



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0136604  
(43) 공개일자 2023년09월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 17/04 (2006.01) C07K 16/24 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/18 (2013.01)  
A61P 17/04 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7025434
- (22) 출원일자(국제) 2022년01월27일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년07월25일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2022/014146
- (87) 국제공개번호 WO 2022/165067  
국제공개일자 2022년08월04일
- (30) 우선권주장  
63/142,774 2021년01월28일 미국(US)

- (71) 출원인  
조에티스 서비스즈 엘엘씨  
미국 뉴저지 (우편번호 07054) 파시파니 실반 웨이 10
- (72) 발명자  
캠포스 헨리 루이스  
미국 미시간주 49007 칼라마주 포티지 스트리트 333 조에티스서비스즈 엘엘씨  
라이틀 산드라 앤 마리  
미국 미시간주 49007 칼라마주 포티지 스트리트 333 조에티스서비스즈 엘엘씨  
버거론 리사 마리  
미국 미시시피주 49007 칼라마주 포티지 스트리트 333 조에티스서비스즈 엘엘씨
- (74) 대리인  
제일특허법인(유)

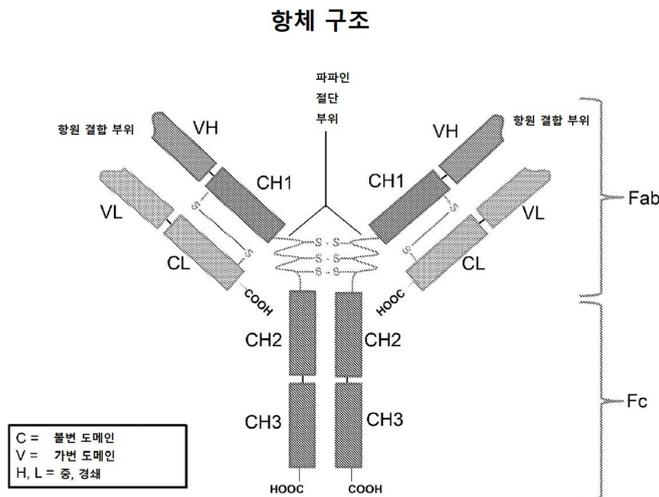
전체 청구항 수 : 총 72 항

(54) 발명의 명칭 개과 항체 불변 영역에서의 돌연변이

(57) 요약

본 발명은 일반적으로 개과 항체 변이체 및 이의 용도에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 다양한 특성을 개선하기 위한 개과 항체의 불변 영역에서의 돌연변이에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C07K 16/244** (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/20 (2013.01)

C07K 2317/52 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

C07K 2317/94 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 개과 IgG 불변 도메인을 포함하는 변형된 IgG로서, 상기 치환은 카바트에서와 같은 Eu 인덱스에 따라 넘버링된 아미노산 잔기 247, 252, 254, 256, 311, 312, 314, 431, 434 또는 439에 있는, 변형된 IgG.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 불변 도메인은 P247V, L252Y, L252P, L252W, L252A, L252D, L252G, L252H, L252I, L252K, L252M, L252N, L252Q, L252S, L252T, L252V, L252F, L252R, A254F, A254G, A254H, A254N, A254Q, A254R, A254W, A254C, A254D, A254I, A254K, A254L, A254M, A254P, A254S, A254T, A254V, A254Y, T256H, T256I, T256K, T256L, T256Q, T256Y, T256A, T256C, T256D, T256F, T256G, T256M, T256N, T256P, T256R, T256S, T256V, T256W, T256E, Q311H, Q311R, Q311Y, Q311W, D312P, L314K, A431K, N434A, N434C, N434D, N434E, N434F, N434G, N434H, N434I, N434K, N434L, N434M, N434P, N434Q, N434R, N434S, N434T, N434V, N434W, N434Y 및 E439K 중 하나 이상의 치환을 포함하는, 변형된 IgG.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 변형된 IgG는 야생형 개과 IgG 불변 도메인을 갖는 IgG보다 FcRn에 대해 더 높은 친화도를 갖는, 변형된 IgG.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 변형된 IgG는 개과 또는 개과화 IgG인, 변형된 IgG.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 IgG는 IgG<sub>A</sub>, IgG<sub>B</sub>, IgG<sub>C</sub> 또는 IgG<sub>D</sub>인, 변형된 IgG.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 IgG 불변 도메인은 IgG<sub>A</sub>, IgG<sub>B</sub>, IgG<sub>C</sub> 또는 IgG<sub>D</sub>의 불변 도메인인, 변형된 IgG.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 IgG 불변 도메인은 CH3 도메인을 갖는 Fc 불변 영역을 포함하는, 변형된 IgG.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 IgG 불변 도메인은 CH2 및 CH3 도메인을 갖는 Fc 불변 영역을 포함하는, 변형된 IgG.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 상기 야생형 개과 IgG 불변 도메인은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는, 변형된 IgG.

#### 청구항 10

제1항의 변형된 IgG 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 11

용기 내에 제1항의 변형된 IgG 및 사용 설명서를 포함하는 키트.

#### 청구항 12

야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 개과 IgG 불변 도메인을 포함하는 폴리펩티드로서, 상기 치환은 카바트에서와 같은 EU 인덱스에 따라 넘버링된 아미노산 잔기 247, 252, 254, 256, 311, 312, 314, 431, 434 또는 439에 있는, 폴리펩티드.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 상기 불변 도메인은 P247V, L252Y, L252P, L252W, L252A, L252D, L252G, L252H, L252I, L252K, L252M, L252N, L252Q, L252S, L252T, L252V, L252F, L252R, A254F, A254G, A254H, A254N, A254Q, A254R, A254W, A254C, A254D, A254I, A254K, A254L, A254M, A254P, A254S, A254T, A254V, A254Y, T256H, T256I, T256K, T256L, T256Q, T256Y, T256A, T256C, T256D, T256F, T256G, T256M, T256N, T256P, T256R, T256S, T256V, T256W, T256E, Q311H, Q311R, Q311Y, Q311W, D312P, L314K, A431K, N434A, N434C, N434D, N434E, N434F, N434G, N434H, N434I, N434K, N434L, N434M, N434P, N434Q, N434R, N434S, N434T, N434V, N434W, N434Y 및 E439K 중 하나 이상의 치환을 포함하는, 폴리펩티드.

**청구항 14**

제12항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 야생형 개과 IgG 불변 도메인을 갖는 IgG의 폴리펩티드보다 FcRn에 대해 더 높은 친화도를 갖는, 폴리펩티드.

**청구항 15**

제12항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 개과 또는 개과화 IgG의 폴리펩티드인, 폴리펩티드.

**청구항 16**

제12항에 있어서, 상기 IgG는 IgG<sub>A</sub>, IgG<sub>B</sub>, IgG<sub>C</sub> 또는 IgG<sub>D</sub>인, 폴리펩티드.

**청구항 17**

제12항에 있어서, 상기 IgG 불변 도메인은 IgG<sub>A</sub>, IgG<sub>B</sub>, IgG<sub>C</sub> 또는 IgG<sub>D</sub>의 불변 도메인인, 폴리펩티드.

**청구항 18**

제12항에 있어서, 상기 IgG 불변 도메인은 CH3 도메인을 갖는 Fc 불변 영역을 포함하는, 폴리펩티드.

**청구항 19**

제12항에 있어서, 상기 IgG 불변 도메인은 CH2 및 CH3 도메인을 갖는 Fc 불변 영역을 포함하는, 폴리펩티드.

**청구항 20**

제12항에 있어서, 상기 야생형 개과 IgG 불변 도메인은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩티드.

**청구항 21**

야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 개과 IgG 불변 도메인을 포함하는 항체로서, 상기 치환은 카바트에서와 같은 EU 인덱스에 따라 넘버링된 아미노산 잔기 247, 252, 254, 256, 311, 312, 314, 431, 434 또는 439에 있는, 항체.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 상기 불변 도메인은 P247V, L252Y, L252P, L252W, L252A, L252D, L252G, L252H, L252I, L252K, L252M, L252N, L252Q, L252S, L252T, L252V, L252F, L252R, A254F, A254G, A254H, A254N, A254Q, A254R, A254W, A254C, A254D, A254I, A254K, A254L, A254M, A254P, A254S, A254T, A254V, A254Y, T256H, T256I, T256K, T256L, T256Q, T256Y, T256A, T256C, T256D, T256F, T256G, T256M, T256N, T256P, T256R, T256S, T256V, T256W, T256E, Q311H, Q311R, Q311Y, Q311W, D312P, L314K, A431K, N434A, N434C, N434D, N434E, N434F, N434G, N434H, N434I, N434K, N434L, N434M, N434P, N434Q, N434R, N434S, N434T, N434V, N434W, N434Y 및 E439K 중 하나 이상의 치환을 포함하는, 항체.

**청구항 23**

제21항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 야생형 개과 IgG 불변 도메인을 갖는 IgG의 폴리펩티드보다 FcRn에 대해 더 높은 친화도를 갖는, 항체.

**청구항 24**

제21항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 개과 또는 개과화 IgG의 폴리펩티드인, 항체.

**청구항 25**

제21항에 있어서, 상기 IgG는 IgG<sub>A</sub>, IgG<sub>B</sub>, IgG<sub>C</sub> 또는 IgG<sub>D</sub>인, 항체.

**청구항 26**

제21항에 있어서, 상기 IgG 불변 도메인은 IgG<sub>A</sub>, IgG<sub>B</sub>, IgG<sub>C</sub> 또는 IgG<sub>D</sub>의 불변 도메인인, 항체.

**청구항 27**

제21항에 있어서, 상기 IgG 불변 도메인은 CH3 도메인을 갖는 Fc 불변 영역을 포함하는, 항체.

**청구항 28**

제21항에 있어서, 상기 IgG 불변 도메인은 CH2 및 CH3 도메인을 갖는 Fc 불변 영역을 포함하는, 항체.

**청구항 29**

제21항에 있어서, 상기 야생형 개과 IgG 불변 도메인은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는, 항체.

**청구항 30**

제29항의 항체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 31**

용기 내에 제29항의 항체 및 사용 설명서를 포함하는 키트.

**청구항 32**

제21항의 항체의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터로서, 상기 야생형 개과 IgG 불변 도메인은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는, 벡터.

**청구항 33**

제32항의 벡터를 포함하는 단리된 세포.

**청구항 34**

제33항의 세포를 제공하는 단계; 및 상기 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 항체 또는 분자의 제조 방법.

**청구항 35**

제21항 내지 제29항 중 어느 한 항의 항체를 제공하는 단계를 포함하는, 항체의 제조 방법.

**청구항 36**

야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 개과 IgG 불변 도메인을 포함하는 융합 분자로서, 상기 치환은 카바트에서와 같은 EU 인덱스에 따라 넘버링된 아미노산 잔기 247, 252, 254, 256, 311, 312, 314, 431, 434 또는 439에 있는, 융합 분자.

**청구항 37**

제36항에 있어서, 상기 불변 도메인은 P247V, L252Y, L252P, L252W, L252A, L252D, L252G, L252H, L252I,

L252K, L252M, L252N, L252Q, L252S, L252T, L252V, L252F, L252R, A254F, A254G, A254H, A254N, A254Q, A254R, A254W, A254C, A254D, A254I, A254K, A254L, A254M, A254P, A254S, A254T, A254V, A254Y, T256H, T256I, T256K, T256L, T256Q, T256Y, T256A, T256C, T256D, T256F, T256G, T256M, T256N, T256P, T256R, T256S, T256V, T256W, T256E, Q311H, Q311R, Q311Y, Q311W, D312P, L314K, A431K, N434A, N434C, N434D, N434E, N434F, N434G, N434H, N434I, N434K, N434L, N434M, N434P, N434Q, N434R, N434S, N434T, N434V, N434W, N434Y 및 E439K 중 하나 이상의 치환을 포함하는, 분자.

**청구항 38**

제36항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 야생형 개과 IgG 불변 도메인을 갖는 IgG의 폴리펩티드보다 FcRn에 대해 더 높은 친화도를 갖는, 분자.

**청구항 39**

제36항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 개과 또는 개과화 IgG의 폴리펩티드인, 분자.

**청구항 40**

제36항에 있어서, 상기 IgG는 IgG<sub>A</sub>, IgG<sub>B</sub>, IgG<sub>C</sub> 또는 IgG<sub>D</sub>인, 분자.

**청구항 41**

제36항에 있어서, 상기 IgG 불변 도메인은 IgG<sub>A</sub>, IgG<sub>B</sub>, IgG<sub>C</sub> 또는 IgG<sub>D</sub>의 불변 도메인인, 분자.

**청구항 42**

제36항에 있어서, 상기 IgG 불변 도메인은 CH3 도메인을 갖는 Fc 불변 영역을 포함하는, 분자.

**청구항 43**

제36항에 있어서, 상기 IgG 불변 도메인은 CH2 및 CH3 도메인을 갖는 Fc 불변 영역을 포함하는, 분자.

**청구항 44**

제36항에 있어서, 상기 야생형 개과 IgG 불변 도메인은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는, 분자.

**청구항 45**

제36항의 분자 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 46**

용기 내에 제36항의 분자 및 사용 설명서를 포함하는 키트.

**청구항 47**

제1항에 있어서, 적어도 하나의 돌연변이는 생물물리학적 특성을 향상시키는, 변형된 IgG.

**청구항 48**

제47항에 있어서, 상기 생물물리학적 특성은 다중반응성인, 변형된 IgG.

**청구항 49**

제12항에 있어서, 적어도 하나의 돌연변이는 생물물리학적 특성을 향상시키는, 폴리펩티드.

**청구항 50**

제49항에 있어서, 상기 생물물리학적 특성은 다중반응성인, 폴리펩티드.

**청구항 51**

제21항에 있어서, 적어도 하나의 돌연변이는 생물물리학적 특성을 향상시키는, 항체.

**청구항 52**

제51항에 있어서, 상기 생물물리학적 특성은 다중반응성인, 항체.

**청구항 53**

제36항에 있어서, 적어도 하나의 돌연변이는 생물물리학적 특성을 향상시키는, 분자.

**청구항 54**

제53항에 있어서, 상기 생물물리학적 특성은 다중반응성인, 분자.

**청구항 55**

야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 개과 IgG 불변 도메인을 포함하는 치료적 유효량의 항체를 개에게 투여하는 단계를 포함하는, 개에서 항체 혈청 반감기를 증가시키는 방법으로, 상기 치환은 카바트에서와 같은 Eu 인덱스에 따라 넘버링된 아미노산 잔기 252, 254, 256, 311, 434 또는 439에 있는, 방법.

**청구항 56**

제55항에 있어서, 상기 개과 IgG 불변 도메인은 L252F, L252R, L252Y, L252M, A254T, A254S, T256E, Q311W, N434H, N434Y 및 E439K 중 하나 이상의 돌연변이를 포함하는, 방법.

**청구항 57**

제55항에 있어서, 상기 개과 IgG 불변 도메인은 (1) L252F; (2) L252R, N434H 및 Q311W; (3) L252R; (4) Q311W; (5) L252R, A254T, T256E 및 N434H; (6) L252Y 및 A254T; 또는 (7) L252M, A254S 및 E439K의 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는, 방법.

**청구항 58**

제55항에 있어서, 상기 개과 IgG 불변 도메인은 돌연변이 L252F를 포함하는, 방법.

**청구항 59**

제55항에 있어서, 상기 개과 IgG 불변 도메인은 돌연변이 L252R, N434H 및 Q311W의 조합을 포함하는, 방법.

**청구항 60**

제55항에 있어서, 상기 개과 IgG 불변 도메인은 돌연변이 L252R 또는 Q311W를 포함하는, 방법.

**청구항 61**

제55항에 있어서, 상기 개과 IgG 불변 도메인은 돌연변이 L252R, A254T, T256E 및 N434H의 조합을 포함하는, 방법.

**청구항 62**

제55항에 있어서, 상기 개과 IgG 불변 도메인은 돌연변이 L252Y 및 A254T의 조합을 포함하는, 방법.

**청구항 63**

제55항에 있어서, 상기 개과 IgG 불변 도메인은 돌연변이 L252M, A254S 및 E439K의 조합을 포함하는, 방법.

**청구항 64**

제55항에 있어서, 상기 개과 IgG 불변 도메인은 야생형 개과 IgG 불변 도메인을 갖는 IgG보다 더 높은 혈청 반감기를 갖는, 방법.

**청구항 65**

제55항에 있어서, 상기 IgG는 IgG<sub>A</sub>, IgG<sub>B</sub>, IgG<sub>C</sub> 또는 IgG<sub>D</sub>인, 방법.

**청구항 66**

제55항에 있어서, 상기 IgG 불변 도메인은 IgG<sub>A</sub>, IgG<sub>B</sub>, IgG<sub>C</sub> 또는 IgG<sub>D</sub>의 불변 도메인인, 방법.

**청구항 67**

제55항에 있어서, 상기 IgG 불변 도메인은 CH3 도메인을 갖는 Fc 불변 영역을 포함하는, 방법.

**청구항 68**

제55항에 있어서, 상기 IgG 불변 도메인은 CH2 및 CH3 도메인을 갖는 Fc 불변 영역을 포함하는, 방법.

**청구항 69**

제55항에 있어서, 상기 야생형 개과 IgG 불변 도메인은 서열 번호 1, 2, 3 또는 4의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

**청구항 70**

제55항에 있어서, 상기 항체는 항-IL31 항체인, 방법.

**청구항 71**

치료적 유효량의 항-IL31 항체를 개과 대상체에게 투여함으로써, 개과 대상체에서 IL-31 매개 소양증 또는 알레르기 상태를 치료하는 단계를 포함하는, 개과 대상체에서 IL-31 매개 소양증 또는 알레르기 상태를 치료하는 방법.

**청구항 72**

제71항에 있어서, 상기 IL-31 매개 소양증 또는 알레르기 상태는 아토피성 피부염, 습진, 건선, 피부경화증 및 소양증으로 이루어지는 군으로부터 선택된 소양증 상태인, 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] **관련 출원의 교차 참조**

[0002] 이 출원은 2021년 1월 28일에 출원된 미국 특허 가출원 63/142,774에 대한 우선권 및 이익을 청구하며, 이는 본원에 그 전문이 참고로 포함된다.

[0003] **본 발명의 기술분야**

[0004] 본 발명은 일반적으로 개과 항체 변이체 및 이의 용도에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 다양한 특성을 개선하기 위한 개과 항체의 Fc 불변 영역에서의 하나 이상의 돌연변이에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0005] 개과 IgG 모노클로날 항체(mAb)는 수의학에서 효과적인 치료제로 개발되고 있다. 수년 전, 4개의 개과 IgG 서브클래스가 식별되고 특성화되었다(Bergeron 등, 2014, *Vet Immunol Immunopathol.*, vol. 157(1-2), 31-41면). 그러나, 개과 IgG의 반감기를 연장하기 위한 작업은 많지 않았다.

[0006] 신생아 Fc 수용체(FcRn)는 리사이클링 메커니즘을 통해 그 단편 결정화가능(Fc) 영역과 pH-의존적 상호작용에서 IgG의 반감기를 연장시킨다. 구체적으로, CH2 및 CH3 도메인의 계면에 걸쳐 있는 Fc 영역은 세포의 표면 상의 FcRn과 상호작용하여 IgG 항상성을 조절한다. 이 상호작용은 IgG 음세포작용 후 산성 상호작용에 의해 선호되고 따라서 IgG는 분해로부터 보호된다. 세포내 이입된 IgG는 그 다음 세포 표면으로 다시 재순환되고 알칼리성 pH에서 혈류 안으로 방출되어 적절한 기능을 위한 충분한 혈청 IgG를 유지한다. 따라서, IgG의 약동학적 프로파일

은 그의 Fc 영역의 구조적 및 기능적 특성에 의존한다.

- [0007] 3개의 개과 IgG 서브클래스가 개과 FcRn에 결합하고 인간 IgG 유사체와 비교되었다. 개과 IgG의 반감기는 임의의 실험 지원 없이는 그것이 인간 IgG와 밀접하게 정렬할지 여부를 예상하거나 예측할 수 없기 때문에 완전히 연구되어야 한다.
- [0008] IgG의 연장된 반감기는 항체 약물의 더 적은 빈도의 투여 및/또는 더 낮은 용량을 허용할 수 있으며, 이는 차례로 수의학적 방문을 감소시키고, 환자 순응도를 개선하고, 농도-의존적 세포독성/부작용을 낮춘다.
- [0009] 따라서, 반감기를 개선하기 위해 Fc 불변 영역에서 돌연변이를 식별할 필요성이 존재한다.

**발명의 내용**

- [0010] 본 발명은 야생형 개과 IgG에 비해 더 높은 FcRn 친화도를 제공하는 돌연변이 개과 IgG에 관한 것이다. 구체적으로, 본 출원의 발명자들은 하나 이상의 아미노산 잔기를 치환하는 것이 FcRn에 대한 친화도를 놀랍게 그리고 예상외로 향상시킨다는 것을 발견하였다.
- [0011] 한 측면에서, 본 발명은 야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 개과 IgG 불변 도메인을 포함하는 변형된 IgG를 제공하며, 여기서 상기 치환은 카바트에서와 같은 Eu 인덱스에 따라 넘버링된 아미노산 잔기 247, 252, 254, 256, 311, 312, 314, 431, 434, 또는 439에 있다.
- [0012] 일부 실시양태에서, 상기 불변 도메인은 P247V, L252Y, L252P, L252W, L252A, L252D, L252G, L252H, L252I, L252K, L252M, L252N, L252Q, L252S, L252T, L252V, L252F, L252R, A254F, A254G, A254H, A254N, A254Q, A254R, A254W, A254C, A254D, A254I, A254K, A254L, A254M, A254P, A254S, A254T, A254V, A254Y, T256H, T256I, T256K, T256L, T256Q, T256Y, T256A, T256C, T256D, T256F, T256G, T256M, T256N, T256P, T256R, T256S, T256V, T256W, T256E, Q311H, Q311R, Q311Y, Q311W, D312P, L314K, A431K, N434A, N434C, N434D, N434E, N434F, N434G, N434H, N434I, N434K, N434L, N434M, N434P, N434Q, N434R, N434S, N434T, N434V, N434W, N434Y 및 E439K 중 하나 이상의 치환을 포함한다.
- [0013] 또 다른 측면에서, 본 발명은 야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 개과 IgG 불변 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 제공하며, 여기서 상기 치환은 카바트에서와 같이 Eu 인덱스에 따라 넘버링된 아미노산 잔기 247, 252, 254, 256, 311, 312, 314, 431, 434, 또는 439에 있다.
- [0014] 또 다른 측면에서, 본 발명은 야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 개과 IgG 불변 도메인을 포함하는 항체를 제공하며, 여기서 상기 치환은 카바트에서와 같이 Eu 인덱스에 따라 넘버링된 아미노산 잔기 247, 252, 254, 256, 311, 312, 314, 431, 434, 또는 439에 있다.
- [0015] 추가적인 측면에서, 본 발명은 야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 개과 IgG 불변 도메인을 포함하는 항체를 갖는 벡터 또는 숙주 세포를 제공하는 것을 포함하고, 여기서 상기 하나 이상의 치환은 아미노산 잔기 247, 252, 254, 256, 311, 312, 314, 431, 434, 또는 439, 또는 이들의 조합에 있는, 항체 또는 분자의 생산 또는 제조 방법을 제공한다.
- [0016] 또 다른 측면에서, 본 발명은 야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 개과 IgG 불변 도메인을 포함하는 융합 분자를 제공하고, 여기서 상기 치환은 카바트에서와 같이 Eu 인덱스에 따라 넘버링된 아미노산 잔기 247, 252, 254, 256, 311, 312, 314, 431, 434, 또는 439에 있다.
- [0017] 또 다른 측면에서, 본 발명은 개에서 항체 혈청 반감기를 증가시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은, 야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 상기 개과 IgG 불변 도메인인, 개과 IgG 불변 도메인을 포함하는 치료적 유효량의 항체를 상기 개에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 치환은 카바트에서와 같이 EU 인덱스에 따라 넘버링된 아미노산 잔기 252, 254, 256, 311, 434, 또는 439에 있다. 하나의 예시적인 실시양태에서, 상기 개과 IgG 불변 도메인은 L252F, L252R, L252Y, L252M, A254T, A254S, T256E, Q311W, N434H, N434Y 및 E439K 중 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 다른 예시적인 실시양태에서, 상기 개과 IgG 불변 도메인은 (1) L252F; (2) L252R, N434H 및 Q311W; (3) L252R; (4) Q311W; (5) L252R, A254T, T256E 및 N434H; (6) L252Y 및 A254T; 또는 (7) L252M, A254S 및 E439K의 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이를 포함한다.
- [0018] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 다음의 상세한 설명 실시예 및 도면으로부터 명백해질 것이다. 그러나, 발명의 사상 및 범주 내에서 다양한 변경 및 변형이 이 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백할 것이기 때문에, 발명의

바람직한 실시양태를 나타내면서 상세한 설명 및 특정 실시예가 단지 예시의 방식으로 제공된 것으로 이해되어야 한다.

**도면의 간단한 설명**

[0019]

본 특허 또는 출원 파일은 컬러로 작성된 적어도 하나의 도면을 포함한다. 컬러 도면(들)이 있는 본 특허 또는 특허 출원 공개의 사본은 신청하고 필요한 수수료를 지불시 사무국에서 제공할 것이다.

도 1은 IgG의 도메인 구조를 예시한다.

도 2는 야생형(WT) 인간 IgG1, WT 개과 IgGA, WT 개과 IgGB, WT 개과 IgGC, 및 WT 개과 IgGD의 아미노산 서열의 정렬을 나타낸다. 상기 아미노산 잔기는 카바트에서와 같은 EU 인덱스에 따라 넘버링된다. 상기 CH1, 힌지, CH2 및 CH3 아미노산 잔기는 각각 적색, 보라색, 파란색 및 녹색이다.

도 3은 개과 Fc IgGB WT 뉴클레오티드 서열을 나타낸다.

도 4는 특정 개과 IgG 점 돌연변이가 개에서 반감기를 증가시킨다는 것을 보여준다. Mut1은 L252F를 지칭하고; Mut2는 돌연변이 L252R, N434H 및 Q311W의 조합을 지칭하고; Mut3은 L252R을 지칭하고; Mut4는 돌연변이 L252Y, N434Y 및 Q311W의 조합을 지칭하고; Mut5는 Q311W를 지칭하고; Mut6은 돌연변이 L252R, A254T, T256E 및 N434H의 조합을 지칭하고; Mut7은 돌연변이 L22Y 및 A254T의 조합을 지칭하고; Mut8은 돌연변이 L252M, A254S 및 E439K의 조합을 지칭한다.

**서열 목록에 대한 간략한 설명**

서열번호 1은 야생형 개과 IgGA 불변 영역의 아미노산 서열을 지칭한다.

서열번호 2는 야생형 개과 IgGB (65) 불변 영역의 아미노산 서열을 지칭한다.

서열번호 3은 야생형 개과 IgGC 불변 영역의 아미노산 서열을 지칭한다

서열번호 4는 야생형 개과 IgGD 불변 영역의 아미노산 서열을 지칭한다<

서열번호 5는 일 실시양태에 따른, 코돈 최적화된 야생형 개과 IgGB (65)의 핵산 서열을 지칭한다.

서열번호 6은 일 실시양태에 따른, 야생형 개과 IgGB (65) 불변 도메인의 핵산 서열을 지칭한다.

서열번호 7은 야생형 개과 IgGB CH1 도메인의 아미노산 서열을 지칭한다.

서열번호 8은 야생형 개과 IgGB 힌지 도메인의 아미노산 서열을 지칭한다.

서열번호 9는 야생형 개과 IgGB CH2 도메인의 아미노산 서열을 지칭한다.

서열번호 10은 야생형 개과 IgGB CH3 도메인의 아미노산 서열을 지칭한다.

서열번호 11은 야생형 개과 IgGB CH1 도메인의 핵산 서열을 지칭한다.

서열번호 12는 야생형 개과 IgGB 힌지 도메인의 핵산 서열을 지칭한다.

서열번호 13은 야생형 개과 IgGB CH2 도메인의 핵산 서열을 지칭한다.

서열번호 14는 야생형 개과 IgGB CH3 도메인의 핵산 서열을 지칭한다.

서열번호 15는 야생형 인간 IgG1 불변 영역의 아미노산 서열을 지칭한다.

서열번호 16은 야생형 개과 IgGA 불변 영역의 핵산 서열을 지칭한다.

서열번호 17은 야생형 개과 IgGC 불변 영역의 핵산 서열을 지칭한다.

서열번호 18은 야생형 개과 IgGD 불변 영역의 핵산 서열을 지칭한다.

서열번호 19는 야생형 인간 IgG1 불변 영역의 핵산 서열을 지칭한다.

서열번호 20은 본원에서 ZTS-8183으로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 중쇄 CDR1의 핵산 서열을 지칭한다.

서열번호 21은 본원에서 ZTS-8183으로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 중쇄 CDR1의 아미노산 서열을 지칭한다.

서열번호 22는 본원에서 ZTS-8183으로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 중쇄 CDR2의 핵산 서열을 지칭한다.

서열번호 23은 본원에서 ZTS-8183으로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 중쇄 CDR2의 아미노산 서열을 지칭한다.  
 서열번호 24는 본원에서 ZTS-8183으로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 중쇄 CDR3의 핵산 서열을 지칭한다.  
 서열번호 25는 본원에서 ZTS-8183으로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 중쇄 CDR3의 아미노산 서열을 지칭한다.  
 서열번호 26은 본원에서 ZTS-8183으로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄 CDR1의 핵산 서열을 지칭한다.  
 서열번호 27은 본원에서 ZTS-8183으로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄 CDR1의 아미노산 서열을 지칭한다.  
 서열번호 28은 본원에서 ZTS-8183으로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄 CDR2의 핵산 서열을 지칭한다.  
 서열번호 29는 본원에서 ZTS-8183으로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄 CDR2의 아미노산 서열을 지칭한다.  
 서열번호 30은 본원에서 ZTS-8183으로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄 CDR3의 핵산 서열을 지칭한다.  
 서열번호 31은 본원에서 ZTS-8183으로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄 CDR3의 아미노산 서열을 지칭한다.  
 서열번호 32는 본원에서 ZTS-8183으로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄의 핵산 서열을 지칭한다.  
 서열번호 33은 본원에서 ZTS-8183으로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄의 아미노산 서열을 지칭한다.  
 서열번호 34는 본원에서 ZTS-8183으로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 중쇄의 핵산 서열을 지칭한다.  
 서열번호 35는 본원에서 ZTS-8183으로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 중쇄의 아미노산 서열을 지칭한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0020] 본 대상물은 본 개시내용의 일부를 형성하는 다음의 상세한 설명을 참조함에 의해 더 쉽게 이해될 수 있다. 본 발명은 본원에 기재 및/또는 도시된 특정 생성물, 방법, 조건 또는 매개변수로 제한되지 않고, 본원에 사용된 용어는 단지 예로서 특정 실시양태를 설명하기 위한 목적적이고 청구된 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는 것을 이해되어야 한다.
- [0021] 본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본 출원과 관련하여 사용되는 과학 및 기술 용어는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 또한, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어는 복수를 포함하고 복수 용어는 단수를 포함할 것이다.
- [0022] 상기 및 개시내용 전반에 걸쳐 이용된 바와 같이, 다음 용어 및 약어는 달리 지시되지 않는 한, 다음 의미를 갖는 것으로 이해되어야 한다.
- [0023] 정의
- [0024] 본 개시내용에서, 단수 형태는 복수 참조를 포함하고, 특정 수치에 대한 언급은 문맥이 명백하게 달리 나타내지 않는 한 적어도 그 특정 값을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "분자" 또는 "화합물"에 대한 언급은 당업자에게 공지된 이러한 분자 또는 화합물 및 그의 등가물 중 하나 이상에 대한 언급 등이다. 본원에서 사용된 용어 "복수"는 하나 이상을 의미한다. 값들의 범위가 표현될 때, 다른 실시양태는 하나의 특정 값으로부터 및/또는 다른 특정 값까지를 포함한다. 유사하게, 값이 근사치로서 표현될 때, 선행사 "약"을 사용함으로써, 특정 값이 다른 실시양태를 형성하는 것으로 이해된다. 모든 범위는 포괄적이고 결합가능하다.
- [0025] 명세서 및 청구범위에서, 면역글로불린 중쇄에서 아미노산 잔기의 넘버링은 카바트 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)에서와 같은 EU 인덱스의 것이다. "카바트에서와 같은 EU 인덱스"는 IgG 항체의 잔기 넘버링을 지칭하고 본원에서 도 2에 반영된다.
- [0026] 핵산과 관련하여 사용될 때 용어 "단리된"은 그 천연 공급원에서 통상적으로 연관된 적어도 하나의 오염 핵산으로부터 식별 및 분리된 핵산이다. 단리된 핵산은 자연에서 발견되는 것과 다른 형태 또는 환경에 있다. 따라서 단리된 핵산 분자는 천연 세포에 존재할 때의 핵산 분자와 구별된다. 단리된 핵산 분자는, 예를 들어, 핵산 분자가 천연 세포의 것과 상이한 플라스미드 또는 염색체 위치에 있는 경우 통상적으로 그 안에 코딩된 폴리펩티드를 발현하는 세포에 함유된 핵산 분자를 포함한다. 단리된 핵산은 단일-가닥 또는 이중-가닥 형태로 존재할 수 있다. 단리된 핵산 분자가 단백질을 발현하기 위해 이용되어야 할 때, 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드는 최소한 센스 또는 코딩 가닥을 함유할 것이지만, 센스 및 안티-센스 가닥 둘 모두를 함유할 수 있다 (즉, 이중-가닥일 수 있음).

- [0027] 핵산 분자는 다른 핵산 분자와 기능적 관계에 놓일 때, "작동가능하게 연결"되거나 "작동가능하게 부착"된다. 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 미치는 경우 핵산의 코딩 서열에 작동가능하게 연결되고; 또는 리보솜 결합 부위가 번역을 용이하게 하도록 위치된다면 그것은 핵산의 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 변이체 Fc 영역을 코딩하는 핵산 분자는 발현된 용합 단백질이 변이체 Fc 영역 폴리펩티드에 상류 또는 하류에 인접한 이중 단백질 또는 이의 기능적 단편을 포함하고; 이중 단백질은 변이체 Fc 영역 폴리펩티드에 바로 인접할 수 있거나 임의의 길이 및 조성의 링커 서열에 의해 이로부터 분리될 수 있도록 위치된다면 이중 단백질(즉, 자연에 존재하므로 Fc 영역을 포함하지 않는 단백질 또는 이의 기능적 단편)을 코딩하는 핵산 분자에 작동가능하게 연결된다. 유사하게, 폴리펩티드(본원에서 "단백질"과 동의어로 사용됨) 분자는 다른 폴리펩티드와 기능적 관계에 놓일 때 "작동가능하게 연결"되거나 "작동가능하게 부착"된다.
- [0028] 폴리펩티드 또는 단백질(예를 들어, 변이체 Fc 영역, 또는 모노클로날 항체)과 관련하여 본원에서 사용된 용어 "기능적 단편"은 전장 폴리펩티드의 적어도 하나의 기능을 보유하는 그 단백질의 단편을 지칭한다. 단편은 6개 아미노산에서 전장 폴리펩티드의 전체 아미노산 서열에서 1개 아미노산을 뺀 크기의 범위일 수 있다. 본 발명의 변이체 Fc 영역 폴리펩티드의 기능적 단편은 본원에서 정의된 바와 같은 적어도 하나의 "아미노산 치환"을 보유한다. 변이체 Fc 영역 폴리펩티드의 기능적 단편은 Fc 영역과 연관된 것으로 당업계에 공지된 적어도 하나의 기능을 보유한다(예를 들어, ADCC, CDC, Fc 수용체 결합, C1q 결합, 세포 표면 수용체의 하향 조절 또는 예를 들어, 작동가능하게 부착된 폴리펩티드의 생체내 또는 시험관내 반감기를 증가시킬 수 있다).
- [0029] 용어 "정제된" 또는 "정제하다"는 샘플에서 적어도 하나의 오염물질의 실질적인 제거를 지칭한다. 예를 들어, 항원-특이적 항체는 적어도 하나의 오염 비-면역글로불린 단백질의 완전한 또는 실질적인 제거(적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 또는 보다 바람직하게는 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%)에 의해 정제될 수 있다; 그것은 또한 동일한 항원에 결합하지 않는 면역글로불린 단백질의 제거에 의해 정제될 수 있다. 비-면역글로불린 단백질의 제거 및/또는 특정 항원에 결합하지 않는 면역글로불린의 제거는 샘플에서 항원-특이적 면역글로불린의 백분율에서 증가를 초래한다. 또 다른 예에서, 박테리아 숙주 세포에서 발현된 폴리펩티드(예를 들어, 면역글로불린)는 숙주 세포 단백질의 완전한 또는 실질적인 제거에 의해 정제되고; 이에 의해 샘플에서 폴리펩티드의 백분율이 증가된다.
- [0030] 폴리펩티드(예를 들어, Fc 영역)를 지칭할 때 용어 "천연"은 폴리펩티드가 자연에서 일반적으로 발생하는 폴리펩티드 또는 이의 자연적으로 발생하는 다형성의 아미노산 서열로 구성된 아미노산 서열을 갖는 것을 나타내기 위해 본원에서 사용된다. 천연 폴리펩티드(예를 들어, 천연 Fc 영역)는 재조합 수단에 의해 생성될 수 있거나 자연적으로 발생하는 공급원으로부터 단리될 수 있다.
- [0031] 본원에서 사용된 용어 "발현 벡터"는 특정 숙주 유기체에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 원하는 코딩 서열 및 적절한 핵산 서열을 함유하는 재조합 DNA 분자를 지칭한다.
- [0032] 본원에서 사용된 용어 "숙주 세포"는, 시험관내 또는 제자리, 또는 생체내에 위치되는 간에 임의의 진핵 또는 원핵 세포(예를 들어, 박테리아 세포 예컨대 대장균, CHO 세포, 효모 세포, 포유동물 세포, 조류 세포, 양서류 세포, 식물 세포, 어류 세포 및 곤충 세포)를 지칭한다.
- [0033] 본원에서 사용된 용어 "Fc 영역"은 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 지칭한다. "Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역 또는 변이체 Fc 영역일 수 있다. 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 일반적으로 허용되는 경계는 다양할 수 있지만, 개과 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로, 예를 들어, 위치 231의 아미노산 잔기로부터 그의 카르복실-말단까지 신장되는 것으로 정의된다. 일부 실시양태에서, 변이체는 Fc 영역의 일부만을 포함하고 카르복시-말단을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 면역글로불린의 Fc 영역은 일반적으로 2개의 불변 도메인, CH2 및 CH3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 불변 도메인 중 하나 이상을 갖는 변이체가 고려된다. 다른 실시양태에서, 이러한 불변 도메인이 없는(또는 이러한 불변 도메인의 일부만 있는) 변이체가 고려된다.
- [0034] 개과 IgG Fc 영역의 "CH2 도메인"은 일반적으로, 예를 들어, 약 아미노산 231 내지 약 아미노산 340으로 연장된다(도2 참조). CH2 도메인은 다른 도메인과 밀접하게 쌍을 이루지 않는다는 점에서 고유하다. 2개의 N-연결된 분지형 탄수화물 사슬은 온전한 천연 IgG 분자의 2개의 CH2 도메인 사이에 개재된다.
- [0035] 개과 IgG Fc 영역의 "CH3 도메인"은 일반적으로, 예를 들어 약 아미노산 잔기 341 내지 약 아미노산 잔기 447에 이르는 Fc 영역 내의 CH2 도메인에 대한 잔기 C-말단의 신장이다(도2 참조).
- [0036] "기능적 Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역의 "이펙터 기능"을 보유한다. 본 발명의 변이체 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드의 적어도 하나의 이펙터 기능은 천연 Fc 영역 또는 변이체의 모 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드와 관

련하여 증진되거나 감소될 수 있다. 이펙터 기능의 예는 다음을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다: C1q 결합; 보체 의존성 세포독성(CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식균 작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체; BCR) 의 하향 조절 등 이러한 이펙터 기능은 Fc 영역이 결합 도메인(예를 들어, 항체 가변 도메인)에 작동가능하게 연결되는 것을 요구할 수 있고 다양한 검정(예를 들어, Fc 결합 검정, ADCC 검정, CDC 검정, 전체 또는 분획화된 혈액 샘플로부터의 표적 세포 고갈 등)을 사용하여 평가될 수 있다.

[0037] "천연 서열 Fc 영역" 또는 "야생형 Fc 영역"은 자연에서 일반적으로 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 지칭한다. 예시적인 천연 서열 개과 Fc 영역이 도 2에 도시되어 있으며, 개과 IgG Fc 영역의 천연 서열을 포함한다.

[0038] "변이체 Fc 영역"은 본원에서 정의된 것과 같은 적어도 하나의 "아미노산 치환"으로 인해 천연 서열 Fc 영역(또는 이의 단편)의 것과 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 치환, 바람직하게는 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역에서 1, 2, 3, 4 또는 5 아미노산 치환을 갖는다. 대안적 실시양태에서, 변이체 Fc 영역은 본원에서 개시된 방법에 따라 생성될 수 있고 이 변이체 Fc 영역은 항체 가변 도메인 또는 비항체 폴리펩티드, 예를 들어, 수용체 또는 리간드의 결합 도메인과 같은 선택된 이종 폴리펩티드에 융합될 수 있다.

[0039] 본원에서 사용된 바와 같이, 폴리펩티드의 맥락에서 용어 "유도체"는 아미노산 잔기 치환의 도입에 의해 변경된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 본원에서 사용된 용어 "유도체"는 또한 임의의 유형의 분자의 폴리펩티드에 대한 공유 부착에 의해 변형된 폴리펩티드를 지칭한다. 예를 들어, 비제한적으로, 항체는 예를 들어 글리코실화, 아세틸화, 폐길화, 인산화, 아미드화, 공지된 보호/차단기에 의한 유도체화, 단백질분해 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질에 대한 연결 등에 의해 변형될 수 있다. 유도체 폴리펩티드는 특정 화학적 절단, 아세틸화, 포르밀화, 투니카마이신의 대사적 합성 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 당업자에게 공지된 기술을 사용하여 화학적 변형에 의해 생성될 수 있다. 더욱이, 유도체 폴리펩티드는 그것이 유래된 폴리펩티드와 유사하거나 동일한 기능을 보유한다. 본 발명의 변이체 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드는 본원에 정의된 유도체일 수 있으며, 바람직하게는 유도체화가 Fc 영역 내에서 일어나는 것으로 이해된다.

[0040] 폴리펩티드(예를 들어, Fc 영역 또는 모노클로날 항체)와 관련하여 본원에 사용된 "실질적으로 개과 유래"는 폴리펩티드가 천연 개과 아미노 폴리펩티드의 것과 적어도 80%, 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 또는 보다 더 바람직하게는 적어도 95%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 상동성인 아미노산 서열을 갖는다는 것을 나타낸다. 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 Fc 영역(예를 들어, 항체의 Fc 영역)에 결합하는 수용체를 기술하기 위해 사용된다. 바람직한 FcR은 천연 서열 FcR이다. 더욱이, 바람직한 FcR은 IgG 항체(감마 수용체)에 결합하는 것이고, 이들 수용체의 대립형질 변이체 및 대안적으로 스포라이싱된 형태를 포함하는 Fc 감마 RI, Fc 감마 RII, Fc 감마 RIII 서브클래스의 수용체를 포함한다. 또 다른 바람직한 FcR은 태아로의 모체 IgG의 전달을 담당하는 신생아 수용체인 FcRn을 포함한다(Guyer 등, J. Immunol. 117:587(1976) 및 Kim 등, J. Immunol. 24: 249(1994)). 미래에 확인될 것을 포함한, 다른 FcR이 본원에서 용어 "FcR"에 포괄된다.

[0041] 어구 "항체-의존적 세포-매개 세포독성" 및 "ADCC"는 FcR(예를 들어, 자연 살해("NK") 세포, 호중구 및 대식세포)을 발현하는 비특이적 세포독성 세포(예를 들어, 비특이적)가 표적 세포에 결합된 항체를 인식하고 후속적으로 표적 세포의 용리를 야기하는 세포-매개된 반응을 지칭한다. ADCC를 매개하기 위한 일차 세포인 NK 세포는, Fc 감마 RIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc 감마 RI, Fc 감마 RII 및 Fc 감마 RIII를 발현한다.

[0042] 본원에 사용된 문구 "이펙터 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구(바람직하게는 개과)를 지칭한다. 바람직하게는, 세포는 적어도 Fc 감마 RIII를 발현하고 ADCC 이펙터 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 백혈구의 예는 PBMC, NK 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구를 포함한다. 이펙터 세포는 천연 공급원으로부터 (예를 들어, 혈액 또는 PBMC로부터) 분리될 수 있다.

[0043] "변경된" FcRn 결합 친화도를 갖는 변이체 폴리펩티드는 변이체의 모 폴리펩티드 또는 pH 6.0에서 측정시 천연 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드에 비하여 증강되거나 (즉, 증가되거나, 더 크거나 더 높은) 또는 약화된(즉, 감소된, 줄은 또는 더 작은) FcRn 결합 친화도를 갖는 것이다. FcRn에 대한 증가된 결합 또는 증가된 결합 친화도를 나타내는 변이체 폴리펩티드는 모 폴리펩티드보다 더 큰 친화도로 FcRn에 결합한다. FcRn에 대한 감소된 결합 또는 감소된 결합 친화도를 나타내는 변이체 폴리펩티드는 그의 모 폴리펩티드보다 낮은 친화도로 FcRn에 결합한다. FcRn에 대한 감소된 결합을 나타내는 이러한 변이체는 FcRn에 대한 적은 또는 전혀 인식할 수 없는 결합, 예를 들어 모 폴리펩티드와 비교하여 FcRn에 대한 0-20% 결합을 보유할 수 있다. 그것의 모 폴리펩티드에

비하여 "증강된 친화성"으로 FcRn에 결합하는 변이체 폴리펩티드는 결합 검정에서 변이체 폴리펩티드와 모 폴리펩티드의 양이 본질적으로 동일하고, 다른 모든 조건이 동일한 경우 모 폴리펩티드보다 더 높은 결합 친화도로 FcRn에 결합하는 것이다. 예를 들어, 증강된 FcRn 결합 친화도를 갖는 변이체 폴리펩티드는, 예를 들어, ELISA 검정 또는 당업자가 이용할 수 있는 다른 방법에서 FcRn 결합 친화도가 결정되는, 모 폴리펩티드에 비하여 FcRn 결합 친화도에서 약 1.10배 내지 약 100배(더 전형적으로는 약 1.2배 내지 약 50배) 증가를 나타낼 수 있다.

[0044] 본원에 사용된 "아미노산 치환"은 주어진 아미노산 서열에서 적어도 하나의 기존 아미노산 잔기를 또 다른 상이한 "대체" 아미노산 잔기로의 대체를 지칭한다. 대체 잔기 또는 잔기들은 "자연적으로 발생하는 아미노산 잔기"(즉, 유전자 코드에 의해 코딩됨)일 수 있고 알라닌(Ala); 아르기닌(Arg); 아스파라긴(Asn); 아스파르트산(Asp); 시스테인(Cys); 글루타민(Gln); 글루탐산(Glu); 글리신(Gly); 히스티딘(His); 이소류신(Ile); 류신(Leu); 라이신(Lys); 메티오닌(Met); 페닐알라닌(Phe); 프롤린(Pro); 세린(Ser); 트레오닌(Thr); 트립토판(Trp); 티로신(Tyr); 및 발린(Val)으로부터 선택된다. 하나 이상의 비-자연적으로 발생하는 아미노산 잔기로의 치환은 또한 본원에서 아미노산 치환의 정의에 의해 포괄된다. "비-자연적으로 발생하는 아미노산 잔기"는 폴리펩티드 사슬에서 인접한 아미노산 잔기(들)에 공유적으로 결합할 수 있는, 상기 열거된 이들 자연적으로 발생하는 아미노산 잔기 이외의 잔기를 지칭한다. 비-자연적으로 발생하는 아미노산 잔기의 예는 노르류신, 오르니틴, 노르발린, 호모세린 및 예컨대 Ellman 등 Meth. Enzym. 202: 301-336 (1991)에 기술된 기타 아미노산 잔기 유사체것들을 포함한다.

[0045] 용어 "검정 신호"는 비색 검정, 형광 강도 또는 분당 봉해로부터의 흡광도 측정을 포함하나 이에 제한되지 않는 단백질-단백질 상호작용을 검출하는 임의의 방법으로부터의 출력을 지칭한다. 검정 형식에는 ELISA, facts 또는 기타 방법이 포함될 수 있다. "검정 신호"에서 변화는 세포 생존율에서 변화 및/또는 운동적 오프-비율, 운동적 온-비율 또는 둘 모두의 변화를 반영할 수 있다. "더 높은 검정 신호"는 측정된 출력 숫자가 다른 숫자보다 큰 것을 지칭한다(예를 들어, 변이체는 모 폴리펩티드와 비교하여 ELISA 검정에서 더 높은(더 큰) 측정된 숫자를 가질 수 있음). "더 낮은" 검정 신호는 측정된 출력 숫자가 다른 숫자보다 작은 것을 지칭한다(예를 들어, 변이체는 모 폴리펩티드와 비교하여 ELISA 검정에서 더 낮은(더 작은) 측정된 숫자를 가질 수 있음).

[0046] 용어 "결합 친화도"는 각각의 Fc 수용체-Fc 결합 상호작용과 연관된 평형 해리 상수(농도의 단위로 표현됨)를 지칭한다. 결합 친화도는 운동적 온-비율(일반적으로 단위 시간당 농도의 단위로 보고됨, 예를 들어, 몰/초)에 의해 나누어진 운동적 오프-비율(일반적으로 역 시간의 단위로 보고됨, 예를 들어, 초<sup>-1</sup>)의 비에 직접적으로 관련된다. 일반적으로 평형 해리 상수에서 변화가 온-비율, 오프-비율 또는 둘 모두에서의 차이로 기인한 것인지 여부는 이들 매개변수 각각이 실험적으로(예를 들어, BIACORE 또는 SAPIDYNE 측정에 의해) 결정되지 않는 한 명확하게 기술하는 것이 가능하지 않다.

[0047] 본원에 사용된 용어 "힌지 영역"은 개과 IgG 스트레칭에서 아미노산의 스트레치, 예를 들어 개과 IgG의 위치 216으로부터 위치 230까지를 지칭한다. 다른 IgG 이소타입의 힌지 영역은 중쇄-간 이황화(S-S) 결합을 형성하는 시스테인 잔기를 동일한 위치에 배치함에 의해 IgG 서열과 정렬될 수 있다.

[0048] "C1q"는 면역글로불린의 Fc 영역에 대한 결합 부위를 포함하는 폴리펩티드다. C1q는 2개의 세린 프로테아제인 C1r 및 C1s와 함께 CDC 경로의 제1 성분인 복합체 C1을 형성한다.

[0049] 본원에서 사용된 것과 같이, 용어 "항체"는 "면역글로불린" 또는 "Ig"와 상호교환적으로 사용되고, 가장 넓은 의미로 사용되며 구체적으로 모노클로날 항체(전장 모노클로날 항체 포함), 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체) 및 원하는 생물학적 활성 또는 기능적 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함한다. 단쇄 항체, 및 키메라, 개과 또는 개과화 항체, 및 상이한 종으로부터 유래된 부분을 포함하는 키메라 또는 CDR-이식된 단쇄 항체 등도 또한 본 발명 및 용어 "항체"에 포함된다. 이들 항체의 다양한 부분은 통상적인 기술에 의해 화학적으로, 합성적으로 함께 연결될 수 있거나, 유전 공학 기술을 사용하여 인접 단백질로서 제조될 수 있다. 예를 들어, 키메라 또는 개과화 사슬을 코딩하는 핵산은 인접 단백질을 생산하기 위해 발현될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호; 미국 특허 제4,816,397호; WO 86/01533호; 미국 특허 번호 제5,225,539호; 및 미국 특허 번호 제5,585,089호 및 제5,698,762호를 참조한다. 또한, 영장류화된 항체에 관하여 Newman, R. 등 BioTechnology, 10:1455-1460, 1993, 및 단일 사슬 항체에 관하여 Ladner 등의 미국 특허 번호 제4,946,778호 및 Bird, R. E. 등, Science, 242:423-426, 1988를 참조한다. Fc 영역(또는 이의 일부)을 포함하는 항체의 모든 형태는 본원에서 "항체"라는 용어 내에 포괄되는 것으로 이해된다. 더욱이, 항체는 당업계에 공지된 방법에 따라 검출가능한 표지로 표지될 수 있고, 고체 상에 고정되고/되거나 이중 화합물(예를 들어, 효소 또는 독소)과 접합될 수 있다.

- [0050] 본원에 사용된 것과 같이, 용어 "항체 단편"은 온전한 항체의 일부를 지칭한다. 항체 단편의 예는 선형 항체; 단일-사슬 항체 분자; Fc 또는 Fc' 펩타이드; Fab 및 Fab 단편, 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 항체 단편은 바람직하게는 힌지의 적어도 일부 및 선택적으로 IgG 중쇄의 CH1 영역을 보유한다. 다른 바람직한 실시양태에서, 항체 단편은 CH2 영역의 적어도 일부 또는 전체 CH2 영역을 포함한다.
- [0051] 본원에 사용된 용어 "기능적 단편"은 모노클로날 항체와 관련하여 사용될 때 여전히 기능적 활성을 유지하는 모노클로날 항체의 일부를 지칭하도록 의도된다. 기능적 활성은, 예를 들어, 항원 결합 활성 또는 특이성, 수용체 결합 활성 또는 특이성, 이펙터 기능 활성 등일 수 있다. 모노클로날 항체 기능적 단편은, 예를 들어, VL, VH 및 Fd와 같은 개별 중쇄 또는 경쇄 및 이의 단편; Fv, Fab 및 Fab'와 같은 1가 단편; F(ab')<sub>2</sub>와 같은 2가 단편; 단일 사슬 Fv(scFv); 및 Fc 단편을 포함한다. 이러한 용어는, 예를 들어, Harlowe와 Lane의 문헌 Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference(Myers, R. A. (ed.), New York: VCH Publisher, Inc.); Enzymol., Huston 등, Cell Biophysics, 22:189-224 (1993); Pluckthun and Skerra, Meth. Enzymol., 178:497-515 (1989) 및 Day, E. D., Advanced Immunochemistry, Second Ed., Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y. (1990)에 기술되어 있다. 용어 기능적 단편은, 예를 들어, 프로테아제 단리 또는 모노클로날 항체의 환원에 의해 및 당업자에게 공지된 재조합 DNA 방법에 의해 생성된 단편을 포함하는 것으로 의도된다.
- [0052] 본원에 사용된 용어 "단편"은 다른 폴리펩티드의 아미노산 서열의 적어도 5, 15, 20, 25, 40, 50, 70, 90, 100 이상의 연속 아미노산 잔기의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 바람직한 실시양태에서, 폴리펩티드의 단편은 전장 폴리펩티드의 적어도 하나의 기능을 보유한다.
- [0053] 본원에 사용된 용어 "키메라 항체"는 1가, 2가 또는 다가 면역글로불린을 포함한다. 1가 키메라 항체는 키메라 경쇄와 이황화 다리를 통해 연관된 키메라 중쇄에 의해 형성된 이량체이다. 2가 키메라 항체는 적어도 하나의 이황화 다리를 통해 연관된 2개 중쇄-경쇄 이량체에 의해 형성된 사량체이다. 개과에서 사용하기 위한 항체의 키메라 중쇄는 CH1 또는 CH2와 같은 개과 중쇄 불변 영역의 적어도 일부에 연결된 비-개과 항체의 중쇄로부터 유래된 항원-결합 영역을 포함한다. 개과에 사용하기 위한 항체의 키메라 경쇄는 개과 경쇄 불변 영역(CL)의 적어도 일부에 연결된 비-개과 항체의 경쇄로부터 유래된 항원 결합 영역을 포함한다. 동일하거나 상이한 가변 영역 결합 특이성의 키메라 중쇄 및 경쇄를 갖는 항체, 단편 또는 유도체는 또한 공지된 방법 단계에 따라 개별 폴리펩티드 사슬의 적절한 회합에 의해 제조될 수 있다. 이 접근법으로, 키메라 중쇄를 발현하는 숙주를 키메라 경쇄를 발현하는 숙주와 별도로 배양하고 면역글로불린 사슬을 별도로 회수한 다음 회합시킨다. 대안적으로, 숙주는 공동-배양될 수 있고 사슬이 배양 배지에서 자발적으로 회합되도록 허용된 후 어셈블링된 면역글로불린 또는 단편 또는 둘 모두의 회수에 의해 중쇄 및 경쇄가 동일한 숙주 세포에서 발현될 수 있다. 키메라 항체를 생산하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, 미국 특허 제6,284,471호; 제5,807,715호; 제4,816,567호; 및 4,816,397를 참조한다).
- [0054] 본원에서 사용된 것과 같이, "개과화" 형태의 비-개과(예를 들어, 무린) 항체(즉, 개과화 항체)는 비-개과 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하거나 서열이 없는 항체이다. 대부분의 경우 개과화 항체는 수용체의 추가변 영역으로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화성 및 능력을 갖는 마우스, 랫트, 토끼, 인간 또는 비인간 영장류와 같은 비-개과 종의 추가변 영역(공여자 항체)으로부터의 잔기로 대체된 개과 면역글로불린(수용체 항체)이다. 일부 경우에, 개과 면역글로불린의 프레임워크 영역(FR) 잔기는 상응하는 비-개과 잔기로 대체된다. 더욱이, 개과화 항체는 수용체 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 일반적으로 항체 성능을 추가로 개선하기 위해 이루어진다. 일반적으로, 개과화 항체는 적어도 하나, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 추가변 루프(CDR)는 비-개과 면역글로불린의 것에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR 잔기는 개과 면역글로불린 서열의 것이다. 개과화 항체는 또한 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 개과 면역글로불린의 것을 포함할 수 있다.
- [0055] 본원에 사용된 용어 "면역부착소"는 이중 "부착소" 단백질(예를 들어, 수용체, 리간드 또는 효소)의 결합 도메인을 면역글로불린 불변 도메인과 조합시키는 항체-유사 분자를 지칭한다. 구조적으로, 면역부착소는 면역글로불린 불변 도메인 서열을 갖는 항체(즉, "이중"임)의 항원 인식 및 결합 부위(항원 조합 부위) 이외의 원하는 결합 특이성을 갖는 부착소 아미노산 서열의 융합을 포함한다.
- [0056] 본원에 사용된 용어 "리간드 결합 도메인"은 상응하는 천연 수용체의 적어도 정성적 리간드 결합 능력을 보유하

는 임의의 천연 수용체 또는 임의의 영역 또는 이의 유도체를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 수용체는 면역글로불린 슈퍼유전자과의 구성원에 상동인 세포의 도메인을 갖는 세포-표면 폴리펩티드로부터의 것이다. 면역글로불린 슈퍼유전자과의 구성원은 아니지만 그럼에도 불구하고 이 정의에 의해 구체적으로 포괄되는 다른 수용체는 사이토카인에 대한 수용체, 특히 티로신 키나제 활성을 갖는 수용체(수용체 티로신 키나제), 조혈모세포 및 신경 성장 인자 수용체 슈퍼패밀리의 구성원, 및 세포 부착 분자(예를 들어, E-, L- 및 P-셀렉틴)이다.

[0057] 본원에 사용된 용어 "수용체 결합 도메인"은, 예를 들어, 세포 부착 분자, 또는 상응하는 천연 리간드의 적어도 실질적 수용체 결합 능력을 보유하는 이러한 천연 리간드의 임의의 영역 또는 유도체를 포함하는 수용체에 대한 임의의 천연 리간드를 지칭한다.

[0058] 본원에 사용된 "단리된" 폴리펩티드는 그의 자연 환경의 성분으로부터 식별 및 분리 및/또는 회수된 것이다. 그 자연 환경의 오염 성분은 폴리펩티드에 대한 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고 효소, 호르몬 및 기타 단백질성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 단리된 폴리펩티드는 (1) Lowry 방법에 의해 결정된 폴리펩티드의 95중량% 초과, 바람직하게는 99중량% 초과, (2) 스피닝 컵 시퀀네이터의 사용에 의한 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15 잔기를 수득하기에 충분한 정도, 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 은 염색을 사용한 환원 또는 비환원 조건 하에서 SDS-page에 의한 균질성으로 정제된다. 단리된 폴리펩티드는 폴리펩티드의 자연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에 재조합 세포 내의 제자리에서 폴리펩티드를 포함한다. 그러나, 통상적으로 단리된 폴리펩티드는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0059] 본원에 사용된 용어 "장애" 및 "질환"은 만성 및 급성 장애 또는 질환(예를 들어, 환자가 특정 장애에 걸리기 쉬운 병리학적 상태)을 포함하는 변이체 폴리펩티드(발명의 변이체 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드)로의 치료로부터 이익을 얻을 수 있는 임의의 상태를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다.

[0060] 본원에 사용된 용어 "수용체"는 적어도 하나의 리간드에 결합할 수 있는 폴리펩티드를 지칭한다. 바람직한 수용체는 세포의 리간드-결합 도메인 및 선택적으로 다른 도메인(예를 들어, 막횡단 도메인, 세포내 도메인 및/또는 막 앵커)을 갖는 세포-표면 또는 가용성 수용체이다. 본원에 기재된 검정에서 평가될 수용체는 온전한 수용체 또는 이의 단편 또는 유도체(예를 들어, 하나 이상의 이중 폴리펩티드에 융합된 수용체의 결합 도메인을 포함하는 융합 단백질)일 수 있다. 더욱이, 그의 결합 특성에 대해 평가될 수용체는 세포에 존재하거나 단리되고 선택적으로 검정 플레이트 또는 일부 다른 고체 상에 코팅되거나 직접 표지되고 프로브로 사용될 수 있다.

[0061] 개과 야생형 IgG

[0062] 개과 IgG는 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어 Bergeron 등, 2014, *Vet Immunol Immunopathol.*, vol.157 (1-2), 31-41면에 자세히 기술되어 있다. 일 실시양태에서, 개과 IgG는 gG<sub>A</sub>이다. 또 다른 실시양태에서, 개과 IgG는 IgG<sub>B</sub>이다. 또 다른 실시양태에서, 개과 IgG는 IgG<sub>C</sub>이다. 추가 실시양태에서, 개과 IgG는 IgG<sub>D</sub>이다. 특정 실시양태에서, 개과 IgG는 IgG<sub>B</sub>이다.

[0063] IgG<sub>A</sub>, IgG<sub>B</sub>, IgG<sub>C</sub>, 및 IgG<sub>D</sub>의 아미노산 및 핵산 서열은 또한 당업계에 잘 알려져 있다.

[0064] 일 예에서, 발명의 IgG는 불변 도메인, 예를 들어 CH1, CH2, 또는 CH3 도메인, 또는 이의 조합을 포함한다. 또 다른 예에서, 발명의 불변 도메인은, 예를 들어 CH2 또는 CH3 도메인 또는 이의 조합을 포함하는 Fc 영역을 포함한다.

[0065] 특정 예에서, 야생형 불변 도메인은 서열번호 1, 2, 3, or 4에 있다. 일부 실시양태에서, 야생형 IgG 불변 도메인은 서열번호 1,2,3 또는 4의 동족체, 변이체, 이성질체 또는 기능적 단편이지만 본원에 기재된 임의의 돌연변이는 없다. 각각의 가능성은 본 발명의 별개의 실시양태를 나타낸다.

[0066] IgGs 불변 도메인은 또한 중쇄 및/또는 경쇄의 아미노산 서열과 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 실질적으로 동일한 아미노산 서열은 본원에서 Pearson 및 Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448 (1988)에 따른 FASTA 검색 방법에 의해 결정된 바와 같이, 비교된 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일성을 갖는 서열로서 정의된다.

[0067] 본 발명은 또한 본원에 기재된 IgG 또는 이의 일부를 코딩하는 핵산 분자를 포함한다. 일 실시양태에서, 핵산은 예를 들어 CH1, CH2, CH3 영역, 또는 이의 조합을 포함하는 항체 중쇄를 코딩할 수 있다. 다른 실시양태에서, 핵산은, 예를 들어, VH 영역 중 임의의 하나 또는 이의 일부, 또는 이의 임의의 변이체를 포함하는 VH CDR 중 임의의 하나를 포함하는 항체 중쇄를 코딩할 수 있다. 발명은 또한, 예를 들어, CL 영역 중 임의의 하나 또는

이의 일부, VL 영역 중 임의의 하나 또는 이의 일부 또는 이의 임의의 변이체를 포함하는 VL CDR 중 임의의 하나를 포함하는 항체 경쇄를 코딩하는 핵산 분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 핵산은 중쇄 및 경쇄 둘 모두, 또는 이의 일부를 코딩한다.

[0068] 서열 번호 1,2,3 또는 4의 야생형 불변 도메인의 아미노산 서열은 그의 상응하는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 예를 들어, 서열 번호 2의 야생형 불변 도메인의 아미노산 서열은 서열 번호 5 또는 6의 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 양태에서, 서열 번호1, 2, 3 또는 4의 야생형 불변 도메인의 아미노산 서열은 각각 서열 번호 16, 5, 17 또는 18에 기재된 핵산 서열에 의해 암호화된다.

[0069] 변형된 개과 IgG

[0070] 본 출원의 발명자들은 하나 이상의 아미노산 잔기를 치환하는 것이 FcRn에 대한 친화도를 놀랍게 그리고 예상외로 향상시킨다는 것을 발견하였다. 본원에서 사용된 바와 같은 아미노산 위치 번호는 카바트 (Kabat 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1991))에서와 같은 Eu 인덱스에 따라 번호화된 위치를 지칭한다.

[0071] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명은 야생형 개과 IgG 불변 도메인에 대한 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 개과 IgG 불변 도메인을 포함하는 변형된 IgG를 제공하며, 여기서 상기 치환은 카바트에서와 같은 Eu 인덱스에 따라 넘버링된 아미노산 잔기 247, 252, 254, 256, 311, 312, 314, 431, 434, 또는 439이다.

[0072] 일부 실시양태에서, 불변 도메인은 P247V, L252Y, L252P, L252W, L252A, L252D, L252G, L252H, L252I, L252K, L252M, L252N, L252Q, L252S, L252T, L252V, L252F, L252R, A254F, A254G, A254H, A254N, A254Q, A254R, A254W, A254C, A254D, A254I, A254K, A254L, A254M, A254P, A254S, A254T, A254V, A254Y, T256H, T256I, T256K, T256L, T256Q, T256Y, T256A, T256C, T256D, T256F, T256G, T256M, T256N, T256P, T256R, T256S, T256V, T256W, T256E, Q311H, Q311R, Q311Y, Q311W, D312P, L314K, A431K, N434A, N434C, N434D, N434E, N434F, N434G, N434H, N434I, N434K, N434L, N434M, N434P, N434Q, N434R, N434S, N434T, N434V, N434W, N434Y 및 E439K 중 하나 이상의 치환을 포함한다.

[0073] 특정 예에서, 본 발명은 서열 번호 1,2,3 또는 4의 야생형 아미노산 서열에서 본원에 기재된 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 IgG 불변 도메인은 본원에 기재된 상동체, 변이체, 이성질체 또는 하나 이상의 돌연변이를 갖는 기능적 단편이다. 각각의 가능성은 본 발명의 별개의 실시양태를 나타낸다.

[0074] 돌연변이체 불변 도메인의 아미노산 서열은 그의 상응하는 돌연변이체 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0075] 본 발명의 항체 분자를 만드는 방법

[0076] 항체 분자를 만드는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며 미국 특허 번호 제8,394,925호; 제8,088,376호; 제8,546,543호; 제10,336,818호; 및 제9,803,023호 및 미국 특허 출원 공개 번호 20060067930를 참조하며, 이들은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다. 당업자에게 공지된 임의의 적합한 방법, 프로세스 또는 기술이 사용될 수 있다. 발명의 변이체 Fc 영역을 갖는 항체 분자는 당업계에 잘 알려진 방법에 따라 생성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 변이체 Fc 영역은 수용체 또는 리간드의 항체 가변 도메인 또는 결합 도메인과 같은 선택된 이중 폴리펩티드에 융합될 수 있다.

[0077] 분자 생물학 및 재조합 기술의 방법의 출현으로, 당업자는 재조합 수단에 의해 항체 및 항체-유사 분자를 생성할 수 있으며, 이에 의해 항체의 폴리펩티드 구조에서 발견되는 특정 아미노산 서열을 코딩하는 유전자 서열을 생성할 수 있다. 이러한 항체는 상기 항체의 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 유전자 서열을 클로닝하거나, 합성된 사슬의 어셈블리로 특정 에피토프 및 항원 결정기에 친화성을 갖는 활성 사랑체(H2L2) 구조를 형성하는 상기 폴리펩티드 사슬의 직접 합성에 의해 생성될 수 있다. 이것은 상이한 종 및 공급원으로부터 항체를 중화시키는 것을 특징으로 하는 서열을 갖는 항체의 용이한 생산을 가능하게 하였다.

[0078] 항체의 공급원, 또는 항체가 재조합적으로 구성되는 방식, 또는 시험관내 또는 생체내에서, 트랜스제닉 동물, 실험실 또는 상업적 크기의 큰 세포 배양물을 사용하거나, 트랜스제닉 식물을 사용하거나 또는 프로세스의 임의의 단계에서 살아있는 유기체를 이용하지 않는 직접적인 화학적 합성에 의해 합성되는 방식에 관계없이, 모든 항체는 유사한 전체 3차원 구조를 갖는다. 이 구조는 종종 H2L2로 주어지고 항체가 일반적으로 2개의 경쇄(L) 아미노산 사슬과 2개의 중쇄(H) 아미노산 사슬을 포함한다는 사실을 지칭한다. 두 사슬 모두 구조적으로 상보적인 항원 표적과 상호작용할 수 있는 영역을 가지고 있다. 표적과 상호작용하는 영역은 "가변" 또는 'V' 영역으로 지칭되고 상이한 항원 특이성의 항체와 아미노산 서열에서 차이를 특징으로 한다. H 또는 L 사슬의 가변 영

역은 항원 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 아미노산 서열을 함유한다.

- [0079] 본원에 사용된 용어 "항원 결합 영역"은 항원과 상호작용하고 항체에 항원에 대한 그 특이성 및 친화성을 부여하는 아미노산 잔기를 함유하는 항체 분자의 그 부분을 지칭한다. 항체 결합 영역은 항원-결합 잔기의 적절한 형태를 유지하는 데 필요한 "프레임워크" 아미노산 잔기를 포함한다. 항원 결합 영역을 제공하는 H 또는 L 사슬의 가변 영역 내에는, 상이한 특이성의 항체 사이에서 이의 극도의 가변성 때문에 "초가변성"이라고 불리는 더 작은 서열이 있다. 이러한 초가변성 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR" 영역으로도 지칭된다. 이들 CDR 영역은 특정 항원 결정기 구조에 대한 항체의 기본적 특이성을 설명한다.
- [0080] CDR은 가변 영역 내의 아미노산의 비-연속적인 스트레치를 나타내지만, 종에 관계없이 가변 중쇄 및 경쇄 영역 내의 이들 중요한 아미노산 서열의 위치적 위치는 가변 사슬의 아미노산 서열 내의 유사한 위치를 갖는 것으로 밝혀졌다. 모든 항체의 가변 중쇄 및 경쇄는 각각 3개의 CDR 영역을 가지며, 각각은 다른 영역과 비-인접성이다. 모든 포유동물 중에서, 항체 펩티드는 불변(즉, 고도로 보존된) 영역과 가변 영역을 함유하고, 후자 내에는 CDR과 CDR 외부가 아닌 중쇄 또는 경쇄의 가변 영역 내의 아미노산 서열로 구성된 소위 "프레임워크 영역"이 있다.
- [0081] 본 발명은 상기 기재된 핵산 중 적어도 하나를 포함하는 벡터를 추가로 제공한다. 유전자 코드는 퇴화성이기 때문에 특정 아미노산을 코딩하는 데 하나 초과와 코돈이 사용될 수 있다. 유전자 코드를 사용하여 하나 이상의 상이한 뉴클레오티드 서열이 식별될 수 있으며, 이들 각각은 아미노산을 코딩할 수 있다. 특정 올리고뉴클레오타이드가 실제로 실제 코딩 서열을 구성할 확률은 비정상적인 염기 페어링 상관관계와 특정 코돈이 항체 또는 일부를 발현하는 진핵 또는 원핵 세포에서 (특정 아미노산을 코딩하기 위해) 실제로 사용되는 빈도를 고려하여 추정될 수 있다. 이러한 "코돈 사용 규칙"은 Lathe, 등, 183 J. Molec. Biol. 1-12(1985)에 개시되어 있다. Lathe의 "코돈 사용 규칙"을 사용하여 개과 IgG 서열을 코딩할 수 있는 이론적인 "가장 가능성 있는" 뉴클레오티드 서열을 함유하는 단일 뉴클레오티드 서열 또는 뉴클레오티드 서열의 세트가 식별될 수 있다. 또한 본 발명에 사용하기 위한 항체 코딩 영역은 본원에 기재된 항체 및 펩티드의 변이체를 생성하는 표준 분자 생물학적 기술을 사용하여 기존 항체 유전자를 변경함에 의해 제공될 수 있다는 것이 또한 의도된다. 이러한 변이체는 항체 또는 펩티드의 아미노산 서열에서 결실, 첨가 및 치환을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0082] 예를 들어, 치환의 한 부류는 보존적 아미노산 치환이다. 이러한 치환은 개과 항체 펩티드에서의 주어진 아미노산을 유사한 특성의 다른 아미노산으로 치환하는 것이다. 전형적으로 보존적 치환으로 보이는 것은 지방족 아미노산 Ala, Val, Leu 및 Ile 중에서 서로에 대한 대체; 하이드록실 잔기 Ser 및 Thr의 상호교환, 산성 잔기 Asp 및 Glu의 교환, amid 잔기 Asn 및 Gin 간의 치환, 염기성 잔기 Lys 및 Arg의 교환, 방향족 잔기 Phe, Tyr 중에서 대체 등이다. 어떤 아미노산 변화가 표현형으로 침묵할 가능성이 있는지에 관한 지침은 Bowie 등, 247 Science 1306-10(1990)에서 찾을 수 있다.
- [0083] 변이체 개과 항체 또는 펩티드는 완전히 기능적일 수 있거나 하나 이상의 활성에서 기능을 결할 수 있다. 완전 기능적 변이체는 전형적으로 비임계 잔기 또는 비임계 영역에서 보존적 변이 또는 변이만을 함유한다. 기능적 변이체는 기능에 변화가 없거나 미미한 변화를 초래하는 유사한 아미노산의 치환을 함유할 수도 있다. 대안적으로, 이러한 치환은 어느 정도 기능에 긍정적 또는 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 비기능적 변이체는 전형적으로 하나 이상의 비보존적 아미노산 치환, 결실, 삽입, 역위 또는 절두 또는 임계 잔기 또는 임계 영역에 치환, 삽입, 역위 또는 결실을 포함한다.
- [0084] 기능에 필수적인 아미노산은 부위-지향된 돌연변이유발 또는 알라닌-스캐닝 돌연변이유발과 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 식별될 수 있다. Cunningham 등, 244 Science 1081-85 (1989). 후자의 절차는 분자의 모든 잔기에 단일 알라닌 돌연변이를 도입한다. 생성된 돌연변이 분자는 그 다음 에피토프 결합 또는 시험관내 ADCC 활성과 같은 생물학적 활성에 대해 시험된다. 리간드-수용체 결합에 중요한 부위는 결정학, 핵 자기 공명 또는 광친화성 표지와 같은 구조 분석에 의해 결정될 수도 있다. Smith 등, 224 J. Mol. Biol. 899-904 (1992); de Vos 등, 255 Science 306-12 (1992).
- [0085] 더욱이, 폴리펩티드는 종종 20개의 "자연적으로 발생하는" 아미노산 이외의 아미노산을 함유한다. 또한, 말단 아미노산을 비롯한 많은 아미노산은 프로세싱 및 다른 해독후 변형과 같은 천연 과정, 또는 본 기술분야에 잘 알려진 화학적 변형 기술에 의해 변형될 수 있다. 공지된 변형에는 아세틸화, 아실화, ADP-리보실화, amid화, 플라빈의 공유 부착, 헴 모이어티의 공유 부착, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체의 공유 부착, 지질 또는 지질 유도체의 공유 부착, 포스포티딜이노시톨의 공유 부착, 가교, 고리화, 이황화 결합 형성, 탈메틸화, 공유 가교의 형성, 시스틴의 형성, 피로글루타메이트의 형성, 포르밀화, 감마 카르복실화, 글리코실화, GPI 앵커

형성, 하이드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 단백질분해 처리, 인산화, 프레닐화, 라세미화, 셀레노일화, 황산화, 아르기닐화 및 유비퀴틴화와 같은 단백질에 대한 아미노산의 전달-RNA 매개된 첨가를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이러한 변형은 본 기술분야의 기술자에게 잘 알려져 있으며 과학 문헌에 매우 상세하게 설명되어 있다. 몇 가지 특히 일반적인 변형, 글리코실화, 지질 부착, 황산화, 글루탐산 잔기의 감마-카르복실화, 하이드록실화 및 ADP 리보실화는 예로써 *Proteins-Structure and Molecular Properties* (2nd ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman & Co., N.Y., 1993)와 같은 가장 기본적 텍스트에 기술되어 있다. 이 주제에 대한 많은 상세한 리뷰가, 예를 들어, *World, Posttranslational Covalent Modification of proteins*, 1-12 (Johnson, ed., Academic Press, N.Y., 1983); Seifter 등 182 *Meth Enzymol.* 626-46 (1990); 및 Rattan 등 663 *Ann. NY Acad. Sci.* 48-62 (1992)에서 확인 가능하다.

[0086] 다른 양태에서, 발명은 항체 유도체를 제공한다. 항체의 "유도체"는 일반적으로 단백질의 일부가 아닌 부가적인 화학적 모이어티를 함유한다. 단백질의 공유 변형이 본 발명의 범위 내에 포함된다. 이러한 변형은 항체의 표적화된 아미노산 잔기를 선택된 측쇄 또는 말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화 제제와 반응시킴에 의해 분자 내로 도입될 수 있다. 예를 들어, 당업계에 잘 알려진 이작용성 제제를 사용한 유도체화는 항체 또는 단편을 수-불용성 지지체 매트릭스 또는 다른 거대분자 담체에 가교결합하는 데 유용하다. 유도체는 또한 표지된 방사성으로 표지된 모노클로날 항체를 포함한다.

[0087] 예를 들어, 방사성 요오드(<sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I), 탄소(<sup>14</sup>C), 황(<sup>35</sup>S), 인듐, 삼중수소(<sup>3</sup>H) 등; 비오틴 또는 아비딘과 모노클로날 항체의 접합체, 양호추냉이 피옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 베타-D-갈락토시다제, 글루코옥시다제, 글루코아밀라제, 카르복실산 탈수효소, 아세틸콜린 에스테라제, 리소자임, 말산 탈수효소 또는 글루코스 6-인산 탈수효소와 같은 효소; 및 또한 생물발광제(예컨대 루시페라제), 화학발광제(예컨대 아크리딘 에스테르) 또는 형광제(예컨대 피코빌리단백질)와 모노클로날 항체의 접합체.

[0088] 발명의 또 다른 유도체 이작용성 항체는 2개의 상이한 항원성 기를 인식하는 2개의 별도 항체의 부분을 조합함에 의해 생성된 이중특이적 항체이다. 이것은 가교 또는 재조합 기술에 의해 달성될 수 있다. 추가로, 모이어티는 항체 또는 이의 일부에 첨가되어 생체내 반감기를 증가시킬 수 있다(예를 들어, 혈류로부터 제거되는 시간을 연장함에 의함. 이러한 기술은, 예를 들어 PEG 모이어티 추가(폐길화라고도 함)를 포함하고, 당업계에 잘 알려져 있다. 미국 특허 출원 공개 번호 제20030031671호를 참조한다.

[0089] 일부 실시양태에서, 대상 항체를 코딩하는 핵산은 숙주 세포 내로 직접적으로 도입되고, 세포는 코딩된 항체의 발현을 유도하기에 충분한 조건 하에 인큐베이션된다. 대상 핵산이 세포 내로 도입된 후, 세포는 통상적으로 항체의 발현을 허용하기 위해 약 1~24시간의 기간 동안 일반적으로 37°C에서, 때로는 선택하에 인큐베이션된다. 일 실시양태에서, 항체는 세포가 성장하는 배지의 상등액 안으로 분비된다. 전통적으로, 모노클로날 항체는 유리 하이브리도마 계통에서 천연 분자로 생산되었다. 그 기술에 더하여, 본 발명은 항체의 재조합 DNA 발현을 제공한다. 이것은 선택한 숙주 중에서 항체뿐만 아니라 일정 범위의 항체 유도체 및 융합 단백질의 생산을 허용한다.

[0090] 본 발명의 적어도 하나의 항체, 일부 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열은 결찰을 위한 평활-말단 또는 엇갈린-단부 말단, 적절한 말단을 제공하기 위한 제한 효소 절단, 접합성 말단의 것에 적절하게 충전하고 바람직하지 않은 연결을 피하기 위한 알칼리성 포스파타제 처리 및 적절한 리가제로 결찰을 포함하는 통상적인 기술에 따라 벡터 DNA와 재조합될 수 있다. 이러한 조작을 위한 기술은, 예를 들어 Maniatis 등, *MOLECULAR CLONING, LAB. MANUAL*, (Cold Spring Harbor Lab. Press, NY, 1982 및 1989), 및 Ausubel 등. 1993 *supra*에 기술되어 있으며, 항체 분자 또는 이의 항원 결합 영역을 코딩하는 핵산 서열을 작제하는데 사용될 수 있다.

[0091] DNA와 같은 핵산 분자는 전사 및 번역 조절 정보를 함유하는 뉴클레오티드 서열을 함유하고 이러한 서열이 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 "작동가능하게 연결"되어 있는 경우 폴리펩티드를 "발현할 수 있는" 것으로 언급된다. 작동가능한 연결은 조절 DNA 서열과 발현하고자 하는 DNA 서열이 회복가능한 양의 펩티드 또는 항체 부분으로서 유전자 발현을 허용하는 방식으로 연결되는 연결이다. 유전자 발현에 필요한 조절 영역의 정확한 특성은 유사한 기술 분야에 잘 알려진 것과 같이 유기체마다 다를 수 있다. 예를 들어, Sambrook 등, 2001 *supra*; Ausubel 등, 1993 *supra*를 참조한다.

[0092] 이에 따라 본 발명은 원핵 또는 진핵 세포에서 항체 또는 펩티드의 발현을 포괄한다. 적합한 숙주는 생체내 또는 현장에서 박테리아, 효모, 곤충, 진균, 조류 및 포유동물 세포를 포함한 박테리아 또는 진핵 숙주, 또는 포유동물, 곤충, 조류 또는 효모 기원의 숙주 세포를 포함한다. 포유동물 세포 또는 조직은 인간, 영장류, 햄스터, 토끼, 설치류, 소, 돼지, 양, 말, 염소, 개 또는 고양이 기원일 수 있다. 당업계에 공지된 임의의 다른

적합한 포유동물 세포가 또한 사용될 수 있다.

- [0093] 일 실시양태에서, 발명의 뉴클레오티드 서열은 수용체 숙주에서 자가 복제가 가능한 플라스미드 또는 바이러스 벡터 안으로 혼입될 것이다. 이 목적을 위해 다양한 벡터 중 임의의 것이 이용될 수 있다. 예를 들어, Ausubel 등, 1993 supra 참조. 특정 플라스미드 또는 바이러스 벡터를 선택하는 데 중요한 요소는: 벡터를 함유하는 수용체 세포가 벡터를 함유하지 않는 이들 수용체 세포로부터 인식되고 선택될 수 있는 용이성; 특정 숙주에서 원하는 벡터의 카피의 수; 및 다른 종의 숙주 세포 사이에서 벡터를 "서플"할 수 있는 것이 바람직한지 여부를 포함한다.
- [0094] 당업계에 공지된 예시적인 원핵 벡터는 E. coli에서 복제할 수 있는 것과 같은 플라스미드 (예를 들어, pBR322, CoIE1, pSC101, pACYC 184, .pi.vX)를 포함한다. 이러한 플라스미드는 예를 들어 문헌 Maniatis 등, 1989 supra; Ausubel 등, 1993 supra에 개시되어 있다. 바실루스 플라스미드는 pC194, pC221, pT127 등을 포함한다. 이러한 플라스미드는 Gryczan에 의해 THE MOLEC. BIO. OF THE BACILLI 307-329 (Academic Press, NY, 1982)에 개시되어 있다. 적합한 스트렙토마이세스 플라스미드는 pIJ101 (Kendall 등, 169 J. Bacteriol. 4177-83 (1987), 및 Streptomyces bacteriophages such as phLC31 (Chater 등, SIXTH INT'L SYMPOSIUM ON ACTINOMYCETALES BIO. 45-54 (Akademiai Kaido, Budapest, Hungary 1986)을 포함한다. 슈도모나스 플라스미드는 John 등, 8 Rev.Infect. Dis. 693-704 (1986); Izaki, 33 Jpn. J. Bacteriol. 729-42 (1978); 및 Ausubel 등, 1993 supra에서 검토되어 있다.
- [0095] 대안적으로, 항체 또는 펩티드를 암호화하는 cDNA의 발현에 유용한 유전자 발현 요소는 (a) SV40 초기 프로모터 (Okayama 등, 3 Mol. Cell Biol. 280(1983), Rous 육종 바이러스 LTR(Gorman 등, 79 Proc. Natl. Acad. Sci., USA 6777(1982), 및 Moloney 쥐 백혈병 바이러스 LTR(Grosschedl 등, 41 Cell 885(1985))와 같은 바이러스 전사 프로모터 및 인핸서 요소 (b) SV40 후기 영역(Okayama 등, 1983)에서 파생된 것과 같은 스플라이스 영역 및 폴리아데닐화 부위 및 (c) SV40(Okayama 등, 1983)에서와 같은 폴리아데닐화 부위를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0096] 번역글로불린 cDNA 유전자는, Weidle 등, 51 Gene 21 (1987)에 의해 기술된 바와 같이 발현 요소로서 SV40 초기 프로모터 및 그의 인핸서, 마우스 번역글로불린 H 사슬 프로모터 인핸서, SV40 후기 영역 mRNA 스플라이싱, 토끼 S-글로빈 개재 서열, 번역글로불린 및 토끼 S-글로빈 폴리아데닐화 부위, 및 SV40 폴리아데닐화 요소를 사용하여 발현될 수 있다. cDNA 부분, 게놈 DNA 부분(Whittle 등, 1 Protein Engin. 499 (1987)), 으로 구성된 번역글로불린 유전자에 대해, 전사 프로모터는 인간 사이토메갈로바이러스일 수 있고, 프로모터 인핸서는 사이토메갈로바이러스 및 마우스/인간 번역글로불린일 수 있고, mRNA 스플라이싱 및 폴리아데닐화 영역은 천연 염색체 번역글로불린 서열일 수 있다.
- [0097] 일 실시양태에서, 설치류 세포에서 cDNA 유전자의 발현을 위해, 전사 프로모터는 바이러스 LTR 서열이고, 전사 프로모터 인핸서는 마우스 번역글로불린 중쇄 인핸서 및 바이러스 LTR 인핸서 중 하나 또는 둘 모두이고, 스플라이스 영역은 31bp보다 큰 인트론을 함유하고, 폴리아데닐화 및 전사 종결 영역은 합성되는 번역글로불린 사슬에 상응하는 천연 염색체 서열로부터 유래된다. 다른 실시양태에서, 다른 단백질을 코딩하는 cDNA 서열은 포유동물 세포에서 단백질의 발현을 달성하기 위해 상기-인용된 발현 요소와 조합된다.
- [0098] 각각의 융합된 유전자는 발현 벡터에 어셈블링되거나 삽입될 수 있다. 번역글로불린 사슬 유전자 생성물을 발현할 수 있는 수용체 세포는 그 다음 펩티드 또는 H 또는 L 사슬-코딩 유전자로 단독으로 형질감염되거나 H 및 L 사슬 유전자로 공동-형질감염된다. 형질감염된 수용체 세포는 혼입된 유전자의 발현을 허용하는 조건 하에 배양되고 발현된 번역글로불린 사슬 또는 온전한 항체 또는 단편은 배양물로부터 회수된다.
- [0099] 일 실시양태에서, 펩티드 또는 H 및 L 사슬, 또는 그의 일부를 코딩하는 융합된 유전자는 그 다음 수용체 세포를 공동형질감염시키기 위해 사용되는 별도의 발현 벡터에서 어셈블링된다. 대안적으로, H 및 L 사슬을 코딩하는 융합된 유전자는 동일한 발현 벡터 상에서 어셈블링될 수 있다. 발현 벡터의 형질감염 및 항체의 생산을 위해, 수용체 세포주는 골수종 세포일 수 있다. 골수종 세포는 형질감염된 번역글로불린 유전자에 의해 코딩된 번역글로불린을 합성, 어셈블링 및 분비할 수 있고 번역글로불린의 글리코실화를 위한 메커니즘을 보유한다. 골수종 세포는 배양액 또는 마우스의 복강에서 성장할 수 있으며, 여기서 분비된 번역글로불린은 복수액에서 얻을 수 있다. 다른 적합한 수용체 세포는 개과 또는 비-개과 기원의 B 림프구, 개과 또는 비-개과 기원의 하이브리도마 세포, 또는 중간 이중하이브리도마 세포와 같은 림프 세포를 포함한다.
- [0100] 발명의 항체 작제물 또는 폴리펩티드를 담지하는 발현 벡터는 형질전환, 형질감염, 접합, 원형질체 융합, 인산

칼슘-침전, 및 디에틸아미노에틸(DEAE) 텍스트란과 같은 폴리양이온으로 적용과 같은 생화학적 수단, 및 전기천공, 직접 미세주입 및 미세발사체 충격과 같은 기계적 수단을 포함하는 다양한 적절한 수단 중 임의의 것에 의해 적절한 숙주 세포 안으로 도입될 수 있다. Johnston 등, 240 Science 1538(1988).

[0101] 효모는 면역글로불린 H 및 L 사슬의 생산에 대해 박테리아에 비해 실질적인 이점을 제공할 수 있다. 효모는 글리코실화를 포함한 번역-후 펩티드 변형을 수행한다. 효모에서 원하는 단백질을 생산하는 데 사용할 수 있는 강력한 프로모터 서열과 높은 카피 수 플라스미드를 활용하는 다수의 재조합 DNA 전략이 현재 존재한다. 효모는 클로닝된 포유동물 유전자 생성물의 리더 서열을 인식하고 리더 서열을 지니는 펩티드(즉, 프리-펩티드)를 분비한다. Hitzman 등, 11th Int'l Conference on Yeast, Genetics & Molec. Biol. (Montpellier, France, 1982).

[0102] 효모 유전자 발현 시스템은 펩티드, 항체, 이의 단편 및 영역의 생산, 분비 및 안정성의 수준에 대해 일상적으로 평가될 수 있다. 효모가 글루코스가 풍부한 배지에서 성장할 때 대량으로 생산되는 해당 효소를 코딩하는 활성적으로 발현된 유전자로부터 프로모터 및 종결 요소를 합체하는 일련의 효모 유전자 발현 시스템 중 임의의 것이 이용될 수 있다. 알려진 해당 유전자는 또한 매우 효율적인 전사 제어 신호를 제공할 수 있다. 예를 들어, 포스포글리세레이트 키나제(PGK) 유전자의 프로모터 및 터미네이터 신호가 이용될 수 있다. 다수의 접근방식이 효모에서 클로닝된 면역글로불린 cDNA의 발현을 위한 최적의 발현 플라스미드를 평가하기 위해 취해질 수 있다. Vol. II DNA Cloning, 45-66, (Glover, ed.,) IRL Press, Oxford, UK 1985 참조.

[0103] 박테리아 균주는 또한 본 발명에 의해 기재된 항체 분자 또는 펩티드의 생산을 위한 숙주로서 이용될 수 있다. 숙주 세포와 호환되는 종에서 유래된 레플리콘 및 제어 서열을 함유하는 플라스미드 벡터는 이들 박테리아 숙주와 관련하여 사용된다. 벡터는 복제 부위뿐만 아니라 형질전환된 세포에서 표현형 선택을 제공할 수 있는 특정 유전자를 운반한다. 박테리아에서 클로닝된 면역글로불린 cDNA에 의해 코딩되는 항체, 단편 및 영역 또는 항체 사슬의 생성을 위한 발현 플라스미드를 평가하기 위해 다수의 접근방식이 취해질 수 있다(Glover, 1985 supra; Ausubel, 1993 supra; Sambrook, 2001 supra; Colligan 등, eds. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, NY, N.Y.(1994-2001); Colligan 등, eds. Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y. (1997-2001) 참조).

[0104] 숙주 포유류 세포는 시험관 내 또는 생체 내에서 성장할 수 있다. 포유동물 세포는 리더 펩티드 제거, H 및 L 사슬의 접합 및 어셈블리, 항체 분자의 글리코실화 및 기능적 항체 단백질의 분비를 포함하는 면역글로불린 단백질 분자에 대한 번역 후 변형을 제공한다. 항체 단백질의 생산을 위한 숙주로서 유용할 수 있는 포유동물 세포는, 상술한 림프성 기원의 세포에 부가하여, Vero(ATCC CRL 81) 또는 CHO-K1(ATCC CRL 61) 세포와 같은 섬유아세포 기원의 세포를 포함한다. 포유동물 세포에서 클로닝된 펩티드 H 및 L 사슬 유전자의 발현을 위해 많은 벡터 시스템이 이용가능하다(Glover, 1985 supra 참조). 완전한 H2L2 항체를 얻기 위해 상이한 접근방식을 따를 수 있다. 동일한 세포에서 H 및 L 사슬을 공동-발현하여 완전한 사량체 H2L2 항체 및/또는 펩티드 안으로 H 및 L 사슬의 세포내 연합 및 연결을 달성하는 것이 가능하다. 공동-발현은 동일한 숙주에서 동일하거나 상이한 플라스미드를 사용함에 의해 발생할 수 있다. H 및 L 사슬 및/또는 펩티드 둘 모두에 대한 유전자를 동일한 플라스미드 안으로 배치할 수 있어, 그 다음 세포 안으로 형질감염시키고 이에 의해 두 사슬 모두를 발현하는 세포에 대해 직접적으로 선택할 수 있다. 대안적으로, 세포는 하나의 사슬, 예를 들어 L 사슬을 코딩하는 플라스미드로 먼저 형질감염되고, 이어서 생성된 세포주를 제2 선택가능 마커를 함유하는 H 사슬 플라스미드로 형질감염시킬 수 있다. 두 경로 중 하나를 통해 펩티드 및/또는 H2L2 분자를 생산하는 세포주는 어셈블링된 H2L2 항체 분자의 더 높은 생산 또는 형질감염된 세포주의 증강된 안정성과 같은 증강된 특성을 가진 세포주를 생성하기 위해 추가 선택가능한 마커와 연계하여 펩티드, H, L 또는 H 플러스 L 사슬의 추가 카피를 코딩하는 플라스미드로 형질감염될 수 있다.

[0105] 재조합 항체의 장기간의 고수율 생산을 위해, 안정적인 발현이 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체 분자를 안정적으로 발현하는 세포주가 조작될 수 있다. 바이러스 복제 기원을 함유하는 발현 벡터를 사용하는 대신, 숙주 세포가 면역글로불린 발현 카세트 및 선택가능한 마커로 형질전환될 수 있다. 외래 DNA의 도입에 이어서, 조작된 세포를 농후화된 배지에서 1-2일 동안 성장시킨 다음 선택 배지로 전환할 수 있다. 재조합 플라스미드에서 선택가능한 마커는 선택에 대한 내성을 부여하고 세포가 플라스미드를 염색체 안으로 안정적으로 합체하고 성장하여 초점을 형성하도록 허용하며 이는 차례로 클로닝되고 세포주 안으로 확장될 수 있다. 이러한 조작된 세포주는 항체 분자와 직접 또는 간접적으로 상호작용하는 화합물/성분의 스크리닝 및 평가에 특히 유용할 수 있다.

[0106] 발명의 항체가 생성되면, 그것은 면역글로불린 분자의 정제를 위해 당업계에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 크

로마토그래피(예를 들어, 이온 교환, 친화도, 특히 단백질 A 및 사이징 컬럼 크로마토그래피 후 특정 항원에 대한 친화도), 원심분리, 차등 용해도, 또는 단백질의 정제를 위한 기타 표준 기술에 의해 정제될 수 있다. 많은 실시양태에서, 항체는 세포로부터 배양 배지 안으로 분비되고 배양 배지로부터 수확된다.

[0107] 약제학적 및 수의학적 적용

[0108] 본 발명은 또한 발명의 분자 및 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 보다 구체적으로, 발명은 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제, 및 활성 성분으로서 발명에 따른 항체 또는 펩티드를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0109] "약제학적으로 허용가능한 담체"는 이용되는 투여량 및 농도에서, 노출되는 세포 또는 동물에 무독성인 임의의 부형제를 포함한다. 약제학적 조성물은 하나 이상의 추가 치료제를 포함할 수 있다.

[0110] "약제학적으로 허용가능한"은 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 합리적인 이익/위험 비율에 상응하는 기타 문제 합병증 없이 동물의 조직과의 접촉에 적합한 이들 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여 형태를 지칭한다.

[0111] 약제학적으로 허용가능한 담체는 용매, 분산 매질, 완충액, 코팅제, 항균제 및 항진균제, 습윤제, 방부제, 버거, 킬레이트제, 항산화제, 등장제 및 흡수 지연제를 포함한다.

[0112] 약제학적으로 허용되는 담체는 물; 식염수; 포스페이트 완충 식염수; 텍스트로스; 글리세롤; 알코올, 예컨대 에탄올 및 이소프로판올; 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산; 아스코르브산; 저분자량(약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 예컨대 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산; 단당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; EDTA; 나트륨 등의 염 형성 반대이온; 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 트윈(TWEEN), 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 및 플루로닉스(PLURONICS); 등장제, 예컨대 당, 폴리알코올, 예컨대 만니톨 및 소르비톨, 및 염화나트륨; 및 이들의 조합물을 포함한다.

[0113] 발명의 약제학적 조성물은, 예를 들어 액체, 반-고체, 또는 고체 투여 형태, 예컨대 액체 용액(예를 들어, 주사 가능한 및 주입가능한 용액), 분산액 또는 현탁액, 리포솜, 좌약, 정제, 알약 또는 분말을 포함하는 다양한 방식으로 제형화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 주사가능한 또는 주입가능한 용액의 형태이다.

[0114] 조성물은 정맥내, 동맥내, 근육내, 피하, 비경구, 경점막, 경구, 국소 또는 경피 투여에 적합한 형태일 수 있다. 조성물은 즉시, 제어, 연장 또는 지연 방출 조성물로 제형화될 수 있다.

[0115] 발명의 조성물은 개별 치료제로서 또는 다른 치료제와 조합하여 투여될 수 있다. 이들은 단독으로 투여될 수 있지만 일반적으로 선택된 투여 경로 및 표준 약제학적 관행에 기초하여 선택된 약제학적 담체와 함께 투여된다. 본원에 개시된 항체의 투여는 비경구 주사(예컨대 복강내, 피하 또는 근육내 주사), 경구, 또는 기도 표면으로의 항체의 국소 투여(전형적으로는 약제학적 제형으로 수행됨)에 의한 것을 포함한 임의의 적합한 수단에 의해 수행될 수 있다. 기도 표면에 대한 국소 투여는 비강내 투여(예를 들어, 점적기, 면봉 또는 흡입기의 사용)에 의해 수행될 수 있다. 기도 표면에 대한 항체의 국소 투여는 또한 에어로졸 현탁액으로서 항체를 함유하는 약제학적 제형의 호흡가능한 입자(고체 및 액체 입자 둘 모두 포함)를 생성한 다음 대상체가 호흡가능한 입자를 흡입하게 함에 의한 것과 같이, 흡입 투여에 의해 수행될 수 있다. 약제학적 제형의 호흡가능한 입자를 투여하기 위한 방법 및 장치는 잘 알려져 있고, 임의의 통상적인 기술이 이용될 수 있다.

[0116] 일부 원하는 실시양태에서, 항체는 비경구 주사에 의해 투여된다. 비경구 투여를 위해, 항체 또는 분자는 약제학적으로 허용가능한 비경구 비히클과 연계하여 용액, 현탁액, 에멀전 또는 동결건조된 분말로서 제형화될 수 있다. 예를 들어, 비히클은 물, 식염수, 링거 용액, 텍스트로스 용액, 트레할로스 또는 수크로스 용액, 또는 5% 혈청 알부민, 0.4% 식염수, 0.3% 글리신 등과 같은 수성 담체와 같은 허용가능한 담체에 용해된 항체 또는 이의 각테일의 용액일 수 있다. 예컨대 고정유와 같은 비수성 비히클 및 리포솜 또한 사용될 수 있다. 이들 용액은 무균이고 일반적으로 미립자 물질이 없다. 이들 조성물은 통상적이고 잘 알려진 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있다. 조성물은 pH 조절제 및 완충제, 독성 조절제 등과 같은 생리학적 조건을 근사화하는 데 필요한 약제학적으로 허용가능한 보조 물질, 예를 들어 아세트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 젖산나트륨 등을 함유할 수 있다. 이들 제형에서 항체의 농도는, 예를 들어 중량으로 약 0.5% 미만, 일반적으로 약 1% 이상 내지 15% 또는 20% 정도로 광범위하게 변할 수 있고 주로 선택된 특정 투여 양식에 따라 유체 부피, 점도 등에 기초하여 선택될 것이다. 비히클 또는 동결건조된 분말은 등장성(예를 들어, 염화나트륨, 만니톨) 및 화학적 안정성(예를 들어, 완충제 및 방부제)을 유지하는 첨가제를 함유할 수 있다. 제형은 일반적으로 사용되는 기술로 멸균된다.

비경구로 투여가능한 조성물을 제조하는 실제 방법은 당업자에게 알려져 있거나 자명할 것이고, 예를 들어, REMINGTON'S PHARMA. SCI. (15th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa., 1980)에 더 상세히 기재되어 있다.

- [0117] 발명의 항체 또는 분자는 저장을 위해 동결건조될 수 있고 사용 이전에 적합한 담체에서 재구성될 수 있다. 이 기술은 종래의 면역 글로불린에서 효과적인 것으로 나타났다. 임의의 적합한 동결건조 및 재구성 기술이 이용될 수 있다. 동결건조 및 재구성은 다양한 정도의 항체 활성 손실을 초래할 수 있고 사용 수준은 이를 보상하기 위해 조정되어야 할 수 있음을 당업자는 이해할 것이다. 본 항체 또는 이의 각테일을 함유하는 조성물은 재발의 예방 및/또는 기존 질환에 대한 치료적 처리를 위해 투여될 수 있다. 적절한 약제학적 담체는 이 기술 분야에서 표준 참조 텍스트인 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES의 최신판에 기술되어 있다. 치료적 적용에서, 조성물은 질환 및 이의 합병증을 치료하거나 적어도 부분적으로 정지 또는 완화시키기에 충분한 양으로 이미 질환을 앓고 있는 대상체에게 투여된다.
- [0118] 본원에 기재된 바와 같은 병태 또는 질환의 치료를 위한 본 발명의 조성물의 유효 용량은, 예를 들어, 특정 제제의 약력학적 특성, 및 그의 투여 방식과 경로; 대상 부위; 동물의 생리적 상태; 투여된 다른 약물; 치료가 예방적인지 치료적인지 여부; 수령체의 나이, 건강 및 체중; 동시치료의 증상 종류의 성질과 정도, 치료의 빈도, 및 원하는 효과를 포함하나 이에 제한되지 않는 많은 상이한 인자에 따라 달라진다.
- [0119] 조성물의 단일 또는 다중 투여는 치료 수의사에 의해 선택되는 용량 수준 및 패턴으로 수행될 수 있다. 어떤 경우든, 약제학적 제형은 대상체를 효과적으로 치료하기에 충분한 양의 본 발명의 항체(들)를 제공해야 한다.
- [0120] 치료 투여량은 안전성 및 효능을 최적화하기 위해 당업자에게 공지된 일상적인 방법을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0121] 발명의 약제학적 조성물은 "치료적 유효량"을 포함할 수 있다. "치료적 유효량"은 원하는 치료 결과를 달성하기 위해 필요한 투여량 및 시간 동안 효과적인 양을 지칭한다. 분자의 치료적 유효량은 질환 상태, 연령, 성별, 및 개체의 체중, 및 개체에서 원하는 반응을 이끌어내는 분자의 능력과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 또한 치료적 유효량은 분자의 임의의 독성 또는 유해한 효과가 치료학적으로 유의한 효과에 의해 압도당하는 양이다.
- [0122] 다른 양태에서, 발명의 조성물은, 예를 들어 개에서 다양한 질환 및 장애의 치료에 사용될 수 있다. 본원에서 사용된 것과 같이, 용어 "치료하다" 및 "치료"는 예방적 또는 방지적 조치를 포함하는 치료적 치료를 지칭하되, 목적은 질환 또는 상태와 연관된 바람직하지 않은 생리학적 변화를 예방하거나 늦추는(경감하는) 것이다. 유익하거나 원하는 임상 결과는 증상의 완화, 질환 또는 병태의 정도 감소, 질환 또는 병태의 안정화(즉, 질환 또는 병태가 악화되지 않는 경우), 질환 또는 병태의 진행의 지연 또는 늦춤, 질환 또는 병태의 개선 또는 완화, 검출 가능 여부에 관계없이 질환 또는 병태의 (부분적이든 전체적이든) 완화를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다. 치료를 필요로 하는 이들은 질환 또는 병태를 이미 갖고 있는 이들 뿐만 아니라 질환 또는 병태에 걸리기 쉬운 이들 또는 질환 또는 병태가 예방되어야 하는 이들을 포함한다.
- [0123] 본원에 인용된 모든 특허 및 참고 문헌들은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.
- [0124] 다음 실시예는 이전 개시내용을 보완하고 본원에 기술된 주제에 대한 더 나은 이해를 제공하기 위해 제공된다. 이들 실시예는 기술된 주제를 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다. 본원에 기술된 실시예 및 실시양태는 단지 예시를 위한 것이라는 것과, 이에 비추어 다양한 변형 또는 변경이 당업자에게 명백할 것이고 발명의 진정한 범주 내에 포함되어야 하고, 이를 벗어나지 않고 이루어질 수 있음을 이해해야 한다.
- [0125] **실시예**
- [0126] **실시예 1**
- [0127] **개과 IgG Fc 돌연변이체의 구축**
- [0128] 모든 개과 IgG의 구축 (도 1)은 Bergeron 등 (Bergeron 등, 2014, *Vet Immunol Immunopathol.* vol. 157(1-2), 페이지 31-41)에 의해 기술된 바와 같이 수행되었으며, 여기서 IgG (65) 서브클래스에 대한 개과 불변 영역을 코딩하는 서열을 함유하는 플라스미드가 사용되고, 본원에서 조사된 각 mAb에 대한 VH/VL 서열을 불변 도메인을 코딩하는 뉴클레오티드와 함께 상류 및 프레임으로 삽입하였다. 돌연변이는 유전자 단편으로서 불변 영역의 직접 DNA 합성에 의해 각각의 플라스미드의 CH1, CH2 또는 CH3 도메인(도 2)의 각각의 각각의 각각의 위치에 혼입되었고, 후속적으로 각각의 관심 가변 영역 내로 서브클로닝되었다.
- [0129] **발현 및 정제**

- [0130] 모노클로날 항체 (mAbs) 돌연변이체를 Thermo Fisher로부터 수득한 포유동물 현탁 세포 시스템인 EXPICHO-S (Chinese Hamster Ovary) 세포에서 발현시켰다. EXPICHO-S 세포 현탁액을 0.14 내지 8.0x10e6 cell/ml로 EXPICHO 발현 배지(Gibco)에 유지시켰다. 세포를 ExpiCHO 프로토콜 사용자 매뉴얼에 따라 Day -1 및 형질감염일에 희석시켰다. 희석된 세포를 Max Titer 조건에 따라 ExpiFectamine CHO 형질감염 키트 (Gibco)로부터 공급받은 시약을 사용하여 프로토콜에 기재된 바와 같이 형질감염시켰다. 12-14일의 인큐베이션 후에, 배양물을 수확하고 정제하였다. 항체를 PBS로 예비-평형화시킨 MabSelect Sure LX (GE Healthcare) 상에서 단백질 A 크로마토그래피로부터 정제하였다. 샘플 로딩 후, 수지를 PBS로 세척하고 이어서 20 mM 아세트산나트륨, pH 3.5로 컬럼으로부터 샘플을 용리시켰다. 용리 후, 풀(pool)을 제조하고 1 M 아세트산나트륨을 4%로 첨가하여 중화시켰다. 이용가능한 부피 및 의도된 용도에 따라, 샘플을 때때로 최종 완충액 (예를 들어, PBS, 기타)으로 교환하였다. 농도는 280 nm에서 흡광도로 측정하였다(도 3).
- [0131] SDS-PAGE
- [0132] 비-환원된 (nr) 및 환원된 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 전기영동 (SDS-PAGE)은 MES-SDS 러닝 버퍼 내의 모두 인비트로젠으로부터 입수된 4-12 % Bis-Tris NuPAGE gels 및 SeeBlue Plus 2 standards을 사용하여 수행하였다. 환원되지 않은 샘플의 경우, 1 mM의 알킬화제 N-에틸말레이미드(NEM)를 첨가하고, 환원된 샘플의 경우 환원제 디티오프레이톨(DTT)을 첨가하였다. 겔을 쿠마시 블루로 염색하여 단백질 밴드를 검출하였다.
- [0133] 분석 SEC
- [0134] 분석 SEC는 0.25 ml/min으로 200 mM NaPhosphate pH 7.2 실행 완충액에서 TOSOH BioScience로부터의 TSK gel Super SW3000, 4.6 mm, 10x30 cm, 4 μm 컬럼을 사용하여 수행하였다.
- [0135] NR-CGE
- [0136] 비-환원된 모세관 겔 전기영동(nrCGE)은 제조자의 지시에 따라 A55625 모세관 카트리지를 사용하는 Beckman Coulter PA800 plus 분석기를 사용하여 수행하였다.
- [0137] SMAC
- [0138] 스탠드업 단층 흡수 크로마토그래피(SMAC)는 0.35 ml/min으로 200 mM Na 포스페이트 pH 7.2 실행 완충액에서 Sepax Zenix SEC-300, 4.6X300 mm 컬럼을 사용하여 수행하였다.
- [0139] HIC
- [0140] 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)는 Sepax Proteomix HIC Butyl-NP5, 4.6x100 mm 컬럼을 사용하여 수행되었다. 0.1 M Na 포스페이트 pH 6.5 중 100 % 1.8 M 황산암모늄 내지 100 % 0.1 M Na 포스페이트 pH 6.5의 선형 구배를 0.75 ml/min으로 20분 동안 적용하였다.
- [0141] Octet-BLI
- [0142] 이 분석은 아민 반응성 2세대 바이오센서들과 함께 Forte Bio's Octet QKe를 사용하여 수행되었다. 샘플은 칼슘 및 마그네슘 없이 1x Gibco PBS로 교환되고 0.5 mg/mL의 농도로 희석된다. 바이오센서의 기준선 설정 후, 바이오센서를 시료 100 μL에 600초 동안 침지시켰다.
- [0143] Octet QKe 정량화 (Pall ForteBio Corp, Menlo Park, CA, USA)를 통해 단백질 A 또는 단백질 G 센서에 대한 결합에 대해 항체를 스크리닝하였다. 단백질 A에 결합된 작제물은 단백질 품질을 위해 Bergeron 등에 기재된 바와 같이 정제되고 정량되었다.
- [0144] 실시예 2
- [0145] FcRn 결합 검정
- [0146] 상기 논의된 Bergeron 등에 따라 개과 FcRn을 단리하였고, 제조하였고 돌연변이체 Fc IgGs를 개과 FcRn에 대해 검정하였다. 표준 PCR을 사용하여 개과 FcRn-α 서브유닛 및 β-마이크로글로불린을 증폭시켰다. FcRn-α 서브유닛 및 β-마이크로글로불린을 HEK 293 세포 내로 공동-형질감염시키고, FcRn 복합체를 c-말단 His 태그를 통해 IMAC 친화성 정제에 의해 정제하였다. FcRn 복합체는 BirA 효소적 비오틴닐화 반응을 통해 비오틴으로 표지되었다. KD는 SA 센서 칩을 사용하여 Biacore 3000 또는 Biacore T200(GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA)에 의해 측정되었다.

[0147] FcRn은 변형된 SA 캡처 방법을 이용하여 센서의 표면에 캡처하였다. 10 mM MES; 150 mM NaCl; 0.005 % Tween 20; 0.5 mg/mL BSA; pH 6을 캡처, 방법 실행 완충액 및 적정에 사용하였다. 1x HBS-P, 0.5 mg/mL BSA; pH 7.4도 또한 방법 실행 완충액 및 적정에 사용되었다. Fc 돌연변이체 IgG를 수용체 표면 위로 흘려보내고, 친화도를 Scrubber2 소프트웨어 분석 (BioLogic Software Pty, Ltd., Campbell, Australia) 또는 T200 평가 소프트웨어를 사용하여 측정하였다 (표 1). 완충액만 포함하는 빈 실행은 모든 실행에서 제외되었다. 유동 세포를 50 mM 트리스 pH 8을 사용하여 재생시켰다. 실행은 15 °C에서 수행되었다.

[0148] 각각의 위치에서 만들어진 돌연변이는 pH 6에서 FcRn에 대한 IgG의 친화도에 현저한 효과를 갖는다. IgG에 대한 FcRn 친화도의 증가는 VHVL 도메인에 의존하지 않으며, 임의의 개과 IgG에 대해 보편적이다.

[0149] 야생형(WT) 및 돌연변이체 IgGs와 개과 FcRn의 결합은 표면 플라즈몬 공명(Biacore)에 의해 측정되었다. 생물물리학적 특성화 또한 수행되었다.

[0150] 표 2에 나타난 바와 같이, 생물물리학적 특성화 데이터는 복수의 돌연변이가 특히 다중반응성에 대해 개선된 생물물리학적 특성을 나타냄을 보여준다.

[0151] 표 1. FcRn 결합 친화도에 대한 돌연변이체의 효과.

ID No.	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4	pH6 에서 KD	pH7.4 에서 KD
1	WT				2.41E-08	NBO
2	L252Y	N434R			1.73E-09	3.37E-08
3	A254F				1.15E-06	NBO
4	A254G				2.87E-08	NBO
5	A254H				2.16E-08	NBO
6	A254N				4.31E-08	NBO
7	A254Q				3.65E-08	NBO
8	A254R				7.83E-09	NBO
9	A254W				8.18E-07	NBO
10	L252P				3.41E-08	NBO
11	L252W				7.67E-09	NBO
12	L252A				9.85E-09	NBO
13	T256H				1.53E-08	NBO
14	T256I				2.03E-08	NBO
15	T256K				3.31E-08	NBO
16	T256L				1.87E-08	NBO
17	T256Q				1.96E-08	NBO
18	T256Y				2.53E-08	NBO
19	A254C				4.53E-08	NBO
20	A254D				6.00E-08	NBO
21	A254I				1.44E-08	NBO
22	A254K				1.14E-08	NBO
23	A254L				1.17E-08	NBO
24	A254M				2.78E-08	NBO
25	A254P				1.14E-07	NBO
26	A254S				1.22E-08	NBO
27	A254T				1.40E-08	NBO
28	A254V				1.13E-08	NBO
29	A254Y				1.37E-10	NBO
30	버퍼				NBO	NBO
31	L252D				4.56E-07	NBO
32	L252G				3.56E-08	NBO
33	L252H				1.03E-08	NBO
34	L252I				1.36E-08	NBO
35	L252K				6.07E-09	NBO
36	L252M				6.47E-09	NBO
37	L252N				1.59E-08	NBO

[0152]

ID No.	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4	pH6 에서 KD	pH7.4 에서 KD
38	L252Q				1.38E-08	NBO
39	L252S				5.36E-09	NBO
40	L252T				1.33E-08	NBO
41	L252V				1.61E-08	NBO
42	T256A				1.26E-08	NBO
43	T256C				1.55E-08	NBO
44	T256D				1.56E-08	NBO
45	T256F				1.96E-08	NBO
46	T256G				1.31E-08	NBO
47	T256M				2.02E-08	NBO
48	T256N				1.01E-08	NBO
49	T256P				2.05E-08	NBO
50	T256R				1.01E-08	NBO
51	T256S				1.24E-08	NBO
52	T256V				1.26E-08	NBO
53	T256W				1.50E-08	NBO
54	A431K				2.17E-08	NBO
55	D312P				9.88E-09	NBO
56	L252F	A254R			2.85E-09	1.03E-07
57	L252F	A254R	T256H		3.09E-09	8.92E-07
58	L252F	A254T	T256E		6.90E-09	NBO
59	L252F	N434F			1.58E-09	3.81E-08
60	L252F	N434H			3.40E-09	2.84E-08
61	L252F	N434R			3.35E-09	6.23E-08
62	L252F	N434W			4.70E-09	4.54E-08
63	L252F	N434Y			9.74E-10	7.28E-09
64	L252F	T256H			2.29E-09	3.14E-09
65	L252M	A254R			3.05E-09	1.24E-07
66	L252M	A254R	T256H		3.42E-09	2.99E-09
67	L252M	A254T	T256E		1.38E-08	NBO
68	L252M	N434F			1.71E-09	5.33E-08
69	L252M	N434H			3.96E-09	1.89E-07
70	L252M	N434R			3.52E-09	1.36E-07
71	L252M	N434W			2.45E-09	2.42E-08
72	L252M	N434Y			1.21E-09	3.60E-08
73	L252M	T256H			6.88E-09	6.37E-08
74	L252R	A254R			8.45E-09	NBO
75	L252R	A254R	T256H		1.01E-08	5.08E-08
76	L252R	A254T	T256E		1.22E-08	NBO

[0153]

ID No.	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4	pH6 에서 KD	pH7.4 에서 KD
77	L252R	N434F			1.18E-09	4.07E-08
78	L252R	N434H			1.17E-09	NBO
79	L252R	N434R			2.21E-09	1.08E-07
80	L252R	N434W			4.32E-09	7.19E-08
81	L252R	N434Y			1.06E-09	1.94E-08
82	L252R	T256H			2.76E-09	4.83E-09
83	L252R	N434H	A431K		1.40E-09	6.06E-08
84	L252R	N434H	D312P		1.37E-09	1.29E-07
85	L252R	N434H	L314K		9.72E-12	NBO
86	L252R	N434H	Q311H		1.16E-09	2.40E-08
87	L252R	N434H	Q311R		1.19E-09	1.24E-07
88	L252R	N434H	Q311Y		8.15E-10	1.72E-08
89	L252S	A254R			4.02E-09	4.16E-07
90	L252S	A254R	T256H		3.16E-09	2.81E-06
91	L252S	N434F			5.80E-09	4.63E-08
92	L252S	N434H			1.07E-08	NBO
93	L252S	N434R			8.07E-09	1.29E-07
94	L252S	N434W			6.22E-09	1.36E-07
95	L252S	N434Y			2.28E-09	1.96E-08
96	L252S	T256H			7.49E-09	NBO
97	L252Y				6.98E-09	2.81E-07
98	L252Y	N434F			7.64E-10	1.86E-08
99	L252Y	N434H			1.66E-09	4.12E-08
100	L252Y	N434W			4.66E-09	2.88E-08
101	L252Y	N434Y			2.63E-10	5.28E-09
102	L252Y	N434Y	A431K		2.93E-10	2.38E-09
103	L252Y	N434Y	P247V		2.25E-10	2.23E-09
104	L252Y	N434Y	P247V	T250Q	1.69E-10	5.57E-09
105	L252Y	T256E			7.29E-09	NBO
106	L252Y	N434Y	L314K		2.12E-09	3.10E-08
107	L314K				2.99E-08	NBO
108	Q311H				1.02E-08	NBO
109	Q311R				7.62E-09	NBO
110	Q311Y				5.86E-09	NBO
111	L252M	A254S			1.29E-08	NBO
112	L252Y	A254T	T256E		6.41E-09	NBO
113	N434A				2.14E-08	9.58E-08
114	N434C				7.59E-10	NBO
115	N434D				1.50E-05	NBO

[0154]

ID No.	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4	pH6 에서 KD	pH7.4 에서 KD
116	N434E				5.42E-08	NBO
117	N434F				7.99E-09	2.94E-06
118	N434G				2.66E-08	NBO
119	N434H				4.51E-09	NBO
120	N434I				1.67E-08	NBO
121	N434K				1.58E-08	1.43E-08
122	N434L				2.80E-08	1.55E-08
123	N434M				1.88E-08	1.10E-08
124	N434P				1.69E-09	NBO
125	N434Q				1.18E-08	NBO
126	N434R				5.02E-09	1.07E-07
127	N434S				1.73E-08	NBO
128	N434T				1.66E-08	NBO
129	N434V				1.36E-08	NBO
130	N434W				8.43E-09	2.90E-07
131	N434Y				2.81E-09	7.18E-08
132	L252F				1.09E-08	NBO
133	L252R				7.81E-09	NBO
134	L252R	A254T	T256E	N434H	3.84E-09	NBO
135	L252R	N434H	Q311W		1.08E-09	1.96E-08
136	L252Y	A254T			5.96E-09	NBO
137	L252Y	N434Y	Q311W		2.76E-10	2.76E-09
138	Q311W				8.13E-09	NBO
139	L252M	A254S	E439K		7.74E-09	NBO

돌연변이체는 카바트에서와 같은 EU 인덱스에 따라 넘버링 된다. NBO=결합이 관찰되지 않음.

[0155]

표 2. 생물물리학적 특성.

ID No.	수율 (mg/L)	SEC % 단량체	SEC RT (min)	SMAC RT	HIC RT	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tagg 266 (°C)	Tagg 473 (°C)	평균 다중반응성
1	76	95.11	12.281	>60 분	>20 분	63.1	73.96	58.93	60.59	0.4925
2	11	94.81	12.35	>60 분	>20 분	62.5	69.85	56.89	62.76	0.1312
54	78.4	93.88	12.353							0.7034
55	54.78	96.23	12.352							0.37685
58	56.52	95.68	12.365							0.3412
59	8	94.65	13.235	>60 분	>20 분	62.2	69.41	57.56	62.6	
60	18.8	94.73	12.653							0.44735
61	33	95.11	12.347	>60 분	>20 분	61.9	69.41	57.34	60.23	0.78175
62	45	91.81	14.396	>60 분	>20 분	63.3	70.59	58.61	58.64	
63	18	94.56	12.336	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0.5713
67	54.9	96	12.323							0.4407
68	27	96.15	13.088	>60 분	>20 분	62.1	70.07	57.64	59.74	0.63865
69	60.16	87.47	12.48							0.41675
70	48	93.43	12.336	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0.3994
71	18	91.17	14.51	>60 분	>20 분	61.9	69.41	57.41	58.97	
72	23	95.89	12.49	>60 분	>20 분	62.6	70.95	58.68	58.82	0.10185
76	56.55	96.74	12.306							0.40965
77	45	97.24	13.077	>60 분	>20 분	62.9	71.03	57.6	57.84	0.5041
78	49	96.53	12.417	>60 분	>20 분	61.7	69.85	57.6	58.12	0.6055
81	27	95.58	12.345	>60 분	>20 분	62	69.27	58.53	58.26	0.82605
82	38	86.91	14.425	>60 분	>20 분	61.7	68.75	58.94	59.96	
83	81.92	94.99	12.467							0.79495
84	12.4	95.26	12.52							0.6358
85	0.28									
86	79	94.99	12.509							0.50235

[0156]

ID No.	수율 (mg/L)	SEC % 단량체	SEC RT (min)	SMAC RT	HIC RT	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tagg 266 (°C)	Tagg 473 (°C)	평균 다중반응성
87	5.4	95.98	12.533							0.6165
88	35.85	92.89	12.654							0.50355
91	12	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
92	12	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
93	12	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
94	21	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
95	4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1.03425
97	48	93.86	12.262	>60 분	>20 분	61.9	71.39	58.48	61.55	0.5288
99	75.75	93.36	12.433							0.53215
100	25	90.79	14.342	>60 분	>20 분	62.2	68.97	56.64	61.99	
101	22	94.85	12.503	>60 분	>20 분	61.9	69	57.26	70.07	0.1438
105	60.48	94.14	12.371							0.5143
106	82	95.39	12.514							0.3063
107	78.4	96.01	12.384							0.3024
108	27.52	89.42	12.41							0.4893
109	8.36	96.02	12.431							0.4709
110	42.24	94.65	12.429							0.45135
111	112.14	95.28	12.315							0.43775
117	30	94.75	12.94	>60 분	>20 분	61.4	68.53	56.09	60.89	
119	56	94.22	12.359	>60 분	>20 분	61.4	69.41	55.96	60.99	0.23625
126	70	95.38	12.356	>60 분	>20 분	61.1	68.75	57.64	60.58	0.12995
130		93.38	14.247	>60 분	>20 분	61.2	68.08	56.62	57.51	
131	48	95.42	12.476	>60 분	>20 분	61.1	68.82	54.4	61.6	0.1406
132	52	95.15	12.388	>60 분	>20 분	61.7	71.61	57.86	62.55	0.2563
133	84	94.75	12.304	>60 분	>20 분	61.7	71.7	58.45	60.66	0.2819
134	121.6	94.17	12.481							0.32625
135	33	93.45	13.085							0.64825

[0157]

ID No.	수율 (mg/L)	SEC % 단량체	SEC RT (min)	SMAC RT	HIC RT	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tagg 266 (°C)	Tagg 473 (°C)	평균 다중반응성
136	25.2	95.24	12.43							0.39895
137	87.2	94.29	12.871							0.4093
138	88.2	94.79	12.513							0.6871
139	114.18	95.91	12.345							0.31525

특정 돌연변이 번호는 표 1의 해당 ID 번호를 지칭한다. SEC = 크기 배제 크로마토그래피; RT = 보유 시간; SMAC = 스탠드업 단중 흡수 크로마토그래피; HIC = 소수성 상호작용 크로마토그래피; Tm = 용융 온도; Tagg = 응집 온도.

[0158]

표 3. 표 1 및 2의 돌연변이 코돈

ID No.	EU 넘버링 시스템에 따른 돌연변이				코돈 사용			
	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4
1	WT				-			
2	L252Y	N434R			TAC	CGG		
3	A254F				TTC			
4	A254G				GGA			
5	A254H				CAC			
6	A254N				AAC			
7	A254Q				CAA			
8	A254R				CGG			
9	A254W				TGG			
10	L252P				CCA			
11	L252W				TGG			
12	L252A				GCA			
13	T256H				CAC			

[0159]

ID No.	EU 넘버링 시스템에 따른 돌연변이				코돈 사용			
	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4
14	T256I				ATA			
15	T256K				AAA			
16	T256L				CTA			
17	T256Q				CAA			
18	T256Y				TAC			
19	A254C				TGT			
20	A254D				GAT			
21	A254I				ATT			
22	A254K				AAG			
23	A254L				CTT, TTG			
24	A254M				ATG			
25	A254P				CCG			
26	A254S				TCC			
27	A254T				ACC			
28	A254V				GTT, GTG			
29	A254Y				TAT			
30	버퍼				-			
31	L252D				GAC			
32	L252G				GGA			
33	L252H				CAC			
34	L252I				ATA			
35	L252K				AAA			
36	L252M				ATG			
37	L252N				AAC			
38	L252Q				CAA			
39	L252S				AGC			
40	L252T				ACA			
41	L252V				GTA			

[0160]

ID No.	EU 넘버링 시스템에 따른 돌연변이				코돈 사용			
	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4
42	T256A				GCT, GCG			
43	T256C				TGT			
44	T256D				GAC			
45	T256F				TTT			
46	T256G				GGG, GGT			
47	T256M				ATG			
48	T256N				AAT			
49	T256P				CCT			
50	T256R				CGG, AGG			
51	T256S				AGT, TCT			
52	T256V				GTT, GTG			
53	T256W				TGG			
54	A431K				AAG			
55	D312P				CCC			
56	L252F	A254R			TTC	AGG		
57	L252F	A254R	T256H		TTC	AGG	CAC	
58	L252F	A254T	T256E		TTC	ACC	GAG	
59	L252F	N434F			TTC	TTC		
60	L252F	N434H			TTC	CAC		
61	L252F	N434R			TTC	CGG		
62	L252F	N434W			TTC	TGG		
63	L252F	N434Y			TTC	TAC		
64	L252F	T256H			TTC	CAC		
65	L252M	A254R			ATG	AGG		
66	L252M	A254R	T256H		ATG	AGG	CAC	
67	L252M	A254T	T256E		ATG	ACC	GAG	
68	L252M	N434F			ATG	TTC		
69	L252M	N434H			ATG	CAC		

[0161]

ID No.	EU 넘버링 시스템에 따른 돌연변이				코돈 사용			
	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4
70	L252M	N434R			ATG	CGG		
71	L252M	N434W			ATG	TGG		
72	L252M	N434Y			ATG	TAC		
73	L252M	T256H			ATG	CAC		
74	L252R	A254R			AGG	AGG		
75	L252R	A254R	T256H		AGG	AGG	CAC	
76	L252R	A254T	T256E		AGG	ACC	GAG	
77	L252R	N434F			AGG	TTC		
78	L252R	N434H			AGG	CAC		
79	L252R	N434R			AGG	CGG		
80	L252R	N434W			AGG	TGG		
81	L252R	N434Y			AGG	TAC		
82	L252R	T256H			AGG	CAC		
83	L252R	N434H	A431K		AGG	CAC	AAG	
84	L252R	N434H	D312P		AGG	CAC	CCC	
85	L252R	N434H	L314K		AGG	CAC	AAG	
86	L252R	N434H	Q311H		AGG	CAC	CAC	
87	L252R	N434H	Q311R		AGG	CAC	AGG	
88	L252R	N434H	Q311Y		AGG	CAC	TAC	
89	L252S	A254R			TCC	AGG		
90	L252S	A254R	T256H		TCC	AGG	CAC	
91	L252S	N434F			AGC	TTC		
92	L252S	N434H			AGC	CAC		
93	L252S	N434R			AGC	CGG		
94	L252S	N434W			AGC	TGG		
95	L252S	N434Y			AGC	TAC		
96	L252S	T256H			TCC	CAC		
97	L252Y				TAC			

[0162]

ID No.	EU 넘버링 시스템에 따른 돌연변이				코돈 사용			
	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4
98	L252Y	N434F			TAC	TTC		
99	L252Y	N434H			TAC	CAC		
100	L252Y	N434W			TAC	TGG		
101	L252Y	N434Y			TAC	TAC		
102	L252Y	N434Y	A431K		TAC	TAC	AAG	
103	L252Y	N434Y	P247V		TAC	TAC	GTG	
104	L252Y	N434Y	P247V	T250Q	TAC	TAC	GTG	CAG
105	L252Y	T256E			TAC	GAG		
106	L252Y	N434Y	L314K		TAC	TAC	AAG	
107	L314K				AAG			
108	Q311H				CAC			
109	Q311R				AGG			
110	Q311Y				TAC			
111	L252M	A254S			ATG	TCC		
112	L252Y	A254T	T256E		TAC	ACC	GAG	
113	N434A				GCC			
114	N434C				TGC			
115	N434D				GAC			
116	N434E				GAG			
117	N434F				TTC			
118	N434G				GGC			
119	N434H				CAC			
120	N434I				ATC			
121	N434K				AAG			
122	N434L				CTG			
123	N434M				ATG			
124	N434P				CCC			
125	N434Q				CAG			

[0163]

ID No.	EU 넘버링 시스템에 따른 돌연변이				코돈 사용			
	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4
126	N434R				AGG			
127	N434S				TCC			
128	N434T				ACC			
129	N434V				GTG			
130	N434W				TGG			
131	N434Y				TAC			
132	L252F				TTC			
133	L252R				AGG			
134	L252R	A254T	T256E	N434H	AGG	ACC	GAG	CAT
135	L252R	N434H	Q311W		AGG	CAC	TGG	
136	L252Y	A254T			TAC	ACC		
137	L252Y	N434Y	Q311W		TAC	TAC	TGG	
138	Q311W				TGG			
139	L252M	A254S	E439K		ATG	TCC	AAG	

[0164]

표 4. FcRn 결합 친화도에 대한 돌연변이체의 효과.

ID No.	EU 넘버링 시스템에 따른 돌연변이				개과 FcRn 결합 친화도		코돈 사용			
	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4	pH6 에서 KD	pH7.4 에서 KD	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4
140	WT				1.1808E-08	NBO				
141	L252Y	A254T			4.3799E-09	LS	TAC	ACC		
142	L252Y	A254T	Q311M		3.0994E-09	LS	TAC	ACC	ATG	
143	L252Y	A254T	Q311N		3.9588E-09	LS	TAC	ACC	AAC	
144	L252Y	A254T	Q311P		8.8167E-09	LS	TAC	ACC	CCC	

[0165]

ID No.	EU 넘버링 시스템에 따른 돌연변이				개과 FcRn 결합 친화도		코돈 사용			
	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4	pH6 에서 KD	pH7.4 에서 KD	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4
145	L252Y	A254T	Q311R		2.7329E-09	LS	TAC	ACC	CGG	
146	L252Y	A254T	Q311S		4.6808E-09	LS	TAC	ACC	AGC	
147	L252Y	A254T	Q311T		4.0472E-09	LS	TAC	ACC	ACC	
148	L252Y	A254T	Q311V		3.9622E-09	LS	TAC	ACC	GTG	
149	L252Y	A254T	Q311W		1.6406E-09	LS	TAC	ACC	TGG	
150	L252Y	A254T	Q311Y		2.2389E-09	LS	TAC	ACC	TAC	
151	L252Y	A254T	Q311A		4.7636E-09	LS	TAC	ACC	GCC	
152	L252Y	A254T	Q311C		4.7199E-09	LS	TAC	ACC	TGC	
153	L252Y	A254T	Q311D		6.3586E-09	LS	TAC	ACC	GAC	
154	L252Y	A254T	Q311E		7.1448E-09	LS	TAC	ACC	GAG	
155	L252Y	A254T	Q311F		4.8406E-09	LS	TAC	ACC	TTC	
156	L252Y	A254T	Q311G		5.5697E-09	LS	TAC	ACC	GGC	
157	L252Y	A254T	Q311H		3.1564E-09	LS	TAC	ACC	CAC	
158	L252Y	A254T	Q311I		3.6406E-09	LS	TAC	ACC	ATC	
159	L252Y	A254T	Q311K		5.7157E-09	LS	TAC	ACC	AAG	
160	L252Y	A254T	Q311L		4.9143E-09	LS	TAC	ACC	CTG	
161	L252Y	A254T	N434F		7.5713E-10	7.45E-09	TAC	ACC	TTC	
162	L252Y	A254T	N434H		1.9465E-09	2.16E-08	TAC	ACC	CAC	
163	L252Y	A254T	N434R		1.7229E-09	1.34E-08	TAC	ACC	CGG	
164	L252Y	A254T	N434W		7.6313E-10	7.77E-09	TAC	ACC	TGG	
165	L252Y	A254T	N434Y		5.9951E-10	5.43E-09	TAC	ACC	TAC	
166	L252Y	A254T	Q311A	N434F	6.5314E-10	6.20E-09	TAC	ACC	GCC	TTC
167	L252Y	A254T	Q311C	N434F	6.2285E-10	7.68E-09	TAC	ACC	TGC	TTC
168	L252Y	A254T	Q311D	N434F	8.5422E-10	1.24E-08	TAC	ACC	GAC	TTC
169	L252Y	A254T	Q311E	N434F	8.1071E-10	1.31E-08	TAC	ACC	GAG	TTC
170	L252Y	A254T	Q311F	N434F	7.086E-10	7.40E-09	TAC	ACC	TTC	TTC
171	L252Y	A254T	Q311G	N434F	7.2154E-10	5.62E-09	TAC	ACC	GGC	TTC

[0166]

ID No.	EU 넘버링 시스템에 따른 돌연변이				개과 FcRn 결합 친화도		코돈 사용			
	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4	pH6 에서 KD	pH7.4 에서 KD	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4
172	L252Y	A254T	Q311H	N434F	4.8161E-10	3.52E-09	TAC	ACC	CAC	TTC
173	L252Y	A254T	Q311I	N434F	5.1209E-10	5.08E-09	TAC	ACC	ATC	TTC
174	L252Y	A254T	Q311K	N434F	-	-	TAC	ACC	AAG	TTC
175	L252Y	A254T	Q311L	N434F	6.4178E-10	5.68E-09	TAC	ACC	CTG	TTC
176	L252Y	A254T	Q311M	N434F	6.886E-10	6.26E-09	TAC	ACC	ATG	TTC
177	L252Y	A254T	Q311N	N434F	6.7755E-10	4.64E-09	TAC	ACC	AAC	TTC
178	L252Y	A254T	Q311P	N434F	1.3674E-09	1.20E-08	TAC	ACC	CCC	TTC
179	L252Y	A254T	Q311R	N434F	3.9992E-10	6.02E-09	TAC	ACC	CGG	TTC
180	L252Y	A254T	Q311S	N434F	7.7973E-10	5.35E-09	TAC	ACC	AGC	TTC
181	L252Y	A254T	Q311T	N434F	7.2606E-10	5.97E-09	TAC	ACC	ACC	TTC
182	L252Y	A254T	Q311V	N434F	5.5237E-10	5.69E-09	TAC	ACC	GTG	TTC
183	L252Y	A254T	Q311W	N434F	2.1268E-10	1.77E-09	TAC	ACC	TGG	TTC
184	L252Y	A254T	Q311Y	N434F	3.0614E-10	2.68E-09	TAC	ACC	TAC	TTC
185	L252Y	A254T	Q311A	N434H	1.3554E-09	1.18E-08	TAC	ACC	GCC	CAC
186	L252Y	A254T	Q311C	N434H	1.3173E-09	1.47E-08	TAC	ACC	TGC	CAC
187	L252Y	A254T	Q311D	N434H	2.3266E-09	2.27E-08	TAC	ACC	GAC	CAC
188	L252Y	A254T	Q311E	N434H	2.3765E-09	1.78E-08	TAC	ACC	GAG	CAC
189	L252Y	A254T	Q311F	N434H	1.5886E-09	1.33E-08	TAC	ACC	TTC	CAC
190	L252Y	A254T	Q311G	N434H	1.6628E-09	1.69E-08	TAC	ACC	GGC	CAC
191	L252Y	A254T	Q311H	N434H	8.5647E-10	8.36E-09	TAC	ACC	CAC	CAC
192	L252Y	A254T	Q311I	N434H	1.2116E-09	1.14E-08	TAC	ACC	ATC	CAC
193	L252Y	A254T	Q311K	N434H	1.6435E-09	1.62E-08	TAC	ACC	AAG	CAC
194	L252Y	A254T	Q311L	N434H	1.2468E-09	1.09E-08	TAC	ACC	CTG	CAC
195	L252Y	A254T	Q311M	N434H	1.1023E-09	9.78E-09	TAC	ACC	ATG	CAC
196	L252Y	A254T	Q311N	N434H	1.4699E-09	9.88E-09	TAC	ACC	AAC	CAC
197	L252Y	A254T	Q311P	N434H	3.4488E-09	5.38E-08	TAC	ACC	CCC	CAC
198	L252Y	A254T	Q311R	N434H	1.034E-09	9.69E-09	TAC	ACC	CGG	CAC

[0167]

ID No.	EU 넘버링 시스템에 따른 돌연변이				개과 FcRn 결합 친화도		코돈 사용			
	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4	pH6 에서 KD	pH7.4 에서 KD	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4
199	L252Y	A254T	Q311S	N434H	1.4029E-09	9.69E-09	TAC	ACC	AGC	CAC
200	L252Y	A254T	Q311T	N434H	1.6654E-09	1.15E-08	TAC	ACC	ACC	CAC
201	L252Y	A254T	Q311V	N434H	1.3817E-09	1.15E-08	TAC	ACC	GTG	CAC
202	L252Y	A254T	Q311W	N434H	6.9637E-10	5.90E-09	TAC	ACC	TGG	CAC
203	L252Y	A254T	Q311Y	N434H	6.9522E-10	5.48E-09	TAC	ACC	TAC	CAC
204	L252Y	A254T	Q311A	N434R	1.6295E-09	1.02E-08	TAC	ACC	GCC	CGG
205	L252Y	A254T	Q311C	N434R	1.4752E-09	7.92E-09	TAC	ACC	TGC	CGG
206	L252Y	A254T	Q311D	N434R	2.4185E-09	1.73E-08	TAC	ACC	GAC	CGG
207	L252Y	A254T	Q311E	N434R	2.2791E-09	1.58E-08	TAC	ACC	GAG	CGG
208	L252Y	A254T	Q311F	N434R	1.7461E-09	1.17E-08	TAC	ACC	TTC	CGG
209	L252Y	A254T	Q311G	N434R	1.9607E-09	1.02E-08	TAC	ACC	GGC	CGG
210	L252Y	A254T	Q311H	N434R	1.0272E-09	6.64E-09	TAC	ACC	CAC	CGG
211	L252Y	A254T	Q311I	N434R	1.413E-09	8.04E-09	TAC	ACC	ATC	CGG
212	L252Y	A254T	Q311K	N434R	1.5216E-09	9.49E-09	TAC	ACC	AAG	CGG
213	L252Y	A254T	Q311L	N434R	1.2966E-09	7.42E-09	TAC	ACC	CTG	CGG
214	L252Y	A254T	Q311M	N434R	1.1557E-09	6.76E-09	TAC	ACC	ATG	CGG
215	L252Y	A254T	Q311N	N434R	1.7545E-09	1.00E-08	TAC	ACC	AAC	CGG
216	L252Y	A254T	Q311P	N434R	4.0339E-09	3.55E-08	TAC	ACC	CCC	CGG
217	L252Y	A254T	Q311R	N434R	8.6034E-10	6.88E-09	TAC	ACC	CGG	CGG
218	L252Y	A254T	Q311S	N434R	1.9273E-09	1.01E-08	TAC	ACC	AGC	CGG
219	L252Y	A254T	Q311T	N434R	1.7209E-09	8.98E-09	TAC	ACC	ACC	CGG
220	L252Y	A254T	Q311V	N434R	1.6688E-09	1.09E-08	TAC	ACC	GTG	CGG
221	L252Y	A254T	Q311W	N434R	1.0237E-09	5.29E-09	TAC	ACC	TGG	CGG
222	L252Y	A254T	Q311Y	N434R	7.1789E-10	4.73E-09	TAC	ACC	TAC	CGG
223	L252Y	A254T	Q311A	N434W	9.6356E-10	7.87E-09	TAC	ACC	GCC	TGG
224	L252Y	A254T	Q311C	N434W	8.3841E-10	1.17E-08	TAC	ACC	TGC	TGG
225	L252Y	A254T	Q311D	N434W	1.2555E-09	1.07E-08	TAC	ACC	GAC	TGG

[0168]

ID No.	EU 넘버링 시스템에 따른 돌연변이				개과 FcRn 결합 친화도		코돈 사용			
	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4	pH6 에서 KD	pH7.4 에서 KD	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4
226	L252Y	A254T	Q311E	N434W	1.1887E-09	1.25E-08	TAC	ACC	GAG	TGG
227	L252Y	A254T	Q311F	N434W	9.8069E-10	6.84E-09	TAC	ACC	TTC	TGG
228	L252Y	A254T	Q311G	N434W	1.0068E-09	5.48E-09	TAC	ACC	GGC	TGG
229	L252Y	A254T	Q311H	N434W	7.1116E-10	3.94E-09	TAC	ACC	CAC	TGG
230	L252Y	A254T	Q311I	N434W	8.8204E-10	5.83E-09	TAC	ACC	ATC	TGG
231	L252Y	A254T	Q311K	N434W	8.6719E-10	6.57E-09	TAC	ACC	AAG	TGG
232	L252Y	A254T	Q311L	N434W	5.8886E-10	4.09E-09	TAC	ACC	CTG	TGG
233	L252Y	A254T	Q311M	N434W	7.0697E-10	4.22E-09	TAC	ACC	ATG	TGG
234	L252Y	A254T	Q311N	N434W	7.5728E-10	4.62E-09	TAC	ACC	AAC	TGG
235	L252Y	A254T	Q311P	N434W	1.5297E-09	1.03E-08	TAC	ACC	CCC	TGG
236	L252Y	A254T	Q311R	N434W	4.0908E-10	3.73E-09	TAC	ACC	CGG	TGG
237	L252Y	A254T	Q311S	N434W	9.8647E-10	5.79E-09	TAC	ACC	AGC	TGG
238	L252Y	A254T	Q311T	N434W	7.5459E-10	4.90E-09	TAC	ACC	ACC	TGG
239	L252Y	A254T	Q311V	N434W	9.8759E-10	8.20E-09	TAC	ACC	GTG	TGG
240	L252Y	A254T	Q311W	N434W	3.6869E-10	1.89E-09	TAC	ACC	TGG	TGG
241	L252Y	A254T	Q311Y	N434W	4.8151E-10	3.17E-09	TAC	ACC	TAC	TGG
242	L252Y	A254T	Q311A	N434Y	8.247E-10	4.69E-09	TAC	ACC	GCC	TAC
243	L252Y	A254T	Q311C	N434Y	5.5363E-10	4.90E-09	TAC	ACC	TGC	TAC
244	L252Y	A254T	Q311D	N434Y	1.0526E-09	7.75E-09	TAC	ACC	GAC	TAC
245	L252Y	A254T	Q311E	N434Y	1.0156E-09	9.18E-09	TAC	ACC	GAG	TAC
246	L252Y	A254T	Q311F	N434Y	7.4997E-10	4.49E-09	TAC	ACC	TTC	TAC
247	L252Y	A254T	Q311G	N434Y	9.5585E-10	5.26E-09	TAC	ACC	GGC	TAC
248	L252Y	A254T	Q311H	N434Y	5.6626E-10	2.88E-09	TAC	ACC	CAC	TAC
249	L252Y	A254T	Q311I	N434Y	7.6121E-10	4.49E-09	TAC	ACC	ATC	TAC
250	L252Y	A254T	Q311K	N434Y	9.0335E-10	6.61E-09	TAC	ACC	AAG	TAC
251	L252Y	A254T	Q311L	N434Y	8.1441E-10	4.97E-09	TAC	ACC	CTG	TAC

[0169]

ID No.	EU 넘버링 시스템에 따른 돌연변이				개과 FcRn 결합 친화도		코돈 사용			
	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4	pH6 에서 KD	pH7.4 에서 KD	Mut#1	Mut#2	Mut#3	Mut#4
252	L252Y	A254T	Q311M	N434Y	7.8224E-10	4.53E-09	TAC	ACC	ATG	TAC
253	L252Y	A254T	Q311N	N434Y	8.3411E-10	4.06E-09	TAC	ACC	AAC	TAC
254	L252Y	A254T	Q311P	N434Y	1.4902E-09	1.59E-08	TAC	ACC	CCC	TAC
255	L252Y	A254T	Q311R	N434Y	6.0439E-10	4.17E-09	TAC	ACC	CGG	TAC
256	L252Y	A254T	Q311S	N434Y	9.1546E-10	5.03E-09	TAC	ACC	AGC	TAC
257	L252Y	A254T	Q311T	N434Y	9.3112E-10	4.77E-09	TAC	ACC	ACC	TAC
258	L252Y	A254T	Q311V	N434Y	9.8239E-10	6.28E-09	TAC	ACC	GTG	TAC
259	L252Y	A254T	Q311W	N434Y	3.1634E-10	1.93E-09	TAC	ACC	TGG	TAC
260	L252Y	A254T	Q311Y	N434Y	3.2729E-10	2.08E-09	TAC	ACC	TAC	TAC

LS = 낮은 신호, NBO = 결합이 관찰되지 않음.

[0170]

[0171] 이 결과는 다양한 위치에서 이루어진 돌연변이가 FcRn에 대한 IgG의 친화도에 현저한 효과를 갖는다는 것을 명확하게 보여준다.

[0172] **실시예 3**

[0173] **개에서 Fc 돌연변이체 IgG PK 연구**

[0174] 다양한 개과 IgG 점 돌연변이의 반감기 연장 효과를 나타내기 위해 약동학(PK) 연구를 수행하였다: (1) L252F; (2) L252R, N434H, Q311W; (3) L252R; (4) L252Y, N434Y, Q311W; (5) Q311W; (6) L252R, A254T, T256E, N434H; (7) 252Y, A254T 및 (8) L252M, A254S, E439K.

[0175] 표 5에 열거된 8개의 Fc 변형된 개과화 모노클로날 항체와 야생형 개과화 모노클로날 항체를 실험에

사용하였다. 8개의 Fc 변형된 개과화 모노클로날 항체를 단일 1 mg/kg 피하로 ~4세 비글개 (n=2)에 투여하였다. 리간드 결합 방법을 이용하여 이들 분자의 혈청 농도를 분석하였다.

[0176] 8 개의 Fc 변형된 개과 모노클로날 항체의 약동학적 특성을 Watson™의 도움으로 비분열 접근법(AUC 계산을 위한 선형 사다리꼴 규칙)을 사용하여 개들에서 평가하였다. 약물을 2차 및 3차 주사한 후 농도-시간 프로파일의 중첩에 대한 AUC의 보정을 포함하는 추가 계산을 Excel™으로 수행하였다. Excel™ 또는 Watson™을 이용하여 간단한 통계(평균, 표준편차, 변동계수)를 가진 집중시간 자료와 약동학 자료의 요약을 계산하였다. 다른 통계 분석은 실시하지 않았다.

[0177] 그 결과를 하기 표 5에 정리하였다.

표 5. 반감기 증가에 대한 돌연변이의 영향

돌연변이	mAb	처리	AUC (µg*일/mL)	AUC Extrap (µg*일/mL)	Cmax (µg/mL)	Tmax (일)	T1/2 (일)
L252F	ZTS-00530712	T01	241	263	6.63	5.0	23.0
L252R, N434H, Q311W	ZTS-00530713	T02	21.5	31.3	3.72	3.0	4.23
L252R	ZTS-00530714	T03	189	196	9.74	7.0	13.9
L252Y, N434Y, Q311W	ZTS-00530715	T04	0	0	0	-	-
Q311W	ZTS-00530716	T05	362	389	11.1	5.0	22.2
L252R, A254T, T256E, N434H	ZTS-00530717	T06	415	492	9.47	7.0	31.4
L252Y, A254T	ZTS-00530718	T07	404	475	8.71	14	27.8
L252M, A254S, E439K	ZTS-00530719	T08	413	461	11.1	7.0	25.3

ZTS-00530712, ZTS-00530713, ZTS-00530714, ZTS-00530715, ZTS-00530716, ZTS-00530717, ZTS-00530718 및 ZTS-00530719는 Fc 변형된 개과화 항-IL31 항체를 의미한다. 본원에서 논의된 ZTS-8183은 야생형 개과화 항-IL31 항체이다. 항-IL31 항체는 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 미국 특허 제 10,526,405 호; 제 10,421,807 호; 제 9,206,253 호; 제 8,790,651 호 참조.

[0178] 상기 결과는 Fc 영역의 특정 변형이 상기 표에 나타난 바와 같이 반감기에 상당한 영향을 미친다는 것을 입증한다. 구체적으로, 개과 IgG 점 돌연변이 (1) L252F; (2) L252R, N434H, Q311W; (3) L252R; (5) Q311W; (6) L252R, A254T, T256E, N434H; (7) L252Y, A254T; 및 (8) L252M, A254S, E439K 들이 야생형에 비해 반감기를 향상시키는데 효과적이다.

[0180] 야생형 mAb ZTS-8183의 반감기 (T1/2)는 ~ 11일이었다. 그러나, Fc 변형된 개과 모노클로날 항체, ZTS-00530712, ZTS-00530713, ZTS-00530714, ZTS-00530716, ZTS-00530717, ZTS-00530718 및 ZTS-00530719의 반감기(T1/2)는 각각 23.0, 4.23, 13.9, 22.2, 31.4, 27.8 및 25.3이었다.

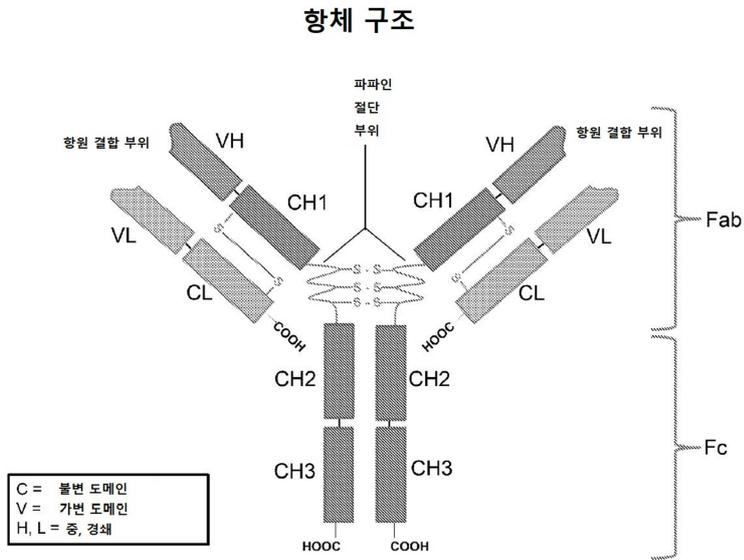
[0181] 상기 표 5 및 도 4에 나타난 바와 같이, Fc 변형된 개과 모노클로날 항체인 ZTS-00530715 (즉, 돌연변이 L252Y, N434Y, 및 Q311W의 조합)의 반감기 (T1/2)는 효과적이지 않다.

[0182] 요컨대, 이 결과는 개과 IgG 점 돌연변이 (1) L252F; (2) L252R, N434H, Q311W; (3) L252R; (5) Q311W; (6) L252R, A254T, T256E, N434H; (7) L252Y, A254T; 및 (8) L252M, A254S, E439K 들이 개과의 반감기를 향상시키는데 매우 효과적이라는 것을 명백하게 보여준다.

[0183] 본 발명의 바람직한 실시양태를 설명하였는데, 본 발명은 정확한 실시양태들에 한정되지 않으며, 첨부된 특허청구범위에 정의된 바와 같은 본 발명의 범위 또는 취지를 벗어나지 않고, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 다양한 변경 및 변형이 이루어질 수 있음을 이해하여야 한다.

도면

도면1



도면2a

좌색=CH1    부리색=흰지    피린색=CH2    녹색=CH4

>인간 lGG1\_EU 인덱스

118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148
A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	C	G	S	T	S	G	S	T	V	A	L	A	C	L	V	S	G

>개과 lGG\_A\_EU 인덱스

118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148
A	S	T	T	A	P	S	V	F	P	L	A	P	S	C	G	S	T	S	G	S	T	V	A	L	A	C	L	V	S	G

>개과 lGG\_B\_EU 인덱스

118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148
A	S	T	T	A	P	S	V	F	P	L	A	P	S	C	G	S	T	S	G	S	T	V	A	L	A	C	L	V	S	G

>개과 lGG\_C\_EU 인덱스

118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148
A	S	T	T	A	P	S	V	F	P	L	A	P	S	C	G	S	T	S	G	S	T	V	A	L	A	C	L	V	S	G

>개과 lGG\_D\_EU 인덱스

118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148
A	S	T	T	A	P	S	V	F	P	L	A	P	S	C	G	S	T	S	G	S	T	V	A	L	A	C	L	V	S	G

>인간 lGG1\_EU 인덱스

149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	
T	P	E	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	S	L	T	S	G	V	H	T	F	P	S	V	L	Q	S	S	G	L

>개과 lGG\_A\_EU 인덱스

149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	
T	P	E	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	S	L	T	S	G	V	H	T	F	P	S	V	L	Q	S	S	G	L

>개과 lGG\_B\_EU 인덱스

149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	
T	P	E	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	S	L	T	S	G	V	H	T	F	P	S	V	L	Q	S	S	G	L

>개과 lGG\_C\_EU 인덱스

149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	
T	P	E	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	S	L	T	S	G	V	H	T	F	P	S	V	L	Q	S	S	G	L

>개과 lGG\_D\_EU 인덱스

149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	
T	P	E	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	S	L	T	S	G	V	H	T	F	P	S	V	L	Q	S	S	G	L

도면2b

3

>인간 IgG1-EU 인덱스

180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	
Y	S	I	S	S	V	V	Y	V	P	S	S	I	S	Y	S	S	Y	Y	I	C	N	V	N	H	H	K	P	S	N	Y	K

>개과 IgGA-EU 인덱스

180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	
H	S	L	S	S	M	V	I	V	P	S	S	R	W	P	S	S	E	Y	F	I	C	N	V	V	H	P	A	S	H	Y	K

>개과 IgGB-EU 인덱스

180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	
Y	S	I	S	S	M	V	I	V	P	S	S	R	W	P	S	S	E	Y	F	I	C	N	V	A	H	P	A	S	K	Y	K

>개과 IgGC-EU 인덱스

180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	
Y	S	I	S	S	M	V	I	V	P	S	S	R	W	P	S	S	E	Y	F	I	C	N	V	A	H	P	A	S	K	Y	K

>개과 IgGD-EU 인덱스

180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	
Y	S	I	S	S	T	V	I	V	P	S	S	R	W	P	S	S	E	Y	F	I	C	N	V	V	H	P	A	S	H	Y	K

4

>인간 IgG1-EU 인덱스

211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241
V	D	K	P	K	V	E	P	A	S	C	D	K	F	H	Y	S	P	P	L	P	A	P	L	L	S	B	P	S	Y	F

>개과 IgGA-EU 인덱스

211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241
V	D	K	P	V	F	N	E	C	R	C	Y	D	T	I	P	P	C	P	Y	P	E	P	L	S	S	P	S	Y	L	

>개과 IgGB-EU 인덱스

211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241
V	D	K	P	V	P	K	R	E	R	G	R	V	P	R	P	P	D	C	P	K	C	P	A	P	E	R	L	S	G	

>개과 IgGC-EU 인덱스

211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241
V	D	K	P	V	A	K	E	C	E	C	K	C	N	C	N	N	C	P	C	P	C	C	L	L	S	G	P	S	G	

>개과 IgGD-EU 인덱스

211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241
V	D	K	P	V	P	K	E	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

도면2c

5

>인간 IgG1\_EU 인덱스

242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	
H	R	P	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K

>계파 IgGA\_EU 인덱스

242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	
I	P	R	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K

>계파 IgGB\_EU 인덱스

238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268
S	V	F	I	R	P	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K

>계파 IgGC\_EU 인덱스

240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	
V	F	I	R	P	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K

>계파 IgGD\_EU 인덱스

239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269
S	V	F	I	R	P	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K

6

>인간 IgG1\_EU 인덱스

273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303
V	K	F	S	W	Y	V	D	G	V	H	R	A	A	T	K	F	R	K	E	E	Q	Y	Q	B	T	Y	A	V	Y	

>계파 IgGA\_EU 인덱스

273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303
V	Q	I	S	W	F	V	D	G	V	H	R	A	A	T	K	F	R	K	E	E	Q	Y	Q	B	T	Y	A	V	Y	

>계파 IgGB\_EU 인덱스

269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299
E	D	P	E	V	Q	I	S	W	F	V	D	G	V	H	R	A	A	T	K	F	R	K	E	E	Q	Y	Q	B	T	Y

>계파 IgGC\_EU 인덱스

271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301
P	E	V	Q	I	S	W	F	V	D	G	V	H	R	A	A	T	K	F	R	K	E	E	Q	Y	Q	B	T	Y	A	V

>계파 IgGD\_EU 인덱스

270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
D	P	E	V	Q	I	S	W	F	V	D	G	V	H	R	A	A	T	K	F	R	K	E	E	Q	Y	Q	B	T	Y	A

도면2d

7																														
>인간 IgG1_EU 인덱스																														
304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334
E	V	L	F	V	L	H	C	D	W	L	R	G	K	E	Y	K	C	K	V	D	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K
>개과 IgGA_EU 인덱스																														
304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334
S	V	L	P	F	G	H	G	D	W	L	F	G	K	E	F	K	C	R	V	N	H	I	D	K	P	S	P	I	E	K
>개과 IgGB_EU 인덱스																														
300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330
V	K	V	S	V	L	P	F	G	H	G	D	W	L	K	C	R	V	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	P	I	E
>개과 IgGC_EU 인덱스																														
302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332
V	V	S	V	L	P	F	G	H	G	D	W	L	F	G	K	C	R	V	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	P	I
>개과 IgGD_EU 인덱스																														
301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331
E	V	S	V	L	P	F	G	H	G	D	W	L	T	G	K	C	R	V	N	H	I	D	K	P	A	P	I	E	K	P
B																														
>인간 IgG1_EU 인덱스																														
335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365
K	C	K	F	R	G	F	R	F	R	F	R	G	V	Y	E	I	P	P	C	D	E	E	L	T	K	W	Q	N	S	I
>개과 IgGA_EU 인덱스																														
335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	
Y	I	S	K	A	R	G	R	A	H	K	P	S	V	Y	V	I	P	P	S	P	K	E	L	S	S	S	C	I	V	S
>개과 IgGB_EU 인덱스																														
331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361
P	I	E	R	T	I	S	K	A	R	G	C	A	H	D	P	S	V	Y	V	I	P	P	S	R	E	E	L	S	K	N
>개과 IgGC_EU 인덱스																														
333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363
E	E	I	I	S	K	T	P	G	D	A	H	Q	P	N	V	Y	V	L	P	P	S	R	D	E	N	S	K	N	T	V
>개과 IgGD_EU 인덱스																														
332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362
F	E	R	T	I	S	K	A	R	G	Q	A	H	Q	P	S	V	Y	V	L	P	P	S	P	K	E	L	S	S	S	D

도면2e

9

>인간 IgG1-EU 인덱스

355	367	388	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396
Y	C	L	V	E	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	R	N	Y	K	T	T	P	P

>개체 IgGA-EU 인덱스

365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	
I	T	C	E	I	K	G	F	Y	P	F	Q	I	D	V	E	W	Q	S	N	B	Q	E	P	E	R	K	H	K	N

>개체 IgGB-EU 인덱스

362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	
Y	V	S	E	Y	C	E	I	K	D	F	F	P	P	D	I	D	V	E	W	Q	S	N	G	Q	E	P	E	S	K

>개체 IgGC-EU 인덱스

364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392
Y	L	T	C	L	V	K	D	F	F	P	E	F	D	V	E	W	Q	S	N	G	Q	E	P	E	S	K	Y	R

>개체 IgGD-EU 인덱스

363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390			
Y	V	T	E	Y	C	E	I	K	D	F	F	P	P	E	I	D	V	E	W	Q	S	N	G	Q	P	E	P	E	S	K

10

>인간 IgG1-EU 인덱스

397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427
Y	L	G	D	G	H	F	F	I	Y	S	F	I	V	D	K	S	R	W	Q	E	H	R	V	F	S	L	S	V		

>개체 IgGA-EU 인덱스

394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424
T	P	P	Q	L	G	E	G	S	Y	F	L	Y	S	K	L	S	V	D	K	S	R	W	Q	E	P	F	Y			

>개체 IgGB-EU 인덱스

391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421
Y	R	T	P	P	Q	L	G	E	D	G	S	Y	F	L	Y	S	K	L	S	V	D	K	S	R	W	Q	R	G	D	

>개체 IgGC-EU 인덱스

393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423
H	Y	P	P	Q	L	G	E	G	S	Y	F	L	Y	S	K	L	S	V	D	K	S	R	W	Q	R	G	D	Y	F	

>개체 IgGD-EU 인덱스

391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421
Y	H	T	A	P	Q	L	G	E	D	G	S	Y	F	L	Y	S	K	L	S	V	D	K	S	R	W	Q	R	G	D	E

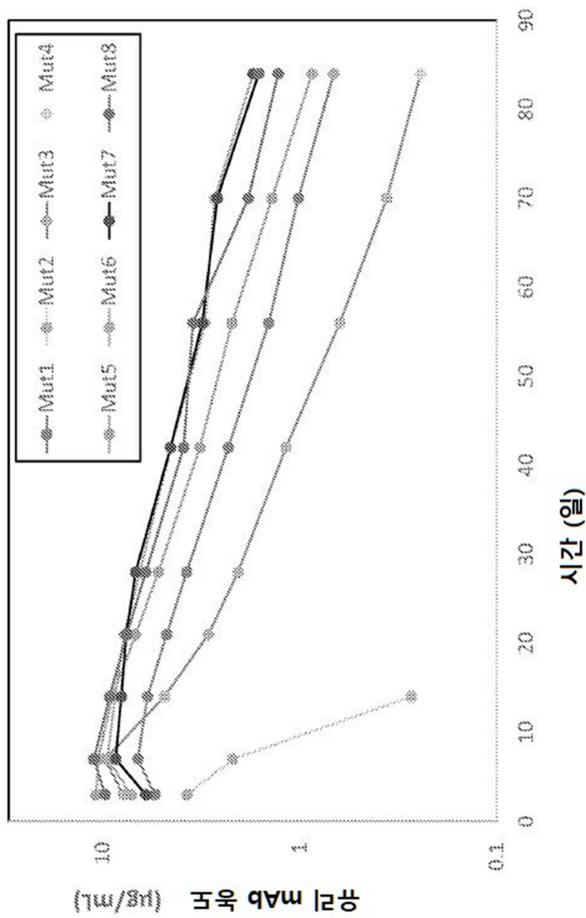
도면2f

>인간 IgG1_EU 인테스 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 S S I A I H R R H Y T Q R Q I S I S P Q R	
>개과 IgA_EU 인테스 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 C A V M R R E T I Q N R R Y T Q I S I S R S P Q R	
>개과 IgG_EU 인테스 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 I F I C A V M R R E A I H N R R Y T Q E S I S H S P Q R	
>개과 IgG_EU 인테스 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 I C A V M R R E A I H N R R Y T Q I S I S R S P Q R	
>개과 IgD_EU 인테스 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 I F T C A V M R R E A I Q N R R Y T Q E S I S H S P Q R	

도면3

개과	IgGB 65	분쇄	CH2-CH3 WT
GCTCCAGAAATGCTGGGAGGACCAAGCGTGTCATCTTTCCACCC AAGCCCAAAGACACTGCTGATTGCTAGAACTCCCAGGTGACC TGCGTGGTGGTGACCTGGATCCAGAGGACCCGAAGTGCAGATC TCCTGGTTCGTGGATGGAAGCAGATGCAGACAGCCAAAACCTCAG CCTCGGGAGGAACAGTTTAAACGGAACCTATAGAGTGGTGTCTGTG CTGCCAATTGGACACCAGGACTGGCTGAAGGGCAAACAGTTTACA TGCAAGGTGAACAACAAGGCCCTGCCTAGTCCAATCGAGAGGACT ATTTCAAAGCTAGGGGACAGGCTCATCAGCCTCCGTGTATGTGC TGCCATCCCGGGAGGAACCTGTCTAAGAACACAGTGAGTCTGA CTTGTCTGATCAAAGATTTCTTTCCCCTGACATTGATGTGGAGTG GCAGAGCAATGGGCAGCAGGAGCCAGAATCCAAGTACAGAACCA CACCACCCAGCTGGACGAAGATGGCTCCTATTTCTGTACAGTAA GCTGTCAAGTGCAGAACTAGGTGGCAGCGGGGATACCTTTAT CTGCGCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAATCATTACACAAGA AAGTCTGTCACATAGCCCCGGCAAG			

도면4



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Zoetis Services LLC

<120> MUTATIONS IN CANINE ANTIBODY CONSTANT REGIONS

<130> ZP000372A

<140> PCT/US2022/014146

<141> 2022-01-27

<140> US 63/142,774

<141> 2021-01-28

<160> 35

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 331

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> The Wildtype Canine IgG Constant Region

<400> 1

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

Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr  
                   20                    25                    30

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu His Ser  
                   50                    55                    60

Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr  
 65                    70                    75                    80

Phe Thr Cys Asn Val Val His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
                   85                    90                    95

Pro Val Phe Asn Glu Cys Arg Cys Thr Asp Thr Pro Pro Cys Pro Val  
                   100                    105                    110

Pro Glu Pro Leu Gly Gly Pro Ser Val Leu Ile Phe Pro Pro Lys Pro  
                   115                    120                    125

Lys Asp Ile Leu Arg Ile Thr Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
                   130                    135                    140

Leu Asp Leu Gly Arg Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val  
 145                    150                    155                    160

Asp Gly Lys Glu Val His Thr Ala Lys Thr Gln Ser Arg Glu Gln Gln  
                   165                    170                    175

Phe Asn Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln  
                   180                    185                    190

Asp Trp Leu Thr Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Asp  
                   195                    200                    205

Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Arg Ala  
                   210                    215                    220

His Lys Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser  
 225                      230                      235                      240  
 Ser Ser Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro  
                                  245                      250                      255  
 Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu  
                                  260                      265                      270

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

<210> 2

<211> 335

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> The Wildtype Canine IgGB Constant Region

<400> 2

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

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

85 90 95  
 Pro Val Pro Lys Arg Glu Asn Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys  
 100 105 110

Pro Lys Cys Pro Ala Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile  
 115 120 125

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Leu Ile Ala Arg Thr Pro Glu  
 130 135 140

Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu Asp Pro Glu Asp Pro Glu Val Gln  
 145 150 155 160

Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Gln Met Gln Thr Ala Lys Thr Gln  
 165 170 175

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 180 185 190

Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Gln Phe Thr Cys Lys  
 195 200 205

Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys  
 210 215 220

Ala Arg Gly Gln Ala His Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser  
 225 230 235 240

Arg Glu Glu Leu Ser Lys Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Ile Lys  
 245 250 255

Asp Phe Phe Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln  
 260 265 270

Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu  
 275 280 285

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

Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu  
 305 310 315 320

His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
 325 330 335

<210> 3

<211> 333

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> The Wildtype Canine IgGC Constant Region

<400> 3

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

1 5 10 15

Ser Gln Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr

20 25 30

Ile Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Val Ser Leu Thr Ser

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr

65 70 75 80

Phe Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Pro Val Ala Lys Glu Cys Glu Cys Lys Cys Asn Cys Asn Asn Cys Pro

100 105 110

Cys Pro Gly Cys Gly Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro

115 120 125

Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Val Thr Ala Arg Thr Pro Thr Val Thr

130 135 140

Cys Val Val Val Asp Leu Asp Pro Glu Asn Pro Glu Val Gln Ile Ser

145 150 155 160

Trp Phe Val Asp Ser Lys Gln Val Gln Thr Ala Asn Thr Gln Pro Arg

165 170 175

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

180 185 190

Gly His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Gln Phe Lys Cys Lys Val Asn





Asp Thr Phe Thr Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu Gln Asn His Tyr  
 305                      310                      315                      320  
 Thr Asp Leu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys

325                      330

<210> 5

<211> 1005

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<220><221> misc\_feature

<223> The Wildtype Canine IgGB constant domain - codon optimized.

<400> 5

gccagcacca cagctccctc cgtgttcccc ctggctccta gctgcggctc tacctccggc 60

agcacagtgg ccctggcttg tctggtgtcc ggctacttcc ctgagccagt gaccgtgagc 120

tggaactccg gtcacctgac ctccggagtg cacacatttc caagcgtgct gcagtcttcc 180

ggcctgtatt ctctgagctc tatggtgacc gtgccttcca gcaggtggcc atctgagaca 240

ttcacctgca acgtggccca tcccgttcc aagacaaagg tggacaagcc cgtgcctaag 300

agggagaatg gaaggtgccc ccggccccct gattgccccta agtgtccagc tccagagatg 360

ctgggaggac catccgtgtt catctttcca cccaagccca aggatacct gctgatcgct 420

agaaccctg aggtgacatg cgtggtgggt gacctggatc cagaggacc cagagtgacg 480

atctcttggg tctggtgatg caagcagatg cagaccgcca agacacagcc tagggaggag 540

cagtttaacg gcacctacag ggtggtgtcc gtgctgcca tcgccacca ggactggctg 600

aagggcaagc agtttacctg caaggtgaac aataaggctc tgccttctcc aatcgagaga 660

acaatctcca aggccagggg ccaggctcat cagcctagcg tgtacgtgct gcctccatcc 720

agagaggagc tgagcaagaa caccgtgtct ctgacatgct tgatcaagga tttctttccc 780

cctgacatcg atgtggagtg gcagagcaat ggccagcagg agccagagtc taagtatcgc 840

accacaccac cccagctgga cgaggatggc agctacttcc tgtatagcaa gctgtctgtg 900

gacaagtcta gatggcagcg cggcgatacc tttatctgtg ccgtgatgca cgaggcactg 960

cacaatcact acaccagga gactctgagc cacagcccag gaaaa 1005

<210> 6

<211> 1005

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<220><221> misc\_feature

<223> The wildtype canine IgGB constant domain

<400> 6

gctcaacaa ctgctcctag cgtgtttccc ctggccccta gctgcggaag tacctcaggc 60  
 agcacagtgg ccttggttg tctggtgtct ggatatttcc ctgagccagt gaccgtgagt 120  
 tggaacacgg gctctctgac ctccggggtg cacacatttc catctgtgct gcagtctagt 180  
 ggctgtact ccctgtcaag catggtgact gtgccttct ctaggtggcc atcagaaact 240

ttcacctgca acgtggccca tcccgccagc aagaccaaag tggacaagcc cgtgcctaaa 300  
 agggagaatg gaaggtgcc aagaccacct gattgcccta agtgtccagc tccagaaatg 360  
 ctgggaggac caagcgtgtt catctttcca ccaagccca aagacacact gctgattgct 420  
 agaactccc agtgacctg cgtggtggtg gacctggatc cagaggaccc cgaagtgcag 480  
 atctctggt tctggatgg gaagcagatg cagacagcca aaactcagcc tcgggaggaa 540  
 cagtttaacg gaacctatag agtgggtgtct gtgctgcaa ttggacacca ggactggctg 600  
 aagggcaaac agtttcatg caaggtgaac aacaaggccc tgcctagtcc aatcgagagg 660

actatttcaa aagctagggg acaggtcat cagccttccg tgtatgtgct gctccatcc 720  
 cgggaggaac tgtctaagaa cacagtgagt ctgacttgtc tgatcaaaga tttctttccc 780  
 cctgacattg attgtagtg gcagagcaat gggcagcagg agccagaatc caagtacaga 840  
 accacaccac ccagctgga cgaagatggc tcctatttcc tgtacagtaa gctgtcagtg 900  
 gacaaatcta ggtggcagcg cggggatacc tttatctgcg ccgtgatgca cgaggctctg 960  
 cacaatcatt acacacaaga aagtctgtca catagccccc gcaag 1005

<210> 7

<211> 98

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> The wildtype canine IgGB CH1 Domain

<400> 7

Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser

35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

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

<210> 8  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Canis familiaris  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <223> The wildtype canine IgGB Hinge Domain  
 <400> 8  
 Pro Lys Arg Glu Asn Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys Pro Lys

1 5 10 15  
 Cys Pro

<210> 9  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Canis familiaris  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <223> The wildtype canine IgGB CH2 Domain  
 <400> 9  
 Ala Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys  
 1 5 10 15  
 Pro Lys Asp Thr Leu Leu Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 20 25 30  
 Val Val Asp Leu Asp Pro Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe

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

100 105 110

<210> 10

<211> 109

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> The wildtype canine IgGB CH3 Domain

<400> 10

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

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

100 105

<210> 11

<211> 294

<212> DNA  
 <213> Canis familiaris  
 <220><221> misc\_feature  
 <223> The wildtype canine IgGB CH1 Domain  
 <400> 11  
 gcctcaaca ctgctcctag cgtgtttccc ctggccccta gctgcggaag tacctcaggc 60  
 agcacagtgg ccctggcctt tctgggtgtct ggatatttcc ctgagccagt gaccgtgagt 120  
 tggaacacgc gctctctgac ctccgggggtg cacacatttc catctgtgct gcagtctagt 180  
 ggctgtact ccctgtcaag catggtgact gtgccttct ctaggtggcc atcagaaact 240  
 ttcactgca acgtggccca tcccgccagc aagaccaaag tggacaagcc cgtg 294

<210> 12  
 <211> 54  
 <212> DNA  
 <213> Canis familiaris  
 <220><221> misc\_feature  
 <223> The wildtype canine IgGB Hinge Domain  
 <400> 12  
 cctaaaaggg agaatggaag ggtgccaaga ccacctgatt gccctaagtg tcca 54

<210> 13  
 <211> 330  
 <212> DNA  
 <213> Canis familiaris  
 <220><221> misc\_feature  
 <223> The wildtype canine IgGB CH2 Domain  
 <400> 13  
 gctccagaaa tgctgggagg accaagcgtg ttcattcttc cacccaagcc caaagacaca 60  
 ctgctgattg ctagaactcc cgaggtgacc tgcgtggtgg tggacctgga tccagaggac 120

cccgaagtgc agatctcctg gttcgtggat gggaagcaga tgcagacagc caaaactcag 180  
 cctcgggagg aacagtttaa cggaacctat agagtgggtg ctgtgctgcc aattggacac 240  
 caggactggc tgaagggcaa acagtttaca tgcaaggatga acaacaagc cctgcctagt 300  
 ccaatcgaga ggactatttc aaaagctagg 330

<210> 14  
 <211> 327

<212> DNA  
 <213> Canis familiaris  
 <220><221> misc\_feature  
 <223> The wildtype canine IgGB CH3 Domain  
 <400> 14  
 ggacaggctc atcagccttc cgtgtatgtg ctgcctccat cccgggagga actgtctaag 60  
 aacacagtga gtctgacttg tctgatcaaa gatttctttc cccctgacat tgatgtggag 120  
 tggcagagca atgggcagca ggagccagaa tccaagtaca gaaccacacc accccagctg 180  
 gacgaagatg gctcctatct cctgtacagt aagctgtcag tggacaaatc taggtggcag 240  
 cgcggggata ccittatctg cgccgtgatg cagcaggctc tgcacaatca ttacacaaa 300  
 gaaagtctgt cacatagccc cggcaag 327

<210> 15  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <223> The Wildtype Human IgG1 Constant Region

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

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 16

<211> 993

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<220><221> misc\_feature

<223> The Wildtype Canine IgGA Constant Region

<400> 16

```

gcctccacca cggcgccctc ggttttccca ctggcccca gctgctgggc cacttccggc      60
tccacgggtg cctggcctg cctggtgtca ggctacttcc cggagcctgt aactgtgtcc      120
tggaaactccg gtccttgac cagcgggtgtg cacaccttcc cgtccgtcct gcagtcctca      180
gggcttcaact ccctcagcag catggtgaca gtgccctcca gcaggtggcc cagcgagacc      240

ttcacctgca acgtggcca cccagccagc aacctaaag tagacaagcc agtgttcaat      300
gaatgcagat gcaactgata accccatgc ccagtcctg aacctctggg agggccttcg      360
gtcctcatct ttccccgaa acccaaggac atcctcagga ttaccggaac acccgaggtc      420
acctgtgtgg tgitagatct gggccgtgag gacctgagg tgcagatcag ctggttcgtg      480
gatggttaagg aggtgcacac agccaagacc cagtctcgtg agcagcagtt caacggcacc      540
taccgtgtgg tcagcgtcct ccccatgag caccaggact ggctcacagg gaaggagttc      600
aagtgcagag tcaaccacat agacctcccg tctcccatcg agaggacat ctctaaggcc      660

agagggaggg ccataagcc cagtgtgtat gtctgccc catcccaaa ggagtgtca      720
tccagtgaca cagtcagcat cacctgcctg ataaaagact tctaccacc tgacattgat      780
gtggagtggc agagcaatgg acagcaggag cccgagagga agcaccgcat gacccgccc      840
cagctggacg aggacgggtc ctacttctg tacagcaagc tctctgtgga caagaccgc      900
tggcagcagg gagaccctt cacatgtgcg gtgatgatg aaactctaca gaaccactac      960
acagatctat ccctctcca ttctccgggt aaa      993

```

<210> 17

<211> 999

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<220><221> misc\_feature

<223> The Wildtype Canine IgGC Constant Region

<400> 17

```

gcctccacca cggcgccctc ggttttccca ctggcccca gctgtgggtc ccaatccggc      60
tccacgggtg cctggcctg cctggtgtca ggctacatcc cggagcctgt aactgtgtcc      120
tggaaactccg ttccttgac cagcgggtgtg cacaccttcc cgtccgtcct gcagtcctca      180
gggcttcaact ccctcagcag catggtgaca gtgccctcca gcaggtggcc cagcgagacc      240

```

ttcacctgca atgtggccca cccggccacc aacctaaag tagacaagcc agtggccaaa 300  
 gaatgcgagt gcaagtgtaa ctgtaacaac tgcccatgcc caggttgtgg cctgctggga 360  
  
 gggccttcgg tcttcatctt tccccaaaa cccaaggaca tctctgtgac tgccccgaca 420  
 cccacagtca ctigtgtggt ggtggatctg gaccagaaa accctgaggt gcagatcagc 480  
 tggttctggt atagtaagca ggtgcaaca gccaacacgc agcctctgta ggagcagtc 540  
 aatggcacct accgtgtggt cagtgtctc cccattgggc accaggactg getttcaggg 600  
 aagcagttca agtgcaaagt caacaacaaa gcctcccat ccccatgga ggagatcatc 660  
 tccaagacc cagggcaggc ccatcagcct aatgtgtatg tctgcccgc atcgccggat 720  
 gagatgagca agaatacgtt caccctgacc tgtctggtca aagacttctt cccacctgag 780  
  
 attgatgtgg agtggcagag caatggacag caggagcctg agagcaagta ccgcatgacc 840  
 ccgccccage tggatgaaga tgggtcctac ttctataca gcaagctctc cgtggacaag 900  
 agcccgctggc agcggggaga caccttcata tgtgcggtga tgcatgaagc tctacacaac 960  
 cactacacac agatatacct ctcccattct cgggtaaa 999  
  
 <210> 18  
 <211> 993  
 <212> DNA  
 <213> Canis familiaris  
 <220><221> misc\_feature  
 <223> The Wildtype Canine IgGD Constant Region  
 <400> 18  
  
 gcctcacca cggcgccctc ggttttcca ctggcccca gctgcgggtc cacttccggc 60  
  
 tccacggtgg cctggcctg cctggtgtca ggetacttcc ccgagcctgt aactgtgtcc 120  
 tggaaactccg gctccttgac cagcgggtgtg cacaccttcc cgtccgtcct gcagtctca 180  
 gggctctact ccctcagcag cacggtgaca gtgccctcca gcaggtggcc cagcgagacc 240  
 ttcacctgca acgtggtcca cccggccagc aacctaaag tagacaagcc agtgcceaaa 300  
 gagtccacct gcaagtgtat atcccatgc ccagtcctg aatcactggg agggccttcg 360  
 gtcttcatct tcccccgaa acccaaggac atcctcagga ttaccggaac acccgagatc 420  
 acctgtgtgg tgitagatct gggccgtgag gaccctgagg tgcagatcag ctggttcgtg 480  
  
 gatggttaagg aggtgcacac agccaagacg cagcctctg agcagcagtt caacagcacc 540  
 taccgtgtgg tcagcgtcct ccccatgag caccaggact ggctcaccgg aaaggagttc 600  
 aagtgcagag tcaaccatc aggcctcccg tccccatcg agaggactat ctccaagcc 660

agagggaag cccatcagcc cagtgtgtat gtctgtccac catccccaaa ggagtgtca 720  
 tccagtgaca cggtcaccct gacctgcctg atcaaagact tcttcccacc tgagattgat 780  
 gtggagtggc agagcaatgg acagccggag cccgagagca agtaccacac gactgcgccc 840  
 cagctggacg aggacgggtc ctacttctg tacagcaagc tctctgtgga caagagccgc 900

tggcagcagg gagacacctt cacatgtgcg gtgatgcatg aagctctaca gaaccactac 960  
 acagatctat cectctccca ttctccgggt aaa 993

<210> 19

<211> 990

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> The Wildtype Human IgG1 Constant Region

<400> 19

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60  
 ggcacagcgg ccttgggctg cctgttcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg 120  
 tggaaactcag ggcacctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 180

ggactctact cctcagcag cgtgttgacc gtgccctcca gcagcttggg cacceagacc 240  
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300  
 aaatcttgtg acaaaactca cacatgcca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360  
 ccgtcagtct tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 420  
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480  
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540  
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 600

gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660  
 aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacacce tgccccatc cgggatgag 720  
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780  
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840  
 ctggactccg acggctcctt ctctcttac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900  
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa cactacacg 960  
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

<210> 20

<211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <220><221> misc\_feature  
 <223> Heavy Chain CDR1  
 <400> 20  
 aactacggca tgagc 15  
 <210> 21  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <223> Heavy Chain CDR1  
 <400> 21  
 Asn Tyr Gly Met Ser  
 1 5  
 <210> 22  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <220><221> misc\_feature  
 <223> Heavy Chain CDR2  
 <400> 22  
 accatcagct acggcggcag ctacacctac taccgccaca acatcaaggg c 51  
 <210> 23  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <223> Heavy Chain CDR2  
 <400> 23  
 Thr Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Ile Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 24  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <220><221> misc\_feature  
 <223> Heavy Chain CDR3  
 <400> 24  
 gtgcggggct acggctacga cacaatggac tac 33  
 <210> 25  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213>  
 Mus musculus  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <223> Heavy Chain CDR3  
 <400> 25  
 Val Arg Gly Tyr Gly Tyr Asp Thr Met Asp Tyr  
 1                    5                    10  
 <210> 26  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <220><221> misc\_feature  
 <223> Light Chain CDR1  
 <400> 26  
 aaggccagcc agagcgtgtc cttgccggc acaggcctga tgcac 45  
 <210> 27  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <223> Light Chain CDR1  
 <400> 27

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr Gly Leu Met His

1                    5                    10                    15

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc\_feature

<223> Light Chain CDR2

<400> 28

cgggccagca acctggaagc c

21

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> Light Chain CDR2

<400> 29

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala

1                    5

<210> 30

<211> 27

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><

221> misc\_feature

<223> Light Chain CDR3

<400> 30

cagcagagca gagagtaccc ctggacc

27

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> Light Chain CDR3

<400> 31

Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 32

<211> 657

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZTS-8183 - Variable Light Nucleic Acid Sequence - Caninized

<400> 32

gagatcgtga tgaccagag ccccgccagc ctgagcctga gccaggaaga gaaagtcacc 60

atcacatgca aggccagcca gagcgtgtcc ttcgccgga caggcctgat gcaactggtat 120

cagcagaagc ccggccaggc cccaagctg ctgatctacc gggccagcaa cctggaagcc 180

ggcgtgcaa gcagattcag cggcagcggc tccggcaccg acttcagctt caccatcagc 240

agcctcgaac ccgaggacgt ggccgtgtac tactgccagc agagcagaga gtaccctgg 300

accttcggcc aggtaccaa gctggaaatc aagcggaaac acgcccagcc cgccgtgtac 360

ctgttcagc ccagccccga tcagctgcac accggcagcg cttcagtcgt ctgcctgctg 420

aacagcttct accccaagga catcaactg aagtggaagg tggacggcgt gatccaggac 480

accggcatcc aggaaagcgt caccgagcag gacaaggaca gcacctacag cctgagcagc 540

acctgacca tgtccagcac cgagtacctg agccacgagc tgtatagctg cgagatcacc 600

cacaagagcc tgcttagcac cctgatcaag agcttccagc ggagcgagtg ctagtag 657

<210> 33

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZTS-8183 - Variable Light Amino Acid Sequence - Caninized

<400> 33

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Leu Ser Gln Glu

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala

20 25 30

Gly Thr Gly Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

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

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Phe Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg

85 90 95

Glu Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110

Asn Asp Ala Gln Pro Ala Val Tyr Leu Phe Gln Pro Ser Pro Asp Gln

115 120 125

Leu His Thr Gly Ser Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Ser Phe Tyr

130 135 140

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Val Asp Gly Val Ile Gln Asp

145 150 155 160

Thr Gly Ile Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Lys Asp Ser Thr Tyr

165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Met Ser Ser Thr Glu Tyr Leu Ser His

180 185 190

Glu Leu Tyr Ser Cys Glu Ile Thr His Lys Ser Leu Pro Ser Thr Leu

195 200 205

Ile Lys Ser Phe Gln Arg Ser Glu Cys

210 215

<210> 34

<211> 1365

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZTS-8183 - Variable Heavy Nucleic Acid Sequence - Caninized

<400> 34

gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgac ctggtcaagc ctggcggcag cctgagactg 60

agctgtgtgg ccagcggctt caccttcagc aactacggca tgagctgggt ccgacaggcc 120

cctggcaagg gactgcagtg ggtggccacc atcagctacg gcggcagcta cacctactac 180

cccgacaaca tcaagggccg gttcaccaac agccgggaca acgccaagaa caccctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcatgt actactgctg gcggggctac 300

ggctacgaca caatggacta ctggggccag ggcaccctcg tgaccgtctc gagcgcctca 360

acaactgctc ctagecgtgtt tcccctggcc cctagctgcg gaagtacctc aggcagcaca 420

gtggccctgg cttgtctggt gtctggatat ttccctgagc cagtgaccgt gatttggaa 480

agcggctctc tgacctcgg ggtgcacaca ttccatctg tgctgcagtc tagtggcctg 540

tactccctgt caagcatggt gactgtgcct tcctctaggt ggccatcaga aactttcacc 600

tgcaactgg cccatccgc cagcaagacc aaagtggaca agcccgtgcc taaaaggag 660

aatggaaggg tgccaagacc acctgattgc cctaagtgtc cagctccaga aatgctggga 720

ggaccaagcg tgttcatctt tccaccaag ccaaagaca cactgctgat tgctagaact 780

cccgagtgta cctcgtggt ggtggacctg gatccagagg accccgaagt gcagatctcc 840

tggttcgtgg atgggaagca gatgcagaca gccaaaactc agcctcggga ggaacagttt 900

aacggaacct atagagtgt gtctgtgctg ccaattggac accaggactg gctgaagggc 960

aaacagttta catgcaaggt gaacaacaag gcctgecta gtecaatcga gaggactatt 1020

tcaaaagcta ggggacaggc tcatcagcct tccgtgtatg tgctgcctcc atcccgggag 1080

gaactgtcta agaacacagt gagtctgact tctctgatca aagatttctt tcccctgac 1140

attgatgtgg agtggcagag caatgggcag caggagccag aatccaagta cagaaccaca 1200

ccaccccgagc tggacgaaga tggctcctat ttctgtaca gtaagctgtc agtggacaaa 1260

tctaggtggc agcgcgggga tacctttatc tgcgccgtga tgcacgaggc tctgcacat 1320

cattacacac aagaaagtct gtcacatagc cccggcaagt agtag 1365

<210> 35

<211> 453

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZTS-8183 - Variable Heavy Amino Acid Sequence - Caninized

<400> 35

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly

1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20                    25                    30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Val



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

Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu Lys Gly  
 305 310 315 320

Lys Gln Phe Thr Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile  
 325 330 335

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

Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Leu Ser Lys Asn Thr Val Ser  
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Phe Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu  
 370 375 380

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

Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 405 410 415

Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys Ala  
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His His His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser  
 435 440 445

His Ser Pro Gly Lys  
 450