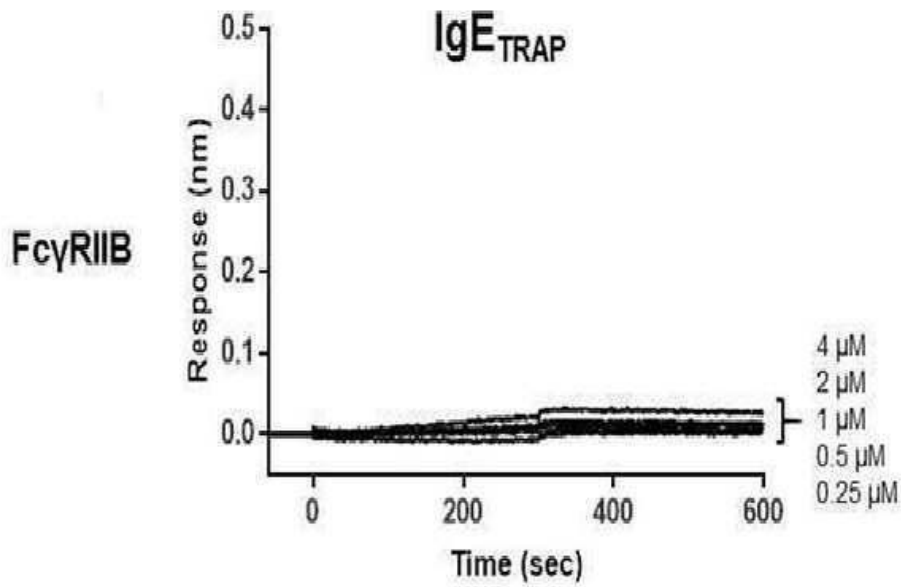
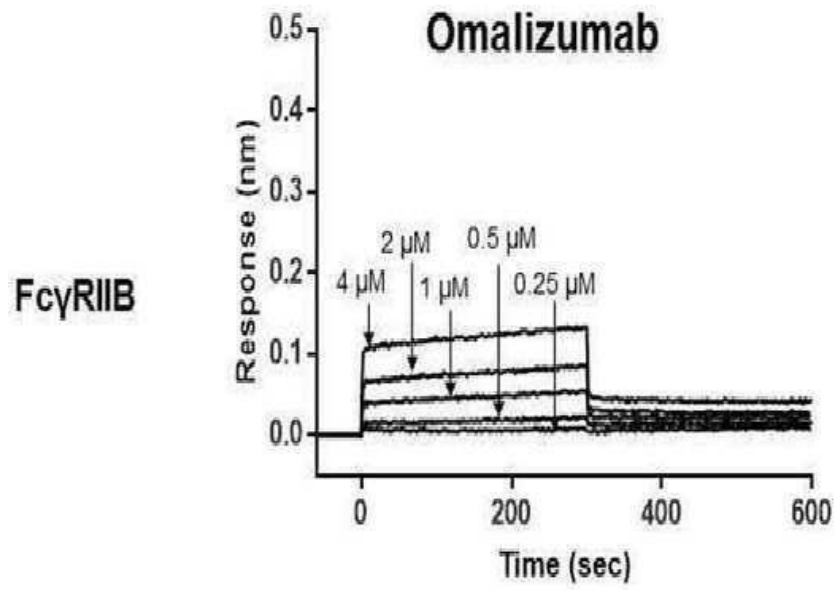
도면5a



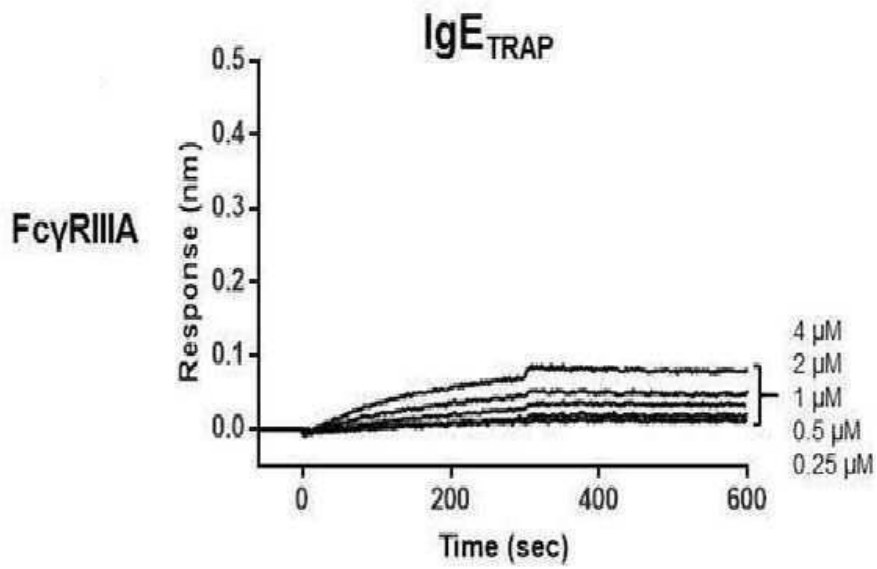
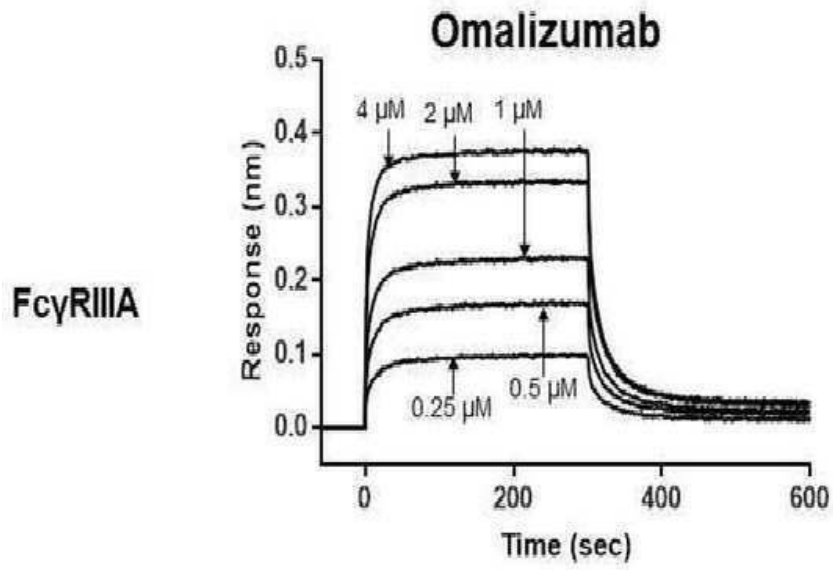
도면5b



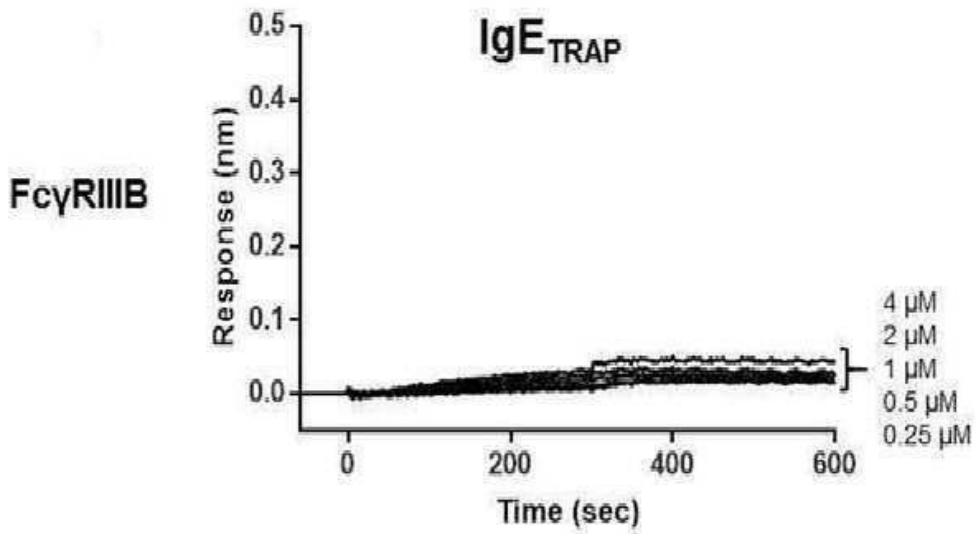
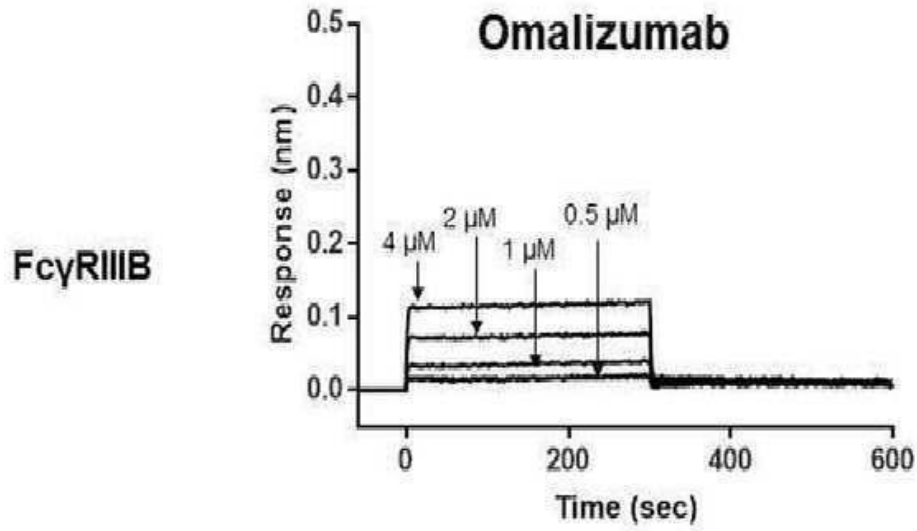
도면5c



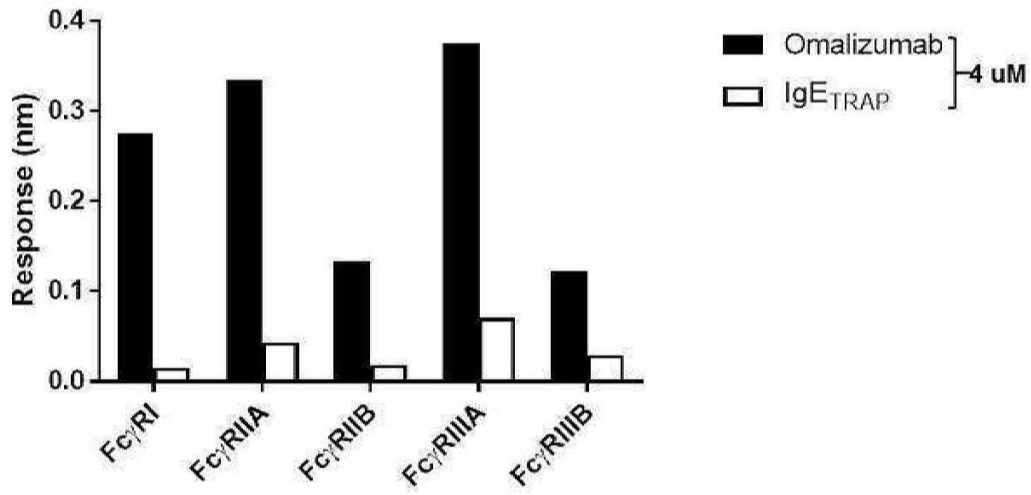
도면5d



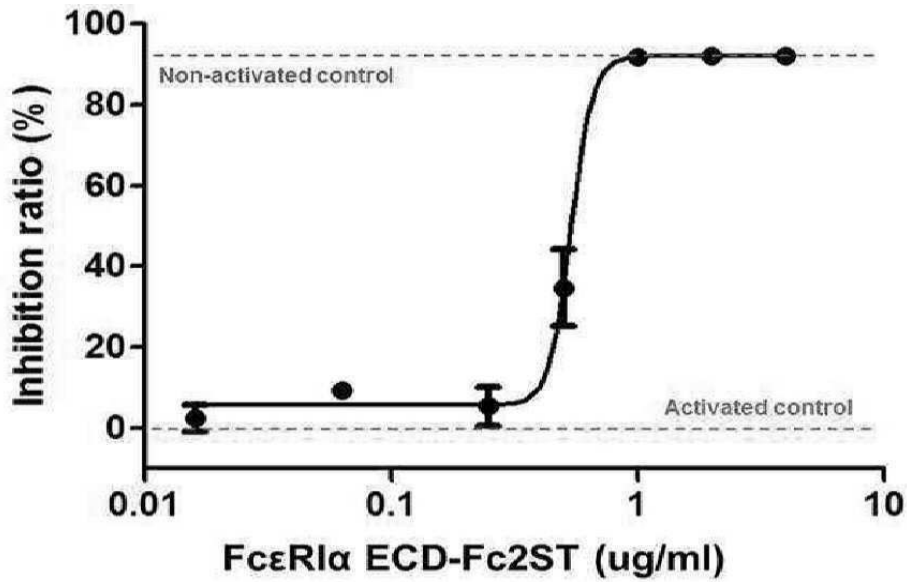
도면5e



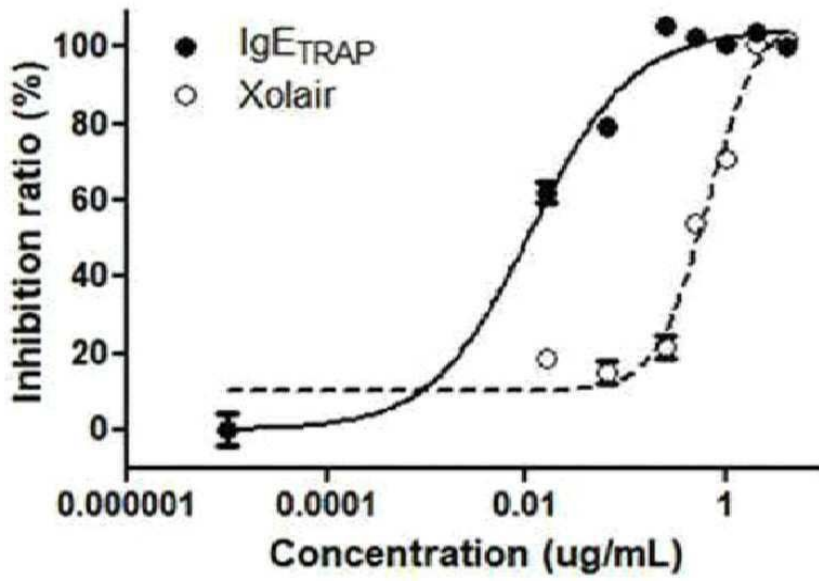
도면6



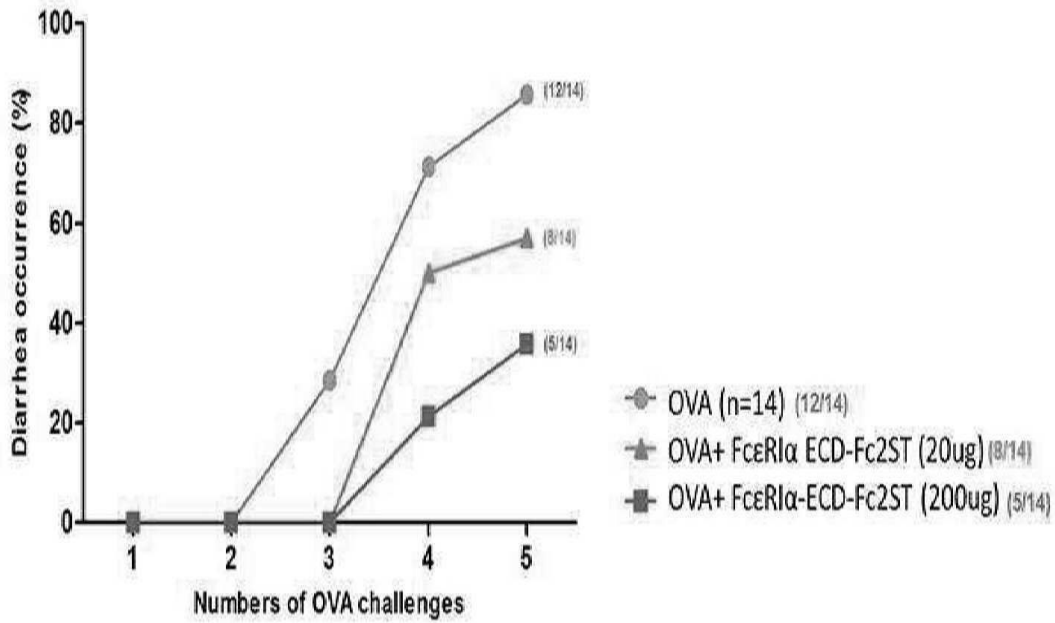
도면7



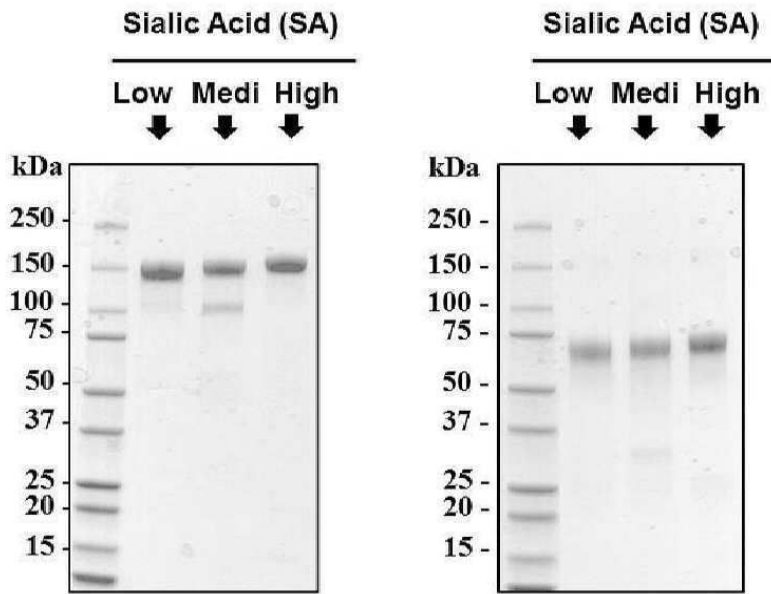
도면8



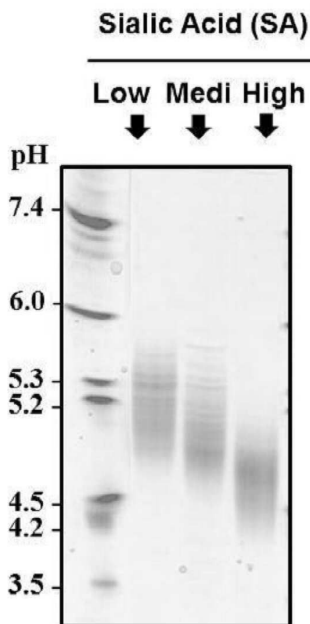
도면9



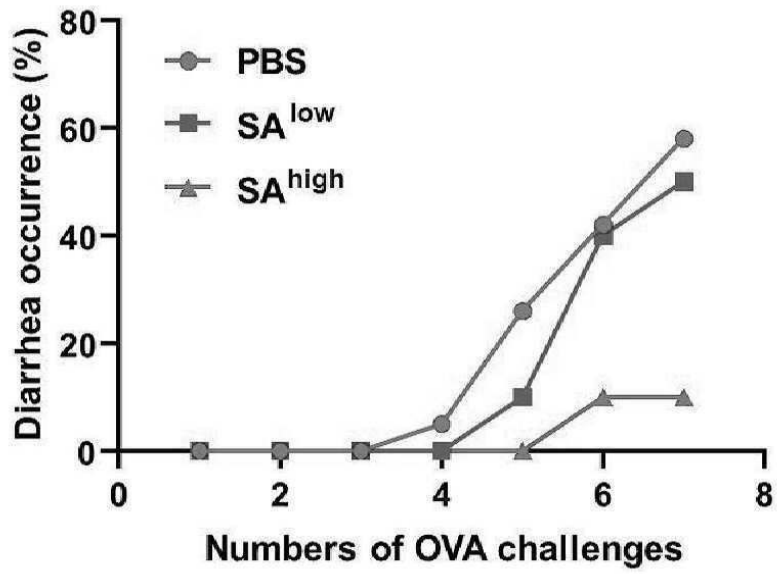
도면10



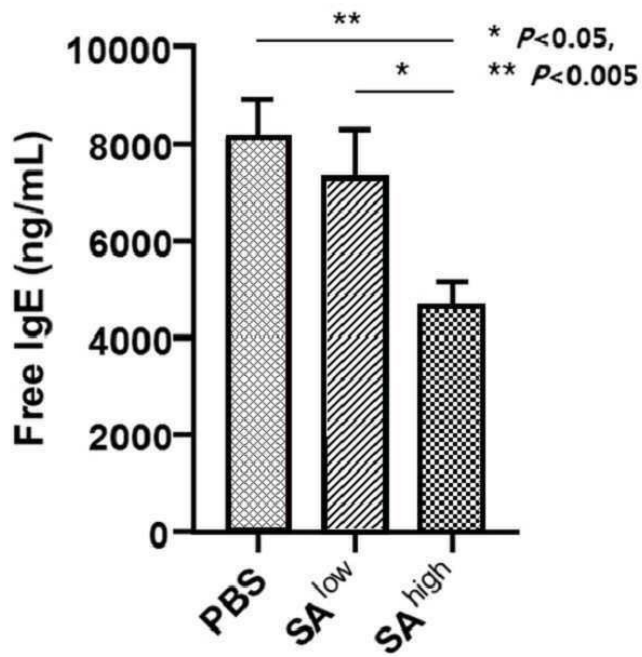
도면11



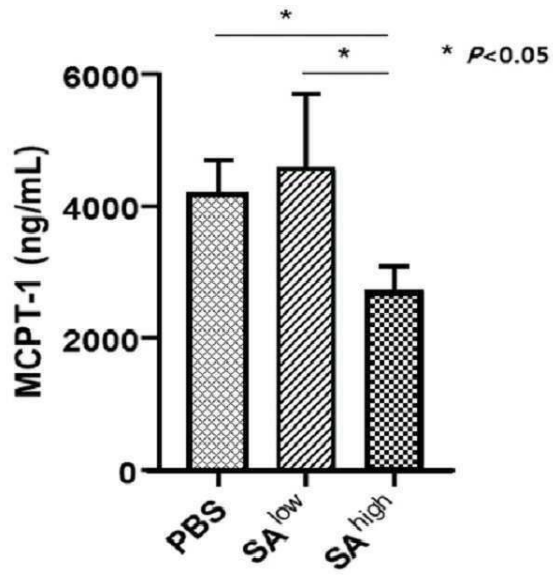
도면12



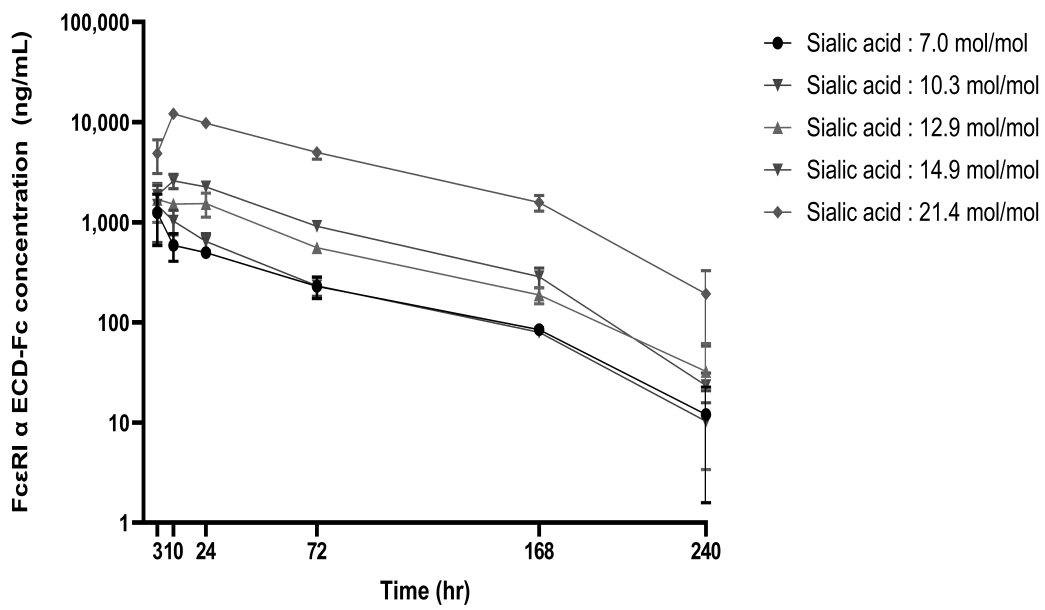
도면13



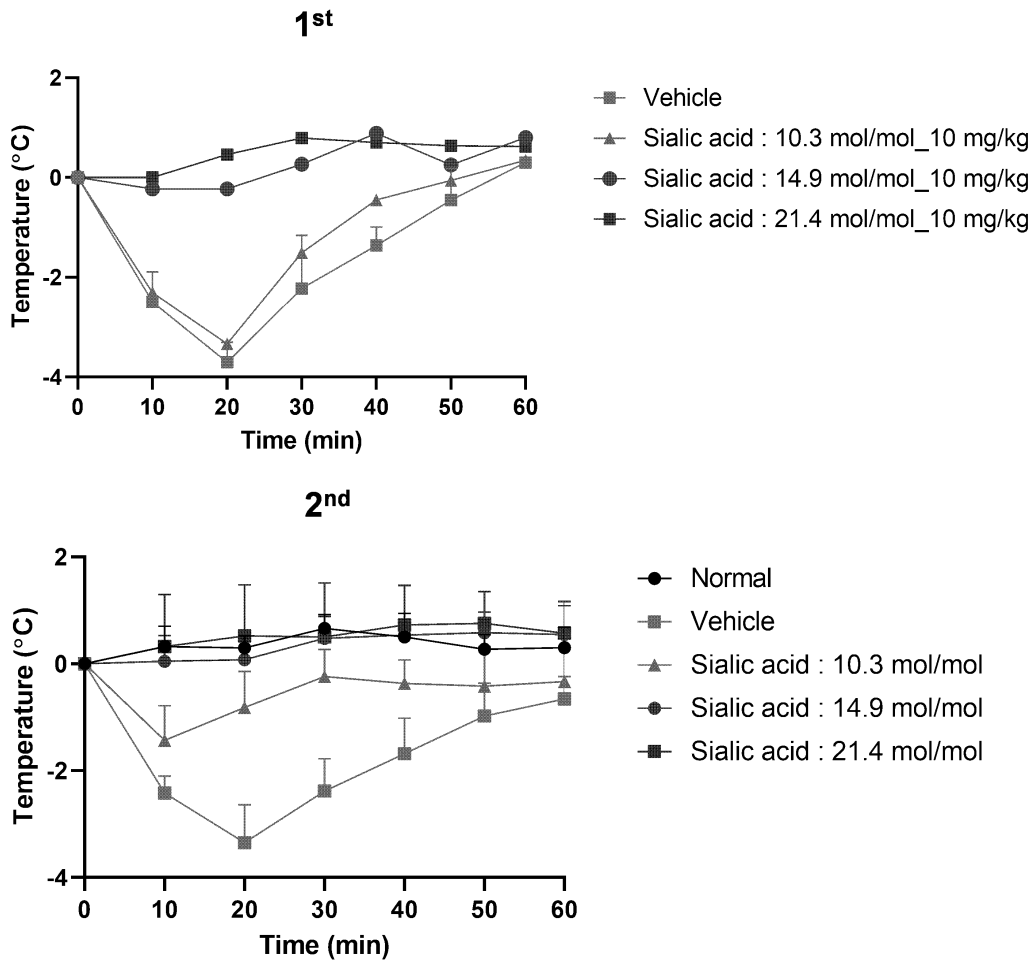
도면14



도면15



도면16



서열목록

- <110> GI Innovation, Inc.
- <120> POLYPEPTIDE DIMER COMPRISING EXTRACELLULAR DOMAIN OF ALPHA SUBUNIT OF IgE Fc RECEPTOR WITH HIGH CONTENT OF SIALIC ACID AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING THE SAME
- <130> SPD20-088-GII
- <150> KR 10-2019-0082217
- <151> 2019-07-08
- <160> 22
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 180
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> FcεR1 ECD

<400> 1

Val Pro Gln Lys Pro Lys Val Ser Leu Asn Pro Pro Trp Asn Arg Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Val Ser Ser Thr Lys Trp Phe His Asn Gly Ser Leu Ser Glu Glu

35 40 45

Thr Asn Ser Ser Leu Asn Ile Val Asn Ala Lys Phe Glu Asp Ser Gly

50 55 60

Glu Tyr Lys Cys Gln His Gln Gln Val Asn Glu Ser Glu Pro Val Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Val Phe Ser Asp Trp Leu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Glu Val

85 90 95

Val Met Glu Gly Gln Pro Leu Phe Leu Arg Cys His Gly Trp Arg Asn

100 105 110

Trp Asp Val Tyr Lys Val Ile Tyr Tyr Lys Asp Gly Glu Ala Leu Lys

115 120 125

Tyr Trp Tyr Glu Asn His Asn Ile Ser Ile Thr Asn Ala Thr Val Glu

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Trp Leu Gln

180

<210> 2

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified Fc

<400> 2

Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

1 5 10 15
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

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

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

 165 170 175
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 180 185 190
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 195 200 205
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210 215
 <210> 3
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IgD hinge variant

<400> 3

Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Gly Ser Lys Glu Lys

1 5 10 15
 Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro
 20 25 30

<210> 4

<211> 49

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgD hinge variant

<400> 4

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

1 5 10 15
 Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Gly Ser
 20 25 30

Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys

35 40 45
 Pro

<210> 5

<211> 540

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotides sequence of FCeRI1 ECD

<400> 5

gtgccccaga agcccaaggt gaggcctgaac cctccctgga acagaatctt caagggcgag 60
 aacgtgacce tgacctgcaa cggcaacaac ttcttcgagg tgagcagcac caagtggttc 120
 cacaatggca gctgagcga ggagaccaac agctccctga acatcgtgaa cgccaagttc 180
 gaggacagcg gcgagtacaa gtgccagcac cagcaggtga acgagagcga gccctgttac 240

 ctggaggtgt tcagcgactg gctgctgctg caggccagcg ccgaggtggt gatggagggc 300
 cagcccctgt tctgagatg ccacggctgg agaaactggg acgtgtacaa ggtgatctac 360
 tacaaggatg gcgaggcctt gaagtactgg tacgagaacc acaacatctc catcaccaac 420

gccaccgtgg aggacagcgg cacctactac tgcacaggca aggtgtggca gctggactac 480
 gagagcgagc ccctgaacat caccgtgatc aaggctccca gagagaagta ctggctgcag 540
 540

<210> 6
 <211> 561
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotides sequence of modified Fc

<400> 6

tgcgtggtcg tggatgtgag ccaggaagat cccgaagtgc agttcaactg gtacgtggat 60
 ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagaag agcagttcaa ctccacctac 120
 agagtggatga gcgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 180
 tgcaaggtgt ccaacaaagg cctgcccagc tccatcgaga agaccatcag caaagccaaa 240
 ggccagccca gagaacccca ggtgtacacc ctgcctccca gccaggaaga gatgaccaag 300
 aaccaggtgt ccctgacctg cctggtgaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 360

tgggaaagca acggccagcc cgagaacaat tacaagacaa cccctcccgt gctggatagc 420
 gatggcagct tctttctgta cagcagactg accgtggaca agagcagatg gcaggaaggc 480
 aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgaa gcctgcaca accactacac ccagaagagc 540
 ctgtccctga gcctgggcaa g 561

<210> 7
 <211> 174
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotides sequence of IgD hinge variant

<400> 7

aggaacaccg gcagaggagg cgaggaaaag aaaggaagca aggagaagga ggagcaggag 60
 gaaagagaaa ccaagacccc cgagtcccc agccacaccc agcccctggg cgtgttctg 120
 ttcccccca ageccaagga caccctgatg atcagcagaa cccccgaggt gacc 174

<210> 8
 <211> 231
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotides sequence of IgD hinge variant
 <400> 8
 gccagcccc aggccgaggg cagcctggct aaggccacca cagctcccgc caccaccagg 60
 aacaccggca gaggaggcga ggaaaagaaa ggaagcaagg agaaggagga gcaggaggaa 120
 agagaaacca agacccccga gtgccccagc cacaccagc ccctgggcgt gttcctgttc 180

cccccaage ccaaggacac cctgatgatc agcagaacce ccgaggtgac c 231

<210> 9
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> signal peptide
 <400> 9
 Met Asp Ala Met Leu Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Ser His Ala
 20 25

<210> 10
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotides sequence of signal peptide

<400> 10
 atggaccca tgctgagagg cctgtgctgt gtgctgctgc tgtgcggcgc cgtgttcgtg 60
 tcccctagcc acgcc 75

<210> 11
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> FceRIa ECD-hinge-Fc2
 <400> 11
 Met Asp Ala Met Leu Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Ser His Ala Val Pro Gln Lys Pro Lys Val

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 12

<211> 1350

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotides sequence of FcεRIa ECD-hinge-Fc2

<400> 12

atggacgcca tgctgagagg cctgtgctgt gtgctgctgc tgtgcggcgc cgtgttcgtg 60

tcccctagcc acgccgtgcc ccagaagccc aaggtgagcc tgaaccctcc ctggaacaga 120

atcttcaagg gcgagaacgt gaccctgacc tgcaacggca acaacttctt cgaggtgagc 180
 agcaccaagt ggttccaca tggcagcctg agcgaggaga ccaacagctc cctgaacatc 240
 gtgaacgcca agttcgagga cagcggcgag tacaagtgcc agcaccagca ggtgaacgag 300
 agcgagcccc tgiacctgga ggtgttcagc gactggctgc tgctgcaggc cagcgccgag 360

gtggtgatgg agggccagcc cctgttctg agatgccacg gctggagaaa ctgggacgtg 420
 tacaaggtga tctactacaa ggatggcgag gccctgaagt actggtacga gaaccacaac 480
 atctccatca ccaacgccac cgtggaggac agcggcacct actactgcac aggcaaggtg 540
 tggcagctgg actacgagag cgagcccctg aacatcaccg tgatcaaggc tcccagagag 600
 aagtactggc tgcagaggaa caccggcaga ggaggcgagg aaaagaaagg aagcaaggag 660
 aaggaggagc aggaggaaag agaaaccaag acccccgagt gccccagcca cacccagccc 720
 ctgggcgtgt tctgttccc cccaagccc aaggacaccc tgatgatcag cagaaccccc 780

gaggtgacct gcgtggtcgt ggatgtgagc caggaagatc ccgaagtgca gttcaactgg 840
 tacgtggatg gcgtggaagt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagaaga gcagttcaac 900
 tccacctaca gagtggtagc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 960
 gagtacaagt gcaaggtgtc caacaaggc ctgccagct ccatcgagaa gaccatcagc 1020
 aaagccaaag gccagcccag agaaccccag gtgtacaccc tgctcccag ccaggaagag 1080
 atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc ctggtgaaag gcttctacc cagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggaaagcaa cggccagccc gagaacaatt acaagacaac ccctcccgtg 1200

ctggatagcg atggcagctt ctttctgtac agcagactga ccgtggacaa gagcagatgg 1260
 caggaaggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgaag ccctgcacaa cactacacc 1320
 cagaagagcc tgtccctgag cctgggcaag 1350

<210> 13

<211> 469

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FcεRIa ECD-hinge-Fc3

<400> 13

Met Asp Ala Met Leu Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly

1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Ser His Ala Val Pro Gln Lys Pro Lys Val

20

25

30

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

 Gln Val Asn Glu Ser Glu Pro Val Tyr Leu Glu Val Phe Ser Asp Trp
 100 105 110
 Leu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Glu Val Val Met Glu Gly Gln Pro Leu
 115 120 125
 Phe Leu Arg Cys His Gly Trp Arg Asn Trp Asp Val Tyr Lys Val Ile
 130 135 140
 Tyr Tyr Lys Asp Gly Glu Ala Leu Lys Tyr Trp Tyr Glu Asn His Asn
 145 150 155 160
 Ile Ser Ile Thr Asn Ala Thr Val Glu Asp Ser Gly Thr Tyr Tyr Cys
 165 170 175
 Thr Gly Lys Val Trp Gln Leu Asp Tyr Glu Ser Glu Pro Leu Asn Ile
 180 185 190
 Thr Val Ile Lys Ala Pro Arg Glu Lys Tyr Trp Leu Gln Ala Gln Pro
 195 200 205
 Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr
 210 215 220
 Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Gly Ser Lys Glu Lys
 225 230 235 240

 Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His
 245 250 255
 Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300

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

305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 340 345 350

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Gly Lys

465

<210> 14

<211> 1407

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotides sequence of FcεRIa ECD-hinge-Fc3

<400> 14

atggacgcca tgctgagagg cctgtgctgt gtgctgtgc tgtgcggcgc cgtgttcgtg 60

tcccctagcc acgccgtgcc ccagaagccc aaggtgagcc tgaaccctcc ctggaacaga 120

atcttcaagg gcgagaacgt gaccctgacc tgcaacggca acaacttctt cgaggtagc 180
 agcaccaagt ggttccacaa tggcagcctg agcgaggaga ccaacagctc cctgaacatc 240

gtgaacgcca agttcgagga cagcggcgag tacaagtgcc agcaccagca ggtgaacgag 300
 agcgagcccc tgiacctgga ggtgttcagc gactggctgc tgctgcagc cagcggcgag 360
 gtggtgatgg agggccagcc cctgttctctg agatgccacg gctggagaaa ctgggacgtg 420
 tacaaggtga tctactacaa ggatggcgag gccctgaagt actggtacga gaaccacaac 480
 atctccatca ccaacgccac cgtggaggac agcggcacct actactgcac aggcaaggtg 540
 tggcagctgg actacgagag cgagcccctg aacatcaccg tgatcaagc tcccagagag 600
 aagtactggc tgcaggccca gccccaggcc gagggcagcc tggctaagc caccacagct 660

cccgccacca ccaggaacac cggcagagga ggcgaggaaa agaaaggaag caaggagaag 720
 gaggagcagg aggaaagaga aaccaagacc cccgagtgcc ccagccacac ccagcccctg 780
 ggcgtgttcc tgttcccccc caagccaag gacacctga tgatcagcag aacccccgag 840
 gtgacctgcg tggtcgtgga tgtgagccag gaagatcccg aagtgcagtt caactggtac 900
 gtggatggcg tgaagtgca caacccaag accaagccca gagaagagca gttcaactec 960
 acctacagag tggtagcgt gctgacctg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 1020
 tacaagtgca aggtgtccaa caaaggcctg cccagctcca tcgagaagac catcagcaaa 1080

gccaaaggcc agcccagaga accccaggtg tacacctgc ctcccagcca ggaagagatg 1140
 accaagaacc aggtgtccct gacctgctg gtgaaaggct tctaccccag cgacatgcc 1200
 gtggagtggg aaagcaacgg ccagcccag acaattaca agacaacccc tcccgtgctg 1260
 gatagcgatg gcagcttctt tctgtacagc agactgaccg tggacaagag cagatggcag 1320
 gaaggcaacg ttttcagctg cagcgtgatg cacgaagccc tgcacaacca ctacaccag 1380
 aagagcctgt cctgagcct gggcaag 1407

<210> 15
 <211> 406
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human a-2,6 sialic acid transferase

<400> 15

Met Ile His Thr Asn Leu Lys Lys Lys Phe Ser Cys Cys Val Leu Val

1 5 10 15

Phe Leu Leu Phe Ala Val Ile Cys Val Trp Lys Glu Lys Lys Lys Gly

Pro Asp Tyr Asn Phe Phe Asn Asn Tyr Lys Thr Tyr Arg Lys Leu His
 275 280 285

Pro Asn Gln Pro Phe Tyr Ile Leu Lys Pro Gln Met Pro Trp Glu Leu
 290 295 300

Trp Asp Ile Leu Gln Glu Ile Ser Pro Glu Glu Ile Gln Pro Asn Pro
 305 310 315 320

Pro Ser Ser Gly Met Leu Gly Ile Ile Ile Met Met Thr Leu Cys Asp
 325 330 335

Gln Val Asp Ile Tyr Glu Phe Leu Pro Ser Lys Arg Lys Thr Asp Val
 340 345 350

Cys Tyr Tyr Tyr Gln Lys Phe Phe Asp Ser Ala Cys Thr Met Gly Ala
 355 360 365

Tyr His Pro Leu Leu Tyr Glu Lys Asn Leu Val Lys His Leu Asn Gln
 370 375 380

Gly Thr Asp Glu Asp Ile Tyr Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Pro Gly
 385 390 395 400

Phe Arg Thr Ile His Cys
 405

<210> 16

<211> 1218

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotides sequence of human a-2,6 sialic acid transferase

<400> 16

atgatccaca ccaacctgaa gaagaagttc agctgctgcg tgctggtgtt cctgctgttc 60
 gccgtgatct gcgtgtggaa ggagaagaag aaaggcagct actacgacag cttcaagctg 120
 cagaccaagg agttccaggt gctgaagagc ctgggcaagc tggccatggg cagcgacagc 180
 cagagcgtgt ccagctcctc caccaggat cccacagag gcagacagac cctgggcagc 240
 ctgagaggcc tggccaaggc caagcccag gccagcttcc aggtgtggaa caaggacagc 300

agcagcaaga acctgatccc cagactgcag aagatctgga agaactacct gagcatgaac 360
 aagtacaagg tgagctaaa aggacccgga cccggcatca agttcagcgc cgaggccctg 420
 aggtgccacc tgagagacca cgtgaacgtg agcatggtgg aagtgaccga cttccccttc 480

aacaccagcg agtgggaagg ctacctgccc aaggagagca tcaggaccaa ggctggcccc 540
 tggggcagat ggcgctggt gacgagcgtt ggcagcctga agagctcca gctgggcaga 600
 gagatcgacg accacgatgc cgtgctgagg ttcaatggcg ctcccaccgc caacttcag 660
 caggacgtgg gcaccaagac cacaatccgg ctgatgaaca gccagctggt gacaaccgag 720

aagcggttcc tgaaggacag cctgtacaac gagggcatcc tgatcgtgtg ggatcccagc 780
 gtgtaccaca ggcacatccc caagtgggtac cagaatcccg actacaactt cttcaacaac 840
 tacaagacct atagaaagct gcacccaac cagcccttct acatcctgaa gccccagatg 900
 ccctggggagc tgtgggacat cctgcaggag atcagccctg aagagatcca gccaacacct 960
 ccctccagcg gcatgctggg cattatcatic atgatgaccc tgtgcgacca ggtggacatc 1020
 tacgagttcc tgcccagcaa gagaaagacc gacgtgtgct actactatca gaagttcttc 1080
 gagacgcctt gcacatggg gcctaccac ccctgctgt acgagaagaa cctggtgaag 1140

cacctgaacc agggcaccga cgaggacatc tacctgctgg gcaaagccac cctgcccggc 1200
 ttcagaacca tccactgc 1218

<210> 17

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgD hinge variant

<400> 17

Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Xaa Xaa Lys Glu Lys

1 5 10 15

Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro

20 25 30

<210> 18

<211> 49

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgD hinge variant

<400> 18

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

1 5 10 15

Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Xaa Xaa

20 25 30
 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys
 35 40 45

Pro

<210> 19

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgD hinge

<400> 19

Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys
 1 5 10 15

Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro
 20 25 30

<210> 20

<211> 425

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FcεRIα ECD-hinge-Fc1

<400> 20

Val Pro Gln Lys Pro Lys Val Ser Leu Asn Pro Pro Trp Asn Arg Ile

1 5 10 15
 Phe Lys Gly Glu Asn Val Thr Leu Thr Cys Asn Gly Asn Asn Phe Phe

20 25 30
 Glu Val Ser Ser Thr Lys Trp Phe His Asn Gly Ser Leu Ser Glu Glu

35 40 45
 Thr Asn Ser Ser Leu Asn Ile Val Asn Ala Lys Phe Glu Asp Ser Gly

50 55 60
 Glu Tyr Lys Cys Gln His Gln Gln Val Asn Glu Ser Glu Pro Val Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Val Phe Ser Asp Trp Leu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Glu Val

340 345 350
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 355 360 365

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

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
 385 390 395 400

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 405 410 415

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 420 425

<210> 21

<211> 425

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FcεRIα ECD-hinge-Fc2

<400> 21

Val Pro Gln Lys Pro Lys Val Ser Leu Asn Pro Pro Trp Asn Arg Ile
 1 5 10 15

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

Glu Val Ser Ser Thr Lys Trp Phe His Asn Gly Ser Leu Ser Glu Glu
 35 40 45

Thr Asn Ser Ser Leu Asn Ile Val Asn Ala Lys Phe Glu Asp Ser Gly
 50 55 60

Glu Tyr Lys Cys Gln His Gln Gln Val Asn Glu Ser Glu Pro Val Tyr
 65 70 75 80

Leu Glu Val Phe Ser Asp Trp Leu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Glu Val
 85 90 95

Val Met Glu Gly Gln Pro Leu Phe Leu Arg Cys His Gly Trp Arg Asn
 100 105 110

Trp Asp Val Tyr Lys Val Ile Tyr Tyr Lys Asp Gly Glu Ala Leu Lys

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 370 375 380
 Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
 385 390 395 400
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 405 410 415
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

420 425
 <210> 22
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FcεRIα ECD-hinge-Fc3
 <400> 22

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

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

115 120 125
 Tyr Trp Tyr Glu Asn His Asn Ile Ser Ile Thr Asn Ala Thr Val Glu
 130 135 140

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

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

 260 265 270
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335

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

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

405

410

415

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

420

425

430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435

440