



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0084886  
(43) 공개일자 2019년07월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 38/16 (2006.01) A23L 33/18 (2016.01)  
A61P 37/08 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 38/16 (2013.01)  
A23L 33/18 (2016.08)  
(21) 출원번호 10-2019-0002037  
(22) 출원일자 2019년01월08일  
심사청구일자 2019년01월08일  
(30) 우선권주장  
1020180002262 2018년01월08일 대한민국(KR)

(71) 출원인  
주식회사 프로젠  
서울특별시 서초구 반포대로 222, 1201호(반포동, 가톨릭대 성의교정 성의회관)  
(72) 발명자  
성영철  
서울특별시 용산구 서빙고로 67, 101동 404호(용산동5가, 파크타워아파트)  
양정윤  
인천광역시 연수구 컨벤시아대로252번길 70, 1303동 602호(송도동, 송도 더샵 퍼스트파크 F13-1BL)  
(74) 대리인  
제일특허법인(유)

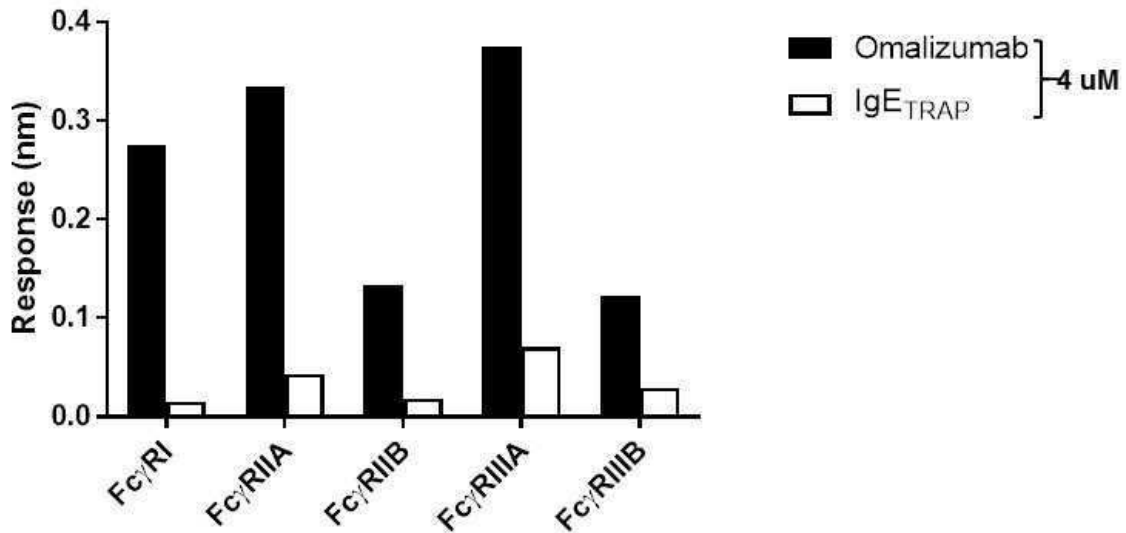
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인을 포함하는 약학적 조성물

(57) 요약

본원 발명은 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIα-ECD)을 포함하는 단량체 두 개를 포함하는 폴리펩티드 이량체 단백질의 용도를 제공한다. 본원 발명에 따른 융합 단백질은 기존의 항 IgE 항체를 포함하는 치료제에 비하여 IgE 결합능이 우수하면서 ADCC 및 CDC 기능이 결여되어 있어 기타 부작용이 적은 장점이 있는 바, IgE에 의해 매개되는 알러지성 질환에 대한 치료 또는 예방 용도의 의약품에 적용될 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

**A61P 37/08** (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/304 (2013.01)

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(Fc εRIa-ECD)을 포함하는 단량체 두 개를 포함하는 폴리펩티드 이량체를 유효성분으로 포함하는 알러지성 질환 치료용 또는 예방용 약학적 조성물로서,  
 상기 단량체는 변형된 Fc 영역을 포함하며,  
 상기 변형된 Fc 영역과 Fc εRIa-ECD는 힌지를 통해 결합된, 약학적 조성물.

**청구항 2**

제1항에 있어서,  
 상기 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이의 단편인, 약학적 조성물.

**청구항 3**

제1항에 있어서,  
 상기 변형된 Fc 영역은 서열번호 2인, 약학적 조성물.

**청구항 4**

제1항에 있어서,  
 상기 힌지는 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체인 것인, 약학적 조성물.

**청구항 5**

제4항에 있어서,  
 상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체는 적어도 하나의 시스테인을 포함하는, 약학적 조성물.

**청구항 6**

제4항에 있어서,  
 상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체는  
 Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Xaa1 Xaa2 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro (서열번호 17)이며,  
 Xaa1은 Lys 또는 Gly 이며,  
 Xaa2는 Glu, Gly 또는 Ser인, 약학적 조성물.

**청구항 7**

제4항에 있어서,  
 상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체는  
 Ala Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Xaa3 Xaa4 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro (서열번호 18)이며,

Xaa1은 Lys 또는 Gly 이며,

Xaa2는 Glu, Gly 또는 Ser인, 약학적 조성물.

**청구항 8**

제1항에 있어서,

상기 힌지는 서열번호 서열번호 3, 서열번호 4 및 서열번호 19에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는, 약학적 조성물.

**청구항 9**

제1항에 있어서,

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

**청구항 10**

IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIα-ECD)을 포함하는 단량체 두 개를 포함하는 폴리펩티드 이량체를 유효성분으로 포함하는 알러지성 증상의 개선 및 완화용 식품 조성물로서,

상기 단량체는 변형된 Fc 영역을 포함하며,

상기 변형된 Fc 영역과 FcεRIα-ECD는 힌지를 통해 결합된, 식품 조성물.

**청구항 11**

1) 폴리펩티드 단량체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 시알산 전이효소 유전자가 도입된 세포를 배양하는 단계; 및

2) 폴리펩티드 이량체를 회수하는 단계를 통해 수득된,

IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIα-ECD)을 포함하는 단량체 두 개를 포함하는 폴리펩티드 이량체를 유효성분으로 포함하는 알러지성 질환 치료용 또는 예방용 약학적 조성물로서,

상기 단량체는 변형된 Fc 영역을 포함하며,

상기 변형된 Fc 영역과 FcεRIα-ECD는 힌지를 통해 결합된, 약학적 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본원 발명은 변형된 IgE Fc 수용체의 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 천식을 비롯한 알러지비염, 아토피피부염, 식품알러지 등 알러지 질환은 산업화, 서구화된 현대사회에서 높은 속도로 확산되고 있으며, 중증 알러지 질환인 아나필락시스의 발생도 증가하고 있다. 이러한 만성 면역질환은 개인 삶의 질을 매우 떨어트리며 이에 따른 사회경제적 비용도 급증하고 있어, 이를 극복하기 위한 대책이 절실한 실정이다.

[0003] 대부분의 알러지 질환은 면역글로불린 E(IgE)의 과잉 면역반응에 의해 유발된다. IgE는 정상 상태에서는 혈청 중에 아주 낮은 농도로 존재하는 항체이다. IgE는 일반적으로 무해한 항원에 의해서 생성되기도 하며, 특별한 자극 없이도 IgE가 증가되는 경우가 있는데 이러한 경우에 알러지 질환이 야기될 수 있다. 비정상적으로 증가된 IgE가 비만 세포(Mast cell)와 호염기성 과립구(basophils) 등의 표면에 발현되는 고친화성 IgE Fc 수용체(FcεRI)에 결합할 수 있다. 이러한 결합에 의해 비만 세포나 호염기성 과립구는 히스타민, 류코트리엔, 프로스타글란딘, 브라디키닌 및 혈소판-활성화 인자 등 화학 매개자를 방출 하게 된다. 이러한 화학 매개자의 방출에 의해

알러지 증상이 발생하게 된다. 특히, 알러지 질환은 IgE 및 FcεRI 사이의 결합으로 증상이 악화 될 수 있다. FcεRI-발현 세포는 알러지 환자에서 증가한다고 알려져 있다.

[0004] 현재 알러지 질환을 치료하기 위하여, 알레르겐 회피, 항알러지 약물 투여, 체내 IgE 합성 조절, 항 IgE 항체 개발 등 여러가지 방법이 제안되었다. 그러나, 현재까지 알려진 치료 방법은 알러지의 근본 원인을 치료할 수 없고, 약제의 효능이 불충분하거나, 심각한 부작용이 발생하는 등 많은 단점을 가지고 있다.

[0005] 또한, IgE 및 FcγRIIb에 고친화성으로 결합하며, IgE를 발현하는 세포를 억제할 수 있는 면역글로불린 조성물이 연구되고 있다(KR10-1783272B1). 이러한 조성물은 알러지 및 천식을 포함하여 IgE-매개된 장애를 치료하는데 유용하다고 보고된 바 있다. 또한, IgE 항체의 Fc 일부분을 표적으로 하는 오말리주맵(Omalizumab, 상품명: 졸레어(Xolair))이 개발되어 난치성 중증 천식과 난치성 두드러기 치료제로 사용되고 있다.

[0006] 하지만, 효과를 유지하기 위해서는 고용량으로 투여되어야 하기 때문에 비용부담이 크고, 혈관부종, 아나필락시스 반응 등의 부작용이 있다는 것이 보고되었다(The Journal of Clinical Investigation Volume 99, Number 5, March 1997, 915-925). 그뿐 아니라, 시판 후 결과를 통해 알러지성 육아종 혈관염, 특발성 중증 혈소판감소증이 보고되고 있어, 부작용 없이 알러지 질환을 효율적으로 치료할 수 있는 치료제 개발에 대한 필요성이 증가하고 있는 실정이다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) KR 10-1783272 B

#### 비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) The Journal of Clinical Investigation Volume 99, Number 5, March 1997, 915-925

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0009] 본원 발명의 목적은 IgE 매개 알러지 질환을 치료하기 위한 폴리펩티드 이량체 단백질을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물 및 식품 조성물을 제공하는 것이다.

#### 과제의 해결 수단

[0010] 본원 발명의 일 측면으로, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인을 포함하는 단량체 두 개를 포함하는 폴리펩티드 이량체를 유효성분으로 포함하는 알러지성 질환 치료용 또는 예방용 약학적 조성물로서, 상기 단량체는 변형된 Fc 영역을 포함하며, 상기 변형된 Fc 영역과 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인은 IgD 항체의 힌지를 통해 연결된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물을 제공한다. 또 다른 측면으로, 상기 폴리펩티드 이량체를 유효성분으로 포함하는 알러지성 증상의 개선 및 완화용 식품 조성물을 제공한다.

#### 발명의 효과

[0011] 본원 발명에 따른 폴리펩티드 이량체 단백질은 기존에 사용되는 항-IgE 항체에 비하여 안전성 및 체내 지속성이 우수할 뿐만 아니라, IgE와의 결합력이 기존에 사용되는 항-IgE 항체인 오말리주맵 대비 70배로 높아 IgE에 매우 강하게 결합하므로, 투여 주기를 늘릴 수 있다. 또한, 본원 발명에 따른 폴리펩티드 이량체 단백질은 IgE 만을 단일표적으로 하고, Fc gamma receptor에는 결합하지 않음으로 ADCC(antibody dependent Cellular Cytotoxicity) 및 CDC(Complement dependent Cytotoxicity) 기능이 결여된 변형된 Fc가 적용된 물질이다. 따라서, IgG1 Fc 영역을 포함하고 있는 기존 항 IgE 항체와 달리 Fc gamma 수용체와 결합하지 않기 때문에 비만 세포 표면의 Fc gamma 수용체와의 결합에 의한 매개자 방출을 억제할 수 있어, IgG1과 비만세포의 Fc gamma 수용체 III와의 결합에 의해 유발될 수 있는 아나필락시스 발생 등의 심각한 부작용을 최소화할 수 있다. 따라서, 중래의 항-IgE 항체를 포함하는 치료제를 대체할 수 있는 새로운 약학적 조성물로 활용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0012] 도 1은 각 세포주에서 생산된 단백질의 SDS-PAGE 및 Gel IEF(isoelectric focusing) 결과이다. 이때, 환원성 및 비환원성 모두에서 절단형이 생성되지 않고, 시알산 전이효소 유전자 도입에 의한 시알산 함량 증가로 인해 acidic 단백질의 함량이 증가하였음을 알 수 있다.
- 도 2는 본원 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체 단백질의 비환원된 형태 및 환원된 형태 단백질의 SDS-PAGE 결과이다. 특히, Input에 해당하는 배양 상등액에서도 폴리펩티드 이량체의 순도가 높은 것을 알 수 있다.
- 도 3은 오말리주맵의 IgE에 대한 결합능을 나타내는 그래프이다. 오말리주맵을 고정하고 IgE의 처리 농도에 따른 결합능을 분석한 결과이다.
- 도 4는 본원 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체 단백질의 IgE에 대한 결합능을 나타내는 그래프로써, 이량체 단백질을 고정하고 IgE의 처리 농도에 따른 결합능을 분석한 결과이다.
- 도 5는 본 발명의 일 구체예인 폴리펩티드 이량체 단백질(IgE<sub>TRAP</sub>)과 오말리주맵의 IgG 수용체 Fc $\gamma$ RI(도 5a), Fc $\gamma$ RIIA(도 5b), Fc $\gamma$ RIIB(도 5c), Fc $\gamma$ RIIIA(도 5d) 및 Fc $\gamma$ RIIIB(도 5e)와의 상호 작용을 bio-layer interferometry(BLI) 분석법으로 확인한 결과이다.
- 도 6은 IgE<sub>TRAP</sub>과 IgG 수용체 및 오말리주맵과 IgG 수용체의 결합력을 수치화한 그래프이다.
- 도 7은 본원 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체 단백질(IgE<sub>TRAP</sub>)의 농도에 따른 마우스 유래 비만 세포의 활성화 억제력을 보여주는 그래프이다.
- 도 8은 본원 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체 단백질(IgE<sub>TRAP</sub>) 및 Xolair(오말리주맵)의 농도에 따른 인간 Fc $\epsilon$ RI 발현 마우스 유래 비만 세포의 활성화 억제력을 비교해서 보여주는 그래프이다.
- 도 9는 식품 알러지 모델에서 본원 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체 단백질의 투여 효과를 나타내는 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0013] 본원 발명은 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(Fc $\epsilon$ RIa-ECD)을 포함하는 단량체 두 개를 포함하는 폴리펩티드 이량체를 유효성분으로 포함하는 알러지성 질환 치료용 또는 예방용 약학적 조성물에 대한 것으로서, 상기 단량체는 변형된 Fc 영역을 포함하며, 상기 변형된 Fc 영역과 Fc $\epsilon$ RIa-ECD는 IgD 항체의 힌지를 통해 연결된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 명세서에서 사용한 용어, "IgE"는 면역글로불린 E로 알려진 항체 단백질을 의미한다. IgE는 비만세포나 혈중의 호염기구 등에 친화성을 가진다. 또한, IgE 항체와 그것에 대응하는 항원(알레르겐)이 반응하면 염증반응을 일으킨다. 또한, IgE는 비만 세포 또는 호염기구가 갑자기 분비되어 나타나는 아나필락시스(anaphylaxis)를 일으키는 항체로 알려져 있다.
- [0015] 본 명세서에서 사용한 용어, "IgE Fc 수용체"란 Fc $\epsilon$  수용체라고도 불리우며, IgE의 Fc 부분과 결합한다. 상기 수용체는 2 종류가 존재한다. IgE Fc에 대해 고친화성인 수용체는 Fc $\epsilon$  수용체I(Fc $\epsilon$ RI)라고 한다. IgE Fc에 대해 저친화성인 수용체는 Fc $\epsilon$  수용체II(Fc $\epsilon$ RII)라고 한다. Fc $\epsilon$ RI은 비만세포, 호염기구에서 발현된다. Fc $\epsilon$ RI에 결합한 IgE 항체가 다가 항원에 의해 가교되면, 비만세포 또는 호염 기구에서 탈과립이 생겨 히스타민을 비롯한 여러 가지 화학 전달 물질을 방출한다. 이러한 방출에 의해 즉시형 알러지 반응이 나타난다.
- [0016] 상기 Fc $\epsilon$ RI는 하나의  $\alpha$ 사슬과 한 개의  $\beta$ 사슬 및 2황화 결합한 2개의  $\gamma$ 사슬로 구성된 막단백질이다. 이 중 IgE가 결합하는 부분은  $\alpha$  사슬(Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ )로서, Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ 는 60 kDa 정도의 크기를 가지며, 세포막 안에 존재하는 소수성 도메인과 세포막 외부에 존재하는 친수성 도메인으로 구성된다. 특히,  $\alpha$ 사슬의 세포외 도메인에 IgE가 결합하게 된다.
- [0017] 구체적으로, 상기 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛은 NP\_001992.1에 기재된 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(Fc $\epsilon$ RIa-ECD)은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 본 명세서에서 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인은 IgE와 결합을 할 수 있는 한, IgE Fc

수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인의 단편 또는 변이체일 수 있다.

- [0018] 상기 변이체는 FcεRI의 α사슬의 기능을 변형시키지 않는 한, 야생형 FcεRIa-ECD(Extracellular domain)에서 하나 이상의 단백질을 치환, 결실 또는 추가하는 방법을 통하여 수행될 수 있다. 이러한 다양한 단백질 또는 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상 동일한 것일 수 있다. 또한, 서열번호 1의 FcεRIa-ECD는 서열번호 5의 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다.
- [0019] 또한, 본 명세서에서 사용한 용어, "변형된 Fc 영역"은 항체의 Fc 부분 중 일부가 변형된 영역을 의미한다. 이때, 용어 "Fc 영역"은 면역글로불린의 중쇄 불변 영역 2(CH2) 및 중쇄 불변 영역 3(CH3)을 포함하며, 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 및 경쇄 불변 영역 1(CH1)은 포함하지 않는 단백질을 말한다. 특히, 변형된 Fc 영역은 Fc 영역 중 일부 아미노산이 치환되거나, 서로 다른 종류의 Fc 영역을 조합하여 제조된 것을 의미한다. 구체적으로, 상기 변형된 Fc 영역은 서열번호 2의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, 서열번호 2의 변형된 Fc 영역은 서열번호 6의 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다.
- [0020] 또한, 본원 발명의 "변형된 Fc 영역"은 천연형 당쇄, 천연형에 비해 증가된 당쇄, 천연형에 비해 감소한 당쇄, 또는 당쇄가 제거된 형태일 수 있다. 화학적 방법, 효소적 방법 및 미생물을 사용한 유전공학적 엔지니어링 방법 등과 같이 통상적인 방법으로 면역글로불린 Fc 당쇄를 변형시킬 수 있다.
- [0021] 이때, 본원 발명의 "변형된 Fc 영역"은 FcγR 또는 C1q에 대한 결합 부위를 갖지 않으므로 ADCC(antibody dependent Cellular Cytotoxicity) 및 CDC(Complement dependent Cytotoxicity) 기능이 결여된 것일 수 있다. 또한, 상기 변형된 Fc 영역과 FcεRIa-ECD는 IgD 항체의 힌지를 통해 연결될 수 있다. 상기 IgD 항체의 힌지는 64개 아미노산으로 이루어져 있으며, 20 내지 60개의 연속된 아미노산, 또는 25 내지 50개의 연속된 아미노산, 또는 30 내지 40개의 아미노산으로 선택되어 포함될 수 있다. 일 구체예로 IgD 항체의 힌지는 하기의 30개 또는 49개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 이때, 상기 힌지는 상기 힌지 영역을 변형시킨 힌지 변이체 일 수 있으며, 상기 힌지는 적어도 하나의 시스테인을 포함할 수 있다. 이때, 상기 힌지 변이체는 단백질 생산 과정에서 절단형 발생을 최소화하기 위해 IgD 항체의 힌지 서열에서 일부를 변형한 것일 수 있다.
- [0022] 일 실시예로, 힌지는 다음과 같은 서열을 포함할 수 있다:
- [0023] Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Xaa1 Xaa2 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro (서열번호 17), 이때, Xaa1은 Lys 또는 Gly 일 수 있으며, Xaa2는 Glu, Gly 또는 Ser일 수 있다. 구체적으로, 상기 힌지는 서열번호 3 및 서열번호 19의 아미노산 서열을 가질 수 있고, 이를 통해 단백질 생산 과정에서 절단형 발생을 최소화할 수 있다.
- [0024] 힌지의 또 다른 실시예로 다음과 같은 서열을 포함할 수 있다:
- [0025] Ala Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Xaa3 Xaa4 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro (서열번호 18)이며, 이때, Xaa3은 Lys 또는 Gly 이며, Xaa4는 Glu, Gly 또는 Ser일 수 있다. 구체적으로, 상기 힌지는 서열번호 4의 아미노산 서열을 가질 수 있고, 이를 통해 단백질 생산 과정에서 절단형 발생을 최소화할 수 있다.
- [0026] 특히, 서열번호 4의 서열을 갖는 힌지에 있어서, Thr 중 적어도 하나는 글리코실레이션 될 수 있다. 구체적으로, 서열번호 18의 아미노산 중, 13번째, 14번째, 18번째 및 19번째의 Thr이 글리코실레이션 될 수 있다. 바람직하게 4개의 아미노산이 모두 글리코실레이션 될 수 있다. 이때, 상기 글리코실레이션은 O-글리코실레이션일 수 있다.
- [0027] 또한, 본원 발명에서 제공하는 폴리펩티드 이량체는 상술한 바와 같이, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인과 변형된 Fc 영역이 결합된 단량체 두 개가 결합된 형태일 수 있다. 상기 폴리펩티드 이량체는 동일한 두 개의 단량체가 힌지 부위에 위치한 시스테인에 의해 결합된 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리펩티드 이량체는 서로 상이한 단량체 두 개가 결합된 형태일 수 있다. 예를 들어, 두 개의 단량체가 서로 다른 경우는, 하나의 단량체는 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인을 포함하고, 다른 단량체는 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인의 단편을 포함한 형태일 수 있다. 이때, 상기 단량체의 일 구체예는 서열번호 20, 서열번호 21 또는 서열번호 22의 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [0028] 또한, 본원 발명에서 제공하는 폴리펩티드 이량체는 항-IgE 항체인 오말리주맙 대비 10 내지 100배, 20 내지 90



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

- [0029] 또한, 본 명세서에서, "알러지성 질환"은 비만세포의 탈과립 등 비만세포의 활성화가 매개된 알러지 반응으로 인하여 초래되는 병리적 증상을 의미하며, 이러한 알러지 질환에는 식품 알러지, 아토피 피부염(atopic dermatitis), 천식(asthma), 알러지성 비염(allergic rhinitis), 알러지성 결막염(allergic conjunctivitis), 알러지성 피부염(allergic dermatitis), 알러지성 접촉성 피부염(allergic contact dermatitis), 과민성(anaphylaxis), 두드러기, 소양증, 곤충 알러지, 만성 특발성 두드러기(Chronic idiopathic urticarial) 및 약 품 알러지 등이 포함된다. 특히, 상기 알러지 질환은 IgE 매개성일 수 있다.
- [0030] 본원 발명의 알러지 치료용 또는 예방용 조성물에서 그 유효성분은 항알러지 활성을 나타낼 수 있는 한, 용도, 제형, 배합 목적 등에 따라 임의의 양(유효량)으로 포함될 수 있는데, 통상적인 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001 중량 % 내지 20.0 중량 % 범위 내에서 결정될 것이다. 여기서 "유효량"이란 항알러지 효과를 유도할 수 있는 유효성분의 양을 말한다. 이러한 유효량은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 실험적으로 결정될 수 있다.
- [0031] 이때, 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 환자에게 전달하기에 적절한 비-독성 물질이면 어떠한 담체라도 가능하다. 증류수, 알코올, 지방, 왁스 및 비활성 고체가 담체로 포함될 수 있다. 약물학적으로 허용되는 애췌번트(완충제, 분산제) 또한 약물학적 조성물에 포함될 수 있다.
- [0032] 구체적으로, 본원 발명의 약제학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하여 당업계에 공지된 통상의 방법으로 투여 경로에 따라 경구용 제형 또는 비경구용 제형으로 제조될 수 있다. 여기서 "약제학적으로 허용되는" 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적용 가능한 이상의 독성을 지니지 않는다는 의미이다.
- [0033] 본원 발명의 약제학적 조성물이 경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 현탁액, 웨이퍼 등의 제형으로 제조될 수 있다. 이때 약제학적으로 허용되는 적합한 담체의 예로서는 락토스, 글루코스, 슈크로스, 텍스트로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨 등의 당류, 옥수수 전분, 감자 전분, 밀 전분 등의 전분류, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 등의 셀룰로오스류, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 맥아, 젤라틴, 탈크, 폴리올, 식물성유 등을 들 수 있다. 제제화할 경우 필요에 따라 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 및/또는 부형제를 포함하여 제제화할 수 있다.
- [0034] 본원 발명의 약제학적 조성물이 비경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 주사제, 경피 투여제, 비강 흡입제 및 좌제의 형태로 제제화될 수 있다. 주사제로 제제화할 경우 적합한 담체로서는 멸균수, 에탄올, 글리세롤이나 프로필렌 글리콜 등의 폴리올 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline)나 주사용 멸균수, 5% 텍스트로스 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다.
- [0035] 약제학적 조성물의 제제화와 관련하여서는 당업계에 공지되어 있으며, 구체적으로 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)] 등을 참조할 수 있다. 상기 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주 된다.
- [0036] 본원 발명의 약제학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 성별, 연령, 환자의 중증도, 투여 경로에 따라 1일 0.01 ug/kg ~ 10 g/kg 범위, 바람직하게는 0.01 mg/kg ~ 1 g/kg 범위일 수 있다. 투여는 1일 1회 또는 수회로 나누어 이루어질 수 있다. 이러한 투여량은 어떠한 측면으로든 본원 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 아니 된다.
- [0037] 본원 발명의 조성물이 적용(처방)될 수 있는 대상은 포유동물 및 사람이며, 특히 사람인 경우가 바람직하다. 본원 발명의 항알러지용 조성물은 유효성분 이외에, 항알러지 활성의 상승·보강을 위하여 이미 안전성이 검증되고 항알러지 활성을 갖는 것으로 공지된 임의의 화합물이나 천연 추출물을 추가로 포함할 수 있다.
- [0038] 본원 발명의 또 다른 측면으로, 상기 폴리펩티드 이량체를 유효성분으로 포함하는 알러지성 증상의 개선 및 완화용 식품 조성물을 제공한다.



- [0039] 이때, 상기 폴리펩티드 이량체는 장내로 효율적인 전달을 위해 적절한 전달 수단과 결합될 수 있다. 또한, 본원 발명의 식품 조성물은 어떠한 형태로도 제조될 수 있으며, 예컨대 차, 주스, 탄산음료, 이온음료 등의 음료류, 우유, 요구르트 등의 가공 유류, 정제, 캡슐, 환, 과립, 액상, 분말, 편상, 페이스트상, 시럽, 젤, 젤리, 바 등의 건강기능식품 제제류 등으로 제조될 수 있다. 또 본원 발명의 식품 조성물은 법률상·기능상의 구분에 있어서 제조·유통 시점의 시행 법규에 부합하는 한 임의의 제품 구분을 떨 수 있다. 예컨대 건강기능식품에 관한 법률에 따른 건강기능식품이거나, 식품위생법의 식품공전(식약처 고시, 식품의 기준 및 규격)상 각 식품유형에 따른 과자류, 두류, 다류, 음료류, 특수용도식품 등일 수 있다. 본원 발명의 식품 조성물에 포함될 수 있는 기타의 식품첨가물과 관련하여서는 식품위생법에 따른 식품공전이나 식품첨가물 공전을 참조할 수 있다.
- [0040] 본원 발명의 또 다른 측면으로, 변형된 Fc 영역이 결합된 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인을 포함하는 단량체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0041] 한편, 상기 폴리뉴클레오티드는 신호서열(signal sequence) 또는 리더 서열(leader sequence)을 추가적으로 포함할 수 있다. 여기에서 사용된 용어 "신호서열"은 목적 단백질의 분비를 지시하는 신호펩타이드를 코딩하는 핵산을 의미한다. 상기 신호펩타이드는 숙주 세포에서 번역된 후에 절단된다. 구체적으로, 본원 발명의 신호서열은 ER(endoplasmic reticulum) 막을 관통하는 단백질의 이동을 개시하는 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드이다. 본원 발명에서 유용한 신호서열은 항체 경쇄 신호서열, 예를 들면 항체 14.18(Gillies et al., J. Immunol. Meth 1989. 125:191-202), 항체 중쇄 신호서열, 예를 들면, MOPC141 항체 중쇄 신호서열(Sakano et al., Nature, 1980. 286: 676-683), 및 당업계에 알려진 다른 신호서열(예, Watson et al., Nucleic Acid Research, 1984. 12:5145-5164를 참조)을 포함한다.
- [0042] 신호서열은 당업계에 그 특징이 잘 알려져 있으며, 통상 16 내지 30개의 아미노산 잔기를 포함하나, 그보다 더 많거나 적은 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 통상적인 신호 펩타이드는 기본 N-말단 영역, 중심의 소수성 영역, 및 보다 극성인(polar) C-말단 영역의 세 영역으로 구성된다. 중심 소수성 영역은 미성숙 폴리펩티드가 이동하는 동안 막지질 이중층을 통하여 신호서열을 고정시키는 4 내지 12개의 소수성 잔기를 포함한다.
- [0043] 개시 이후에, 신호서열은 흔히 신호 펩티다아제(signal peptidases)로 알려진 세포 효소에 의하여 ER의 루멘(lumen) 내에서 절단된다. 이때, 상기 신호서열은 tPa(tissue Plasminogen Activation), HSV gDs(signal sequence of Herpes simplex virus glycoprotein D), 또는 성장 호르몬(growth hormone)의 분비신호서열일 수 있다. 바람직하게, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵 세포에서 사용되는 분비 신호서열을 사용할 수 있다. 또한, 분비 신호서열은 숙주세포에서 발현 빈도가 높은 코돈으로 치환하여 사용할 수 있다.
- [0044] 한편, 신호서열, 변형된 Fc 영역이 결합된 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인 단량체는 서열번호 11 또는 서열번호 13의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 상기 서열번호 11 또는 서열번호 13의 단백질은 각각 서열번호 12 및 서열번호 14의 서열을 가지는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다.
- [0045] 본원 발명의 또 다른 측면으로, 상기 단량체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 적재된 발현 벡터를 제공한다. 이때, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 12 및 서열번호 14의 서열을 가질 수 있다.
- [0046] 본원 발명에서 사용된 용어 "벡터"는 숙주 세포에 도입되어 숙주 세포 유전체 내로 재조합 및 삽입될 수 있다. 또는 상기 벡터는 에피솜으로서 자발적으로 복제될 수 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 수단으로 이해된다. 상기 벡터는 선형 핵산, 플라스미드, 과지미드, 코스미드, RNA 벡터, 바이러스 벡터 및 이의 유사체들을 포함한다. 바이러스 벡터의 예로는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 및 아데노-관련 바이러스를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 플라스미드는 항생제 내성 유전자와 같은 선별 마커를 포함할 수 있고, 플라스미드를 유지하는 숙주 세포는 선택적인 조건하에서 배양될 수 있다.
- [0047] 본원 발명에서 사용된 용어, 목적 단백질의 "유전자 발현" 또는 "발현"은, DNA 서열의 전사, mRNA 전사체의 번역 및 융합 단백질 생산물 또는 이의 단편의 분비를 의미하는 것으로 이해된다. 유용한 발현 벡터는 RCMV(Invitrogen, Carlsbad) 또는 이의 변이체일 수 있다. 상기 발현 벡터는 포유류 세포에서 목적 유전자의 연속적인 전사를 촉진하기 위한 인간 CMV(cytomegalovirus) 프로모터, 및 전사 후 RNA의 안정상태 수준을 높이기 위한 우태 성장 인자(bovine growth hormone) 폴리아데닐레이션 신호서열을 포함할 수 있다.
- [0048] 본원 발명의 또 다른 측면으로, 상기 발현 벡터가 도입된 숙주 세포를 제공한다. 본원 발명에서 사용된 용어 "숙주 세포"는 재조합 발현 벡터가 도입될 수 있는 원핵 및 진핵 세포를 나타낸다. 본원 발명에서 사용된 용어, "형질주입된", "형질전환된" 및 "형질감염된"은 당업계에 공지된 기술을 사용하여 세포 내로 핵산(예를 들어, 벡터)을 도입하는 것을 의미한다.

- [0049] 본원 발명에 사용될 수 있는 바람직한 숙주 세포는 불사의 하이브리도마 세포, NS/0 골수종 세포, 293 세포, 중국 햄스터 난소 세포(CHO cell), HeLa 세포, 인간 양수 유래 세포(CapT cell) 또는 COS 세포를 포함한다. 바람직하게는, CHO 세포일 수 있다. 한편, 상기 숙주 세포는 상기 백터와 시알산 전이효소 유전자가 적재된 백터가 도입된 것일 수 있다. 이때, 상기 시알산 전이효소는 2,3-시알산 전이효소 또는 2,6-시알산 전이효소 일 수 있다. 이때, 상기 2,6-시알산 전이효소는 서열번호 15의 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [0050] 본원 발명의 또 다른 측면으로, 1) 폴리펩티드 단량체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 시알산 전이효소 유전자가 도입된 세포를 배양하는 단계; 및 2) 폴리펩티드 이량체를 회수하는 단계를 통해 수득된, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIα-ECD)을 포함하는 단량체 두 개를 포함하는 폴리펩티드 이량체를 유효성분으로 포함하는 알러지성 질환 치료용 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다. 이때, 상기 단량체는 변형된 Fc 영역을 포함한다. 또한, 상기 변형된 Fc 영역과 FcεRIα-ECD는 힌지를 통해 결합된 것일 수 있다.
- [0051] 본원 발명의 또 다른 측면으로, 상술한 이량체 제조방법으로 제조된 폴리펩티드 이량체를 유효성분으로 포함하는 알러지성 증상의 개선 또는 완화용 식품 조성물을 제공한다.
- [0052] 본원 발명의 또 다른 측면으로, 상기 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIα-ECD)을 포함하는 단량체 두 개를 포함하는 폴리펩티드 이량체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 알러지 질환 치료 또는 예방 방법을 제공한다.
- [0053] 상기 개체는 포유 동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다. 이때, 투여는 경구 또는 비경구를 통하여 투여할 수 있다. 이때, 비경구는 피하 투여, 정맥 투여, 점막 투여, 근육 투여 등의 방법으로 수행될 수 있다.
- [0054] 이하, 본원 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본원 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본원 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.
- [0055] **실시예 1. FcεRIαECD과 변형된 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드의 제조**
- [0056] IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIα ECD: Extracellular domain)의 C 말단이 변형된 폴리펩티드는 미국 특허 7,867,491에 개시된 방법에 따라 제조하였다.
- [0057] 먼저, 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 FcεRI의 α사슬의 세포외 도메인과 서열번호 2의 변형된 면역글로불린 Fc가 각각, 서열번호 19의 힌지로 연결된 단백질(FcεRIαECD-Fc1), 서열번호 3의 힌지로 연결된 단백질(FcεRIαECD-Fc2) 및 서열번호 4의 힌지로 연결된 단백질(FcεRIαECD-Fc3)을 발현시키기 위하여, 각각의 단백질을 코딩하는 유전자를 연결한 카세트를 pAD15 백터(제넥신)에 클로닝하여, FcεRIαECD-Fc 단백질 발현 백터를 제작하였다. 그 후, 상기 발현 백터를 각각 CHO DG44 (from Dr. Chasin, Columbia University, USA) 세포에 형질주입하였다.
- [0058] 이때, 세포주에 형질 주입시 pCI Hygro 백터(Invitrogen)에 α-2,6-시알산 전이효소 유전자가 클로닝된 발현 백터를 동시에 형질주입하여, 시알산이 부가된 FcεRIαECD-Fc2ST 및 FcεRIαECD-Fc3ST 단백질을 발현할 수 있는 세포주를 별도로 제조하였다.
- [0059] 1차 스크리닝 과정으로 HT(5-hydroxytryptamine)가 없는 10% dFBS(Gibco, USA, 30067-334), MEMα(Gibco, 12561, USA, Cat No. 12561-049), HT+(Gibco, USA, 11067-030)) 배지를 사용하여 HT 선별을 수행하였다. 이후, DHFR(dihydrofolate reductase)-시스템을 이용하여 생산성을 증폭시키기 위해, HT 선별된 클론들을 이용하여 메토포렉사트(MTX) 증폭을 수행하였다.
- [0060] MTX 증폭이 완료된 후 생산성 평가를 위한 세포 안정화를 위해 1~5회 정도 계대배양하였다. 그 후, MTX 증폭이 된 세포의 단위 생산성 평가를 수행하였고, 그 결과는 하기 표 1에 나타내었다.

**표 1**

<b>Version</b>	<b>Media</b>	<b>MTX conc.</b>	<b>Productivity</b>		<b>Batch culture(mg/ml)</b>
			<b>3-day culture</b>		
			<b>ug/mL</b>	<b>ug/10<sup>6</sup> cells</b>	

Fc ε RI αECD-Fc2	Ex-cell DHFR	500nM	37.23	20.9	225
Fc ε RI αECD-Fc2+ a2,6-ST		100nM	45.4	25.1	338.2
Fc ε RI αECD-Fc3		2uM	27.0	16.9	180.4
Fc ε RI αECD-Fc3+ a2,6-ST		1uM	17.5	10.2	101.7

[0062] 표 1에 기재된 바와 같이, Fc ε RI αECD-Fc3 세포주는 2 uM 메토티렉사트 증폭 후 16.9 ug/10<sup>6</sup> cells 생산성을 나타내었다. 반면, 2,6-시알산 전이효소가 공동 형질주입된 Fc ε RI αECD-Fc3 세포주(Fc ε RI αECD-Fc3ST)는 1 uM 메토티렉사트 증폭후 17.5 ug/10<sup>6</sup> cells 생산성을 나타내었다. 또한, Fc ε RI αECD-Fc2 세포주는 0.5 uM 메토티렉사트 증폭 조건에서 20.9 ug/10<sup>6</sup> cells 생산성을 나타내었다. 또한, 2,6-시알산 전이효소가 공동 형질주입된 Fc ε RI αECD-Fc2 세포주(Fc ε RI αECD-Fc2ST)는 0.1 uM 메토티렉사트 증폭 후 25.1 ug/10<sup>6</sup> cells 생산성을 나타내었다. 즉, 0.1 uM 메토티렉사트 증폭 조건에서 선별된 2,6-시알산 전이효소가 공동 형질주입된 Fc ε RI αECD-Fc2 세포주가 생산성이 가장 우수한 것을 확인하였다.

[0063] **실시예 2. Fc ε RI α ECD 융합 단백질의 정제 및 순도 확인**

[0064] 상기 실시예 1에서 선별된 세포주 중 i) Fc ε RI αECD-Fc3, ii) Fc ε RI αECD-Fc3ST, iii) Fc ε RI αECD-Fc2ST를 60 ml 규모에서 배치배양법으로 배양하였다. 상기 배양된 배양액을 Protein-A affinity column을 이용하여 정제한 후, 정제된 단백질을 SDS-PAGE 및 크기-배제(Size-Exclusion) HPLC(SE-HPLC)를 수행하여 단백질의 순도를 확인하였다.

[0065] 도 1에 나타난 바와 같이, SE-HPLC 방법으로 정제된 각 단백질의 순도는 모두 93% 이상인 것을 확인하였다. 또한, SDS-PAGE 분석결과, 비환원 조건 및 환원 조건에서 각각 약 150 kDa, 약 75 kDa 크기의 단백질이 검출되는 것으로 확인되었으며(도 1, Lane 1 내지 6), 이를 통해 Fc와 결합된 Fc ε RI αECD가 이량체를 형성하고 있음을 알 수 있었다. 또한, SDS-PAGE 결과에서 절단된 형태 등의 불순물이 나타나지 않았으며, 특히, 해동(thawing)/냉동(freezing)의 과정을 거친 후에도(도 1, Lane 7 내지 8) 모두 순도가 93% 이상이었고 불순물이 없는 것을 확인하였으며, 야생형 IgD hinge가 적용된 Fc ε RI αECD-Fc1 대비 단백질 절단형의 생산이 줄어들었음을 알 수 있었다.

[0066] 이때, 시알산 전이효소 도입에 따른 단백질 시알산 함량 정도를 확인하기 위해 Gel-IEF를 아래의 시험조건으로 수행하였으며, 이를 통해 시알산 함량 증가로 인해 acidic 단백질의 함량이 증가되었음을 확인하였다.

**표 2**

[0067]

시험 조건	
Gel	pH3-10 IEF gel 1.0mm
Sample buffer	IEF sample buffer (2X)
Loading condition	100V 1hr, 200V 1hr, 500V 2hr

[0068] 또한, 정제 수율 재현성을 확인하기 위하여, Fc ε RI αECD-Fc2ST 세포주를 1L 플라스크에서 250 ml 규모에서 배치 배양하고, Protein-A affinity column을 이용하여 정제하였다. 그 후, 배양 상등액 및 정제물에 대해 4-15% TGX™ 겔(BIO-RAD사)에 트리스글라이신 SDS(TGS) 버퍼, 200V 조건으로 30분 동안 러닝 후 SDS PAGE 분석을 수행하였다. 그 결과, 1 단계 정제만으로도 매우 높은 순도(98% 이상)의 단백질이 정제되었을 뿐 아니라, 배양 상등액에서도 매우 높은 순도로 단백질이 발현되는 것을 확인하였다. 이는 해당 세포주에서 발현된 Fc ε RI αECD-Fc 단백질을 의약품으로 개발하는 데 있어, 공정 개발 단계가 간소화될 수 있고 결과적으로 의약품으로의 개발 비용이 현저히 절감될 수 있는 가능성이 매우 높음을 의미한다.

[0069] **실시예 3. Fc ε RI α ECD 융합 단백질과 IgE의 결합능 확인**

[0070] 상기 실시예 2의 방법을 통해 정제된 i) Fc ε RI αECD-Fc2, ii) Fc ε RI αECD-Fc2ST, iii) Fc ε RI αECD-Fc3 및 iv) Fc ε RI αECD-Fc3ST의 4 종 단백질과 시중에 판매되고 있는 항 IgE 항체인 오말리주맙(Omalizumab, 상품명: 졸레어(Xolair))에 대하여 IgE 결합능을 비교 측정하였다. 구체적으로, IgE 결합능은 Protein GLC sensor

chip(Bio-Rad, Cat #. 176-5011)의 채널에 IgE를 코팅하고, 오말리주맵 혹은 FcεRI αECD-Fc 단백질 각각을 여러 농도로 분당 30 ul의 속도로 흘려주었다.

[0071] 실험은 재생 버퍼인 25 mM NaOH를 이용하여 제로베이스를 확인한 후, 상기 단계를 반복하여 진행하였다. 그 후, 단백질 결합 분석기기(Proton XPR36, BIO-RAD, USA)를 이용하여 결합곡선을 확인하였으며, 그 결과를 표 3, 도 3 및 도 4에 나타내었다.

표 3

[0072]

Samples		FcεRIα ECD-Fc		오말리주맵	비고
Items					
Drug type		Fc 융합 단백질		Anti-IgE Ab	
Binding affinity	ka (Association rate)	Fc2	2.14 x 10 <sup>5</sup>	4.05 x 10 <sup>5</sup>	오말리주맵 대비 1.9배 약함
		Fc2ST	2.64 x 10 <sup>5</sup>		오말리주맵 대비 1.5배 약함
		Fc3	1.98 x 10 <sup>5</sup>		오말리주맵 대비 2.0배 약함
		Fc3ST	2.40 x 10 <sup>5</sup>		오말리주맵 대비 1.7배 약함
	kd (Dissociation rate)	Fc2	8.29 x 10 <sup>-5</sup>	6.02 x 10 <sup>-3</sup>	오말리주맵 대비 73배 좋음
		Fc2ST	5.69 x 10 <sup>-5</sup>		오말리주맵 대비 106배 좋음
		Fc3	1.33 x 10 <sup>-4</sup>		오말리주맵 대비 45배 좋음
		Fc3ST	1.49 x 10 <sup>-4</sup>		오말리주맵 대비 40배 좋음
	KD (kd/ka)	Fc2	3.88 x 10 <sup>-10</sup>	1.49 x 10 <sup>-8</sup>	오말리주맵 대비 38배 좋음
		Fc2ST	2.16 x 10 <sup>-10</sup>		오말리주맵 대비 69배 좋음
		Fc3	6.72 x 10 <sup>-10</sup>		오말리주맵 대비 22배 좋음
		Fc3ST	6.21 x 10 <sup>-10</sup>		오말리주맵 대비 24배 좋음

[0073]

표 3에 나타난 바와 같이, 본원 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체의 결합상수(Association rate, ka) 값은 오말리주맵과 비교하여 1.5 내지 2.0 배 작은 것으로 측정되었다. 즉, IgE 외의 물질과의 결합력이 오말리주맵에 비해 1.5 ~ 2.0 배 정도 낮은 것을 알 수 있었다. 또한, 본원 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체의 해리상수(Dissociation rate, kd) 값은 오말리주맵과 비교하여 40 내지 106 배 큰 것으로 측정되었다. 또한, 도 3 및 도 4에서 개시된 바와 같이, 오말리주맵은 IgE와 결합한 후 일정 시간이 지나면 결합이 떨어지는 반면, 본원 발명의 FcεRI αECD 융합 단백질의 폴리펩티드 이량체는 일단 IgE와 결합한 후에는 IgE와 떨어지지 않는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 본원 발명의 폴리펩티드 이량체는 IgE와 쉽게 분리되지 않고, 결합된 상태로 유지되는 능력이 오말리주맵에 비해 월등히 좋은 것을 알 수 있다. 결과적으로, 본원 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체의 평형상수(Equilibrium dissociation constant, KD <kd/ka>) 값은 오말리주맵과 비교하여 22 내지 69배 높은 것을 알 수 있으며, 이를 통해, 본원 발명의 FcεRI αECD 융합 단백질은 오말리주맵과 비교하여 IgE에 대한 결합능이 현저히 증가한 것을 확인하였다. 특히, 시알산이 부가된 FcεRI αECD-Fc2(FcεRI αECD-Fc2ST)가 오말리주맵 대비 69배로 IgE 결합력이 가장 우수함을 확인하였다.

[0074]

실시예 4. FcεRI α ECD 융합 단백질과 IgG 수용체의 결합능 확인

[0075]

IgE TRAP와 오말리주맵의 IgG 수용체에 대한 결합 정도는 Octet RED384 시스템(Pall ForteBio, CA, USA)을 사용하여 확인하였다. 활성화된 AR2G 바이오 센서에 FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA 및 FcγRIIIB 재조합 단백질(R & D 시스템, 5 μg/ml)을 300 mM 아세트이트 완충액(pH 5)에 고정화 하였다. Running buffer는 0.1 % Tween-20 및 1 % bovine serum을 포함한 PBS를 사용하였다. 모든 실험은 샘플 플레이트 셰이커 1000 rpm 속도로 30℃에서 이루어졌다. 그 결과는 도면 도 5a 내지 도 5e에 나타내었고, 오말리주맵과 IgE<sub>TRAP</sub>의 IgG 수용체와의 결합능을 수치화하여 도 6에 나타내었다.

[0076]

실시예 5. 마우스 골수 유래 비만 세포에서 베타-헥소사미니다제 어세이를 통한 FcεRI α ECD 융합 단백질의 활



**성 확인**

- [0077] 본원 발명의 FcεRIαECD 융합 단백질의 in vitro 활성 분석을 위하여 베타 헥소사미니다제 분석을 수행하였다. 구체적으로, 본원 발명의 일 구체예에 따른 FcεRIαECD-Fc2 단백질을 농도별로 마우스 IgE(1 ug/mL)와 혼합하여 상온(20℃)에서 30분간 인큐베이션(incubation)시켜 시료를 준비하였다. 비만 세포 활성화를 위해 배양중인 마우스 골수 유래 비만세포(mast cell)를 HBSS(Hank's balanced salt solution) 버퍼로 세척하여 배지를 제거하였으며, 세포수를 측정된 후  $5 \times 10^5$  개의 세포들이 40 uL의 HBSS 버퍼에 주입되도록 조절하였다.
- [0078] 그 후, 상기 프리 인큐베이션을 통해 준비된 시료 용액 50 uL를 활성화된 비만 세포에 첨가하였다. 그 후, 37℃에서 30분간 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 30분 동안 배양하였다. 이후 외래 항원인 DNP(2,4-dinitrophenol, 100 ng/mL)를 10 uL씩 첨가한 후, 다시 37℃에서 30분간 5% CO<sub>2</sub> 배양시킨 다음 상층액을 30 uL 분리하였다. 분리된 상층액 30 uL와 기질(4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide, 5.84 mM) 30 uL를 잘 혼합한 후 37℃에서 20분간, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 그 후, 정지용액(Stop solution)인 0.1 M 소듐 카보네이트 버퍼(sodium carbonate buffer)(pH 10) 140 uL를 넣고 반응을 종결시켰다. 이 후, 405 nm에서 흡광도를 측정하여 활성화된 비만 세포에서 외래 항원에 의해 분비되는 베타-헥소사미니다아제(β-hexosaminidase)의 분비량을 확인하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0079] 도 7에 나타난 바와 같이, 본원 발명의 일 구체예의 폴리펩티드 이량체의 농도가 마우스 IgE의 절반(0.5 ug/mL)일 때 약 49.4 %의 억제율을 보여주었으며, 마우스 IgE와 동일한 농도(1 ug/mL)일 때 약 99.4 %의 비만 세포 억제율을 보여주었다. 즉, 본원 발명의 FcεRIα-ECD 폴리펩티드 이량체에 의해 IgE에 의한 골수 유래 비만세포의 활성이 크게 억제되는 것을 알 수 있다.
- [0080] **실시예 6. 인간 FcεRI 발현 마우스 골수 유래 비만 세포에서 베타-헥소사미니다제 어세이를 이용한 FcεRIα ECD 융합 단백질 및 anti-human IgE 항체의 활성 비교**
- [0081] in vitro 활성 분석을 통해 FcεRIα ECD 융합 단백질의 Xolair 대비 우수성을 확인하기 위하여 베타-헥소사미니다제 분석을 진행하였다. 각 약물 FcεRIαECD-Fc2ST(IgE<sub>TRAP</sub>)과 Xolair를 농도별로 준비한 후 인간 IgE (1 ug/mL)와 혼합한 후 상온에서 30분간 인큐베이션 시켰다. 약물을 프리(pre)-인큐베이션 하는 동안 인간 FcεRI 유전자가 도입되고, 마우스 FcεRI 유전자가 제거된 마우스의 골수로부터 유래 및 분화된 비만세포를 준비하였다. 준비한 비만 세포들을 HBSS 버퍼로 세척해준 후,  $5 \times 10^5$  개의 세포들을 60 uL의 HBSS 버퍼에 주입하였다. 준비가 끝난 비만세포에 프리(pre)-인큐베이션한 시료 20 uL를 비만세포에 첨가한 후 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 30분 동안 배양하였다.
- [0082] 이후 anti-human IgE 항체 (Biolegend, Cat No. 325502, 0.5 ug/mL)를 20 uL 첨가한 후 다시 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 30분 동안 배양하였다. 이후 1,500 rpm, 4℃, 원심분리 한 후 상층액 30 uL를 분리하였다. 분리한 상층액 30 uL와 기질(4-Nitrophenyl N-acetyl-βglucosaminide, 5.84 mM) 30 uL를 잘 혼합한 후 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 25분 동안 배양하였다. 그 후, 0.1 M 소듐 카보네이트 버퍼(sodium carbonate buffer) (pH 10) 140 uL를 넣고 반응을 종결시켰다.
- [0083] 이 후, 405 nm에서 흡광도를 측정하여분비된 베타-헥소사미니다아제 (β-hexosaminidase)의 상대량을 비교하여 각 약물의 농도에 따른 비만 세포 억제효과를 확인하였다. 그 결과는 도 8에 나타내었다. 도 8에 표시한 바와 같이, FcεRIα ECD 융합 단백질의 IC<sub>50</sub>은 대략 11.16 ng/mL로 측정되었고, Xolair 단백질의 IC<sub>50</sub>은 대략 649.8 ng/mL로 측정되었다. 따라서, FcεRIα ECD 융합 단백질은 Xolair에 비해 58배 정도 높은 비만 세포 활성 억제력이 있음을 확인하였다.
- [0084] **실시예 7. FcεRIα ECD 융합 단백질의 in vivo assay(식품 알러지 모델)**
- [0085] Balb/c 마우스(오리엔트바이오)들에 대하여 OVA(ovalbumin) 50 ug 및 알룸(Alum) 1 mg을 14일 간격으로 2회 복강 투여하여 감작(sensitization)을 유발하였다. 이후, 28, 30, 32, 34, 36일째, 총 5회에 걸쳐 OVA 50 mg을 경구 투여하여 장에 음식물 알러지를 유발하였다.
- [0086] 상기 OVA를 경구 투여 2회 후 즉, 31일째에 상기 마우스를 7마리씩 3개의 그룹으로 분류하였다. 제 1 그룹인 FcεRIαECD-Fc2ST 융합 단백질을 고농도(200 ug)로 투여하는 군, 제 2 그룹인 저농도(20 ug)로 투여하는 군 및 제 3 그룹인 투여하지 않는 군으로 분류하였다. 상기 OVA를 경구 투여하면서 음식물 알러지 유발에 따라 설사

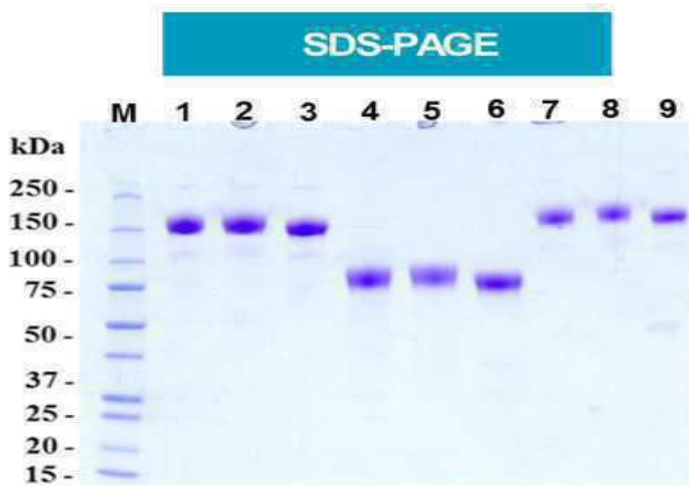
발생 여부를 확인하였으며, 37일째 상기 마우스를 희생시켜 각 그룹에 속한 마우스에 대하여 소장 내 비만세포의 수, 혈중 IgE 농도 및 혈중 비만세포의 탈과립 효소 농도(MCPT-1, Mast cell protease-1)를 분석하였다.

[0087]

도 9에 나타난 바와 같이, FcεRI αECD-Fc2ST인 폴리펩티드 이량체를 고농도로 투여한 군에 속한 마우스에서, 아무것도 투여하지 않은 군에 속한 마우스에 비하여 농도 의존적으로 식품 알러지가 완화되는 효과를 나타남을 확인하였다.

**도면**

**도면1a**

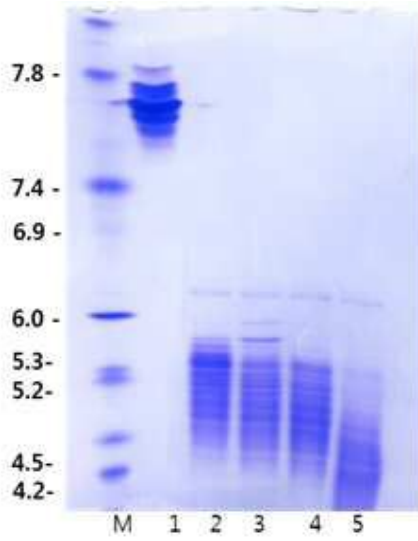


**도면1b**

Lane #	Sample	Purification	Purity (SE-HPLC)	Sample condition	
M	Protein standard		.	.	.
1	FcεR1α ECD-Fc3	One-step (Protein-A column) purification	94.5%	.	Non-reducing
2	FcεR1α ECD-Fc3+2,6 ST		93.7%		
3	FcεR1α ECD-Fc2+2,6 ST		93.2%		
4	FcεR1α ECD-Fc3		94.5%	.	Reducing
5	FcεR1α ECD-Fc3+2,6 ST		93.7%		
6	FcεR1α ECD-Fc2+2,6 ST		93.2%		
7	FcεR1α ECD-Fc3		94.5%	Freezing/Thawing test	Non-reducing
8	FcεR1α ECD-Fc3+2,6 ST		93.7%		
9	FcεR1α ECD-Fc3+2,6 ST		93.2%		

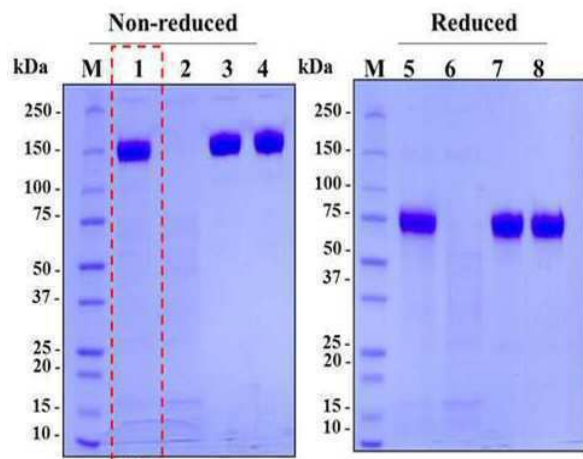


도면1c



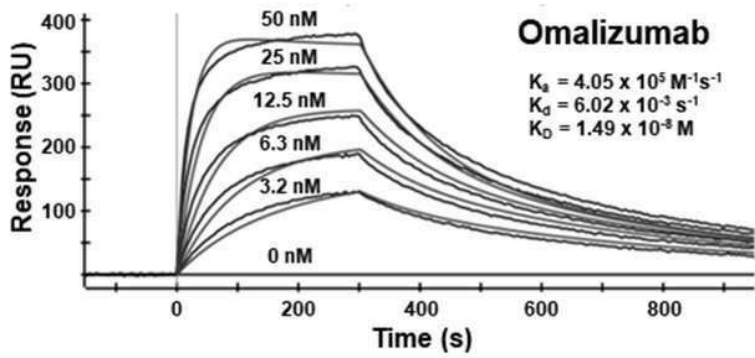
Lane	Loading sample	이론 pI
M	Marker (SERVA pH3-10, 5uL)	
1	Xolair	7.03
2	FcεRIα ECD-FC2	5.62
3	FcεRIα ECD-FC2+2,6 ST	5.62
4	FcεRIα ECD-FC3	5.63
5	FcεRIα ECD-FC3+2,6 ST	5.63

도면2

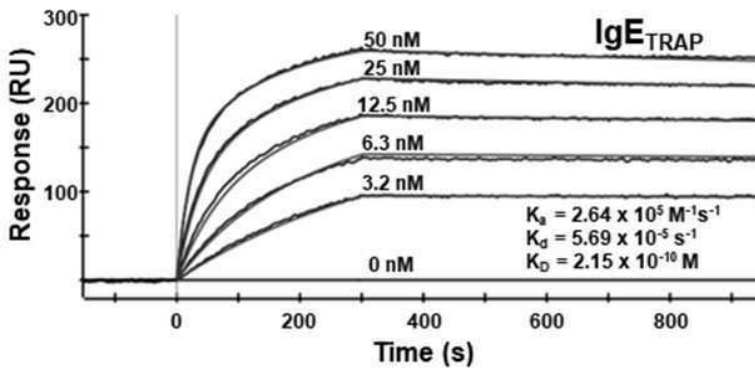


Lane	Sample name	Loading amount
M	Size Marker	3ul
<b>1</b>	<b>Input</b>	<b>Max</b>
2	FT	Max
3	Elute	3 ug
4	Elute_N	3 ug
M	Size Marker	3ul
5	Input	Max
6	FT	Max
7	Elute	3 ug
8	Elute_N	3 ug

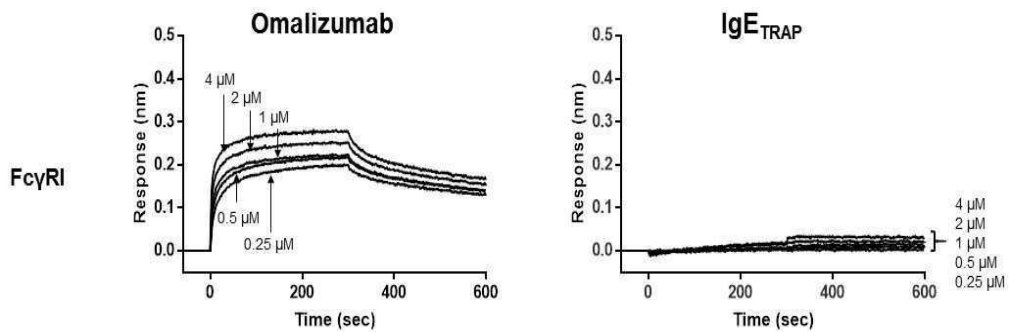
도면3



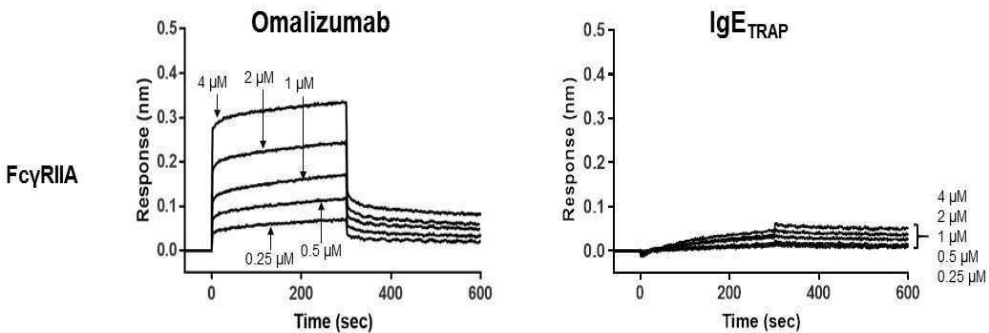
도면4



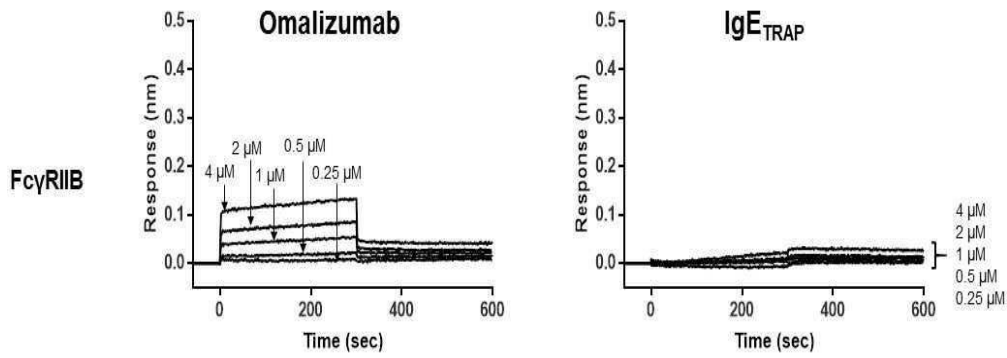
도면5a



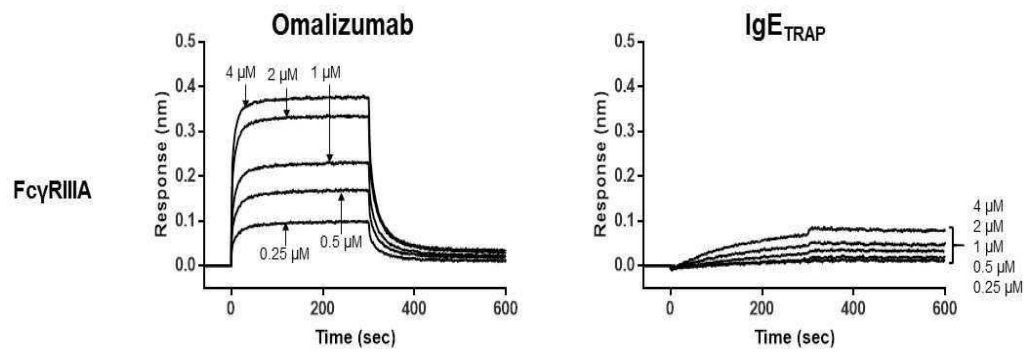
도면5b



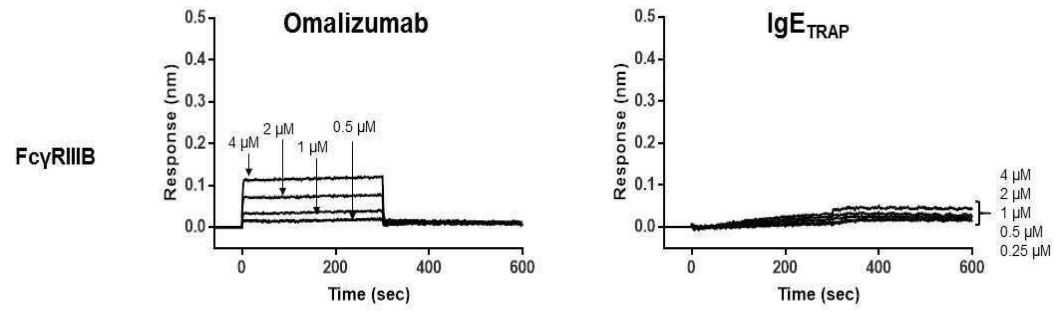
도면5c



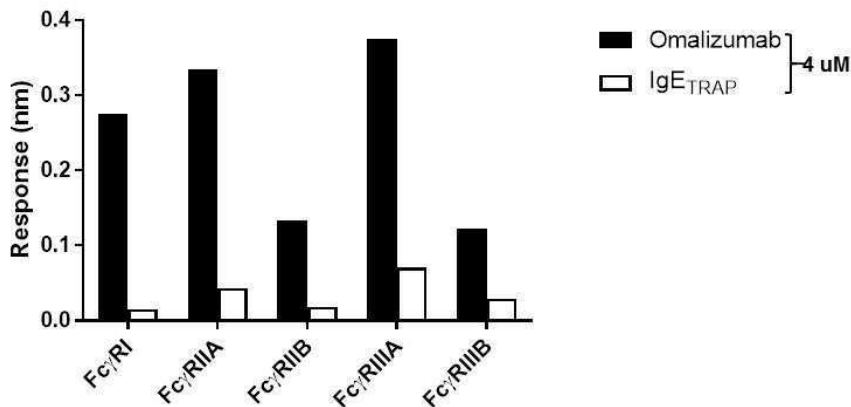
도면5d



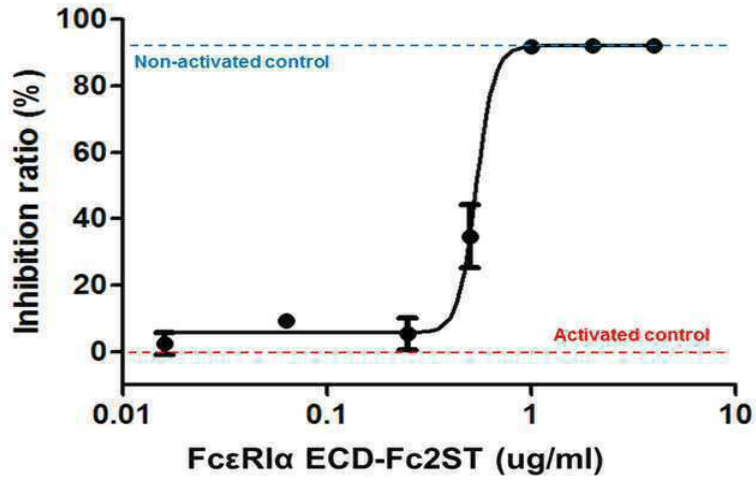
도면5e



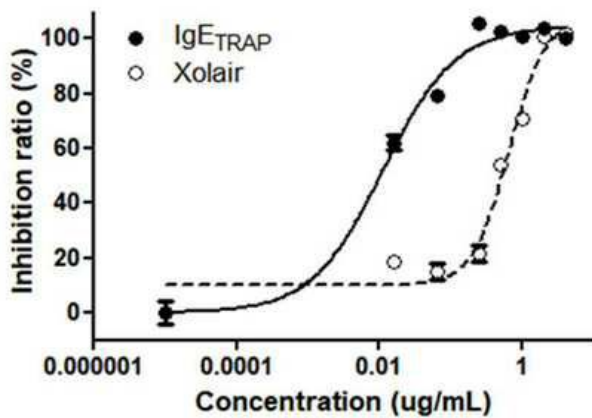
도면6



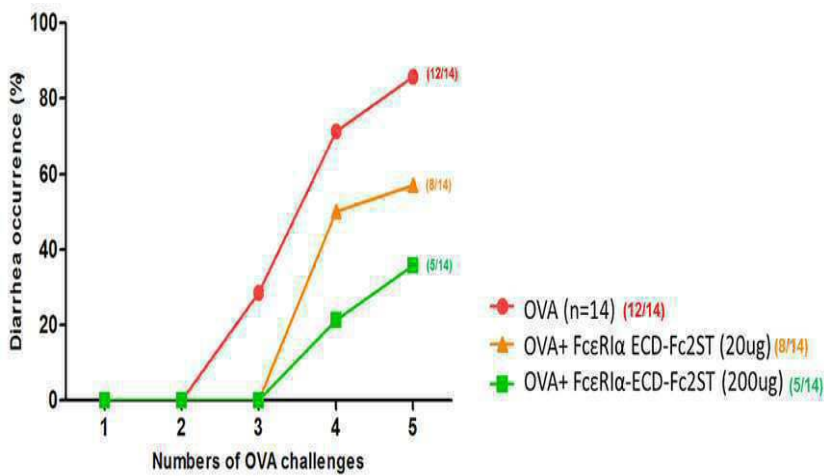
도면7



도면8



도면9



서열 목록

<110> PROGEN CO., LTD.

<120> PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING RECOMBINANT EXTRACELLULAR DOMAIN OF IgE Fc RECEPTOR SUBUNIT ALPHA

<130> FPD/201901-0002/c

<150> KR 10-2018-0002262

<151> 2018-01-08

<160> 22

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 180

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FcεRI1 ECD

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Trp Leu Gln

180

<210> 2

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified Fc

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175



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

180 185 190

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

195 200 205

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

210 215

<210> 3

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgD hinge variant

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 4

<211> 49

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgD hinge variant

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Pro

<210> 5

<211> 540

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotides sequence of FcεRI1 ECD

<400> 5

```

gtgccccaga agcccaaggt ggcctgaac cctccctgga acagaatctt caagggcgag      60
aacgtgacce tgacctgcaa cggcaacaac ttcttcgagg tgagcagcac caagtggttc      120
cacaatggca gcctgagcga ggagaccaac agctccctga acatcgtgaa cgccaagttc      180
gaggacacgc gcgagtacaa gtgccagcac cagcaggtga acgagagcga gcccggttac      240
ctggaggtgt tcagcgactg gctgctgctg caggccagcg ccgaggtggt gatggagggc      300

cagccctgtt tcctgagatg ccacggctgg agaaactggg acgtgtaca ggtgatctac      360
tacaagatg gcgaggccct gaagtactgg tacgagaacc acaacatctc catcaccaac      420
gccaccgtgg aggacagcgg cacctactac tgcacaggca aggtgtggca gctggactac      480
gagagcgagc ccctgaacat caccgtgatc aaggctccca gagagaagta ctggctgcag      540
540
    
```

<210> 6

<211> 561

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotides sequence of modified Fc

<400> 6

```

tgcgtggtcg tggatgtgag ccaggaagat cccgaagtgc agttcaactg gtacgtggat      60
ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagaag agcagttcaa ctccacctac      120
agagtggatg gcgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag      180
tgcaaggtgt ccaacaaagg cctgcccagc tccatcgaga agaccatcag caaagccaaa      240
ggccagccca gagaacccca ggtgtacacc ctgcctccca gccaggaaga gatgaccaag      300
aaccaggtgt ccctgacctg cctggtgaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag      360
tgggaaagca acggccagcc cgagaacaat tacaagacaa cccctcccgt gctggatagc      420

gatggcagct tctttctgta cagcagactg accgtggaca agagcagatg gcaggaaggc      480
aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgaa gcctgcaca accactacac ccagaagagc      540
ctgtccctga gcctgggcaa g                                     561
    
```

<210> 7

<211> 174

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> nucleotides sequence of IgD hinge variant  
 <400> 7  
 aggaacaccg gcagaggagg cgaggaaaag aaaggaagca aggagaagga ggagcaggag 60  
 gaaagagaaa ccaagacccc cgagtgcccc agccacaccc agcccctggg cgtgttctg 120  
  
 ttcccccca agcccaagga caccctgatg atcagcagaa cccccgaggt gacc 174  
 <210> 8  
 <211> 231  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> nucleotides sequence of IgD hinge variant  
 <400> 8  
 gccccagccc aggccgaggg cagcctggct aaggccacca cagctcccgc caccaccagg 60  
 aacaccggca gaggaggcga ggaaaagaaa ggaagcaagg agaaggagga gcaggaggaa 120  
 agagaaacca agacccccga gtgccccagc cacaccagc ccctgggcgt gttcctgttc 180  
 ccccccaagc ccaaggacac cctgatgatc agcagaacce ccgaggtgac c 231  
  
 <210> 9  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> signal peptide  
 <400> 9  
 Met Asp Ala Met Leu Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Val Phe Val Ser Pro Ser His Ala  
 20 25  
 <210> 10  
 <211> 75  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> nucleotides sequence of signal peptide  
 <400> 10

atggacgccca tgctgagagg cctgtgctgt gtgctgctgc tgtgcggcgc cgtgttcgtg 60

tcccctagcc acgcc 75

<210> 11

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FcεR1a ECD-hinge-Fc2

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Asn Pro Pro Trp Asn Arg Ile Phe Lys Gly Glu Asn Val Thr

35 40 45

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

50 55 60

Phe His Asn Gly Ser Leu Ser Glu Glu Thr Asn Ser Ser Leu Asn Ile

65 70 75 80

Val Asn Ala Lys Phe Glu Asp Ser Gly Glu Tyr Lys Cys Gln His Gln

85 90 95

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

100 105 110

Leu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Glu Val Val Met Glu Gly Gln Pro Leu

115 120 125

Phe Leu Arg Cys His Gly Trp Arg Asn Trp Asp Val Tyr Lys Val Ile

130 135 140

Tyr Tyr Lys Asp Gly Glu Ala Leu Lys Tyr Trp Tyr Glu Asn His Asn

145 150 155 160

Ile Ser Ile Thr Asn Ala Thr Val Glu Asp Ser Gly Thr Tyr Tyr Cys

165 170 175

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

180 185 190  
Thr Val Ile Lys Ala Pro Arg Glu Lys Tyr Trp Leu Gln Arg Asn Thr  
195 200 205  
Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Gly Ser Lys Glu Lys Glu Glu Gln  
210 215 220  
Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro  
225 230 235 240  
Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
245 250 255  
  
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu  
260 265 270  
Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
275 280 285  
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg  
290 295 300  
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
305 310 315 320  
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu  
325 330 335  
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
340 345 350  
Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
355 360 365  
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
370 375 380  
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
385 390 395 400  
  
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp  
405 410 415  
Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
420 425 430  
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu

435  
 Gly Lys  
 450  
 <210> 12  
 <211> 1350  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> nucleotides sequence of FcεRIa ECD-hinge-Fc2

<400> 12

atggacgcca tgctgagagg cctgtgctgt gtgctgctgc tgtgcggcgc cgtgttcgtg 60  
 tcccctagcc acgccgtgcc ccagaagccc aaggtgagcc tgaacctcc ctggaacaga 120  
 atcttcaagg gcgagaacgt gaccctgacc tgcaacggca acaacttctt cgaggtgagc 180  
 agcaccaagt ggttccacaa tggcagcctg agcgaggaga ccaacagctc cctgaacatc 240  
 gtgaacgcca agttcgagga cagcggcgag tacaagtgcc agcaccagca ggtgaacgag 300  
 agcgagcccc tgiacctgga ggtgttcagc gactggctgc tgctgcaggc cagcgccgag 360  
 gtggtgatgg agggccagcc cctgttcctg agatgccacg gctggagaaa ctgggacgtg 420

tacaagtgta tctactaaa ggatggcgag gcctgaagt actggtacga gaaccacaac 480  
 atctccatca ccaacgccac cgtggaggac agcggcacct actactgcac aggcaaggtg 540  
 tggcagctgg actacgagag cgagcccctg aacatcaccc tgatcaagcc tcccagagag 600  
 aagtactggc tgcagaggaa caccggcaga ggaggcgagg aaaagaaagg aagcaaggag 660  
 aaggaggagc aggaggaaag agaaaccaag acccccagat gccccagcca cacccagccc 720  
 ctgggcgtgt tctgttccc cccaagccc aaggacaccc tgatgatcag cagaaccccc 780  
 gaggtgacct gcgtggtcgt ggatgtgagc caggaagatc ccgaagtgca gttcaactgg 840

tacgtggatg gcgtggaagt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagaaga gcagttcaac 900  
 tccacctaca gagtggtagc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 960  
 gagtacaagt gcaaggtgtc caacaaaggc ctgcccagct ccatcgagaa gaccatcagc 1020  
 aaagccaaag gccagcccag agaaccccag gtgtacaccc tgccctccag ccaggaagag 1080  
 atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc ctggtgaaag gcttctacc cagcgacatc 1140  
 gccgtggagt gggaaagcaa cggccagccc gagaacaatt acaagacaac ccctcccgtg 1200  
 ctggatagcg atggcagctt ctttctgtac agcagactga ccgtggacaa gagcagatgg 1260

caggaaggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgaag ccctgcacaa cactacacc 1320



cagaagagcc tgcacctgag cctgggcaag

1350

<210> 13

<211> 469

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FcεRIα ECD-hinge-Fc3

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Asn Pro Pro Trp Asn Arg Ile Phe Lys Gly Glu Asn Val Thr

35 40 45

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

50 55 60

Phe His Asn Gly Ser Leu Ser Glu Glu Thr Asn Ser Ser Leu Asn Ile

65 70 75 80

Val Asn Ala Lys Phe Glu Asp Ser Gly Glu Tyr Lys Cys Gln His Gln

85 90 95

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

100 105 110

Leu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Glu Val Val Met Glu Gly Gln Pro Leu

115 120 125

Phe Leu Arg Cys His Gly Trp Arg Asn Trp Asp Val Tyr Lys Val Ile

130 135 140

Tyr Tyr Lys Asp Gly Glu Ala Leu Lys Tyr Trp Tyr Glu Asn His Asn

145 150 155 160

Ile Ser Ile Thr Asn Ala Thr Val Glu Asp Ser Gly Thr Tyr Tyr Cys

165 170 175

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

180 185 190

Thr Val Ile Lys Ala Pro Arg Glu Lys Tyr Trp Leu Gln Ala Gln Pro



450

455

460

Leu Ser Leu Gly Lys

465

<210> 14

<211> 1407

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 14

```

atggacgcca tgctgagagg cctgtgctgt gtgctgctgc tgtgcggcgc cgtgttcgtg      60
tcccctagcc acgccgtgcc ccagaagccc aaggtgagcc tgaacctcc ctggaacaga      120
atcttcaagg gcgagaacct gaccctgacc tgcaacggca acaacttctt cgaggtagagc      180
agcaccaagt ggttcacaa tggcagcctg agcgaggaga ccaacagctc cctgaacatc      240
gtgaacgcca agttcgagga cagcggcgag tacaagtgcc agcaccagca ggtgaacgag      300

agcgagcccc tgiacctgga ggtgttcagc gactggctgc tgctgcaggc cagcggcgag      360
gtggtgatgg agggccagcc cctgttctct agatgccacg gctggagaaa ctgggacgtg      420
tacaagtgta tctactaaa ggatggcgag gccctgaagt actggtacga gaaccacaac      480
atctccatca ccaacgccac cgtggaggac agcggcacct actactgcac aggcaaggtg      540
tggcagctgg actacgagag cgagcccctg aacatcaccg tgatcaaggc tcccagagag      600
aagtactggc tgcaggccca gccccaggcc gagggcagcc tggctaaggc caccacagct      660
cccgccacca ccaggaacac cggcagagga ggcgaggaaa agaaaggaag caaggagaag      720

gaggagcagg aggaaagaga aaccaagacc cccgagtgcc ccagccacac ccagcccctg      780
ggcgtgttcc tgttcccccc caagccaag gacaccctga tgatcagcag aacccccgag      840
gtgacctgcg tggtcgtgga tgtgagccag gaagatcccg aagtgcagtt caactggtac      900
gtggatggcg tgaagtgca caacccaag accaagccca gagaagagca gttcaactcc      960
acctacagag tggtagcgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag      1020
tacaagtgca aggtgtccaa caaaggcctg cccagctcca tcgagaagac catcagcaaa      1080
gccaaaggcc agcccagaga accccagggtg tacacctgc ctcccagcca ggaagagatg      1140

accaagaacc aggtgtcctt gacctgcctg gtgaaaggct tctaccccag cgacatcgcc      1200
gtggagtggg aaagcaacgg ccagcccag aacaattaca agacaacccc tcccgtgctg      1260
gatagcgatg gcagcttctt tctgtacagc agactgaccg tggacaagag cagatggcag      1320
    
```

gaaggcaacg tgttcagctg cagcgtgatg cacgaagccc tgcacaacca ctacaccag 1380  
aagagcctgt ccctgagcct gggcaag 1407

<210> 15  
<211> 406  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> human a-2,6 sialic acid transferase

<400> 15

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

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

Leu Lys Ser Ser Gln Leu Gly Arg Glu Ile Asp Asp His Asp Ala Val  
 195 200 205  
 Leu Arg Phe Asn Gly Ala Pro Thr Ala Asn Phe Gln Gln Asp Val Gly  
 210 215 220  
 Thr Lys Thr Thr Ile Arg Leu Met Asn Ser Gln Leu Val Thr Thr Glu  
 225 230 235 240  
 Lys Arg Phe Leu Lys Asp Ser Leu Tyr Asn Glu Gly Ile Leu Ile Val  
 245 250 255  
 Trp Asp Pro Ser Val Tyr His Ser Asp Ile Pro Lys Trp Tyr Gln Asn  
 260 265 270  
 Pro Asp Tyr Asn Phe Phe Asn Asn Tyr Lys Thr Tyr Arg Lys Leu His  
 275 280 285  
  
 Pro Asn Gln Pro Phe Tyr Ile Leu Lys Pro Gln Met Pro Trp Glu Leu  
 290 295 300  
 Trp Asp Ile Leu Gln Glu Ile Ser Pro Glu Glu Ile Gln Pro Asn Pro  
 305 310 315 320  
 Pro Ser Ser Gly Met Leu Gly Ile Ile Ile Met Met Thr Leu Cys Asp  
 325 330 335  
 Gln Val Asp Ile Tyr Glu Phe Leu Pro Ser Lys Arg Lys Thr Asp Val  
 340 345 350  
 Cys Tyr Tyr Tyr Gln Lys Phe Phe Asp Ser Ala Cys Thr Met Gly Ala  
 355 360 365  
 Tyr His Pro Leu Leu Tyr Glu Lys Asn Leu Val Lys His Leu Asn Gln  
 370 375 380  
 Gly Thr Asp Glu Asp Ile Tyr Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Pro Gly  
 385 390 395 400  
 Phe Arg Thr Ile His Cys  
 405  
 <210> 16  
 <211> 1218  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 16

```

atgatccaca ccaacctgaa gaagaagttc agctgctgcg tgctggtgtt cctgctgttc      60
gccgtgatct gcgtgtggaa ggagaagaag aaaggcagct actacgacag cttcaagctg      120
cagaccaagg agttccaggt gctgaagagc ctgggcaagc tggccatggg cagcgacagc      180
cagagcgtgt ccagctcttc caccaggat cccacagag gcagacagac cctgggcagc      240
ctgagaggcc tggccaaggc caagcccag gccagcttcc aggtgtggaa caaggacagc      300
agcagcaaga acctgatccc cagactgcag aagatctgga agaactacct gagcatgaac      360
aagtacaagg tgagctacaa aggacccgga cccggcatca agttcagcgc cgaggcctg      420

aggtgccacc tgagagacca cgtgaacgtg agcatggtgg aagtgaccga cttccccttc      480
aacaccagcg agtgggaagg ctacctgccc aaggagagca tcaggaccaa ggctggcccc      540
tggggcagat gcgccgtggt gagcagcgtt ggagcctga agagctcca gctgggcaga      600
gagatcgacg accacgatgc cgtgctgagg ttcaatggcg ctcccaccgc caacttcag      660
caggacgtgg gcaccaagac cacaatccgg ctgatgaaca gccagctggt gacaaccgag      720
aagcggttcc tgaaggacag cctgtacaac gagggcatcc tgatcgtgtg ggatcccagc      780
gtgtaccaca gcgacatccc caagtgttac cagaatcccg actacaactt cttcaacaac      840

tacaagacct atagaaagct gcacccaac cagcccttct acatcctgaa gcccagatg      900
ccctgggagc tgtgggacat cctgcaggag atcagccctg aagagatcca gcccaccct      960
ccctccagcg geatgctggg cattatcctc atgatgacce tgtgcgacca ggtggacatc     1020
tacgagttcc tgcccagcaa gagaaagacc gacgtgtgct actactatca gaagttcttc     1080
gacagcgcct gcaccatggg gcctaccac ccctgtgtgt acgagaagaa cctggtgaag     1140
cacctgaacc agggcaccca cgaggacatc tacctgetgg gcaaagccac cctgcccggc     1200
ttcagaacca tccactgc                                     1218
    
```

<210> 17

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgD hinge variant

<400> 17

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

1

5

10

15

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

20 25 30

<210> 18

<211> 49

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgD hinge variant

<400> 18

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Pro

<210> 19

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgD hinge

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 20

<211> 425

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FcεRIα ECD-hinge-Fc1

<400> 20

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

1                    5                    10                    15  
 Phe Lys Gly Glu Asn Val Thr Leu Thr Cys Asn Gly Asn Asn Phe Phe  
                          20                    25                    30  
 Glu Val Ser Ser Thr Lys Trp Phe His Asn Gly Ser Leu Ser Glu Glu  
                          35                    40                    45  
 Thr Asn Ser Ser Leu Asn Ile Val Asn Ala Lys Phe Glu Asp Ser Gly  
                          50                    55                    60  
 Glu Tyr Lys Cys Gln His Gln Gln Val Asn Glu Ser Glu Pro Val Tyr  
                          65                    70                    75                    80  
 Leu Glu Val Phe Ser Asp Trp Leu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Glu Val  
                          85                    90                    95  
 Val Met Glu Gly Gln Pro Leu Phe Leu Arg Cys His Gly Trp Arg Asn  
                          100                    105                    110  
  
 Trp Asp Val Tyr Lys Val Ile Tyr Tyr Lys Asp Gly Glu Ala Leu Lys  
                          115                    120                    125  
 Tyr Trp Tyr Glu Asn His Asn Ile Ser Ile Thr Asn Ala Thr Val Glu  
                          130                    135                    140  
 Asp Ser Gly Thr Tyr Tyr Cys Thr Gly Lys Val Trp Gln Leu Asp Tyr  
                          145                    150                    155                    160  
 Glu Ser Glu Pro Leu Asn Ile Thr Val Ile Lys Ala Pro Arg Glu Lys  
                          165                    170                    175  
 Tyr Trp Leu Gln Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys  
                          180                    185                    190  
 Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu  
                          195                    200                    205  
 Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
                          210                    215                    220  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
                          225                    230                    235                    240  
 Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
                          245                    250                    255



Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 260 265 270

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 275 280 285

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 290 295 300

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 305 310 315 320

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met  
 325 330 335

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 340 345 350

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 420 425

<210> 21

<211> 425

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FcεRIα ECD-hinge-Fc2

<400> 21

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

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

Glu Val Ser Ser Thr Lys Trp Phe His Asn Gly Ser Leu Ser Glu Glu  
 35 40 45  
 Thr Asn Ser Ser Leu Asn Ile Val Asn Ala Lys Phe Glu Asp Ser Gly  
 50 55 60  
 Glu Tyr Lys Cys Gln His Gln Gln Val Asn Glu Ser Glu Pro Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Val Phe Ser Asp Trp Leu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Glu Val  
 85 90 95  
  
 Val Met Glu Gly Gln Pro Leu Phe Leu Arg Cys His Gly Trp Arg Asn  
 100 105 110  
 Trp Asp Val Tyr Lys Val Ile Tyr Tyr Lys Asp Gly Glu Ala Leu Lys  
 115 120 125  
 Tyr Trp Tyr Glu Asn His Asn Ile Ser Ile Thr Asn Ala Thr Val Glu  
 130 135 140  
 Asp Ser Gly Thr Tyr Tyr Cys Thr Gly Lys Val Trp Gln Leu Asp Tyr  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Glu Pro Leu Asn Ile Thr Val Ile Lys Ala Pro Arg Glu Lys  
 165 170 175  
 Tyr Trp Leu Gln Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Gly  
 180 185 190  
 Ser Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu  
 195 200 205  
 Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 210 215 220  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 225 230 235 240  
  
 Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
 245 250 255  
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 260 265 270  
 Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 275 280 285

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 290 295 300

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 305 310 315 320

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met  
 325 330 335

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 340 345 350

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 420 425

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

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

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

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

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

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

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

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

Trp Asp Val Tyr Lys Val Ile Tyr Tyr Lys Asp Gly Glu Ala Leu Lys  
 115 120 125

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

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

145 150 155 160

Glu Ser Glu Pro Leu Asn Ile Thr Val Ile Lys Ala Pro Arg Glu Lys  
 165 170 175

Tyr Trp Leu Gln Ala Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala  
 180 185 190

Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu  
 195 200 205

Lys Lys Gly Ser Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys  
 210 215 220

Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe  
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr

290 295 300

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

305                    310                    315                    320  
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
                                  325                    330                    335  
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln  
                                  340                    345                    350  
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
                                  355                    360                    365  
  
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
                                  370                    375                    380  
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
 385                    390                    395                    400  
 Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu  
                                  405                    410                    415  
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
                                  420                    425                    430  
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
  
                                  435                    440