



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년11월08일
(11) 등록번호 10-2323342
(24) 등록일자 2021년11월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/24 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) A61P 37/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/244 (2013.01)
A61K 47/6845 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2019-0049177
(22) 출원일자 2019년04월26일
심사청구일자 2019년04월26일
(65) 공개번호 10-2020-0125213
(43) 공개일자 2020년11월04일
(56) 선행기술조사문헌
WO2017132457 A1
US20150147327 A1
KR1020150113199 A

(73) 특허권자
주식회사 와이바이오로지스
대전광역시 유성구 테크노4로 29, 3층 (관평동)
(72) 발명자
윤재봉
대전광역시 서구 만년로 45, 106동 203호 (만년동, 초원아파트)
전은영
서울특별시 송파구 도곡로62길 11-14, 302호 (잠실동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이치영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 21 항

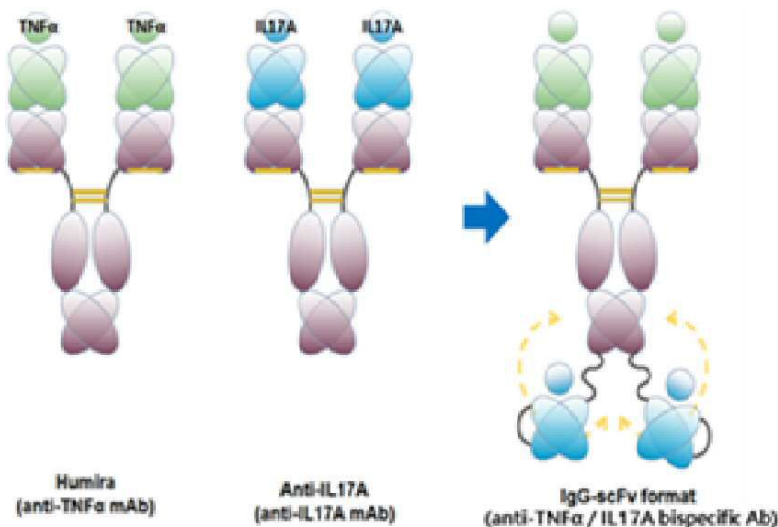
심사관 : 정지혜

(54) 발명의 명칭 IL-17A 및 TNF-α에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체

(57) 요약

본 발명은 IL-17A 및 TNF-α에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 IL-17A 및 TNF-α에 대하여 높은 특이성을 나타내며, 기존의 단일표적 항체에 비해서 뛰어난 중화능을 보일 뿐만 아니라, IL-17와 TNF-α를 동시 억제하여 신속하게 염증 및 면역반응을 억제하므로, 투여 용량은 감소되면서 치료 효과는 증진되는 이점이 있다.

대표도 - 도1



- (52) CPC특허분류
A61P 37/00 (2018.01)
C07K 16/241 (2013.01)
C07K 16/461 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/567 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)

박범찬

대전광역시 유성구 어은로 57, 106동 1305호 (어은동, 한빛아파트)

조영규

대전광역시 유성구 배울2로 114, 1102동 1004호 (용산동, 대덕테크노밸리11단지아파트)

박영우

대전광역시 유성구 학하로 33, 102동 1201호 (계산동, 학하리슈빌학의뜰아파트)

(72) 발명자

이진실

경상남도 창원시 마산회원구 내서읍 광령로 29, 202동 1801호 (삼계리, 삼계대동이미지2차아파트)

백기선

세종특별자치시 남세종로 503, 101동 904호 (보람동, 호려울마을1단지)

유석호

대전광역시 서구 둔산남로 30, 103동 1107호 (둔산동, 녹원아파트)

임정채

대전광역시 유성구 노은서로210번길 32, 405동 190호 (지족동, 열매마을4단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI14C1277
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원 육성 R&D사업
연구과제명	치료 항체 설계 및 개발 기반 기술 확립
기여율	1/2
과제수행기관명	주식회사 와이바이오로직스
연구기간	2014.10.01 ~ 2023.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	9991006103
부처명	한국산업기술평가관리원
과제관리(전문)기관명	(재)범부처신약개발사업단
연구사업명	범부처전주기신약개발
연구과제명	이중표적 자가 면역질환치료제 개발
기여율	1/2
과제수행기관명	주식회사 와이바이오로직스
연구기간	2016.12.09 ~ 2018.03.08

명세서

청구범위

청구항 1

IL-17A (interleukin-17A)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 TNF- α (tumor necrosis factor- α)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체로,

상기 IL-17A에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은

(i) 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 2의 중쇄 CDR2 및 서열번호 3의 중쇄 CDR3;

서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 4의 중쇄 CDR2 및 서열번호 5의 중쇄 CDR3;

서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 4의 중쇄 CDR2 및 서열번호 6의 중쇄 CDR3;

서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 4의 중쇄 CDR2 및 서열번호 7의 중쇄 CDR3;

서열번호 8의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2 및 서열번호 10의 중쇄 CDR3; 및

서열번호 8의 중쇄 CDR1, 서열번호 11의 중쇄 CDR2 및 서열번호 10의 중쇄 CDR3로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나를 포함하는 중쇄 가변영역, 및

(ii) 서열번호 12의 경쇄 CDR1, 서열번호 13의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 14의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 IL-17A에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 15 내지 서열번호 26으로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역 프레임워크 (Framework Region: FR)를 포함하는 것을 특징으로 하는 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 IL-17A에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은

서열번호 15의 FR1, 서열번호 16의 FR2, 서열번호 17의 FR3 및 서열번호 18의 FR4;

서열번호 19의 FR1, 서열번호 16의 FR2, 서열번호 20의 FR3 및 서열번호 21의 FR4;

서열번호 22의 FR1, 서열번호 23의 FR2, 서열번호 24의 FR3 및 서열번호 25의 FR4; 및

서열번호 22의 FR1, 서열번호 26의 FR2, 서열번호 24의 FR3 및 서열번호 25의 FR4로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역 프레임워크를 포함하는 것을 특징으로 하는 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 IL-17A에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 27 내지 서열번호 33으로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변영역 프레임워크 (Framework Region: FR)를 포함하는 것을 특징

으로 하는 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 IL-17A에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 27의 FR1, 서열번호 28의 FR2, 서열번호 29의 FR3 및 서열번호 30의 FR4; 또는 서열번호 31의 FR1, 서열번호 32의 FR2, 서열번호 33의 FR3 및 서열번호 30의 FR4의 경쇄 가변영역 프레임워크를 포함하는 것을 특징으로 하는 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 IL-17A에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 34 내지 서열번호 39로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 40 또는 서열번호 41의 경쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은

- (i) 서열번호 54의 중쇄 CDR1, 서열번호 55의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 56의 중쇄 CDR3; 및 서열번호 57의 경쇄 CDR1, 서열번호 58의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 59의 경쇄 CDR3;
- (ii) 서열번호 60의 중쇄 CDR1, 서열번호 61의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 62의 중쇄 CDR3; 및 서열번호 63의 경쇄 CDR1, 서열번호 64의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 65의 경쇄 CDR3;
- (iii) 서열번호 66의 중쇄 CDR1, 서열번호 67의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 68의 중쇄 CDR3; 및 서열번호 69의 경쇄 CDR1, 서열번호 70의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 71의 경쇄 CDR3; 또는
- (iv) 서열번호 72의 중쇄 CDR1, 서열번호 73의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 74의 중쇄 CDR3; 및 서열번호 75의 경쇄 CDR1, 서열번호 76의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 77의 경쇄 CDR3을 포함하는 것을 특징으로 하는 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은

- (i) 서열번호 78의 중쇄 가변영역 및 서열번호 79의 경쇄 가변영역;
- (ii) 서열번호 80의 중쇄 가변영역 및 서열번호 81의 경쇄 가변영역;
- (iii) 서열번호 82의 중쇄 가변영역 및 서열번호 83의 경쇄 가변영역; 또는
- (iv) 서열번호 84의 중쇄 가변영역 및 서열번호 85의 경쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 아달리무맙 (adalimumab; 제품명 휴미라), 골리무맙 (golimumab; 제품명 심퍼니), 세톨리주맙 (certolizumab; 제품명 심지아) 및 인플릭시맙 (infliximab; 제품명 레미케이드)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 이중표적

항체.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 IL-17A에 특이적으로 결합하는 항체 및 상기 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 항체 각각의 중쇄 불변영역 C-말단이 서로 연결되는 것을 특징으로 하는 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 항체-항체 간의 연결은 링커(linker)에 의해 연결되는 것을 특징으로 하는 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 IL-17A에 특이적으로 결합하는 항체의 항원 결합 단편이 상기 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 불변영역 C-말단에 연결되는 것을 특징으로 하는 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 IL-17A에 특이적으로 결합하는 항체의 항원 결합 단편은 단일 사슬 가변 분절(Single-chain variable fragment, scFv)인 것을 특징으로 하는 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 항체-단편 간의 연결은 링커(linker)에 의해 연결되는 것을 특징으로 하는 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체.

청구항 16

제1항, 제3항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 17

제16항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 18

제17항의 벡터로 형질전환된 세포.

청구항 19

다음 단계를 포함하는 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제

조방법:

(a) 제18항의 세포를 배양하는 단계; 및

(b) 상기 배양된 세포에서 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 회수하는 단계.

청구항 20

제1항, 제3항 내지 제15항 중 어느 한 항의 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 자가면역질환은 류마티스 관절염, 건선, 건성성 관절염, 강직성 척추염, 다발성 경화증, 간질성 섬유증, 루프스, 사구체 신염, 크론병, 염증성 장질환, 자가면역성 안질환, 아동 관절염, 베켓병, IL-1 수용체 길항제의 결핍 (DIRA), TNF 수용체 관련 주기성 증후군 (TRAPS), 신생아기 다발성 염증성 질환 (NOMID), 가족성지중해열(FMF), 및 크리오피린 관련 주기적 증후군(CAPS)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 22

제1항, 제3항 내지 제15항 중 어느 한 항의 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 이에 결합된 약물을 포함하는 항체-약물 접합체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] TNF- α 는 활성화된 대식세포와 CD4⁺T세포, NK세포 등의 면역세포에서 생산되는 염증성 사이토카인으로 면역세포의 조절을 통해 염증반응을 조절하는 역할을 한다. TNF- α 는 일부 중앙세포에 대하여 출혈성 괴사와 세포자연사를 유도하며, T-세포의 증식을 촉진하고, B-세포의 분화와 증식을 촉진하여 면역반응을 활성화한다 (Biotherapy. 3(2):103-11, 1991). TNF- α 는 정상적인 면역반응을 위해 중요한 사이토카인이거나, 체내 TNF- α 의 과발현 등의 불균형이 발생할 경우 다양한 자가면역반응으로 이어진다. 또한, 전-염증 사이토카인으로서 자가면역반응이 발생하는 부위에 다른 사이토카인을 증가시킴으로서 그 증상을 가속시킨다 (Annu Rev Immunol. 14:397-440, 1996; Inflamm Bowel Dis. 5(2):119-33, 1999).

[0004] 이러한 자가면역 질환에 대한 치료 및 완화를 위하여 다양한 TNF- α 억제제가 개발되었고, 대표적으로 인플릭시맙 (Infliximab; 상품명: 레미케이드 (Remicade)), 아달리무맙 (Adalimumab; 상품명: 휴미라 (Humira)), 에타너셉트 (Etanercept; 상품명 엔브렐 (Enbrel)) 등이 있다. 그러나 자가면역 질환 환자의 10-30%는 TNF- α 억제제 치료에 효과가 없으며, TNF- α 억제제 치료에 효과가 있었던 환자의 60% 정도는 효과의 감소가 발생하여 용량의 증가 또는 대체 요법으로의 전환이 필요하다 (Rheumatology (Oxford). 46(7):1153-6, 2007; Ann Rheum Dis. 65(6):746-52, 2006).

[0005] IL-17은 대표적인 염증성 사이토카인으로 T helper17세포로 알려진 Th세포 그룹에 의해 생산된다 (J Exp Med. 1;183(6):2593-603, 1996). IL-17은 1993년 (Rouvier et al., J Immunol. 15;150(12):5445-56, 1993)에 처음 분리 및 기술되었다. IL-17은 IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F 총 6개 family로 이루어져 있고, 특히 IL-17F가 IL-17A와 가장 높은 상동성을 보인다. IL-17A와 IL-17F는 각각 동형 이량체를 이루거나, 서

로 결합한 이형 이량체를 형성한다. 이량체를 형성한 IL-17은 수용체인 IL-17R과 결합하는데, IL-17R은 IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD, IL-17RE 5가지 subtype이 있다. IL-17이 수용체인 IL-17R과 결합하면, 케모카인을 유도하는 신호전달 시스템을 활성화하고, 케모카인은 단핵구, 호중구 등의 면역 세포를 염증 부위로 유도한다. IL-17은 TNF- α 와 IL-1등과 함께 작용하며, 이들의 신호전달 시스템이 다양한 자가면역질환 발병기전에서 확인된다 (*J Invest Dermatol.* 131(3):677-87, 2011; *N Engl J Med.* 27:361(9):888-98, 2009; *J Invest Dermatol.* 133(1):17-26, 2013).

[0006] IL-17 매개 자가면역질환의 치료 및 완화를 위한 IL-17 억제제가 개발되었으며 의약품으로서 허가되었다. 2015년 1월 FDA에서 중증 플라크 건선 치료제로 IL-17 억제 단일클론 항체인 세쿠키누맙 (secukinumab; 상품명: 콘센틱스 (Cosentyx))을 허가하였다. 직접적인 IL-17 항체가 아니더라도, IL-17의 수준을 감소시키는 항 IL-23 항체 우스테키누맙 (ustekinumab) 역시 건선 등의 치료에 사용될 수 있다 (*Lancet.* 17:371(9625):1665-74, 2008).

[0007] 세쿠키누맙 (secukinumab)은 흥미롭게도 임상 3상 시험 중 TNF 억제제에 불응하는 강직성 척추염 환자를 대상으로 시험하였는데, ASAS20 반응율은 투여 방식에 따라 58.8% 내지 45.5%였다. 이전에 TNF- α 억제제를 투여받지 않았던 환자의 ASAS20 반응율이 투여 방식에 따라 60%, 66.3%인 것과 비교하면, 이전의 TNF- α 억제제의 노출과 상관없이 활성 강직성 척추염 환자에게 세쿠키누맙이 효과를 보였다 (2014 ACR/ARHP annual meeting, ABSTRACT NUMBER: 819). 이것은 전통적인 생물학적 제제였던 TNF- α 저해제 다음으로, 환자에게는 치료의 또 다른 기회가 제공된 것이며, 치료 방법이 세분화되어 가고 있음을 나타낸다. 하지만 여전히 ASAS20 미반응율이 40%이고, ASAS40 미반응율이 60%인 것은 해당 질환에 대한 개선된 치료제의 필요성을 나타낸다.

[0008] 이러한 이유로 강직성 척추염 및 축성 척추 관절염 등에 대하여 TNF- α 억제제 및 IL-17 억제제의 우수한 효능을 고려하여, 가까운 장래에 효능을 강화하고, 부작용의 문제를 다루는 콤비네이션 (combination) 치료를 기대하고 있음이 보고되고 있다 (*Rheumatology (Oxford).* 55(suppl 2):ii38-ii42, 2016). 또한, 이전의 항 TNF- α 치료법 또는 항 IL-17 치료법에 대한 단일 표적 항체에 부적절한 반응을 가진 환자에 대하여, 이중 특이적 약물로 전환할 필요성이 있음을 보고되고 있다 (*Rheumatology (Oxford).* 2017 Oct 12).

[0009] 이러한 결과에 근거하여 단일 사이토카인에 대한 억제보다는 정상 면역계를 크게 해치지 않는 수준에서 TNF- α 와 IL-17를 동시에 억제하여 신속하게 염증 및 면역반응을 억제하는 것이 효과적이고 지속적인 치료방법으로 기대된다. 또한, TNF- α 억제제에 반응성이 없는 환자와 내성이 생긴 환자에서도 적용하여 효과를 기대할 수 있을 것이다. 그러므로, TNF- α 와 IL-17에 대한 면역억제제를 각각 투여하는 병용요법이 있었으나, 투여 횟수와 용량의 증가에 따른 불편함과 각각의 약제를 생산함으로써 증가하는 생산비용을 생각할 때, 최소한의 투여와 비용의 감소가 기대되는 이중항체의 접근이 효율적이다.

[0010] 이에, 본 발명자들은 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체를 개발하고자 예의 노력한 결과, IL-17A 또는 TNF- α 단일표적 항체 및 기존의 TNF- α 와 IL-17A 이중항체에 비해 IL-17A 및 TNF- α 를 동시에 특이적으로 억제하는 효능이 우수한 이중표적 항체를 제조하여, 이러한 항체가 목적하는 치료 효과를 나타내면서도 부작용 발생을 낮출 수 있을 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0012] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 IL-17A (interleukin-17A)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 TNF- α (tumor necrosis factor- α)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체를 제공하는데 있다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 상기 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는데 있다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 세포 및 이의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0017] 본 발명의 다른 목적은 상기 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 항체-약물 접합체를 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0020] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 IL-17A (interleukin-17A)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 TNF- α (tumor necrosis factor- α)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체로, 상기 IL-17A (interleukin-17A)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 (i) 서열번호 1 또는 서열번호 8의 중쇄 CDR1; 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 9 및 서열번호 11로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR2; 및 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 10으로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR3, 및 (ii) 서열번호 12의 경쇄 CDR1; 서열번호 13의 경쇄 CDR2; 및 서열번호 14의 경쇄 CDR3;를 포함하는 것을 특징으로 하는 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체를 제공한다.

[0021] 본 발명은 또한, 상기 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0022] 본 발명은 또한, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0023] 본 발명은 또한, 상기 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

[0024] 본 발명은 또한, (a) 상기 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양된 세포에서 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 회수하는 단계를 포함하는 상기 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조방법을 제공한다.

[0025] 본 발명은 또한, 상기 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 또는 상기 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0026] 본 발명은 또한, 상기 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 항체-약물 접합체를 제공한다.

발명의 효과

[0028] 본 발명에 따른 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 IL-17A 및 TNF- α 에 대하여 높은 특이성을 나타내며, 기존의 단일표적 항체에 비해서 뛰어난 중화능을 보일 뿐만 아니라, IL-17와 TNF- α 를 동시 억제하여 신속하게 염증 및 면역반응을 억제하므로, 투여 용량은 감소되면서 치료 효과는 증진되는 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 IL-17A 및 TNF- α 을 표적으로 하는 이중항체의 모식도이다.

도 2는 이중항체 후보 SDA-0070의 GFC (겔 여과 크로마토그래피) FPLC (Fast protein liquid chromatography) 정제 후 SDS-PAGE로 분석한 것이다.

도 3은 이중항체 후보 SDA-0070의 GFC 정제 후의 SE-HPLC로 분석한 것이다.

도 4의 (a) 내지 (c)는 IL-17A와 TNF- α 에만 특이적 결합성을 보이며, 비특이적 결합성이 없는 이중항체임을 ELISA로 분석한 것이다.

도 5는 IL-17A와 TNF- α 이중 결합 ELISA의 원리에 대한 모식도이다.

도 6은 이중항체 후보에 대해 IL-17A와 TNF- α 이중 결합 ELISA 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 7은 인간 HT-29 세포에서 이중항체 후보의 중화능을 평가한 것이다.

도 8은 HEK 블루 유래 세포에서 이중항체 후보의 중화능을 평가한 것이다.

도 9는 인간 HT-29 세포에서 정제법에 따른 중화능을 평가하여 동등성을 평가한 것이다.

도 10은 인간 HT-29 세포에서 이중항체 후보의 임시발현 생산물과 안정화 세포를 통한 대량 생산물의 효능 동등

성을 평가한 것이다.

도 11은 HEK 블루 유래 세포에서 이중항체 후보의 임시발현 생산물과 안정화 세포를 통한 대량 생산물의 효능 동등성을 평가한 것이다.

도 12는 pH 조건에 따른 휴미라 (Humira)의 인간 FcRn과 사이노몰구스 원숭이 FcRn에 대한 센서그램을 나타낸 것이다.

도 13은 pH 조건에 따른 SDA-0070의 인간 FcRn과 사이노몰구스 원숭이 FcRn에 대한 센서그램을 나타낸 것이다.

도 14는 이중항체 후보의 ADCC 분석을 위해 CD64 결합력 조사결과를 나타낸 것이다.

도 15는 이중항체 후보의 ADCC 분석을 위해 CD16a 결합력 조사결과를 나타낸 것이다.

도 16은 이중항체 후보의 ADCC 분석을 위해 BSA 결합력 조사결과를 나타낸 것이다.

도 17은 SDA-0070의 IL-17A와 TNF- α 의 동시 결합능을 조사한 결과이다.

도 18은 상용 RA-FLS 세포에서 SDA-0070의 IL-17A, TNF- α 에 대한 동시 중화능 평가를 나타낸 것이다.

도 19는 상용 RA-FLS 세포에서 SDA-0070의 IL-17A에 대한 중화능 평가를 나타낸 것이다.

도 20은 상용 RA-FLS 세포에서 SDA-0070의 TNF- α 에 대한 중화능 평가를 나타낸 것이다.

도 21은 환자 유래 RA-FLS 세포에서 SDA-0070의 TNF- α , IL-17A에 대한 중화능 평가를 나타낸 것이다.

도 22는 C57BL/6 마우스에서의 SDA-0070의 중화능을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0033] 본 발명에 따른 이중표적 항체는 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-17A를 보다 효율적으로 억제함으로써 자가면역질환을 억제하는 효능을 가지고, 본 발명에 따른 이중표적 항체는 TNF- α 와 IL-17A 각각의 표적에 대한 결합능이 있음이 확인되었다. 특히, 비표적 항원 단백질에는 전혀 결합하지 않고, 오직 인간 TNF- α 와 인간 IL-17A 또는 IL-17A/F에만 특이적으로 결합하는 월등한 특이성을 나타내었으며, TNF- α 만을 단독 표적 하는 항체 (휴미라; Humira), IL-17A만을 단독 표적 하는 항체 (세쿠키누맙; secukinumab) 및 기존의 TNF- α 와 IL-17A 이중항체 (LY3114062)에 비해 우수한 효능을 나타냄이 확인되었다.

[0034] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, IL-17A (interleukin-17A)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 TNF- α (tumor necrosis factor- α)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체에 관한 것으로,

[0035] 상기 IL-17A (interleukin-17A)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 (i) 서열번호 1 또는 서열번호 8의 중쇄 CDR1; 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 9 및 서열번호 11로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR2; 및 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 10으로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR3, 및 (ii) 서열번호 12의 경쇄 CDR1; 서열번호 13의 경쇄 CDR2; 및 서열번호 14의 경쇄 CDR3;를 포함하는 것을 특징으로 하는 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체에 관한 것이다.

[0036] 본 발명에서의 용어, "이중표적 항체"는 하나 이상의 표적에 결합능 또는 길항능을 가지는 항체를 의미하며, 2개의 서로 다른 표적에 대한 결합능 또는 길항능을 가지는 항체가 결합된 형태 또는 한 표적에 대한 결합능을 가지는 항체와 다른 표적에 대한 길항능을 가지는 물질이 결합되어 있는 항체를 의미한다.

[0037] 본 발명의 이중표적 항체의 하나의 표적인 "IL-17A"는 IL-17의 6개 패밀리 (IL-17은 IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F) 중 하나로 대표적인 염증성 사이토카인이며, T helper 17세포로 알려진 Th세포 그룹에 의해 생산된다. 상기 IL-17A 단백질은 모든 종에서 유래하는 것일 수 있으며, 예컨대, 인간, 원숭이 등과 같은 영장류 유래의 것, 또는 마우스, 래트 등과 같은 설치류 유래의 것 등일 수 있다. IL-17은 류마티스 관절염 (Rheumatoid arthritis; RA), 건선 (Psoriasis; PsA), 홍반 루푸스, 크론병, 다발성 경화증, 전신성 경화증, 베체트씨 병 등의 자가면역질환과 관련된 면역시스템의 비정상적 발현과 연관되어 있다.

- [0038] 본 발명에서 용어, "항체"는 다클론 항체 및 단클론 항체를 모두 포함하며, 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 단편도 사용될 수 있다.
- [0039] 완전한 형태의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고 서브클래스로 감마1(γ 1), 감마2(γ 2), 감마3(γ 3), 감마4(γ 4), 알파1(α 1) 및 알파2(α 2)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다. 기본 4쇄 항체 단위는 2개의 동일한 경쇄(L) 및 2개의 동일한 중쇄(H)로 이루어진 이중 4량체 당단백질이다. 경쇄는 N-말단에서 가변 영역(VL)을 가지고, 이어서 그의 다른 단부에서 불변영역을 가진다. 중쇄는 N-말단에서 가변 영역(VH)을 갖고, 이어서 각각 α 및 γ 사슬에 대해 3개의 불변 영역(CH) 및 μ 및 ϵ 이소형에 대해 4개의 CH 영역을 가진다. 가변은 가변 영역의 특정 부분이 항체들 사이에서 서열이 크게 상이함을 나타낸다. V 영역은 항원 결합을 매개하고, 그의 특정 항원에 대한 특정 항체의 특이성을 규정한다. 가변성은 경쇄 및 중쇄 가변 영역 모두에서 초가변 영역(HVR) 즉, CDR로 불리는 3개의 세그먼트에 집중된다. 가변 영역의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임워크 구역(FR)으로 불린다. 중쇄 및 경쇄 가변영역은 N-말단에서 C-말단으로 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4 구조를 가진다.
- [0040] 본 명세서에서 사용되는 용어, "중쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VH 및 3 개의 불변영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 전체길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.
- [0041] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어, "경쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VL 및 불변영역 도메인 CL을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.
- [0042] 항체의 항원 결합 단편 또는 항체 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다.
- [0043] "Fv" 단편은 완전한 항체 인식 및 결합 부위를 함유하는 항체 단편이다. 이러한 영역은 1개의 중쇄 가변 도메인과 1개의 경쇄 가변 도메인이, 예를 들어 scFv로 간단하게 사실상 공유적으로 연합된 이량체로 이루어진다.
- [0044] "Fab" 단편은 경쇄의 가변 및 불변 도메인과, 중쇄의 가변 및 제1 불변 도메인(CH1)을 함유한다. F(ab')₂ 항체 단편은 일반적으로 그들 사이에 힌지 시스테인에 의해 그들의 카복시 말단 근처에 공유적으로 연결되는 한 쌍의 Fab 단편을 포함한다.
- [0045] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는데, 이들 도메인은 단일 폴리펩티드쇄 내에 존재한다. Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위해 목적하는 구조를 형성할 수 있도록 하는 VH 도메인과 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함할 수 있다.
- [0046] 하나의 실시예에서, 본 발명에 따른 항체는 Fv 형태(예컨대, scFv)이거나, 완전한 항체 형태이다. 또한, 중쇄 불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 또는 엡실론(ϵ) 중의 어느 한 이소타입으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 불변영역은 감마 1(IgG1), 감마 3(IgG3) 또는 감마 4(IgG4)이다. 경쇄 불변영역은 카파 또는 람다 형일 수 있다.
- [0047] 본 발명의 항체는 단일클론 항체, 다특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단쇄 Fvs(scFV), 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 다이설파이드-결합 Fvs(sdFV) 및 항-이디오타입(항-Id) 항체, 또는 상기 항체들의 에피토프-결합 단편 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0048] 상기 단일클론 항체는 실질적으로 동질적 항체 집단으로부터 수득한 항체, 즉 집단을 차지하고 있는 개개의 항체가 미량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 발생적 돌연변이를 제외하고는 동일한 것을 지칭한다. 단일클론 항체는 고도로 특이적이어서, 단일 항원 부위에 대항하여 유도된다.
- [0049] 상기 "인간화" 형태의 비-인간(예: 뮤린) 항체는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는, 수용자의 초가변 영역으로부터의 잔기를 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 보유하고 있는 비-인간 중(공여자 항체), 예를 들어 마우스, 랫트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 초가변 영역으로부터의 잔기로 대체시킨 인간 면역글로불린(수용자 항체)이다.
- [0050] 상기 "인간 항체"는 인간 면역글로불린으로부터 유래하는 분자로서 상보성 결정영역, 구조 영역을 포함한 항체

를 구성하는 모든 아미노산 서열 전체가 인간의 면역글로불린으로 구성되어 있는 것을 의미한다. 인간 항체는 과거 디스플레이 라이브러리를 포함하여 당업계에서 공지된 다양한 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 인간 항체는 항원 시험 접종에 반응하여 항체를 생산하도록 변형되었지만, 그의 내인성 로커스가 기능하지 않는 트랜스제닉 동물, 예를 들어 면역처리된 제노마우스 (xenomouse)에 항원을 투여하여 만들어질 수 있다. 종래 익세키주맵 (ixekizumab)은 인간화 항체임에 비해, 본 발명에 따른 항체는 인간 항체이다.

- [0051] 중쇄 및/또는 경쇄 일부가 특별한 종으로부터 유래되거나 특별한 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 반면, 나머지 쇠(들)는 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 "키메라" 항체 (면역글로불린) 뿐 아니라 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 상기 항체의 단편이 포함된다.
- [0052] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "항체 가변 도메인"은 상보성 결정 영역 (CDR; 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3), 및 골격 영역 (FR)의 아미노산 서열을 포함하는 항체 분자의 경쇄 및 중쇄 부분을 지칭한다. VH는 중쇄의 가변 도메인을 지칭한다. VL은 경쇄의 가변 도메인을 지칭한다.
- [0053] "상보성 결정 영역" (CDR; 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3)은 항원 결합을 위해 필요한 존재인, 항체 가변 도메인의 아미노산 잔기를 지칭한다. 각 가변 도메인은 전형적으로, CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 확인된 3개의 CDR 영역을 갖는다.
- [0054] 하나의 실시예에서, 본 발명에 따른 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 있어서, 상기 IL-17A (interleukin-17A)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 2의 중쇄 CDR2, 서열번호 3의 중쇄 CDR3; 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 4의 중쇄 CDR2, 서열번호 5의 중쇄 CDR3; 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 4의 중쇄 CDR2, 서열번호 6의 중쇄 CDR3; 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 4의 중쇄 CDR2, 서열번호 7의 중쇄 CDR3; 서열번호 8의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 서열번호 10의 중쇄 CDR3; 또는 서열번호 8의 중쇄 CDR1, 서열번호 11의 중쇄 CDR2, 서열번호 10의 중쇄 CDR3를 포함할 수 있다.
- [0055] "골격 영역" (FR)은 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다. 각 가변 도메인은 전형적으로, FR1, FR2, FR3 및 FR4로서 확인된 4개의 FR을 가진다.
- [0056] 하나의 실시예에서, 본 발명에 따른 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 있어서, 상기 IL-17A (interleukin-17A)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 15 내지 서열번호 26으로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역 프레임워크 (Framework Region: FR)를 포함할 수 있다. 구체적으로, 서열번호 15의 FR1, 서열번호 16의 FR2, 서열번호 17의 FR3 및 서열번호 18의 FR4; 서열번호 19의 FR1, 서열번호 16의 FR2, 서열번호 20의 FR3 및 서열번호 21의 FR4; 서열번호 22의 FR1, 서열번호 23의 FR2, 서열번호 24의 FR3 및 서열번호 25의 FR4; 및 서열번호 22의 FR1, 서열번호 26의 FR2, 서열번호 24의 FR3 및 서열번호 25의 FR4로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역 프레임워크를 포함할 수 있다.
- [0057] 또 하나의 실시예에서, 본 발명에 따른 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 있어서, 상기 IL-17A (interleukin-17A)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 27 내지 서열번호 33으로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변영역 프레임워크 (Framework Region: FR)를 포함할 수 있다. 구체적으로, 서열번호 27의 FR1, 서열번호 28의 FR2, 서열번호 29의 FR3 및 서열번호 30의 FR4; 또는 서열번호 31의 FR1, 서열번호 32의 FR2, 서열번호 33의 FR3 및 서열번호 30의 FR4의 경쇄 가변영역 프레임워크를 포함할 수 있다.
- [0058] 상기 CDR1 내지 CDR3 및 프레임워크를 포함하여, 본 발명에 따른 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 있어서, 상기 IL-17A (interleukin-17A)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 예를 들어, 서열번호 34 내지 서열번호 39로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 예를 들어, 서열번호 40 또는 서열번호 41의 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [0059] 하나의 실시예에서, 본 발명에 따른 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 있어서, 상기 IL-17A (interleukin-17A)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음의 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다:
- [0060] (i) 서열번호 34의 중쇄 가변영역 및 서열번호 40의 경쇄 가변영역;
- [0061] (ii) 서열번호 35의 중쇄 가변영역 및 서열번호 41의 경쇄 가변영역;

- [0062] (iii) 서열번호 36의 중쇄 가변영역 및 서열번호 41의 경쇄 가변영역;
- [0063] (iv) 서열번호 37의 중쇄 가변영역 및 서열번호 41의 경쇄 가변영역;
- [0064] (v) 서열번호 38의 중쇄 가변영역 및 서열번호 40의 경쇄 가변영역; 또는
- [0065] (vi) 서열번호 39의 중쇄 가변영역 및 서열번호 41의 경쇄 가변영역.
- [0066] 본 발명의 이중표적 항체의 하나의 표적인 "TNF- α "는 활성화된 대식 세포와 CD4+T세포, NK세포 등의 면역 세포에서 생산되는 염증성 사이토카인으로 면역세포의 조절을 통해 염증반응을 조절하는 역할을 한다. 상기 TNF- α 단백질은 모든 종에서 유래하는 것일 수 있으며, 예컨대, 인간, 원숭이 등과 같은 영장류 유래의 것, 또는 마우스, 래트 등과 같은 설치류 유래의 것 등일 수 있다. TNF- α 에 의한 면역활성화는 류마티스 관절염 (Rheumatoid arthritis; RA), 강직성 척추염 (ankylosing spondylitis), 염증성 장 질환 (inflammatory bowel disease, psoriasis) 등의 자가면역 질환을 매개한다.
- [0067] 본 발명에 따른 이중표적 항체에서, TNF- α (tumor necrosis factor- α)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 TNF- α 에 결합하여 TNF- α 활성을 저해하는 특성을 지니는 항체라면 제한없이 사용 가능하며, 아달리무맙 (adalimumab; 제품명 휴미라), 골리무맙 (golimumab; 제품명 심퍼니), 세톨리주맙 (certolizumab; 제품명 심지아) 및 인플릭시맙 (infliximab; 제품명 레미케이드)로 구성된 군에서 선택되는 것 또는 이들의 변이체가 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0068] 본 발명에 따른 이중표적 항체에서, TNF- α (tumor necrosis factor- α)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 (i) 서열번호 54의 중쇄 CDR1, 서열번호 55의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 56의 중쇄 CDR3; 및 서열번호 57의 경쇄 CDR1, 서열번호 58의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 59의 경쇄 CDR3; (ii) 서열번호 60의 중쇄 CDR1, 서열번호 61의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 62의 중쇄 CDR3; 및 서열번호 63의 경쇄 CDR1, 서열번호 64의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 65의 경쇄 CDR3; (iii) 서열번호 66의 중쇄 CDR1, 서열번호 67의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 68의 중쇄 CDR3; 및 서열번호 69의 경쇄 CDR1, 서열번호 70의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 71의 경쇄 CDR3; 또는 (iv) 서열번호 72의 중쇄 CDR1, 서열번호 73의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 74의 중쇄 CDR3; 및 서열번호 75의 경쇄 CDR1, 서열번호 76의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 77의 경쇄 CDR3;을 포함하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 (i) 서열번호 78의 중쇄 가변영역 및 서열번호 79의 경쇄 가변영역; (ii) 서열번호 80의 중쇄 가변영역 및 서열번호 81의 경쇄 가변영역; (iii) 서열번호 82의 중쇄 가변영역 및 서열번호 83의 경쇄 가변영역; 또는 (iv) 서열번호 84의 중쇄 가변영역 및 서열번호 85의 경쇄 가변영역;을 포함하는 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0069] TNF- α 에 특이적인 항체의 서열은 하기 표 1 (중쇄 CDR 및 중쇄 가변영역) 및 표 2 (경쇄 CDR 및 경쇄 가변영역)에 기재된 바와 같다.

[0070] [표 1]

TNF- α 항체	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3
adalimumab	DYAMH (서열번호 54)	AITWNSGHIDYADSVEG (서열번호 55)	AKVSYLSTASSLDY (서열번호 56)
	VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQ APGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGRFTISRDNAKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLVT VSS (서열번호 78)	
golimumab	GFIFSSYA (서열번호 60)	MSYDGSNK (서열번호 61)	ARDRGIAAGGNYYYY YGMDV (서열번호 62)
	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQA PGNGLEWVAFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGIAAGGNYYYYGMDVWGQ GTTVTVSS (서열번호 80)	
certolizumab pegol	GYVFTDYG (서열번호 66)	INTYIGEPI (서열번호 67)	ARGYRSYAMDY (서열번호 68)
	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYVFTDYGMINWVRQ APGKGLEWMGWINTYIGEPIYADSVKGRFTFSLDTSKSTA YLQMNSLRAEDTAVYYCARGYRSYAMDYWGQGLTVTS (서열번호 82)	
infliximab	GFIPSNHW (서열번호 72)	IRSKSINSAT (서열번호 73)	SRNYYGSTYDY (서열번호 74)
	VH	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFIPSNHWMNWRQ SPEKGLEWVAEIRSKSINSATHYAESVKGRFTISRDDSKSA VYLQMTDLRTEDTGYYCSRNYYGSTYDYWGQGTTLTVS (서열번호 84)	

[0071]

[0073] [표 2]

TNF- α	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
adalimumab	RASQGIRNYLA (서열번호 57)	AASTLQS (서열번호 58)	QRYNRAPYT (서열번호 59)
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIRNYLAWYQQK PGKAPKLLIYAAS TLQSG VPFRFSGSGSGTDFLTIS SLQ PEDVATYYC QRYNRAPYTF GGQGTKVEIK (서열번호 79)	
golimumab	SQSVYSY (서열번호 63)	DAS (서열번호 64)	QQRSNWPPFT (서열번호 65)
	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS SQSVYSY LAWYQQK PGQAPRLLIY DAS NRATGIPARFSGSGSGTDFLTIS SLE PEDFAVYYC QQRSNWPPFT FGPGTKVDIK (서열번호 81)	
certolizumab pegol	QNVGTN (서열번호 69)	SAS (서열번호 70)	QQYNIYPLT (서열번호 71)
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKAS QNVGTN VAWYQQ KPGKAPKALIIY SAS FLYSGVTPYRFSGSGSGTDFLTIS SL QPEDFATYYC QQYNIYPLT FGQGTKVEIK (서열번호 83)	
infiximab	QFVGSS (서열번호 76)	YAS (서열번호 76)	QQSHSWPFT (서열번호 77)
	VL	DILLTQSPAILSVPGERVFSFCRAS QFVGSS SIHWYQQRT NGSPRLLIKY ASE MSGIPSRFSGSGSGTDFLTIS NTVES EDIADYYC QQSHSWPFT FGSGTNLEVK (서열번호 85)	

[0074]

[0075]

본 발명의 일 실시예에서는 항 TNF- α 항체 중쇄사슬의 핵산서열 (서열번호86) 3' 말단에 링커를 도입하고 그 뒤에 최적화를 통해 획득된 항 IL-17A VH VL을 이용한 scFv 핵산서열 (서열번호 87)을 연결하고, HEK293F에 형질전환시켜 TNF- α 및 IL-17A의 활성을 동시에 억제하는 이중표적 항체를 발현시켰다.

[0076]

상기 이중항체는 서로 다른 두 종류의 항원 (표적 단백질)에 결합할 수 있는 항체로, 유전공학 또는 임의의 방법에 의해 제조된 형태일 수 있다. 본 발명에 따른 이중항체는 복수의 항체가 링커로 연결된 형태일 수 있다.

[0077]

상기 링커는 두 개의 서로 다른 융합 파트너(예를 들어, 생물학적 고분자 등)를 수소 결합, 정전기적 상호작용, 반데르 바알스력, 이황화 결합, 염 브릿지, 소수성 상호작용, 공유결합 등을 이용하여 연결할 수 있는 연결체를 의미하는데, 구체적으로는 생리학적 조건 또는 다른 표준 펩타이드 조건(예를 들면, 펩타이드 정제 조건, 펩타이드 저장 조건)하에서 적어도 하나의 이황화 결합에 참여할 수 있는 적어도 하나의 시스테인을 가질 수 있으며, 단순히 각각의 융합 파트너를 연결하는 역할 이외에도, 융합파트너 사이에 일정한 크기의 간격을 부여하는 역할을 수행하거나 또는 융합체에 유연성 또는 강직성을 제공하는 힌지(hinge)의 역할을 수행할 수 있다. 상기 링커는 비펩타이드 링커 또는 펩타이드 링커일 수 있으며, 펩티드 결합, 이황화 결합 등에 의해서 직접 연결되는 것도 모두 포함될 수 있다.

[0078]

상기 펩타이드 링커는 복수의 아미노산 서열 또는 모티프가 반복된 형태의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0079]

상기 비펩타이드 링커는 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol; PEG) 단독 중합체, 폴리프로필렌 글리콜 단독 중합체, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐 에틸 에테르과 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 또는 이들의 조합일 수 있다. 구체적으로는 폴리에틸렌 글리콜 단독 중합체일 수 있으며, 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함될 수 있다.

[0080]

상기 링커를 통하여 직접 또는 간접적으로 연결되는 부위는 특별히 제한되지 않으나, Fc 부분, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv 등이 될 수 있다.

- [0081] 본 발명에 있어서, 상기 이중표적 항체는 IL-17A에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 및 경쇄; 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 IL-17A에 특이적으로 결합하는 항체 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 불변영역 C-말단이 서로 연결되어 있는 것이 바람직하며, 상기 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 불변영역 C-말단에 IL-17A에 특이적으로 결합하는 항체의 단편이 연결되어 있는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0082] 본 발명에 따른 이중표적 항체에서, 상기 항체-항체 간의 연결 또는 상기 항체-단편 간의 연결은 링커에 의한 결합, 화학적 직접 결합 또는 유전공학 융합(genetic fusion) 등의 다양한 방법에 의해 연결될 수 있으며, 바람직하게는 링커(linker)(서열번호 88)에 의한 결합인 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0083] 아울러, 상기 항체의 단편은 단일 사슬 가변 분절(Single-chain variable fragment, scFv)인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0084] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 IL-17A 유전자를 클로닝하여 IL-17A 항원 단백질을 제조하였으며, 이를 라이브러리 파지에 반응시켜 IL-17A에 특이적으로 결합하는 scFv-파지를 획득하였고, 이를 대장균에 감염시켜 증폭시키는 패닝 과정을 3회 수행하였다.
- [0085] 또한, 본 발명자들은 상기 결합능이 큰 3차 패닝한 다클론 파아지 항체군에서 단일 클론 항체를 선별하였으며, 이의 ELISA 분석을 수행하여 단일 클론 항체를 한번 더 선별하였다. 이와 같이 선별한 단일클론 파아지의 서열 분석을 통해 6 종류의 단일 클론 항체의 VH 및 VL의 CDR 영역의 패턴 및 폴리펩티드 서열을 확인하였다 (표 4 및 표 5).
- [0086] 상기 선별한 6 종류의 단일클론 파지 중 7H3C11FW의 scFv를 항-TNF- α 단일항체인 휴미라 말단 3'에 클로닝하여 IL-17A 및 TNF- α 에 이중 특이적인 항체인 SDA-0070를 제조하였다 (도 1). 이와 같이 제작된 이중표적 항체는 ELISA 분석을 통해, TNF- α 와 인간 IL-17A 또는 IL-17A/F에만 결합하는 결합 특이성을 확인하고, IL-17A 또는 TNF- α 단일표적 항체 및 기존의 TNF- α 와 IL-17A 이중항체 (LY3114062)에 비해 특이적 결합능 및 중화능이 현저히 우수한 것을 확인하였다.
- [0087] 따라서, 본 발명의 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체는 IL-17A 및 TNF- α 에 동시에 강한 항원 결합능을 가짐을 확인하였다.
- [0088] 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 특성이 유지되는 한, 가변영역 내에서의 변이가 일어난 항체 또는 항체 단편도 본 발명의 권리범위에 포함된다. 그러한 예로서 가변영역에서의 아미노산의 보존적 치환(conservative substitution)이 일어난 항체를 들 수 있다. 보존적 치환은 원래의 아미노산 서열과 유사한 특성을 가지는 다른 아미노산 잔기로의 치환을 의미하는데, 예를 들어 라이신, 아르기닌, 히스티딘은 염기 결사슬을 가지고 있어 유사한 특성을 가지고, 아스파라틱산과 글루탐산은 산 결사슬을 가진다는 점에서 유사한 특성을 가진다. 또한, 글라이신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판은 비전하 극성 결사슬을 가진다는 점에서 특성이 유사하며, 알라닌, 발린, 루신, 트레오닌, 아이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌은 비극성 결사슬을 가지고 있다는 점에서, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘은 방향족 결사슬을 가지고 있다는 점에서 유사한 특성을 가진다. 따라서, 상기와 같이 유사한 특성을 가지는 그룹 내에서의 아미노산 치환이 일어나더라도 별다른 특성 변화를 보이지 않을 것이라는 점은 통상의 기술자에게는 자명한 것이므로, 본 발명에 따른 항체의 특성이 유지되는 한, 가변영역 내에서의 보존적 치환에 의한 변이가 일어난 항체도 본 발명의 권리범위에 포함된다.
- [0090] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 항체 또는 항체 단편, 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 61%의 상동성, 보다 바람직하게는 70%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 90%의 상동성, 바람직하게 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상 동일한 서열을 의미한다. 서열 비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)은 NCBI 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn 및 tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.
- [0091] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한

것이다.

- [0092] 본 발명의 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 분리하여 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 재조합적으로 생산할 수 있다. 폴리뉴클레오티드 핵산을 분리하고, 이를 복제 가능한 벡터 내로 삽입하여 추가로 클로닝하거나 (DNA의 증폭) 또는 추가로 발현시킨다. 이를 바탕으로, 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터에 관한 것이다.
- [0093] "폴리뉴클레오티드"는 복수의 핵산 예를 들어, DNA(gDNA 및 cDNA) 및 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산에서 기본 구성단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다. 본 발명의 중쇄 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 서열은 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오타이드의 추가, 결실, 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.
- [0094] 하나의 실시예에서, 본 발명에 따른 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 구체적으로 IL-17A (interleukin-17A)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 42 내지 서열번호 47로 구성된 군에서 선택될 수 있으며, 경쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 48 또는 서열번호 49일 수 있고, TNF- α (tumor necrosis factor-alpha)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 86일 수 있으며, 경쇄 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 89일 수 있다.
- [0095] 본 발명의 핵산은 상기 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 실질적인 동일성은 본 발명의 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인 된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성, 바람직하게 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상의 상동성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다.
- [0096] 상기 항체를 암호화하는 DNA는 통상적인 과정을 사용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역을 암호화하는 DNA와 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 분리 또는 합성한다. 많은 벡터가 입수 가능하다. 벡터 성분에는 일반적으로, 다음 중의 하나 이상이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 증강인자 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열.
- [0097] 본 명세서에서 사용되는 용어, "벡터"는 숙주세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단으로 플라스미드 벡터; 코즈미드 벡터; 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터 같은 바이러스 벡터 등을 포함한다. 상기 벡터에서 항체를 코딩하는 핵산은 프로모터와 작동적으로 연결되어 있다.
- [0098] "작동적으로 연결"은 핵산 발현조절서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [0099] 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL λ 프로모터, pR λ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 또한, 예를 들어, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터, β -액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈 프로모터 및 사람 근육 크레아틴 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터엡스타인 바 바이러스(EBV)의 프로모터 및 로우스 사코마 바이러스(RSV)의 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [0100] 경우에 따라서, 벡터는 그로부터 발현되는 항체의 정제를 용이하게 하기 위하여 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은, 예컨대 글루타티온 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질(NEB, USA), FLAG(ABI, USA) 및 6x His(hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있다.
- [0101] 상기 벡터는 선택표지로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이

클린에 대한 내성 유전자가 있다.

- [0103] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 언급된 벡터로 형질전환된 세포에 관한 것이다. 본 발명의 이중표적 항체를 생성시키기 위해 사용된 세포는 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵생물 세포일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0104] 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 슈린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*)(예를 들면, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)), 프로테우스미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 및 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)(예를 들면, 스태필로코쿠스 카르노수스(*Staphylococcus carnosus*))와 같은 원핵 숙주세포를 이용할 수 있다.
- [0105] 다만, 동물 세포에 대한 관심이 가장 크며, 유용한 숙주 세포주의 예는 COS-7, BHK, CHO, CHO-S, CHOK1, DXB-11, DG-44, CHO/-DHFR, CV1, COS-7, HEK293, BHK, TM4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PER.C6, SP2/0, NS-0, U2OS, 또는 HT1080일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0107] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 상기 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양된 세포에서 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 회수하는 단계를 포함하는 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조방법에 관한 것이다.
- [0108] 상기 세포는 각종 배지에서 배양할 수 있다. 시판용 배지 중 제한없이 배양 배지로서 사용할 수 있다. 당업자에게 공지되어 있는 기타 모든 필수 보충물이 적당한 농도로 포함될 수도 있다. 배양 조건, 예를 들어 온도, pH 등이 발현을 위해 선별된 숙주 세포와 함께 이미 사용되고 있고, 이는 당업자에게 명백할 것이다.
- [0109] 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 회수는 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 불순물을 제거하고, 그 결과물을 예를 들어 친화 크로마토그래피 등을 이용하여 정제할 수 있다. 추가의 기타 정제 기술 예를 들어 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피, 히드록실아파타이트 크로마토그래피 등이 사용될 수 있다.
- [0111] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 이에 결합된 약물을 포함하는 항체-약물 접합체에 관한 것이다.
- [0112] 상기 약물에는 화학물질, 방사성핵종, 면역치료제, 사이토킨, 케모킨, 독소, 생물작용제 및 효소 저해물질 등이 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 항암제와 직접 혹은 간접적으로 결합될 수 있고, 상기 항암제의 예로는 아시바이신, 아클라루비신, 아코다졸, 아크로나이신, 아도젤레신, 알라노신, 알데스루킨, 알로푸리놀 소듐, 알트레타민, 아미노글루테티미드, 아모나파이드, 암플리젠, 암사크린, 안드로겐스, 안구이딘, 아피디롤린 글리시네이트, 아사레이, 아스파라기나아제, 5-아자시티딘, 아자티오프린, 바실러스 칼레테-구에린(BCG), 베이커스 안티폴, 베타-2-디옥시티오구아노신, 비스안트렌 HCl, 블레오마이신 설페이트, 불서판, 부티오닌 설펡시민, BWA773U82, BW 502U83/HCl, BW 7U85 메실레이트, 세라세미드, 카르베티머, 카르보플라틴, 카르무스틴, 클로람부실, 클로로퀴녹살린-설포나미드, 클로로조토신, 크로모마이신 A3, 시스플라틴, 클라드리빈, 코르티코스테로이드, 코리너박테리움 파르부, CPT-11, 크리스나톨, 사이클로사이티딘, 사이클로포스파미드, 사이타라빈, 사이템베나, 다비스 말리에이트, 데카르바진, 닥티노마이신, 다우노루바이신 HCl, 디아자유리딘, 텍스라죽산, 디엔하이드로 갈락티톨, 디아지쿠온, 디브로모들시톨, 디테민 B, 에틸디티오카르바메이트, 디클라이코알데하이드, 다이하이드로-5-아자사이틴, 독소루비신, 에치노마이신, 데다트렉세이트, 에텔포신, 에플롤니틴, 엘리우스 용액, 엘사미트루신, 에피루비신, 에소루비신, 에스트라머스틴 포스페이트, 에스트로겐, 에타니다졸, 에티오포스, 에토포사이드, 파드라졸, 파자라빈, 펜레티나이드, 필그라스티프, 피나스테라이드, 플라본 아세트산, 플록스유리딘, 플루다라빈 포스페이트, 5'-플루오로우라실, Fluosol™, 플루타미드, 갈륨 나이트레이트, 겐사이타빈, 고세레린 아세테이트, 헤프실팜, 핵사메틸렌 비스아세트아미드, 호모하링토닌, 하이드라진 설페이트, 4-하이드록시안드로스테네디온, 하이드로지우레아, 이다루비신 HCl, 이포스파미드, 4-이포메아놀, 이프로플라틴, 이소트레티노인, 류코보린 칼슘, 류프로라이드 아세테이트, 레바미솔, 리포솜 다우노루비신, 리포솜 포집 독소루비신, 로머스틴, 로니다민, 마이탄신, 메클로레타민 하이드로클로라이드, 멜팔란, 메노가릴, 메르바론, 6-머캅토프린, 메스나, 바실러스 칼레테-구에린의 메탄올 추출물, 메토티렉세이트, N-메틸포름아미드, 미페프리스톤, 미토구아존, 마이토마이신-C, 미토탄, 미톡산트론 하이드로클로라이드, 모노사이트/마크로파지 콜로니-자극 인자, 나빌론, 나폭시딘, 네오카르지노스타틴, 옥트레오타이드 아세테이트, 오르파몰라틴, 옥살리플라틴, 파크리탁셀, 팔라, 펜토스타틴, 피페라진디온, 피포브로만, 피라루비신, 피리트렉심, 피복산트론 하이드로클로라이드, PIXY-321, 플리카마이신, 포르피머 소듐, 프레드니무스틴, 프로카르바진, 프로게스틴스, 파이라

조푸린, 라족산, 사르그라마스티, 세무스틴, 스피로게르마늄, 스피로무스틴, 스트렙토나이트린, 스트렙토조신, 솔로페너르, 수라민 소듐, 타목시펜, 탁소레레, 테가푸르, 테니포사이드, 테레프탈아미딘, 테록시론, 티오구아닌, 티오테파, 티미딘 인젝션, 티아조푸린, 토포데칸, 토레미펜, 트레티노인, 트리플루오페라진 하이드로클로라이드, 트리플루리딘, 트리메트렉세이트, TNF(tumor necrosis factor), 우라실 머스타드, 빈블라스틴 설페이트, 빈크리스틴 설페이트, 빈데신, 비노렐빈, 빈줄리딘, Yoshi 864, 조루비신, 사이토신아라비노시드, 에토포시드, 멜파란, 탁소텔 및 탁솔 등을 들 수 있다.

- [0114] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 상기 항체-약물 접합체를 유효성분으로 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0115] 본 발명은 예를 들어, (a) 본 발명에 따른 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 상기 항체-약물 접합체의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물일 수 있다. 본 발명은 또한, 환자에게 필요한 유효량으로 본 발명에 따른 이중표적 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 상기 항체-약물 접합체를 투여하는 단계를 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.
- [0116] 상기 자가면역질환은 류마티스 관절염, 건선, 건성성 관절염, 강직성 척추염, 다발성 경화증, 간질성 섬유증, 루프스, 사구체 신염, 크론병, 염증성 장질환, 자가면역성 안질환, 아동 관절염, 베체트병, IL-1 수용체 길항제의 결핍 (DIRA), TNF 수용체 관련 주기성 증후군 (TRAPS), 신생아기 다발성 염증성 질환 (NOMID), 가족성지중해열 (FMF), 및 크리오피린 관련 주기적 증후군(CAPS)으로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0117] "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 자가면역질환을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 자가면역질환 발전의 억제, 자가면역질환의 경감 또는 완치를 의미한다.
- [0118] 본 발명의 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유효제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0119] 본 발명에서, "개체"는 본 발명의 이중표적항체를 투여하여 경감, 억제 또는 치료될 수 있는 상태 또는 질환을 앓고 있거나 그러한 위험이 있는 포유동물을 의미하며, 바람직하게 사람을 의미한다.
- [0120] 본 발명에서, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 개체에 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하면 본 발명의 이중표적 항체를 포함하는 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 그러나 경구 투여시, 단백질은 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 하는 것이 바람직하다. 또한, 제약 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0121] 본 발명에 따른 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.0001-100 mg/kg, 예를 들어 1 mg/kg 내지 2g/kg의 투여량으로 투여될 수 있다. 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 단일 또는 수회 투여될 수 있다. 본 명세서에서 용어 "약제학적 유효량"은 자가면역질환을 예방 또는 치료에 충분한 양을 의미한다.
- [0122] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.
- [0123] 본 발명의 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 좌제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는

안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0125] **[실시예]**

[0126] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0128] **실시예 1: IL-17 항원 발현 및 정제**

[0129] **1-1: IL-17A 단백질 발현 벡터 제작**

[0130] IL-17A의 클로닝은 인간 IL-17A cDNA (sinobiological, 중국: 서열번호 50)를 주형으로 하여, 세포의 도메인만을 얻기 위해 5'과 3'에 IL-17A에 대한 프라이머 (표 3)를 이용하여 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)에 의해 증폭시켰다. 증폭된 PCR 산물은 N293F 벡터를 이용하여 카복시-말단에 His-tag를 융합시켜 제작하였다. IL-17A-N293F는 DH5α 대장균 세포에 트랜스포메이션(transformation)하여 앰피실린 (ampicillin) 저항성이 있는 균주를 선별하였다. sfiI과 xhoI 제한효소에 의한 절단 및 시퀀싱을 통해 IL-17A-His 유전자 (서열번호 51)의 삽입여부를 확인하였다.

[0131] **[표 3]**

명칭	5'→3' 서열
IL-17A-F	GGAATCACAATCCCACGAAAT (서열번호 52)
IL-17A-R	GGCCACATGGTGGACAATCGG (서열번호 53)

[0133] **1-2: IL-17A 항원의 발현 및 정제**

[0134] 인간 IL-17A-His 또는 마우스 IL-17A-His 항원을 생산하기 위하여 HEK293F 세포를 freestyle media (Gibco, cat. A13835)에 배양하여 5 x 10⁵ cells/ml로 접종하고, 1일 배양하여 제조된 IL-17A-N293F 벡터를 HEK293F 세포에 PEI (polyethylenimine, Aldrich, cat. 408727) 형질감염(Transfection)하였다. 플라스미드와 PEI를 1 : 2 무게 비율로 섞어 폴리플렉스 (polyplex)를 형성하게 한 후 세포에 형질감염하였다. 7일 배양된 세포배양액을 SDS-PAGE 후 PVDF membrane으로 transfer하여 항-His HRP 항체를 처리하고 ECL 기질로 발현을 확인하였다.

[0135] 발현된 hIL-17A-His와 mIL-17A-His 배양액을 Ni-NTA column으로 분리정제 한 후 SDS-PAGE하여 CBR-250으로 염색하여 단백질을 분석하였다.

[0137] **실시예 2: IL-17 항체의 선별을 위한 스크리닝**

[0138] **2-1. 바이오패닝**

[0139] hIL-17A에 특이적으로 결합하는 항체 후보의 선별을 위하여 파아지 디스플레이 기술과 인간 B 세포의 naive cDNA로 구성된 Ymax-nABL 라이브러리를 이용하였다.

[0140] 실시예 1에서 제조된 IL-17A-His를 면역흡착 튜브 (Immuno tube)에 코팅하고 라이브러리 파아지를 넣은 후, 실온에서 2시간 반응한 다음, 1 X PBST와 1 X PBS로 세척 후 항원에 특이적으로 결합한 scFv-파아지를 용출하였다. 용출된 항원에 특이적으로 결합한 scFv-파아지를 다시 대장균에 감염시켜 증폭시키는 패닝을 통해 양성 파아지의 pool을 얻고, 첫 번째 패닝에서 증폭된 파아지를 대상으로 PBST 세척의 횟수를 증가시켜 2차와 3차 패닝을 반복 수행하였다.

[0141] 1~3차 라운드 패닝을 통해 도출된 hIL-17A 파아지 항체 pool의 CFU 확인 시, 3차 패닝의 output CFU는 1차 내지 2차 패닝의 output CFU보다 약 10배 가량 증가된 것으로 확인되었다.

[0143] **2-2: IL-17A에 특이적인 항체 선별**

[0144] 각 라운드의 패닝을 통해 얻어진 양성 폴리 ScFv-파아지 항체 pool에 대한 항원과의 특이성을 알아보기 위해 폴리 파아지 ELISA(enzyme linked immunoassay)를 수행하였다. 패닝에 사용된 인간 IL-17A-His 항원과 마우스 항원에 교차결합 유무를 확인하기 위한 마우스 IL-17A-His 항원을 코팅한 면역 플레이트 (immuno-plate)에 각 라운드에서 얻어진 파아지 pool로 다이렉트 ELISA (direct ELISA)를 수행하였다. 그 결과, hIL-17A-His 항원에 대한 결합능이 3차 폴리 ScFv-파아지에서 주로 증가하여 3차 패닝의 양성 파아지 pool에 항-IL-17A 파아지 항체

가 증가되었음을 확인하였다.

- [0145] 폴리 파아지 ELISA에서 결합능이 큰 3차 패닝으로부터 무작위로 단일 클론이 포함되는 E.coli를 선별하여 2xYT/C 배양액이 처리된 96-딥 웰 플레이트 (96-deep well plate)에서 37 °C 300rpm에서 미드 로그(mid-log)기로 배양 후 헬퍼 파아지 감염을 유도하였다. 6000rpm 10분간 원심분리하여 세포를 펠렛화 하고 상층액에 존재하는 용출된 모노 scFv-파아지만 획득하였다.
- [0146] 인간 IL-17A-His, BSA를 각각 0.4µg/ml로 Maxisorb 96well ELISA 플레이트 (Nunc, Denmark)에 코팅하고, 3% 탈지우유가 포함된 PBST로 차단한 후, 획득된 모노 scFv-파아지를 각 항원이 코팅된 면역-플레이트 (immuno-plate)로 이동 (transfer)하였다. 상기 ELISA 플레이트는 PBST 0.05%로 3회 세척하고, 항-M13-HRP(Horse Radish Peroxidase)항체를 PBST 0.05%에 희석하여 1시간 반응하였다. OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride)기질을 10분 처리하여 발색시킨 후 2N H₂SO₄를 처리하여 반응을 중지시켰다. 발색된 ELISA는 SpectraMax ELISA reader (Molecular device, 미국)기를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, 대조 항원으로 사용된 BSA에 결합하는 신호 대비, hIL-17A-his에 결합 신호가 최소 3배 이상 강한 수 십여종의 모노 scFv-파아지 클론들을 선별하였다.
- [0147] 상기 선별된 단일 클론에 대해 DNA 정제 키트 (Qiagen, 독일)를 사용하여 파아지미드(phagemid) DNA를 분리하였다. 분리된 DNA의 염기서열, 중쇄 및 경쇄의 서열을 분석하여 서열이 서로 다른 특이적 클론을 확인하였다. 그 다음, 친화도 증진을 위한 중쇄사슬의 변경을 목적으로 하는 친화도 성숙 (affinity maturation)을 진행하여 IL-17A에 특이적인 scFv를 선별하였다. IL-17A에 특이적인 항체의 서열은 하기 표 4 (중쇄 CDR 및 중쇄 가변영역) 및 표 5 (경쇄 CDR 및 경쇄 가변영역)에 기재된 바와 같다.

[0148] [표 4]

항체	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3
7D1	SYTMH (서열번호 1)	ISFDGRSKLYGDSVRD (서열번호 2)	RGREGEDAFDL (서열번호 3)
	FR1	QVQLVESGGGVAQPGRSLRLSCAASGFAFG (서열번호 15)	
	FR2	WVRQAPGKGLEWVTL (서열번호 16)	
	FR3	RFTISRDN SKNMLYLKISDLRSED TAVYYCAR (서열번호 17)	
	FR4	WGQGMVTVSS (서열번호 18)	
	VH	QVQLVESGGGVAQPGRSLRLSCAASGFAFGSYT MHWVRQAPGKGLEWVTLISFDGRSKLYGDSVR DRFTISRDN SKNMLYLKISDLRSED TAVYYCARR GREGEDAFDLWGQGMVTVSS (서열번호 34)	
7H3C11FW	SYTMH (서열번호 1)	ISFDGRSKLYGDSVKG (서열번호 4)	GSVRGEA AFDL (서열번호 5)
	FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFG (서열번호 19)	
	FR2	WVRQAPGKGLEWVTL (서열번호 16)	
	FR3	RFTISRDN SKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR (서열번호 20)	
	FR4	WGQGLTVTVSS (서열번호 21)	
	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFGSYT MHWVRQAPGKGLEWVTLISFDGRSKLYGDSVK GRFTISRDN SKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARG SVRGEA AFDLWGQGLTVTVSS (서열번호 35)	
7H3B6FW	SYTMH (서열번호 1)	ISFDGRSKLYGDSVKG (서열번호 4)	GSKLGEDAFDL (서열번호 6)
	FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFG (서열번호 19)	
	FR2	WVRQAPGKGLEWVTL (서열번호 16)	
	FR3	RFTISRDN SKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR (서열번호 20)	
	FR4	WGQGLTVTVSS (서열번호 21)	
	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFGSYT MHWVRQAPGKGLEWVTLISFDGRSKLYGDSVK GRFTISRDN SKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARG SKLGEDAFDLWGQGLTVTVSS (서열번호 36)	

[0149]

7H3C12FW	SYTMH (서열번호 1)	ISFDGRSKLYGDSVKG (서열번호 4)	GSRIGEDAFDL (서열번호 7)
	FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFG (서열번호 19)	
	FR2	WVRQAPGKGLEWVTL (서열번호 16)	
	FR3	RFTISRDN SKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (서열번호 20)	
	FR4	WGQGLTVTVSS (서열번호 21)	
	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFGSYT MHWVRQAPGKGLEWVTLISFDGRSKLYGDSVK GRFISRDN SKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG SRIGEDAFDLWGQGLTVTVSS (서열번호 37)	
9E12	DHAMH (서열번호 8)	SLISGDGGATYYADSVKG (서열번호 9)	HFSDSRGRSDVPFDI (서열번호 10)
	FR1	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFD (서열번호 22)	
	FR2	WVRQAPGKGLEWV (서열번호 23)	
	FR3	RFIISRDN SKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (서열번호 24)	
	FR4	WGQGLTIVTVSS (서열번호 25)	
	VH	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFDHA MHWVRQAPGKGLEWVSLISGDGGATYYADSVK GRFIISRDN SKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARH FSDSRGRSDVPFDI WGQGLTIVTVSS (서열번호 38)	
9H2D9	DHAMH (서열번호 8)	GLIGPDGGATYYADSVKG (서열번호 11)	HFSDSRGRSDVPFDI (서열번호 10)
	FR1	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFD (서열번호 22)	
	FR2	WVRQAPGNGLWV (서열번호 26)	
	FR3	RFIISRDN SKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (서열번호 24)	
	FR4	WGQGLTIVTVSS (서열번호 25)	
	VH	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFDHA MHWVRQAPGNGLWVGLIGPDGGATYYADSVK GRFIISRDN SKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARH FSDSRGRSDVPFDI WGQGLTIVTVSS (서열번호 39)	

[0150]

[0151] [표 5]

항체	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
7D1	SGDNLRTKYVS (서열번호 12)	QDTRRPS (서열번호 13)	MTWDVDTTSM (서열번호 14)
	FR1	SYELTQAPSLSVSPGQTANIIC (서열번호 27)	
	FR2	WYQQKPGQSPLLVIY (서열번호 28)	
	FR3	GIPARFSGSNSGNTATLTISGTQTRDESTYYC (서열번호 29)	
	FR4	IFGGGTKLTVL (서열번호 30)	
	VL	SYELTQAPSLSVSPGQTANIICSGDNLRTKYVSWYQQKPGQSPLLVIYQDTRRPSGIPARFSGSNSGNTATLTISGTQTRDESTYYCMTWDVDTTSMIFGGGTKLTVL (서열번호 40)	
7H3C11FW	SGDNLRTKYVS (서열번호 12)	QDTRRPS (서열번호 13)	MTWDVDTTSM (서열번호 14)
	FR1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC (서열번호 31)	
	FR2	WYQQKPGQSPVLIY (서열번호 32)	
	FR3	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC (서열번호 33)	
	FR4	IFGGGTKLTVL (서열번호 30)	
	VL	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNLRTKYVSWYQQKPGQSPVLIYQDTRRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCMTWDVDTTSMIFGGGTKLTVL (서열번호 41)	
7H3B6FW	SGDNLRTKYVS (서열번호 12)	QDTRRPS (서열번호 13)	MTWDVDTTSM (서열번호 14)
	FR1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC (서열번호 31)	
	FR2	WYQQKPGQSPVLIY (서열번호 32)	
	FR3	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC (서열번호 33)	
	FR4	IFGGGTKLTVL (서열번호 30)	
	VL	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNLRTKYVSWYQQKPGQSPVLIYQDTRRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCMTWDVDTTSMIFGGGTKLTVL (서열번호 41)	

[0152]

7H3C12FW	SGDNLRTKYVS (서열번호 12)	QDTRRPS (서열번호 13)	MTWDVDTTSM (서열번호 14)
	FR1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC (서열번호 31)	
	FR2	WYQQKPGQSPVLVIY (서열번호 32)	
	FR3	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADY YC (서열번호 33)	
	FR4	IFGGGTKLTVL (서열번호 30)	
	VL	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNLRTK YVSWYQQKPGQSPVLVIYQDTRRPSGIPE RFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCM TWDVDTTSMIFGGGTKLTVL (서열번호 41)	
9E12	SGDNLRTKYVS (서열번호 12)	QDTRRPS (서열번호 13)	MTWDVDTTSM (서열번호 14)
	FR1	SYELTQAPSLSVSPGQTANIIC (서열번호 27)	
	FR2	WYQQKPGQSPLVIY (서열번호 28)	
	FR3	GIPARFSGSNSGNTATLTISGTQTRDESTYY C (서열번호 29)	
	FR4	IFGGGTKLTVL (서열번호 30)	
	VL	SYELTQAPSLSVSPGQTANIICSGDNLRTK YVSWYQQKPGQSPLVIYQDTRRPSGIPA RFSGSNSGNTATLTISGTQTRDESTYYCMT WDVDTTSMIFGGGTKLTVL (서열번호 40)	
9H2D9	SGDNLRTKYVS (서열번호 12)	QDTRRPS (서열번호 13)	MTWDVDTTSM (서열번호 14)
	FR1	SYELTQ PPSVSVSPGQTASITC (서열번호 31)	
	FR2	WYQQKPGQSPVLVIY (서열번호 32)	
	FR3	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADY YC (서열번호 33)	
	FR4	IFGGGTKLTVL (서열번호 30)	
	VL	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNLRTK YVSWYQQKPGQSPVLVIYQDTRRPSGIPE RFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCM TWDVDTTSMIFGGGTKLTVL (서열번호 41)	

[0153]

[0155] 실시예 3: IL-17A와 TNF- α 을 표적으로 하는 이중항체의 제조

[0156] 3-1: 이중항체 생산

[0157] IL-17A는 단독으로 존재 시 염증을 유도할 수 있는 활성이 적으나 TNF- α 와 함께 존재 시 염증 활성을 과도하게 유도하는 것으로 알려져 있고, 이에 따라 IL-17와 TNF- α 를 매개하는 염증성 사이토카인의 발현을 차단하는 이중표적 항체의 필요성이 대두되었다. 이에, 항 IL-17 항체 및 항 TNF- α 항체인 휴미라 (humira)를 융합한 이중항체를 제조하기 위해, 상기 실시예 2에서 제조한 항 IL-17 항체 단일클론 중 7H3C11FW의 scFv를 휴미라 말단 3'에 클로닝하여 이를 SDA-0070로 명명하였다.

[0158] 항-TNF- α 항체인 휴미라 (아달리무맙)는 중쇄 가변영역을 포함하는 아미노산 서열(서열번호 90) 및 경쇄 가변영역을 포함하는 아미노산 서열 (서열번호 91)을 토대로 유전자 합성을 통하여 제조하였다. 그 다음, 항 TNF- α 항체인 휴미라 중쇄사슬의 핵산서열 (서열번호 86) 3' 말단에 링커를 도입하고 그 뒤에 최적화를 통해 획득된 항 IL-17A VH VL을 이용한 scFv 핵산서열 (서열번호 87)을 연결하였다. 이렇게 제조된 이중항체 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 92로 나타내었다.

[0159] 이러한 이중항체를 단백질로서 생산 및 제조하기 위하여 생산 세포로서 HEK293F를 이용하여 임시발현을 유도하였다. 생산 구조체인 플라스미드는 N293F로 명명된 벡터 내에 상기 이중항체의 핵산서열을 삽입하였고, 이러한 구조체를 HEK293F에 형질감염 하기 위하여 폴리에틸렌이민과 섞어 폴리플렉스를 형성하여 처리하고 프리스타일

(Gibco, 미국) 배지를 이용하여 6일 배양하였다. 8000rpm에서 원심분리하여 세포 잔해를 제거하고 보틀 탑 필터 (bottle top filter: Millipore, Steritop-GP Filter Unit. Cat. No. SCGPS01RE)를 이용하여 순수 배양액을 획득하였다.

[0161] 3-2: 항체의 정제

[0162] 배양액 내에 존재하는 TNF- α /IL-17 이중항체를 분리정제 하기 위하여 1차 정제는 Protein A 레진 (KANEKA, 일본)을 이용하여 affinity 정제하였다. 빈 칼럼 (Bio-rad, BR731-1550)에 4ml의 Protein A를 넣어 준 후 100ml의 DPBS (LB001-02)로 레진을 팩킹 및 세척하였다. 레진이 충전된 컬럼 내에 배지를 주입하여 1ml/분의 유속으로 흘려 주었다 (Bio-Rad, EP-1 Econo pump, USA). 150ml의 DPBS로 세척 후, 0.1 M glycine-HCl (pH 3.3) 10ml로 용출하였다. 용출액에 1M Tris-HCl (pH 9.0)을 10% 첨가하여 pH를 중화시키고, Amicon Ultra-15 (Millipore, UFC901096)를 이용하여 DPBS로 버퍼를 바꾸어 주었다. 이 과정을 3번 정도 한 후 1ml 정도 농축되었을 때 멈추고, 농도를 확인하였다. 농도 측정은 Epoch (Biotek, 미국)를 이용하여 UV 정량하였다.

[0163] 2차 정제는 Gel filtration 정제를 위하여 Superdex200 레진 (GE healthcare, 미국)을 이용하였고 고분자 물질을 제거하기 위해 이용되었다. 이동상인 DPBS(welgene, 한국)로 2CV 평형화 (equilibration)하고, 1차 정제 단백질은 0.22 μ m 시린지 필터 (Millipore, SLGP033RB)로 여과한 후 10mL 만큼 sample loop에 로딩하였다. 로딩된 단백질을 컬럼에 주입하고, 목적 분자에 해당하는 분획을 pooling 하였다. Pooling 한 분획은 Amicon Ultra-15 (Millipore, UFC905096)을 이용하여 농축하고, 0.22 μ m 시린지 필터 Msillipore, SLGP033RB)로 멸균 여과하였다.

[0165] 3-3: SDS-PAGE 및 HPLC

[0166] 정제된 단백질은 환원 또는 비환원 버퍼와 혼합하여 준비하였다. 단백질의 분리에 사용된 아크릴아마이드 분리젤 (트랜스랩, 한국)은 각 12%로 제작하였다. 제작한 분리젤은 러닝 탱크 (BioRad, 미국)에 장착하고 1X 러닝 버퍼를 채워 샘플 2 μ g을 로딩하였다. 분리젤에는 단백질 사이즈 마커 (BioRad, 미국)를 로딩한 웰을 한 개씩 포함시켰다. 로딩이 끝난 뒤, 러닝탱크에 (-)에서 (+)방향으로 전극을 연결하고 200V로 전기영동 하였으며, 로딩 버퍼의 brilliant blue 염료가 젤 말단에 이르기까지 전기영동 하였다. 전기영동 후 분리젤은 쿠마시 블루 염색시약으로 염색하고 탈색 버퍼로 탈색한 뒤, 증류수 (Distilled water, D.W.)로 잔여 시약을 제거하여 마커와 정제 단백질 분리 양상을 분석하였다 (도 2). GFC (젤 여과 크로마토그래피) 정제 후 SE-HPLC 분석 결과는 도 3에 나타냈었다.

[0168] 실시예 4: 이중항체의 결합 특이성 분석

[0169] 이중항체의 항원 특이적 결합 특이성을 확인하기 위해 ELISA를 수행하였다. 인간 IL-17A와 마우스 IL-17A (R&D system, 미국), 마모셋 IL-17A (Sino biological, 중국), 사이노몰구스 IL-17A, 인간 TNF- α (Peprotech, 미국), 인간 IL-17F (R&D system, 미국), 인간 IL-17A/F (R&D system, 미국), BSA를 각각 15nM로 96웰 플레이트에 37 $^{\circ}$ C에서 O/N 코팅하였다. 이후 3% 탈지우유/PBST 0.05%로 코팅되지 않은 부분을 차단시킨 후, 66nM, 6.6nM, 0.6nM의 IL-17A 항체를 플레이트에 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응하였고, 항 인간 Fc-HRP (pierce, 미국)를 1:3000 희석하여 1시간 반응하였다. 다음으로 TMB 기질 (BD, 미국)을 10분 처리하여 발색시킨 후 2N H2SO4를 처리하여 반응을 중지시켰다. 발색된 ELISA는 Sunrise ELISA reader (TECAN, 스위스)기를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0170] 그 결과, 인간 TNF- α 단일표적 항체와는 달리 이중항체는 인간 TNF- α 뿐만 아니라 인간 IL-17A와 결합하고, 마모셋, 사이노몰구스 종 및 인간 IL-17A/F 이중이중체 (heterodimer)에 대한 결합을 유지하고 있었다 (도 4a). 또한, IL-17 리간드 패밀리에 해당하는 IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E 및 인간 RAGE-his, 인간 ErbB2-his, 인간 VEGF-his, 인간 CD93-His, 인간 HMGB1-His의 비표적 항원 단백질에 대한 결합은 나타나지 않았다 (도 4b 및 도 4c). 즉, 본 발명의 항체는 인간 TNF- α 와 인간 IL-17A 또는 IL-17A/F에만 결합이 증진된 매우 특이적인 항체임을 확인할 수 있었다.

[0172] 실시예 5: ELISA를 이용한 이중항체의 두 항원 동시 결합능 평가

[0173] 이중항체의 표적인 IL-17A와 TNF- α 에 대한 동시 결합능을 분석하기 위해, 표적 항원 TNF- α 를 코팅하고, 나머지 표적 항원 IL-17A를 이용하여 검출하는 효소면역분석법을 사용하였다 (도 5).

[0174] TNF- α (peprotech, 미국)를 DPBS (웰진, 한국)에 0.26 μ g/ml로 희석하여 96웰 플레이트 (corning, 미국)에 웰당 100 μ l 처리한 후 4 $^{\circ}$ C에 16시간 정치하여 코팅하였다. 세척 버퍼는 PBS-T (0.1% Tween 20)를 사용하였고 블로

킹에는 skim milk (BDbiosciences, 미국)를 PBS-T에 3%로 희석하였다. 항체 시료는 6.6nM에서부터 10배씩 단계 희석하여 660fM까지 총 5 포인트 희석하였고, 희석한 항체 시료는 96웰 플레이트에 웰 당 100 μ l씩 처리하여 25 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응하였다. IL-17A-His (와이바이오로직스, S0995)를 2.25 μ g/ml로 희석하여 웰 당 100 μ l 처리하고, 25 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응한 뒤, 2차 항체로 항-His-HRP (Thermofisher scientific, 미국)를 1:5000으로 희석하여 웰 당 100 μ l 처리하여 25 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응하였다. 기질로는 TMB (sigma aldrich, 미국)를 사용하였으며, 웰 당 100 μ l 넣고 20분 반응한 뒤 2.5N H₂SO₄로 기질 반응을 정지하여 Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (thermofisher scientific, 미국)에서 흡광도 450nm로 측정하였다.

[0175] 그 결과, 단일항체에서는 결합 반응이 전혀 나타나지 않았으며, 이중항체는 농도 구배에 따라 TNF- α 와 IL-17A의 동시결합 반응이 나타났다 (도 6 및 표 6).

[0176] [표 6]

[0177] TNF- α 및 IL-17A 항원에 대한 각 항체의 EC50

	SDA-0070	휴미라 (Humira)	세쿠키누맙 (secukinumab)
EC50 (pM)	133.7	-	-

[0178]

[0180] **실시예 6: HT-29 세포 분석을 이용한 SDA-0070 양이온 교환 크로마토그래피 (cation exchange; CEX) 정제물의 효능 평가**

[0181] 시험을 위해 사용한 HT-29 (Homo sapiens colorectal adenocarcinoma) (한국세포주은행, 한국)는 인간 대장 선암종 유래 세포주로, IL-17과 TNF- α 에 반응하여 다양한 면역성 사이토카인과 면역성 케모카인인 CXCL-1 (human GRO- α) 등을 분비하는 것으로 알려져 있다. 10% 우태아혈청 (Gibco, 미국)와 1% 항생제, Anti-anti (penicillin/streptomycin/anti-mycoplasma; Gibco, 미국)가 포함된 RPMI1640 (hyclone, 미국)배지를 사용하여 3번 이상 계대 배양한 세포를 사용하였다.

[0182] 중화능 시험은 IL-17A에 대한 단독 중화능, TNF- α 에 대한 단독 중화능, IL-17A, TNF- α 동시 중화능 세가지를 수행하였다. IL-17A 또는 TNF- α 를 단독 희석하거나 함께 섞어 희석물을 조제하였고, 항체 시료는 736pM에서 2배씩 희석하여 0.36pM까지 총 12개 농도로 최종 처리되도록 희석하였다. 각 희석된 항체와 앞서 제작한 항원 희석물을 96웰 플레이트에 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응하였다. 항원-항체 반응이 완료된 플레이트에 트립신-EDTA 처리하여 회수한 HT-29세포를 웰 당 7.5x10⁴ 세포씩 접종 (seeding)하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 환경에서 48시간 배양하였으며, 48시간 뒤 세포를 제외한 배양액을 회수하였다. 회수한 배양액은 ELISA kit Human CXCL-1 (R&D systems, 미국)를 이용하여 배양액 내 CXCL-1 농도를 측정함으로써 항체의 항원에 대한 중화능을 평가 하였다.

[0183] SDA-0070에 대한 중화능 비교시험 결과, 단일 표적 항체에 비교하여 이중항체의 IL-17A에 대한 중화능과 TNF- α 에 대한 중화능이 다소 우수하였고, 이에 따라 IL-17A, TNF- α 동시 중화능 역시 우수한 경향을 보였다 (도 7 및 표 7). 하기 표 7은 HT-29 세포를 이용한 SDA-0070 클론의 저해능 평가 결과이다.

[0184] [표 7]

Name	IL-17A+TNF- α IC50(pM)	IL-17A IC50(pM)	TNF- α IC50(pM)
Humira	80.45		23.2
secukinumab	1229	258.8	
SDA-0070_CEX	21.55	22.72	25.15

[0185]

[0187] **실시예 7: 리포터 세포 분석을 이용한 SDA-0070 CEX 정제물의 효능 평가**

[0188] HEK 블루 유래 세포주 중 IL-17 수용체인 IL-17RA, IL-17RC를 발현하는 HEK-Blue™ IL-17 세포주 (invivogen, 미국)와 TNF- α 수용체 TNFR1, TNFR2를 발현하는 HEK-Blue™ TNF- α 세포주 (invivogen, 미국)를 사용하여, IL-17A와 TNF- α 에 대한 중화능을 평가하였다. HEK 블루 세포주의 배양에는 10% 우태아혈청 (Gibco, 미국)과 1% 항생제, Anti-anti (penicillin/streptomycin/anti-mycoplasma; Gibco, 미국)가 포함된 DMEM-HG (hyclone, 미국)를 사용하였으며, 각 수용체와 SEAP 발현을 유지하는 선택 항생제로는 지오신 (zeocin; invivogen, 미국)이 사용되었다. HEK-Blue™ IL-17 세포주에는 항생제 혼합 제품인 HEK-Blue™ Selection (invivogen, 미국)이 추가

적으로 사용되었다. 실험에 사용된 모든 세포는 최소 3번 이상 계대 배양한 것을 사용하였으며 배양 플레이트에서 세포 회수 시 accutase (Merck Millipore, 독일)를 사용하였다. IL-17A (R&D, 미국)는 최종 농도 0.6ng/ml, TNF- α (R&D, 미국)는 최종 농도 0.4ng/ml이 되도록 각각 항원 희석물을 만들고, 각 항체 시료는 736pM에서 2배씩 희석하여 0.36pM까지 총 12개 농도로 최종 처리되도록 희석하였다. 각 희석된 항체와 앞서 제작한 항원 희석물을 96웰 플레이트에 혼합하여 37°C에서 1시간 반응하였다. 항원-항체 반응이 완료된 플레이트에 accutase로 회수한 HEK-Blue™ IL-17 세포와 HEK-Blue™ TNF- α 세포를 웰 당 5×10^4 세포씩 접종(seeding)하고 37°C, 5% CO₂ 환경에서 24시간 배양하였으며, 24시간 뒤 세포를 제외한 배양액을 회수하였다. 회수한 배양액에 QUANTI-Blue™ 배지 (Invivogen, 미국) 용액을 넣고 37°C에 배양하며, 발생하는 기질 반응 속도에 따라 20분에서 60분 내에 Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (thermofisher scientific, 미국)에서 흡광도 622nm로 측정하였다.

[0189] SDA-0070_CEX (양이온 교환 크로마토그래피)에 대한 HEK 블루 중화능 비교시험 결과, IL-17의 단일표적 항체인 세쿠키누맙 (secukinumab) 대비 우수하였고 TNF- α 의 단일표적 항체인 휴미라 (Humira)와 유사한 효능을 확인하였다 (도 8 및 표 8). 하기 표 8은 HEK 블루 세포주를 이용한 SDA-0070의 IC50 결과이다.

[0190] [표 8]

NAME	IL-17A IC50(pM)	TNF- α IC50(pM)
Humira		34.35
secukinumab	229.2	
SDA-0070_CEX	58.04	39.87

[0191]

[0193] 실시예 8: HT-29 세포 분석을 통한 정제법에 따른 물질 효능 동등성 평가

[0194] 8-1: 양이온 교환 크로마토그래피 정제

[0195] 연구중인 이중항체에 대한 정제공정을 개선하기 위하여 기존의 기존 젤 여과 크로마토그래피(GFC) 컬럼 (GE healthcare, 영국) 방식 외에 양이온 교환 크로마토그래피 (cation exchange; CEX) 컬럼 (Thermofisher scientific poros, 미국)을 이용하였다.

[0196] 양이온 교환 크로마토그래피 레진 (Thermo, 미국)을 충전 한 후, 이동상 A인 sodium acetate 버퍼로 평형화된 AKTA Pure L(GE healthcare, 미국)에 연결하고, 5 CV 만큼 이동상 A를 흘려주어 평형화하였다. 1차 정제 산물은 이동상 A로 투석하고, 0.22 μ m 시린지 필터 (Millipore, 미국)로 여과하여 주입하였다. 이동상 A를 5CV 만큼 흘려주어 비부착 단백질을 제거하고, 농도 구배에 따른 이동상 B (이동상 A + 1M NaCl)를 흘려주면서 로딩된 단백질을 용출하였다. 용출액은 투석 백 (Spectrumlabs)에 넣어 DPBS (welgene, 한국)로 최소 4시간 간격으로 2차례 투석 하였다. 투석한 단백질은 amicon Ultra-15 (Millipore, UFC905096)을 이용하여 20 mg/mL이상으로 농축하고, 0.22 μ m 시린지 필터 (Millipore, SLGP033RB)로 멸균 여과하였다.

[0198] 8-2: 정제법에 따른 중화능 비교

[0199] 젤 여과 크로마토그래피(GFC) 컬럼 (GE healthcare, 영국)을 사용한 항체 시료 정제물과 양이온 교환 크로마토그래피 (cation exchange; CEX) 컬럼 (Thermofisher scientific poros, 미국)을 사용하여 정제한 항체 시료 정제물의 HT-29 세포에서의 IL-17A, TNF- α 동시 중화능을 비교하여 정제법의 차이가 효능에 영향을 주는지에 대한 동등성 평가를 수행하였다.

[0200] 시험을 위해 사용한 HT-29 (Homo sapiens colorectal adenocarcinoma) (한국세포주은행, 한국)에 10% 우태아혈청 (Gibco, 미국)와 1% 항생제, Anti-anti (penicillin/streptomycin/anti-mycoplasma; Gibco, 미국)가 포함된 RPMI1640 (Hyclone, 미국)배양액을 사용하여 3번 이상 계대 배양한 세포를 사용하였다.

[0201] IL-17A (R&D systems, 미국)와 TNF- α (R&D systems, 미국)의 희석물을 만들고 항체 시료는 736pM에서 4배씩 희석하여 0.7pM까지 총 6개 농도로 최종 처리되도록 희석하였다. 각 희석된 항체와 앞서 제작한 항원 희석물을 96웰 플레이트에 혼합하여 37°C에서 1시간 반응하였다. 항원-항체 반응이 완료된 플레이트에 트립신-EDTA 처리하여 회수한 HT-29세포를 웰 당 7.5×10^4 세포씩 접종 (seeding)하고 37°C, 5% CO₂ 환경에서 48시간 배양하였으며, 48시간 뒤 세포를 제외한 배양액을 회수하였다. 회수한 배양액은 ELISA kit Human CXCL-1 (R&D, 미국)를 이

용하여 배양액 내 CXCL-1 농도를 측정함으로써 항체의 각 항원에 대한 중화능을 평가하였다.

[0202] HT-29 세포에 대한 항체시료들의 IL-17A, TNF- α 동시 중화능 시험 결과, 질 여과 크로마토그래피 컬럼 정제 시료와 양이온 교환 크로마토그래피 컬럼 정제 시료간의 IL-17A와 TNF- α 에 대한 동시 중화능이 유사한 수준으로 유지되는 것을 확인할 수 있었다 (도 9 및 표 9). 하기 표 9는 HT-29 세포를 이용한 GFC 및 CEX 정제법에 따른 효능을 평가한 것이다.

[0203] [표 9]

NAME	IC50 (pM)
Humira	63.19
secukinumab	960.7
SDA-0070_GFC	18.2
SDA-0070_CEX	19.56

[0204]

[0206] 실시예 9: HT-29 세포 분석을 이용한 HEK293 및 CHO-S 유래 시료 간 물질 효능 동등성 평가

[0207] HEK293 임시 발현 시스템으로 생산한 항체시료 SDA-0070_CEX와 CHO-S 세포주 시스템을 통해 생산하고 2차 CEX 정제를 거친 시료 SDA-0070_RD1601를 이용하여 HT-29 세포에서의 중화능을 평가하고 생산 세포주에 따른 효능 동등성을 비교하였다.

[0208] 시험을 위해 HT-29에 10% 우태아혈청 (Gibco, 미국)와 1% 항생제, Anti-anti (penicillin/streptomycin/anti-mycoplasma; Gibco, 미국)가 포함된 RPMI1640 (hyclone, 미국) 배지를 사용하여 3번 이상 계대 배양한 세포를 사용하였다. 중화능 시험은 IL-17A에 대한 단독 중화능, TNF- α 에 대한 단독 중화능, IL-17A, TNF- α 동시 중화능 세가지로 수행하였다. IL-17A 단독 중화능 시험을 위하여 IL-17A (R&D, 미국)는 최종 농도 3.75ng/ml로 희석하였으며, TNF- α 에 대한 단독 중화능 시험을 위해 TNF- α (R&D, 미국)는 최종 농도 1.17ng/ml이 되도록 희석하였다. IL-17A, TNF- α 동시 중화능 시험을 위해 IL-17A는 최종 농도 2.5ng/ml, TNF- α 는 최종 농도 0.39ng/ml이 되도록 희석하였다. 항체 시료는 736pM에서 2배씩 희석하여 0.36pM까지 총 12개 농도로 최종 처리되도록 희석하였다. 각 희석된 항체와 앞서 제작한 항원 희석물을 96웰 플레이트에 혼합하여 37°C에서 1시간 반응하였다. 항원-항체 반응이 완료된 플레이트에 트립신-EDTA 처리하여 회수한 HT-29세포를 접종 (seeding)하고 37°C, 5% CO₂ 환경에서 48시간 배양하고 배양액을 회수하였다. 회수한 배양액은 ELISA kit Human CXCL-1 (R&D, 미국)을 이용하여 배양액 내 CXCL-1 농도를 측정함으로써 항체의 항원에 대한 중화능을 평가하였다.

[0209] 동일 클론의 HEK293 임시 발현 시스템 생산 시료 SDA-0700_CEX와 CHO-S 세포주 생산 시료 SDA-0070_RD1601 간의 중화능 비교시험 결과, IL-17과 TNF- α 에 대한 중화능에 차이는 발생하지 않았다 (도 10 및 표 10). 하기 표 10은 HT-29 세포를 이용한 생산 시스템 간 효능을 비교한 것이다.

[0210] [표 10]

NAME	IL-17A+TNF- α IC50 (pM)	IL-17A IC50 (pM)	TNF- α IC50 (pM)
Humira	95.09		32.38
SDA-0070_CEX	30.86	60.53	33.63
SDA-0070_RD1601	27.67	55.16	30.16
secukinumab	9303	804.6	

[0211]

[0213] 실시예 10: 리포터 세포 분석을 통한 HEK293 및 CHO-S 유래 시료 간 물질 효능 동등성 평가

[0214] HEK293 세포주 임시발현 시스템으로 생산한 항체시료 SDA-0070_CEX와 CHO-S 세포주 시스템을 통해 생산한 항체 시료 SDA-0070_RD1601의 HEK 블루 유래 세포에서의 중화능을 평가하고 생산 세포주에 따른 효능 동등성을 비교 하였다.

[0215] HEK 블루 유래 세포주 중 IL-17 수용체 IL-17RA, IL-17RC를 발현하는 HEK-BlueTM IL-17 세포주(invivogen, 미국)와 TNF- α 수용체 TNFRI, TNFRII를 발현하는 HEK-BlueTM TNF- α 세포주(invivogen, 미국)를 사용하여, IL-

17A와 TNF- α 에 대한 중화능을 평가하였다. HEK 블루 세포주의 배양에는 10% 우태아혈청(Gibco, 미국)와 1% 항생제, Anti-anti (penicillin/streptomycin/anti-mycoplasma; Gibco, 미국)가 포함된 DMEM-HG(hyclone, 미국) 사용하였으며, 각 수용체와 SEAP 발현을 유지하는 선택 항생제로는 공통적으로 지오신 (zeocin; invivogen, 미국)이 사용되었으며, HEK-Blue™ IL-17 세포주에는 항생제 혼합 제품인 HEK-Blue™ Selection(invivogen, 미국, hb-sel)이 추가적으로 사용되었다. 실험에 사용된 모든 세포는 최소 3번 이상 계대 배양한 것을 사용하였으며 배양접시에서 세포 회수 시 accutase (Merck Millipore, 독일)를 사용하였다. IL-17A (R&D, 미국, 7955-IL-025/CF)는 최종 농도 0.6ng/ml, TNF- α (R&D, 미국, 210-TA-020/CF)는 최종 농도 0.4ng/ml이 되도록 각각 항원 희석물을 만들고, 각 항체 시료는 736pM에서 2배씩 희석하여 0.36pM까지 총 12개 농도로 최종 처리 되도록 희석하였다. 각 희석된 항체와 앞서 제작한 항원 희석물을 96웰 플레이트에 혼합하여 37°C에서 1시간 반응하였다. 항원-항체 반응이 완료된 플레이트에 accutase로 회수한 HEK-Blue IL-17 세포와 HEK-Blue TNF- α 세포를 접종 (seeding)하고 37°C, 5% CO₂ 환경에서 24시간 배양하였으며, 24시간 뒤 세포를 제외한 배양액을 회수하였다. 회수한 배양액에 QUANTI-Blue™ 배지 (Invivogen, 미국) 용액을 넣고 37°C에 배양하며, 발생하는 기질 반응 속도에 따라 20분에서 60분 내에 spectrophotometer (thermofisher scientific, 미국, Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer)에서 흡광도 622nm로 측정하였다.

[0216] 동일 클론의 HEK293 임시발현 시스템 생산 시료 SDA-0070_CEX와 CHO-S 세포주 생산 시료 SDA-0070_RD1601 간의 중화능 비교시험 결과, 세포 유래에 따른 두가지 단백질의 효능 차이는 발생하지 않았다 (도 11 및 표 11). 하기 표 11은 HEK 블루 유래 세포를 이용한 각 단백질의 효능을 비교한 것이다.

[0217] [표 11]

NAME	IL-17A IC50 (pM)	TNF- α IC50 (pM)
Humira		25.26
SDA-0070 CEX	4.456	19.83
SDA-0070 RD1601	4.542	23.26
secukinumab	208.3	

[0218]

[0220] **실시예 11: 인간 FcRn항원에 대한 항체의 친화도 평가**

[0221] Octet QK 분석 장비 (ForteBio Inc, 미국)를 사용하여 인간 또는 원숭이 FcRn (Sinobiological, 중국) 항원에 대한 항체들의 친화도를 측정하였다. Octet 분석 장비는 BLI (Bio-Layer Interferometry) 원리를 적용하여 바이오센서 표면에 결합된 단백질 층의 두께 변화를 측정함으로써 단백질과 기타 생물분자의 결합 상황을 실시간으로 모니터링 할 수 있다.

[0222] 니켈이 코팅되어 있는 Ni-NTA 바이오센서 (ForteBio Inc, 18-5101)를 사용하여 단백질의 C-말단에 히스티딘 잔기가 결합되어 있는 인간 또는 원숭이 FcRn-His항원을 고정시키고, 여기에 농도별로 준비한 항체 휴미라, SDA-0070을 결합시켜서 친화도를 구하였다.

[0223] 인간 FcRn에 대한 모든 항체의 친화도 조사 결과, SDA-0070은 pH6.0에서의 결합속도 (Kon) 1.6X10⁶ 1/Ms로 정상 IgG 구조인 휴미라와 유사한 결합속도를 보였으며, 해리속도 (Kdis)는 1X10⁻³ 1/s 미만으로 낮게 나타났다. KD는 근소한 해리속도 (Kdis) 차이가 반영되어, 휴미라는 6.4X10⁻¹⁰ M 수준이었고, SDA-0070은 5.0X10⁻¹⁰ M 수준이었다. pH7.4 환경에서 해리속도 (Kdis)는 SDA-0070이 휴미라와 유사한 수준인 5.83X10⁻³ 1/s 였다. 또한, 원숭이 FcRn에서도 인간 FcRn의 결과와 유사하게 분석되었다. 이중항체의 구조 차이에도 불구하고 정상 구조의 IgG와 유사한 수준의 FcRn 친화도를 나타내었다 (도 12 내지 도 13 및 표 12). 하기 표 12는 SDA-0070과 인간 FcRn, 원숭이 FcRn간의 Kinetic parameter를 나타낸 것이다.

[0224] [표 12]

Immobilize	Analyte	Disociation pH	Humira	SDA-0070
hFcRN-C-His	K_D (M)	pH 6.0	6.42×10^{-10}	5.06×10^{-10}
	K_{on} (1/Ms)		1.63×10^6	1.69×10^6
	K_{dis} (1/s)		1.05×10^{-3}	8.56×10^{-4}
hFcRN-C-His	K_D (M)	pH 7.4	6.32×10^{-9}	9.08×10^{-9}
	K_{on} (1/Ms)		8.61×10^5	6.41×10^5
	K_{dis} (1/s)		5.44×10^{-3}	5.83×10^{-3}
cynoFcRN-C-His	K_D (M)	pH 6.0	5.99×10^{-10}	4.61×10^{-10}
	K_{on} (1/Ms)		1.89×10^6	1.63×10^6
	K_{dis} (1/s)		1.13×10^{-3}	7.50×10^{-4}
cynoFcRN-C-His	K_D (M)	pH 7.4	4.24×10^{-9}	4.46×10^{-9}
	K_{on} (1/Ms)		1.06×10^6	9.43×10^5
	K_{dis} (1/s)		4.49×10^{-3}	4.20×10^{-3}

[0225]

[0227] **실시예 12: ADCC 주요 단백질에 대한 SDA-0070의 결합 평가**

[0228] SDA-0070의 항체의존세포매개세포독성 (antibody-dependent cell mediated cytotoxicity; ADCC)에 대한 결합력을 측정하기 위해 Indirect-ELISA를 실시하였다. ADCC는 타깃 세포의 표면에 결합한 항체의 Fc 영역을 NK세포가 인식하고 그 세포를 타깃으로 세포독성을 나타내게 된다. NK세포의 표면에 있는 CD16, CD64 등은 항체의 Fc와 결합하여 활성화 신호를 촉발하여 감염세포의 세포사멸을 유도하게 된다.

[0229] SDA-0070의 CD64와 CD16에 대한 결합을 평가하기 위하여, 양성 조건 항체로 IgG1 형태의 항체 (Sigma Aldrich, 미국) 1종과 휴미라 (Abbvie, 미국)를 사용하였다. 음성 조건 항체로 IgG4 (Sigma Aldrich, 미국) 항체 1종을 함께 사용하였다. 1 µg/ml의 재조합 인간 Fc 감마 RIIIA/CD16a 단백질 (R&D systems, 미국), 재조합 인간 Fc 감마 RI/CD64 단백질 (R&D systems, 미국)과 BSA (Sigma Aldrich, 미국)을 DPBS를 이용하여 100 µl씩 96 웰 플레이트 (NUNC, 96 well plat bottom)에 처리하여 12시간 이상 반응시켜 코팅하였다. 결합을 시험할 상기의 항체군을 1380 nM부터 4배 단계 희석하여 100 µl씩 처리하여 2시간 반응하였다. 2차 항체 Peroxidase-AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgG, F(ab')₂ Fragment Specific (Jackson Immune research, 미국)을 처리하고 1시간 반응하였다. TMB를 처리하여 발색을 확인하고, H₂SO₄를 처리하여 기질 반응을 멈춘 후 450 nm에서 분광광도계 (Thermo Scinentific, 미국)를 이용하여 감지하였다.

[0230] 항체군의 Fc 부분이 NK세포 유래의 CD64와 CD16a에 결합하는 정도를 측정한 결과, SDA-0070은 휴미라와, IgG1 대조군의 CD64에 대한 결합력과 같은 수준이었다 (도 14).

[0231] 또한, 항체군의 CD16a의 결합력에 대한 결과는 IgG1 control 항체의 경우가 가장 우수한 결합력을 보였고, 다음으로 SDA-0070과 휴미라 항체가 서로 비슷한 결합력을 나타내는 것을 확인하였다 (도 15). BSA 결합력에 있어서 SDA-0070을 포함한 대조군 항체 모두 반응이 없는 것을 확인하였다 (도 16).

[0233] **실시예 13: SDA-0070의 IL-17A와 TNF-α 동시 결합능 분석**

[0234] ELISA를 통해 SDA-0070의 TNF-α와 IL-17A의 동시 결합을 확인하였고, 추가적으로 OCTET을 이용하여 동시 결합에 대한 양상을 실시간으로 확인하고자 하였다.

[0235] Octet QK 분석 장비 (Fortebio Inc, 미국)를 사용하고 AHC 바이오센서 (Fortebio Inc, 미국)를 사용하여 항체의 Fc영역을 통해 결합할 수 있도록 하였다. SDA-0070은 10ug/ml의 농도로 1x Kinetics buffer (Fortebio Inc, 미국)에 희석되고 AHC 바이오 센서에 로딩하여 결합시켰다. 센서에 결합된 SDA-0070은 안정화 시간을 통해 미결합 상태를 확인하였다. 각 조건에 따라 TNF-α 20nM (Peprotech, 미국) 또는 Kinetics buffer만을 처리하여 TNF-α 결합을 실시간으로 비교하였고, 이후 각 조건에 따라 IL-17A 15nM (R&D systems, 미국) 또는 Kinetics buffer만을 처리하여 IL-17A 결합을 실시간 비교하였다.

[0236] 그 결과, ELISA와 동일하게 SDA-0070이 두 항원을 동시에 인지하고 결합하고 있음을 실시간 결과 자료를 통해 확인하였다 (도 17).

[0238] 실시예 14: 항 IL-17A와 항 TNF- α 항체 중화능 분석

[0239] TNF- α 또는 IL-17A에 의해 염증성 사이토카인인 hIL-6 발현이 유도되는 세포로 알려진 RA-FLS의 상용 세포 (Cell application, 미국)를 획득하고, 인간 윤활막세포 (Synoviocyte) 배지 (Cell application, 미국)를 사용하여 세포를 2×10^4 세포씩 96-웰 세포배양 플레이트에 접종(seeding)하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양하였다. 본 실시예에서는 TNF- α 단일표적 항체인 휴미라 (Abbvie, 미국), IL-17A 단일표적 항체인 세쿠키누맙 (secukinumab; Novartis, 스위스), TNF- α 와 IL-17A 이중항체인 LY3114062 (Eli Lilly, WO2014137961, 미국)와 함께 SDA-0070을 평가하였다. 1.87ng/ml의 hTNF- α (R&D system, 미국), 18.7ng/ml의 hIL-17A (R&D system, 미국)에 항 IL-17A인 세쿠키누맙 항체를 17664 pM부터 4배씩 단계 희석하여 혼합하고, SDA-0070, LY3114062 또는 항 TNF- α 항체인 휴미라는 4416 pM 부터 단계 희석하여 혼합한 뒤 1시간 동안 함께 37°C에서 1시간 반응하였다.

[0240] 혼합물을 Human Synoviocyte media에 배양된 RA-FLS세포에 처리하여 24시간 동안 함께 배양하였다. 그 후 배양액만 취해 hIL-6 측정용 ELISA kit (R&D system, 미국)에 처리하고, hIL-6 발현량의 정도를 분광광도계 (Multiskan GO, Thermo Scientific, 미국)를 이용하여 hIL-6을 정량하였다.

[0241] 그 결과, SDA-0070 이중항체에 대한 중화능이 단일 항 IL-17 항체 또는 단일 항 TNF- α 항체 처리군의 IL-6 분비 수준보다도 우수하게 저해를 시킬 수 있는 것으로 확인되었다 (도 18 내지 도 20 및 표 13 내지 표 15).

[0242] [표 13]

[0243] 상용 RA-FLS 세포에서 SDA-0070의 IL-17A, TNF- α 에 대한 동시 중화능 평가에 대한 IC50 값

	Humira	SDA-0070	LY3114062	secukinumab
IC50 (pM)	44.10	13.72	14.85	1614

[0244]

[0245] [표 14]

[0246] 상용 RA-FLS 세포에서 SDA-0070의 IL-17A에 대한 중화능 평가에 대한 IC50 값

	Humira	SDA-0070	LY3114062	secukinumab
IC50 (pM)	-	312.4	371.5	519.1

[0247]

[0248] [표 15]

[0249] 상용 RA-FLS 세포에서 SDA-0070의 TNF- α 에 대한 중화능 평가에 대한 IC50 값

	Humira	SDA-0070	LY3114062	secukinumab
IC50 (pM)	31.75	30.65	18.57	-

[0250]

[0252] 실시예 15: 환자 유래 RA-FLS를 이용한 SDA-0070의 IL-17A와 TNF- α 중화능 평가

[0253] 본 실시예에서는 상용 RA-FLS 세포가 아닌 류마티스 관절염 환자의 섬유모세포 유사 윤활막세포 (rheumatoid arthritis-fibroblast like synoviocyte; RA-FLS)를 분리 및 배양하여 SDA-0070의 활성을 평가하였다. 활막조직 조각을 잘게 자른 후 Dulbecco's modified Eagle's medium (WelGENE Inc. 한국)에서 1 mg/ml 의 2형 콜라겐 분해 효소 (Worthington Biochemical Corporation)를 첨가하여 반응하였다. DMEM (supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% P/S)에서 재부유 시킨 후, 세포 여과기 (40 μ m cell strainer)로 거르고 100 mm 배양접시에 부착시켰다. 부착된 세포만을 거둬 배양하여 사용하였다.

[0254] 분리 배양된 환자유래 RA-FLS (RA03) 세포를 24웰 플레이트에 5×10^4 세포/ml로 접종하여 37°C에서 배양 후 각 세포에 휴미라, SDA-0070, LY3114062를 각각 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} pM 씩 처리하고 1시간 후 TNF- α 10 ng/ml (R&D systems, 미국)와 IL-17A 50 ng/ml (R&D systems, 미국)를 동시 처리하여 48시간째에 세포 배양액을 회수하였다. 회수한 배양액은 3500 rpm, 5분간 원심 분리하여, 상층액을 얻고 초저온 냉동고에 보관하여 ELISA 실험용으로 이용하였다. 세포 배양액 내의 IL-6 농도를 측정하기 위해 Human IL-6 ELISA (R&D systems, 미국)를 이용하여 분석하였다.

[0255] RA-FLS (RA03)에서 TNF- α + IL-17A 유도 IL-6 생산 조건에서 항체 처리군들의 IC50 값(pM 단위)을 확인하였다. 그 결과, IC50값이 낮은 순서대로 보면 SDA-0070: 0.3694 pM, LY3114062: 1.420 pM, 휴미라: 1.966 pM로 분석되었다. SDA-0070이 이중항체로서 TNF- α /IL-17A를 동시에 저해하는 효능이 가장 우수했으며, 다음으로 LY3114062에 비해서는 약 3.8배 우수한 IC50 값을 보유하고, TNF- α 의 단일표적 항체인 휴미라에 비해서는 약 5배 우수함을 확인하였다 (도 21).

[0257] 실시예 16: C57BL/6 마우스에서의 IL-17A, TNF- α 기능 억제능 측정

[0258] In vivo에서 이중항체 투여에 따른 IL-17A/TNF- α 자극에 의한 혈청 내 KC 농도 변화를 확인하였다.

[0259] C57/BL6 수컷, 6주령 마우스에 PBS, SDA-0070 (40 μ g/마우스), LY3114062 (40 μ g /마우스), 세쿠키누맙 (30 μ g /마우스) 그리고 휴미라 (30 μ g /마우스)를 그룹당 5마리씩 주사하였다. 1시간 후 TNF- α (R&D systems, 미국) 0.5 μ g/마우스 및 IL-17A (R&D system, 미국) 6 μ g/마우스를 피하주사하고, 4 시간 후 혈액을 얻었다. 채혈된 혈액은 5000 rpm, 10 분간 원심 분리하여 혈청을 얻어 초저온 냉동고에 보관하였고, Quantikine ELISA Mouse CXCL1/KC Immunoassay kit (R&D systems, 미국)를 이용하여 KC (CXCL1) 농도를 측정하였다.

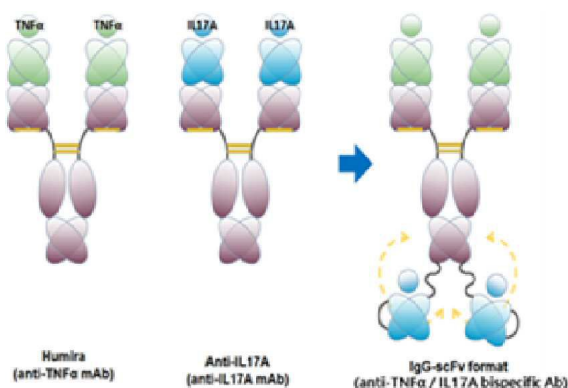
[0260] 항 마우스 KC항체가 코팅되어 있는 마이크로플레이트에 분석용 희석액에 희석된 마우스 혈청을 처리하고, 2 시간 동안 상온에서 반응하였다. 세척 버퍼로 5 회 씻어낸 후 마우스 KC Conjugate를 100 μ l씩 처리한 후 2시간 동안 상온에서 반응하였다. 세척 버퍼로 5 회 다시 씻은 후 기질 용액을 100 μ l씩 첨가하여 30분 동안 반응하고 정지 용액으로 정지시켜 Spectrophotometer 450 nm에서 O.D를 측정하였다.

[0261] 그 결과, 항체를 처리한 군들은 모두 양성 대조군 (TNF- α + IL-17A combination only)에 비해 모두 통계적으로 유의하게 낮은 KC level을 나타내었고, 그 중에 SDA-0070 처리군이 가장 낮은 KC level을 가짐을 확인하였다. SDA-0070 처리군은 휴미라 처리군보다 p=0.0012로 통계적으로 유의하게 효능이 우수하였고, SDA-0070 처리군은 LY3114062 처리군보다 p=0.0138로 통계적으로 유의하게 효능이 우수하였다. 즉, in vivo에서 이중항체 투여에 따른 IL-17A/TNF- α 자극에 의한 혈청 내 KC 농도변화를 확인한 결과, SDA-0070 투여에 따른 IL-17A/TNF- α 두 항원에 대한 KC 중화능이 우수함을 확인하였다 (도 22).

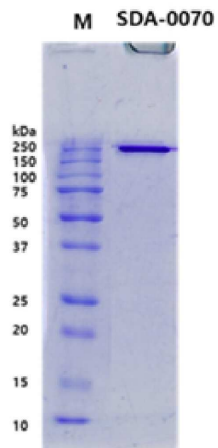
[0263] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

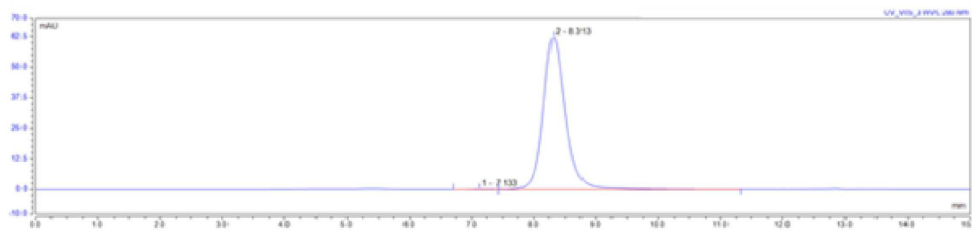
도면1



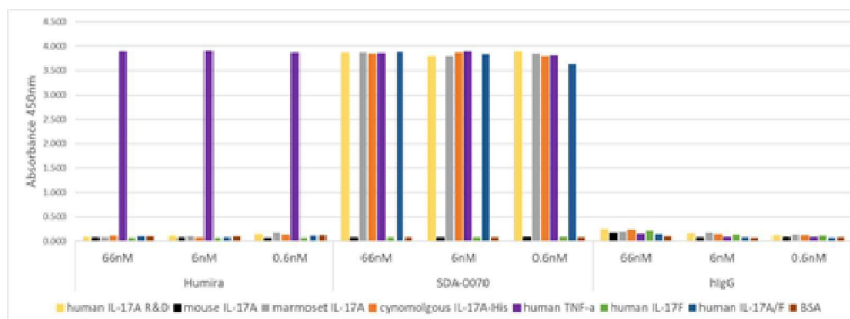
도면2



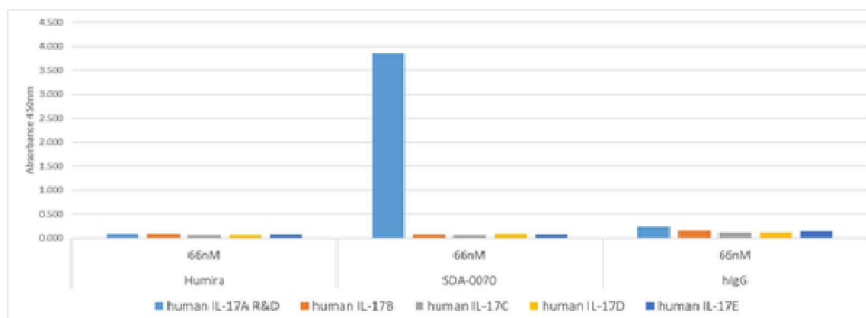
도면3



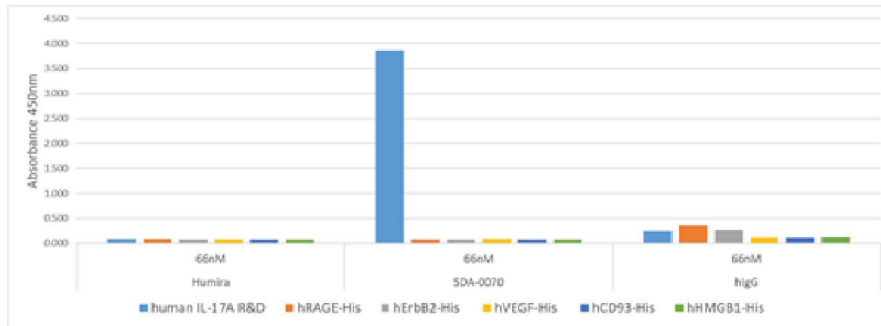
도면4a



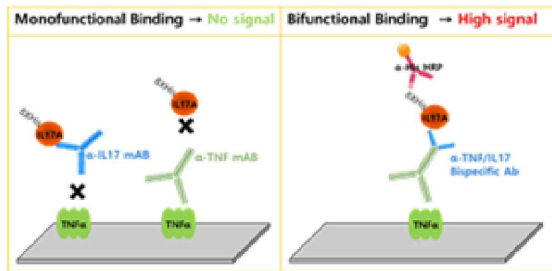
도면4b



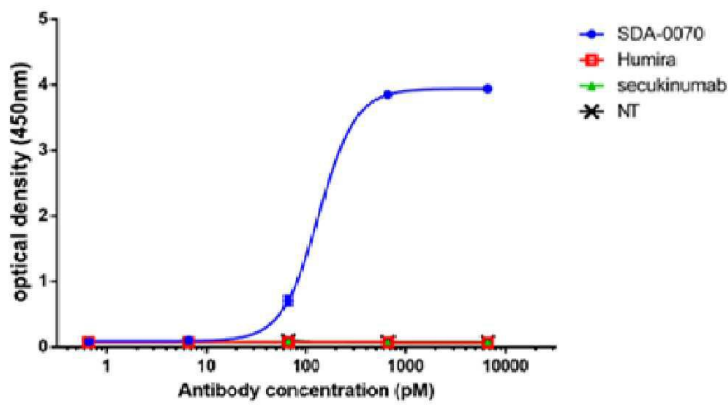
도면4c



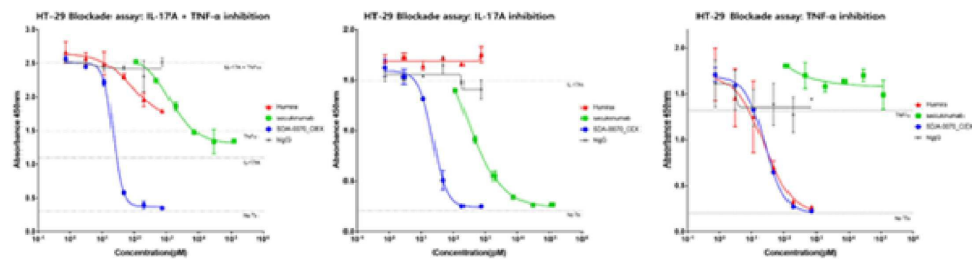
도면5



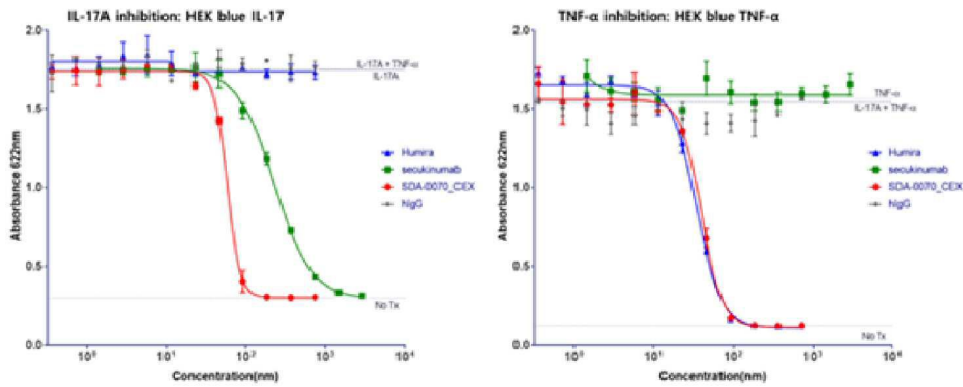
도면6



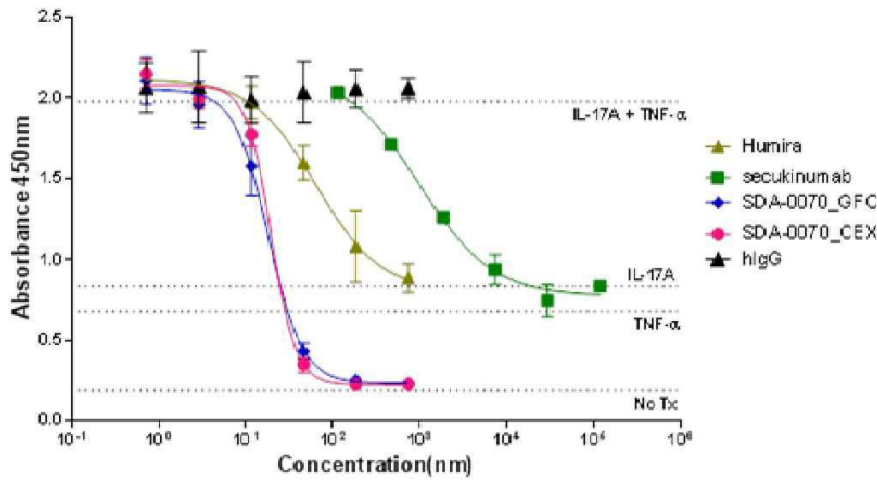
도면7



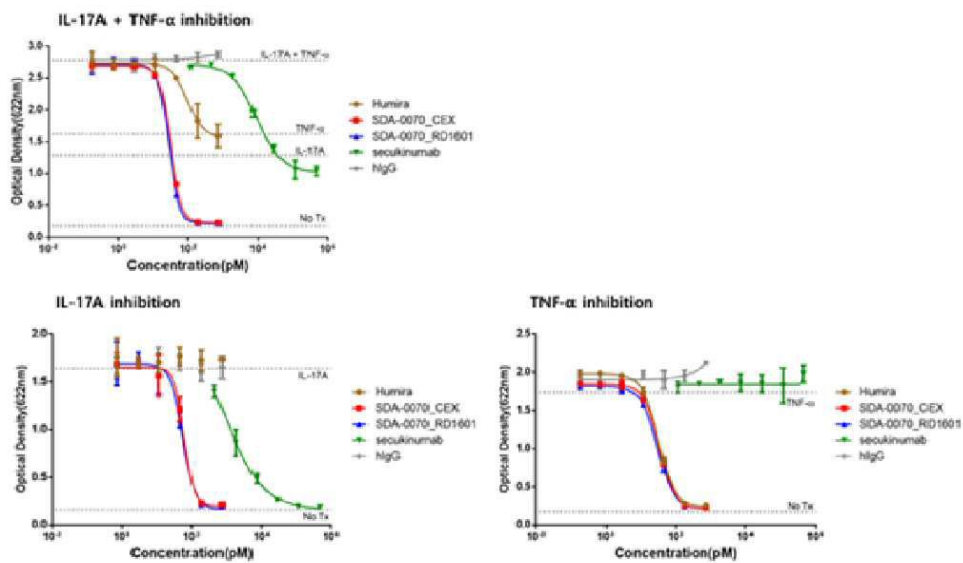
도면8



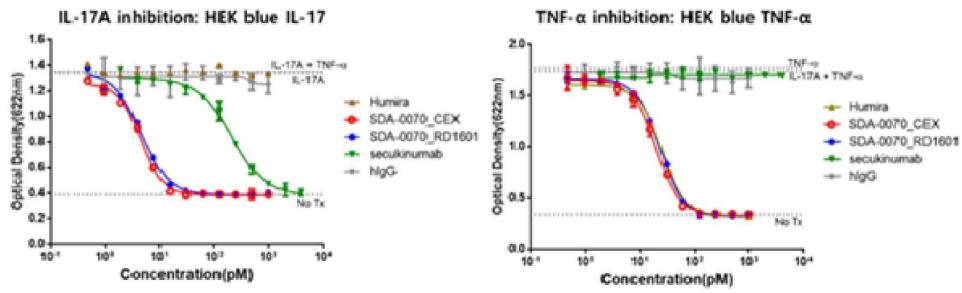
도면9



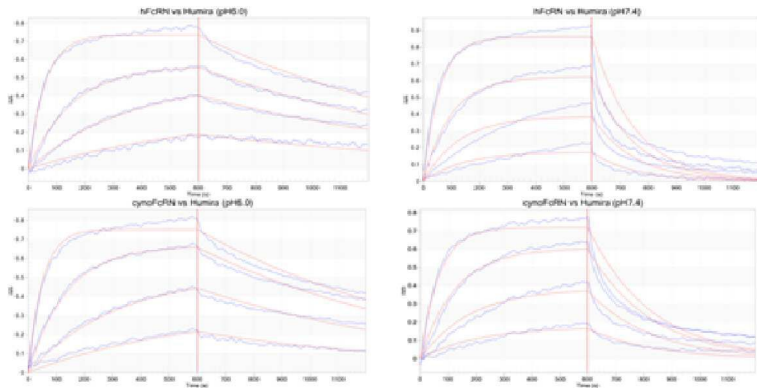
도면10



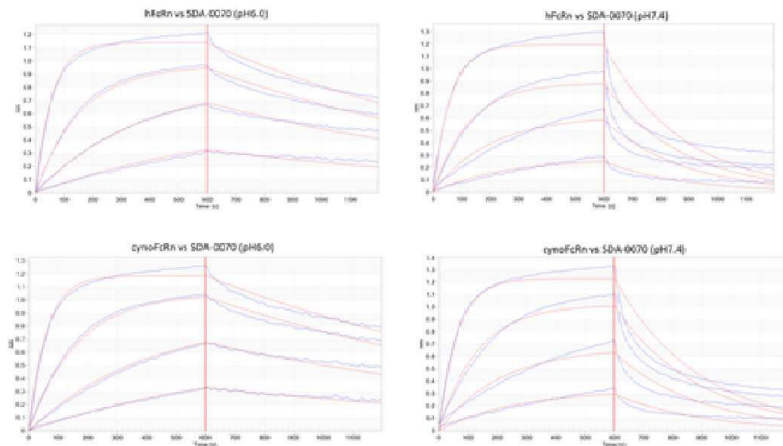
도면11



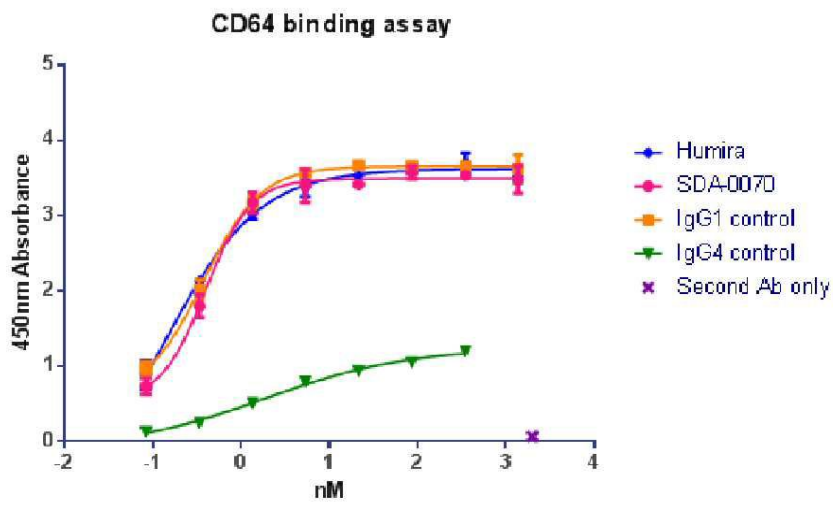
도면12



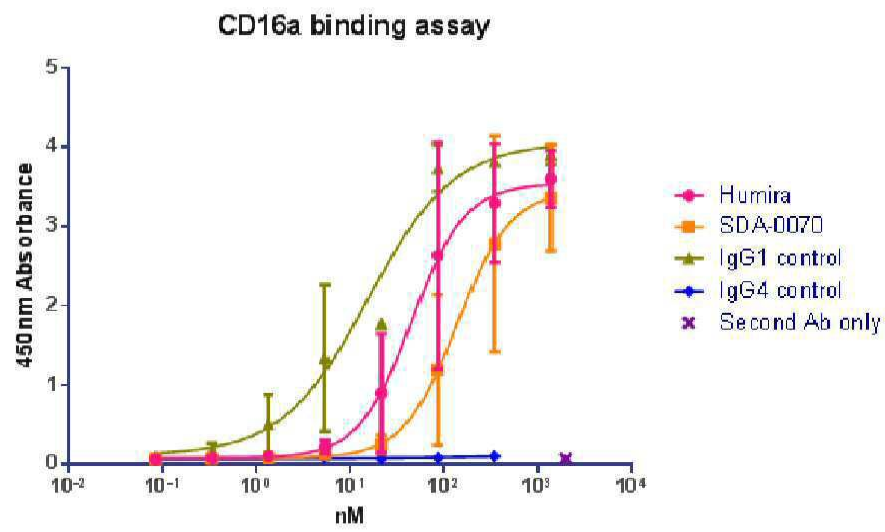
도면13



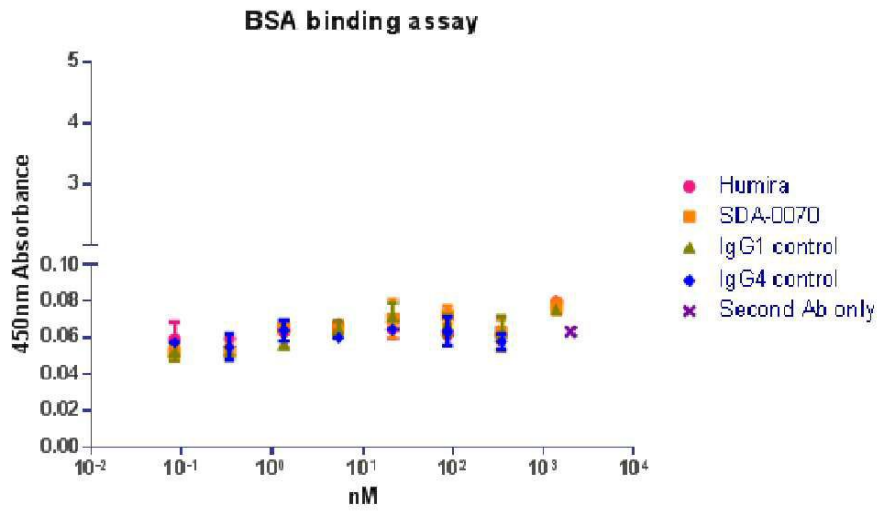
도면14



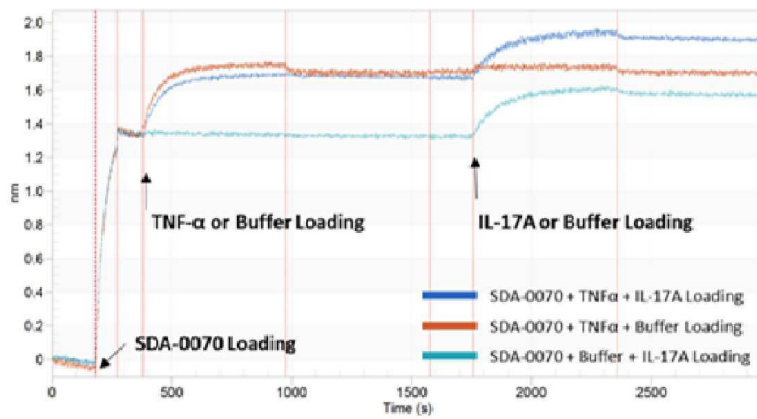
도면15



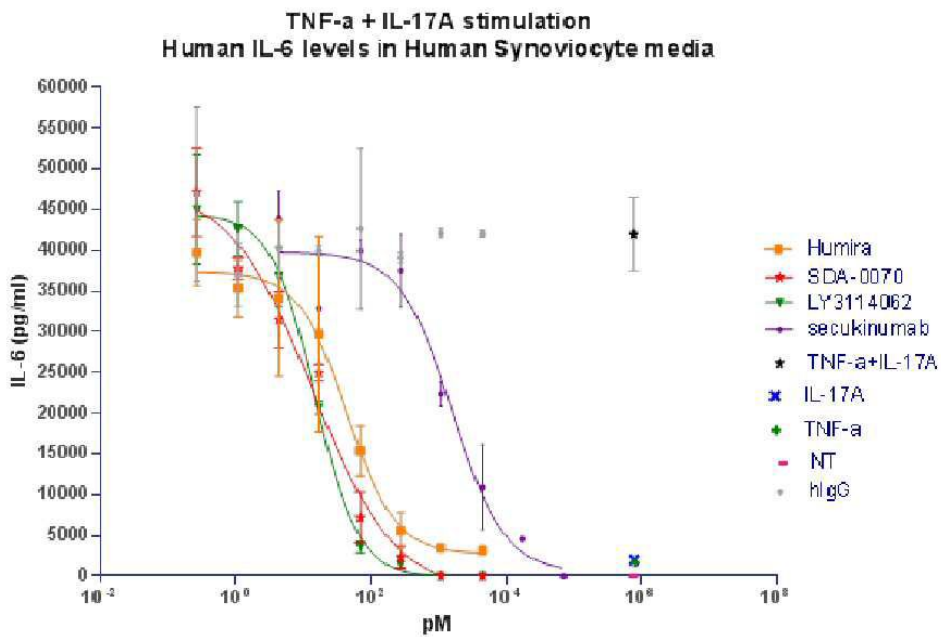
도면16



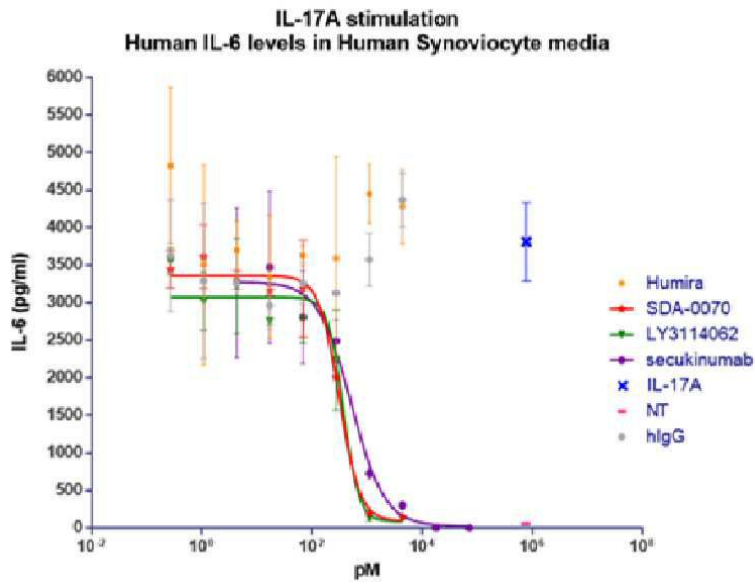
도면17



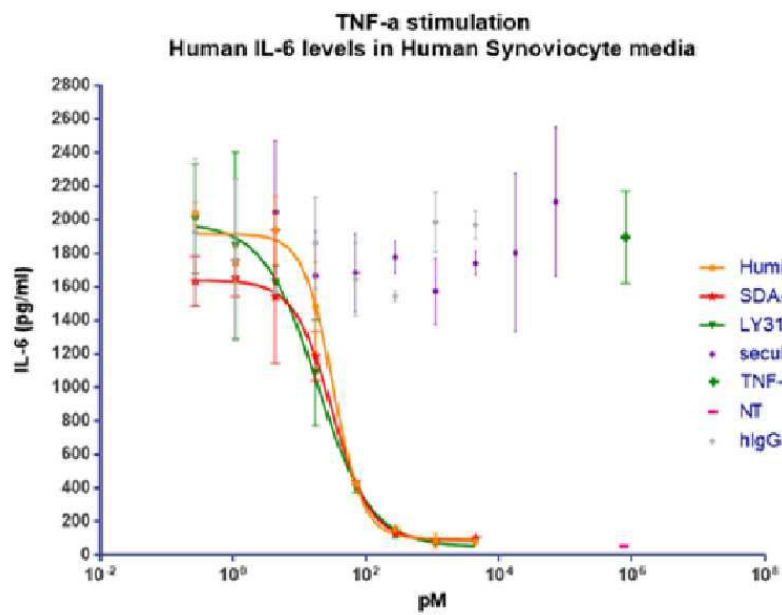
도면18



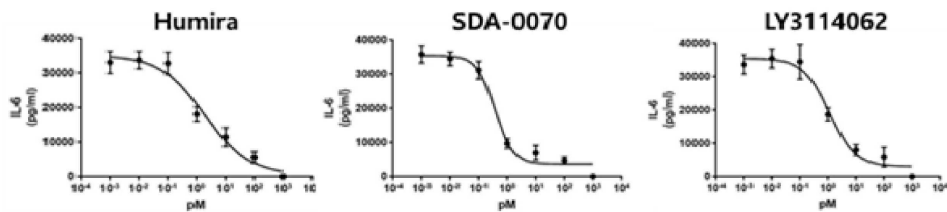
도면19



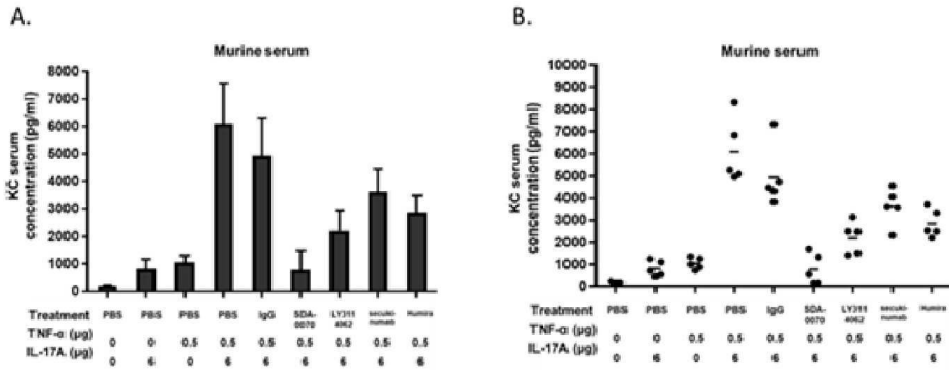
도면20



도면21



도면22



서열목록

- <110> Y-Biologics Inc.
- <120> Bispecific Antibody Against IL-17A and TNF- α
- <130> P18-B307
- <160> 92
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> H-CDR1
- <400> 1
- Ser Tyr Thr Met His
- 1 5
- <210> 2
- <211> 16
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> H-CDR2
- <400> 2
- Ile Ser Phe Asp Gly Arg Ser Lys Leu Tyr Gly Asp Ser Val Arg Asp
- 1 5 10 15
- <210> 3
- <211> 11
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR3

<400> 3

Arg Gly Arg Glu Gly Glu Asp Ala Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR2

<400> 4

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

1 5 10 15

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> H-CDR3

<400> 5

Gly Ser Val Arg Gly Glu Ala Ala Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR3

<400> 6

Gly Ser Lys Leu Gly Glu Asp Ala Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR3

<400> 7
 Gly Ser Arg Ile Gly Glu Asp Ala Phe Asp Leu
 1 5 10

<210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> H-CDR1

<400> 8
 Asp His Ala Met His
 1 5

<210> 9
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> H-CDR2

<400> 9
 Ser Leu Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Gly

<210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> H-CDR3

<400> 10
 His Phe Ser Asp Ser Arg Gly Arg Ser Asp Val Pro Phe Asp Ile
 1 5 10 15

<210> 11
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR2

<400> 11

Gly Leu Ile Gly Pro Asp Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-CDR1

<400> 12

Ser Gly Asp Asn Leu Arg Thr Lys Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-CDR2

<400> 13

Gln Asp Thr Arg Arg Pro Ser

1 5

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-CDR3

<400> 14

Met Thr Trp Asp Val Asp Thr Thr Ser Met

1 5 10

<210> 15

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 15

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Gly

20 25 30

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 16

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Thr Leu

1 5 10 15

<210> 17

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 17

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Met Leu Tyr Leu Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR4

<400> 18

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 19
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FR1
 <400> 19
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Gly
 20 25 30

<210> 20
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FR3

<400> 20
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FR4

<400> 21
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 22
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FR1

<400> 22

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp

20 25 30

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 23

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

1 5 10

<210> 24

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 24

Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR4

<400> 25

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Ile Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 26

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val

1 5 10

<210> 27

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 27

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

1 5 10 15

Thr Ala Asn Ile Ile Cys

20

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 28

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Leu Leu Val Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 29

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 29

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Arg Asp Glu Ser Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 30
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FR4
 <400> 30
 Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

1 5 10
 <210> 31
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FR1
 <400> 31
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys
 20

<210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FR2
 <400> 32
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 33
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FR3
 <400> 33
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr

1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 <210> 34
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH
 <400> 34
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Ala Gln Pro Gly Arg

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

 Leu Lys Ile Ser Asp Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Arg Glu Gly Glu Asp Ala Phe Asp Leu Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 35
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH
 <400> 35
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Gly Ser Tyr			
	20	25	30
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Thr Leu Ile Ser Phe Asp Gly Arg Ser Lys Leu Tyr Gly Asp Ser Val			
	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr			
	65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Gly Ser Val Arg Gly Glu Ala Ala Phe Asp Leu Trp Gly Gln			
	100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	
<210> 36			
<211> 120			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> VH			
<400> 36			
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Gly Ser Tyr			
	20	25	30
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Thr Leu Ile Ser Phe Asp Gly Arg Ser Lys Leu Tyr Gly Asp Ser Val			
	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr			
	65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			

85 90 95

Ala Arg Gly Ser Lys Leu Gly Glu Asp Ala Phe Asp Leu Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 37

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 37

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Gly Ser Tyr

20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Ser Arg Ile Gly Glu Asp Ala Phe Asp Leu Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 38

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 38

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

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Ile Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 39

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 39

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

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

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Ile Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 40
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL

<400> 40
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Ala Pro Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Asn Ile Ile Cys Ser Gly Asp Asn Leu Arg Thr Lys Tyr Val
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Leu Leu Val Ile Tyr

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

<210> 41
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL

<400> 41
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Leu Arg Thr Lys Tyr Val
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gln Asp Thr Arg Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Thr Trp Asp Val Asp Thr Thr Ser
 85 90 95
 Met Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 42
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH
 <400> 42

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggcccagc ctgggaggtc cctcagactc 60
 tcctgtgcag ccctctggatt cgccttcggt agttacacta tgcactgggt cgccaggcgc 120
 ccaggcaagg gactggagtg ggtgacactt atatcgtttg atggacgtag caagctttac 180
 ggagactccg tgagggaccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa catgctgtat 240
 ctgaaaataa gtgacctgcg atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagacggggg 300
 agggagggtg aagatgcttt cgatctctgg ggccaaggga caatggtcac cgtctcctca 360

<210> 43
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> VH
 <400> 43
 caggtgcagc tggatggagtc tgggggaggc gtggtgcagc ctgggaggtc cctcagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cgccttcggt agttacacta tgcactgggt cgccaggcg 120
 ccaggcaagg gactggagtg ggtgacactt atatcgtttg atggacgtag caagctttac 180
 ggagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgcg agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtct 300
 gtgcggggtg aagctgcttt cgatctctgg ggccaaggga cactggtcac cgtctcctca 360
 360

<210> 44
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> VH
 <400> 44
 caggtgcagc tggatggagtc tgggggaggc gtggtgcagc ctgggaggtc cctcagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cgccttcggt agttacacta tgcactgggt cgccaggcg 120
 ccaggcaagg gactggagtg ggtgacactt atatcgtttg atggacgtag caagctttac 180
 ggagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgcg agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtct 300
 aagttgggtg aagatgcttt cgatctctgg ggccaaggga cactggtcac cgtctcctca 360
 360

<210> 45
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> VH
 <400> 45
 caggtgcagc tggatggagtc tgggggaggc gtggtgcagc ctgggaggtc cctcagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cgccttcggt agttacacta tgcactgggt cgccaggcg 120
 ccaggcaagg gactggagtg ggtgacactt atatcgtttg atggacgtag caagctttac 180
 ggagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcctgtat 240

ctgcagatga acagcctgcg agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaggttcg 300
 cgtattgggtg aagatgcttt cgatctctgg ggccaaggga cactggtcac cgtctcctca 360
 360

<210> 46
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH

<400> 46
 caggtgcagc tggtagagtc tgggggaggc gtggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt cacctttgat gatcatgcca tgcactgggt cgtcaagct 120
 ccaggaagg gtctggagtg ggtctctctt attagcgggt atggtgggtgc cacatactat 180

gcagactctg tgaagggccg gttcatcatc tccagagaca acagcaaaaa ctccctgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagacatfff 300
 tctgatagtc gtggtcgtct cgatgttctt ttgatatact ggggccaagg gacactgatc 360
 accgtctcct ca 372

<210> 47
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH

<400> 47
 caggtgcagc tggtagagtc tgggggaggc gtggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt cacctttgat gatcatgcca tgcactgggt cgtcaagct 120

ccaggaatg gtctggagtg ggtcggcctg attggtcctg atggtgggtgc cacatactat 180
 gcagactctg tgaagggccg gttcatcatc tccagagaca acagcaaaaa ctccctgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagacatfff 300
 tctgatagtc gtggtcgtct cgatgttctt ttgatatact ggggccaagg gacactgatc 360
 accgtctcct ca 372

<210> 48
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> VL
 <400> 48
 tcctatgagc tgacacaggc accctcactg tccgtgtcgc caggacagac agccaacatc 60

 atctgctctg gagataactt gcgtactaaa tatgtttctt ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcccctt tattggatcat ctatcaggac accagggcgc cctcaggcat ccctgcgcga 180
 ttctcaggct ccaactcggg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccagactaga 240
 gatgaatcta cctattactg tatgacgtgg gacgtcgaca ctacctgat gattttcggc 300
 ggagggacca agctgaccgt ccta 324

 <210> 49
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL
 <400> 49
 tcctatgagc tgacacagcc cccctcagtg tccgtgtcgc caggacagac agccagcatc 60

 acctgctctg gagataactt gcgtactaaa tatgtttctt ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcccctg tgttggatcat ctatcaggac accagggcgc cctcaggcat ccctgagcga 180
 ttctcaggct ccaactcggg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
 gatgaagctg actattactg tatgacgtgg gacgtcgaca ctacctgat gattttcggc 300
 ggagggacca agctgaccgt ccta 324

 <210> 50
 <211> 396
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hIL-17A
 <400> 50
 ggaatcaaa tcccacgaaa tccaggatgc ccaaatctg aggacaagaa ctcccccg 60

 actgtgatgg tcaacctgaa catccataac cggaatacca ataccaatcc caaaaggtec 120
 tcagattact acaaccgatc cacctcacct tggaatctcc accgcaatga ggaccctgag 180
 agatatccct ctgtgatctg ggaggcaaag tgcgccact tgggctgcat caacgtgat 240
 gggaactgg actaccacat gaactctgtc cccatccagc aagagatcct ggtcctgcgc 300
 agggagcctc cacactgccc caactcctc cggtggaga agatactggt gtccgtgggc 360

tgcacctgtg tcaccccgat tgtccacat gtggcc 396
 <210> 51
 <211> 420
 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-17A-His
 <400> 51
 ggaatcacia tcccacgaaa tccaggatgc ccaaattctg aggacaagaa cttcccccg 60
 actgtgatgg tcaacctgaa catccataac cggaatacca ataccaatcc caaaaggtec 120
 tcagattact acaaccgatc cacctcacct tggaatctcc accgcaatga ggaccctgag 180
 agatatccct ctgtgatctg ggaggcaaag tgcgccact tgggctgcat caacgctgat 240
 gggaacgtgg actaccacat gaactctgtc cccatccagc aagagatcct ggtcctgcgc 300
 agggagcctc cacactgccc caactccttc cggctggaga agatactggt gtccgtgggc 360

 tgcacctgtg tcaccccgat tgtccacat gtggcccatc atcatcatca tcaccatcac 420
 420
 <210> 52
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 52
 ggaatcacia tcccacgaaa t 21
 <210> 53
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 53
 ggccacatgg tggacaatcg g 21

 <210> 54
 <211> 5
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR1

<400> 54

Asp Tyr Ala Met His

1 5

<210> 55

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR2

<400> 55

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

1 5 10 15

Gly

<210> 56

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR3

<400> 56

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 57

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-CDR1

<400> 57

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-CDR2

<400> 58

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-CDR3

<400> 59

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr

1 5

<210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR1

<400> 60

Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr Ala

1 5

<210> 61

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR2

<400> 61

Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys

1 5

<210> 62

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR3
 <400> 62
 Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 1 5 10 15
 Met Asp Val

<210> 63
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> L-CDR1
 <400> 63
 Ser Gln Ser Val Tyr Ser Tyr
 1 5

<210> 64
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 ><223> L-CDR2

<400> 64
 Asp Ala Ser
 1
 <210> 65
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> L-CDR3
 <400> 65
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Phe Thr
 1 5 10

<210> 66
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR1
 <400> 66
 Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr Gly
 1 5
 <210> 67
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 223> H-CDR2
 <400> 67
 Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile
 1 5
 <210> 68
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> H-CDR3
 <400> 68
 Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 69
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> L-CDR1
 <400> 69
 Gln Asn Val Gly Thr Asn
 1 5
 <210> 70
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> L-CDR2

<400> 70

Ser Ala Ser

1

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-CDR3

<400> 71

Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu Thr

1

5

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR1

<400> 72

Gly Phe Ile Phe Ser Asn His Trp

1

5

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR2

<400> 73

Ile Arg Ser Lys Ser Ile Asn Ser Ala Thr

1

5

10

<210> 74

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR3

<400> 74

Ser Arg Asn Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Asp Tyr

1 5 10

<210> 75

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-CDR1

<400> 75

Gln Phe Val Gly Ser Ser

1 5

<210> 76

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-CDR2

<400> 76

Tyr Ala Ser

1

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-CDR3

<400> 77

Gln Gln Ser His Ser Trp Pro Phe Thr

1 5

<210> 78

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 78

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 79
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL
 <400> 79

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 80
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH
 <400> 80
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 81
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL
 <400> 81
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Tyr Ser Tyr

20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro

85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105

<210> 82

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 82

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

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

50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser

115
 <210> 83
 <211> 107
 <212> PRT

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL
 <400> 83
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

<210> 84
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH
 <400> 84
 Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

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

35 40 45
Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ser Ile Asn Ser Ala Thr His Tyr Ala Glu

50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ala
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Thr Asp Leu Arg Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ser Arg Asn Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
115

<210> 85

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL

<400> 85

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Val Gly Ser Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Met Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Thr Val Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Ser Trp Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Asn Leu Glu Val Lys
100 105

<210> 86

<211> 1347

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 86

```

gaagtgcagc tggatggagag cggcggcggc ctggtgcagc cggcgggag cctgcggctg      60
agctgcgccg ccagcggctt caccttcgac gactacgcca tgcactgggt gcggcaggcc      120
cccggcaagg gcctggagtg ggtgagcgcc atcacctgga acagcggcca catcgactac      180
gccgacagcg tggagggccg gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac      240

ctgcagatga acagcctcgc ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caaggtgagc      300
tacctgagca ccgccagcag cctggactac tggggccagg gcaccctggt caccgtctct      360
agcgctagca ccaagggccc atcggctctc ccctggcac cctcctcaa gagcacctct      420
gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg      480
tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc      540
tcaggactct atccctcag cagcgtggig accgtgcctt ccagcagcct gggcacccag      600
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag      660

cccaaatctt gtgacaaaaa tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg      720
ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc      780
cctgaggtea catgcgtggt ggtggactg agccacgaag acctgaggt caagttcaac      840
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac      900
aacagcagct accgtgtggt cagcgtctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc      960
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gcctcccag ccccatcga gaaaaccatc     1020
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat     1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgctgtgca aaggcttcta tcccagcgac     1140
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc     1200
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg     1260
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgatg aggctctgca caaccactac     1320
acgcagaaga gcctctcctt gtctccg                                     1347

```

<210> 87

<211> 744

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> scFv
 <400> 87
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtgcagc ctgggaggtc cctcagactc 60

 tcctgtgcag ccctctggatt cgccttcggt agttacacta tgcaactgggt cgcaccagcgc 120
 ccaggcaagt gcctggagtg ggtgacactt atatcgtttg atggacgtag caagctttac 180
 ggagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgcg agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtct 300
 gtgcgggggtg aagctgcttt cgatctctgg ggccaagga cactggtcac cgtctcctca 360
 ggccggcggtg gatccggcgg aggaggctcc ggagggtggc gaagcgggtg cggaggatct 420
 tcctatgagc tgacacagcc ccctcagtg tccgtgtcgc caggacagac agccagcatc 480

 acctgctctg gagataactt gcgtactaaa tatgtttctt ggtatcagca gaagccaggc 540
 cagtccctg tgttggatc ctatcaggac accaggcggc cctcagcat cctgagcga 600
 ttctcaggct ccaactcggg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 660
 gatgaagctg actattactg tatgacgtgg gacgttgaca ctacctgat gattttcggc 720
 tgcgggacca agctgaccgt ccta 744
 <210> 88
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linker
 <400> 88
 ggaggcggag gttctggcgg cggcggctcc ggtggaggtg gctca 45

 <210> 89
 <211> 642
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL
 <400> 89
 gacatccaga tgaccagtc tcccagcagc ctgagcgcga gcgtgggcga ccgggtgacc 60
 atcacctgcc gggccagcca gggcatccgg aactacctgg cctggtacca gcagaagccc 120
 ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgc gccagcacc tgcagagcgg cgtgccagc 180
 cggttcagc gcagcggcag cggcaccgac ttaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacgtgg ccacctacta ctgccagcgg tacaaccggg cccctacac cttcggccag 300
 ggcaccaagg tggaatcaa aagaaccgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 90
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH

<400> 90
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

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

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

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

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

385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

 435 440 445
 Pro

 <210> 91
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL
 <400> 91
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 92

<211> 712

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SDA-0070

<400> 92

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

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

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

 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 450 455 460

 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 465 470 475 480
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Gly Ser Tyr
 485 490 495
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
 500 505 510
 Thr Leu Ile Ser Phe Asp Gly Arg Ser Lys Leu Tyr Gly Asp Ser Val
 515 520 525
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr

 530 535 540
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 545 550 555 560
 Ala Arg Gly Ser Val Arg Gly Glu Ala Ala Phe Asp Leu Trp Gly Gln
 565 570 575
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 580 585 590
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Glu Leu
 595 600 605

 Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala Ser Ile
 610 615 620

Thr Cys Ser Gly Asp Asn Leu Arg Thr Lys Tyr Val Ser Trp Tyr Gln
 625 630 635 640
 Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Gln Asp Thr Arg
 645 650 655
 Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn
 660 665 670
 Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp
 675 680 685
 Tyr Tyr Cys Met Thr Trp Asp Val Asp Thr Thr Ser Met Ile Phe Gly
 690 695 700
 Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 705 710

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1

【변경전】

IL-17A (interleukin-17A)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 TNF- α (tumor necrosis factor- α)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체로,

상기 IL-17A에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은

(i) 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 2의 중쇄 CDR2 및 서열번호 3의 중쇄 CDR3;

서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 4의 중쇄 CDR2 및 서열번호 5의 중쇄 CDR3;

서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 4의 중쇄 CDR2 및 서열번호 6의 중쇄 CDR3;

서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 4의 중쇄 CDR2 및 서열번호 7의 중쇄 CDR3;

서열번호 8의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2 및 서열번호 10의 중쇄 CDR3; 및

서열번호 8의 중쇄 CDR1, 서열번호 11의 중쇄 CDR2 및 서열번호 10의 중쇄 CDR3로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나를 포함하는 중쇄 가변영역,

(ii) 서열번호 12의 경쇄 CDR1, 서열번호 13의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 14의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체.

【변경후】

IL-17A (interleukin-17A)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 TNF- α (tumor necrosis factor- α)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체로,

상기 IL-17A에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은

(i) 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 2의 중쇄 CDR2 및 서열번호 3의 중쇄 CDR3;

서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 4의 중쇄 CDR2 및 서열번호 5의 중쇄 CDR3;

서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 4의 중쇄 CDR2 및 서열번호 6의 중쇄 CDR3;

서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 4의 중쇄 CDR2 및 서열번호 7의 중쇄 CDR3;

서열번호 8의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2 및 서열번호 10의 중쇄 CDR3; 및

서열번호 8의 중쇄 CDR1, 서열번호 11의 중쇄 CDR2 및 서열번호 10의 중쇄 CDR3로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나를 포함하는 중쇄 가변영역, 및

(ii) 서열번호 12의 경쇄 CDR1, 서열번호 13의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 14의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 IL-17A 및 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 이중표적 항체.