



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2016-0089390  
 (43) 공개일자 2016년07월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 47/48* (2006.01) *A61K 38/55* (2006.01)  
*C07K 14/78* (2006.01) *C07K 14/81* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*A61K 47/48238* (2013.01)  
*A61K 38/55* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7015078
- (22) 출원일자(국제) 2014년12월09일  
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2015년06월07일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2014/076952
- (87) 국제공개번호 WO 2015/086548  
 국제공개일자 2015년06월18일
- (30) 우선권주장  
 13196356.3 2013년12월10일  
 유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인  
**에프. 호프만-라 로슈 아게**  
 스위스 체하-4070 바젤 그린자체스트라쎄 124
- (72) 발명자  
**조르쥬 기**  
 독일 82392 하바흐 암 베르그라벤 11  
**귀블러 마르셀**  
 스위스 체하-4144 아를레스하임 쥬네랄 귀상-슈트  
 라쎄 31  
**임호프-융 자비네**  
 독일 82152 플라넥 에겐호펜슈트라쎄 26베
- (74) 대리인  
**특허법인코리아나**

전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 **다중-하부단위 구조에 대한 약학적 활성 개체의 표적화 전달을 위한 다중-하부단위 구조의 하부단위의 결합 도메인의 용도**

**(57) 요약**

본원에서는, 생물학적 활성 개체를 다중-하부단위 구조에 표적화 전달하기 위한, 다중-하부단위 구조의 하부단위 및 하나의 생물학적 활성 개체의 접합체의 용도가 보고되어 있다.

(52) CPC특허분류

*A61K 47/48369* (2013.01)

*C07K 14/78* (2013.01)

*C07K 14/8132* (2013.01)

*C07K 2319/01* (2013.01)

*C07K 2319/30* (2013.01)

*C07K 2319/70* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

생물학적 활성 개체를 다중-하부단위 구조에 표적화 전달하기 위한, 다중-하부단위 구조의 하부단위의 결합 도메인 및 하나의 생물학적 활성 개체의 접합체의 용도.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 하부단위의 결합 도메인이 다중-하부단위 구조와 가역적으로 결합하며 이와 분리될 수 있는 것을 특징으로 하는 용도.

#### 청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 결합 도메인이 다중-하부단위 구조의 두 번째로 큰 하부단위이거나 다중-하부단위 구조의 최소 하부단위인 하부단위로부터의 것임을 특징으로 하는 용도.

#### 청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 다중-하부단위 구조가 2-하부단위 구조 또는 3-하부단위 구조 또는 4-하부단위 구조인 것을 특징으로 하는 용도.

#### 청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 다중-하부단위 구조가 다중-하부단위 단백질인 것을 특징으로 하며, 이때 적어도 하나의 하부단위 또는 모든 개별 하부단위가 서로 비공유적으로 결합하는 용도.

#### 청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 활성 개체가 치료적 활성 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는 용도.

#### 청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 접합체가 재조합 접합체인 것을 특징으로 하는 용도.

#### 청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 접합체가 N-말단에서 C-말단 방향으로 생물학적 활성 개체 및 다중-하부단위 구조의 하부단위의 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

#### 청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 접합체가 항체 Fc-부위를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

#### 청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 다중-하부단위 구조의 하부단위의 결합 도메인이 비트로넥틴(vitronectin)의 SMB 도메인이고 생물학적 활성 개체가 PAI-1의 반응성 중심 루프(RCL)인 것을 특징으로 하는 용도.

#### 청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 접합체가 N-말단에서 C-말단 방향으로 비트로넥틴의 SMB 도메인 및 하나의 PAI-1의 반응성 중심 루프(RCL) 및 항체 Fc-부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

#### 청구항 12

약학적 활성 폴리펩티드의 작용 부위가 다중-하부단위 단백질 상에 있으며 하나의 약학적 활성 폴리펩티드가 다중-하부단위 단백질의 하부단위의 결합 도메인에 접합되는 것을 특징으로 하는, 약학적 활성 폴리펩티드를 작용 부위에 표적화 전달하는 방법.

**청구항 13**

제 12 항에 있어서, 하부단위의 결합 도메인이 다중-하부단위 단백질과 가역적으로 결합하며 이와 분리될 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 14**

제 12 항 또는 제 13 항에 있어서, 하부단위가 다중-하부단위 단백질의 두 번째로 큰 하부단위이거나 다중-하부단위 단백질의 최소 하부단위인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 15**

제 12 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서, 다중-하부단위 단백질이 2-하부단위 단백질 또는 3-하부단위 단백질 또는 4-하부단위 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 16**

제 12 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서, 다중-하부단위 단백질의 적어도 하나의 하부단위 또는 모든 개별 하부단위가 서로 비공유적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 17**

제 12 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서, 접합체가 재조합 접합체인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 18**

제 12 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서, 접합체가 N-말단에서 C-말단 방향으로 약학적 활성 폴리펩티드 및 다중-하부단위 구조의 하부단위의 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 19**

제 12 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항에 있어서, 접합체가 항체 Fc-부위를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 20**

제 12 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서, 다중-하부단위 구조의 하부단위의 결합 도메인이 비트로넥틴의 SMB 도메인이고 약학적 활성 폴리펩티드가 PAI-1 의 반응성 중심 루프 (RCL) 인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 21**

제 12 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항에 있어서, 접합체가 N-말단에서 C-말단 방향으로 비트로넥틴의 SMB 도메인 및 하나의 PAI-1 의 반응성 중심 루프 (RCL) 및 항체 Fc-부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본원은 표적화 및 페이로드 (payload) 전달 개체로서 다중-하부단위 구조의 하부단위의 결합 도메인을 사용하여 상기 다중-하부단위 구조 상의 그의 작용 부위에 약학적 활성 개체를 직접 표적화 전달하는 방법을 보고하고 있다.

**배경 기술**

[0002] WO 2002/24219 에서는, 성장 인자, 성장 인자 결합 단백질 및 비트로넥틴을 포함하는 단리된 단백질 복합체를

보고하고 있다. 또한, 상처 치유, 피부 회복 및 조직 대체 치료요법의 목적으로 상기 단백질 복합체를 투여하여 세포 증식 및/또는 이동을 조정하는 방법을 보고하고 있다.

- [0003] WO 2009/033095 에서는, PAI-1 을 이의 잠재적 형태로 변환시키는 인간화 항-PAI-1 항체 및 이의 항원-결합 단편의 조성물을 보고하고 있다. 보고된 또 다른 양상은 PAI-1 을 이의 잠재적 형태로 변환시키거나 단백질분해성 절단을 증가시킴으로써 PAI-1 에 결합하고 이를 중화시키는 항체에 관한 것이다. 보고된 또 다른 양상은 PAI-1 또는 이의 조합과 연관된 질환 또는 병상의 검출, 진단 또는 치료를 위한, PAI-1 를 저해하거나 중화시키는 인간화 항체의 용도에 관한 것이다.
- [0004] WO 2009/131850 에서는 PAI-1 발현 또는 PAI-1 활성을 저해하는 작용제를 포함하는 유효량의 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 환자에서의 녹내장 또는 상승 IOP 의 치료 방법을 보고하고 있다.
- [0005] 모두는 아니지만 많은 표적화 전달을 위한 접근 방식이 중 제한의 결점을 가지며, 즉 중 교차-반응성 접근 방식은 예를 들어 실험 동물에서의 대리물 연구용으로 거의 알려지지 않았다.
- [0006] 모두는 아니지만 많은 표적화 전달을 위한 접근 방식은 특정 표적에 특이적이다.
- [0007] WO 2009/089059 에서는 PAI-1 기능의 치료적 저해제 및 그의 사용 방법을 보고하고 있다. WO 2012/085076 은 uPAR-안타고니스트 및 이의 용도를 보고하고 있다. WO 2012/035034 에서는 세린-펩티드 폴리펩티드 및 제 2 펩티드를 포함하는 융합 폴리펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질 및 이러한 폴리펩티드의 용도를 보고하고 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0008] 다중-하부단위 단백질과 같은 다중-하부단위 구조의 하부단위의 결합 도메인이 치료적 활성 개체, 예를 들어 저해 폴리펩티드를 상기 다중-하부단위 구조에 표적화 전달하는데 사용될 수 있다는 것이 발견된 바 있다.
- [0009] 다중-하부단위 구조의 하부단위에서 유래한 결합 도메인의 특이적 결합 상호작용이 결합 도메인에 접합된 치료적 활성 개체의 표적화 전달에 사용될 수 있다는 것이 발견된 바 있다.

**과제의 해결 수단**

- [0010] 본원에 보고된 바와 같은 용도 및 방법은 다중-하부단위 구조의 개별 하부단위 사이에 존재하는 특이적 결합 상호작용, 특히 그의 특이적 인식 특성의 탐색을 기반으로 한다. 치료적 활성 개체를 전체 크기 하부단위에 접합할 수 있으나, 재조합체 생성 및 허용가능한 용량으로의 적용이 가능하도록 접합체의 크기를 감소시키는 것이 유리하다. 따라서, 다중-하부단위 구조의 다른 하부단위에 대한 적절한 인식 및 표적화를 위한 하부단위의 결합 도메인만을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0011] 본원에 보고되고 있는 바와 같은 한 양상은, 다중-하부단위 구조에 대한 생물학적 활성 개체의 표적화 전달을 위한 다중-하부단위 구조의 하부단위의 결합 도메인 및 (정확하게) 1 개의 생물학적 활성 개체의 접합체의 용도이다.
- [0012] 한 구현예에서 하부단위의 결합 도메인은 다중-하부단위 구조와 가역적으로 결합하며 이와 분리될 수 있다.
- [0013] 한 구현예에서 결합 도메인은 다중-하부단위 구조의 두 번째로 큰 하부단위 또는 다중-하부단위 구조의 최소 하부단위인 하부단위로부터의 것이다.
- [0014] 한 구현예에서 다중-하부단위 구조는 2-하부단위 구조 또는 3-하부단위 구조 또는 4-하부단위 구조이다.
- [0015] 한 구현예에서 다중-하부단위 구조는, 적어도 한 하부단위 또는 모든 개별 하부단위가 서로 비공유 결합하는 다중-하부단위 단백질이다.
- [0016] 한 구현예에서 생물학적 활성 개체는 약학적 활성 개체이다. 한 구현예에서 생물학적 활성 개체는 치료적 활성 폴리펩티드이다.
- [0017] 한 구현예에서 접합체는 재조합 접합체이다.
- [0018] 한 구현예에서 접합체는 반감기 연장 개체를 추가로 포함한다. 한 구현예에서 반감기 연장 개체는 폴리(에틸렌 글리콜), 인간 혈청 알부민 또는 이의 단편, 및 항체 Fc-부위에서 선택된다.

- [0019] 한 구현예에서 결합 도메인 및 치료적 활성 폴리펩티드 및 반감기 연장 개체는 서로 독립적으로, 직접 또는 펩티드 링커를 통해 서로 접합된다.
- [0020] 본원에 보고된 바와 같은 접합체에서 단일 생물학적 활성 개체의 효능이 PAI-1 의 잠복을 유도하기에 충분하다는 것이 발견되었다.
- [0021] 한 구현예에서 접합체는 N-말단에서 C-말단 방향으로 생물학적 활성 개체 및 다중-하부단위 구조의 하부단위의 결합 도메인을 포함한다.
- [0022] 한 구현예에서 접합체는 항체 Fc-부위를 추가로 포함한다. 한 구현예에서 항체 Fc-부위는 접합체의 C-말단에 있다.
- [0023] 접합체에서의 생물학적 활성 개체의 효능이, 인간 IgG 중쇄 Fc-부위가 IgG1 하위부류이고 위치 221 (SEQ ID NO: 01 ~ SEQ ID NO: 12 의 위치 1 에 상응) 에서 아스파르트로 시작하는 경우, 예를 들어 위치 217 (인간 IgG1 의 Kabat EU 인덱스에 따라 번호화) 에서 프롤린으로 시작하는 인간 IgG 중쇄 Fc-부위와 비교하여 향상된다는 것이 발견되었다. 한 구현예에서 인간 IgG 중쇄 Fc-부위는 Asp221 로부터 중쇄의 카르복실-말단까지 확장된다. 한 바람직한 구현예에서 중쇄 Fc-부위는 SEQ ID NO: 01 ~ SEQ ID NO: 12 로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열을 갖는다.
- [0024] 한 구현예에서 다중-하부단위 구조의 하부단위의 결합 도메인은 비트로넥틴의 SMB 도메인이며 생물학적 활성 개체는 PAI-1 의 반응성 중심 루프 (Reactive Center Loop) (RCL) 이다.
- [0025] 한 구현예에서 접합체는 N-말단에서 C-말단 방향으로 비트로넥틴의 SMB 도메인 및 하나의 PAI-1 의 반응성 중심 루프 (RCL) 및 항체 Fc-부위를 포함한다.
- [0026] 본원에서 보고된 바와 같은 한 양상은 하기를 특징으로 하는, 비-공유 결합 다중-하부단위 단백질의 하부단위의 결합 도메인 및 생물학적 활성 폴리펩티드의 재조합적으로 생성된 접합체이다:
- [0027] - 다중-하부단위 단백질은 2-하부단위 단백질이고 하부단위는 다중-하부단위 단백질의 더 작은 하부단위이거나,
- [0028] - 다중-하부단위 단백질은 3-하부단위 단백질이고 하부단위는 다중-하부단위 단백질의 최소 또는 두 번째로 큰 하부단위이거나,
- [0029] - 다중-하부단위 단백질은 4-하부단위 단백질이고 하부단위는 다중-하부단위 단백질의 최소 또는 두 번째로 작거나 두 번째로 큰 하부단위이다.
- [0030] 본원에 보고된 바와 같은 한 양상은 생물학적 활성 폴리펩티드를 그의 작용 부위에 표적화 전달하는 방법이며, 이는 생물학적 활성 폴리펩티드의 작용 부위가 다중-하부단위 단백질 상에 있으며 (정확하게) 1 개의 생물학적 활성 폴리펩티드가 다중-하부단위 단백질의 하부단위의 결합 도메인에 접합되는 것을 특징으로 한다.
- [0031] 한 구현예에서 하부단위의 결합 도메인은 다중-하부단위 단백질과 가역적으로 결합하며 이와 분리될 수 있다.
- [0032] 한 구현예에서 하부단위는 다중-하부단위 단백질의 두 번째로 큰 하부단위이거나 다중-하부단위 단백질의 최소 하부단위이다.
- [0033] 한 구현예에서 다중-하부단위 단백질은 2-하부단위 단백질 또는 3-하부단위 단백질 또는 4-하부단위 단백질이다.
- [0034] 한 구현예에서 다중-하부단위 단백질의 적어도 하나의 하부단위 또는 모든 개별 하부단위는 서로 비-공유 결합한다.
- [0035] 한 구현예에서 생물학적 활성 폴리펩티드는 치료적 활성 폴리펩티드이다.
- [0036] 한 구현예에서 접합체는 재조합 접합체이다.
- [0037] 한 구현예에서 접합체는 반감기 연장 개체를 추가로 포함한다. 한 구현예에서 반감기 연장 개체는 폴리(에틸렌 글리콜), 인간 혈청 알부민 또는 이의 단편, 및 항체 Fc-부위에서 선택된다.
- [0038] 한 구현예에서 결합 도메인 및 치료적 활성 폴리펩티드 및 반감기 연장 개체는 서로 독립적으로 직접 또는 펩티드 링커를 통해 서로 접합된다.

**도면의 간단한 설명**

- [0039] **도 1:** PAI-1 의 반응성 중심 루프 (RCL), 비트로넥틴의 SMB 도메인 및 인간 Fc-부위를 포함하는 접합체의 일반적 구조; 1: PAI-1 의 반응성 중심 루프, 2: 펩티드 링커, 3: SMB 도메인, 4: Fc-부위.
- 도 2:** PAI-1 의 반응성 중심 루프 (RCL), 비트로넥틴의 SMB 도메인 및 인간 Fc-부위 및 PAI-1 및 비트로넥틴의 2-하부단위 구조를 포함하는 접합체로 예시화된, 본원에 보고된 바와 같은 접합체의 작용 방식.
- 도 3:** 비-글리코실화 인간 PAI-1 에 대한 효과의 용량-반응 곡선.
- 도 4:** 글리코실화 인간 PAI-1 에 대한 효과의 용량-반응 곡선.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0040] **발명의 상세한 설명**

[0041] 본원에 보고된 바와 같은 용도 및 방법은 다중-하부단위 구조의 개별 하부단위 사이에 존재하는 특이적 결합 상호작용, 특히 그의 특이적 인식 특성의 탐색을 기반으로 한다. 치료적 활성 개체를 전체 크기 하부단위에 접합할 수 있으나, 재조합체 생성 및 허용가능한 용량으로의 적용이 가능하도록 접합체의 크기를 감소시키는 것이 유리하다. 따라서, 다중-하부단위 구조의 다른 하부단위에 대한 적절한 인식 및 표적화를 위한 하부단위의 결합 도메인만을 사용하는 것이 바람직하다.

[0042] 단수형 표현은 하나 또는 하나 초과 (즉, 하나 이상) 의 단수형 표현의 문법적 대상을 지칭하는데 사용된다. 예를 들어, "항체" 는 하나의 항체 또는 하나 초과항체를 의미한다.

[0043] 용어 "하나 이상" 은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상을 나타낸다. 용어 "둘 이상" 은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상을 나타낸다.

[0044] 용어 "생물학적 활성 개체" 는 유기 분자, 예를 들어, 조류 또는 포유동물, 예컨대 인간을 비제한적으로 포함하는 동물에게 생체내, 또는 세포주 및 바이러스를 사용하는 생물검정법과 같은 인공 생물학적 시스템 내에 또는 상기 시스템에 투여되는 경우 생물학적 효과를 초래하는, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 당단백질, 핵단백질, 뮤코단백질, 지단백질, 합성 폴리펩티드 또는 합성 단백질과 같은 생물학적 거대분자를 나타낸다. 이러한 생물학적 효과는 효소 저해 또는 활성화, 수용체 또는 리간드에 대한 결합 (결합 부위에서 또는 주변에서), 신호 촉발 또는 신호 조정일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 생물학적 활성 폴리펩티드는 비제한적으로, 예를 들어 면역글로불린, 또는 호르몬, 또는 사이토카인, 또는 성장 인자, 또는 수용체 리간드, 또는 아고니스트 또는 안타고니스트, 또는 세포독성제, 또는 항바이러스제, 또는 조영제 (imaging agent), 또는 효소 저해제, 효소 활성제 또는 효소 활성 조절제 예컨대 알로스테릭 (allosteric) 물질이다. 한 구현예에서 생물학적 활성 개체는 생물학적 활성 폴리펩티드이다. 한 구현예에서 생물학적 활성 폴리펩티드는 치료적 활성 폴리펩티드이다. 한 구현예에서 치료적 활성 폴리펩티드는 선형 폴리펩티드이며 10 내지 250 개 아미노산 잔기의 길이이다. 한 구현예에서 치료적 활성 폴리펩티드는 10 내지 100 개 아미노산 잔기의 길이이다. 한 구현예에서 치료적 활성 폴리펩티드는 10 내지 50 개 아미노산 잔기의 길이이다. 한 구현예에서 생물학적 활성 개체는 전체 항체 경쇄 또는 중쇄, 또는 scFv 또는 scFab 또는 단일 도메인 항체, 또는 단일 사슬 항체이다.

[0045] 생물학적 활성 개체의 결합 도메인에 대한 "접합" 은 화학적 수단에 의해 및 재조합적으로 수행될 수 있다. 재조합 접합을 위해, 생물학적 활성 개체의 인코딩 핵산 및 결합 도메인은 직접 또는 판독 프레임 내에서 인접한 링커 펩티드를 인코딩하는 개체 서열과 함께 연결된다. 화학적 접합을 위해, 생물학적 활성 개체 및 결합 도메인은 화학적 결합, 또는 특이적 결합 쌍을 통한 결합과 같은 상이한 방법에 의해 접합될 수 있다. 한 구현예에서 화학적 접합은 N-말단 및/또는 ε-아미노기 (리신), 상이한 리신의 ε-아미노기, 복합체 일부의 아미노산 서열의 카르복시-, 술폰히드릴-, 히드록실-, 및/또는 페놀성 관능기, 및/또는 복합체의 탄수화물 구조의 당 알코올기를 통한 화학적 결합에 의해 수행된다. 한 구현예에서 생물학적 활성 개체는 특이적 결합 쌍을 통해 결합 도메인에 접합된다.

[0046] 본원의 용어 "Fc-부위" 는 불변부의 적어도 일부를 함유하는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 부위를 정의하는데 사용된다. 상기 용어는 선천적 서열 Fc-부위 및 변이체 Fc-부위를 포함한다. 한 바람직한 구현예에서 인간 IgG 중쇄 Fc-부위는 Asp221 에서 중쇄의 카르복실-말단까지 확장된다. 그러나, C-말단 리신 (Lys447) 또는 말단 글리신 (Gly476) 및 Fc-부위의 리신 (Lys477) 은 존재할 수 있거나 존재하지 않을 수 있다. 본원에서 다르게 명시하지 않는 한, Fc-부위 또는 불변부에서의 아미노산 잔기의 번호화는 [Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242] 에서 기재한 바와 같은 EU 번호화 시스템 (EU 인



텍스로도 지칭)에 따른다. "Fc-부위"는 널리 공지되어 있는 용어이며 항체 중쇄의 과파인 절단을 기초로 하여 정의될 수 있다. 본원에 보고된 바와 같은 접합체는 한 구현예에서 인간 Fc-부위 또는 인간 기원에서 유래한 Fc-부위를 포함할 수 있다. 추가 구현예에서 Fc-부위는 Fc $\gamma$  수용체 (예를 들어 Fc $\gamma$ RIIIa) 결합 및/또는 C1q 결합이 검출될 수 없는 방식으로 개질되는 하위부류 IgG1, IgG2 또는 IgG3의 인간 항체의 Fc-부위 또는 하위부류 IgG4의 인간 항체의 Fc-부위이다. 한 구현예에서 Fc-부위는 인간 Fc-부위이며 특히 인간 IgG4 하위부류의 것이거나 인간 IgG1 하위부류로부터의 돌연변이화 Fc-부위이다. 한 구현예에서 Fc-부위는 돌연변이 L234A 및 L235A를 갖는 인간 IgG1 하위부류로부터의 것이다. IgG4가 감소된 Fc $\gamma$  수용체 (Fc $\gamma$ RIIIa) 결합을 나타내지만, 다른 IgG 하위부류의 항체는 강력한 결합을 나타낸다. 그러나 Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (Fc 탄수화물 손실), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 및/또는 His435는, 변경되는 경우 또한 감소된 Fc $\gamma$  수용체 결합을 제공하는 잔기이다 (Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., et al., FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; EP 0 307 434). 한 구현예에서 본원에 보고된 바와 같은 접합체는 IgG4 하위부류 또는 IgG1 또는 IgG2 하위부류 (L234, L235 및/또는 D265에서 돌연변이를 가짐)의 Fc $\gamma$  수용체 결합에 관련되고/되거나 PVA236 돌연변이를 함유한다. 한 구현예에서 돌연변이는 S228P, L234A, L235A, L235E 및/또는 PVA236 (PVA236은 IgG1의 아미노산 위치 233 ~ 236으로부터의 아미노산 서열 ELLG (1 글자 아미노산 코드로 주어짐) 또는 IgG4의 EFLG가 PVA에 의해 대체되는 것을 나타냄)이다. 한 구현예에서 돌연변이는 IgG4의 S228P이고, IgG1의 L234A 및 L235A이다. 항체의 Fc-부위는 ADCC (항체-의존적 세포-매개 세포독성) 및 CDC (보체-의존적 세포독성)에 직접적으로 관련된다. Fc $\gamma$  수용체 및/또는 보체 인자 C1q에 결합하지 않는 복합체는 항체-의존적 세포매개 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체 의존적 세포독성 (CDC)을 이끌어내지 않는다.

[0047] IgG1 동형의 야생형 인간 Fc-부위의 폴리펩티드 사슬은 하기의 아미노산 서열을 갖는다:

```
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 01).
```

[0048]

[0049] 돌연변이 L234A를 갖는 IgG1 동형의 변이체 인간 Fc-부위의 폴리펩티드 사슬에 있어서, L235A는 하기의 아미노산 서열을 갖는다:

```
DKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 02).
```

[0050]

[0051] T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이를 갖는 IgG1 동형의 변이체 인간 Fc-부위의 폴리펩티드 사슬은 하기의 아미노산 서열을 갖는다:

```
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 03).
```

[0052]

[0053] T366W 돌연변이를 갖는 IgG1 동형의 변이체 인간 Fc-부위의 폴리펩티드 사슬은 하기의 아미노산 서열을 갖는다:

```
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 04).
```

[0054]

[0055] L234A, L235A 및 T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 갖는 IgG1 동형의 변이체 인간 Fc-부위의 폴리펩티드 사슬은 하기의 아미노산 서열을 갖는다:



DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE  
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV  
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 05).

[0056]

L234A, L235A 및 T366W 돌연변이를 갖는 IgG1 동형의 변이체 인간 Fc-부위의 폴리펩티드 사슬은 하기의 아미노산 서열을 갖는다:

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE  
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 06).

[0058]

P329G 돌연변이를 갖는 IgG1 동형의 변이체 인간 Fc-부위의 폴리펩티드 사슬은 하기의 아미노산 서열을 갖는다:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE  
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 07).

[0060]

L234A, L235A 및 P329G 돌연변이를 갖는 IgG1 동형의 변이체 인간 Fc-부위의 폴리펩티드 사슬은 하기의 아미노산 서열을 갖는다:

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE  
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 08).

[0062]

P239G 및 T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 갖는 IgG1 동형의 변이체 인간 Fc-부위의 폴리펩티드 사슬은 하기의 아미노산 서열을 갖는다:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE  
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 09).

[0064]

P329G 및 T366W 돌연변이를 갖는 IgG1 동형의 변이체 인간 Fc-부위의 폴리펩티드 사슬은 하기의 아미노산 서열을 갖는다:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE  
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 10).

[0066]

L234A, L235A, P329G 및 T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 갖는 IgG1 동형의 변이체 인간 Fc-부위의 폴리펩티드 사슬은 하기의 아미노산 서열을 갖는다:

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE  
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11).

[0068]

L234A, L235A, P329G 및 T366W 돌연변이를 갖는 IgG1 동형의 변이체 인간 Fc-부위의 폴리펩티드 사슬은 하기의 아미노산 서열을 갖는다:

[0069]

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE  
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGN  
VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 12).

[0070]

IgG4 동형의 야생형 인간 Fc-부위의 폴리펩티드 사슬은 하기의 아미노산 서열을 갖는다:

ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED  
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN  
VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 13).

[0072]

S228P 및 L235E 돌연변이를 갖는 IgG4 동형의 변이체 인간 Fc-부위의 폴리펩티드 사슬은 하기의 아미노산 서열을 갖는다:

ESKYGPPCPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED  
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN  
VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 14).

[0074]

S228P, L235E 및 P329G 돌연변이를 갖는 IgG4 동형의 변이체 인간 Fc-부위의 폴리펩티드 사슬은 하기의 아미노산 서열을 갖는다:

ESKYGPPCPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED  
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  
KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN  
VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 15).

[0076]

S228P, L235E, P329G 및 T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 갖는 IgG4 동형의 변이체 인간 Fc-부위의 폴리펩티드 사슬은 하기의 아미노산 서열을 갖는다:

ESKYGPPCPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED  
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  
KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLCAVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN  
VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 16).

[0078]

S228P, L235E, P329G 및 T366W 돌연변이를 갖는 IgG4 동형의 변이체 인간 Fc-부위의 폴리펩티드 사슬은 하기의 아미노산 서열을 갖는다:

ESKYGPPCPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED  
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  
KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN  
VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 17).

[0080]

용어 "펩티드 링커" 는 천연 및/또는 합성 기원의 아미노산 서열을 나타낸다. 이는 20 개의 자연 발생적 아미노산이 단량체성 빌딩 블록 (building block) 인 선형 아미노산으로 이루어진다. 펩티드 링커는 1 내지 50 개 아미노산의 길이이고, 한 구현예에서는 1 내지 28 개 아미노산의 길이이고, 추가의 구현예에서는 2 내지 25 개 아미노산의 길이이다. 펩티드 링커는 자연 발생적 폴리펩티드의 서열 또는 반복성 아미노산 서열을 함유할 수 있다. 링커는 개체가 적절히 제시되게 함으로써 서로 접합된 개체가 그의 생물학적 활성을 수행할 수 있다는 것을 보장하기 위한 기능을 갖는다. 한 구현예에서 펩티드 링커는 글리신, 글루타민 및/또는 세린 잔기가 풍부하다. 이러한 잔기는 예를 들어 GS (SEQ ID NO: 18), GGS (SEQ ID NO: 19), GGG (SEQ ID NO: 20) 및 GGGG (SEQ ID NO: 21) 와 같은 5 개 이하의 아미노산의 소규모 반복성 단위로 배열된다. 소규모 반복성 단위는 1 내지 5 회 반복될 수 있다. 단량체성 단위의 아미노- 및/또는 카르복시-말단 끝에서 6 개 이하의 추가적인 임의의, 자연 발생적 아미노산이 첨가될 수 있다. 기타 합성 펩티드 링커는 10 내지 20 회 반복되는 단일 아미노산으로 이루어지며 아미노- 및/또는 카르복시-말단 끝에서 6 개 이하의 추가적인 임의

[0081]

의, 자연 발생적 아미노산을 포함할 수 있다. 모든 펩티드 링커는 핵산 분자에 의해 인코딩될 수 있으며, 따라서 재조합적으로 발현될 수 있다. 링커 자체가 펩티드이므로, 링커에 의해 연결된 폴리펩티드는 2 개 아미노산 사이에 형성되는 펩티드 결합을 통해 링커에 연결된다.

[0082] 용어 "폴리 (에틸렌 글리콜)" 은 필수 부분으로서 폴리 (에틸렌 글리콜) 을 함유하는 비-단백질성 잔기를 나타낸다. 이러한 폴리 (에틸렌 글리콜) 잔기는 결합 반응에 필요한 추가의 화학기를 함유할 수 있는데, 이는 분자의 화학적 합성으로 인한 것이거나, 분자 부분의 최상의 거리에 대한 스페이서이다. 이러한 추가의 화학기는 폴리 (에틸렌 글리콜) 잔기의 분자량 계산에 사용되지 않는다. 또한, 이러한 폴리 (에틸렌 글리콜) 잔기는 함께 공유 연결되는 하나 이상의 폴리 (에틸렌 글리콜) 사슬로 이루어질 수 있다. 1 개 초과 PEG 사슬을 갖는 폴리 (에틸렌 글리콜) 잔기는 다중-부분 (multi-armed) 또는 분지형 폴리 (에틸렌 글리콜) 잔기로 지칭된다. 분지형 폴리 (에틸렌 글리콜) 잔기는 예를 들어 폴리에틸렌 옥시드를 각종 폴리올, 에컨대 글리세롤, 펜타에리트리올 및 소르비톨에 첨가하여 제조될 수 있다. 분지형 폴리 (에틸렌 글리콜) 잔기는 예를 들어 EP 0 473 084, US 5,932,462 에 보고되어 있다. 한 구현예에서 폴리 (에틸렌 글리콜) 잔기는 분자량이 20 kDa 내지 35 kDa 이며 선형 폴리 (에틸렌 글리콜) 잔기이다. 또 다른 구현예에서 폴리 (에틸렌 글리콜) 잔기는 분자량이 35 kDa 내지 40 kDa 인 분지형 폴리 (에틸렌 글리콜) 잔기이다.

[0083] "폴리펩티드" 는 자연적으로 생성되는지 합성적으로 생성되는지 여부에 따라 펩티드 결합에 의해 연결되는 아미노산으로 이루어지는 중합체이다. 약 20 개 미만 아미노산 잔기의 폴리펩티드는 "펩티드" 로서 지칭될 수 있는 한편, 100 개 초과 아미노산 잔기의 하나의 폴리펩티드를 포함하거나 둘 이상의 폴리펩티드로 이루어지는 분자는 "단백질" 로 지칭될 수 있다. 폴리펩티드는 또한 비-아미노산 성분, 예컨대 탄수화물기, 금속 이온 또는 카르복실산 에스테르를 포함할 수 있다. 비-아미노산 성분은 폴리펩티드가 발현되는 세포에 의해 첨가될 수 있으며, 세포 유형에 따라 가변적일 수 있다. 본원에서 폴리펩티드는 그의 아미노산 백본 구조 또는 이를 인코딩하는 핵산에 관련하여 정의된다. 탄수화물기와 같은 부가물은 일반적으로 명시되지 않으나, 존재할 수 있다.

[0084] 한 구현예에서 생물학적 활성 개체는 치료적 활성 폴리펩티드이다. 용어 "치료적 활성 폴리펩티드" 는 인간 치료제로서의 승인용 임상 연구에서 시험되며 질환 치료를 위해 개인에게 투여될 수 있는 폴리펩티드를 나타낸다.

[0085] 당업자에게 공지되어 있는 바와 같이 재조합 DNA 기술을 사용하여 핵산 및/또는 폴리펩티드의 수많은 유도체를 생성할 수 있다. 이러한 유도체는 예를 들어 치환, 변경, 교환, 결실 또는 삽입에 의해 하나의 개별 또는 여러 위치에서 개질될 수 있다. 개질 또는 유도체화는 예를 들어 위치 지정 돌연변이유발에 의해 실행될 수 있다. 이러한 개질은 당업자에 의해 용이하게 실행될 수 있다 (예를 들어 Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA (1999) 참조). 재조합 기술을 사용하여, 당업자는 다양한 숙주 세포를 외인성 (이종) 핵산(들) 으로 형질전환할 수 있다. 상이한 세포의 전사 및 번역 (즉, 발현) 기구가 동일한 요소를 사용하지만, 상이한 종류에 속하는 세포는 다른 것들 중에서도 상이한 소위 코돈 사용빈도 (codon usage) 를 가질 수 있다. 그에 따라 동일한 폴리펩티드 (아미노산 서열에 관하여) 는 상이한 핵산(들) 에 의해 인코딩될 수 있다. 또한, 유전 코드의 퇴화로 인해, 상이한 핵산이 동일한 폴리펩티드를 인코딩할 수 있다 (예를 들어, Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA (1999); Hames, B.D., and Higgins, S.J., Nucleic acid hybridization - a practical approach, IRL Press, Oxford, England (1985) 참조).

[0086] 유전자 발현은 일시적 또는 영구적 발현으로서 수행된다. 관심 폴리펩티드(들) 는 일반적으로 분비된 폴리펩티드이며 따라서 세포 벽을 통해 세포의 매질로 폴리펩티드를 이동/분비하는데 필요한 N-말단 확장물 (신호 서열로도 알려져 있음) 을 함유한다. 일반적으로, 신호 서열은 분비된 폴리펩티드를 인코딩하는 임의의 유전자에서 유래할 수 있다. 이종 신호 서열이 사용되는 경우, 이는 바람직하게는 숙주 세포에 의해 인지되고 처리되는 (즉, 신호 펩티다아제에 의해 절단됨) 것이다. 효모에서의 분비를 위해 예를 들어 발현될 이종 유전자의 선천적 신호 서열은 분비된 유전자에서 유래한 상동 효모 신호 서열, 예컨대 효소 인버타아제 신호 서열, 알파-인자 리더 (예컨대 사카로마이세스 (Saccharomyces), 클루이베로마이세스 (Kluyveromyces), 피키아 (Pichia) 및 한세놀라 (Hansenula) α-인자 리더, 두 번째 것은 US 5,010,182 에 기재되어 있음), 산 포스파타아제 신호 서열, 또는 C. 알비칸스 (C. albicans) 글루코아미라아제 신호 서열 (EP 0 362 179) 에 의해 치환될 수 있다. 포유류 세포 발현에서, 예를 들어 인간 또는 쥐과 기원의 면역글로불린에 대한 동일하거나 관련된 종류의 분비된 폴리펩티드로부터의 신호 서열 뿐 아니라 바이러스 분비성 신호 서열, 예를 들어 단순포진 당단

백질 D 신호 서열과 같은 다른 포유류 신호 서열이 적합할 수 있으나, 관심 단백질의 선천적 신호 서열이면 만족스럽다. 이러한 예비 (pre) 조각을 인코딩하는 DNA 단편은 프레임 내에서 라이게이션되며, 즉 관심 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 단편에 작동가능하게 연결된다.

- [0087] 폴리펩티드는 진핵 및 원핵 세포, 예컨대 CHO 세포, HEK 세포 및 대장균 (E.coli) 에서 재조합적으로 생성될 수 있다. 폴리펩티드가 원핵 세포에서 생성되는 경우, 이는 일반적으로 불용성 봉입체의 형태로 수득된다. 봉입체는 원핵 세포 및 배양 배지로부터 용이하게 회수될 수 있다. 봉입체 중 불용성 형태로 수득되는 폴리펩티드는 정제 전에 가용화되어야 하고/하거나 재-폴딩 (folding) 절차가 실행될 수 있다.
- [0088] 상이한 방법이 잘 확립되어 있고 단백질 정제에 널리 사용되고 있으며, 예컨대 미생물 단백질로의 친화성 크로마토그래피 (예를 들어 단백질 A 또는 단백질 G 친화성 크로마토그래피), 이온 교환 크로마토그래피 (예를 들어 양이온 교환 (술포프로필 또는 카르복시메틸 수지), 음이온 교환 (아미노 에틸 수지) 및 혼합-방식 이온 교환), 황친화성 흡착 (예를 들어 베타-머캅토에탄올 및 기타 SH 리간드 사용), 소수성 상호작용 또는 방향족 흡착 크로마토그래피 (예를 들어 페닐-세파로오스, 아자-아레노필릭 (arenophilic) 수지, 또는 m-아미노페닐보론산 사용), 금속 킬레이트 친화성 크로마토그래피 (예를 들어 Ni(II)- 및 Cu(II)-친화성 물질 사용), 크기 배제 크로마토그래피 및 전기영동 방법 (예컨대 겔 전기영동, 모세관 전기영동) 이 있다 (예를 들어, Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102 참조).
- [0089] 다중-하부단위 구조, 예를 들어 다중-하부단위 단백질의 하부단위의 결합 도메인이, 치료적 활성 개체, 예를 들어 저해 폴리펩티드를 다중-하부단위 구조에 표적화 전달하는데 사용될 수 있다는 것이 발견되었다.
- [0090] 다중-하부단위 구조의 하부단위에서 유래한 결합 도메인의 특이적 결합 상호작용이 결합 도메인에 접합된 치료적 활성 개체의 표적화 전달에 사용될 수 있다는 것이 발견되었다.
- [0091] 본원에서 보고된 바와 같은 한 양상은 생물학적 활성 개체를 다중-하부단위 구조에 표적화 전달하기 위한, 다중-하부단위 구조의 하부단위의 결합 도메인 및 생물학적 활성 개체의 접합체의 용도이다.
- [0092] 자연 발생적 하부단위를 본원에서 보고된 바와 같은 접합체로 대체하기 위해, 바람직하게는 이러한 다중-하부단위 구조가 표적화될 수 있으며 여기서 하부단위가 가역적으로 결합하거나 분리될 수 있다. 따라서 한 구현예에서, 하부단위의 결합 도메인은 다중-하부단위 구조와 가역적으로 결합하며 이와 분리될 수 있다.
- [0093] 다중-하부단위 구조의 전체 결합을 방해하지 않기 위해, 결합 도메인이 그로부터 가능한 한 작은 것으로 유래되는 하부단위를 선택하는 것이 유리하다. 한 구현예에서 결합 도메인은 다중-하부단위 구조의 두 번째로 큰 하부단위 또는 다중-하부단위 구조의 최소 하부단위인 하부단위로부터의 것이다.
- [0094] 환자 순환계에서의 본원에 보고된 바와 같은 접합체의 치료적으로 적절한 수준을 확립하기 위해서는 일 또는 주 범위의 반감기를 갖는 것이 바람직하다. 따라서 한 구현예에서, 접합체는 반감기 연장 개체를 추가로 포함한다. 한 구현예에서 반감기 연장 개체는 폴리(에틸렌 글리콜), 인간 혈청 알부민 또는 이의 단편, 및 항체 Fc-부위에서 선택된다.
- [0095] 본원에 보고된 바와 같은 한 양상은 하기를 특징으로 하는, 비-공유 결합된 다중-하부단위 단백질의 하부단위의 결합 도메인 및 생물학적 활성 폴리펩티드의 재조합적 생성 접합체이다:
- [0096] - 다중-하부단위 단백질은 2-하부단위 단백질이고 하부단위는 다중-하부단위 단백질의 더 작은 하부단위이거나,
- [0097] - 다중-하부단위 단백질은 3-하부단위 단백질이고 하부단위는 다중-하부단위 단백질의 최소 또는 두 번째로 큰 하부단위이거나,
- [0098] - 다중-하부단위 단백질은 4-하부단위 단백질이고 하부단위는 다중-하부단위 단백질의 최소 또는 두 번째로 작거나 두 번째로 큰 하부단위임.
- [0099] 본원에 보고된 바와 같은 한 양상은 생물학적 활성 폴리펩티드를 그의 작용 부위에 표적화 전달하는 방법이며, 이는 생물학적 활성 폴리펩티드의 작용 부위가 다중-하부단위 단백질 상에 있으며 생물학적 활성 폴리펩티드가 다중-하부단위 단백질의 하부단위의 결합 도메인에 접합되는 것을 특징으로 한다.
- [0100] 본 발명은 다음에서, 치료적 활성 폴리펩티드로서 PAI-1 의 반응성 중심 루프, 결합 도메인으로서 비트로넥틴의 SMB 도메인, 및 반감기 증가를 위한 Fc-부위를 포함하는 접합체로 예시된다. 이러한 예시는 본원에 보고된 방법의 범주 제한을 나타내지 않으며 이는 단지 본원에 제시한 바와 같은 개념의 예시로서 존재한다.



- [0101] PAI-1 은 플라스미노겐 활성화 캐스케이드에 관련되는 세린 프로테아제의 2 가지 유형, 즉 조직 플라스미노겐 활성화제 (tPA) 및 유로키나아제 플라스미노겐 활성화제 (uPA) 를 비가역적으로 저해하는, 분비된 50 kDa 당단백질이다. 이러한 기능에 있어서, PAI-1 은 지혈 (혈액 응고 및 섬유소 용해) 뿐 아니라 조직 리모델링 (세포의 매트릭스의 턴오버 (turnover) 및 분해) 을 제어한다. 더욱이, 비트로넥틴 (VN) 에 결합한 경우, PAI-1 은 또한 트롬빈 활성화 캐스케이드를 방해함으로써 강력한 항응고제로서 기능하는 또 다른 세린 프로테아제인 활성화 단백질 C (APC) 를 저해한다. 그의 항응고제 활성화에 추가로, APC 는 염증 억제, 세포자멸사 방지 및 내피 장벽 기능의 안정화를 포함하는 광범위한 세포-보호 작용을 발휘한다.
- [0102] 정상적 생리 상태에서, PAI-1 은 신장 조직에서 저수준으로 발현된다. 그러나 병리학적 조건 하에, 상주 신장 세포 및 침윤성 염증 세포 모두에 의한 PAI-1 합성이 급성 및 만성 인간 신장 질환에서 발생한다. 본 발명자는 상승된 PAI-1 활성의 약리학적 저해가 두 가지 방식으로 이득을 제공할 수 있다는 것을 제기하였다: i) 만성 섬유화 신장 질환에서의 세포의 매트릭스의 보다 동적인 턴오버를 유도하기 위한 플라스미노겐 활성화의 억제 해제 및 ii) 특히 급성 신장 상해에서의 항-염증 및 세포-보호 기능을 촉진하기 위한 PAI-1-매개 APC 불활성화의 방지.
- [0103] PAI-1-매개 질환의 치료를 위한 일반적인 근본 개념은, 잠복 상태 형성 촉진에 의해 활성 저해 PAI-1 의 양을 감소시키고/시키거나 PAI-1 에 대한 비트로넥틴 (VN) 결합을 저해하는 것이다.
- [0104] 잠복 상태 형성을 촉진시키기 위해, PAI-1 의 반응성 중심 루프 (RCL), 비트로넥틴의 SMB 도메인 및 인간 Fc-부위를 포함하는 접합체를 생성시켰다. 이러한 접합체의 일반적 구조를 도 1 에 나타내며 작용 방식을 도 2 에 나타낸다.
- [0105] 본원에 보고된 바와 같은 본 발명에 따른 접합체의 시험관내/생체내 효능을 평가하기 위해서, PAI-1 잠복 유도 항체를 사용하였다 (예를 들어 US 2009/0081239 참조). 항체-관련 효과기가 필요/바람직하지 않으므로, 사용한 항체는 돌연변이 SPLE (S228P L235E) 를 갖는 인간 IgG4 하위부류의 것이었다. 참조 항체는 하기에서 쥐과 IgG1 Fc-부위의 경우 PAI1-0001 로서, 및 인간 IgG4 SPLE Fc-부위의 경우 PAI1-0046 로서 지칭될 것이다:
- [0106] 항체 중쇄의 아미노산 서열은 하기의 것이다:
- ```

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWM
GWINTYTGPEPTYDDFKGRFTMTLDTSTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAK
DVSQGFVFDYWGQGLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTC
NVDHKPSNTKVKDRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS

```
- [0107]
- ```

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNYHTQKSLSLSLGK

```
- [0108] (SEQ ID NO: 22).
- [0109] 항체 경쇄의 아미노산 서열은 하기의 것이다.
- ```

DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLNIIKQKNCLAWYQQKPGQPPK
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPY
TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVT
HQGLSSPVTKSFNRGEC

```
- [0110] (SEQ ID NO: 23).
- [0111] 본원에 보고된 바와 같은 한 양상은 SEQ ID NO: 22 의 중쇄 가변 도메인의 중쇄 CDR 을 포함하며 SEQ ID NO: 23 의 경쇄 가변 도메인의 경쇄 CDR 을 포함하는 잠복 유도 항-인간 PAI-1 항체이다.
- [0112] 한 구현예에서 항체는 SEQ ID NO: 22 의 중쇄 가변 도메인 및 SEQ ID NO: 23 의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0113] 한 구현예에서 항체는 돌연변이 L234A, L235A 및 임의로는 P329G 를 갖는 인간 하위부류 IgG1 의 Fc-부위를 갖는다.
- [0114] 한 구현예에서 항체는 돌연변이 S228P, L235E 및 임의로는 P329G 를 갖는 인간 하위부류 IgG4 의 Fc-부위를 갖

는다.

- [0115] 본원에서 보고된 바와 같은 한 양상은 인간 비트로넥틴의 SMB 도메인 및 PAI-1 잠복 유도 폴리펩티드의 제조합적 생성 접합체이다.
- [0116] 한 구현예에서 잠복 유도 폴리펩티드는 GTVASSSTAVIVSAR (SEQ ID NO: 24) 의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0117] 바람직한 구현예에서 잠복 유도 폴리펩티드는 GTVASSSTAVIVSAS (SEQ ID NO: 25) 의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0118] 한 구현예에서 SMB 도메인은 ESCKGRCTEGFNVDKCKQCDELCSYYQSCCTDYTAEC (SEQ ID NO: 26) 의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0119] 한 구현예에서 접합체는 잠복 유도 폴리펩티드 및 SMB 도메인 사이에 펩티드 링커를 포함한다.
- [0120] 한 구현예에서 펩티드 링커는 25 내지 35 개 아미노산 잔기의 길이이다.
- [0121] 한 구현예에서 펩티드 링커는 (GGGS)<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 27) 이다.
- [0122] 한 구현예에서 접합체는 항체 Fc-부위를 추가로 포함한다.
- [0123] 한 구현예에서 항체 Fc-부위는 돌연변이 L234A, L235A 및 임의로는 P329G 를 갖는 인간 하위부류 IgG1 의 것이다.
- [0124] 한 구현예에서 항체 Fc-부위는 돌연변이 S228P, L235E 및 임의로는 P329G 를 갖는 인간 하위부류 IgG4 의 것이다.
- [0125] 한 구현예에서 접합체는 N- 에서 C-말단 방향으로 하기를 포함한다:
- [0126] - SEQ ID NO: 24 또는 25 의 PAI-1 잠복 유도 폴리펩티드,
- [0127] - SEQ ID NO: 27 의 펩티드 링커,
- [0128] - SEQ ID NO: 26 의 SMB 도메인,
- [0129] - SEQ ID NO: 07 또는 15 의 항체 Fc-부위.
- [0130] 한 구현예에서 접합체는 하기의 아미노산 서열을 갖는다:  
 GTVASSSTAVIVSARGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSECKGRCTEGFNVDK  
 KCQCDELCSYYQSCCTDYTAECDKTHTCPPELLGGPSVFLFPPKPKD  
 TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
 TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS  
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
 (SEQ ID NO: 28).
- [0131]
- [0132] 이러한 접합체를 하기에서 PAI1-0004 로 나타낸다.
- [0133] 한 구현예에서 접합체는 하기의 아미노산 서열을 갖는다:  
 GTVASSSTAVIVSARGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSECKG  
 RCTEGFNVDKCKQCDELCSYYQSCCTDYTAECDKTHTCPPELLGGPS  
 VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
 TPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA  
 KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  
 YKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS  
 LSLSPGK (SEQ ID NO: 29).
- [0134]
- [0135] 이러한 접합체를 하기에서 PAI1-0005 로 나타낸다.

[0136] 한 구현예에서 접합체는 하기의 아미노산 서열을 갖는다:

GTVASSSTAVIVSASGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSECKG  
 RCTEGFNVDKCKCQDELCSYYQSCCTDYTAECDKTHTCPPAPELLGGPS  
 VFLFPPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA  
 KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  
 YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKS  
 LSLSPGK (SEQ ID NO: 30).

[0137]  
 [0138] 이러한 접합체를 하기에서 PAI1-0036 로서 나타낸다.

[0139] 상기 나타낸 바와 같은 참조 항체 및 접합체를 실시예 1 에서 나타낸 PAI-1 저해 검정에서 시험하였다. 비-글리코실화 및 글리코실화 인간 PAI-1 에 대해 측정된 IC<sub>50</sub>-값을 하기 표에 나타낸다.

| 화합물       | 인간 PAI-1 에 대한 IC <sub>50</sub> (μM) |       |
|-----------|-------------------------------------|-------|
|           | 비-글리코실화                             | 글리코실화 |
| PAI1-0001 | 0.007                               | 0.116 |
| PAI1-0046 | 0.005                               | 0.065 |
| PAI1-0004 | 0.003                               | 0.002 |
| PAI1-0005 | 0.0005                              | 0.002 |
| PAI1-0036 | 0.001                               | 0.001 |

[0140]  
 [0141] 관찰할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 개념에 따른 접합체는 참조 항체로서 보다 강력한 잠복-유도 (저해) 화합물이다. 참조 항체가 글리코실화 인간 PAI-1 에 대해 낮은 친화성 (높은 IC<sub>50</sub> 값) 을 나타내는 반면, 본원에서 보고된 바와 같은 접합체는 인간 PAI-1 의 두 형태 모두, 즉 글리코실화 및 비-글리코실화 형태에 대해 비슷한 친화성을 나타내었다.

[0142] 상응하는 용량-반응 곡선을 도 3 및 4 에서 나타낸다.

[0143] 또한, 청구범위에서 단어 "포함하는" 은 다른 요소 또는 단계를 배제하지 않으며, 단수형 표현은 복수형 표현을 배제하지 않는다. 단일 단위는 청구범위에서 나열된 여러 특질의 기능을 수행할 수 있다. 속성 또는 값과 관련되는 용어 "본질적으로", "약", "대략" 등은 특히 또한 각각 정확히 그 속성 또는 정확히 그 값을 정의한다. 청구범위에서의 임의의 참조 기호가 범주를 제한하는 것으로서 해석되어서는 안된다.

[0144] 본 발명의 이해를 돕기 위해 하기의 실시예, 서열 및 도면을 제공하며, 이의 참된 범주를 첨부된 청구범위에서 나타낸다. 본 발명의 취지를 벗어나지 않고 나타낸 절차에 변형을 가할 수 있다는 것이 이해된다.

[0145] **실시예**

[0146] **실시예 1**

[0147] **융합 단백질의 생성**

[0148] **재조합 DNA 기법**

[0149] [Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989] 에서 기재한 바와 같이 DNA 를 조작하는데 표준 방법을 사용하였다. 분자 생물학적 시약은 제조사의 지시사항에 따라 사용하였다.

[0150] **유전자 합성**

[0151] 유전자 합성 단편을 소정의 명세에 따라 Geneart (Regensburg, Germany) 에서 주문하였다. RCL-SMB-Fc 융합 단백질을 인코딩하는 모든 유전자 조각을 리더 펩티드 (MGWSCIIILFLVATATGVHS) 를 코딩하는 5'-말단 DNA 서열로 합성하였는데, 이는 진핵 세포에서 분비용 단백질을 표적화하며 합성된 유전자의 5' 말단 및 3' 말단에서 고유한 제한 위치를 갖는다.

[0152] **DNA 서열 결정**

[0153] DNA 서열을, Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Germany) 에서 수행한 이중 가닥 서열분석에 의해 결정하였다.

[0154] **DNA 및 단백질 서열 분석 및 서열 데이터 관리**

[0155] GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) 소프트웨어 패키지 버전 10.2 및 Infomax Vector NT1



Advance suite 버전 11.0 을 서열 생성, 맵핑 (mapping), 분석, 주석화 (annotation) 및 설명에 사용하였다.

- [0156] 발현 벡터
- [0157] 기재된 융합 분자의 발현을 위해, CMV-인트론 A 프로모터를 갖는 cDNA 구조 기반의 일시적 발현용 (예를 들어 HEK293-F 세포에서의) 발현 플라스미드를 사용하였다.
- [0158] 항체 발현 카세트 외에 벡터에는 하기가 함유된다:
- [0159] - 대장균에서 이러한 플라스미드가 복제되게 하는 복제 기원, 및
- [0160] - 대장균에서 암피실린 저항성을 부여하는  $\beta$ -락타마아제 유전자.
- [0161] 항체 유전자의 전사 단위는 하기 요소로 구성된다:
- [0162] - 5' 말단에서의 고유한 제한 위치(들),
- [0163] - 인간 거대세포바이러스 (cytomegalovirus) 로부터의 급초기 (immediate early) 인핸서 및 프로모터,
- [0164] - 이후 인트론 A 서열,
- [0165] - 인간 항체 유전자의 5'-미번역 부위,
- [0166] - 면역글로불린 중쇄 신호 서열,
- [0167] - RCL, SMB 및 인간 항체 IgG1 힌지 및 도메인 CH2 및 CH3 의 융합 단백질에 대한 유전자.
- [0168] - 폴리아데닐화 신호 서열을 갖는 3'-미번역 부위, 및
- [0169] - 3' 말단에서의 고유한 제한 위치(들).
- [0170] 일시적이고 안정적인 트랜스펙션을 위해서, 형질전환된 대장균 배양물 (Nucleobond AX, Macherey-Nagel) 로부터의 플라스미드 제조에 의해 더 큰 분량의 플라스미드를 제조하였다.
- [0171] 세포 배양 기법
- [0172] [Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.] 에서 기재된 바와 같은 표준 세포 배양 기법을 사용하였다.
- [0173] HEK293-F 시스템에서의 일시적 트랜스펙션
- [0174] RCL-SMB-Fc 융합 단백질을 제조사의 지시사항 (Invitrogen, USA) 에 따라 FreeStyle™ 293 발현 시스템을 사용하여 인간 배아 신장 293-F 세포의 일시적 트랜스펙션에 의해 발현시켰다. 간략하게, 현탁액 FreeStyle™ 293-F 세포를 37°C/8 % CO<sub>2</sub> 에서 FreeStyle™ 293 발현 배지에서 배양하고, 세포를 트랜스펙션일에 1-2x10<sup>6</sup> 생균/ml 의 밀도로 새 배지에서 시딩하였다. 250 ml 최종 트랜스펙션 부피에 대하여 325  $\mu$ l 의 293fectin™ (Invitrogen, Germany) 및 500  $\mu$ g 의 플라스미드 DNA 를 사용하여, DNA-293fectin™ 복합체를 Opti-MEM® I 배지 (Invitrogen, USA) 중 에서 제조하였다. 세포 배양 상청액을 함유하는 융합 단백질을 14000 g 에서 30 분 동안 원심분리하여 트랜스펙션 7 일 후 수확하고, 멸균 필터 (0.22  $\mu$ m) 를 통해 여과하였다. 정제할 때까지 상청액을 -20°C 에서 저장하였다.
- [0175] 단백질 측정
- [0176] 정제된 융합 단백질의 단백질 농도를, [Pace et. al., Protein Science, 1995, 4, 2411-1423] 에 따른 아미노산 서열을 기초로 하여 계산한 몰 흡광 계수를 사용하여, 280 nm 에서 광학 밀도 (OD) 를 측정함으로써 측정하였다.
- [0177] 상청액에서의 융합 단백질 농도 측정
- [0178] 세포 배양 상청액에서의 융합 단백질 농도를 단백질 A-HPLC 크로마토그래피에 의해 측정하였다. 간략하게, 단백질 A 에 결합하는 융합 단백질을 함유하는 세포 배양 상청액을 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 7.3 중 HiTrap 단백질 A 컬럼 (GE Healthcare) 에 가하고, Dionex HPLC-System 에서 550 mM 아세트산, pH 2.5 으로 매

트릭스로부터 용리하였다. 용리한 단백질을 UV 흡광도 및 피크 면적의 적분에 의해 정량하였다. 정제된 표준 IgG1 항체가 표준으로서 역할하였다.

[0179] 융합 단백질의 정제

[0180] 융합 단백질을 단백질 A-Sepharose™ (GE Healthcare, Sweden) 를 사용하는 친화성 크로마토그래피 및 Superdex200 크기 배제 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상청액으로부터 정제하였다. 간략하게, 멸균 여과된 세포 배양 상청액을 PBS 완충액 (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl 및 2.7 mM KCl, pH 7.4) 으로 평형화된 HiTrap 단백질 A HP (5 ml) 컬럼에 가하였다. 미결합한 단백질을 평형화 완충액으로 세척하였다. 융합 단백질을 0.1 M 시트레이트 완충액, pH 2.8 으로 용리하고, 단백질 함유 분획물을 0.1 ml 1 M Tris, pH 8.5 로 중화시켰다. 그런 다음, 용리된 단백질 분획물을 풀링 (pooling) 하고, Amicon Ultra 원심분리 필터 장치 (MWCO: 30 K, Millipore) 를 사용하여 3 ml 의 부피로 농축하고, 20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0 으로 평형화된 Superdex200 HiLoad 120 ml 16/60 겔 여과 컬럼 (GE Healthcare, Sweden) 에 로딩하였다. 5% 미만의 고분자량 응집물을 갖는 정제된 융합 단백질을 함유하는 분획물을 풀링하고, -80°C 에서 1.0 mg/ml 분취액으로서 저장하였다.

[0181] SDS-PAGE

[0182] NuPAGE® Pre-Cast 겔 시스템 (Invitrogen) 을 제조사의 지시사항에 따라 사용하였다. 특히, 4-20% NuPAGE® Novex® TRIS-글리신 Pre-Cast 겔 및 Novex® TRIS-글리신 SDS 전개 완충액 (running buffer) 을 사용하였다. 겔을 전개시키기 전에 NuPAGE® 샘플 환원제를 첨가하여 샘플을 환원시켰다.

[0183] 분석적 크기 배제 크로마토그래피

[0184] 융합 단백질의 올리고머성 상태 및 응집의 측정을 위한 크기 배제 크로마토그래피를 HPLC 크로마토그래피에 의해 수행하였다. 간략하게, 단백질 A 정제된 융합 단백질을 Agilent HPLC 1100 시스템에서 300 mM NaCl, 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.5 중 Tosoh TSKgel G3000SW 컬럼에, 또는 Dionex HPLC-System 에서 2 x PBS 중 Superdex 200 컬럼 (GE Healthcare) 에 가하였다. 용리된 단백질을 UV 흡광도 및 피크 면적의 적분에 의해 정량하였다. BioRad Gel 여과 표준 151-1901 이 표준으로서 역할하였다.

[0185] 질량 분석법

[0186] 융합 단백질의 총 탈글리코실화된 질량을 전기분무 이온화 질량 분석법 (ESI-MS) 을 통해 측정하고 확인하였다. 간략하게, 100 µg 정제된 융합 단백질을, 2 mg/ml 이하의 단백질 농도에서, 37°C 에서 12-24 시간 동안 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7 중 50 mU N-글리코시다아제 F (PNGaseF, ProZyme) 로 탈글리코실화한 후, Sephadex G25 컬럼 (GE Healthcare) 상에서 HPLC 를 통해 탈염하였다. 환원된 사슬의 질량을 탈글리코실화 및 환원 후 ESI-MS 에 의해 측정하였다. 간략하게, 115 µl 중 50 µg 의 항체를 60 µl 1 M TCEP 및 50 µl 8 M 구아니딘-히드로클로라이드 (이후 탈염됨) 와 함께 인큐베이션하였다. 환원된 사슬의 질량 및 총 질량을 NanoMate 소스가 장착된 Q-Star Elite MS 시스템 상에서 ESI-MS 를 통해 측정하였다.

[0187] 실시예 2

[0188] PAI-1 저해 검정

[0189] 이 방법은 [Lawrence et al. Eur. J. Biochem. 186 (1989) 523-533] 에 의해 기재된 검정 원리를 기반으로 한다. 규정량의 활성 PAI-1 단백질을, 활성 PAI-1 에 의해 불가역적으로 차단되는 규정량의 세린 프로테아제 와 혼합한다. 잔여 세린 프로테아제 활성을, 세린 프로테아제에 의한 그의 가수분해가 흡광도 및 형광의 증가를 초래하는 발색성 펩티드를 첨가하여 정량적으로 측정한다. 활성 PAI-1 단백질을 규정 농도의 시험 화합물과 함께 예비-인큐베이션하여, PAI-1 의 잠복 유도 (저해) 를 초래할 수 있다. 시험 화합물에 의한 PAI-1 저해 정도를, 세린 프로테아제 활성의 비례적 증가 (즉, 흡광도 또는 형광의 증가) 를 측정함으로써 측정 하였다. 이러한 검정에서의 시험 화합물의 연속 희석물 사용으로, 그로부터 시험 화합물의 효능이 IC50 값 으로서 유도될 수 있는 용량-반응 곡선이 초래된다. IC50 값은 세린 프로테아제 활성의 50% 증가로서 관찰 되는 PAI-1 활성의 50% 저해를 유발하는 시험 화합물의 농도를 나타낸다. 통상의 PAI-1 저해 검정을 웰 당 100 µl 의 부피로 블랙 96-웰 평평 바닥 마이크로타이터 플레이트 (Costar 3915) 에서 수행한다. 시험 화합물, 활성 PAI-1, 세린 프로테아제 및 발색성 펩티드를 포함하는 모든 성분을 검정 완충액 (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.01% Tween 80 및 0.1 mg/ml 지방산-불포함 BSA 함유) 중 희석한다. 각각의 웰에서,

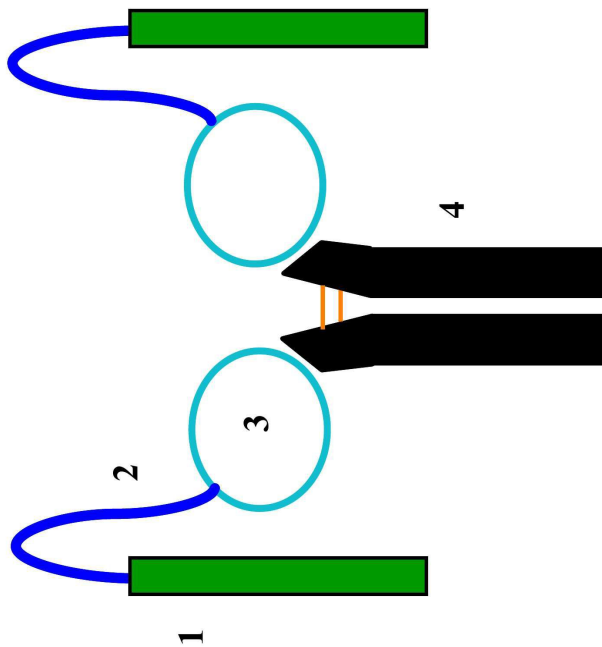
60  $\mu\text{l}$ 의 검정 완충액을 10  $\mu\text{l}$ 의 10-배 농축 시험 화합물 및 10  $\mu\text{l}$ 의 10-배 농축 활성 인간 PAI-1 단백질 (제조함 비-글리코실화 인간 PAI-1, Roche 배치 #10\_02, N-말단 6x His-태깅된 융합 단백질로서 대장균에서 생성됨, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 또는 제조함 글리코실화 인간 PAI-1, Molecular Innovations 제품 #GLYHPAI-A, 곤충 세포에서 생성됨, 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 과 혼합한다. 37°C 에서 90 분 동안 인큐베이션한 후, 10  $\mu\text{l}$ 의 10-배 농축 세린 프로테아제를 첨가한다 (rPA=tPA 결실 변이체 BM 06.022, Roche 롯데 #PZ0606P064, 배치 #G366, 150 ng/ml).

37°C 에서 30 분 동안 인큐베이션한 후, 10  $\mu\text{l}$ 의 10-배 농축 발색성 펩티드를 첨가한다 (Spectrofluor tPA, American Diagnostica 제품 #444F, 100  $\mu\text{M}$ ). 37°C 에서 2 시간의 추가 인큐베이션 직전 및 직후에 형광 플레이트 판독기 (358 nm 에서 여기, 440 nm 에서 방출) 로 각각의 웰에서 형광을 측정한다. t=2 시간에서의 형광에서 t=0 시간에서의 형광을 뺀 그 사이의 차이로부터, 형광 강도에 있어서의 순 증가를 계산한다.

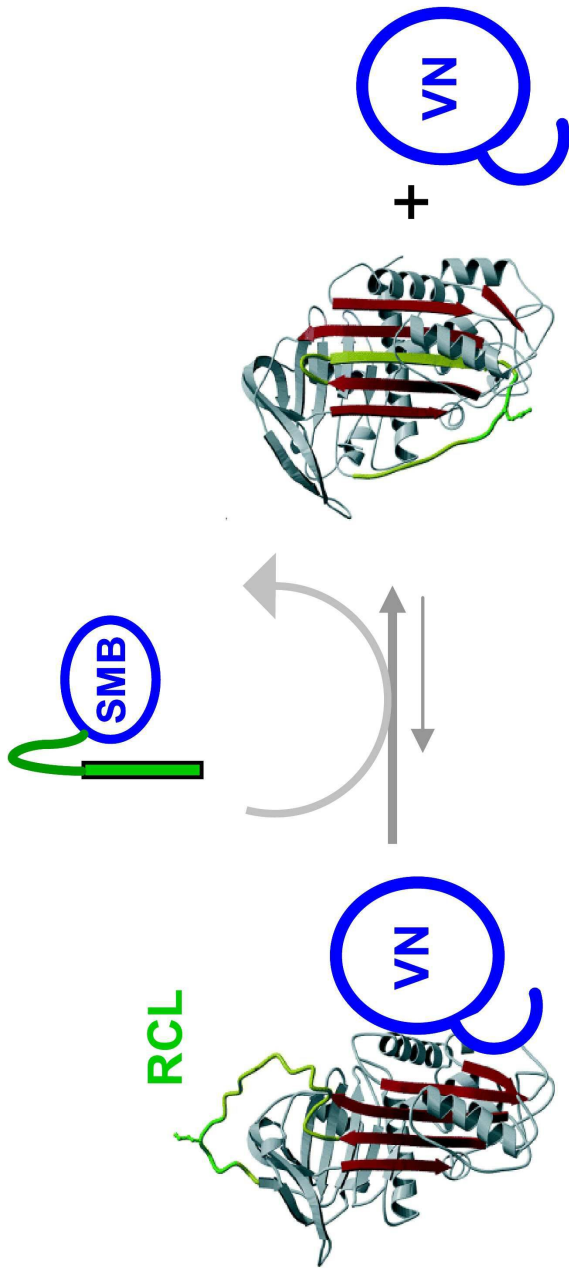
검정의 동적 범위를 규정하기 위해 시험 화합물이 없는 대조 반응을 포함시킨다. 세린 프로테아제 및 활성 PAI-1 단백질이 존재하는 반응은 하한치 (0% rPA 활성, 100% PAI-1 활성) 를 나타내고; 세린 프로테아제가 존재하지만 PAI-1 단백질이 존재하지 않는 반응은 상한치 (100% rPA 활성, 0% PAI-1 활성) 를 나타낸다.

**도면**

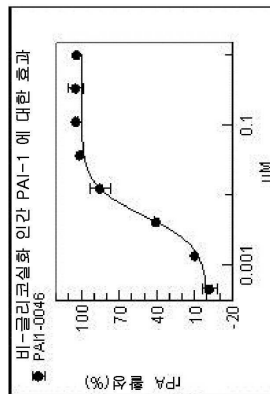
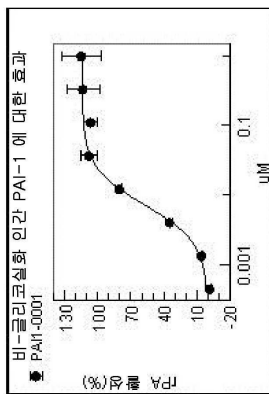
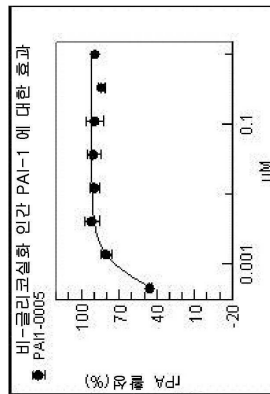
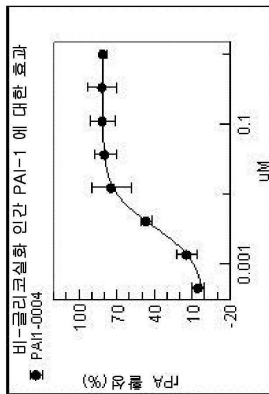
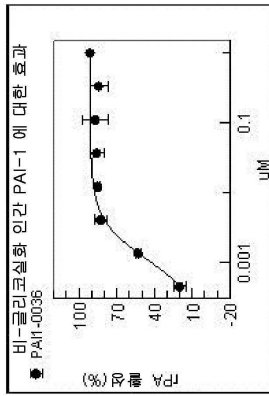
**도면1**



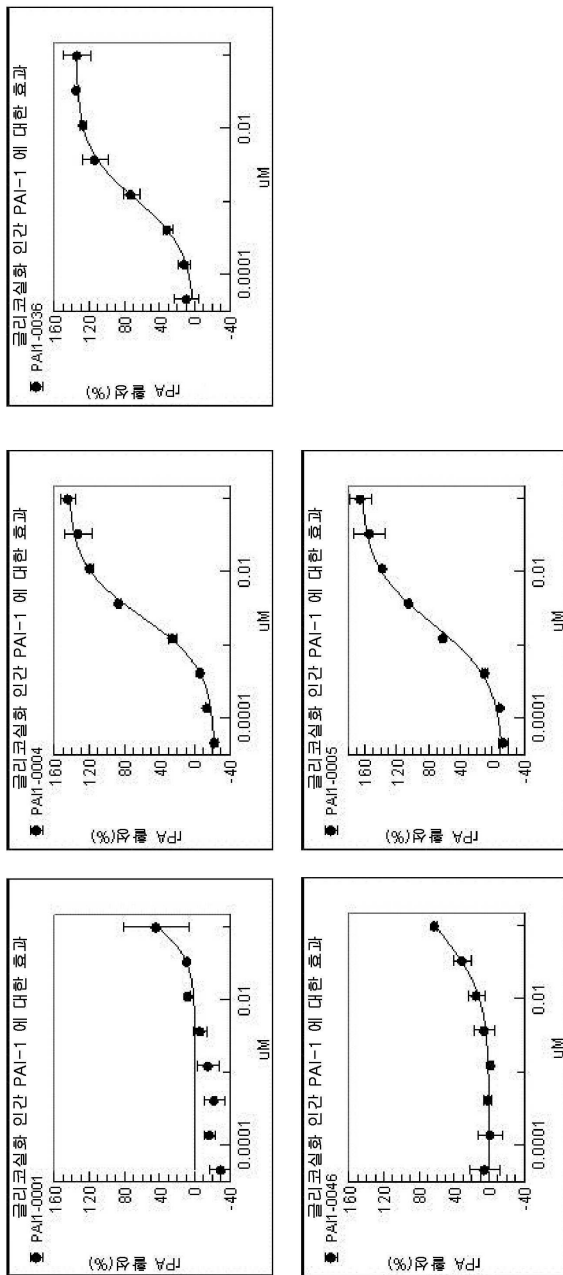
도면2



도면3



도면4



서열목록

- <110> F. Hoffmann-La Roche AG
- <120> Use of the binding domain of a subunit of a multi-subunit structure for targeted delivery of pharmaceutically active entities to the multi-subunit structure
- <130> P31358-WO
- <150> EP13196356.3
- <151> 2013-12-10
- <160> 30

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 227

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205









100 105 110  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140  
 Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

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

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

Pro Gly Lys

225

<210> 5

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variant human Fc-region of the IgG1 isotype with a L234A, L235A  
 and hole mutation

<400> 5

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly

1 5 10 15  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

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

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

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

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

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

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

145 150 155 160

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

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

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

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

Pro Gly Lys

225

<210> 6

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variant human Fc-region of the IgG1 isotype with a L234A, L235A  
 and knob mutation

<400> 6

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly  
 1 5 10 15

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

20 25 30  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140  
 Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220  
 Pro Gly Lys

225  
 <210> 7

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variant human Fc-region of the IgG1 isotype with a P329G mutation

<400> 7

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

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

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 85 90 95  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile  
 100 105 110  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 115 120 125  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 130 135 140  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 165 170 175  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 180 185 190  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 195 200 205  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 210 215 220

Pro Gly Lys

225



<210> 8  
 <211> 227  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> variant human Fc-region of the IgG1 isotype with a L234A, L235A  
 and P329G mutation

<400> 8

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



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

Pro Gly Lys

225

<210> 10

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variant human Fc-region of the IgG1 isotype with a P329G and knob  
 mutation

<400> 10

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys

225

<210> 11

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variant human Fc-region of the IgG1 isotype with a L234A, L235A,  
 P329G and hole mutation

<400> 11

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

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
                           85                          90                          95  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile  
                           100                          105                          110  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
                           115                          120                          125  
 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
                           130                          135                          140

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

                          210                          215                          220

Pro Gly Lys

225

<210> 12

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variant human Fc-region of the IgG1 isotype with a L234A, L235A,  
 P329G and knob mutation

<400> 12

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

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

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

100 105 110  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 115 120 125  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 130 135 140  
 Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 145 150 155 160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 165 170 175

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

Pro Gly Lys

225

<210> 13

<211> 229

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

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

1 5 10 15

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

Leu Ser Leu Gly Lys

225

<210> 14

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variant human Fc-region of the IgG4 isotype with a S228P and

L235E mutation

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys



225

<210> 15

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variant human Fc-region of the IgG4 isotype with a S228P, L235E and P329G mutation

<400> 15

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe  
 1 5 10 15

Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 20 25 30

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

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

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

65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu  
 180 185 190

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

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

Leu Ser Leu Gly Lys  
 225

<210> 16

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variant human Fc-region of the IgG4 isotype with a S228P and  
 L235E mutation

<400> 16

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe  
 1 5 10 15

Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

145                    150                    155                    160  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
                          165                    170                    175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu  
                          180                    185                    190

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

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

Leu Ser Leu Gly Lys

225

<210> 17

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variant human Fc-region of the IgG4 isotype with a S228P, L235E

and P329G mutation

<400> 17

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe  
   1                    5                    10                    15

Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
                          20                    25                    30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu  
 180 185 190

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

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

Leu Ser Leu Gly Lys  
 225

<210> 18  
 <211> 2  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> peptide linker 1  
 <400> 18

Gly Ser  
 1

<210> 19  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> peptide linker 2  
 <400> 19

Gly Gly Ser  
 1

<210> 20

<211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker 3

<400> 20  
 Gly Gly Gly Ser

1

<210> 21  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker 4

<400> 21  
 Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 22  
 <211> 445  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> latency inducing anti-PAI-1 antibody heavy chain

<400> 22  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Met Thr Leu Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys



340 345 350  
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 355 360 365

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

370 375 380  
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 435 440 445

<210> 23

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> latency inducing anti-PAI-1 antibody light chain

<400> 23

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ile  
 20 25 30

Ile Lys Gln Lys Asn Cys Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110  
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

115 120 125  
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

130 135 140  
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

145 150 155 160  
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

165 170 175  
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
 195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215 220

- <210> 24
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 24

Gly Thr Val Ala Ser Ser Ser Thr Ala Val Ile Val Ser Ala Arg  
 1 5 10 15

- <210> 25
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> latency inducing polypeptide

<400> 25  
 Gly Thr Val Ala Ser Ser Ser Thr Ala Val Ile Val Ser Ala Ser

- 1 5 10 15
- <210> 26
- <211> 37



<212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 26  
 Glu Ser Cys Lys Gly Arg Cys Thr Glu Gly Phe Asn Val Asp Lys Lys  
 1 5 10 15  
 Cys Gln Cys Asp Glu Leu Cys Ser Tyr Tyr Gln Ser Cys Cys Thr Asp  
 20 25 30  
 Tyr Thr Ala Glu Cys  
 35

<210> 27  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> peptide linker 5  
 <400> 27  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 20 25 30

<210> 28  
 <211> 299  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PAI1-0004  
 <400> 28  
 Gly Thr Val Ala Ser Ser Ser Thr Ala Val Ile Val Ser Ala Arg Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 20 25 30  
 Gly Gly Ser Glu Ser Cys Lys Gly Arg Cys Thr Glu Gly Phe Asn Val  
 35 40 45  
 Asp Lys Lys Cys Gln Cys Asp Glu Leu Cys Ser Tyr Tyr Gln Ser Cys  
 50 55 60



<211> 309  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PAI1-0005  
 <400> 29  
 Gly Thr Val Ala Ser Ser Ser Thr Ala Val Ile Val Ser Ala Arg Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 20 25 30  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Cys  
 35 40 45  
  
 Lys Gly Arg Cys Thr Glu Gly Phe Asn Val Asp Lys Lys Cys Gln Cys  
 50 55 60  
 Asp Glu Leu Cys Ser Tyr Tyr Gln Ser Cys Cys Thr Asp Tyr Thr Ala  
 65 70 75 80  
 Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 85 90 95  
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 100 105 110  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
  
 115 120 125  
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 130 135 140  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 145 150 155 160  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 165 170 175  
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 180 185 190  
  
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 195 200 205  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln



