



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0089514
 (43) 공개일자 2018년08월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/24 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
 (52) CPC특허분류
C07K 16/241 (2013.01)
C07K 16/244 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2018-7020510
 (22) 출원일자(국제) 2016년12월14일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2018년07월17일
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2016/080979
 (87) 국제공개번호 WO 2017/102830
 국제공개일자 2017년06월22일
 (30) 우선권주장
 1522391.0 2015년12월18일 영국(GB)

(71) 출원인
유씨비 바이오파마 에스피알엘
 벨기에 브뤼셀 1070 알레 더 라 리쉴르쉐 60
 (72) 발명자
아담스 랄프
 영국 에스엘1 3더블유이 버크셔주 슬라우 바스 로드 208 유씨비 셀텍 아이피디 내
바타 팔라비
 영국 에스엘1 3더블유이 버크셔주 슬라우 바스 로드 208 유씨비 셀텍 아이피디 내
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 65 항

(54) 발명의 명칭 **TNF-알파, IL-17A 및 IL-17F에 대해 특이성을 갖는 다중특이적 항체 분자**

(57) 요약

본 발명은 TNF 알파, IL-17A 및 IL-17F에 대해 특이성을 갖는 다중특이적 항체 분자, 그 항체 분자의 치료 용도, 및 상기 항체 분자의 제조 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/60 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/624 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

데이브 엠마

영국 에스엘1 3더블유이 버크셔주 슬라우 바스 로드 208 유씨비 셀텍 아이피디 내

헤이우드 샘 필립

영국 에스엘1 3더블유이 버크셔주 슬라우 바스 로드 208 유씨비 셀텍 아이피디 내

험프리스 데이빗 폴

영국 에스엘1 3더블유이 버크셔주 슬라우 바스 로드 208 유씨비 셀텍 아이피디 내

마살 다이엔

영국 에스엘1 3더블유이 버크셔주 슬라우 바스 로드 208 유씨비 셀텍 아이피디 내

쇼 스테반 그레이엄

영국 에스엘1 3더블유이 버크셔주 슬라우 바스 로드 208 유씨비 셀텍 아이피디 내

라이트우드 다니엘 존

영국 에스엘1 3더블유이 버크셔주 슬라우 바스 로드 208 유씨비 셀텍 아이피디 내

명세서

청구범위

청구항 1

다중특이적 항체 분자로서, 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인과 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인을 포함하고, 인간 TNF-알파, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F의 생물학적 활성을 중화시킬 수 있는 다중특이적 항체 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, 인간 TNF-알파에 대한 결합 친화도가 200 pM 이하인 다중특이적 항체 분자.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 인간 IL-17A에 대한 결합 친화도가 100 pM 이하인 다중특이적 항체 분자.

청구항 4

제3항에 있어서, 인간 IL-17A에 대한 결합 친화도가 20 pM 이하인 다중특이적 항체 분자.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, IL-17F에 대한 결합 친화도가 100 pM 이하인 다중특이적 항체 분자.

청구항 6

제5항에 있어서, IL-17F에 대한 결합 친화도가 20 pM 이하인 다중특이적 항체 분자.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인이 IL-17A/IL-17F 이중이량체에도 결합하는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 결합 도메인이 2개의 항체 가변 도메인을 포함하는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 9

제8항에 있어서, 2개의 항체 가변 도메인이 VH/VL 쌍인 다중특이적 항체 분자.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 분자 포맷이 디아바디(diabody), sc디아바디(sc diabody), 트리아바디(triabody), 탠덤(tandem) scFv, FabFv, Fab'Fv, FabdsFv, Fab-scFv, Fab-dsscFv, Fab-(dsscFv)₂, diFab, diFab', 트리바디(tribody), 탠덤 scFv-Fc, scFv-Fc-scFv, sc디아바디-Fc, sc디아바디-CH3, Ig-scFv, scFv-Ig, V-Ig, Ig-V, 듀오바디(Duobody) 및 DVD-Ig로부터 선택되는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인과 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인이 독립적으로 Fab, scFv, Fv, dsFv 및 dsscFv로부터 선택되는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 12

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 하기 c) 및 d)를 포함하거나 그로 이루어진 다중특이적 항체 분자:

c) 하기 화학식 (I)의 폴리펩티드 사슬:

VH1-CH1-X-V1; 및

d) 하기 화학식 (II)의 폴리펩티드 사슬:

VL1-CL-Y-V2

상기 식에서,

VH1은 중쇄 가변 도메인을 나타내고;

CH1은 중쇄 불변 영역의 도메인, 예를 들어 그의 도메인 1을 나타내며;

X는 결합 또는 링커를 나타내고;

Y는 결합 또는 링커를 나타내며;

V1은 dsFv, sdAb, scFv 또는 dsscFv를 나타내고;

VL1은 경쇄 가변 도메인을 나타내며;

CL은 경쇄 불변 영역으로부터의 도메인, 예컨대 C카파를 나타내고;

V2는 dsFv, sdAb, scFv 또는 dsscFv를 나타낸다.

청구항 13

제12항에 있어서, V1 및 V2 중 1 이상이 scFv 또는 dsscFv인 다중특이적 항체 분자.

청구항 14

제13항에 있어서, V1이 scFv 또는 dsscFv이고, V2가 scFv 또는 dsscFv인 다중특이적 항체 분자.

청구항 15

제14항에 있어서, V1이 dsscFv이고, V2가 dsscFv인 다중특이적 항체 분자.

청구항 16

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, V1이 scFv 또는 dsscFv이고, V1이 하기 a 또는 b의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 것인 다중특이적 항체 분자:

a. 화학식 (III): VH2-Z1-VL2, VH2는, 예를 들어 펩티드 결합을 통해 X에 부착됨; 또는

b. 화학식 (IV): VL2-Z1-VH2, VL2는, 예를 들어 펩티드 결합을 통해 X에 부착됨

상기 식에서, VH2는 중쇄 가변 도메인을 나타내고, Z1은 펩티드 링커를 나타내며, VL2는 경쇄 가변 도메인을 나타낸다.

청구항 17

제12항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, V2가 scFv 또는 dsscFv이고, V2가 하기 a 또는 b의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 것인 다중특이적 항체 분자:

a. 화학식 (V): VH3-Z2-VL3, VH3은, 예를 들어 펩티드 결합을 통해 Y에 부착됨; 또는

b. 화학식 (VI): VL3-Z2-VH3, VL3은, 예를 들어 펩티드 결합을 통해 Y에 부착됨

상기 식에서, VH3은 중쇄 가변 도메인을 나타내고, Z2는 펩티드 링커를 나타내며, VL3은 경쇄 가변 도메인을 나타낸다.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, Z1 및/또는 Z2가 12~25개 아미노산 길이의 펩티드 링커, 예를 들어 서열 번호 68에 제시된 서열인 다중특이적 항체 분자.

청구항 19

제12항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, X가 펩티드 링커, 예를 들어 서열 번호 1 또는 2에 제시된 서열인 다중특이적 항체 분자.

청구항 20

제12항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, Y가 펩티드 링커, 예를 들어 서열 번호 1 또는 2에 제시된 서열인 다중특이적 항체 분자.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, X가 서열 번호 2에 제시된 서열이고, Y가 서열 번호 2에 제시된 서열인 다중특이적 항체 분자.

청구항 22

제19항 또는 제20항에 있어서, X가 서열 번호 1에 제시된 서열이고, Y가 서열 번호 2에 제시된 서열인 다중특이적 항체 분자.

청구항 23

제12항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, V1 및 V2 중 1 이상이 dsscFv 또는 dsFv이고; V1의 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 및/또는 V2의 경쇄 및 중쇄 가변 도메인이 2개의 조작된 시스테인 잔기 사이의 디설피드 결합에 의해 연결되는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 24

제12항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, V1 및 V2 중 1 이상이 dsscFv 또는 dsFv이고; V1 및/또는 V2의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인이 2개의 시스테인 잔기 사이의 디설피드 결합에 의해 연결되며, 여기서 시스테인 잔기 쌍의 위치가 V_H37과 V_L95, V_H44와 V_L100, V_H44와 V_L105, V_H45와 V_L87, V_H100과 V_L50, V_H100b와 V_L49, V_H98과 V_L46, V_H101과 V_L46, V_H105와 V_L43, 및 V_H106과 V_L57을 포함하거나 그로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 25

제24항에 있어서, 조작된 시스테인 잔기 쌍의 위치가 V_H44와 V_L100인 다중특이적 항체 분자.

청구항 26

제12항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, V_H1 및 V_L1이 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인을 포함하고, V1 및/또는 V2가 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인을 포함하는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 3개의 결합 도메인을 포함하는 다중특이적 항체 분자.

청구항 28

제27항에 있어서, 3개의 결합 도메인 각각은 상이한 항원에 결합하는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 29

제28항에 있어서, 인간 혈청 담체 단백질에 특이적인 결합 도메인을 포함하는 다중특이적 항체 분자.

청구항 30

제29항에 있어서, 인간 혈청 담체 단백질이 티록신 결합 단백질, 트랜스티레틴, α1-산 당단백질, 트랜스페린, 피브리노겐 및 알부민, 또는 이들 중 어느 하나의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 다중특이적 항

체 분자.

청구항 31

제12항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,

- a. VH1 및 VL1이 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인을 포함하고;
- b. V1이 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인을 포함하고, V2가 인간 혈청 담체 단백질, 예를 들어 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인을 포함하거나; 또는 V2가 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인을 포함하고, V1이 인간 혈청 담체 단백질, 예를 들어 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인을 포함하는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 TNF-알파에 특이적인 1 이하의 결합 도메인과, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 1 이하의 결합 도메인을 포함하는 다중특이적 항체 분자.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, CH2 도메인 및/또는 CH3 도메인을 포함하지 않는 다중특이적 항체 분자.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인이, CDRH1에 대해 서열 번호 85에 제시된 서열을 갖는 CDR, CDRH2에 대해 서열 번호 86에 제시된 서열을 갖는 CDR, 및 CDRH3에 대해 서열 번호 87에 제시된 서열을 갖는 CDR 중 1 이상을 포함하는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 35

제34항에 있어서, 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인이, CDRH1에 대해 서열 번호 85, CDRH2에 대해 서열 번호 86, 및 CDRH3에 대해 서열 번호 87에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR을 포함하는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인이, CDRL1에 대해 서열 번호 88에 제시된 서열을 갖는 CDR, CDRL2에 대해 서열 번호 89에 제시된 서열을 갖는 CDR, 및 CDRL3에 대해 서열 번호 90에 제시된 서열을 갖는 CDR 중 1 이상을 포함하는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 37

제36항에 있어서, 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인이, CDRL1에 대해 서열 번호 88, CDRL2에 대해 서열 번호 89, 및 CDRL3에 대해 서열 번호 90에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR을 포함하는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인은, 서열 번호 92 또는 서열 번호 96에 제시된 서열을 포함하거나; 서열 번호 92 또는 서열 번호 96에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는 서열 번호 92 또는 서열 번호 96에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3이 제35항에 제시된 서열을 갖는 것인 중쇄 가변 도메인을 포함하는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인은, 서열 번호 91 또는 서열 번호 95에 제시된 서열을 포함하거나; 서열 번호 91 또는 서열 번호 95에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는 서열 번호 91 또는 서열 번호 95에 제시된 서열에 대해 80% 이

상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3이 제37항에 제시된 서열을 갖는 것인 경쇄 가변 도메인을 포함하는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간 TNF-알파에 특이적인 dsscFv를 포함하고, dsscFv는 서열 번호 101에 제시된 서열을 포함하거나; 서열 번호 101에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는 서열 번호 101에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3이 제35항에 제시된 서열을 가지며 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3이 제37항에 제시된 서열을 갖는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 41

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간 TNF-알파에 특이적인 scFv를 포함하고, scFv는 서열 번호 99에 제시된 서열을 포함하거나; 서열 번호 99에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는 서열 번호 99에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3이 제35항에 제시된 서열을 가지며 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3이 제37항에 제시된 서열을 갖는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인이, CDRH1에 대해 서열 번호 71, CDRH2에 대해 서열 번호 72, 및 CDRH3에 대해 서열 번호 73에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR을 포함하는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인이, CDRL1에 대해 서열 번호 74, CDRL2에 대해 서열 번호 75 및 CDRL3에 대해 서열 번호 76에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR을 포함하는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인이, 서열 번호 78에 제시된 서열을 포함하거나; 서열 번호 78에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는 서열 번호 78에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3이 제42항에 제시된 서열을 갖는 것인 중쇄 가변 도메인을 포함하는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인이, 서열 번호 77에 제시된 서열을 포함하거나; 서열 번호 77에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는 서열 번호 77에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3이 제43항에 제시된 서열을 갖는 것인 경쇄 가변 도메인을 포함하는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 46

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가, 서열 번호 82에 제시된 서열을 포함하거나; 서열 번호 82에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는 서열 번호 82에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3이 제42항에 제시된 서열을 갖는 것인 중쇄를 포함하는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 47

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가, 서열 번호 81에 제시된 서열을 포함하거나; 서열 번호 81에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는 서열 번호 81에 제시된

서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3이 제43항에 제시된 서열을 갖는 것인 경쇄를 포함하는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, CDRH1에 대해 서열 번호 103, CDRH2에 대해 서열 번호 104, 및 CDRH3에 대해 서열 번호 105에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR을 포함하는, 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인을 포함하는 다중특이적 항체 분자.

청구항 49

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, CDRL1에 대해 서열 번호 106, CDRL2에 대해 서열 번호 107, 및 CDRL3에 대해 서열 번호 108에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR을 포함하는, 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인을 포함하는 다중특이적 항체 분자.

청구항 50

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인이, 서열 번호 110 또는 서열 번호 114에 제시된 서열을 포함하거나; 서열 번호 110 또는 서열 번호 114에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는 서열 번호 110 또는 서열 번호 114에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3이 제48항에 제시된 서열을 갖는 것인 중쇄 가변 도메인을 포함하는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 51

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인이, 서열 번호 109 또는 서열 번호 113에 제시된 서열을 포함하거나; 서열 번호 109 또는 서열 번호 113에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는 서열 번호 109 또는 서열 번호 113에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3이 제49항에 제시된 서열을 갖는 것인 경쇄 가변 도메인을 포함하는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 52

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가, 인간 혈청 알부민에 특이적인 dsscFv를 포함하고, dsscFv는 서열 번호 119에 제시된 서열을 포함하거나; 서열 번호 119에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는 서열 번호 119에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3이 제48항에 제시된 서열을 가지며 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3이 제49항에 제시된 서열을 갖는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 53

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가, 인간 혈청 알부민에 특이적인 scFv를 포함하고, scFv는 서열 번호 117에 제시된 서열을 포함하거나; 서열 번호 117에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는 서열 번호 117에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3이 제48항에 제시된 서열을 가지며 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3이 제49항에 제시된 서열을 갖는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 54

삼중특이적 항체 분자로서, 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인, 및 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인을 포함하고, 하기 a 및 b를 포함하거나 그로 이루어지는 삼중특이적 항체 분자:

- a. 서열 번호 125에 제시된 서열을 포함하거나 그로 이루어지고; 또는 서열 번호 125에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나 그로 이루어지며; 또는 서열 번호 125에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나 그로 이루어지고 CDR이 제35항, 제37항 및 제42항에 제시된 서열을 갖는 것인 제1 폴리펩티드; 및

b. 서열 번호 131에 제시된 서열을 포함하거나 그로 이루어지고; 또는 서열 번호 131에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나 그로 이루어지며; 또는 서열 번호 131에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나 그로 이루어지고 CDR이 제43항, 제48항 및 제49항에 제시된 서열을 갖는 것인 제2 폴리펩티드.

청구항 55

삼중특이적 항체 분자로서, 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인, 및 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인을 포함하고, 하기 a 및 b를 포함하거나 그로 이루어지는 삼중특이적 항체 분자:

a) 서열 번호 127에 제시된 서열을 포함하거나 그로 이루어지고; 또는 서열 번호 127에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나 그로 이루어지며; 또는 서열 번호 127에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나 그로 이루어지고 CDR이 제35항, 제37항 및 제42항에 제시된 서열을 갖는 것인 제1 폴리펩티드; 및

b. 서열 번호 131에 제시된 서열을 포함하거나 그로 이루어지고; 또는 서열 번호 131에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나 그로 이루어지며; 또는 서열 번호 131에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나 그로 이루어지고 CDR이 제43항, 제48항 및 제49항에 제시된 서열을 갖는 것인 제2 폴리펩티드.

청구항 56

제54항 또는 제55항에 있어서, 인간 TNF-알파, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F의 생물학적 활성을 중화시킬 수 있는 삼중특이적 항체 분자.

청구항 57

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 따른 다중특이적 항체 분자 또는 그의 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 58

제57항에 정의된 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드들을 포함하는 벡터.

청구항 59

각각 제57항 또는 제58항의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 하나 이상 포함하는 숙주 세포.

청구항 60

2개의 벡터를 포함하며, 각각의 벡터가 제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 따른 다중특이적 항체 분자의 상이한 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 숙주 세포.

청구항 61

제59항 또는 제60항에 정의된 숙주 세포로부터 다중특이적 항체 분자를 발현시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 62

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 따른 다중특이적 항체 분자 및 1 이상의 부형제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 63

요법에 사용하기 위한, 제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 따른 다중특이적 항체 분자 또는 제62항에 따른 약학 조성물.

청구항 64

치료 유효량의 제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 따른 다중특이적 항체 분자 또는 제62항에 따른 약학 조성물

을 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 환자의 치료 방법.

청구항 65

삼중특이적 항체 분자로서, 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인, 및 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인을 포함하고, 서열 번호 126에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 제1 폴리펩티드 및 서열 번호 132에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 제2 폴리펩티드를 포함하거나 그로 이루어지는 삼중특이적 항체 분자.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시내용은 인간 TNF-알파, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 대해 특이성을 갖는 다중특이적 항체 분자에 관한 것이다. 본 발명은 또한 그 항체 분자의 치료 용도, 및 그의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 류마티스 관절염(RA) 환자에서 질병의 주요 동인으로서의 TNF α의 역할은 잘 규명되어 있다. 실제로, 항-TNF α 항체는 환자 치료를 변화시켰다. 그러나, 이러한 성공에도 불구하고, 많은 환자들이 임상적 완화를 달성하지 못하기 때문에 아직 충족되지 않은 의학적 요구가 존재한다. 따라서, RA의 치료를 위한 다음 임상적 목표는 이러한 충족되지 못한 임상적 요구를 해결하고, 임상적 완화를 달성하는 환자의 비율을 크게 향상시키는 치료법을 제공하는 것이다. 최근 연구에 의하면, RA 환자에서 Th17/IL-17 생물학적 경로가 강화된 것으로 나타났다. RA 환자의 말초 혈액에서 Th17 세포의 비율이 건강한 지원자에 비해 증가하고 이것은 항-TNF α로 처리한 후에 더 증가한다는 것이 밝혀졌다([Alzabin et al., 2012]; [Chen et al., 2011]; [Aerts et al., 2010]). 항-TNF α 치료 후에 보완적인 생물학적 경로에 대한 이러한 강화는 왜 많은 환자가 요법에 단지 부분적으로 반응하는지 또는 치료에 대한 초기 반응에도 불구하고 일부 환자가 재발하는지에 대해 부분적으로 설명할 수 있다.

[0003] 현재 RA의 발병 기전에서 IL-17의 역할에 대한 증거를 제공하는 다수의 문헌이 있다. IL-17 사이토카인 패밀리는 23-36 kDa의 분자 질량 및 이량체 구조를 갖는 구조 유사성에 기초한 6개의 구성원으로 이루어진다. 시조 구성원 IL-17A(종종 문헌에서 간단히 IL-17로 언급됨)는 다음과 같은 다른 구성원과 16%-50%의 아미노산 서열 동일성을 공유한다: IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E(IL-25로도 알려짐) 및 IL-17F. IL-17A 및 IL-17F는 가장 큰 상동성(50%)을 공유하며, 동일한 수용체 복합체에 결합하여 이들 2개의 사이토카인 간에 공유된 생물학적 활성이 확인되었다. 또한, IL-17A 및 IL-17F는 동종이량체뿐만 아니라, IL-17A/F 이종이량체로도 존재한다. IL-17E(IL-25)는 IL-17A와의 유사성이 가장 적다. IL-17A 및 IL-17F의 생물학적 활성에 대한 중요한 관련된 사실은 이들이 동일한 IL-17RA/IL-17RC 수용체 복합체를 공유하고, 이 때 IL-17A는 IL-17RA에 대해 가장 큰 친화도를 갖는 반면, IL-17F는 IL-17RC에 보다 강하게 결합한다는 발견이다. IL-17RA를 이용하는 다른 패밀리 구성원은 IL-17E이고, 이것은 IL-17RA/IL-17RB 수용체 복합체를 통해 신호를 전달한다.

[0004] IL-17A 및 IL-17F는 CD4+ T 세포의 Th17 하위세트에 의해 생성된다. 또한, 세포독성 CD8+ T 세포(Tc17), gdT 세포 및 NK T 세포를 비롯한 다른 T 세포 하위세트는 IL-17A 및 IL-17F를 생성한다. IL-17A를 분비하는 것으로 보고된 다른 세포 집단은 호중구, 단핵구, NK 세포, 림프 조직 유도인자(lymphoid tissue inducer)-유사(LTi-유사) 세포, 장 파네쓰(paneth) 세포 및 심지어 B 세포 및 비만 세포를 포함한다. 또한, 상피 세포는 IL-17F를 분비하는 것으로 보고되었다.

[0005] IL-17 사이토카인에 반응하는 세포 유형은 상이한 수용체의 발현에 의해 반영된다. IL-17RA는 어디에서나 흔하게 발현되고, 조혈 조직에서 특히 높은 수준으로 발현되는 반면, IL-17RC는 관절, 간, 신장, 갑상선 및 전립선의 비면역 세포에서 보다 고도로 발현된다. 높은 수준의 IL-17RC를 발현하는 세포는 IL-17F에 보다 반응성일 수 있는 반면에, IL-17RC보다 IL17-RA의 발현이 보다 높은 세포는 IL-17A에 보다 쉽게 반응할 수 있기 때문에, 상기 차등 발현은 IL17-RA 및 IL-17F의 생물학적 활성의 차이를 설명할 수 있다. IL-17A 및 F에 반응성인 특정 세포 유형은 섬유모세포, 상피 세포, 각질세포, 활막세포 및 내피 세포를 포함하고, IL-17A는 T 및 B 세포 및 대식세포에 작용하는 것으로 또한 보고되었다.

[0006] IL-17A 및 IL-17F는 섬유모세포, 내피 세포 및 상피 세포로부터 전염증성(proinflammatory) 사이토카인, 케모카인 및 매트릭스 메탈로프로테이나제(IL-6, IL-8 및 MMP-13 포함)의 유도인자이다. IL-17F는 종종 IL-17A보다 활성이 더 작은 것으로 보고되었지만, IL-17F가 TNF α와 조합되면 증가된 생물학적 반응이 관찰된다(Zrioual et

al., 2009). TNF α 와의 이러한 상가적 또는 상승적 생물학적 활성은 IL-17A와 IL-17F 둘 모두에서 나타나며, mRNA 안정성의 증가로 인한 것일 수 있다. IL-17A와 IL-17F 둘 모두의 발현은 RA 환자에서 증가하는 것으로 나타났다(Zrioual et al., 2009), RA 발병 기전에서 T 세포 및 IL-17의 기여는 이제 문헌에서 자세하게 발표되어 있다([Hot & Miossec 2011]; [Truchetet et al., 2013]). 인간의 활막 및 뼈의 외식편을 이용한 연구는 IL-17A가 연골 및 뼈의 분해를 증가시킨다는 것을 증명하였다(Chabaud et al., 2001). 마우스의 콜라겐 유도 관절염(CIA) 모델에 대한 추가의 연구는 또한 IL-17A의 과다 발현이 활막의 염증 및 관절 파괴를 유도하고, CIA가 IL-17A 차단에 의해 및 IL-17 결핍 마우스에서 억제되는 것으로 나타남을 입증하였다([Lubberts 2001 & 2004]; [Nakae 2003]).

[0007] 따라서, TNF α 및 IL-17 생물학적 경로 둘 모두가 동시에 차단되는 치료는 반응 속도를 현저하게 향상시키고 RA 환자 및 TNF-알파 및 IL-17A 및/또는 IL-17F에 의해 매개되는 다른 병리학적 장애의 치료에서 기존의 충족되지 못한 요구를 해결할 잠재력을 갖는다.

[0008] WO2014/044758(Covagen AG)은 글리코실화된 IL-17A를 억제하고 TNF-알파에 결합할 수 있는 융합 구축물을 개시한다. WO2013/063110(Abbvie Inc.)은 TNF 및 IL-17에 결합할 수 있는 다가 DVD-Ig 결합 단백질을 개시한다. WO2014/137961(Eli Lilly and Company)에는 항-TNF 및 항-IL-17A 이중특이적 항체가 개시되어 있다. 그러나, IL-17F가 중화되지 않기 때문에 이들 분자는 단지 제한된 효능만을 달성할 수 있으며, 상기한 바와 같이 IL-17F는 IL-17A와 유사한 생물학적 활성을 부여하기 때문에 상기 치료 분자의 사용에 의해서는 IL-17 생물학적 경로의 단지 부분적 억제만이 달성될 수 있다. TNF-알파의 억제와 조합한 IL-17A 및 IL-17F 둘 모두의 억제는 TNF-알파 및 IL-17A 단독 차단제보다 개선된 효능을 제공할 수 있다.

[0009] 본 발명자들은 환자에게 새로운 치료 옵션을 제공할, TNF-알파, IL-17A 및 IL-17F를 억제할 수 있는 신규한 다중특이적 항체를 개발하였다.

발명의 내용

[0010] 본 발명은, 특히 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인과 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인을 포함하는, TNF-알파, IL-17A 및 IL-17F에 결합할 수 있는 다중특이적 항체 분자로서, 인간 TNF-알파, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F의 생물학적 활성을 중화시킬 수 있는 항체 분자를 제공한다. 한 실시양태에서, 다중특이적 항체 분자는 삼중특이적이고, 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인을 추가로 포함한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본원에서 사용되는 "항원 결합 부위" 또는 "결합 부위"는 하나 이상의 가변 도메인의 일부 또는 전부, 예를 들어 표적 항원과 특이적으로 상호작용하는 한 쌍의 가변 도메인의 일부 또는 전부를 포함하는 분자의 부분을 지칭한다.

[0012] 본원에서 사용되는 "결합 도메인"은 표적 항원과 특이적으로 상호작용하는 하나 이상의 가변 도메인, 예를 들어 한 쌍의 가변 도메인 VH 및 VL 및 선택적으로 하나 이상의 불변 도메인, 예를 들어 CH1 도메인 및/또는 CL 도메인, 카파 또는 람다를 포함하는 분자의 부분을 지칭한다. 결합 도메인은 단일 도메인 항체를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 각각의 결합 도메인은 1가이다. 바람직하게는, 각각의 결합 도메인은 1 이하의 VH 및 하나의 VL을 포함한다.

[0013] 본원에서 사용되는 "특이적으로"는 특이적인 항원만을 인식하는 결합 부위 또는 결합 도메인, 또는 비특이적인 항원에 대한 친화도에 비해 특이적인 항원에 대해 유의하게 더 높은 결합 친화도, 예를 들어 5, 6, 7, 8, 9, 10 배 더 높은 결합 친화도를 갖는 결합 부위 또는 결합 도메인을 지칭하고자 의도된다.

[0014] 본원에서 사용되는 "다중특이적 항체"는 2개 이상의 결합 도메인, 예를 들어 2 또는 3개의 결합 도메인을 갖는 본원에서 설명되는 항체 분자를 나타낸다.

[0015] 한 실시양태에서, 구축물은 이중특이적 항체이다.

[0016] 본원에서 사용되는 "이중특이적 항체"는 하나의 결합 부위가 인간 TNF-알파에 결합하고 다른 결합 부위는 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 결합하는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 항체 분자를 나타낸다.

[0017] 한 실시양태에서, 항체 구축물은 삼중특이적 항체이다.

[0018] 본원에서 사용되는 "삼중특이적 항체"는 3개의 항원 결합 부위를 갖는 항체 분자를 나타낸다.

- [0019] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 TNF-알파, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 결합할 수 있는 다중특이적 항체 분자가 제공되고, 상기 항체 분자는 인간 TNF-알파, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F의 생물학적 활성을 중화시킬 수 있다.
- [0020] 한 실시양태에서, 다중특이적 항체 분자는 인간 TNF-알파에 특이적인 제1 결합 도메인, 인간 IL-17A에 특이적인 제2 결합 도메인 및 인간 IL-17F에 특이적인 제3 결합 도메인을 포함한다.
- [0021] 다른 실시양태에서, 다중특이적 항체 분자는 인간 TNF-알파에 특이적인 제1 결합 도메인과 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F 둘 모두에 특이적인 제2 결합 도메인을 포함한다.
- [0022] 한 실시양태에서, 항체 분자는 3개의 결합 도메인을 포함하고, 2개의 결합 도메인은 동일한 항원 상의 동일한 에피토프 또는 상이한 에피토프에 대한 결합을 비롯하여 동일한 항원에 결합하고, 제3 결합 도메인은 상이한(별개의) 항원에 결합한다. 한 예에서, 다중특이적 항체 분자는 항원 인간 TNF-알파, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 결합하고, 여기서 2개의 결합 도메인은 인간 TNF-알파에 결합하고 제3 결합 도메인은 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 결합한다. 또 다른 예에서, 다중특이적 항체 분자는 항원 인간 TNF-알파, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 결합하고, 여기에서 2개의 결합 도메인은 각각 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 결합할 수 있고 제3 결합 도메인은 인간 TNF-알파에 결합한다.
- [0023] 본 발명에 따른 항체 분자는 한 실시양태에서 인간 TNF-알파에 특이적인 1 이하의 결합 도메인과 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 1 이하의 결합 도메인을 포함한다. 따라서, 이 실시양태에서, 항체 분자는 인간 TNF-알파에 대한 결합에 대해 1가이고, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 대한 결합에 대해 1가이다.
- [0024] 한 실시양태에서, 본 발명의 다중특이적 항체 분자는 3개의 상이한 항원에 독립적으로 결합하는 3개의 결합 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 다중특이적 항체 분자는 항원 인간 TNF-알파, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 결합하고, 여기서 제1 결합 도메인은 인간 TNF-알파에 결합하고, 제2 결합 도메인은 인간 IL-17A에 결합하고, 제3 결합 도메인은 인간 IL-17F에 결합한다.
- [0025] 또 다른 실시양태에서, 다중특이적 항체 분자는 항원 인간 TNF-알파, 인간 IL-17A, 인간 IL-17F 및 인간 혈청 알부민에 결합하고, 여기서 제1 결합 도메인은 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 결합하고, 제2 결합 도메인은 인간 TNF-알파에 결합하고, 제3 결합 도메인은 항체 분자의 반감기를 연장할 수 있는 항원에 결합한다. 항체 분자의 반감기를 연장할 수 있는 항원에 결합하는 제3 결합 도메인은 인간 혈청 담체 단백질, 순환 면역글로불린 분자 또는 CD35/CR1에 결합할 수 있다.
- [0026] 본원에서 사용되는 바와 같이, "혈청 담체 단백질"은 티록신 결합 단백질, 트랜스티레틴, α 1-산 당단백질, 트랜스페린, 피브리노겐 및 알부민, 또는 이들 중 어느 하나의 단편을 포함한다.
- [0027] 본원에서 사용되는 바와 같이, "순환 면역글로불린 분자"는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, sIgA, IgM 및 IgD 또는 이들 중 어느 하나의 단편을 포함한다.
- [0028] CD35/CR1은 반감기가 36일(정상 범위 28 내지 47일; [Lanaro et al., 1971, Cancer, 28(3):658-661])인 적혈구에 존재하는 단백질이다.
- [0029] 특정 실시양태에서, 다중특이적 항체 분자는 3개의 결합 도메인을 포함하거나 그로 이루어지고, 여기서 제1 결합 도메인은 인간 TNF-알파에 특이적이고, 제2 결합 도메인은 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적이고, 제3 결합 도메인은 인간 혈청 알부민에 특이적이다.
- [0030] 본 발명에 따른 항체 분자는 한 실시양태에서 인간 TNF-알파에 특이적인 1 이하의 결합 도메인, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 1 이하의 결합 도메인 및 인간 혈청 담체 단백질, 예를 들어 인간 혈청 알부민에 특이적인 1 이하의 결합 도메인을 포함한다. 따라서, 이 실시양태에서, 항체 분자는 인간 TNF-알파에 대한 결합에 대해 1가이고, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 대한 결합에 대해 1가이고, 인간 혈청 담체 단백질, 예를 들어 인간 혈청 알부민에 대한 결합에 대해 1가이다.
- [0031] 동종다량체, 예를 들어 인간 TNF-알파 삼량체 또는 인간 IL-17 이량체인 동일한 표적 항원에 대한 다수의 결합 도메인을 포함하는 항체 분자는 생체 내에서 큰 항체 및 항원 복합체를 형성할 가능성이 더 높을 수 있다. 항체 분자가 각각의 표적 항원에 대해 1 이하의 결합 도메인을 포함하는 본 발명의 실시양태에서, 항체는 동일한 표적 항원에 대한 다수의 결합 도메인을 포함하는 항체 분자와 비교하여 생체 내에서 큰 항체 및 항원 복합체를 형성하는 경향이 유리하게 더 낮을 수 있다.

- [0032] 본 발명은 높은 친화도로 IL-17A 및 IL-17F 둘 모두에 결합할 수 있는 개선된 다중특이적 항체를 제공한다. 특히, 본 발명의 다중특이적 항체는 IL-17A 및 IL-17F 둘 모두에 특이적으로 결합할 수 있다. 특이적 결합은 항체가 다른 폴리펩티드보다 IL-17A 및 IL-17F 폴리펩티드(IL-17A/IL-17F 이종이량체 포함)에 대해 더 큰 친화도를 갖는 것을 의미하고, 한 실시양태에서는 항체는 IL-17의 다른 이소형에 결합하지 않는다. 본 발명의 다중특이적 항체는 IL-17A 동종이량체 및 IL-17F 동종이량체에 특이적으로 결합할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 다중특이적 항체는 또한 IL-17A/IL-17F 이종이량체에도 결합한다.
- [0033] 바람직하게는, 본 발명의 다중특이적 항체는 IL-17A 및 IL-17F 둘 모두의 활성을 중화한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 다중특이적 항체는 또한 IL-17A/IL-17F 이종이량체의 활성을 중화한다. 따라서, 본 발명의 다중특이적 항체는 IL-17A 및 IL-17F 둘 모두의 생물학적 활성을 억제할 수 있는 유리한 특성을 갖는다.
- [0034] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 '중화 항체'는 예를 들어 IL-17A 및 IL-17F의 이들의 수용체 중 하나 이상에 대한 결합을 차단함으로써 또는 IL-17A/IL-17F 이종이량체의 그의 수용체 중 하나 이상에 대한 결합을 차단함으로써, IL-17A 및 IL-17F 둘 모두의 생물학적 신호전달 활성을 중화시킬 수 있는 항체를 설명한다. 본원에서 사용되는 용어 '중화'는 부분적이거나 완전할 수 있는 생물학적 신호전달 활성의 감소를 나타낸다는 것을 이해할 것이다. 또한, 항체에 의한 IL-17A 및 IL-17F 활성의 중화 정도는 동일하거나 상이할 수 있음을 이해할 것이다. 한 실시양태에서, IL-17A/IL-17F 이종이량체의 활성 중화는 IL-17A 또는 IL-17F 활성의 중화 정도와 동일하거나 상이할 수 있다. 중화를 결정하기 위한 적합한 검정은 관련 기술 분야에 공지되어 있고, 특정한 상기 검정이 본원의 실시예에서 제시된다.
- [0035] 바람직하게는, IL-17A 및 IL-17F 폴리펩티드는 인간이다. 한 실시양태에서, 항체는 또한 사이노몰거스(*cynomolgus*) IL-17A 및 IL-17F에 결합한다.
- [0036] 다중특이적 항체는 또한 유리하게는 높은 친화도로 TNF-알파에 결합할 수 있다. 특히, 본 발명의 다중특이적 항체는 TNF-알파에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0037] 바람직하게는, 본 발명의 다중특이적 항체는 예를 들어 TNF-알파의 하나 이상의 수용체에 대한 TNF-알파의 결합을 차단함으로써 TNF-알파의 활성을 중화한다. 본원에서 사용되는 용어 '중화'는 부분적이거나 완전할 수 있는 생물학적 신호전달 활성의 감소를 나타낸다는 것을 이해할 것이다. 바람직하게는 TNF-알파 폴리펩티드는 인간 폴리펩티드이다. 한 실시양태에서, 항체는 또한 사이노몰거스 TNF-알파에도 결합한다. 중화를 결정하기 위한 적합한 검정은 관련 기술 분야에 공지되어 있고, 특정한 상기 검정이 본원의 실시예에서 제시된다.
- [0038] 따라서, 본 발명은 또한 자가면역 또는 염증성 질환 또는 암과 같은 TNF-알파 및 IL-17A 및/또는 IL-17F에 의해 매개되는 질환의 치료 및/또는 예방에서의 상기 항체의 용도를 제공한다.
- [0039] 결합 친화도(KD)는 표준 검정, 예컨대 BIAcore와 같은 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정될 수 있다.
- [0040] 한 실시양태에서, 다중특이적 항체 분자는 인간 TNF-알파에 대한 결합 친화도가 200 pM 이하, 예를 들어 100 pM 이하, 50 pM 이하, 20 pM 이하, 15 pM 이하 또는 12 pM 이하이다. 한 실시양태에서, 다중특이적 항체 분자는 인간 TNF- α 에 대한 결합 친화도가 50 pM 내지 1 pM, 20 pM 내지 1 pM, 15 pM 내지 1 pM 또는 12 pM 내지 1 pM 범위이다. 한 실시양태에서, 다중특이적 항체 분자는 인간 TNF-알파에 대한 결합 친화도가 15 pM 내지 5 pM 또는 12 pM 내지 11 pM 범위이다.
- [0041] 한 실시양태에서, 다중특이적 항체 분자는 인간 IL-17A에 대한 결합 친화도가 200 pM 이하, 예를 들어 100 pM 이하, 50 pM 이하, 20 pM 이하, 10 pM 이하, 8 pM 이하, 5 pM 이하 또는 2 pM 이하이다. 한 실시양태에서, 다중특이적 항체 분자는 인간 IL-17A에 대한 결합 친화도가 50 pM 내지 1 pM, 20 pM 내지 1 pM, 10 pM 내지 1 pM, 8 pM 내지 1 pM, 5 pM 내지 1 pM 또는 2 pM 내지 1 pM의 범위이다.
- [0042] 한 실시양태에서, 다중특이적 항체 분자는 인간 IL-17F에 대한 결합 친화도가 200 pM 이하, 예를 들어 100 pM 이하, 50 pM 이하, 20 pM 이하, 15 pM 이하 또는 10 pM 이하이다. 한 실시양태에서, 다중특이적 항체 분자는 인간 IL-17F에 대한 결합 친화도가 50 pM 내지 1 pM, 20 pM 내지 1 pM, 15 pM 내지 1 pM 또는 10 pM 내지 1 pM의 범위이다. 한 실시양태에서, 다중특이적 항체 분자는 인간 IL-17F에 대한 결합 친화도가 10 pM 내지 5 pM 또는 8 pM 내지 7 pM 범위이다.
- [0043] 한 실시양태에서, 다중특이적 항체 분자는 인간 혈청 알부민에 대한 결합 친화도가 3 nM 이하, 2 nM 이하, 1.9 nM 이하 또는 1.8 nM 이하이다. 한 실시양태에서, 다중특이적 항체 분자는 인간 혈청 알부민에 대한 결합 친화도가 3 nM 내지 1 pM, 2 nM 내지 1 nM, 2 nM 내지 1.5 nM 또는 1.8 nM 내지 1.7 nM 범위이다.

- [0044] 본 발명의 한 측면에서, 각각의 결합 도메인은 2개의 항체 가변 도메인, 바람직하게는 VH/VL 쌍을 포함한다. 한 측면에서, 각각의 결합 도메인은 2개 이하의 항체 가변 도메인을 포함한다.
- [0045] 본 발명의 다중특이적 항체 분자는 전술한 바와 같이 2개 이상의 항원, 예를 들어 3개의 항원에 결합할 수 있는 임의의 적합한 항체 포맷을 가질 수 있다.
- [0046] 한 측면에서, 항체 분자 포맷은 디아바디(diabody), sc디아바디(scdiabody), 트리아바디(triabody), 탠덤 (tandem) scFv, FabFv, Fab'Fv, FabdsFv, Fab-scFv, Fab-dsscFv, Fab-(dsscFv)₂, FabFvFv, FabFvFc, diFab, diFab', 트리바디(tribody), 탠덤 scFv-Fc, scFv-Fc-scFv, sc디아바디-Fc, sc디아바디-CH₃, Ig-scFv, scFv-Ig, V-Ig, Ig-V, 듀오바디(Duobody) 및 DVD-Ig로부터 선택된다. 한 예에서, 항체 분자는 도 8에 2xdsscFv로 도시되고 WO2015/197772에 기술된 포맷을 갖는다.
- [0047] 한 실시양태에서, 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인과 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인은 Fab, scFv, Fv, dsFv 및 dsscFv로부터 독립적으로 선택된다.
- [0048] 본 발명의 한 실시양태에서, 항체 분자는 CH₂ 도메인 및/또는 CH₃ 도메인을 포함하지 않는다. Fc 도메인으로도 지칭되는 CH₂ 도메인 및/또는 CH₃ 도메인이 결합된 항체 분자는 보체 결합과 같은 Fc 도메인에 기인한 기능적 특성이 요구되지 않는 경우에 유리하다.
- [0049] 항체 치료제에서 Fc 도메인, 특히 IgG1 이소형 Fc와 같은 활성 Fc 도메인의 존재는 생체 내에서 FcGR 및 보체와 같은 전염증성 단백질과의 상호작용을 유도할 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체 분자가 Fc 도메인을 포함하지 않는 실시양태에서, 항체는 Fc 도메인을 함유하는 항체 분자와 비교하여 생체 내에서 FcGR 및 보체와 같은 전염증성 단백질과의 상호작용이 더 적을 수 있다.
- [0050] 동종다량체인 동일한 표적 항원에 대한 다수의 결합 도메인 및 Fc 도메인 둘 모두를 포함하는 항체는 큰 항체: 항원 복합체를 형성하는 경향을 큰 면역 복합체를 형성하는 다수의 활성 Fc 도메인과 조합할 수 있다. 큰 면역 복합체가 생체 내에서 부적절하게 침착되어 면역계 활성화를 유도할 수 있다. 항체가 각각의 표적 항원에 대해 1 이하의 결합 도메인을 포함하고 Fc 도메인을 포함하지 않는 본 발명의 실시양태에서, 항체는 큰 면역 복합체를 형성하는 능력이 감소될 수 있고, 따라서 생체 내에서 부적절한 침착 및 생체 내에서의 면역 활성화 가능성이 보다 낮을 수 있다.
- [0051] 본 발명의 한 측면에서, 다중특이적 항체 분자는 하기 a) 및 b)를 포함하거나 그로 이루어진 이량체로서 제공된다:
- [0052] a) 화학식 (I)의 폴리펩티드 사슬:
- [0053] **VH1-CH1-X-V1;**
- [0054] b) 화학식 (II)의 폴리펩티드 사슬:
- [0055] **VL1-CL-Y-V2**
- [0056] 상기 식에서,
- [0057] VH1은 중쇄 가변 도메인을 나타내고;
- [0058] CH1은 중쇄 불변 영역의 도메인, 예를 들어 그의 도메인 1을 나타내고;
- [0059] X는 결합 또는 링커를 나타내고;
- [0060] Y는 결합 또는 링커를 나타내고;
- [0061] V1은 dsFv, sdAb, scFv 또는 dsscFv를 나타내고;
- [0062] VL1은 경쇄 가변 도메인을 나타내고;
- [0063] CL은 경쇄 불변 영역으로부터의 도메인, 예컨대 C카파를 나타내고;
- [0064] V2는 dsFv, sdAb, scFv 또는 dsscFv를 나타낸다.
- [0065] 한 실시양태에서, VH1 및 VL1은 함께 인간 TNF-알파, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F로부터 선택된 제1 항원에 특이적인 결합 도메인을 형성한다. 한 실시양태에서, VH1 및 VL1은 함께 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인을 형성한다.

- [0066] 한 실시양태에서, V1은 인간 TNF-알파, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F로부터 선택된 제2 항원에 특이적인 결합 도메인을 포함한다. 한 실시양태에 있어서, V1은 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인을 포함한다.
- [0067] 한 실시양태에서, V2는 인간 TNF 알파, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F로부터 선택된 제2 또는 제3 항원에 대한 특이적인 결합 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, V₂는 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인을 포함한다.
- [0068] 한 실시양태에서, VH1 및 VL1은 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인을 포함하고, V1 및/또는 V2는 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인을 포함한다. V1 및 V2가 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인을 포함하는 실시양태에서, V1 및 V2는 인간 TNF-알파의 동일한 또는 상이한 에피토프에 결합할 수 있다.
- [0069] 한 실시양태에서, VH1 및 VL1은 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인을 포함하고, V1 및/또는 V2는 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인을 포함한다. V1 및 V2가 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인을 포함하는 실시양태에서, V1 및 V2는 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F의 동일한 또는 상이한 에피토프에 결합할 수 있다.
- [0070] 한 실시양태에서, 항체 분자는 화학식 (I) 및 화학식 (II)에서 정의된 바와 같은 폴리펩티드 사슬을 포함하거나 그로 이루어지며, 인간 TNF-알파에 특이적인 1 이하의 결합 도메인과 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 1 이하의 결합 도메인을 포함한다.
- [0071] 본 발명의 한 측면에서, 다중특이적 항체 분자는 추가의 항원에 결합할 수 있고, 예를 들어, 항체 분자의 반감기를 연장하기 위해 혈청 담체 단백질, 순환 면역글로불린 분자 또는 CD35/CR1에 특이적인 결합 도메인을 포함한다.
- [0072] 한 실시양태에서, V_{H1}/V_{L1}이 그에 대해 특이성을 갖는 관심 항원은 혈청 담체 단백질, 예컨대 인간 혈청 담체, 예컨대 인간 혈청 알부민이다.
- [0073] 한 실시양태에서, V1이 그에 대해 특이성을 갖는 관심 항원은 혈청 담체 단백질, 예컨대 인간 혈청 담체, 예컨대 인간 혈청 알부민이다.
- [0074] 한 실시양태에서, V2가 그에 대해 특이성을 갖는 관심 항원은 혈청 담체 단백질, 예컨대 인간 혈청 담체, 예컨대 인간 혈청 알부민이다.
- [0075] 한 실시양태에서, VH1/VL1, V1 또는 V2 중 하나만이 혈청 담체 단백질, 예컨대 인간 혈청 담체, 예컨대 인간 혈청 알부민에 대해 특이성을 갖는다.
- [0076] 따라서, 한 실시양태에서, 항체 분자는 상기 화학식 (I) 및 화학식 (II)에서 정의된 바와 같은 폴리펩티드 사슬을 포함하거나 그로 이루어지고, 여기서
- [0077] a. VH1 및 VL1은 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인을 포함하고;
- [0078] b. V1은 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인을 포함하고, V2는 혈청 담체 단백질, 예를 들어 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인을 포함하거나; 또는 V2는 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인을 포함하고 V1은 혈청 담체 단백질, 예를 들어 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인을 포함한다.
- [0079] 한 실시양태에서, 항체 분자는 화학식 (I) 및 화학식 (II)에서 정의된 바와 같은 폴리펩티드 사슬을 포함하거나 그로 이루어지고, 인간 TNF-알파에 특이적인 1 이하의 결합 도메인, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 1 이하의 결합 도메인, 및 혈청 담체 단백질, 예를 들어 인간 혈청 알부민에 특이적인 1 이하의 결합 도메인을 포함한다.
- [0080] V_{H1}-CH₁ 부분은 V_L-C_L 부분과 함께 기능적 Fab 또는 Fab' 단편을 형성한다.
- [0081] V_{H1}은 가변 도메인, 예를 들어 중쇄 가변 도메인을 나타낸다. 한 실시양태에서, V_{H1}은 중쇄 가변 도메인을 나타낸다. 한 실시양태에서, V_{H1}은 키메라 가변 도메인이고, 즉, 이것은 적어도 두 종으로부터 유래된 성분, 예를 들어 인간 프레임워크 및 비-인간 CDR을 포함한다. 한 실시양태에서, V_{H1}은 인간화된다. 한 실시양태에서, V_{H1}은 인간이다.

- [0082] V_{L1} 은 가변 도메인, 예를 들어 경쇄 가변 도메인을 나타낸다. 한 실시양태에서, V_{L1} 은 경쇄 가변 도메인을 나타낸다. 한 실시양태에서, V_{L1} 은 키메라 가변 도메인이고, 즉, 이것은 적어도 두 종으로부터 유래된 성분, 예를 들어 인간 프레임워크 및 비-인간 CDR을 포함한다. 한 실시양태에서, V_{L1} 은 인간화된다. 한 실시양태에서, V_L 은 인간이다.
- [0083] 일반적으로, V_{H1} 및 V_{L1} 은 함께 항원 결합 도메인을 형성한다. 한 실시양태에서, V_{H1} 및 V_{L1} 은 동족(cognate) 쌍을 형성한다.
- [0084] 본원에서 사용되는 바와 같이, "동족 쌍"은 생체 내에서 생성된 단일 항체로부터의 가변 도메인의 쌍, 즉 숙주로부터 단리된 가변 도메인의 자연적으로 발생하는 쌍 형성을 지칭한다. 따라서, 동족 쌍은 V_H 및 V_L 쌍이다. 한 예에서, 동족 쌍은 협력하여 항원에 결합한다.
- [0085] 본원에서 사용되는 바와 같이, "가변 영역"은 CDR 및 프레임워크, 특히 적합한 프레임워크를 포함하는 항체 사슬 내의 영역을 지칭한다.
- [0086] 본 개시내용에서 사용하기 위한 가변 영역은 일반적으로 관련 기술 분야에서 알려진 임의의 방법에 의해 생성될 수 있는 항체로부터 유래될 것이다.
- [0087] 본원에서 사용되는 바와 같이, "로부터 유래된"은 이용된 서열 또는 이용된 서열과 매우 유사한 서열이 원래의 유전 물질, 예컨대 항체의 경쇄 또는 중쇄로부터 획득되었다는 사실을 지칭한다.
- [0088] 본원에서 사용되는 바와 같이, "매우 유사한"은 그의 전체 길이에 걸쳐 95% 이상 유사한, 예컨대 96, 97, 98 또는 99% 유사한 아미노산 서열을 지칭하고자 하는 것이다.
- [0089] V_{H1} 및 V_{L1} 에 대해 상기 설명된 바와 같이, 본 발명에서 사용하기 위한 가변 영역은 임의의 적합한 공급원으로부터 유래될 수 있고, 예를 들어 완전히 인간이거나 인간화될 수 있다.
- [0090] 한 실시양태에서, C_{H1} 도메인은 항체 중쇄 또는 그의 유도체로부터의 자연적으로 발생하는 도메인 1이다.
- [0091] 한 실시양태에서, 경쇄 내의 C_L 단편은 불변 카파 서열 또는 불변 람다 서열 또는 그의 유도체이다.
- [0092] 본원에서 사용되는 바와 같이, 자연적으로 발생하는 도메인의 유도체는 예를 들어 도메인의 특성을 최적화하기 위해, 예컨대 바람직하지 않은 특성을 제거함으로써, 자연적으로 발생하는 서열 내의 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산이 대체되거나 결실되었으나, 상기 도메인의 특징(들)은 유지되는 경우를 지칭한다.
- [0093] 한 실시양태에서, 하나 이상의 천연 또는 조작된 사슬간(즉, 경쇄와 중쇄간) 디설피드 결합은 기능적 Fab 또는 Fab' 단편에 존재한다.
- [0094] 한 실시양태에서, "천연" 디설피드 결합은 화학식 (I) 및 (II)의 폴리펩티드 사슬 내의 CH_1 과 C_L 사이에 존재한다.
- [0095] C_L 도메인이 카파 또는 람다로부터 유래되는 경우, 결합 형성 시스템을 위한 천연 위치는 인간 c카파 및 c람다에서 214이다(Kabat numbering 4th edition 1987).
- [0096] CH_1 내의 디설피드 결합 형성 시스템의 정확한 위치는 실제 이용된 특정 도메인에 따라 결정된다. 따라서, 예를 들어 인간 감마-1에서 디설피드 결합의 천연 위치는 위치 233에 위치한다(Kabat numbering 4th edition 1987). 감마 2, 3, 4, IgM 및 IgD와 같은 다른 인간 이소형에 대한 결합 형성 시스템의 위치, 예를 들어 인간 IgM, IgE, IgG2, IgG3, IgG4의 경우 위치 127 및 인간 IgD 및 IgA2B의 중쇄의 위치 128이 알려져 있다.
- [0097] 선택적으로, 화학식 I 및 II의 폴리펩티드의 V_H 와 V_L 사이에 디설피드 결합이 있을 수 있다.
- [0098] 한 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 다중특이적 항체는 CH_1 과 C_L 사이에서 자연적으로 발생하는 것에 동등하거나 상응하는 위치에 디설피드 결합을 갖는다.
- [0099] 한 실시양태에서, CH_1 을 포함하는 불변 영역 및 C_L 과 같은 불변 영역은 비자연적으로 발생하는 위치 내에 있는 디설피드 결합을 갖는다. 이것은 상기 위치 또는 필요한 위치에서 시스템(들)을 아미노산 사슬 내로 도입함으

로써 분자에서 조작될 수 있다. 이 비천연 디설피드 결합은 CH₁과 C_L 사이에 존재하는 천연 디설피드 결합에 부가적이거나 대안적이다. 천연 위치 내의 시스테인(들)은 디설피드 다리를 형성할 수 없는 세린과 같은 아미노산에 의해 대체될 수 있다.

- [0100] 조작된 시스테인의 도입은 관련 기술 분야에 알려진 임의의 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 이들 방법은 비제한적으로, PCR 연장 증폭 돌연변이 유발, 부위 지향적 돌연변이 유발 또는 카세트 돌연변이 유발을 포함한다(일반적으로, 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989]; [Ausbel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing & Wiley-Interscience, NY, 1993] 참고). 부위 지향적 돌연변이 유발 키트는 예를 들어 QuikChange® 부위 지향적 돌연변이 유발 키트(Stratagene, 미국 캘리포니아주 라 호야 소재)와 같이, 상업적으로 이용가능하다. 카세트 돌연변이 유발은 문헌 [Wells et al., 1985, Gene, 34:315-323]에 기초하여 수행될 수 있다. 대안적으로, 돌연변이체는 어닐링, 라이게이션 및 PCR 증폭에 의한 총 유전자 합성 및 증폭 올리고뉴클레오티드의 클로닝에 의해 만들어질 수 있다.
- [0101] 한 실시양태에서, CH₁과 C_L 사이의 디설피드 결합이 완전히 존재하지 않으며, 예를 들어 사슬간 시스테인은 세린과 같은 또 다른 아미노산에 의해 대체될 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 분자의 기능적 Fab 단편 내에 사슬간 디설피드 결합이 존재하지 않는다. 본원에 참고로 통합된 W02005/003170과 같은 개시내용은 사슬간 디설피드 결합이 없는 Fab 단편을 제공하는 방법을 기술한다.
- [0102] 한 실시양태에서 화학식 (I) 및 화학식 (II)에서 정의된 바와 같은 폴리펩티드 사슬을 포함하거나 그로 이루어지는 상기 정의된 항체 분자는 CH₂ 도메인 및/또는 CH₃ 도메인을 포함하지 않는다.
- [0103] V₁은 dsFv, sdAb, scFv 또는 dsscFv, 예를 들어 dsFv, scFv 또는 dsscFv를 나타낸다.
- [0104] V₂는 dsFv, sdAb, scFv, 또는 dsscFv, 예를 들어 dsFv, scFv 또는 dsscFv를 나타낸다.
- [0105] 본원에서 사용되는 바와 같이, "단쇄 가변 단편" 또는 "scFv"는 V_H와 V_L 가변 도메인 사이의 펩티드 링커에 의해 안정화된 중쇄 가변 도메인(V_H) 및 경쇄 가변 도메인(V_L)을 포함하거나 그로 이루어지는 단쇄 가변 단편을 지칭한다. V_H 및 V_L 가변 도메인은 임의의 적합한 배향일 수 있으며, 예를 들면 V_H의 C-말단은 V_L의 N-말단에 연결될 수 있거나 또는 V_L의 C-말단은 V_H의 N-말단에 연결될 수 있다.
- [0106] 본원에서 사용되는 바와 같이, "디설피드-안정화된 단쇄 가변 단편" 또는 "dsscFv"는 V_H와 V_L 가변 도메인 사이의 펩티드 링커에 의해 안정화되고 또한 V_H와 V_L 사이의 도메인간 디설피드 결합을 포함하는 단쇄 가변 단편을 지칭한다.
- [0107] 본원에서 사용되는 바와 같이, "디설피드-안정화된 가변 단편" 또는 "dsFv"는 V_H와 V_L 가변 도메인 사이에 펩티드 링커를 포함하지 않고 그 대신에 V_H와 V_L 사이의 도메인간 디설피드 결합에 의해 안정화된 단쇄 가변 단편을 지칭한다.
- [0108] 본원에 사용되는 바와 같이, "단일 도메인 항체" 또는 "sdAb"는 단일 단량체성 가변 항체 도메인, 예컨대 V_H 또는 V_L 또는 V_{HH}로 이루어지는 항체 단편을 지칭한다.
- [0109] 한 실시양태에서, V₁ 및 V₂는 모두 dsFv이다. V₁ 및 V₂ 둘 모두가 dsFv일 때, V_H 또는 V_L 가변 도메인은 V₁ 및 V₂에 대해 동일하다. 한 실시양태에서, V₁ 및 V₂는 동일한 V_H 가변 도메인을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, V₁ 및 V₂는 동일한 V_L 가변 도메인을 갖는다. 한 실시양태에서, V_H 및 V_L 가변 도메인은 V₁ 및 V₂에 대해 동일하다. 후자는 일부 표적에 바람직할 수 있는 가교결합을 허용한다.
- [0110] 한 실시양태에서, V₁은 dsFv이고, V₂는 scFv이다. 한 실시양태에서, V₁은 scFv이고, V₂는 dsFv이다. 한 실시양태에서, V₁은 dsscFv이고, V₂는 dsFv이다. 한 실시양태에서, V₁은 dsFv이고, V₂는 dsscFv이다. 한 실시양태에서, V₁은 dsscFv이고, V₂는 scFv이다. 한 실시양태에서, V₁은 scFv이고, V₂는 dsscFv이다. 한 실시양태에서, V₁은 scFv가 아니다. 한 실시양태에서, V₂는 scFv가 아니다. 한 실시양태에서, V₁ 및 V₂ 둘 모두가 scFv가 아니다.
- [0111] V₁ 및/또는 V₂가 dsFv 또는 dsscFv인 실시양태에서, V₁의 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 및/또는 V₂의 경쇄 및 중쇄 가변 도메인은 2개의 조작된 시스테인 잔기 사이의 디설피드 결합에 의해 연결된다. V₁ 및/또는 V₂의 가변 도메인 V_H와 V_L 사이의 디설피드 결합은 하기 열거된 2개의 잔기 사이에 있다(문맥이 달리 나타내지 않는 한, 카바

트(Kabat) 넘버링이 하기 목록에서 이용됨). 카바트 넘버링이 언급되는 경우, 관련 참고문헌은 [Kabat et al, 1987, in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA]이다.

- [0112] 한 실시양태에서, 디슬피드 결합은 다음을 포함하는 군으로부터 선택되는 위치에 있고, 여기서 VH 및 VL 값은 제시된 V1 또는 V2 내에서 독립적으로 선택된다:
- [0113] · VH37 + VL95, 예를 들면 문헌 [Protein Science 6, 781-788 Zhu et al. (1997)] 참고;
- [0114] · VH44 + VL100, 예를 들면 문헌 [Biochemistry 33 5451-5459 Reiter et al. (1994)]; 또는 [Journal of Biological Chemistry Vol. 269 No. 28 pp.18327-18331 Reiter et al. (1994)]; 또는 [Protein Engineering, vol.10 no.12 pp.1453-1459 Rajagopal et al. (1997)] 참고;
- [0115] · VH44 + VL105, 예를 들면 문헌 [J Biochem. 118, 825-831 Luo et al. (1995)] 참고;
- [0116] · VH45 + VL87, 예를 들면 문헌 [Protein Science 6, 781-788 Zhu et al. (1997)] 참고;
- [0117] · VH55 + VL101, 예를 들면 문헌 [FEBS Letters 377 135-139 Young et al. (1995)] 참고;
- [0118] · VH100 + VL50, 예를 들면 문헌 [Biochemistry 29 1362-1367 Glockshuber et al. (1990)] 참고;
- [0119] · VH100b + VL49;
- [0120] · VH98 + VL46, 예를 들면 문헌 [Protein Science 6, 781-788 Zhu et al. (1997)];
- [0121] · VH101 + VL46;
- [0122] · VH105 + VL43, 예를 들면 문헌 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 90 pp.7538-7542 Brmkmann et al. (1993)]; 또는 [Proteins 19, 35-47 Jung et al. (1994)] 참고;
- [0123] · VH106 + VL57, 예를 들면 문헌 [FEBS Letters 377 135-139 Young et al. (1995)] 참고.
- [0124] 상기 열거된 아미노산 쌍은 디슬피드 결합이 형성될 수 있도록 시스테인에 의한 대체에 도움이 되는 위치 내에 있다. 시스테인은 공지된 기술에 의해 이들 원하는 위치 내로 조작될 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서 본 개시내용에 따른 조작된 시스테인은 제시된 아미노산 위치에서 자연적으로 발생하는 잔기가 시스테인 잔기로 대체된 경우를 지칭한다.
- [0125] 조작된 시스테인의 도입은 관련 기술 분야에 알려진 임의의 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 이들 방법은 비제한적으로, PCR 연장 중첩 돌연변이 유발, 부위 지향적 돌연변이 유발 또는 카세트 돌연변이 유발을 포함한다(일반적으로, 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989]; [Ausbel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing & Wiley-Interscience, NY, 1993] 참고). 부위 지향적 돌연변이 유발 키트는 예를 들어 QuikChange® 부위 지향적 돌연변이 유발 키트(Stratagene, 미국 캘리포니아주 라 호야 소재)와 같이, 상업적으로 이용가능하다. 카세트 돌연변이 유발은 문헌 [Wells et al., 1985, Gene, 34:315-323]에 기초하여 수행될 수 있다. 대안적으로, 돌연변이체는 어닐링, 라이게이션 및 PCR 증폭에 의한 총 유전자 합성 및 중첩 올리고뉴클레오티드의 클로닝에 의해 만들어질 수 있다.
- [0126] 따라서, 한 실시양태에서 V1 및/또는 V2가 dsFv 또는 dsscFv인 경우, V1의 가변 도메인 VH 및 VL 및/또는 V2의 가변 도메인 VH 및 VL은 2개의 시스테인 잔기 사이의 디슬피드 결합에 의해 연결될 수 있고, 여기서 시스테인 잔기 쌍의 위치는 VH37과 VL95, VH44와 VL100, VH44와 VL105, VH45와 VL87, VH100과 VL50, VH100b와 VL49, VH98과 VL46, VH101과 VL46, VH105와 VL43, 및 VH106과 VL57로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0127] 한 실시양태에서, V1 및/또는 V2가 dsFv 또는 dsscFv인 경우, V1의 가변 도메인 VH 및 VL 및/또는 V2의 가변 도메인 VH 및 VL은 CDR의 외부에 있는 2개의 시스테인 잔기(VH에 하나 및 VL에 하나) 사이의 디슬피드 결합에 의해 연결될 수 있고, 여기서 시스테인 잔기 쌍의 위치는 VH37과 VL95, VH44와 VL100, VH44와 VL105, VH45와 VL87, VH100과 VL50, VH98과 VL46, VH105와 VL43, 및 VH106과 VL57로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0128] 한 실시양태에서, V1이 dsFv 또는 dsscFv인 경우, V1의 가변 도메인 VH 및 VL은 2개의 조작된 시스테인 잔기(위치 VH44에 하나 및 VL100에 다른 하나) 사이의 디슬피드 결합에 의해 연결된다.
- [0129] 한 실시양태에서, V2가 dsFv 또는 dsscFv인 경우, V2의 가변 도메인 VH 및 VL은 2개의 조작된 시스테인 잔기(위

치 VH44에 하나 및 VL100에 다른 하나) 사이의 디술피드 결합에 의해 연결된다.

- [0130] 한 실시양태에서, V1 및 V2가 dsFv 또는 dsscFv인 경우, V1 및 V2의 가변 도메인 VH 및 VL은 2개의 조작된 시스템인 잔기(위치 VH44에 하나 및 VL100에 다른 하나) 사이의 디술피드 결합에 의해 연결된다.
- [0131] 한 실시양태에서, V1 및 V2 둘 모두가 dsscFv인 경우, V1 및 V2의 가변 도메인 VH 및 VL은 2개의 조작된 시스템인 잔기(위치 VH44에 하나 및 VL100에 다른 하나) 사이의 디술피드 결합에 의해 연결된다.
- [0132] 한 실시양태에서, V1이 dsFv, dsscFv 또는 scFv인 경우, V1의 VH 도메인은 예를 들어 펩티드 결합을 통해 X에 부착된다.
- [0133] 한 실시양태에서, V1이 dsFv, dsscFv 또는 scFv인 경우, V1의 VL 도메인은 예를 들어 펩티드 결합을 통해 X에 부착된다.
- [0134] 한 실시양태에서, V2가 dsFv, dsscFv 또는 scFv인 경우, V2의 VH 도메인은 예를 들어 펩티드 결합을 통해 Y에 부착된다.
- [0135] 한 실시양태에서, V2가 dsFv, dsscFv 또는 scFv인 경우, V2의 VL 도메인은 예를 들어 펩티드 결합을 통해 Y에 부착된다.
- [0136] 통상의 기술자는 V1 및/또는 V2가 dsFv를 나타내는 경우, 다중특이적 항체는 X 또는 Y에 부착되지 않은 상응하는 자유 VH 또는 VL 도메인을 코딩하는 제3 폴리펩티드를 포함할 것임을 인식할 것이다. V1 및 V2 둘 모두가 dsFv인 경우, "자유 가변 도메인"(즉, 폴리펩티드의 나머지에 디술피드 결합을 통해 연결된 도메인)은 두 사슬에 공통적일 것이다. 따라서, 폴리펩티드에 X 또는 Y를 통해 융합되거나 연결된 실제 가변 도메인은 각각의 폴리펩티드 사슬에서 상이할 수 있지만, 이와 쌍을 형성한 가변 도메인은 일반적으로 서로 동일할 것이다.
- [0137] 한 실시양태에서, X는 결합이다.
- [0138] 한 실시양태에서, Y는 결합이다.
- [0139] 한 실시양태에서, X와 Y는 둘 모두 결합이다.
- [0140] 한 실시양태에서, X는 링커, 바람직하게는 펩티드 링커, 예를 들어 부분 CH₁ 및 V1을 연결하기 위해 적합한 펩티드이다.
- [0141] 한 실시양태에서, Y는 링커, 바람직하게는 펩티드 링커, 예를 들어 부분 C_L 및 V₂를 연결하기 위해 적합한 펩티드이다.
- [0142] 한 실시양태에서, X 및 Y는 둘 모두 링커이다. 한 실시양태에서, X 및 Y는 둘 모두 펩티드 링커이다.
- [0143] 본원에서 사용되는 용어 "펩티드 링커"는 아미노산으로 이루어진 펩티드를 지칭한다. 다양한 적합한 펩티드 링커가 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 알려져 있을 것이다.
- [0144] 한 실시양태에서, X 및/또는 Y 펩티드 링커의 길이는 50개 이하의 아미노산, 예를 들어 20개 이하의 아미노산, 예컨대 약 15개 이하의 아미노산, 예컨대 9, 10, 11, 12, 13 또는 14개의 아미노산이다.
- [0145] 한 실시양태에서, X 및/또는 Y 링커는 서열 1 내지 서열 67로 나타낸 서열로부터 선택된다.
- [0146] 한 실시양태에서, X 및/또는 Y 링커는 서열 번호(SEQ ID NO:) 1 또는 서열 번호 2에 제시된 서열로부터 선택된다.
- [0147] 한 실시양태에서, X는 서열 SGGGGTGGGGS(서열 번호 1)를 갖는다.
- [0148] 한 실시양태에서, Y는 서열 SGGGGTGGGGS(서열 번호 1)를 갖는다.
- [0149] 한 실시양태에서, X는 서열 SGGGGSGGGGS(서열 번호 2)를 갖는다.
- [0150] 한 실시양태에서, Y는 서열 SGGGGSGGGGS(서열 번호 2)를 갖는다.
- [0151] 한 실시양태에서, X는 서열 번호 1에 제시된 서열을 갖고, Y는 서열 번호 2에 제시된 서열을 갖는다.
- [0152] 한 실시양태에서, X는 서열 번호 2에 제시된 서열을 갖고, Y는 서열 번호 1에 제시된 서열을 갖는다.
- [0153] 한 실시양태에서, X는 서열 번호 2에 제시된 서열을 갖고, Y는 서열 번호 2에 제시된 서열을 갖는다.

[0154] 한 실시양태에서, X는 서열 번호 69 또는 70에 제시된 서열을 갖는다. 한 실시양태에서, X는 서열 번호 69 또는 70에 제시된 서열을 갖는다. 한 실시양태에서, X는 서열 번호 69에 제시된 서열을 갖고, Y는 서열 번호 70에 제시된 서열을 갖는다.

[0155] X 및/또는 Y에 적합한 링커 서열은 하기 표 1 및 표 2에 또한 제시된다.

[0156] <표 1> 힌지 링커 서열

서열 번호	서열
3	DKTHTCAA
4	DKTHTCPPCPA
5	DKTHTCPPCPATCPPCPA
6	DKTHTCPPCPATCPPCPATCPPCPA
7	DKTHTCPPCPAGKPTLYNSLVMSDTAGTCY
8	DKTHTCPPCPAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
9	DKTHTCCVECPCPA
10	DKTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPA
11	DKTHTCPSCPA

[0157]

[0158] <표 2> 가요성(flexible) 링커 서열

서열 번호	서열
12	SGGGGSE
13	DKHTS
14	(S)GGGGS
15	(S)GGGGSGGGGS
16	(S)GGGGSGGGGS
17	(S)GGGGSGGGGS
18	(S)GGGGSGGGGS
19	AAAGSG-GASAS
20	AAAGSG-XGGGS-GASAS
21	AAAGSG-XGGGSXGGGS -GASAS
22	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGS -GASAS
23	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGSXGGGS-GASAS
24	AAAGSG-XS-GASAS
25	PGNRRGTTTTRRPATTGSSPGPTQSHY
26	ATTTGSSPGPT
27	ATTTGS
-	GS

[0159]

28	EPSGPISTINSPPSKESHKSP
29	GTVAAPSVFIFPPSD
30	GGGGIAPSMVGGGGS
31	GGGGKVEGAGGGGGS
32	GGGGSMKSHDGGGGS
33	GGGGNLITIVGGGGS
34	GGGGVVPSLPGGGGS
35	GGEKSIPGGGGS
36	RPLSYRPPFPFGFPSVRP
37	YPRSIYIRRRHPSPSLTT
38	TPSHLSHILPSFGLPTFN
39	RPVSPFTFPRLSNSWLPA
40	SPA AHFPRSIPRPGPIRT
41	APGPSAPSHRSLPSRAFG
42	PRNSIHFLHPLLVAPLGA
43	MPSLSGVLQVRYLSPDDL
44	SPQYPSPLTLTLPPHPSL
45	NPSLNPPSYLHRAPSRIS
46	LPWRTSLLPSLPLRRP
47	PPLFAKGPVGLLSRSFPP
48	VPPAPVVSLRSAHARPPY
49	LRPTPPRVRSYTCCPTP-
50	PNVAHVLP LLTVPWDNLR
51	CNPLLPLCARSPAVRTEP

[0160]

[0161]

(S)는 서열 14 내지 18에서 선택적이다.

[0162]

경질(rigid) 링커의 예는 펩티드 서열 GAPAPAAPAPA(서열 번호 52), PPPP(서열 번호 53) 및 PPP를 포함한다.

[0163]

한 실시양태에서, 펩티드 링커는 알부민 결합 펩티드이다.

[0164]

알부민 결합 펩티드의 예는 W02007/106120에 제공되고, 다음을 포함한다:

[0165]

<표 3>

서열 번호	서열 번호
54	DLCLRDWGCLW
55	DICLPRWGCLW
56	MEDICLPRWGCLWGD
57	QRLMEDICLPRWGCLWEDDE
58	QGLIGDICLPRWGCLWGRSV
59	QGLIGDICLPRWGCLWGRSVK

[0166]

60	EDICLPRWGCLWEDD
61	RLMEDICLPRWGCLWEDD
62	MEDICLPRWGCLWEDD
63	MEDICLPRWGCLWED
64	RLMEDICLARWGCLWEDD
65	EVRSFCTRWPAEKSCKPLRG
66	RAPESFVCYWETICFERSEQ
67	EMCYFPGICWM

[0167]

링커로서 일부인 결합 펩티드를 유리하게 사용하면, 다중 특이적 항체 분자의 반감기가 증가될 수 있다.

[0168]

한 실시양태에서, V1 및 V2 중 1 이상은 scFv 또는 dsscFv이다. 예를 들어, V1은 scFv 또는 dsscFv이고, V2는 scFv 또는 dsscFv이다.

[0169]

한 실시양태에서, V1은 dsscFv이고, V2는 dsscFv이다.

[0170]

V1이 scFv 또는 dsscFv인 실시양태에서, V1은 하기 a 또는 b의 폴리펩티드 사슬을 포함하거나 그로 이루어진다:

[0171]

a. 화학식 (III): VH2-Z1-VL2, VH2는, 예를 들어 펩티드 결합을 통해 X에 부착됨;

[0172]

b. 화학식 (IV): VL2-Z1-VH2, VL2는, 예를 들어 펩티드 결합을 통해 X에 부착됨)

[0173]

여기서, VH2는 중쇄 가변 도메인을 나타내고, Z1은 링커, 예를 들어 펩티드 링커를 나타내고, VL2는 경쇄 가변 도메인을 나타낸다.

[0174]

V2가 scFv 또는 dsscFv인 실시양태에서, V2는 하기 a 또는 b의 폴리펩티드 사슬을 포함하거나 그로 이루어진다:

[0175]

a. 화학식 (V): VH3-Z2-VL3, VH3은, 예를 들어 펩티드 결합을 통해 Y에 부착됨;

[0176]

b. 화학식 (VI): VL3-Z2-VH3, VL3은, 예를 들어 펩티드 결합을 통해 Y에 부착됨)

[0177]

여기서, VH3은 중쇄 가변 도메인을 나타내고, Z2는 링커, 예를 들어 펩티드 링커를 나타내고, VL3은 경쇄 가변 도메인을 나타낸다.

[0178]

한 실시양태에서, scFv 또는 dsscFv 내의 펩티드 링커 Z1 및/또는 Z2의 길이는 약 12 내지 25개 아미노산, 예컨대 15 내지 20개 아미노산 범위이다.

[0179]

V1이 scFv 또는 dsscFv인 한 실시양태에서, V1의 가변 도메인 VH 및 VL을 연결하는 링커 Z1은 서열 GGGGSGGGGSGGGGSGGGG(서열 번호 68)를 갖는다.

[0180]

V2가 scFv 또는 dsscFv인 한 실시양태에서, V2의 가변 도메인 VH 및 VL을 연결하는 링커 Z2는 서열 GGGGSGGGGSGGGGSGGGG(서열 번호 68)를 갖는다.

[0181]

V1이 scFv 또는 dsscFv인 한 실시양태에서, V1의 가변 도메인 VH 및 VL을 연결하는 링커 Z1은 서열 SGGGSGGGGSGGGG(서열 번호 69)를 갖는다.

[0182]

V2가 scFv 또는 dsscFv인 한 실시양태에서, V2의 가변 도메인 VH 및 VL을 연결하는 링커 Z2는 서열 SGGGSGGGGSGGGG(서열 번호 69)를 갖는다.

[0183]

V1이 scFv 또는 dsscFv인 한 실시양태에서, V1의 가변 도메인 VH 및 VL을 연결하는 링커 Z1은 서열 SGGGSGGGGTGGGG(서열 번호 70)를 갖는다.

[0184]

V2가 scFv 또는 dsscFv인 한 실시양태에서, V2의 가변 도메인 VH 및 VL을 연결하는 링커 Z2는 서열 SGGGSGGGGTGGGG(서열 번호 70)를 갖는다.

[0185]

따라서, 한 측면에서, 하기 a) 및 b)를 포함하거나 그로 이루어진 다중특이적 항체 분자가 제공된다:

[0186]

a) 화학식 (I)의 폴리펩티드 사슬:

[0187]

VH1-CH1-X-V1;

[0188]

- [0189] b) 화학식 (II)의 폴리펩티드 사슬:
- [0190] **VL1-CL-Y-V2**
- [0191] 상기 식에서,
- [0192] VH1은 중쇄 가변 도메인을 나타내고;
- [0193] CH1은 중쇄 불변 영역의 도메인, 예를 들어 그의 도메인 1을 나타내고;
- [0194] X는 서열 번호 2에 제시된 서열을 갖는 링커를 나타내고;
- [0195] Y는 서열 번호 2에 제시된 서열을 갖는 링커를 나타내고;
- [0196] V1은 화학식 (III) VH2-Z1-VL2의 폴리펩티드 사슬을 포함하거나 그로 이루어진 dsscFv를 나타내고, 여기서 VH2는 중쇄 가변 도메인을 나타내고, Z1은 서열 번호 68에 제시된 서열을 갖는 링커를 나타내고, VL2는 경쇄 가변 도메인을 나타내며, VH2는 예를 들어 펩티드 결합을 통해 X에 부착되고, V1의 가변 도메인 VH2 및 VL2는 2개의 조작된 시스테인 잔기(위치 VH44에 하나 및 VL100에 다른 하나) 사이의 디설피드 결합에 의해 연결되고;
- [0197] VL1은 경쇄 가변 도메인을 나타내고;
- [0198] CL은 경쇄 불변 영역으로부터의 도메인, 예컨대 C카파를 나타내고;
- [0199] V2는 화학식 (V) VH3-Z2-VL3의 폴리펩티드 사슬을 포함하거나 그로 이루어진 dsscFv를 나타내고, 여기서 VH3은 중쇄 가변 도메인을 나타내고, Z2는 서열 번호 68에 제시된 서열을 갖는 링커를 나타내고, VL3은 경쇄 가변 도메인을 나타내며, VH3은 예를 들어 펩티드 결합을 통해 Y에 부착되고, V2의 가변 도메인 VH3 및 VL3은 2개의 조작된 시스테인 잔기(위치 VH44에 하나 및 VL100에 다른 하나) 사이의 디설피드 결합에 의해 연결되고;
- [0200] 여기서, VH1 및 VL1은 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인을 포함하고; V1은 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인을 포함하고, V2는 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인을 포함하거나; 또는 V2는 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인을 포함하고, V1은 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인을 포함한다.
- [0201] 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인은 CDRH1에 대해 서열 번호 85에 제시된 서열을 갖는 CDR, CDRH2에 대해 서열 번호 86에 제시된 서열을 갖는 CDR 및 CDRH3에 대해 서열 번호 87에 제시된 서열을 갖는 CDR 중 1 이상을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인은 CDRH1에 대해 서열 번호 85, CDRH2에 대해 서열 번호 86 및 CDRH3에 대해 서열 번호 87에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인은 3개의 중쇄 CDR을 포함하고, CDRH1의 서열은 서열 번호 85에 제시된 서열에 대해 적어도 60%의 동일성 또는 유사성을 가지며, CDRH2의 서열은 서열 번호 86에 제시된 서열에 대해 적어도 60%의 동일성 또는 유사성을 가지며, CDRH3의 서열은 서열 번호 87에 제시된 서열에 대해 적어도 60%의 동일성 또는 유사성을 갖는다.
- [0202] 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인은 CDRL1에 대해 서열 번호 88 또는 서열 번호 136에 제시된 서열을 갖는 CDR, CDRL2에 대해 서열 번호 89, 서열 번호 137, 서열 번호 138 또는 서열 번호 139에 제시된 서열을 갖는 CDR 및 CDRL3에 대해 서열 번호 90에 제시된 서열을 갖는 CDR 중 1 이상을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인은 CDRL1에 대해 서열 번호 88 또는 서열 번호 136, CDRL2에 대해 서열 번호 89, 서열 번호 137, 서열 번호 138 또는 서열 번호 139 및 CDRL3에 대해 서열 번호 90에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인은 3개의 경쇄 CDR을 포함하고, CDRL1의 서열은 서열 번호 88 또는 서열 번호 136에 제시된 서열에 대해 적어도 60%의 동일성 또는 유사성을 가지며, CDRL2의 서열은 서열 번호 89, 서열 번호 137, 서열 번호 138 또는 서열 번호 139에 제시된 서열에 대해 적어도 60%의 동일성 또는 유사성을 가지며, CDRL3의 서열은 서열 번호 90에 제시된 서열에 대해 적어도 60%의 동일성 또는 유사성을 갖는다.
- [0203] 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인은 CDRH1에 대해 서열 번호 85, CDRH2에 대해 서열 번호 86 및 CDRH3에 대해 서열 번호 87에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 88, CDRL2에 대해 서열 번호 89 및 CDRL3에 대해 서열 번호 90에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR을 포함한다.
- [0204] 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인은 CDRH1에 대해 서열 번호 85, CDRH2에 대해 서열 번호 86 및 CDRH3에 대해 서열 번호 87에 제시된 서열을 갖는 3

개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 136, CDRL2에 대해 서열 번호 89, 서열 번호 137, 서열 번호 138 또는 서열 번호 139 및 CDRL3에 대해 서열 번호 90에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR을 포함한다.

- [0205] 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인은 서열 번호 92 또는 서열 번호 96에 제시된 서열을 포함하거나; 서열 번호 92 또는 서열 번호 96에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는 서열 번호 92 또는 서열 번호 96에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3이 CDRH1에 대해 서열 번호 85, CDRH2에 대해 서열 번호 86 및 CDRH3에 대해 서열 번호 87에 제시된 서열을 갖는 것인 중쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0206] 한 예에서, 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인은 인간화된다. 본 발명의 인간화 항체에서, 수여자 (acceptor) 중쇄 및 경쇄는 반드시 동일한 항체로부터 유래 될 필요는 없으며, 원한다면 상이한 사슬에서 유래된 프레임워크 영역을 갖는 복합 사슬을 포함할 수 있다.
- [0207] 한 예에서, 본 발명의 TNF-알파 결합 도메인의 중쇄에 적합한 하나의 상기 프레임워크 영역은 인간 VH3 1-3 3-21 JH4 수여자 프레임워크로부터 유래된다.
- [0208] 따라서, 한 예에서, TNF-알파에 특이적인 결합 도메인은 CDR-H1에 대해 서열 번호 85에 제시된 서열, CDR-H2에 대해 서열 번호 86에 제시된 서열 및 CDRH3에 대해 서열 번호 87에 제시된 서열로부터 선택된 하나 이상의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하고, 여기서 중쇄 프레임워크 영역은 인간 수여자 프레임워크 VH3 1-3 3-21 JH4로부터 유래된다.
- [0209] 본 발명의 인간화 항체에서, 프레임워크 영역은 수여자 항체와 정확히 동일한 서열을 가질 필요는 없다. 예를 들어, 비정상적인 잔기는 수여자 사슬 클래스 또는 유형에 대해 보다 빈번하게 발생하는 잔기로 변경될 수 있다. 대안적으로, 수여자 프레임워크 영역에서 선택된 잔기는 공여자 항체 내의 동일한 위치에서 발견되는 잔기에 대응하도록 변경될 수 있다(문헌 [Reichmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324] 참조). 이러한 변화는 공여자 항체의 친화도를 회복시키는데 필요한 최소한으로 유지되어야 한다. 변경될 필요가 있을 수 있는 수여자 프레임워크 영역 내의 잔기를 선택하기 위한 프로토콜은 W091/09967에 개시되어 있다.
- [0210] 따라서, 한 실시양태에서, 중쇄 및/또는 경쇄 프레임워크에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 잔기가 대체 아미노산 잔기로 대체된다.
- [0211] 따라서, 한 예에서, TNF-알파에 특이적인 결합 도메인은 중쇄 가변 도메인을 포함하며, 여기서 중쇄의 가변 도메인의 위치 24, 48, 49, 71, 73, 78 및 93(카바트 넘버링)의 잔기 중 1 이상은 공여자 잔기이며, 예를 들어 서열 번호 92 또는 서열 번호 96에 제시된 서열을 참조한다.
- [0212] 한 실시양태에서, 중쇄 가변 도메인의 잔기 24는 대체 아미노산, 예를 들어 트레오닌으로 대체된다.
- [0213] 한 실시양태에서, 중쇄 가변 도메인의 잔기 48은 대체 아미노산, 예를 들어 이소류신으로 대체된다.
- [0214] 한 실시양태에서, 중쇄 가변 도메인의 잔기 49는 대체 아미노산, 예를 들어 글리신으로 대체된다.
- [0215] 한 실시양태에서, 중쇄 가변 도메인의 잔기 71은 대체 아미노산, 예를 들어 발린으로 대체된다.
- [0216] 한 실시양태에서, 중쇄 가변 도메인의 잔기 73은 대체 아미노산, 예를 들어 라이신으로 대체된다.
- [0217] 한 실시양태에서, 중쇄 가변 도메인의 잔기 78은 대체 아미노산, 예를 들어 알라닌으로 대체된다.
- [0218] 한 실시양태에서, 중쇄 가변 도메인의 잔기 93은 대체 아미노산, 예를 들어 트레오닌으로 대체된다.
- [0219] 한 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 인간화된 항-TNF 알파 중쇄 가변 도메인에서 잔기 48은 이소류신이고, 잔기 49는 글리신이고, 71은 발린이고, 73은 라이신이고, 78은 알라닌이고, 잔기 93은 트레오닌이다.
- [0220] 따라서, 한 예에서, 인간화된 TNF-알파 결합 도메인이 제공되고, 여기서 적어도 중쇄의 가변 도메인의 위치 48, 49, 71, 73, 78 및 93(카바트 넘버링)의 각각의 위치의 잔기는 공여자 잔기이며, 예를 들어 서열 번호 92 또는 서열 번호 96에 제시된 서열을 참조한다.
- [0221] 한 예에서, 인간화된 TNF-알파 결합 도메인이 제공되고, 여기서 적어도 중쇄의 가변 도메인의 위치 24, 48, 49, 71, 73, 78 및 93(카바트 넘버링)의 각각의 위치의 잔기는 공여자 잔기이다.
- [0222] 한 예에서, 본 발명의 인간화된 TNF-알파 결합 도메인의 경쇄에 적합한 프레임워크 영역은 인간 수여자 프레임

워크 VK1 2-1(U) A20 JK2로부터 유래된다.

- [0223] 따라서, 한 예에서, TNF-알파에 특이적인 결합 도메인은 CDR-L1에 대해 서열 번호 88 또는 136에 제시된 서열, CDR-L2에 대해 서열 번호 89, 137, 138 또는 139에 제시된 서열 및 CDRL3에 대해 서열 번호 90에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 여기서 경쇄 프레임워크 영역은 인간 수여자 프레임워크 VK1 2-1(U) A20 JK2로부터 유래된다.
- [0224] 한 예에서, TNF-알파에 특이적인 결합 도메인은 경쇄의 가변 도메인의 위치 65, 71 및 87(카바트 넘버링)의 하나 이상의 잔기가 공여자 잔기인 인간화 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 예를 들어 서열 번호 91 또는 서열 번호 95에 제시된 서열을 참조한다.
- [0225] 한 예에서, 인간화된 TNF-알파 결합 도메인이 제공되고, 여기서 적어도 경쇄의 가변 도메인의 위치 65, 71 및 87(카바트 넘버링)의 각각의 위치의 잔기는 공여자 잔기이며, 예를 들어 서열 번호 91 또는 95에 제시된 서열을 참조한다.
- [0226] 한 실시양태에서, 경쇄 가변 도메인의 잔기 65는 대체 아미노산, 예를 들어 트레오닌으로 대체된다.
- [0227] 한 실시양태에서, 경쇄 가변 도메인의 잔기 71은 대체 아미노산, 예를 들어 티로신으로 대체된다.
- [0228] 한 실시양태에서, 경쇄 가변 도메인의 잔기 87은 대체 아미노산, 예를 들어 페닐알라닌으로 대체된다.
- [0229] 한 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 인간화된 항-TNF-알파 경쇄 가변 영역에서 잔기 65는 트레오닌이고, 잔기 71은 티로신이고, 잔기 87은 페닐알라닌이다.
- [0230] 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인은 서열 번호 91 또는 서열 번호 95에 제시된 서열을 포함하거나; 서열 번호 91 또는 서열 번호 95에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는 서열 번호 91 또는 서열 번호 95에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3이 CDRL1에 대해 서열 번호 88, CDRL2에 대해 서열 번호 89 및 CDRL3에 대해 서열 번호 90에 제시된 서열을 갖는 것인 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0231] 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인은 서열 번호 91에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인 및 서열 번호 92에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0232] 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인은 서열 번호 147에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인 및 서열 번호 92에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0233] 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인은 서열 번호 95에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인 및 서열 번호 96에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0234] 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 항체는 인간 TNF-알파에 특이적인 dsscFv를 포함하고, dsscFv는 서열 번호 101에 제시된 서열을 포함하거나; 서열 번호 101에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는 서열 번호 101에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3이 CDRH1에 대해 서열 번호 85, CDRH2에 대해 서열 번호 86 및 CDRH3에 대해 서열 번호 87에 제시된 서열을 가지며 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3이 CDRL1에 대해 서열 번호 88, CDRL2에 대해 서열 번호 89 및 CDRL3에 대해 서열 번호 90에 제시된 서열을 갖는다.
- [0235] 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 항체는 인간 TNF-알파에 특이적인 scFv를 포함하고, scFv는 서열 번호 99에 제시된 서열을 포함하거나; 서열 번호 99에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는 서열 번호 99에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3이 CDRH1에 대해 서열 번호 85, CDRH2에 대해 서열 번호 86 및 CDRH3에 대해 서열 번호 87에 제시된 서열을 가지며 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3이 CDRL1에 대해 서열 번호 88, CDRL2에 대해 서열 번호 89 및 CDRL3에 대해 서열 번호 90에 제시된 서열을 갖는다.
- [0236] 항체 분자가 상기 정의된 바와 같은 화학식 (I) 및 화학식 (II)의 폴리펩티드 사슬을 포함하거나 그로 이루어진 본 발명의 측면에서, 항체 분자는 CDRH1에 대해 서열 번호 85, CDRH2에 대해 서열 번호 86 및 CDRH3에 대해 서

열 번호 87에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 88 또는 136, CDRL2에 대해 서열 번호 89 또는 137 또는 138 또는 139, 및 CDRL3에 대해 서열 번호 90에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR을 포함할 수 있고, 이들은 항체 분자에서 위치 V_{H1}/V_{L1} 에 존재한다. 한 실시양태에서, CDRH1에 대해 서열 번호 85, CDRH2에 대해 서열 번호 86 및 CDRH3에 대해 서열 번호 87에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 88 또는 136, CDRL2에 대해 서열 번호 89 또는 137 또는 138 또는 139, 및 CDRL3에 대해 서열 번호 90에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR은 본 개시내용의 구축물에서 위치 V_1 에 존재한다. 한 실시양태에서, CDRH1에 대해 서열 번호 85, CDRH2에 대해 서열 번호 86 및 CDRH3에 대해 서열 번호 87에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 88 또는 136, CDRL2에 대해 서열 번호 89 또는 137 또는 138 또는 139, 및 CDRL3에 대해 서열 번호 90에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR은 본 개시내용의 구축물에서 위치 V_2 에 존재한다. 한 실시양태에서, CDRH1에 대해 서열 번호 85, CDRH2에 대해 서열 번호 86 및 CDRH3에 대해 서열 번호 87에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 88 또는 136, CDRL2에 대해 서열 번호 89 또는 137 또는 138 또는 139, 및 CDRL3에 대해 서열 번호 90에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR은 본 개시내용의 구축물에서 위치 V_1 및 V_2 에 존재한다. 한 실시양태에서, CDRH1에 대해 서열 번호 85, CDRH2에 대해 서열 번호 86 및 CDRH3에 대해 서열 번호 87에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 88 또는 136, CDRL2에 대해 서열 번호 89 또는 137 또는 138 또는 139, 및 CDRL3에 대해 서열 번호 90에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR은 본 개시내용의 구축물에서 위치 $VH1/VL1$ 및 V_1 에 존재한다. 한 실시양태에서, CDRH1에 대해 서열 번호 85, CDRH2에 대해 서열 번호 86 및 CDRH3에 대해 서열 번호 87에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 88 또는 136, CDRL2에 대해 서열 번호 89 또는 137 또는 138 또는 139, 및 CDRL3에 대해 서열 번호 90에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR은 본 개시내용의 구축물에서 위치 $VH1/VL1$ 및 V_2 에 존재한다.

[0237] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 화학식 (I) 및 화학식 (II)의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 항체 분자 내의 TNF-알파 결합 부위는 서열 번호 92 및 서열 번호 96으로부터 선택되는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호 91 및 서열 번호 95로부터 선택되는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 특히 중쇄 및 경쇄에 대해 각각 서열 번호 92 및 91 또는 서열 번호 96 및 95를 포함한다. 한 실시양태에서, 이들 도메인은 본 개시내용의 구축물에서 $VH1/VL1$ 에 존재한다. 한 실시양태에서, 이들 가변 도메인은 위치 V_1 에 존재한다. 한 실시양태에서, 이들 가변 도메인은 위치 V_2 에 존재한다. 한 실시양태에서, 이들 가변 도메인은 위치 V_1 및 V_2 에 존재한다. 한 실시양태에서, 이들 가변 도메인은 본 개시내용의 구축물에서 위치 $VH1/VL1$ 및 V_1 에 존재한다. 한 실시양태에서, 이들 가변 도메인은 본 개시내용의 구축물에서 위치 $VH1/VL1$ 및 V_2 에 존재한다. 가변 도메인이 본 개시내용의 구축물에서 2개의 위치에 존재하는 경우, 동일한 쌍의 가변 도메인이 각각의 위치에 존재할 수 있거나 2개의 상이한 쌍의 가변 도메인이 사용될 수 있다.

[0238] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 화학식 (I) 및 화학식 (II)의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 항체 분자 내의 TNF-알파 결합 부위는 인간 TNF-알파에 특이적인 dsscFv를 포함하고, dsscFv는 서열 번호 101에 제시된 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 서열 번호 101에 제시된 서열을 포함하는 dsscFv는 위치 V_1 및/또는 V_2 에 존재한다. 한 실시양태에서, 서열 번호 101에 제시된 서열을 포함하는 dsscFv는 위치 V_1 에 존재한다. 한 실시양태에서, 서열 번호 101에 제시된 서열을 포함하는 dsscFv는 위치 V_2 에 존재한다.

[0239] 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인은 CDRH1에 대해 서열 번호 71, CDRH2에 대해 서열 번호 72 및 CDRH3에 대해 서열 번호 73에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인은 3개의 중쇄 CDR을 포함하고, CDRH1의 서열은 서열 번호 71에 제시된 서열에 대해 적어도 60%의 동일성 또는 유사성을 갖고, CDRH2의 서열은 서열 번호 72에 제시된 서열에 대해 적어도 60%의 동일성 또는 유사성을 갖고, CDRH3의 서열은 서열 번호 73에 제시된 서열에 대해 적어도 60%의 동일성 또는 유사성을 갖는다.

[0240] 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인은 CDRL1에 대해 서열 번호 74, CDRL2에 대해 서열 번호 75 및 CDRL3에 대해 서열 번호 76에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인은 3개의 경쇄 CDR을 추가로 포함하고, CDRL1의 서열은 서열 번호 74에 제시된 서열에 대해 적어도 60%의 동일성 또는 유사성을 갖고, CDRL2의 서열은 서열 번호 75에 제시된 서열에 대해 적어도 60%의 동일성 또는 유사성을 갖고, CDRL3의 서열은 서열 번호 76에 제시된 서열에 대해 적어도 60%의 동일성 또는 유사성을 갖는다.

[0241] 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합

도메인은 CDRH1에 대해 서열 번호 71, CDRH2에 대해 서열 번호 72 및 CDRH3에 대해 서열 번호 73에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 74, CDRL2에 대해 서열 번호 75 및 CDRL3에 대해 서열 번호 76에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR을 포함한다.

- [0242] 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인은 서열 번호 78에 제시된 서열을 포함하거나; 서열 번호 78에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는 서열 번호 78에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3이 CDRH1에 대해 서열 번호 71, CDRH2에 대해 서열 번호 72 및 CDRH3에 대해 서열 번호 73에 제시된 서열을 갖는 것인 중쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0243] 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인은 서열 번호 77에 제시된 서열을 포함하거나; 서열 번호 77에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는 서열 번호 77에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3이 CDRL1에 대해 서열 번호 74, CDRL2에 대해 서열 번호 75 및 CDRL3에 대해 서열 번호 76에 제시된 서열을 갖는 것인 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0244] 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인은 서열 번호 78에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호 77에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0245] 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인은 서열 번호 82에 제시된 서열을 포함하거나; 서열 번호 82에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는 서열 번호 82에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3이 CDRH1에 대해 서열 번호 71, CDRH2에 대해 서열 번호 72 및 CDRH3에 대해 서열 번호 73에 제시된 서열을 갖는 것인 중쇄 가변 도메인 및 중쇄 불변 도메인을 포함하는 중쇄를 포함한다.
- [0246] 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인은 서열 번호 81에 제시된 서열을 포함하거나; 서열 번호 81에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는 서열 번호 81에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3이 CDRL1에 대해 서열 번호 74, CDRL2에 대해 서열 번호 75 및 CDRL3에 대해 서열 번호 76에 제시된 서열을 갖는 것인 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0247] 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인은 서열 번호 82에 제시된 서열을 갖는 중쇄 및 서열 번호 81에 제시된 서열을 갖는 경쇄를 포함한다.
- [0248] 항체 분자가 상기 정의된 바와 같은 화학식 (I) 및 화학식 (II)의 폴리펩티드 사슬을 포함하거나 그로 이루어진 본 발명의 측면에서, 항체 분자는 CDRH1에 대해 서열 번호 71, CDRH2에 대해 서열 번호 72 및 CDRH3에 대해 서열 번호 73에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 74, CDRL2에 대해 서열 번호 75 및 CDRL3에 대해 서열 번호 76에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR을 포함할 수 있고, 이들은 항체 분자에서 위치 V_H/V_{L1} 에 존재한다. 한 실시양태에서, CDRH1에 대해 서열 번호 71, CDRH2에 대해 서열 번호 72 및 CDRH3에 대해 서열 번호 73에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 74, CDRL2에 대해 서열 번호 75 및 CDRL3에 대해 서열 번호 76에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR은 본 개시내용의 구축물에서 위치 V_1 에 존재한다. 한 실시양태에서, CDRH1에 대해 서열 번호 71, CDRH2에 대해 서열 번호 72 및 CDRH3에 대해 서열 번호 73에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 74, CDRL2에 대해 서열 번호 75 및 CDRL3에 대해 서열 번호 76에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR은 본 개시내용의 구축물에서 위치 V_2 에 존재한다. 한 실시양태에서, CDRH1에 대해 서열 번호 71, CDRH2에 대해 서열 번호 72 및 CDRH3에 대해 서열 번호 73에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 74, CDRL2에 대해 서열 번호 75 및 CDRL3에 대해 서열 번호 76에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR은 본 개시내용의 구축물에서 위치 V_1 및 V_2 에 존재한다. 한 실시양태에서, CDRH1에 대해 서열 번호 71, CDRH2에 대해 서열 번호 72 및 CDRH3에 대해 서열 번호 73에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 74, CDRL2에 대해 서열 번호 75 및 CDRL3에 대해 서열 번호 76에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR은 본 개시내용의 구축물에서 위치 $VH1/VL1$ 및 V_1 에 존재한다. 한 실시양태에서, CDRH1에 대해 서열 번호 71, CDRH2에 대해 서열 번호 72 및 CDRH3에 대해 서열 번호 73에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 74, CDRL2에 대해 서열 번호 75 및 CDRL3

에 대해 서열 번호 76에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR은 본 개시내용의 구축물에서 위치 VH1/VL1 및 V2에 존재한다.

- [0249] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 화학식 (I) 및 화학식 (II)의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 항체 분자 내의 IL-17A 및 IL-17F 결합 부위는 서열 번호 78에 제시된 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호 77에 제시된 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 이들 도메인은 본 개시내용의 구축물에서 VH1/VL1에 존재한다. 한 실시양태에서, 이들 가변 도메인은 위치 V1에 존재한다. 한 실시양태에서, 이들 가변 도메인은 위치 V2에 존재한다. 한 실시양태에서, 이들 가변 도메인은 위치 V1 및 V2에 존재한다. 한 실시양태에서, 이들 가변 도메인은 본 개시내용의 구축물에서 위치 VH1/VL1 및 V1에 존재한다. 한 실시양태에서, 이들 가변 도메인은 본 개시내용의 구축물에서 VH1/VL1 및 V2에 존재한다.
- [0250] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 화학식 (I) 및 화학식 (II)의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 항체 분자 내의 IL-17A 및 IL-17F 결합 부위는 위치 VH1에 서열 번호 82에 제시된 서열을 갖는 중쇄 및 위치 VL1에 서열 번호 81에 제시된 서열을 갖는 경쇄를 포함한다.
- [0251] 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 분자를 제공하며, 상기 항체 분자는 CDRH1에 대해 서열 번호 103, CDRH2에 대해 서열 번호 104, CDRH3에 대해 서열 번호 105에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR을 포함하는, 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인은 3개의 중쇄 CDR을 포함하고, CDRH1의 서열은 서열 번호 103에 제시된 서열에 대해 적어도 60%의 동일성 또는 유사성을 갖고, CDRH2의 서열은 서열 번호 104에 제시된 서열에 대해 적어도 60%의 동일성 또는 유사성을 갖고, CDRH3의 서열은 서열 번호 105에 제시된 서열에 대해 적어도 60%의 동일성 또는 유사성을 갖는다.
- [0252] 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 다중특이적 항체 분자를 제공하며, 상기 항체 분자는 CDRL1에 대해 서열 번호 106, CDRL2에 대해 서열 번호 107 및 CDRL3에 대해 서열 번호 108에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR을 포함하는, 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인은 추가로 3개의 경쇄 CDR을 포함하고, CDRL1의 서열은 서열 번호 106에 제시된 서열에 대해 적어도 60%의 동일성 또는 유사성을 갖고, CDRL2의 서열은 서열 번호 107에 제시된 서열에 대해 적어도 60%의 동일성 또는 유사성을 갖고, CDRL3의 서열은 서열 번호 108에 제시된 서열에 대해 적어도 60%의 동일성 또는 유사성을 갖는다.
- [0253] 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 분자를 제공하며, 상기 항체 분자는 CDRH1에 대해 서열 번호 103, CDRH2에 대해 서열 번호 104 및 CDRH3에 대해 서열 번호 105에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 106, CDRL2에 대해 서열 번호 107 및 CDRL3에 대해 서열 번호 108에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR을 포함하는, 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인을 포함한다.
- [0254] 또한, 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 결합 분자를 제공하며, 여기서 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인은 서열 번호 110 또는 서열 번호 114에 제시된 서열을 포함하거나; 서열 번호 110 또는 서열 번호 114에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는 서열 번호 110 또는 서열 번호 114에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3이 CDRH1에 대해 서열 번호 103, CDRH2에 대해 서열 번호 104, CDRH3에 대해 서열 번호 105에 제시된 서열을 갖는 것인 중쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0255] 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인은 서열 번호 109 또는 서열 번호 113에 제시된 서열을 포함하거나; 서열 번호 109 또는 서열 번호 113에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는 서열 번호 109 또는 서열 번호 113에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3이 CDRL1에 대해 서열 번호 106, CDRL2에 대해 서열 번호 107 및 CDRL3에 대해 서열 번호 108에 제시된 서열을 갖는 것인 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0256] 또한, 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 결합 분자를 제공하며, 여기서 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인은 서열 번호 110에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호 109에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0257] 또한, 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 결합 분자를 제공하며, 여기서 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인은 서열 번호 114에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호 113에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0258] 본 발명은 또한 상기 정의된 다중특이적 항체 결합 분자를 제공하며, 여기서 항체는 인간 항체 알부민에 특이적인 dsscFv를 포함하고, dsscFv는 서열 번호 119에 제시된 서열을 포함하거나; 서열 번호 119에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는 서열 번호 119에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3이 CDRH1에 대해 서열 번호 103, CDRH2에 대해 서열 번호 104 및 CDRH3에 대해 서열 번호 105에 제시된 서열을 가지며 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3이 CDRL1에 대해 서열 번호 106, CDRL2에 대해 서열 번호 107 및 CDRL3에 대해 서열 번호 108에 제시된 서열을 갖는다.

[0259] 또한, 본 발명은 상기 정의된 다중특이적 항체 결합 분자를 제공하며, 여기서 항체는 인간 혈청 알부민에 특이적인 scFv를 포함하고, scFv는 서열 번호 117에 제시된 서열을 포함하거나; 서열 번호 117에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는 서열 번호 117에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3이 CDRH1에 대해 서열 번호 103, CDRH2에 대해 서열 번호 104 및 CDRH3에 대해 서열 번호 105에 제시된 서열을 가지며 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3이 CDRL1에 대해 서열 번호 106, CDRL2에 대해 서열 번호 107 및 CDRL3에 대해 서열 번호 108에 제시된 서열을 갖는다.

[0260] 항체 분자가 상기 정의된 바와 같은 화학식 (I) 및 화학식 (II)의 폴리펩티드 사슬을 포함하거나 그로 이루어진 본 발명의 측면에서, 항체 분자는 CDRH1에 대해 서열 번호 103, CDRH2에 대해 서열 번호 104 및 CDRH3에 대해 서열 번호 105에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 106, CDRL2에 대해 서열 번호 107 및 CDRL3에 대해 서열 번호 108에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR을 포함할 수 있고, 이들은 항체 분자에서 위치 V_{H1}/V_{L1} 에 존재한다. 한 실시양태에서, CDRH1에 대해 서열 번호 103, CDRH2에 대해 서열 번호 104 및 CDRH3에 대해 서열 번호 105에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 106, CDRL2에 대해 서열 번호 107 및 CDRL3에 대해 서열 번호 108에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR은 본 개시내용의 구축물에서 위치 V_1 에 존재한다. 한 실시양태에서, CDRH1에 대해 서열 번호 103, CDRH2에 대해 서열 번호 104 및 CDRH3에 대해 서열 번호 105에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 106, CDRL2에 대해 서열 번호 107 및 CDRL3에 대해 서열 번호 108에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR은 본 개시내용의 구축물에서 위치 V_2 에 존재한다. 한 실시양태에서, CDRH1에 대해 서열 번호 103, CDRH2에 대해 서열 번호 104 및 CDRH3에 대해 서열 번호 105에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 106, CDRL2에 대해 서열 번호 107 및 CDRL3에 대해 서열 번호 108에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR은 본 개시내용의 구축물에서 위치 V_1 및 V_2 에 존재한다. 한 실시양태에서, CDRH1에 대해 서열 번호 103, CDRH2에 대해 서열 번호 104 및 CDRH3에 대해 서열 번호 105에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 106, CDRL2에 대해 서열 번호 107 및 CDRL3에 대해 서열 번호 108에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR은 본 개시내용의 구축물에서 위치 V_{H1}/V_{L1} 및 V_2 에 존재한다.

[0261] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 화학식 (I) 및 화학식 (II)의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 항체 분자 내의 인간 혈청 알부민 결합 부위는 서열 번호 110 및 서열 번호 114로부터 선택되는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호 109 및 서열 번호 113으로부터 선택되는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 특히 중쇄 및 경쇄에 대해 각각 서열 번호 110 및 109 또는 서열 번호 114 및 113을 포함한다. 한 실시양태에서, 이들 도메인은 본 개시내용의 구축물에서 V_{H1}/V_{L1} 에 존재한다. 한 실시양태에서, 이들 가변 도메인은 위치 V_1 에 존재한다. 한 실시양태에서, 이들 가변 도메인은 위치 V_2 에 존재한다. 한 실시양태에서, 이들 가변 도메인은 위치 V_1 및 V_2 에 존재한다. 한 실시양태에서, 이들 가변 도메인은 본 개시내용의 구축물에서 위치 V_{H1}/V_{L1} 및 V_1 에 존재한다. 한 실시양태에서, 이들 가변 도메인은 본 개시내용의 구축물에서 위치 V_{H1}/V_{L1} 및 V_2 에 존재한다. 가변 도메인이 본 개시내용의 구축물에서 2개의 위치에 존재하는 경우, 동일한 쌍의 가변 도메인이 각각의 위치에 존재할 수 있거나 2개의 상이한 쌍의 가변 도메인이 사용될 수 있다.

[0262] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 화학식 (I) 및 화학식 (II)의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 항체 분자 내의 인간 혈청 알부민 결합 부위는 인간 혈청 알부민에 특이적인 dsscFv를 포함하고, dsscFv는 서열 번호 119에 제시

된 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 서열 번호 119에 제시된 서열을 포함하는 dsscFv는 위치 V_1 및/또는 V_2 에 존재한다. 한 실시양태에서, 서열 번호 119에 제시된 서열을 포함하는 dsscFv는 위치 V_1 에 존재한다. 한 실시양태에서, 서열 번호 119에 제시된 서열을 포함하는 dsscFv는 위치 V_2 에 존재한다.

- [0263] 본 발명의 한 측면에서, 상기 정의된 바와 같은 다중특이적 항체 분자는 하기 a) 및 b)를 포함하거나 그로 이루어진 이량체로서 제공된다:
- [0264] a) 화학식 (I)의 폴리펩티드 사슬:
- [0265] **VH1-CH1-X-V1;**
- [0266] b) 화학식 (II)의 폴리펩티드 사슬:
- [0267] **VL1-CL-Y-V2**
- [0268] 상기 식에서,
- [0269] VH1은 CDRH1에 대해 서열 번호 71, CDRH2에 대해 서열 번호 72 및 CDRH3에 대해 서열 번호 73에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 나타내고;
- [0270] CH1은 중쇄 불변 영역의 도메인, 예를 들어 그의 도메인 1을 나타내고;
- [0271] X는 결합 또는 예를 들어 서열 번호 2에 제시된 서열을 갖는 링커를 나타내고;
- [0272] Y는 결합 또는 예를 들어 서열 번호 2에 제시된 서열을 갖는 링커를 나타내고;
- [0273] V1은 CDRH1에 대해 서열 번호 85, CDRH2에 대해 서열 번호 86 및 CDRH3에 대해 서열 번호 87에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 88, CDRL2에 대해 서열 번호 89 및 CDRL3에 대해 서열 번호 90에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR을 포함하는 dsFv, sdAb, scFv 또는 dsscFv를 나타내고;
- [0274] VL1은 CDRL1에 대해 서열 번호 74, CDRL2에 대해 서열 번호 75 및 CDRL3에 대해 서열 번호 76에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 나타내고;
- [0275] CL은 경쇄 불변 영역으로부터의 도메인, 예컨대 C카파를 나타내고;
- [0276] V2는 CDRH1에 대해 서열 번호 103, CDRH2에 대해 서열 번호 104 및 CDRH3에 대해 서열 번호 105에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 106, CDRL2에 대해 서열 번호 107 및 CDRL3에 대해 서열 번호 108에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR을 포함하는 dsFv, sdAb, scFv 또는 dsscFv를 나타낸다.
- [0277] 본 발명의 한 측면에서, 상기 정의된 바와 같은 다중특이적 항체 분자는 하기 a) 및 b)를 포함하거나 그로 이루어진 이량체로서 제공된다:
- [0278] a) 화학식 (I)의 폴리펩티드 사슬:
- [0279] **VH1-CH1-X-V1;**
- [0280] b) 화학식 (II)의 폴리펩티드 사슬:
- [0281] **VL1-CL-Y-V2**
- [0282] 상기 식에서,
- [0283] VH1은 CDRH1에 대해 서열 번호 71, CDRH2에 대해 서열 번호 72 및 CDRH3에 대해 서열 번호 73에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 나타내고;
- [0284] CH1은 중쇄 불변 영역의 도메인, 예를 들어 그의 도메인 1을 나타내고;
- [0285] X는 결합 또는 예를 들어 서열 번호 2에 제시된 서열을 갖는 링커를 나타내고;
- [0286] Y는 결합 또는 예를 들어 서열 번호 2에 제시된 서열을 갖는 링커를 나타내고;
- [0287] V1은 CDRH1에 대해 서열 번호 103, CDRH2에 대해 서열 번호 104 및 CDRH3에 대해 서열 번호 105에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 106, CDRL2에 대해 서열 번호 107 및 CDRL3에 대해 서열 번호 108에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR을 포함하는 dsFv, sdAb, scFv 또는 dsscFv를 나타내고;

- [0288] VL1은 CDRL1에 대해 서열 번호 74, CDRL2에 대해 서열 번호 75 및 CDRL3에 대해 서열 번호 76에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 나타내고;
- [0289] CL은 경쇄 불변 영역으로부터의 도메인, 예컨대 C카파를 나타내고;
- [0290] V2는 CDRH1에 대해 서열 번호 85, CDRH2에 대해 서열 번호 86 및 CDRH3에 대해 서열 번호 87에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 88, CDRL2에 대해 서열 번호 89 및 CDRL3에 대해 서열 번호 90에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR을 포함하는 dsFv, sdAb, scFv 또는 dsscFv를 나타낸다.
- [0291] 본 발명의 한 측면에서, 하기 a) 및 b)를 포함하거나 그로 이루어진 다중특이적 항체 분자가 제공된다:
- [0292] a) 화학식 (I)의 폴리펩티드 사슬:
- [0293] **VH1-CH1-X-V1;**
- [0294] b) 화학식 (II)의 폴리펩티드 사슬:
- [0295] **VL1-CL-Y-V2**
- [0296] 상기 식에서,
- [0297] VH1은 서열 번호 78에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인을 나타내고;
- [0298] CH1은 중쇄 불변 영역의 도메인, 예를 들어 그의 도메인 1을 나타내고;
- [0299] X는 예를 들어 서열 번호 2에 제시된 서열을 갖는 링커를 나타내고;
- [0300] Y는 예를 들어 서열 번호 2에 제시된 서열을 갖는 링커를 나타내고;
- [0301] V1은 서열 번호 96에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호 95에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 dsscFv를 나타내고;
- [0302] VL1은 서열 번호 77에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 나타내고;
- [0303] CL은 경쇄 불변 영역으로부터의 도메인, 예컨대 C카파를 나타내고;
- [0304] V2는 서열 번호 114에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호 113에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 dsscFv를 나타낸다.
- [0305] 한 측면에서, 하기 a) 및 b)를 포함하거나 그로 이루어진 다중특이적 항체 분자가 제공된다:
- [0306] a) 화학식 (I)의 폴리펩티드 사슬:
- [0307] **VH1-CH1-X-V1;**
- [0308] b) 화학식 (II)의 폴리펩티드 사슬:
- [0309] **VL1-CL-Y-V2**
- [0310] 상기 식에서,
- [0311] VH1은 서열 번호 78에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인을 나타내고;
- [0312] CH1은 중쇄 불변 영역의 도메인, 예를 들어 그의 도메인 1을 나타내고;
- [0313] X는 예를 들어 서열 번호 2에 제시된 서열을 갖는 링커를 나타내고;
- [0314] Y는 예를 들어 서열 번호 2에 제시된 서열을 갖는 링커를 나타내고;
- [0315] V1은 서열 번호 114에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호 113에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 dsscFv를 나타내고;
- [0316] VL1은 서열 번호 77에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 나타내고;
- [0317] CL은 경쇄 불변 영역으로부터의 도메인, 예컨대 C카파를 나타내고;
- [0318] V2는 서열 번호 96에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호 95에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 dsscFv를 나타낸다.

- [0319] 한 측면에서, 하기 a) 및 b)를 포함하거나 그로 이루어진 다중특이적 항체 분자가 제공된다:
- [0320] a) 화학식 (I)의 폴리펩티드 사슬:
- [0321] **VH1-CH1-X-V1;**
- [0322] b) 화학식 (II)의 폴리펩티드 사슬:
- [0323] **VL1-CL-Y-V2**
- [0324] 상기 식에서,
- [0325] VH1 및 CH1은 서열 번호 82에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 중쇄 불변 도메인을 나타내고;
- [0326] X는 예를 들어 서열 번호 2에 제시된 서열을 갖는 링커를 나타내고;
- [0327] Y는 예를 들어 서열 번호 2에 제시된 서열을 갖는 링커를 나타내고;
- [0328] V1은 서열 번호 96에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호 95에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 dsscFv를 나타내고;
- [0329] VL1 및 CL은 서열 번호 81에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 나타내고;
- [0330] V2는 서열 번호 114에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호 113에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 dsscFv를 나타낸다.
- [0331] 한 측면에서, 하기 a) 및 b)를 포함하거나 그로 이루어진 다중특이적 항체 분자가 제공된다:
- [0332] a) 화학식 (I)의 폴리펩티드 사슬:
- [0333] **VH1-CH1-X-V1;**
- [0334] b) 화학식 (II)의 폴리펩티드 사슬:
- [0335] **VL1-CL-Y-V2**
- [0336] 상기 식에서,
- [0337] VH1 및 CH1은 서열 번호 82에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 중쇄 불변 도메인을 나타내고;
- [0338] X는 예를 들어 서열 번호 2에 제시된 서열을 갖는 링커를 나타내고;
- [0339] Y는 예를 들어 서열 번호 2에 제시된 서열을 갖는 링커를 나타내고;
- [0340] V1은 서열 번호 114에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호 113에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 dsscFv를 나타내고;
- [0341] VL1 및 CL은 서열 번호 81에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 나타내고;
- [0342] V2는 서열 번호 96에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호 95에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 dsscFv를 나타낸다.
- [0343] 한 측면에서, 하기 a) 및 b)를 포함하거나 그로 이루어진 다중특이적 항체 분자가 제공된다:
- [0344] a) 화학식 (I)의 폴리펩티드 사슬:
- [0345] **VH1-CH1-X-V1;**
- [0346] b) 화학식 (II)의 폴리펩티드 사슬:
- [0347] **VL1-CL-Y-V2**
- [0348] 상기 식에서,
- [0349] VH1 및 CH1은 서열 번호 82에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 중쇄 불변 도메인을 나타내고;
- [0350] X는 예를 들어 서열 번호 2에 제시된 서열을 갖는 링커를 나타내고;
- [0351] Y는 예를 들어 서열 번호 2에 제시된 서열을 갖는 링커를 나타내고;

- [0352] V1은 서열 번호 101에 제시된 서열을 포함하는 dsscFv를 나타내고;
- [0353] VL1 및 CL은 서열 번호 81에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 나타내고;
- [0354] V2는 서열 번호 119에 제시된 서열을 포함하는 dsscFv를 나타낸다.
- [0355] 한 측면에서, 하기 a) 및 b)를 포함하거나 그로 이루어진 다중특이적 항체 분자가 제공된다:
- [0356] a) 화학식 (I)의 폴리펩티드 사슬:
- [0357] **VH1-CH1-X-V1;**
- [0358] b) 화학식 (II)의 폴리펩티드 사슬:
- [0359] **VL1-CL-Y-V2**
- [0360] 상기 식에서,
- [0361] VH1 및 CH1은 서열 번호 82에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 중쇄 불변 도메인을 나타내고;
- [0362] X는 예를 들어 서열 번호 2에 제시된 서열을 갖는 링커를 나타내고;
- [0363] Y는 예를 들어 서열 번호 2에 제시된 서열을 갖는 링커를 나타내고;
- [0364] V1은 서열 번호 119에 제시된 서열을 포함하는 dsscFv를 나타내고;
- [0365] VL1 및 CL은 서열 번호 81에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 나타내고;
- [0366] V2는 서열 번호 101에 제시된 서열을 포함하는 dsscFv를 나타낸다.
- [0367] 본 발명은 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인 및 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인을 포함하는 삼중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 항체 분자는 하기 a) 및 b)를 포함하거나 그로 이루어진다:
- [0368] a) 다음을 포함하거나 그로 이루어진 제1 폴리펩티드:
- [0369] i. 서열 번호 125에 제시된 서열;
- [0370] ii. 서열 번호 125에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열; 또는
- [0371] iii. 서열 번호 125에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열로서, CDRH1에 대해 서열 번호 71, CDRH2에 대해 서열 번호 72 및 CDRH3에 대해 서열 번호 73에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR, CDRH1에 대해 서열 번호 85, CDRH2에 대해 서열 번호 86 및 CDRH3에 대해 서열 번호 87에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 88, CDRL2에 대해 서열 번호 89 및 CDRL3에 대해 서열 번호 90에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR을 포함하는 것인 서열; 및
- [0372] b) 다음을 포함하거나 그로 이루어진 제2 폴리펩티드:
- [0373] i. 서열 번호 131에 제시된 서열;
- [0374] ii. 서열 번호 131에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열; 또는
- [0375] iii. 서열 번호 131에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열로서, CDRL1에 대해 서열 번호 74, CDRL2에 대해 서열 번호 75 및 CDRL3에 대해 서열 번호 76에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR, CDRH1에 대해 서열 번호 103, CDRH2에 대해 서열 번호 104 및 CDRH3에 대해 서열 번호 105에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 106, CDRL2에 대해 서열 번호 107 및 CDRL3에 대해 서열 번호 108에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR을 포함하는 것인 서열.
- [0376] 한 실시양태에서, 항체 분자는 서열 번호 125에 제시된 서열을 갖는 제1 폴리펩티드; 및 서열 번호 131에 제시된 서열을 갖는 제2 폴리펩티드를 포함하거나 그로 이루어진다.
- [0377] 또한, 본 발명은 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인 및 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인을 포함하는 삼중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 항체 분자는 하기 a) 및 b)를 포함하거나 그로 이루어진다:

- [0378] a) 다음을 포함하거나 그로 이루어진 제1 폴리펩티드:
- [0379] i. 서열 번호 127에 제시된 서열;
- [0380] ii. 서열 번호 127에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열; 또는
- [0381] iii. 서열 번호 127에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열로서, CDRH1에 대해 서열 번호 71, CDRH2에 대해 서열 번호 72 및 CDRH3에 대해 서열 번호 73에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR, CDRH1에 대해 서열 번호 85, CDRH2에 대해 서열 번호 86 및 CDRH3에 대해 서열 번호 87에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 88, CDRL2에 대해 서열 번호 89 및 CDRL3에 대해 서열 번호 90에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR을 포함하는 것인 서열; 및
- [0382] b) 다음을 포함하거나 그로 이루어진 제2 폴리펩티드:
- [0383] i. 서열 번호 131에 제시된 서열;
- [0384] ii. 서열 번호 131에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열; 또는
- [0385] iii. 서열 번호 131에 제시된 서열에 대해 80% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 서열로서, CDRL1에 대해 서열 번호 74, CDRL2에 대해 서열 번호 75 및 CDRL3에 대해 서열 번호 76에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR, CDRH1에 대해 서열 번호 103, CDRH2에 대해 서열 번호 104 및 CDRH3에 대해 서열 번호 105에 제시된 서열을 갖는 3개의 중쇄 CDR 및 CDRL1에 대해 서열 번호 106, CDRL2에 대해 서열 번호 107 및 CDRL3에 대해 서열 번호 108에 제시된 서열을 갖는 3개의 경쇄 CDR을 포함하는 것인 서열.
- [0386] 한 실시양태에서, 항체 분자는 서열 번호 127에 제시된 서열을 갖는 제1 폴리펩티드; 및 서열 번호 131에 제시된 서열을 갖는 제2 폴리펩티드를 포함하거나 그로 이루어진다.
- [0387] 또한, 본 발명은 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인 및 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인을 포함하는 삼중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 항체 분자는 서열 번호 121에 제시된 서열을 갖는 제1 폴리펩티드; 및 서열 번호 129에 제시된 서열을 갖는 제2 폴리펩티드를 포함하거나 그로 이루어진다.
- [0388] 본 발명은 또한 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인 및 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인을 포함하는 삼중특이적 항체 분자를 제공하며, 여기서 항체 분자는 서열 번호 123에 제시된 서열을 갖는 제1 폴리펩티드; 및 서열 번호 129에 제시된 서열을 갖는 제2 폴리펩티드를 포함하거나 그로 이루어진다.
- [0389] 본 발명은 또한 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인 및 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인을 포함하는 삼중특이적 항체 분자를 제공하며, 이 항체 분자는 서열 번호 126에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 제1 폴리펩티드; 및 서열 번호 132에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 제2 폴리펩티드를 포함하거나 그로 이루어진다.
- [0390] 본 발명은 또한 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인 및 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인을 포함하는 삼중특이적 항체 분자를 제공하며, 이 항체 분자는 서열 번호 144에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 제1 폴리펩티드; 및 서열 번호 146에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 제2 폴리펩티드를 포함하거나 그로 이루어진다.
- [0391] 본 발명은 또한 인간 TNF-알파에 특이적인 결합 도메인, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 특이적인 결합 도메인 및 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인을 포함하는 삼중특이적 항체 분자를 제공하며, 이 항체 분자는 서열 번호 143에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 제1 폴리펩티드; 및 서열 번호 145에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 제2 폴리펩티드를 포함하거나 그로 이루어진다.
- [0392] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 삼중특이적 항체 분자는 서열 번호 132, 서열 번호 146 또는 서열 번호 145로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 제1 폴리펩티드 및 서열 번호 126, 서열 번호 144 또는 서열 번호 143으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 제2 폴리펩티드를 포함하거나 그로 이루어진다. 상기 정의된 삼중특이적 항체 분자는 바람직하게는 인간 TNF-알파, 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F의 생물학적 활성을 중화시킬 수 있다.
- [0393] 본 개시내용은 또한 본원에 개시된 서열에 대해 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%

유사한 서열을 제공한다.

- [0394] 본원에서 사용되는 바와 같이, "동일성"은 정렬된 서열 내의 임의의 특정 위치에서 아미노산 잔기가 서열 간에 동일하다는 것을 나타낸다.
- [0395] 본원에서 사용되는 바와 같이, "유사성"은 정렬된 서열 내의 임의의 특정 위치에서 아미노산 잔기가 서열 간에 유사한 유형임을 나타낸다. 예를 들어, 류신이 이소류신 또는 발린을 치환할 수 있다. 서로 종종 치환될 수 있는 다른 아미노산은 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다:
- [0396] - 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판(방향족 측쇄를 갖는 아미노산);
- [0397] - 라이신, 아르기닌 및 히스티딘(염기성 측쇄를 갖는 아미노산);
- [0398] - 아스파르트레이트 및 글루타메이트(산성 측쇄를 갖는 아미노산);
- [0399] - 아스파라긴 및 글루타민(아미드 측쇄를 갖는 아미노산); 및
- [0400] - 시스테인 및 메티오닌(황 함유 측쇄를 갖는 아미노산).
- [0401] 동일성 및 유사성의 정도는 쉽게 계산할 수 있다([Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988]; [Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993]; [Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994]; [Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987], [Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991], [the BLAST™ software available from NCBI (Altschul, S.F. et al, 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410)]; [Gish, W. & States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272], [Madden, T.L. et al, 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141]; [Altschul, S.F. et al, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402]; [Zhang, J. & Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656]).
- [0402] 본 발명의 다중특이적 구축물에 사용하기 위한 항체는 관련 기술 분야에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 생성될 수 있다.
- [0403] 항원 폴리펩티드에 대해 생성된 항체는 동물의 면역화가 필요한 경우, 공지된 통상적인 프로토콜을 사용하여 동물, 바람직하게는 비인간 동물에게 폴리펩티드를 투여함으로써 취득될 수 있다(문헌 [Handbook of Experimental Immunology, D.M. Weir (ed.), Vol. 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986] 참조). 토끼, 마우스, 래트, 양, 소, 낙타 또는 돼지와 같은 많은 온혈 동물이 면역화될 수 있다. 그러나, 마우스, 토끼, 돼지 및 래트가 일반적으로 가장 적합하다.
- [0404] 모노클로날 항체는 관련 기술 분야에 알려진 임의의 방법, 예컨대 하이브리도마 기술(Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), 트리오마 기술, 인간 B-세포 하이브리도마 기술(Kozbor et al., 1983, Immunology Today, 4:72) 및 EBV-하이브리도마 기술(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp77-96, Alan R Liss, Inc., 1985)에 의해 제조될 수 있다.
- [0405] 항체는 또한, 예를 들어 문헌 [Babcock, J. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15):7843-78481]; W092/02551; W02004/051268 및 W02004/106377에 기재되어 있는 방법에 의해 특정 항체의 생산을 위해 선택된 단일 림프구로부터 생성된 면역글로불린 가변 영역 cDNA를 클로닝하고 발현시킴으로써 단일 림프구 항체 방법을 사용하여 생성될 수 있다.
- [0406] 본 개시내용에서 사용하기 위한 항체는 또한 관련 기술 분야에 공지된 다양한 과지 디스플레이 방법을 사용하여 생성될 수 있으며, 문헌 [Brinkman et al. J. Immunol. Methods, 1995, 182: 41-50], [Ames et al. J. Immunol. Methods, 1995, 184:177-186], [Kettleborough et al. Eur. J. Immunol. 1994, 24:952-958], [Persic et al. Gene, 1997 187 9-18], [Burton et al. Advances in Immunology, 1994, 57:191-280] 및 W090/02809; WO 91/10737; W092/01047; W092/18619; W093/11236; W095/15982; W095/20401; 및 US 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743; 5,969,108 및 W020011/30305에 개시된 것을 포함한다.
- [0407] 한 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 다중특이적 분자는 인간화된다.
- [0408] 본원에서 사용되는 인간화된(CDR 이식된 항체 포함)은 비인간 종으로부터의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR)

및 인간 면역글로불린 분자로부터의 프레임워크 영역을 갖는 분자를 말한다(예를 들어, US 5,585,089; W091/09967 참조). 전체 CDR보다는 CDR의 특이성 결정 잔기만을 전달하는 것이 필요할 수 있음을 이해할 것이다(예를 들어, 문헌 [Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34] 참조). 인간화 항체는 CDR이 유래된 비인간 종으로부터 유래된 하나 이상의 프레임워크 잔기를 선택적으로 더 포함할 수 있다.

- [0409] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "인간화된 항체 분자"는 중쇄 및/또는 경쇄가 수여자 항체(예를 들어, 인간 항체)의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역 프레임워크 내로 이식된 공여자 항체(예를 들어, 뮤린 모노클로날 항체)로부터의 하나 이상의 CDR(원하는 경우, 하나 이상의 변형된 CDR 포함)을 함유하는 항체 분자를 지칭한다. 검토를 위해, 문헌[Vaughan et al., Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998]을 참고한다. 한 실시양태에서, 전체 CDR이 이동되기보다는, 상기 본원에서 설명된 하나 이상의 CDR로부터의 하나 이상의 특이성 결정 잔기만이 인간 항체 프레임워크로 이동된다(예를 들어, 문헌 [Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34] 참고). 한 실시양태에서, 상기 본원에서 설명된 하나 이상의 CDR로부터의 특이성 결정 잔기만이 인간 항체 프레임워크로 이동된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 본원에서 설명된 각각의 CDR로부터의 특이성 결정 잔기만이 인간 항체 프레임워크로 이동된다.
- [0410] CDR 또는 특이성 결정 잔기가 이식되는 경우, 마우스, 영장류 및 인간 프레임워크 영역을 포함하는, CDR이 유래되는 공여자 항체의 클래스/유형을 고려하여 임의의 적절한 수여자 가변 영역 프레임워크 서열이 사용될 수 있다. 적합하게는, 본 발명에 따른 인간화된 항체는 인간 수여자 프레임워크 영역뿐만 아니라 본원에 제공된 하나 이상의 CDR을 포함하는 가변 도메인을 갖는다.
- [0411] 본 개시내용에서 사용될 수 있는 인간 프레임워크의 예는 KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY, 및 POM이다(상기 문헌 [Kabat et al.] 참조). 예를 들면, KOL 및 NEWM은 중쇄를 위해 사용될 수 있고, REI는 경쇄를 위해 사용될 수 있으며, EU, LAY 및 POM은 중쇄와 경쇄 둘 모두를 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 인간 생식계열 서열이 사용될 수 있고; 이들은 <http://www.imgt.org/> 또는 <http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/list2.php>에서 이용가능하다.
- [0412] 본 개시내용의 인간화된 항체 분자에서, 수여자 중쇄 및 경쇄는 반드시 동일한 항체로부터 유래될 필요는 없으며, 원한다면 상이한 사슬로부터 유래된 프레임워크 영역을 갖는 복합 사슬을 포함할 수 있다.
- [0413] 프레임워크 영역은 수여자 항체와 정확히 동일한 서열을 가질 필요는 없다. 예를 들어, 비통상적인 잔기는 수여자 사슬 클래스 또는 유형에 대해 보다 빈번하게 발생하는 잔기로 변경될 수 있다. 대안적으로, 수여자 프레임워크 영역에서 선택된 잔기는 공여자 항체 내의 동일한 위치에서 발견되는 잔기에 대응하도록 변경될 수 있다(문헌 [Reichmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324] 참조). 이러한 변화는 공여자 항체의 친화도를 회복시키는데 필요한 최소한으로 유지되어야 한다. 변경될 필요가 있을 수 있는 수여자 프레임워크 영역 내의 잔기를 선택하기 위한 프로토콜은 W091/09967에 개시되어 있다.
- [0414] 프레임워크의 유도체는 1, 2, 3 또는 4개의 아미노산이 대체 아미노산, 예를 들어 공여자 잔기로 대체될 수 있다.
- [0415] 공여자 잔기는 공여자 항체, 즉 CDR이 원래 유래된 항체로부터의 잔기이다. 공여자 잔기는 인간 수여자 프레임워크로부터 유래된 적합한 잔기(수여자 잔기)로 대체될 수 있다.
- [0416] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 다중특이적 항체는 완전 인간 항체이며, 특히 하나 이상의 가변 도메인은 완전 인간 항체의 것이다.
- [0417] 완전 인간 분자는 중쇄 및 경쇄 둘 모두의 가변 영역 및 불변 영역(존재하는 경우)이 모두 인간 기원이거나 또는 반드시 동일한 항체로부터 유래되는 것은 아닌, 인간 기원의 서열과 실질적으로 동일한 것이다. 완전 인간 항체의 예는 상기 설명된 파지 디스플레이 방법에 의해 생성된 항체, 및 예를 들어 EP0546073, US5,545,806, US5,569,825, US5,625,126, US5,633,425, US5,661,016, US5,770,429, EP 0438474 및 EP0463151에 일반적으로 기술된 바와 같이 뮤린 면역글로불린 가변 및 선택적으로 불변 영역 유전자가 그들의 인간 대응물로 대체된 마우스에 의해 생성된 항체를 포함할 수 있다.
- [0418] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 다중특이적 항체 분자는 표적 항원 또는 항원에 대해 개선된 친화도를 제공하도록 처리된다. 이러한 변이체는 CDR의 돌연변이(Yang et al. J. Mol. Biol, 254, 392-403, 1995), 사슬 서플링(Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), 이. 콜라이(*E. coli*)의 돌연변이체 균주의 사용(Low et al., J. Mol. Biol, 250, 359-368, 1996), DNA 서플링(Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), 파지 디스플레이(Thompson et al., J. Mol. Biol, 256, 77-88, 1996) 및 유성(sexual)

PCR(Cramer et al. Nature, 391, 288-291, 1998)을 포함하는 많은 친화도 성숙 프로토콜에 의해 얻을 수 있다. 본(Vaughan) 등(상기 문헌)은 이들 친화도 성숙 방법을 논의한 바 있다.

- [0419] 본 측면에서 본원에서 사용되는 개선된 친화도는 출발 분자에 대한 개선을 의미한다.
- [0420] 원한다면, 본 개시내용에서 사용하기 위한 다중특이적 항체 구축물은 하나 이상의 이펙터 분자(들)에 접합될 수 있다. 이펙터 분자는 단일 이펙터 분자 또는 본 발명의 항체에 부착될 수 있는 단일 모이어티를 형성하도록 연결된 2개 이상의 그러한 분자를 포함할 수 있음을 이해할 것이다. 이펙터 분자에 연결된 항체 단편을 얻는 것이 바람직한 경우, 이것은 항체 단편이 직접 또는 커플링제를 통해 이펙터 분자에 연결되는 표준 화학적 또는 재조합 DNA 과정에 의해 제조될 수 있다. 이러한 이펙터 분자를 항체에 접합시키는 기술은 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있다(문헌 [Hellstrom et al., Controlled Drug Delivery, 2nd Ed., Robinson et al., eds., 1987, pp. 623-53], [Thorpe et al. 1982, Immunol. Rev., 62:119-58] 및 [Dubowchik et al. 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123] 참조). 특정 화학적 절차는 예를 들어 W093/06231, W092/22583, W089/00195, W089/01476 및 W003031581에 기재된 것을 포함한다. 대안적으로, 이펙터 분자가 단백질 또는 폴리펩티드인 경우, 예를 들어 W086/01533 및 EP0392745에 기재된 바와 같은 재조합 DNA 과정을 사용하여 연결을 달성할 수 있다.
- [0421] 본원에서 사용되는 "이펙터 분자"라는 용어는 생물학적 활성 단백질, 예를 들어 효소, 다른 항체 또는 항체 단편, 합성 또는 천연 발생 중합체, 핵산 및 그의 단편, 예를 들어 DNA, RNA 및 그의 단편, 방사성 핵종, 방사성 동위원소, 킬레이트화된 금속, 나노입자 및 리포터 군, 예컨대 형광 화합물 또는 NMR 또는 ESR 분광법에 의해 검출될 수 있는 화합물을 포함한다.
- [0422] 다른 이펙터 분자는 킬레이트화된 방사성 핵종, 예컨대 111In 및 90Y, Lu177, 비스무스213, 칼리포르늄252, 이리듐192 및 텅스텐188/레늄188; 또는 약물, 예컨대 비제한적으로 알킬포스포콜린, 토포이소머라제 I 억제제, 탁소이드 및 수라민을 포함할 수 있다.
- [0423] 다른 이펙터 분자에는 단백질, 펩티드 및 효소가 포함된다. 관심 효소는 비제한적으로, 단백질분해 효소, 가수분해효소, 리아제, 이소머라제, 트랜스퍼라제를 포함한다. 관심 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드는 비제한적으로, 면역글로불린, 독소, 예컨대 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소, 또는 디프테리아 독소, 단백질, 예컨대 인슐린, α -인터페론, β -인터페론, 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자 또는 조직 플라스미노겐 활성화자, 혈전제 또는 항혈관신생제, 예를 들어 안지오테닌 또는 엔도스타틴, 또는, 생물학적 반응 변형제, 예컨대 림포카인, 인터루킨-1(IL-1), 인터루킨-2(IL-2), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF), 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF), 신경 성장 인자(NGF) 또는 다른 성장 인자 및 면역글로불린을 포함한다.
- [0424] 다른 이펙터 분자는 예를 들면 진단에서 유용한 검출가능한 물질을 포함할 수 있다. 검출가능한 물질의 예는 다양한 효소, 보결 그룹, 형광 물질, 발광 물질, 생물발광 물질, 방사성 핵종, 양전자 방출 금속(양전자 방출 단층촬영에서 사용하기 위함), 및 비방사성 상자성 금속 이온을 포함한다. 진단에 사용하기 위해 항체에 접합될 수 있는 금속 이온의 경우 일반적으로 US4,741,900을 참고한다. 적합한 효소는 양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리성 포스포타제, 베타-갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스터라제를 포함하고; 적합한 보결 그룹은 스트렙타비딘, 아비딘 및 비오틴을 포함하며; 적합한 형광 물질은 옴벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단일 클로라이드 및 피코에리트린을 포함하고; 적합한 발광 물질은 루미놀을 포함하며; 적합한 생물발광 물질은 루시페라제, 루시페린, 및 애쿠오린을 포함하고; 적합한 방사성 핵종은 125I, 131I, 111In, 및 99Tc를 포함한다.
- [0425] 또 다른 실시양태에서, 이펙터 분자는 생체 내에서 항체의 반감기를 증가시키고/시키거나, 항체의 면역원성을 감소시키고/시키거나, 면역계에 대한 상피 장벽을 가로지르는 항체의 전달을 향상시킬 수 있다. 이러한 유형의 적합한 이펙터 분자의 예는 중합체, 알부민, 알부민 결합 단백질 또는 알부민 결합 화합물, 예컨대 W005/117984에 기재된 것을 포함한다.
- [0426] 이펙터 분자가 중합체인 경우, 이것은 일반적으로 합성 또는 자연 발생 중합체, 예를 들어 선택적으로 치환된 직쇄 또는 분지쇄 폴리알킬렌, 폴리알케닐렌 또는 폴리옥시알킬렌 중합체 또는 분지 또는 비분지쇄 폴리사카라이드, 예를 들어 동중 또는 이종폴리사카라이드일 수 있다.
- [0427] 상기 언급된 합성 중합체 상에 존재할 수 있는 선택적인 특정 치환기는 하나 이상의 히드록시, 메틸 또는 메톡시기를 포함한다.
- [0428] 합성 중합체의 특정 예는 선택적으로 치환된 직쇄 또는 분지쇄 폴리(에틸렌글리콜), 폴리(프로필렌글리콜) 폴리

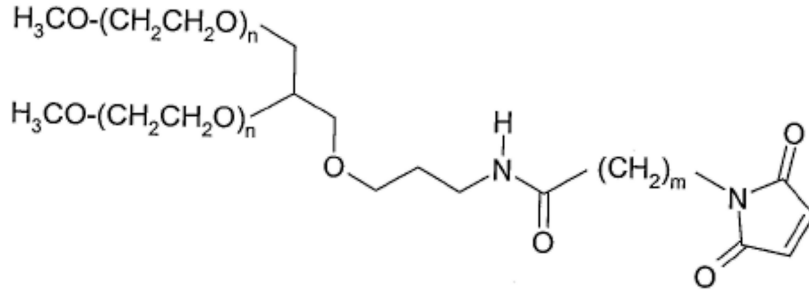
(비닐알콜) 또는 그의 유도체, 특히 선택적으로 치환된 폴리(에틸렌글리콜), 예컨대 메톡시폴리(에틸렌글리콜) 또는 그의 유도체를 포함한다.

- [0429] 특정 자연 발생 중합체는 락토스, 아밀로스, 텍스트란, 글리코젠 또는 그의 유도체를 포함한다.
- [0430] 본원에서 사용되는 "유도체"는 반응성 유도체, 예를 들어 말레이미드 등과 같은 티올 선택성 반응기를 포함하는 것으로 의도된다. 반응성 기는 중합체에 직접적으로 또는 링커 분절을 통해 연결될 수 있다. 그러한 기의 잔기는 일부 경우에 항체 단편과 중합체 사이의 연결기로서 생성물의 일부를 형성할 것이다.
- [0431] 중합체의 크기는 원하는 대로 다양할 수 있지만, 일반적으로 평균 분자량 범위는 500 Da 내지 50000 Da, 예를 들어 5000 내지 40000 Da, 예를 들어 20000 내지 40000 Da일 것이다. 중합체 크기는 특히, 예를 들어 종양과 같은 특정 조직에 국재하거나 순환 반감기를 연장하는 능력과 같은 생성물의 의도된 용도에 기초하여 선택될 수 있다(검토를 위해, 문헌 [Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545] 참조). 따라서, 예를 들어, 예를 들어 종양의 치료에 사용하기 위해, 생성물이 순환계를 떠나 조직을 투과하도록 의도되는 경우, 예를 들어 분자량이 약 5000 Da 인 저분자량 중합체를 사용하는 것이 유리할 수 있다. 생성물이 순환계 내에 남아 있는 용도를 위해, 예를 들어 20000 Da 내지 약 40000 Da의 분자량을 갖는 보다 더 높은 분자량의 중합체를 사용하는 것이 유리할 수 있다.
- [0432] 적합한 중합체는 특히 약 15000 Da 내지 약 40000 Da의 분자량을 갖는 폴리알킬렌 중합체, 예컨대 폴리(에틸렌글리콜) 또는 특히 메톡시폴리(에틸렌글리콜) 또는 그의 유도체를 포함한다.
- [0433] 한 실시양태에서, 본 개시내용에서 사용하기 위한 항체는 폴리(에틸렌글리콜)(PEG) 모이어티에 부착된다. 하나의 특정 예에서, 항체는 항체 단편이고, PEG 분자는 항체 단편에 위치한 임의의 이용 가능한 아미노산 측쇄 또는 말단 아미노산 관능기, 예를 들어 임의의 자유 아미노, 이미노, 티올, 히드록실 또는 카르복실 기를 통해 부착될 수 있다. 이러한 아미노산은 항체 단편 내에 자연적으로 존재할 수 있거나, 재조합 DNA 방법을 사용하여 단편 내로 조작될 수 있다(예를 들어, US 5,219,996; US 5,667,425; WO 98/25971, WO 2008/038024 참조). 한 실시양태에서, 본 발명의 항체 분자는 변형된 Fab 단편이고, 여기서 변형은 그의 중쇄의 C 말단에 하나 이상의 아미노산이 부가되어 이펙터 분자의 부착을 허용한다. 적절하게는, 추가의 아미노산은 이펙터 분자가 부착될 수 있는 하나 이상의 시스테인 잔기를 함유하는 변형된 힌지 영역을 형성한다. 여러 부위를 사용하여 2개 이상의 PEG 분자를 부착시킬 수 있다.
- [0434] 적절하게는, PEG 분자는 항체 단편에 위치한 1 이상의 시스테인 잔기의 티올 기를 통해 공유 연결된다. 변형된 항체 단편에 부착된 각각의 중합체 분자는 상기 단편에 위치한 시스테인 잔기의 황 원자에 공유 연결될 수 있다. 상기 공유 연결은 일반적으로 디설피드 결합 또는, 특히, 황-탄소 결합일 것이다. 티올 기가 부차적으로 사용되는 경우, 적절하게 활성화된 이펙터 분자, 예를 들면 말레이미드 및 시스테인 유도체와 같은 티올 선택적 유도체가 사용될 수 있다. 활성화된 중합체는 상기 기재된 바와 같은 중합체-변형된 항체 단편의 제조에서 출발 물질로서 사용될 수 있다. 상기 활성화된 중합체는 α -할로카르복실산 또는 에스테르, 예를 들어 아이오도아세트아마이드, 이미드, 예를 들어 말레이미드, 비닐 술폰 또는 디설피드와 같은 티올 반응성 기를 함유하는 임의의 중합체일 수 있다. 그러한 출발 물질은 상업적으로 수득될 수 있거나(예를 들면, Nektar, 이전의 Shearwater Polymers Inc, (미국 앨라배마주 헨즈빌 소재)로부터), 또는 종래의 화학 과정을 이용하여 상업적으로 이용가능한 출발 물질로부터 제조될 수 있다. 특정한 PEG 분자는 20K 메톡시-PEG-아민(Nektar, 이전의 Shearwater; Rapp Polymere; 및 SunBio로부터 수득가능함) 및 M-PEG-SPA(Nektar, 이전에 Shearwater로부터 수득가능함)를 포함한다.
- [0435] 한 실시양태에서, 분자 내의 F(ab')₂, Fab 또는 Fab'는 폐길화(PEGylation)되고, 즉, 예를 들어 EP0948544 또는 EP1090037에 개시된 방법에 따라 공유 부착된 PEG(폴리(에틸렌글리콜))를 갖는다[또한, 문헌 ["Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J Milton Harris (ed), Plenum Press, New York], ["Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC] 및 ["Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New York]; [Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545] 참고]. 한 실시양태에서, PEG는 힌지 영역 내의 시스테인에 부착된다. 한 예에서, PEG 변형된 Fab 단편은 변형된 힌지 영역 내의 단일 티올 기에 공유 연결된 말레이미드 기를 갖는다. 라이신 잔기는 말레이미드 기에 공유 연결될 수 있고, 약 20,000 Da의 분자량을 갖는 메톡시폴리(에틸렌글리콜) 중합체는 라이신 잔기 상의 각각의 아민 기에

부착될 수 있다. 따라서, Fab 단편에 부착된 PEG의 총 분자량은 약 40,000 Da일 수 있다.

[0436] 특정 PEG 분자는 PEG2MAL40K(Nektar, 이전의 Shearwater로부터 수득가능함)로도 알려진, N,N'-비스(메톡시폴리(에틸렌 글리콜) MW 20,000) 변형된 라이신의 2-[3-(N-말레이미도)프로피온아미도]에틸 아미드를 포함한다.

[0437] PEG 링커의 대체 공급원은 GL2-400MA2(하기 구조에서 m은 5임) 및 GL2-400MA(m은 2임)를 공급하는 NOF를 포함하며, n은 약 450이다:

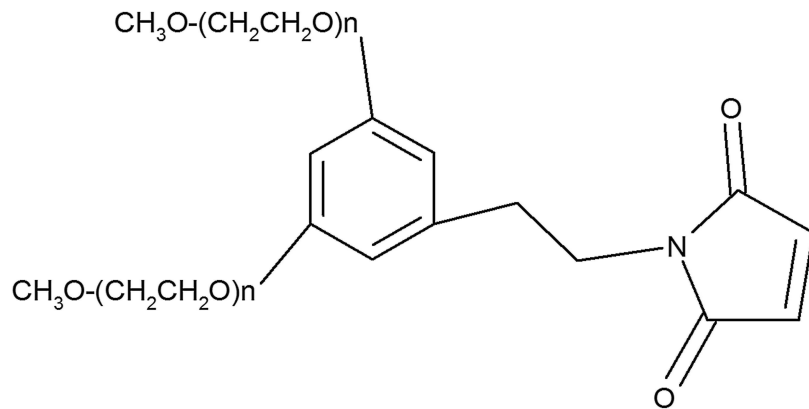


m은 2 또는 5이다

[0438]

[0439] 즉, 각각의 PEG는 약 20,000 Da이다.

[0440] 다음 유형의 추가의 대체 PEG 이펙터 분자는 Dr Reddy, NOF 및 Jenkem에서 입수가 가능하다.



[0441]

[0442] 한 실시양태에서, 사슬의 아미노산 226, 예를 들어 중쇄의 아미노산 226(순차적 넘버링에 의한)에 또는 그 근처에 있는 시스테인 아미노산 잔기를 통해 부착된, 폐길화된(예를 들어 본원에서 설명되는 PEG로) 항체 분자가 제공된다.

[0443] 한 실시양태에서, DNA 서열과 같은 본 개시내용의 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이 제공된다.

[0444] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 분자의 하나 이상, 예컨대 2개 이상, 또는 3개 이상의 폴리펩티드 성분, 예를 들어 하기 a) 및 b)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이 제공된다:

[0445] a) 화학식 (I)의 폴리펩티드 사슬:

[0446] **VH1-CH1-X-V1;**

[0447] b) 화학식 (II)의 폴리펩티드 사슬:

[0448] **VL1-CL-Y-V2**

[0449] 상기 식에서,

[0450] VH1은 중쇄 가변 도메인을 나타내고;

[0451] CH1은 중쇄 불변 영역의 도메인, 예를 들어 그의 도메인 1을 나타내고;

[0452] X는 결합 또는 링커를 나타내고;

[0453] Y는 결합 또는 링커를 나타내고;

- [0454] V1은 dsFv, sdAb, scFv 또는 dsscFv를 나타내고;
- [0455] VL1은 경쇄 가변 도메인을 나타내고;
- [0456] CL은 경쇄 불변 영역으로부터의 도메인, 예컨대 C카파를 나타내고;
- [0457] V2는 dsFv, sdAb, scFv 또는 dsscFv를 나타낸다.
- [0458] 한 실시양태에서, DNA와 같은 폴리뉴클레오티드는 벡터에 포함된다.
- [0459] 통상의 기술자는 V1 및/또는 V2가 dsFv를 나타내는 경우, 다중특이적 항체는 X 또는 Y에 부착되지 않은 상응하는 자유 VH 또는 VL 도메인을 코딩하는 제3 폴리펩티드를 포함할 것임을 인식할 것이다. 따라서, 본 발명의 다중특이적 단백질은 하나 이상의, 2개 이상의 또는 3개 이상의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있으며, 이들은 하나 이상의 벡터에 혼입될 수 있다.
- [0460] 벡터가 구축될 수 있는 일반적인 방법, 형질감염 방법 및 배양 방법은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다. 이와 관련하여, 문헌 ["Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York] 및 [Maniatis Manual, Cold Spring Harbor Publishing]을 참고한다.
- [0461] 본 발명의 다중특이적 단백질을 코딩하는 하나 이상의 DNA 서열을 포함하는 하나 이상의 클로닝 또는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 또한 제공된다. 임의의 적합한 숙주 세포/벡터 시스템이 본 발명의 항체 분자를 코딩하는 DNA 서열의 발현을 위해 사용될 수 있다. 박테리아, 예를 들면 이. 콜라이, 및 다른 미생물 시스템이 사용될 수 있거나 또는 진핵, 예를 들면 포유동물 숙주 세포 발현 시스템이 또한 사용될 수 있다. 적합한 포유동물 숙주 세포는 CHO, 골수종, NSO 골수종 세포 및 SP2 세포, COS 세포 또는 하이브리도마 세포를 포함한다.
- [0462] 본 개시내용은 또한 본 발명의 다중특이적 단백질을 코딩하는 DNA로부터 단백질의 발현을 야기하는데 적합한 조건 하에 본 발명의 벡터를 함유하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 상기 다중특이적 단백질을 단리하는 단계를 포함하는, 본 개시내용에 따른 다중특이적 단백질의 생산을 위한 방법을 제공한다.
- [0463] 중쇄 및 경쇄 둘 모두를 포함하는 생성물의 생산을 위해, 세포주는 2개의 벡터, 즉 경쇄 폴리펩티드를 코딩하는 제1 벡터 및 중쇄 폴리펩티드를 코딩하는 제2 벡터로 형질감염될 수 있다. 대안적으로, 경쇄 및 중쇄 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 단일 벡터가 사용될 수 있다. 한 예에서 세포주는 본 발명의 항체 분자의 폴리펩티드 사슬을 각각 코딩하는 2개의 벡터로 형질감염될 수 있다. V1 및/또는 V2가 dsFv인 경우, 세포주는 본 발명의 다중특이적 단백질의 폴리펩티드 사슬을 각각 코딩하는 3개의 벡터로 형질감염될 수 있다.
- [0464] 한 실시양태에서, 세포주는 각각 하기 a) 및 b)로부터 선택되는 상이한 폴리펩티드를 코딩하는 2개의 벡터로 형질감염된다:
- [0465] a) 화학식 (I)의 폴리펩티드 사슬:
- [0466] **VH1-CH1-X-V1;**
- [0467] b) 화학식 (II)의 폴리펩티드 사슬:
- [0468] **VL1-CL-Y-V2**
- [0469] 상기 식에서,
- [0470] VH1은 중쇄 가변 도메인을 나타내고;
- [0471] CH1은 중쇄 불변 영역의 도메인, 예를 들어 그의 도메인 1을 나타내고;
- [0472] X는 결합 또는 링커를 나타내고;
- [0473] Y는 결합 또는 링커를 나타내고;
- [0474] V1은 dsFv, sdAb, scFv 또는 dsscFv를 나타내고;
- [0475] VL1은 경쇄 가변 도메인을 나타내고;
- [0476] CL은 경쇄 불변 영역으로부터의 도메인, 예컨대 C카파를 나타내고;
- [0477] V2는 dsFv, sdAb, scFv 또는 dsscFv를 나타낸다.
- [0478] 한 실시양태에서, V1이 dsFv이고 V1의 VH 도메인이 X에 부착되는 경우, 세포주는 V1의 VL 도메인을 코딩하는

제3 벡터로 형질감염될 수 있다.

- [0479] 한 실시양태에서, V1이 dsFv이고 V1의 VL 도메인이 X에 부착되는 경우, 세포주는 V1의 VH 도메인을 코딩하는 제3 벡터로 형질감염될 수 있다.
- [0480] 한 실시양태에서, V2가 dsFv이고 V2의 VH 도메인이 Y에 부착되는 경우, 세포주는 V2의 VL 도메인을 코딩하는 제3 벡터로 형질감염될 수 있다.
- [0481] 한 실시양태에서, V2가 dsFv이고 V2의 VL 도메인이 Y에 부착되는 경우, 세포주는 V2의 VH 도메인을 코딩하는 제3 벡터로 형질감염될 수 있다.
- [0482] 한 실시양태에서, V1과 V2 둘 모두가 dsFv이고 V2의 VL 도메인이 Y에 부착되고 V1의 VL 도메인이 X에 부착되는 경우, 세포주는 V1과 V2 둘 모두의 공통적인 VH 도메인을 코딩하는 제3 벡터로 형질감염될 수 있다.
- [0483] 한 실시양태에서, V1과 V2 둘 모두가 dsFv이고 V2의 VH 도메인이 Y에 부착되고 V1의 VH 도메인이 X에 부착되는 경우, 세포주는 V1과 V2 둘 모두의 공통적인 VL 도메인을 코딩하는 제3 벡터로 형질감염될 수 있다.
- [0484] 숙주 세포 내로 형질감염된 각각의 벡터의 비율은 다중특이적 항체 생성물의 발현을 최적화하기 위해 변화될 수 있음을 이해할 것이다. 2개의 벡터가 사용되는 한 실시양태에서, 벡터의 비율은 1:1일 수 있다. 3개의 벡터가 사용되는 한 실시양태에서, 벡터의 비율은 1:1:1일 수 있다. 통상의 기술자는 형질감염 후 단백질 발현 수준에 대한 일상적인 검사에 의해 최적의 비율을 발견할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 각각의 벡터로부터 다중특이적 구축물의 각각의 폴리펩티드 사슬의 발현 수준은 동일하거나 상이한 프로모터를 사용하여 제어할 수 있다.
- [0485] 2개 이상 또는 존재하는 경우 3개의 폴리펩티드 성분은 단일 벡터에서 하나의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다는 것을 알 것이다. 또한, 2개 이상, 특히 3개 이상의 폴리펩티드 성분이 단일 벡터에서 하나의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 경우, 각각의 폴리펩티드 성분의 상대적 발현은 본 개시내용의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 각각의 폴리뉴클레오티드를 위한 상이한 프로모터를 이용함으로써 달라질 수 있다는 것을 알 것이다.
- [0486] 한 실시양태에서, 벡터는 단일 프로모터의 제어 하에 본 발명의 다중특이적 항체 분자의 2개 또는 존재하는 경우 3개의 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 단일 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0487] 한 실시양태에서, 벡터는 각각의 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 각각의 폴리뉴클레오티드 서열이 상이한 프로모터의 제어 하에 있는, 본 개시내용의 다중특이적 항체 분자의 2개 또는 존재하는 경우 3개의 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 단일 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0488] 본 개시내용에 따른 다중특이적 단백질은 숙주 세포로부터 우수한 수준으로 발현된다. 따라서, 항체 및/또는 단편의 특성은 최적화되고 상업적 처리에 도움이 되는 것으로 보인다.
- [0489] 유리하게는, 본 개시내용의 다중특이적 항체 분자는 정제 후 관찰되는 응집의 양을 최소화하고, 약제학적 농도에서 구축물의 체제 내의 단량체의 양을 최대화하며, 예를 들면 단량체는 총 단백질의 50%, 60%, 70% 또는 75% 이상, 예컨대 80 또는 90% 이상, 예컨대 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 이상으로 존재할 수 있다. 한 예에서, 본 개시내용의 다중특이적 항체 분자의 정제된 샘플은 4°C에서 28일 보관 후에 98% 또는 99%를 초과하는 수준으로 단량체를 유지한다. 한 예에서, 인산염 완충 염수(PBS)에서 5 mg/ml의 본 개시내용의 다중특이적 항체 분자의 정제된 샘플은 4°C에서 28일 보관 후에 98%를 초과하는 수준으로 단량체를 유지한다.
- [0490] 본 개시내용의 항체 분자 및 이를 포함하는 조성물은 치료, 예를 들어 병리학적 상태의 치료 및/또는 예방에서 유용하다.
- [0491] 본 개시내용은 또한 하나 이상의 약학상 허용되는 부형제, 희석제 또는 담체와 조합된 본 개시내용의 항체 분자를 포함하는 약학 또는 진단 조성물을 제공한다. 따라서, 특히 본원에 개시된 적응증에 대한 치료 및 의약의 제조에 사용하기 위한 본 개시내용의 항체의 용도가 제공된다.
- [0492] 조성물은 일반적으로 약학상 허용되는 담체를 통상 포함하는 멸균된 약학 조성물의 일부로서 공급될 것이다. 본 발명의 약학 조성물은 약학상 허용되는 보조제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0493] 본 개시내용은 또한 하나 이상의 약학상 허용되는 부형제, 희석제 또는 담체와 함께 본 개시내용의 항체 분자를 첨가하고 혼합하는 것을 포함하는, 약학 또는 진단 조성물의 제조 방법을 제공한다.
- [0494] 항체 분자는 약학 또는 진단 조성물의 유일한 활성 성분일 수 있거나, 예를 들어 항-IL-1 β , 항-T 세포, 항-IFN γ 또는 항-LPS 항체와 같은 다른 항체 성분, 또는 크산틴과 같은 비항체 성분을 포함하는 다른 활성 성분을 동

반할 수 있다. 다른 적합한 활성 성분은 예를 들어 항-CD3 또는 항-CD4 항체와 같은 관용(tolerance)을 유도할 수 있는 항체를 포함한다.

- [0495] 추가의 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 항체, 단편 또는 조성물은 추가의 약학 활성제와 조합하여 사용된다.
- [0496] 약학 조성물은 적합하게는 치료 유효량의 본 발명의 항체 분자를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "치료 유효량"은 표적으로 하는 질환 또는 병태를 치료, 개선 또는 예방하거나 또는 검출 가능한 치료 또는 예방 효과를 나타내는 데 필요한 치료제의 양을 지칭한다. 임의의 항체에 대해, 치료 유효량은 초기에 세포 배양 검정 또는 동물 모델, 일반적으로 설치류, 토끼, 개, 돼지 또는 영장류에서 추정할 수 있다. 동물 모델은 또한 적절한 농도 범위 및 투여 경로를 결정하는데 사용될 수 있다. 그런 정보는 인간에게 투여하기 위해 유용한 용량 및 경로를 결정하는데 사용될 수 있다.
- [0497] 인간 대상체를 위한 정확한 치료 유효량은 질환 상태의 중증도, 대상체의 일반적 건강, 대상체의 연령, 체중 및 성별, 식이, 투여 시간 및 빈도, 약물 조합(들), 반응 민감도 및 요법에 대한 관용/반응에 좌우될 것이다. 이 양은 일상적인 실험에 의해 결정될 수 있고, 이는 임상학의 판단에 속한다. 일반적으로, 치료 유효량은 0.01 mg/kg 내지 50 mg/kg, 예를 들면 0.1 mg/kg 내지 20 mg/kg일 것이다. 대안적으로, 용량은 1일당 1 mg 내지 500 mg, 예컨대 1일당 10 내지 100, 200, 300 또는 400 mg일 수 있다. 약학 조성물은 본 발명의 활성제의 미리 결정된 양을 함유하는 단위 투여 형태로 편리하게 제공될 수 있다.
- [0498] 조성물은 환자에게 개별적으로 투여될 수 있거나 또는 다른 약제, 약물 또는 호르몬과 함께 조합하여(예를 들어, 동시에, 순차적으로 또는 별개로) 투여될 수 있다.
- [0499] 본 개시내용의 항체 분자가 투여되는 용량은 치료될 병태의 특성, 존재하는 염증의 정도, 및 항체 분자가 예방적으로 사용되는지 또는 존재하는 병태를 치료하는지 여부에 좌우된다.
- [0500] 투여 빈도는 항체 분자의 반감기 및 그의 효과의 지속시간에 좌우될 것이다. 만약 항체 분자가 짧은 반감기(예컨대 2 내지 10시간)를 가지면, 1일당 1회 이상 투여하는 것이 필요할 수 있다. 대안적으로, 만약 항체 분자가 긴 반감기(예컨대 2 내지 15일)를 가지면, 단지 1일당 1회, 1주당 1회 또는 심지어 1 또는 2개월마다 1회 투여하는 것이 필요할 수 있다.
- [0501] 약학상 허용되는 담체는 그 자체가 조성물이 투여되는 개체에게 해로운 항체의 생산을 유도하지 않아야 하고, 독성이 없어야 한다. 적합한 담체는 크고, 느리게 대사되는 거대분자, 예컨대 단백질, 폴리펩티드, 리포솜, 폴리사카라이드, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 중합체 아미노산, 아미노산 공중합체, 및 불활성 바이러스 입자일 수 있다.
- [0502] 약학상 허용되는 염, 예를 들면 미네랄 산 염, 예컨대 염산염, 브롬화수소산염, 인산염 및 황산염, 또는 유기산의 염, 예컨대 아세테이트, 프로피오네이트, 말로네이트 및 벤조에이트가 사용될 수 있다.
- [0503] 치료 조성물 내의 약학상 허용되는 담체는 물, 염수, 글리세롤 및 에탄올과 같은 액체를 추가로 함유할 수 있다. 추가로, 보조 물질, 예컨대 습윤제 또는 유화제 또는 pH 완충 물질이 상기 조성물 내에 존재할 수 있다. 그러한 담체는 환자에 의한 섭취를 위해, 약학 조성물을 정제, 환제, 당의정(dragee), 캡슐, 액체, 겔, 시럽, 슬러리 및 현탁액으로 제제화하는 것을 가능하게 한다.
- [0504] 적합한 투여 형태는 예를 들어 주사 또는 주입에 의한, 예를 들면 볼루스 주사 또는 연속 주입에 의한 경구 투여에 적합한 형태를 포함한다. 제품이 주사용 또는 주입용인 경우, 그것은 유성 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액 또는 에멀전의 형태를 취할 수 있고, 현탁제, 보존제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제제화제를 함유할 수 있다. 대안적으로, 항체 분자는 적절한 멸균 액체에 의해 사용하기 전에 재구성하기 위한 건조 형태일 수 있다.
- [0505] 제제화되면, 본 발명의 조성물은 대상체에게 직접 투여될 수 있다. 치료될 대상체는 동물일 수 있다. 그러나, 하나 이상의 실시양태에서 조성물은 인간 대상에게 투여하기 위해 조정된다.
- [0506] 한 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 제제에서, 최종 제제의 pH는 항체 또는 단편의 등전점의 값과 유사하지 않으며, 그것은 제제의 pH가 7이면 8-9 또는 이를 초과하는 pI가 적절할 수 있기 때문이다. 이론에 매이기를 바라지 않지만, 이것은 개선된 안정성을 갖는 최종 제제를 최종적으로 제공할 수 있는 것으로, 예를 들면 항체 또는 단편이 용해된 상태를 유지하는 것으로 여겨진다.
- [0507] 본 개시내용의 약학 조성물은 비제한적으로, 경구, 정맥내, 근육내, 동맥내, 수내, 척추강내, 심실내,

피부경유, 경피(예를 들면, W098/20734 참고), 피하, 복막내, 비강내, 장내, 국소, 설하, 질내 또는 직장 경로를 포함하는 많은 경로에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물을 투여하기 위해 하이포스프레이(hypospray)가 또한 사용될 수 있다. 전형적으로, 치료 조성물은 주사제로서, 액체 용액 또는 현탁액으로서 제조될 수 있다. 주사 전에 액체 비히클 중의 용액 또는 현탁액에 적합한 고체 형태가 또한 제조될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 항체 분자는 피하, 흡입에 의해 또는 국소로 투여된다.

- [0508] 조성물의 직접 전달은 일반적으로 주사, 피하 내로, 복막 내로, 정맥 내로 또는 근육 내로 달성되거나, 또는 조직의 간극 공간(interstitial space)에 전달될 것이다. 조성물은 또한 관심 있는 특정 조직 내로 투여될 수 있다. 투여 치료는 단일 투여 스케줄 또는 다중 투여 스케줄일 수 있다.
- [0509] 조성물 내의 활성 성분은 항체 분자일 것임을 알 것이다. 따라서, 그것은 위장관에서의 분해에 민감할 것이다. 따라서, 만약 조성물이 위장관을 이용한 경로에 의해 투여되는 경우, 항체를 분해로부터 보호하지만 일단 항체가 위장관으로부터 흡수된 후에는 항체를 방출하는 작용제를 조성물이 함유할 필요가 있을 것이다.
- [0510] 약학상 허용되는 담체의 철저한 논의는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Company, N.J. 1991)]에서 이용가능하다.
- [0511] 한 실시양태에서, 제제는 흡입을 포함하는 국소 투여를 위한 제제로서 제공된다.
- [0512] 적합한 흡입가능한 제제는 흡입가능한 분말, 추진 기체를 함유하는 계량 투여 에어로졸 또는 추진 기체가 없는 흡입가능한 용액(예컨대 분무가능한 용액 또는 현탁액)을 포함한다. 활성 물질을 함유하는 본 개시내용에 따른 흡입가능한 분말은 상기 언급된 활성 물질만으로 이루어질 수 있거나, 생리학상 허용되는 부형제와 상기 언급된 활성 물질의 혼합물로 이루어질 수 있다.
- [0513] 이들 흡입가능한 분말은 모노사카라이드(예를 들어, 글루코스 또는 아라비노스), 디사카라이드(예를 들어, 락토스, 사카로스, 말토스), 올리고사카라이드 및 폴리사카라이드(예를 들어, 텍스트란), 폴리알콜(예를 들어, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨), 염(예를 들어, 염화나트륨, 탄산칼슘) 또는 이들의 서로 간의 혼합물을 포함할 수 있다. 모노사카라이드 또는 디사카라이드가 적합하게 사용되고, 특히 락토스 또는 글루코스가 비배타적으로 그의 수화물의 형태로 사용된다.
- [0514] 폐에서의 침착을 위한 입자는 10 마이크로미터 미만, 예컨대 1-9 마이크로미터, 예를 들면 0.1 내지 5 μm , 특히 1 내지 5 μm 의 입자 크기를 필요로 한다. 활성제(예컨대 항체 또는 항체 단편)의 입자 크기가 매우 중요하다.
- [0515] 흡입가능한 에어로졸을 제조하는데 사용될 수 있는 추진 기체는 관련 기술분야에서 알려져 있다. 적합한 추진 기체는 탄화수소, 예컨대 n-프로판, n-부탄 또는 이소부탄 및 할로탄화수소, 예컨대 메탄, 에탄, 프로판, 부탄, 시클로프로판 또는 시클로부탄의 염소화된 및/또는 불소화된 유도체로부터 선택된다. 상기 언급된 추진 기체는 그 자체로 또는 이의 혼합물로 사용될 수 있다.
- [0516] 특히 적합한 추진 기체는 TG 11, TG 12, TG 134a, 및 TG227로부터 선택된 할로겐화된 알칸 유도체이다. 상기 언급된 할로겐화된 탄화수소 중에서, TG134a(1,1,1,2-테트라플루오로에탄) 및 TG227(1,1,1,2,3,3,3-헵타플루오로프로판) 및 이의 혼합물이 특히 적합하다.
- [0517] 추진 기체 함유 흡입가능 에어로졸은 또한 다른 성분, 예컨대 공용매, 안정화제, 표면-활성제(계면활성제), 항산화제, 윤활제 및 pH를 조절하기 위한 수단을 함유할 수 있다. 이들 모든 성분들은 관련 기술분야에 알려져 있다.
- [0518] 본 발명에 따른 추진 기체 함유 흡입가능 에어로졸은 최대 5 중량%의 활성 물질을 함유할 수 있다. 본 발명에 따른 에어로졸은 예를 들면 0.002 내지 5 중량%, 0.01 내지 3 중량%, 0.015 내지 2 중량%, 0.1 내지 2 중량%, 0.5 내지 2 중량% 또는 0.5 내지 1 중량%의 활성 물질을 함유한다.
- [0519] 대안적으로, 폐로의 국소 투여는 예를 들면 분무기, 예를 들면, 압축기에 연결된 분무기(예를 들어, Pari Respiratory Equipment, Inc(미국 버지니아주 리치몬드 소재)에 의해 제작된 Pari Master(R) 압축기에 연결된 Pari LC-Jet Plus(R) 분무기)와 같은 장치를 이용한 액체 용액 또는 현탁액 제제의 투여에 의해 실시될 수 있다.
- [0520] 한 실시양태에서, 제제는 분무에 의한 전달을 위해 단위 용량을 함유하는 별개의 앰플로서 제공된다.
- [0521] 한 실시양태에서, 항체는 재구성을 위한 동결건조된 형태로 또는 대안적으로 현탁액 제제로서 공급된다.

- [0522] 본 개시내용의 항체는 용매 중에 분산되어, 예를 들어 용액 또는 현탁액의 형태로 전달될 수 있다. 이것은 적절한 생리학적 용액, 예를 들어 생리학적 염수, 약학상 허용되는 용매 또는 완충 용액에 현탁될 수 있다. 관련 기술분야에 알려진 완충 용액은 약 4.0 내지 5.0의 pH를 달성하기 위해 물 1 ml 당 0.05 mg 내지 0.15 mg의 에데트산이나트륨, 8.0 mg 내지 9.0 mg의 NaCl, 0.15 mg 내지 0.25 mg의 폴리소르베이트, 0.25 mg 내지 0.30 mg의 무수 시트르산, 및 0.45 mg 내지 0.55 mg의 시트르산나트륨을 함유할 수 있다. 상기 언급한 바와 같이, 현탁액은 예를 들면 동결건조된 항체로부터 만들어질 수 있다.
- [0523] 치료 현탁액 또는 용액 제제는 또한 하나 이상의 부형제를 함유할 수 있다. 부형제는 관련 기술 분야에 널리 알려져 있으며, 버퍼(예컨대, 시트레이트 버퍼, 인산염 버퍼, 아세테이트 버퍼 및 비카르보네이트 버퍼), 아미노산, 우레아, 알콜, 아스코르브산, 인지질, 단백질(예를 들어, 혈청 알부민), EDTA, 염화나트륨, 리포솜, 만니톨, 소르비톨, 및 글리세롤을 포함한다. 용액 또는 현탁액은 리포솜 또는 생분해성 미소구체에 캡슐화될 수 있다. 제제는 일반적으로 멸균 제조 공정을 이용하여 실질적으로 멸균 형태로 제공될 것이다.
- [0524] 이것은 제제를 위해 사용된 완충 용매 용액의 여과에 의한 생산 및 멸균, 멸균 완충 용매 용액 중의 항체의 무균 현탁, 및 관련 기술분야에서 통상의 기술자에게 익숙한 방법에 의해 상기 제제를 멸균 용기 내로 분배하는 것을 포함할 수 있다.
- [0525] 본 개시내용에 따른 분무가능 제제는 예를 들면 포일 봉투에 포장된 단일 투여 단위(예를 들어, 밀봉된 플라스틱 용기 또는 바이알)로서 제공될 수 있다. 각각의 바이알은 일정 부피, 예를 들어 2 ml의 용매/용액 버퍼 내에 단위 용량을 함유한다.
- [0526] 본 개시내용의 항체는 분무를 통한 전달에 적합한 것으로 생각된다.
- [0527] 또한, 본 발명의 항체는 유전자 요법을 사용함으로써 투여될 수 있는 것으로 예상된다. 이를 달성하기 위해, 적절한 DNA 성분의 제어 하에 항체 분자의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 DNA 서열이 환자 내로 도입되어, 상기 DNA 서열로부터 항체 사슬이 발현되고, 제 위치에서(in situ) 조립된다.
- [0528] 본 발명은 또한 요법에 사용하기 위한 상기 정의된 다중특이적 항체 분자를 제공한다.
- [0529] 본 발명은 또한 염증 질환의 제어를 위한 상기 정의된 바와 같은 다중특이적 항체 분자를 제공한다. 바람직하게는, 다중특이적 항체 분자를 사용하여 염증 과정을 감소시키거나 염증 과정을 억제할 수 있다.
- [0530] 또한, 본 발명은 TNF-알파 및 IL-17A 및/또는 IL-17F에 의해 매개되거나 또는 TNF-알파 및 IL-17A 및/또는 IL-17F의 수준 증가와 관련된 병리학적 장애의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 다중특이적 항체 분자를 제공한다. 바람직하게는, 병리학적 상태는 예를 들면 감염(바이러스, 박테리아, 진균 및 기생충), 감염과 연관된 내독소 쇼크, 관절염, 류마티스성 관절염, 건선 관절염, 전신형 소아 특발성 관절염(JIA), 전신성 홍반성 루푸스(SLE), 천식, 만성 폐쇄성 기도 질환(COAD), 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 급성 폐 손상, 골반 염증성 질환, 알츠하이머(Alzheimer) 병, 크론(Crohn) 병, 염증성 장 질환, 과민성 장 증후군, 궤양성 대장염, 캐슬만(Castleman) 병, 강직성 척추염 및 기타 척추관절병증, 피부근육염, 심근염, 포도막염, 안구 돌출증, 자가면역 갑상선염, 페이로니(Peyronie) 병, 복강 질환, 담낭 질환, 모소동(pilonidal) 질환, 복막염, 건선, 아토피성 피부염, 혈관염, 수술 유착, 뇌졸중, I형 당뇨병, 라임 관절염, 수막염, 중추 및 말초 신경계의 면역 매개 염증 장애, 예컨대 다발성 경화증, 길랑-바레(Guillain-Barré) 증후군, 다른 자가면역 질환, 췌장염, 외상(수술), 이식편 대 숙주 질환(graft-versus-host disease), 이식 거부, 폐 섬유증, 간 섬유증, 신장 섬유증, 경피증 또는 전신 경화증을 포함하는 섬유화 장애, 암(흑색종, 간모세포종, 육종, 편평세포 암종, 전이세포암, 난소암 및 혈액학적 악성 종양과 같은 고형 종양 및 특히 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프성 백혈병, 위암 및 결장암 둘 모두), 심근 경색 및 아테롬성 경화증과 같은 허혈성 질환을 포함하는 심장 질환, 혈관 내 응고, 골 재흡수, 골다공증, 치주염 및 저산증(hypochlorhydia)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0531] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 관절염, 류마티스 성 관절염, 건선, 건선 관절염, 전신형 소아 특발성 관절염(JIA), 전신성 홍반성 루푸스(SLE), 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환, 아토피성 피부염, 경피증, 전신 경화증, 폐 섬유증, 염증성 장 질환, 강직성 척추염 및 기타 척추관절병증 및 암으로 이루어진 군으로부터 선택된 병리학적 장애의 치료 또는 예방에 사용된다.
- [0532] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 관절염, 류마티스성 관절염, 건선, 건선 관절염, 전신형 소아 특발성 관절염(JIA), 전신성 홍반성 루푸스(SLE), 천식, 만성 폐쇄성 기도 질환, 만성 폐쇄성 폐 질환, 아토피성 피부염, 경피증, 전신 경화증, 폐 섬유증, 크론병, 궤양성 대장염, 강직성 척추염 및 기타 척추관절병증 및 암으로 이루

어진 군으로부터 선택된 병리학적 장애의 치료 또는 예방에 사용된다.

- [0533] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 관절염, 류마티스성 관절염, 건선, 건선 관절염, 전신형 소아 특발성 관절염(JIA), 전신성 홍반성 루푸스(SLE), 천식, 만성 폐쇄성 기도 질환, 만성 폐쇄성 폐 질환, 아토피성 피부염, 경피증, 전신 경화증, 폐 섬유증, 크론병, 궤양성 대장염, 강직성 척추염 및 기타 척추관절병증으로 이루어진 군으로부터 선택된 병리학적 장애의 치료 또는 예방에 사용된다.
- [0534] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 관절염, 건선 관절염, 전신형 소아 특발성 관절염, 크론병, 염증성 장 질환, 궤양성 대장염, 강직성 척추염 및 기타 척추관절병증, 건선, 화농성 한선염(hidradenitis suppurativa), 베체트(Behcet) 병, 류마티스성 관절염, 전신성 홍 반성 루푸스(SLE), 천식, 심근염, 포도막염, 아토피성 피부염, 혈관염, 증추 및 말초 신경계의 면역 매개 염증 장애, 예컨대 다발성 경화증, 길랑-바레 증후군, 다른 자가 면역 질환, 골다공증, 골 재흡수, 통풍, 유육종증, 쇼그렌(Sjogren) 증후군 및 괴저성 농피증(pyoderma gangrenosum.)으로 이루어진 군으로부터 선택된 병리학적 장애의 치료 또는 예방에 사용된다.
- [0535] 한 실시양태에서, 병리학적 장애는 류마티스성 관절염이다.
- [0536] 한 실시양태에서, 병리학적 장애는 크론병이다.
- [0537] 한 실시양태에서, 병리학적 장애는 궤양성 대장염이다.
- [0538] 한 실시양태에서, 병리학적 장애는 포도막염이다.
- [0539] 한 예에서, 본 발명의 항체는 염증성 또는 면역 관련 질환의 치료에 사용된다. 한 예에서, 염증성 또는 면역 관련 질환은 류마티스성 관절염, 크론병 및 궤양성 대장염으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0540] 본 발명은 또한 통증, 특히 염증과 관련된 통증의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명에 따른 항체 분자를 제공한다.
- [0541] 본 발명은 TNF-알파 및 IL-17A 및/또는 IL-17F에 의해 매개되거나 또는 IL-17A 및/또는 IL-17F의 수준 증가와 관련된 병리학적 장애의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에 있어서의 본 발명에 따른 항체 분자의 용도를 추가로 제공한다. 바람직하게는, 병리학적 장애는 상기 분원에서 설명된 의학적 적응증 중 하나이다. 본 발명은 또한 통증, 특히 염증과 관련된 통증의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에 있어서의 본 발명에 따른 항체 분자의 용도를 제공한다.
- [0542] 본 발명의 항체 분자는 인간 또는 동물 신체에서 TNF-알파 및 IL-17A 및/또는 IL-17F의 효과를 감소시키는 것이 요망되는 임의의 요법에 사용될 수 있다. TNF-알파 및 IL-17A 및/또는 IL-17F는 신체 내에서 순환할 수 있거나 또는 신체의 특정 부위, 예를 들어 염증 부위에 국한되는, 바람직하지 않은 높은 수준으로 존재할 수 있다.
- [0543] 본 발명에 따른 항체 분자는 바람직하게는 염증 질환, 자가면역 질환 또는 암의 제어에 사용된다.
- [0544] 본 발명은 또한 TNF-알파 및 IL-17A 및/또는 IL-17F에 의해 매개되는 장애를 앓고 있거나 또는 이에 걸릴 위험이 있는 인간 또는 동물 대상체를 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 유효량의 본 발명의 항체 분자를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0545] 본 발명에 따른 항체 분자는 또한 예를 들어 진단에, 예를 들어 TNF-알파 및 IL-17A 및/또는 IL-17F를 수반하는 질병 상태의 생체 내 진단 및 영상화에 사용될 수 있다.
- [0546] 따라서, 치료에 사용하기 위한 본 개시내용에 따른 다중특이적 항체 및 이를 사용하는 치료 방법이 제공된다.
- [0547] 한 실시양태에서, 다중특이적 항체(특히, 본 발명에 따른 항체 또는 단편)를 정제하는 방법이 제공된다.
- [0548] 한 실시양태에서, 불순물이 컬럼에 보유되고 항체는 결합되지 않은 분획에 유지되도록 음이온 교환 크로마토그래피를 비결합 방식으로 수행하는 단계를 포함하는, 다중특이적 항체(특히 본 발명에 따른 항체 또는 단편)를 정제하기 위한 방법이 제공된다. 상기 단계는, 예를 들면 pH 약 6-8에서 수행될 수 있다.
- [0549] 상기 방법은 예를 들면 약 4 내지 5의 pH에서 수행되는, 양이온 교환 크로마토그래피를 이용하는 초기 포획 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0550] 상기 방법은 생성물 및 공정 관련 불순물이 생성물 스트림(stream)으로부터 적절히 분할되는 것을 보장하기 위해 추가의 크로마토그래피 단계(들)를 추가로 포함할 수 있다.
- [0551] 상기 정제 방법은 또한 하나 이상의 한외여과(ultra-filtration) 단계, 예컨대 농축 및 정용여과

(diafiltration) 단계를 포함할 수 있다.

- [0552] 상기에서 사용된 바와 같은 정제된 형태는 적어도 90% 순도, 예컨대 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% w/w 이상 순수하다는 것을 지칭하고자 하는 것이다.
- [0553] 내독소가 실질적으로 없다는 것은 일반적으로 항체 생성물 1 mg당 1 EU 또는 그 미만, 예컨대 생성물 1 mg당 0.5 또는 0.1 EU의 내독소 함량을 지칭하고자 하는 것이다.
- [0554] 숙주 세포 단백질 또는 DNA가 실질적으로 없다는 것은 일반적으로 항체 생성물 1 mg당 숙주 세포 단백질 및/또는 DNA 함량이 400 μ g 또는 그 미만, 예컨대 1 mg당 100 μ g 또는 그 미만, 적절한 경우, 특히 1 mg당 20 μ g을 지칭하고자 하는 것이다.
- [0555] 본 발명의 항체 분자는 또한 진단에서, 예를 들면 질병 상태의 생체 내 진단 및 영상화에 사용될 수 있다.
- [0556] 한 실시양태에서, 하기 단계 a), b) 및 c)를 포함하는, 본 발명에 따른 다중특이적 단백질 구축물을 선택하는 방법이 제공된다:
- [0557] a) V_1 또는 V_2 가 주어진 가변 영역 쌍에 대해 dsscFv일 때, 단량체성 다중특이적 단백질의 수율을 결정하는 단계,
- [0558] b) (a)에서 시험된 V_1 또는 V_2 중 어느 쪽이든 동일한 가변 영역 쌍에 대해 dsFv일 때, 단량체성 다중특이적 단백질의 수율을 결정하는 단계 및
- [0559] c) (a) 및 (b)에서 수득된 단량체의 수율을 비교하고, 가장 높은 단량체 수율을 갖는 다중특이적 단백질을 선택하는 단계.
- [0560] 전형적으로, 상기 방법의 단계 (a) 및 (b)에서 "가변 영역 쌍"은 V_H 및 V_L 쌍이다. 일반적으로, V_H 및 V_L 은 함께 항원 결합 도메인 V_1 또는 V_2 를 형성한다. 따라서, 상기 방법은 V_H 및 V_L 쌍이 본 발명의 구축물에서 dsscFv 및 dsFv 둘 모두로서 시험되는 것을 가능하게 하고, 대부분의 단량체 구축물은 단계(c)에서 선택된다.
- [0561] 전형적으로, 상기 방법의 단계 (a) 및 (b)에서, 수율은 정제 후에, 예컨대 친화성 크로마토그래피 후에 결정된다. 단량체 수율은 임의의 적합한 방법, 예컨대 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 결정될 수 있다.
- [0562] 본 명세서의 맥락에서 "포함하는(comprising)"은 포괄하는(including)을 의미하고자 하는 것이다. 기술적으로 적절한 경우, 본 발명의 실시양태는 조합될 수 있다. 실시양태는 특정 특징/요소를 포함하는 것으로 본원에서 설명된다. 또한, 상기 개시내용은 상기 특징/요소로 이루어지거나 또는 본질적으로 그로 이루어지는 별개의 실시양태까지 확장된다.
- [0563] 특허 및 출원과 같은 기술 문헌은 본원에 참고로 포함된다.
- [0564] 본원에 구체적으로 및 명시적으로 언급된 임의의 실시양태는 단독으로 또는 하나 이상의 추가의 실시양태와 조합되어 권리포기(disclaimer)의 기초를 형성할 수 있다.
- [0565] 본 개시내용은 하기 실시예에서 단지 예시로서 추가로 설명되고, 이는 하기 첨부된 도면을 참조한다.
- [0566] **[도면의 간단한 설명]**
- [0567] 도 1 내지 도 7은 본 발명에 따른 항체 분자의 아미노산 및 핵산 서열을 나타낸 것이다.
- [0568] 도 8은 Fab-2xdsscFv 및 Fab-dsscFv-dsFv 포맷을 보여준다.
- [0569] 도 9는 CA2109 마우스 Fab(fwk18 FAB) IgG1(fwk18 IgG)에 대한 적정 곡선을 보여준다.
- [0570] 도 10a는 악티노마이신-D/ 및 인간 TNF- α 및 TrYbe 18B 또는 대조군 화합물인 엔브렐(Enbrel)로 처리된 L929 세포에 대한 대표적인 세포 생존 곡선을 도시한 것이다.
- [0571] 도 10b는 악티노마이신-D/ 및 사이노몰거스 TNF- α 및 TrYbe 18B 또는 대조군 화합물인 엔브렐로 처리된 L929 세포에 대한 대표적인 세포 생존 곡선을 도시한 것이다.
- [0572] 도 11은 TrYbe 18B가 마우스에서 인간 TNF α 유도 호중구 증가증을 억제한다는 것을 보여준다.
- [0573] 도 12는 TrYbe 18B가 마우스에서 인간 TNF α 및 인간 IL-17A 유도 호중구 증가증을 억제한다는 것을 보여준다.

- [0574] 도 13은 TrYbe 18B의 상이한 배치에 대한 SDS PAGE 분석을 보여준다.
- [0575] 도 14는 TrYbe 18B가 시험관 내에서 호중구 이동을 억제함을 보여준다.
- [0576] 도 15는 TrYbe 18B를 사이노몰거스 원숭이에게 IV 볼루스 투여한 후의 TrYbe18B의 혈청 농도를 보여준다.
- [0577] **[실시에]**
- [0578] **실시예 1: 중화 항-인간 TNF-알파 가변 영역의 단리:**
- [0579] B 세포 배양 및 항체 스크리닝을 위한 물질을 생성하기 위해 다음 면역화를 수행하였다:
- [0580] 5마리의 스프라그 돌리(Sprague Dawley) 래트를 소분자 벤즈이미다졸 화합물인 화합물 1(W02013/186229 및 PCT/EP2015/074527에 기재된 바와 같음)로 미리 복합체화된 인간 TNF-알파의 3회 주사로 면역화하였다. 혈청을 생성시키고, ELISA로 인간 TNF-알파에 대한 결합에 대해 시험하였다. 역가는 100,000배 희석을 초과시에도 측정 가능하였고, 따라서 B 세포 배양에 수용 가능하다고 간주되었다.
- [0581] B 세포 배양물은 문헌 [Zubler et al. (1985)] 및 [Lightwood et al. (2013)]에 기재된 것과 유사한 방법을 사용하여 제조하였다. 간단히 설명하면, 웰당 약 5000개 세포의 밀도로 B 세포를 함유하는 비장세포를 10% FCS(PAA laboratories ltd), 2% HEPES(Sigma Aldrich), 1% L-글루타민(Gibco BRL), 1% 페니실린/스트렙토마이신 용액(Gibco BRL), 0.1% β -머캅토에탄올(Gibco BRL), 2-5% 활성화된 비장세포 배양 상청액 및 감마선 조사된 뮤린 흉선종 세포(5×10^4 /웰)가 보충된 200 μ l/웰 RPMI 1640 배지(Gibco BRL)을 사용하여 바코드가 부착된 96웰 조직 배양 플레이트에서 37°C에서 7일 동안 5% CO₂ 분위기에서 배양하였다. 이 프로젝트 동안 7000만 개 이상의 B 세포가 스크리닝되었다.
- [0582] B 세포 배양 상청액 내의 인간 TNF 특이적 항체의 존재는 표적 항원의 공급원으로서 비오틴화된 인간 TNF로 코팅된 10마이크로미터의 수퍼아비딘 중합체 비드(Bangs laboratories)를 사용하는 균질 형광 기반 결합 검정을 사용하여 결정하였다. 10 μ l의 상청액을 바코드가 부착된 96웰 조직 배양 플레이트로부터 매트릭스 플레이트 매트릭스 플레이트(Matrix Platemate) 액체 처리기를 사용하여 5000개의 코팅된 비드를 함유하는 바코드가 부착된 384웰 흑색 벽 검정 플레이트로 옮겼다. 결합은 염소 항-래트 또는 마우스 IgG Fc γ 특이적 Cy-5 접합체(Jackson)를 사용하여 제시되었다. 플레이트는 Applied Biosystems 8200 세포 검출 시스템에서 판독되었다.
- [0583] 대안적으로, ELISA 검정을 사용하여 양성 웰을 확인하였다. 384웰 ELISA 플레이트를 2 μ g/ml의 TNF로 코팅한 다음, 10 μ l의 B 세포 배양 상청액을 차단된 플레이트에 첨가하였다. 1시간 동안 배양한 후, 플레이트를 세척하고, 결합은 염소 항-래트 Fc 특이적 HRP 접합체(Jackson)를 사용하여 제시되었다.
- [0584] 1차 스크리닝 후, 양성 상청액을 아비소 오닉스 히트 피킹(Aviso Onyx hit-picking) 로봇 및 -80°C에서 냉동된 세포 배양 플레이트의 B 세포를 사용하여 96웰 바코드 부착 마스터 플레이트 상에 통합하였다. 이어서, 높은 친화도의 항체를 함유하는 웰을 확인하기 위해 마스터 플레이트를 Biacore 검정에서 스크리닝하였다.
- [0585] TNF α 의 생물학적 활성을 중화시킬 수 있는 항체를 확인하기 위해, 본 발명자들은 마스터 플레이트 내의 B 플레이트 배양 상청액을 사용하여 세포 기반 TNF α 리포터 검정을 수행하였다. 이 검정은 인간 TNF α 를 포함한 NF κ B 경로를 통해 작동하는 많은 자극에 반응하여 알칼리성 포스파타제를 분비하도록 조작된 HEK-293-CD40-BLUE 세포(Invivogen)를 이용하였다. 항체 함유 상청액을 상기 검정에서 1:2.5의 단일 희석액으로 직접 사용하였다. 높은 친화도 차단 항체(Biacore에서 100 pM 미만이고 리포터 검정에서 >90% 억제를 나타냄)를 함유하는 웰을 추가 진행을 위해 선택하였다.
- [0586] 관심 웰의 선택으로부터 항체 가변 영역 유전자의 회수를 허용하기 위해, B 세포의 불균일 집단을 함유하는 주어진 웰에서 항원 특이적 B 세포의 확인을 가능하게 하기 위해 디컨벌루션(deconvolution) 단계를 수행하여야 하였다. 이것은 형광 초점(Fluorescent foci) 방법을 사용하여 달성되었다. 간단히 설명하면, 양성 웰로부터의 면역글로불린 분비 B 세포를 비오틴화된 인간 TNF로 코팅된 스트렙타비딘 비드(New England Biolabs) 및 염소 항-래트 Fc γ 단편 특이적 FITC 접합체(Jackson)의 1:1200 최종 희석액과 혼합하였다. 37°C에서 1시간 동안의 정치 인큐베이션 후에, 항원 특이적 B 세포는 B 세포를 둘러싸고 있는 형광 후광(halo)의 존재로 확인될 수 있었다. 이어서, 올림푸스(Olympus) 현미경을 사용하여 확인된 이들 개별 B 세포는 에펜도르프(Eppendorf) 미세조작기로 집어서 PCR 튜브에 넣었다.
- [0587] 중쇄 및 경쇄 가변 영역 특이적 프라이머를 사용한 역전사(RT)-PCR에 의해 단일 세포로부터 2102, 2101, 2109 및 2111로 알려진 4가지의 상이한 항체에 대한 항체 가변 영역 유전자를 회수하였다. 래트 가변 영역을 마우스

γ1 IgG 또는 Fab(VH) 또는 마우스 카파(VL) 포유동물 발현 벡터 내로 클로닝할 수 있게 하는 제한 부위가 3' 및 5' 말단에 통합된 중첩된(nested) 2° PCR을 이용하여 2라운드의 PCR을 아비소 오닉스 액체 처리 로봇으로 실시하였다. 증쇄 및 경쇄 구축물은 펙틴(Fectin) 293(Invitrogen) 및 1 ml의 부피로 48웰 플레이트에서 발현된 재조합 항체를 사용하여 HEK-293 세포에 동시 형질감염시켰다. 5-7일 발현 후, 상청액을 수거하고, 항체를 추가로 스크리닝하였다.

[0588] EC50 값을 계산하고 최대 억제율을 결정하기 위해, 재조합 래트/마우스 키메라 IgG 및 Fab 분자를 HEK-293-CD40-BLUE 리포터 검정에서 다수의 농도로 스크리닝하였다. 항체가 1가일 때 활성을 보이는지 확인하기 위해 Fab 단편을 시험하였다. IgG는 또한 인간 TNF에 대한 결합 친화도를 결정하기 위해 Biacore 실험에서 분석되었다. Biacore 실험의 검정 포맷은 고정된 항-마우스 IgG-Fc에 의한 마우스 IgG의 포획, 이어서 포획된 표면에 대한 인간 TNF의 적정이다. BIA(Biomolecular Interaction Analysis)는 Biacore T200(GE Healthcare)을 사용하여 수행되었다. 아피니퓨어(Affinipure) F(ab')₂ 단편 염소 항-마우스 IgG, Fc 단편 특이적 항체(Jackson ImmunoResearch)를 ~5000 응답 단위(RU)의 수준으로 아민 커플링 화학을 통해 CM5 센서 칩 상에 고정하였다. 10 μl/분의 유속으로 러닝 버퍼로서 HBS-EP 버퍼(10 mM HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% Surfactant P20, GE Healthcare)를 사용하였다. 고정된 항-마우스 IgG-Fc에 의한 포획을 위해 0.5 μg/mL의 마우스 IgG의 10 μl 주사를 사용하였다. 인간 TNF를 30 μl/분의 유속으로 20 nM에서 포획된 마우스 IgG 상에 2회 주사하였다. 10 μl/분의 유속으로 40 mM HCl의 2 x 10 μl 주사, 이어서 5 mM NaOH의 5 μl 주사로 표면을 재생하였다. 표준 절차에 따라 T200evaluation 소프트웨어(버전 1.0)를 사용하여 배경 제거 결합 곡선을 분석하였다.

[0589] <표 4>

항체	EC50 (ng/ml)	% 억제	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (pM)
CA2109 IgG	0.31	100	4.70E+06	1.19E-04	25
CA2109 Fab	3.8	100	ND	ND	ND

[0590] 증화는 HEK-293-CD40-BLUE 리포터 검정(Invivogen)을 사용하여 측정하였다. EC50 및 증화 %가 제시된다. 결합 동역학을 결정하기 위해 Biacore 분석을 수행하였다. 온 레이트(on rate)(ka), 오프 레이트(off rate)(kd) 및 친화도 상수(KD)가 제시된다.

[0592] 도 9는 CA2109 래트/마우스 Fab(fwk18 FAB) IgG1(fwk18 IgG)에 대한 적정 곡선을 보여준다. 상기한 바와 같은 HEK-293-CD40-BLUE 리포터 검정(Invivogen)을 사용하여 데이터를 결정하였다.

[0593] 상기 기재된 바와 같이 단리된 4개의 항체(2101, 2109, 2111 및 2102) 모두를 하기 표 4a에 나타낸 바와 같이 인간 TNF(hTNF) 및 사이노 TNF(cTNF)에 대한 사이노몰거스 및 인간 TNF 교차 반응성에 대한 래트/인간 키메라 Fab로서 스크리닝하였다.

[0594] Biacore 실험의 분석 포맷은 고정된 항-인간 F(ab')에 의한 래트/인간 키메라 Fab의 포획, 이어서 포획된 표면에 대한 인간 또는 사이노몰거스 TNF의 적정이다. BIA(Biomolecular Interaction Analysis)는 Biacore T200(GE Healthcare)을 사용하여 수행되었다. 아피니퓨어 F(ab')₂ 단편 염소 항-인간 IgG-F(ab')₂ 단편 특이적 항체(Jackson ImmunoResearch)를 ~5000 응답 단위(RU)의 수준으로 아민 커플링 화학을 통해 CM5 센서 칩 상에 고정하였다. 10 μl/분의 유속으로 러닝 버퍼로서 HBS-EP 버퍼(10 mM HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% Surfactant P20, GE Healthcare)를 사용하였다. 고정된 인간 IgG-F(ab')₂에 의한 포획을 위해 0.5 μg/mL의 래트/인간 키메라의 10 μl 주사를 사용하였다. 인간 또는 사이노몰거스 TNF를 30 μl/분의 유속으로 포획된 래트/인간 키메라 Fab(각각 5 nM 또는 3.125 nM) 상에 주사하였다. 10 μl/분의 유속으로 50 mM HCl의 2 x 10 μl 주사, 이어서 5 mM NaOH의 5 μl 주사로 표면을 재생하였다. 표준 절차에 따라 T200evaluation 소프트웨어(버전 1.0)를 사용하여 배경 제거 결합 곡선을 분석하였다.

[0595] <표 4a>

			ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD (pM)
02101	인간 Fab 키메라	hTNF	4.63E+06	1.39E-04	2.99E-11	30
02109	인간 Fab 키메라	hTNF	4.09E+06	1.43E-04	3.49E-11	35
02111	인간 Fab 키메라	hTNF	2.89E+06	1.39E-04	4.81E-11	48
02102	인간 Fab 키메라	hTNF	2.59E+06	2.27E-04	8.73E-11	87

			ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD (pM)
02101	인간 Fab 키메라	cTNF	4.54E+06	9.72E-05	2.14E-11	21
02109	인간 Fab 키메라	cTNF	3.71E+06	1.02E-04	2.74E-11	27
02111	인간 Fab 키메라	cTNF	2.26E+06	2.25E-04	9.98E-11	100
02102	인간 Fab 키메라	cTNF	4.17E+05	8.64E-03	2.07E-08	20720

[0596]

[0597] 항체 2102는 사이노몰거스 TNF에 대한 친화도가 훨씬 낮았다. 이 항체는 또한 인간화 동안 친화도를 잃었고, 따라서 더 이상 진행되지 않았다.

[0598] 이 연구를 바탕으로, CA2109는 사이노몰거스/인간 교차 반응성, 높은 친화도(표 4) 및 강력한 중화 활성(도 9 및 표 4)으로 인해 주요 후보물질로 선택되었다. 이 항체는 이러한 특성을 바탕으로 인간화를 위해 선택되었다.

[0599] 유사한 친화도 및 중화 특성을 갖는 2개의 다른 항체를 CA2109와 병행하여 인간화를 위해서 선택하였고, 이들은 2101 및 2111이었다. 그러나, 2101은 인간화시에 TNF에 대한 친화도를 유지하지 못하였고, 따라서 항체는 더 이상 진행되지 않았다. 항체 2109 및 항체 2111 둘 모두가 성공적으로 인간화된 후, scFv 포맷으로 전환되고, 중화 활성을 확인하기 위해 L929 TNF 억제 검정(하기 실시예 6에서 설명되는 검정)에서 스크리닝되었다(표 4b).

[0600] <표 4b>

항체	IC50 (pM)
CA2111 Fab	12.49
CA2111 VH1 HLds scFv	135.09
CA2111 VH1 LHds scFv	143.24
CA2109 VH3 scFv	16.55

[0601]

[0602] 표 4b에서 알 수 있는 바와 같이, 항체 2111은 이 검정에서 scFv로서 활성을 보유하지 않았기 때문에, 다중특이적 TrYbe 항체 분자에 사용하기에는 적합하지 않았다. 오직 항체 2109만이 인간화된 scFv로서 사이노몰거스-인간 교차 반응성, 높은 친화도 및 중화 능력 및 열 안정성을 유지하였다. 항체 CA2109의 인간화에 대해서는 아래에서 보다 자세히 설명된다.

[0603] 실시예 2: 항-TNF-알파 항체 CA2109의 인간화

[0604] 항체 CA2109는 인간 생식계열 프레임워크 상에 상보성 결정 영역(CDR)을 이식함으로써 인간화되었다. 래트 항체(공여자) 서열과 인간 생식계열(수여자) 프레임워크의 정렬을 설계된 인간화 서열과 함께 도 6 및 도 7에 나타내었다.

[0605] 선택된 경쇄 생식계열 수여자 서열은 인간 VK1 2-1(U) A20 V-영역 + JK2 J-영역(V BASE, <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)이었다. 선택된 중쇄 생식계열 수여자 서열은 인간 VH3 1-3 3-21 V-영역 + JH4 J-영역(V BASE, <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)이었다. 공여자로부터 수여자 서열로 이식된 CDR은 코티아(Chothia)/카바트

의 조합된 정의가 사용되는 CDR-H1을 제외하고는 카바트(Kabat et al. 1987)에 의해 정의된 바와 같다.

- [0606] 초기 V-영역 서열을 코딩하는 유전자는 엔텔레콘 게엠베하(Entelechon GmbH)에 의한 자동화된 합성 방법에 의해 설계되고 구축되었으며, 올리고뉴클레오티드 지향 돌연변이 유발에 의해 이식된 버전 gL1, gL18, gH1 및 gH2를 생성하도록 변형되었다. gL18 유전자 서열을 인간 C-카파 불변 영역(Km3 동종이형(allotype))을 코딩하는 DNA를 함유하는, 유씨비 셀텍(UCB Celltech) 인간 경쇄 발현 벡터 pMhCK 델타에 서브클로닝하였다. gH2 서열을 인간 중쇄 감마-1 CH1 불변 영역을 코딩하는 DNA를 함유하는 유씨비 셀텍 발현 벡터 pMhGFab에 서브클로닝하였다.
- [0607] 완전한 활성을 보유하고 높은 열 안정성을 유지하기 위해, 인간화 중쇄의 위치 48(이소류신), 49(글리신), 71(발린), 73(라이신), 78(알라닌) 및 93(트레오닌)(카바트 넘버링)이 유지되었다. 유사하게, 인간화된 경쇄의 위치 65(트레오닌), 71(티로신) 및 87(페닐알라닌)(카바트 넘버링)의 공여자 잔기가 유지되었다. 또한, 위치 31, 50 및 52의 아스파라긴 잔기를 각각 세린, 아스파르트산 및 세린으로 돌연변이시키함으로써 경쇄 내의 3개의 탈아미드화 부위를 제거하였다. 선택된 최종 가변 이식 서열 gL18 및 gH2를 도 6 및 7 및 서열 번호 91 및 92에 나타내었다. 하기 실시예에서, 항체 2109에 대한 임의의 언급은 원래의 래트 모 서열보다는 이들 인간화된 서열을 언급하는 것이다.
- [0608] **실시예 3: 포유동물 세포에서 Fab496.g3-(HC)dsscFv(HL)2109 및 Fab496.g3-(LC) dsscFv(HL)645 플라스미드의 구축 및 발현**
- [0609] 인간 IL-17A 및 인간 IL-17F에 대한 항체 CA028_00496.g3(본원에서 항체 496.g3으로도 언급됨)의 생산은 WO2008/047134 및 WO2012/095662에 이미 기재되어 있다. 상기 항체는 pM 친화도로 인간 IL-17A, IL-17F 및 IL-17A/F 이중이량체에 결합한다. 항체 496.g3의 Fab 포맷의 CDR, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 및 경쇄 및 중쇄의 아미노산 및 이를 코딩하는 DNA 서열을 도 1에 나타내었다. 496.g3(IL-17A/F 결합) Fab 불변 영역은 인간 C-카파 불변 영역(K1m3 동종이형) 및 인간 감마-1 CH1 불변 영역 및 힌지(G1m17 동종이형)를 포함한다.
- [0610] 항-인간 알부민 항체 645의 생산은 이전에 WO2013/068571에 이미 기재되어 있다. 항체 645의 CDR, 중쇄 및 경쇄 가변 영역, scFv 및 dsscFv 포맷의 아미노산 및 이를 코딩하는 DNA 서열을 도 3에 나타내었다.
- [0611] 항-TNF 항체 2109의 생산은 상기 설명되었으며, 항체 2109의 CDR, 중쇄 및 경쇄 가변 영역, scFv 및 dsscFv 포맷의 아미노산 및 이를 코딩하는 DNA 서열을 도 2에 나타내었다.
- [0612] 항체 2109 및 항체 645의 dsscFv는 각각 Kabat 넘버링 시스템을 사용하여 잔기 44(중쇄)와 100(경쇄) 사이의 안정화 디설피드 결합을 함유하였다.
- [0613] 항체 645 HL의 dsscFv를 11개 아미노산의 경쇄 링커(SGGGGSGGGGS)에 의해 항체 496.g3의 Fab c카파 단편에 연결하고, 항체 CA2109 HL의 dsscFv를 11개 아미노산의 중쇄 링커 SGGGGTGGGGGS[본원에서 S, 2xG4S로도 언급됨](서열 번호 2) 또는 SGGGGTGGGGGS [본원에서 S, G4T, G4S로도 언급됨](서열 번호 1)에 의해 항체 496.g3의 Fab CH1 단편에 연결하였다. 생성된 항체 포맷은 도 8에서 2xdsscFv로 제시되고,본원에서 TrYbe로 알려져 있다.
- [0614] 일시적인 발현은 Fab496.g3-(HC)dsscFv(HL)2109(서열 번호 127)(Fab HC 및 dsscFv2109를 연결하는 링커 SGGGGTGGGGGS를 가짐) 및 Fab496.g3-(LC) dsscFv(HL)645(서열 번호 131)(Fab LC 및 dsscFv645를 연결하는 링커 SGGGGSGGGGS를 가짐)를 발현하기 위해 사용되었다. 전체 경쇄 및 중쇄 Fab 단편을 코딩하는 유전자를 이. 콜라 이에서의 발현을 위해 코돈 수준에서 이전에 최적화된 플라스미드로부터 제한 클로닝하였다. 645 dsHL scFv를 코딩하는 AgeI-EcoRI 유전자 단편을 pTrYbe HC#1로부터 절제하고, pED489에 클로닝하여 UCB 자체 생산 발현 벡터 pNAFL(Dhami, 2012)에 '경쇄 단일 유전자 벡터' 496.g3 LC-645 dsHL scFv를 생성하였다. 2109 dsHL scFv(BspEI-EcoRI 단편)를 코딩하는 DNA를 DNA2.0에 의해 합성하고, pTrYbe HC#1(Dhami, 2012)에 클로닝하여 UCB 자체 생산 발현 벡터 pNAFH(Dhami, 2012)에 '중쇄 단일 유전자 벡터' 496.g3 Fab-2109 dsHL scFv를 생성하였다. HEK293 세포에서의 2개의 단일 유전자 벡터 모두의 일시적인 동시 발현 후, 중쇄 링커 SGGGGTGGGGGS를 갖는 Fab496.g3-(HC)dsscFv(HL)2109 및 Fab496.g3-(LC)dsscFv(HL)645를 포함하는 TrYbe 단백질을 세포 배양 상층액으로부터 정제하였다. 정제된 TrYbe는 높은 수준의 단량체(89%) 및 높은 열 안정성(Tm 71°C)을 나타내었고, 따라서 안정적인 세포주 생성을 위해 진행되었다.
- [0615] 본원에서 항체 분자 Trybe 18B로도 지칭되는 Fab496.g3-(HC)dsscFv(HL)2109(서열 번호 125)(Fab HC를 dsscFv2109에 연결하는 링커 SGGGGSGGGGS를 가짐) 및 Fab496.g3-(LC) dsscFv(HL)645(서열 번호 131)(FabLC를 dsscFv645에 연결하는 링커 SGGGGSGGGGS를 가짐)를 포유류 CHO 세포주로부터 약 1 g/L의 생산성 수준 및 약 70% 단량체로 발현시키기 위해 안정한 발현을 사용하였다. 정제된 TrYbe18B를 생성하기 위해 하류 정제 공정이

수행되었다.

[0616] 실시예 4 Fab496.g3-(HC)dsHLscFv2109(LC)dsHLscFv645(Trybe 18B)의 항원 표적에 대한 Biacore 친화도 및 동시 결합

[0617] 실시예 3의 방법에 따라 생산된, 본원에서 항체 분자 Trybe 18B로도 지칭되는 Fab496.g3-(HC)dsscFv(HL)2109(서열 번호 125)(Fab HC를 dsscFv2109에 연결하는 링커 SGGGGSGGGGS를 가짐) 및 Fab496.g3-(LC) dsscFv(HL)645(서열 번호 131)(FabLC를 dsscFv645에 연결하는 링커 SGGGGSGGGGS를 가짐)를 포함하는 항체 분자를 인간 TNF-알파, 인간 IL-17A, 인간 IL-17F 및 인간 혈청 알부민에 대한 친화도에 대해 아래에서 설명되는 방법에 따라 시험하였다:

[0618] 검정 포맷은 고정된 항-인간 IgG-F(ab')₂에 의한 TrYbe 18B의 포획, 이어서 포획된 표면에 대한 인간 TNF, 인간 IL-17A, 인간 IL-17F 및 인간 혈청 알부민의 적정이었다. BIA(Biomolecular Interaction Analysis)는 Biacore T200(GE Healthcare)을 사용하여 수행되었다. 아피니퓨어 F(ab')₂ 단편 염소 항-인간 IgG, F(ab')₂ 단편 특이적 항체(Jackson ImmunoResearch)를 ~5000 응답 단위(RU)의 포획 수준으로 아민 커플링 화학을 통해 CM5 센서 칩 상에 고정하였다. 10 µl/분의 유속으로 러닝 버퍼로서 HBS-EP 버퍼(10 mM HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% Surfactant P20, GE Healthcare)를 사용하였다. 고정된 항-인간 IgG-F(ab')₂에 의한 포획을 위해 0.5 µg/mL의 TrYbe 18B의 10 µl 주사를 사용하였다. 인간 TNF, 인간 IL-17A, 인간 IL-17F 및 HSA를 30 µl/분의 유속으로 다양한 농도(각각, 5 nM 내지 0.15625 nM, 5 nM 내지 0.15625 nM, 10 nM 내지 0.3125 nM 및 100 nM 내지 3.125 nM)에서 포획된 TrYbe 18B 상에 적정하였다. 10 µl/분의 유속으로 50 mM HCl의 2 x 10 µl 주사, 이어서 5 mM NaOH의 5 µl 주사로 표면을 재생하였다. 표준 절차에 따라 T200evaluation 소프트웨어(버전 1.0)를 사용하여 배경 제거 결합 곡선을 분석하였다. 동역학적 파라미터는 피팅 알고리즘으로부터 결정되었다. 그 결과를 표 5에 나타낸다.

[0619] <표 5>

샘플	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)	KD(pM)
인간 TNF	5.54E+06	6.43E-05	1.16E-11	11.6
인간 IL-17A	5.52E+06	1.00E-05*	1.81E-12	1.81
인간 IL-17F	5.06E+06	3.80E-05	7.51E-12	7.51
인간 알부민	7.75E+04	1.35E-04	1.74E-09	1740

[0620]

[0621] 1.00E-05* 기구의 한계로 인해 해리가 제한됨.

[0622] 항체 분자 TrYbe 18B의 사이노몰거스 TNF, 사이노몰거스 IL-17A, 사이노몰거스 IL-17F 및 사이노몰거스 알부민에 대한 결합을 측정하기 위해 추가의 검정을 수행하였다. 검정 포맷은 고정된 항-인간 IgG-F(ab')₂에 의한 TrYbe 18B의 포획, 이어서 포획된 표면에 대한 사이노몰거스 TNF, IL-17A, IL-17F 및 알부민의 적정이었다. BIA(Biomolecular Interaction Analysis)는 Biacore T200(GE Healthcare)을 사용하여 수행되었다. 아피니퓨어 F(ab')₂ 단편 염소 항-인간 IgG, F(ab')₂ 단편 특이적 항체(Jackson ImmunoResearch)를 ~5000 응답 단위(RU)의 포획 수준으로 아민 커플링 화학을 통해 CM5 센서 칩 상에 고정하였다. 10 µl/분의 유속으로 러닝 버퍼로서 HBS-EP 버퍼(10 mM HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% Surfactant P20, GE Healthcare)를 사용하였다. 고정된 항-인간 IgG-F(ab')₂에 의한 포획을 위해 0.5 µg/mL의 TrYbe 18B의 10 µl 주사를 사용하였다. 사이노몰거스 TNF, IL-17A, IL-17F 및 알부민을 30 µl/분의 유속으로 다양한 농도(각각, 5 nM 내지 0.15625 nM, 10 nM 내지 0.3125 nM, 40 nM 내지 1.25 nM 및 100 nM 내지 3.125 nM)에서 포획된 TrYbe 18B 상에 적정하였다. 10 µl/분의 유속으로 50 mM HCl의 2 x 10 µl 주사, 이어서 5 mM NaOH의 5 µl 주사로 표면을 재생하였다. 표준 절차에 따라 T200evaluation 소프트웨어(버전 1.0)를 사용하여 배경 제거 결합 곡선을 분석하였다. 동역학적 파라미터는 피팅 알고리즘으로부터 결정되었다. 그 결과를 표 6에 나타낸다.

[0623] <표 6>

샘플	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)	KD(nM)
사이노몰거스 TNF	8.90E+06	6.38E-05	7.16E-12	7.16
사이노몰거스 IL-17A	1.67E+06	1.00E-05*	5.99E-12	5.99
사이노몰거스 IL-17F	5.82E+05	1.67E-04	2.88E-10	288
사이노몰거스 알부민	5.83E+04	1.59E-04	2.72E-9	2723

[0624]

[0625] 1.00E-05* 기구의 한계로 인해 해리가 제한됨.

[0626] 인간 IL-17A, 인간 TNF 및 인간 혈청 알부민의 TrYbe 18B에 대한 동시 결합을 평가하였다. TrYbe 18B 구조물은 고정된 항-인간 IgG-F(ab')₂에 의해 센서 칩에 포획된 후, hIL-17A 단독, hTNF 단독, HSA 단독, 또는 hIL-17A, hTNF 및 HSA의 혼합 용액을 포획된 TrYbe 18B 상에 별개로 적정하였다.

[0627] BIA(Biomolecular Interaction Analysis)는 Biacore T200(GE Healthcare)을 사용하여 수행되었다. TrYbe 18B 구조물은 인간 TNF, IL-17A, IL-17F 및 HSA에 결합하는 TrYbe 18B에 대한 Biacore 동역학에 대해 상기 방법에서 언급한 바와 같이 센서 칩 표면에 포획되었다. 100 nM HSA, 20 nM hIL-17A, 20 nM hTNF, 또는 100 nM HSA, 20 nM hIL-17A, 20 nM hTNF의 최종 농도를 갖는 혼합 용액을 포획된 TrYbe 18B 상에 별개로 적정하였다.

[0628] 조합된 hIL-17A/hTNF/HSA 용액에 대한 결합 반응은 표 7에 나타난 바와 같이 독립적인 주사에 대한 반응의 합과 동일하였다. 이것은 TrYbe 18B가 인간 IL-17A, 인간 TNF 및 HSA에 동시에 결합할 수 있음을 입증한다.

[0629] <표 7>

샘플	분석물	결합 (RU)
TrYbe18B	hTNF	47
	hIL-17A	38
	HSA	58
	hTNF + hIL-17A +HSA	130 (143)

[0630]

[0631] TrYbe 18B에 대한 사이노몰거스 IL-17A, TNF 및 알부민의 동시 결합을 측정하기 위해 추가의 분석을 수행하였다. TrYbe 18B 구조물은 고정된 항-인간 IgG-F(ab')₂에 의해 센서 칩에 포획된 후, 사이노몰거스 IL-17A 단독, 사이노몰거스 TNF 단독, 사이노몰거스 HSA 단독, 또는 사이노몰거스 IL-17A, TNF 및 알부민의 혼합 용액을 포획된 TrYbe 18B 상에 별개로 적정하였다.

[0632] BIA(Biomolecular Interaction Analysis)는 Biacore T200(GE Healthcare)을 사용하여 수행되었다. TrYbe 18B 구조물은 사이노몰거스 TNF, IL-17A, IL-17F에 결합하는 TrYbe 18B에 대한 Biacore 동역학에 대해 상기 방법에서 언급한 바와 같이 센서 칩 표면에 포획되었다. 100 nM CSA, 20 nM cynoIL-17A, 20 nM cynoTNF, 또는 100 nM HSA, 20 nM cynoIL-17A, 20 nM cynoTNF의 최종 농도를 갖는 혼합 용액을 포획된 TrYbe 18B 상에 별개로 적정하였다.

[0633] 조합된 cynoIL-17A/cynoTNF/CSA 용액에 대한 결합 반응은 표 8에 나타난 바와 같이 독립적인 주사에 대한 반응의 합과 동일하였다. 이것은 TrYbe 18B가 사이노몰거스 IL-17A, 사이노몰거스 TNF 및 CSA에 동시에 결합할 수 있음을 입증한다.

[0634] <표 8>

샘플	분석물	결합 (RU)	
TrYbe18B	cTNF		42
	cIL-17A		44
	CSA		41
	cTNF + cIL-17A + CSA		118 (127)

[0635]

[0636] 실시예 6 TNF(인간 및 사이노몰거스)에 대한 Fab496.g3-(HC)dsHLscFv2109(LC) dsHLscFv645(Trybe 18B)의 시험관내 세포 기반 활성

[0637] 실시예 3의 방법에 따라 생산된, 본원에서 항체 분자 Trybe 18B로도 지칭되는 Fab496.g3-(HC)dsscFv(HL)2109(서열 번호 125)(Fab HC를 dsscFv2109에 연결하는 링커 SGGGGSGGGGS를 가짐) 및 Fab496.g3-(LC) dsscFv(HL)645(서열 번호 131)(FabLC를 dsscFv645에 연결하는 링커 SGGGGSGGGGS를 가짐)를 포함하는 항체 분자를 인간 TNF-알파에 대한 활성에 대해 시험관내 세포 검정에서 시험하였다. L929 세포주는 TNF-α의 세포 독성 효과에 감수성인 무린 섬유육종 세포주이다. TNF는 인간, 사이노몰거스 또는 무린 TNF-α에 결합하는 TNF 수용체를 통해 자극하여 세포자멸을 유도한다. 세포는 TNF-α에 의한 사멸에 대한 감수성을 증가시키는 악티노마이신 D와 함께 처리된다. 악티노마이신 D/TNF-α 및 TrYbe 18B로 처리한 후 L929 세포의 생존력은 루시페라제 반응(CellTiter-Glo, Promega)을 통해 ATP 수준(생존력이 감소하면 감소하는)을 검출함으로써 결정되었다.

[0638] L929 세포를 1시간 예비 인큐베이팅한 후, 384웰 평평 바닥 플레이트에서 30 μl의 최종 부피로 TrYbe 18B(농도 범위 8.12E-9 M 내지 1.23E-13 M) 또는 대조군 화합물 엔브렐(농도 범위 1.3E-9 M - 2E-14 M)의 존재 하에 2.35 μg/ml의 악티노마이신 D 및 인간 TNF 알파로 처리하였다. 37°C에서 24시간 후에, CellTiter-Glo(Promega Ltd)에 의해 5% CO₂ 세포 생존력을 측정하였다. 도 10a는 악티노마이신-D/및 인간 TNF-α 및 TrYbe 18B 또는 대조군 화합물 엔브렐로 처리된 L929 세포에 대한 대표적인 세포 생존 곡선을 보여준다.

[0639] L929 세포를 1시간 예비 인큐베이팅한 후, 384웰 평평 바닥 플레이트에서 30 μl의 최종 부피로 TrYbe 18B(농도 범위 8.12E⁻⁹ M 내지 1.23E⁻¹³ M) 또는 대조군 화합물 엔브렐(농도 범위 1.3E⁻⁹ M - 2E⁻¹⁴ M)의 존재 하에 2.35 μg/ml의 악티노마이신 D 및 사이노몰거스 TNF 알파로 또한 처리하였다. 37°C에서 24시간 후에, CellTiter-Glo(Promega Ltd)에 의해 5% CO₂ 세포 생존력을 측정하였다. 도 10b는 악티노마이신-D/및 사이노몰거스 TNF-α 및 TrYbe 18B 또는 대조군 화합물 엔브렐로 처리된 L929 세포에 대한 대표적인 세포 생존 곡선을 보여준다.

[0640] 인간 또는 사이노몰거스 TNF-α에 의해 자극되었을 때, TrYbe 18B는 용량 의존적 방식으로 TNF-α의 사멸 효과를 완전히 억제할 수 있었다: 평균 EC₅₀ 5.87 pM(인간, N=3) 및 평균 EC₅₀ 4.97 pM(사이노몰거스, N=2). TrYbe 18B는 마우스 TNF와 교차반응하지 않고, 따라서 무린 TNF-α(N = 3)의 사멸 효과를 억제하지 않았다.

[0641] 실시예 7 IL-17A 및 IL-17F에 대한 Fab496.g3-(HC)dsHLscFv2109(LC) dsHLscFv645(Trybe 18B)의 시험관내 세포 기반 활성

[0642] 실시예 3의 방법에 따라 생산된, 본원에서 항체 분자 Trybe 18B로도 지칭되는 Fab496.g3-(HC)dsscFv(HL)2109(서열 번호 125)(Fab HC를 dsscFv2109에 연결하는 링커 SGGGGSGGGGS를 가짐) 및 Fab496.g3-(LC) dsscFv(HL)645(서열 번호 131)(FabLC를 dsscFv645에 연결하는 링커 SGGGGSGGGGS를 가짐)를 포함하는 항체 분자를 인간 및 사이노몰거스 IL-17A 및 F에 대한 활성에 대해 시험관내 세포 검정에서 시험하였다.

[0643] IL-1β와 조합된 IL-17A 및 IL-17F는 무린 섬유모세포 세포주 NIH 3T3에 의한 IL-6 방출을 유도한다. 이것은 항-IL-17A 및 항-IL-17F 분자의 중화 능력을 시험하는 검정 시스템의 기초를 형성한다.

[0644] W02012/095662에 기재된 TrYbe 18B 또는 항-IL17A/F 항체 CA028_00496.g3(농도 범위 5000 ng/mL 내지 19.5 ng/mL)을 재조합 인간 IL-17A(30 ng/mL) 및 재조합 인간 IL-1β(50 pg/mL)과 함께 37°C에서 4시간 동안 예비 인큐베이팅하였다. 이어서, TrYbe/항체 단백질 복합체를 96웰 평평 바닥 플레이트에서 NIH-3T3 세포로 옮겼다. 37°C, 5% CO₂, 100% 습도에서 3일 동안 인큐베이팅한 후, 무세포 상청액을 수거하고, IL-6의 수준을 MSD로 측정하였다.

- [0645] TrYbe 18B 또는 항-IL17A/F 항체 CA028_00496.g3(농도 범위 5000 ng/mL 내지 19.5 ng/mL)을 재조합 인간 IL-17F(300 ng/mL) 및 재조합 인간 IL-1 β (50 pg/mL)과 함께 37°C에서 4시간 동안 예비 인큐베이션하였다. 이어서, TrYbe/항체 단백질 복합체를 96웰 평평 바닥 플레이트에서 NIH-3T3 세포로 옮겼다. 37°C, 5% CO₂, 100% 습도에서 3일 동안 인큐베이션한 후, 무세포 상청액을 수거하고, IL-6의 수준을 MSD로 측정하였다.
- [0646] TrYbe 18B 또는 항-IL17A/F 항체 CA028_00496.g3(농도 범위 5000 ng/mL 내지 19.5 ng/mL)을 재조합 사이노몰거스 IL-17F(30 ng/mL) 및 재조합 인간 IL-1 β (50 pg/mL)과 함께 37°C에서 4시간 동안 예비 인큐베이션하였다. 이어서, TrYbe/항체 단백질 복합체를 96웰 평평 바닥 플레이트에서 NIH-3T3 세포로 옮겼다. 37°C, 5% CO₂, 100% 습도에서 3일 동안 인큐베이션한 후, 무세포 상청액을 수거하고, IL-6의 수준을 MSD로 측정하였다.
- [0647] TrYbe 18B 또는 항-IL17A/F 항체 CA028_00496.g3(농도 범위 5000 ng/mL 내지 19.5 ng/mL)을 재조합 사이노몰거스 IL-17F(300 ng/mL) 및 IL-1 β (50 pg/mL)과 함께 37°C에서 4시간 동안 예비 인큐베이션하였다. 이어서, 트리바디/항체 단백질 복합체를 96웰 평평 바닥 플레이트에서 NIH-3T3 세포로 옮겼다. 37°C, 5% CO₂, 100% 습도에서 3일 동안 인큐베이션한 후, 무세포 상청액을 수거하고, IL-6의 수준을 MSD로 측정하였다.
- [0648] TrYbe 18B 또는 항-IL17A/F 항체 CA028_00496.g3(농도 범위 5000 ng/mL 내지 19.5 ng/mL)을 재조합 사이노몰거스 IL-17F(300 ng/mL) 및 IL-1 β (50 pg/mL)과 함께 37°C에서 4시간 동안 예비 인큐베이션하였다. 이어서, 트리바디/항체 단백질 복합체를 96웰 평평 바닥 플레이트에서 NIH-3T3 세포로 옮겼다. 37°C, 5% CO₂, 100% 습도에서 3일 동안 인큐베이션한 후, 무세포 상청액을 수거하고, IL-6의 수준을 MSD로 측정하였다.
- [0649] NIH 3T3 생물검정에서, TrYbe 18B는 인간과 사이노몰거스 원숭이(cyno) IL-17A 및 IL-17F 유도 IL-6 방출을 농도 의존적으로 모두 억제하였다(데이터 미제시). TrYbe 18B는 대조군 항체 CA028_00496.g3(데이터 미제시)와 동등한 효능을 나타냈다.
- [0650] **실시예 8 TNF-알파에 대한 Fab496.g3-(HC)dsHLscFv2109 (LC)dsHLscFv645(Trybe 18B)의 생체내 활성**
- [0651] 실시예 3의 방법에 따라 생산된, 본원에서 항체 분자 Trybe 18B로도 지칭되는 Fab496.g3-(HC)dsscFv(HL)2109(서열 번호 125)(Fab HC를 dsscFv2109에 연결하는 링커 SGGGGSGGGGS를 가짐) 및 Fab496.g3-(LC) dsscFv(HL)645(서열 번호 131)(FabLC를 dsscFv645에 연결하는 링커 SGGGGSGGGGS를 가짐)를 포함하는 항체 분자를 TNF-알파의 억제를 시험하기 위해 생체내 검정에서 시험하였다.
- [0652] 마우스에서 외인성 인간 TNF 알파의 복막 투여는 호중구와 관련된 국소 염증 반응을 일으킨다. 이 반응은 주로 마우스 TNF 수용체 I(TNFR1)의 활성화 및 NF- κ B 매개 전사 후의 호중구 케모카인의 후속 방출을 통해 유발된다. 상기 인간 TNF 알파 유도 호중구 모델은 인간 IL-17A/F와 독립적인 생리학 시스템에서 인간 TNF 알파에 대한 TrYbe 18B의 생체 내 효능 및 효력을 결정하는데 사용될 수 있다. 인간 TNF 알파가 상기 모델에서 유일한 염증 자극원이기 때문에, TrYbe 18B를 사용한 예방 처리는 인간 TNF 알파 유도 복막 호중구 증가를 억제할 것이라는 가설을 세웠다.
- [0653] Balb/c 마우스를 PBS 또는 증가하는 농도의 TrYbe 18B(0.1, 1 또는 10 mg/kg)로 정맥 내로 처리하였다. PBS 또는 TrYbe 18B 처리 1시간 후에, 마우스에게 PBS 또는 인간 TNF 알파(0.3 μ g/kg)를 복막 내로 시험 투여하였다. 4시간 후, 마우스를 인도적인 방법으로 처사시키고, 유동 세포 계측법에 의해 호중구 증가를 평가하기 위해 복막 세척액을 수거하였다. 결과는 n=8/군의 평균(+/- SEM)이다. 통계적 비교는 던넛 사후 검정(**** = p \leq 0.0001)을 이용한 일원 분산 분석을 사용하여 계산되었다.
- [0654] 도 11은 TrYbe 18B가 1 및 10 mg/kg(각각 96% 및 100% 억제)에서 반응을 거의 완전히 제거하면서 인간 TNF 알파 유도 호중구 증가를 용량 의존적으로 억제할 수 있음을 보여준다. 이 시스템에는 인간 IL-17A/F가 없기 때문에, 이것은 TrYbe 18B의 항-인간 TNF 알파 dsscFv가 생체 내에서 효능이 있고 강력하다는 것을 시사한다.
- [0655] **실시예 9 TNF-알파 및 IL-17A에 대한 Fab496.g3-(HC)dsHLscFv2109 (LC)dsHLscFv645(Trybe 18B)의 생체내 활성**
- [0656] 실시예 3의 방법에 따라 생산된, 본원에서 항체 분자 Trybe 18B로도 지칭되는 Fab496.g3-(HC)dsscFv(HL)2109(서열 번호 125)(Fab HC를 dsscFv2109에 연결하는 링커 SGGGGSGGGGS를 가짐) 및 Fab496.g3-(LC) dsscFv(HL)645(서열 번호 131)(FabLC를 dsscFv645에 연결하는 링커 SGGGGSGGGGS를 가짐)를 포함하는 항체 분자를 TNF-알파 및 IL-17A의 억제를 시험하기 위해 생체내 검정에서 시험하였다.
- [0657] TrYbe 18B 항체가 동시에 존재하는 두 사이토카인에 의한 생물학적 반응을 억제할 수 있음을 보여주는 것이 중

요하다. 이전의 연구들은 생체 내에서 인간 TNF 알파와 IL-17A의 조합이 자극 단독의 합보다 더 큰 상승적 호중구 반응을 생성함을 보였다. 따라서, TrYbe 18B의 생체 내 효능 및 효력은 인간 IL-17A와 조합하여 인간 TNF 알파에 대해 시험하였다. 이 모델에서 인간 TNF 알파와 인간 IL-17A의 상승적 기여를 더 구분하기 위해, 인간 TNF 알파(101.4) 및 인간 IL-17A/F(항체 CA028_00496.g3)에 대한 단일특이적 항체를 사용하였다.

[0658] Balb/c 마우스를 PBS, 항체 CA028_00496.g3(30 mg/kg), 101.4(30 mg/kg) 또는 증가하는 농도의 TrYbe 18B(0.1, 1 또는 10 mg/kg)로 정맥 내로 처리하였다. 항체 투여 1시간 후에, 마우스에게 PBS, 인간 IL-17A(10 µg/kg), 인간 TNF 알파(0.3 µg/kg) 또는 인간 TNF 알파(0.3 µg/kg)와 인간 IL-17A(10 µg/kg)의 조합물을 복막 내로 시험 투여하였다. 4시간 후, 마우스를 인도적인 방법으로 치사시키고, 유동 세포 계측법에 의해 호중구 증가를 평가하기 위해 복막 세척액을 수거하였다. 결과는 n=8/군의 평균(+/- SEM)이다. 통계적 비교는 던넛 사후 검정 (*p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001, ****p≤0.0001)을 이용한 일원 분산 분석을 사용하여 계산되었다.

[0659] 도 12는 인간 TNF 알파와 조합한 인간 IL-17A의 복막내 투여가 단독으로 투여된 자극의 합보다 훨씬 큰 국소 호중구 증가 반응을 유도함을 보여준다. 또한, 이 모델에서 인간 TNF 알파의 억제제는 조합된 IL-17A/TNF 알파 유도 반응을 IL-17A 단독 투여 후에 관찰된 것과 유사한 수준으로 감소시켰다. 이와 유사하게, 인간 IL-17A/F의 억제제(과량의 항체 CA028_00496.g3 사용)는 조합된 IL-17A/TNF 알파 유도 반응을 단지 TNF 알파 단독 투여 후에 관찰된 것과 동일한 수준으로 억제할 수 있었다. 이와 대조적으로, TrYbe 18B는 IL-17A/TNF 알파 유도 호중구 증가를 항체 CA028_00496.g3 또는 101.4에 의해 달성된 수준을 초과하는 수준으로 용량 의존적으로 억제할 수 있었다(10 mg/kg의 TrYbe 18B에서 96%의 억제 vs. 각각 30 mg/kg의 101.4 및 항체 CA028_00496.g3 사용시의 81% 및 67% 억제). 이 데이터는 함께 TrYbe 18B가 생체내 모델에서 인간 TNF 알파와 인간 IL-17A 둘 모두를 동시에 억제할 수 있음을 보여준다.

[0660] **실시예 10 Fab496.g3-(HC)dsHLscFv2109(LC)dsHLscFv645(Trybe 18B)의 생물물리학적 특성 규명**

[0661] 실시예 3의 방법에 따라 생산된, 본원에서 항체 분자 Trybe 18B로도 지칭되는 Fab496.g3-(HC)dsscFv(HL)2109(서열 번호 125)(Fab HC를 dsscFv2109에 연결하는 링커 SGGGSGGGGS를 가짐) 및 Fab496.g3-(LC) dsscFv(HL)645(서열 번호 131)(FabLC를 dsscFv645에 연결하는 링커 SGGGSGGGGS를 가짐)를 포함하는 항체 분자, 및 실시예 3의 방법에 따라 생산된, 본원에서 항체 분자 Trybe 18T로도 지칭되는 Fab496.g3-(HC)dsscFv(HL)2109(서열 번호 127)(Fab HC 및 dsscFv2109를 연결하는 링커 SGGGTGGGGGS를 가짐) 및 Fab496.g3-(LC) dsscFv(HL)645(서열 번호 131)(FabLC 및 dsscFv645를 연결하는 링커 SGGGSGGGGS를 가짐)를 포함하는 항체 분자를 생물물리학적 특성 규명 실험에서 시험하였다.

[0662] 항체 분자의 3개의 배치를 분석하였다(표 9 참조). 이 연구를 통해 TrYbe 18B 분자의 전반적인 생화학적 및 생물물리학적 특성을 결정하였다.

[0663] 또한, 모 TrYbe 18B 분자와 다르게 용리되는 안정한 배치 2의 정제로부터의 분획(A3)을 분석하여 동일성을 확인하였고, 따라서 TrYbe 18B 분자의 예기치 않은 불순물 및/또는 생물학적 특성을 설명할 수 있었다.

[0664] <표 9> 생물물리학적 특성 규명을 위해 사용된 TrYbe 18B의 배치

	샘플	농도 (mg/ml)
일시적 배치	TrYbe T (일시적)	4.6
안정한 배치 1	TrYbe 18B (미니 풀 LP10)	2.64
안정한 배치 2	TrYbe 18B (미니 풀 MP77)	14.18

[0665] 배치의 순도는 크기 배제 HPLC(SEC HPLC)(데이터 미제시) 및 SDS PAGE(비환원 및 환원 조건 하의)에 의해 결정되었다(도 13).

[0667] SEC HPLC로 판단했을 때, 모든 샘플이 동일한 체류 시간에서 용리되었고, 고 분자량 종은 2.2% 미만이었다(일시적 배치: 0.56%; 안정한 배치 1: 0.59%; 안정한 배치 2: 2.2%)다. 일시적 샘플은 주 피크보다 늦게 용리되는 넓

은 피크로 표시된 바와 같이 저 분자량의 오염 물질을 함유하였다.

- [0668] 도 13은 SDS PAGE 4-20% 노백스(Novex) 트리스/글리신(Invitrogen)을 사용하여 TrYbe 18B의 상이한 배치에 대한 SDS PAGE 분석을 보여준다. (A) 비환원(+ N-에틸말레이미드(NEM) 및 (B) 환원 조건 하에서의 분석. 레인 1 = 블루 인비트로젠 마커(Blue Invitrogen Marker) 참조; 레인 2 = A3(안정한 배치 2의 정제 분획); 레인 3 = 일시적 배치; 레인 4 = 안정한 배치 1; 레인 5 = 안정한 배치 2. 3개의 모든 배치는 완전하게 조립된, 디설피드 쌍을 이룬 항체 분자에 기인하는 ~130 kDa(비환원 조건하에)에서의 밴드 및 각각의 환원된 중쇄 및 경쇄와 일치하게 ~50 kDa(환원 조건 하에)에서의 이중선(doublet)을 갖는 SDS PAGE에 의해 유사한 수준의 순도를 보였다. 비환원 조건 하에서, A3(레인 2)에서 관찰된 것과 동등한 밴드가 ~50 kDa에 존재하였다. A3은 무순상 질량 스펙트럼 분석(50.8 kDa) 및 N 말단 서열결정(우세한 경쇄)에 의해 시스테인으로 캐핑된 경쇄인 것으로 확인되었다. 질량 스펙트럼 분석이 어떠한 중쇄도 식별하지 못하기 때문에, 관심 샘플에 대한 50 kDa(비환원 겔)에서의 밴드는 경쇄로 생각되었다. 이것은 나중에 폰시우 에스(Ponseau S)로 염색된 블롯으로부터 절제된 밴드의 N 말단 서열결정 분석에 의해 확인되었고; 경쇄 N 말단(AIQLTQSPSS.)만이 식별되었다.
- [0669] pI 측정:
- [0670] 방법 1: 1 mg/ml의 30 μ l의 단백질 샘플, 0.35% 메틸셀룰로스, 4% pH3-10 양성전해질(ampholyte)(Pharmalyte), 1 μ l의 각각의 합성 pI 마커(4.65 및 9.77) 및 최종 부피를 100 μ l로 만들기 위한 HPLC 등급수. 이어서, 혼합물을 iCE3 IEF 분석기(ProteinSimple)를 사용하여 1500 V에서 1분 동안 예비 포커싱한 후, 3000 V에서 5분 동안 포커싱하여 분석하였다. 이어서, 보정된 전기영동도를 Empower 소프트웨어(Waters)를 사용하여 통합하였다.
- [0671] 방법 2: 2 mg/ml의 30 μ l의 단백질 샘플, 105 μ l의 1% 메틸셀룰로스, 12 μ l의 pH3-8 양성전해질(Pharmalyte), 1.5 μ l의 각각의 합성 pI 마커(4.65 및 9.77) 및 최종 부피를 300 μ l로 만들기 위한 HPLC 등급수. 이어서, 방법 1과 마찬가지로 iCE3를 사용하여 혼합물을 분석하였다.
- [0672] TrYbe T 및 18B의 모든 배치에 대한 실험 pI는 높았으며(9.2-9.4 범위), 따라서 예상된 제제 pH(~pH 5)에서 총 분자 전하가 대략 0일 가능성은 낮다(응집 위험이 증가한 경우).
- [0673] 분획 A3의 pI는 대부분 8.31(48.6%)인 것으로 밝혀졌다.
- [0674] 분자 안정성:
- [0675] 분자 안정성은 용융 온도(T_m)(언폴딩(unfolding)의 척도) 및 교반의 효과(물리적 스트레스, 이어서 응집에 의한 언폴딩)에 의해 측정되었다.
- [0676] TrYbe T 및 18B의 모든 배치의 시차 주사 열량계(DSC)에 의한 T_m 분석은 2개의 주요 도메인을 구별할 수 있다. 보다 낮은 언폴딩 이벤트는 2109 scFv로 인해 발생하였다. 버퍼 물질종 및 pH는 용융 온도에 영향을 미치지 않는 것으로 보였다.
- [0677] 서모플루오르(ThermoFluor) 검정은 DSC 분석에서 유래한 것과 유사한 T_m 값(관찰된 경우)을 제시하였지만, 상이한 도메인을 구분하는 것은 쉽지 않았다. 안정한 배치 1 및 안정한 배치 2에 대해서는 보다 높은 언폴딩 도메인만이 분명하게 나타났다. 과량의 경쇄의 존재에 기인할 수 있는, 일시적 배치에 대한 보다 이른 언폴딩 전이(48-50 $^{\circ}$ C)를 식별하는 것이 가능하였다.
- [0678] <표 10> 시차 주사 열량계(DSC) 및 서모플루오르 검정에 의한 T_m 유도: 모든 TrYbe 18B 분자는 IgG4 분자(~68 $^{\circ}$ C)보다 더 낮은 초기 언폴딩 이벤트를 보였다.

		일시적 배치	안정한 배치 1	안정한 배치 2
서모 플루오르	분석 1 (PBS pH 7.40)	3개의 분명한 전이 : 48.85±0.52°C;60.95±0.35°C;70.9±0.2°C	61.63±0.29°C;71.2±0.23°C	ND
	분석 2 (PBS pH 7.40)	50.1±0.6°C;71.3±0.3°C	71.0±0.2°C	71.9±0.2
	분석 2 (PBS pH 7.40 + NEM)	71.0±0.2;61.4±0.3°C	61.4±0.3°C	71.5±0.2°C
DSC	PBS pH 7.4	2개의 전이 : 63.8±0.4°C ;72.6±0.1°C	2개의 전이 : 62.9±0°C;71.8±0.1°C	ND
	Ac pH 5	2개의 전이 : 61.8±0.1°C ;72.2±0.1°C	2개의 전이 : 61.7±0°C ;71.9±0.1°C	ND

[0679]

[0680]

ND는 분석이 수행되지 않았음을 나타낸다(물질의 이용가능성 때문에).

[0681]

요약하면, TrYbe T 및 18B의 3개의 배치 사이에 유의한 차이가 없다는 것이 상기 분석에서 분명하였다.

[0682]

TrYbe 18B는 pI가 높았지만, 종래의 포맷(IgG 및 Fab' 분자)에 비해 다소 낮은 T_m을 나타내었고, 이것은 분자의 2109scFv 성분의 CDR에 의해 좌우되는 것으로 보였다. 모든 배치에는 과량의 경쇄가 포함되어 있고, 이에 의해 관찰된 불균일성/불안정성이 발생할 가능성이 있지만, 이것은 정화를 통해 제거할 수 있었다.

[0683]

실시예 11 IL-17A 및 IL-17F에 대한 Fab496.g3-(HC)dshLscFv2109 (LC)dshLscFv645(Trybe 18B)의 시험관내 활성

[0684]

IL-17A 및 IL-17F 이소형에 추가로, TNF 알파는 Th17 세포에 의해 생산되는 주요 사이토카인이며, 관절의 활막 세포와 같은 비조혈 조직의 활성화를 통해 호중구의 동원을 간접적으로 유도한다고 알려져 있다. 본 연구에서는, 호중구 이동의 복잡한 시험관내 모델에서 TrYbe18B의 효능을 IL-17AF를 표적화하는 조합된 개별 항체 및 TNF 알파를 표적화하는 엔브렐에 대해 비교하였다.

[0685]

RA 활막세포의 활성화: 제1일: 배양된 RA 활막세포(계대배양 6)를 웰당 10⁴ 세포로 24웰 트랜스웰 플레이트의 하부 챔버에 씨딩하고, 37°C에서 24시간 동안 인큐베이팅하였다. 제2일: 다음날, 추가의 항-TNF 알파 중화 엔브렐을 사용하거나 사용하지 않으면서, IL-17A 특이적 항체(WO2008/001063에 기재된 바와 같은 항체 497) 또는 IL-17F 또는 IL-17AF 특이적 항체(항체 CA028_00496.g3)로 미리 차단된(실온에서 1시간) Th17 세포(EWBE-037388)로부터 유래된 상청액(1:10 희석 비율의)으로 활막세포를 활성화하였다. Th17은 또한 IL-17A+F 및 TNF 알파를 중화하기 위해 음성 대조군 A33 IgG 또는 TrYbe18B와 미리 인큐베이팅하였다. 배양은 총 0.5 ml의 대조군 배지 또는 자극 배지에서 수행하였다. 시험된 모든 항체는 Th17 상청액에 존재하는 표적 사이토카인을 완전히 중화하기 위해 과량(10 µg/ml)으로 사용하였다. 이어서, 자극된 섬유모세포를 이동 검정 전에 추가로 24시간 동안 인큐베이팅하였다.

[0686]

호중구 이동 검정: 제3일: 인간의 전혈로부터 인간의 백혈구(leucocyte)를 단리하기 위해, 40 ml ACK 용해 버퍼를 10 ml의 인간 혈액과 10분 동안 실온에서 혼합하여 RBC를 효율적으로 용해시켰다. 이어서, 백혈구를 10분 동안 400 g에서 회전시키고, 20 ml PBS로 2회 더 세척한 후, 단순(plain) RPMI 배지(Gibco)에 10⁶ 세포/ml로 재현탁하여 계수하였다. 5x10⁵ 백혈구(0.5 ml)를 트랜스웰의 상부 챔버에 씨딩하고, 37°C에서 6시간 동안 인큐베이팅하였다. 3.0 µM 투과성 막을 통해 하부 챔버로 이동한 백혈구를 단리하고, 호중구를 확인하기 위해 항-인간 CD18 특이적 항체(Ebioscience)로 30분 동안(2 µl/빙상에서의 시험) 표지하였다. 이어서, 항체 염색된 샘플을 BD LSRII 포르테사(Fortessa) X20 세포 계측 분석기에서 FACS 획득 전에 인산염 완충 염수(PBS)(pH7.4)로 1회 세척하였다. 모든 샘플을 시그마 참조 비드로 스파이킹된 200 µl의 PBS에 재현탁하였다. 비교 대상으로서 IgG(-항-TNF 알파)를 사용하여 던넷 사후 검정을 이용한 일원 분산 분석을 사용하여 통계 분석을 수행하였다.

[0687]

TrYbe18B 또는 IL-17 이소형 특이적 항체 및 TNF 알파 차단 항체를 사용하여, 복잡한 전임상 시험관내 검정에서 인간 호중구의 이동을 조절할 때 IL-17 및 TNF 알파의 개별적이고 집단적인 영향을 결정하는 것이 가능하였다. Th17 세포로부터의 상청액을 사용하여 활성화된 RA 활막세포는 호중구의 화학주성 반응을 현저히 증가시켰다(도 14). 호중구 이동은 이소형 매치된 음성 대조군에 비해 특정 IL-17A 차단에 의해 유의하게 억제되었다. RA 활막 세포 활성화 전에 Th17 상청액 내의 IL-17F 단독의 중화는 호중구의 이동 능력을 변화시키지 않았다. 이와 대조적으로, IL-17A 및 IL-17F의 이중 억제에는 호중구 이동을 IL-17A 억제 단독보다 더 큰 정도로 억제하였다. 엔브

렐을 사용한 TNF 알파의 예비 차단은 또한 호중구의 화학주성에 주목할만한 영향을 주었으며, 이것은 추가의 IL-17 이소형 특이적 중화 항체에 의해 추가로 억제되었다. 중요한 것은, TrYbe18B를 사용한 IL-17A, IL-17F 및 TNF의 삼중특이적 차단이 이들 사이토카인을 중화하기 위해 별도의 항체를 사용하는 것과 유사한 호중구 이동 억제를 입증하였다는 것이다.

[0688] 본 연구에서, 본 발명자들은 호중구 이동의 최적 억제가 별도의 차단(항-IL-17AF + 엔브렐)을 사용한 또는 TrYbe18B를 사용한 삼중특이적 차단을 통한 IL-17AF 및 TNF 알파의 중화를 통해 달성됨을 입증하였다.

[0689] 실시예 12 생체 내에서 TrYbe 18B의 약동학(PK) 분석

[0690] 4마리의 수컷 사이노몰거스 원숭이에게 TrYbe18B의 10 mg/kg의 정맥내(IV) 볼루스 용량을 투여하고, 28일 동안 선택된 간격으로 혈청 샘플을 수집하였다. IL17A/F 및 TNF 결합 영역 둘 모두의 존재를 확인하는 면역검정을 사용하여 샘플을 TrYbe18B의 농도에 대해 분석하였다. 2개의 구획된 PK 분석이 수행되었다.

[0691] TrYbe18B의 혈청 농도는 FcRn에 결합하고 FcRn에 의해 재순환되는 능력을 갖는 고 분자량 단백질과 일치하였다 (도 15). 이 특성은 그의 알부민 결합 도메인에 의해 TrYbe18B에 부여된다. TrYbe18B의 IV 투여 후 초기 농도는 혈장 부피와 유사한 중앙 구획 부피를 갖는 분자와 일치하였다. 농도는 약 5.6일의 말단 (베타) 반감기로 2중 지수(biexponential) 방식으로 감소하였다(표 11). 느린 말단 반감기는 TrYbe18B의 비교적 느린 클리어런스 (clearance)와 일치하고; FcRn에 대한 결합 및 FcRn에 의한 재순환과 일치한다. 느린 클리어런스는 또한 분자의 임의의 결합 성분의 실질적인 절단이 겔보기 클리어런스 증가로서 나타날 것이므로, 생체 내에서 TrYbe의 안정성을 입증한다.

[0692] <표 11> 사이노몰거스 원숭이에게 IV 투여한 후의 TrYbe18B의 추정 PK 파라미터

동물	C _{max} (µg/mL)	중앙 구획 부피 (mL/kg)	항정 상태 부피 (mL/kg)	CL (mL/ 일 /kg)	말단 반감기 (일)
평균	329	31.2	48.1	6.70	5.59
SD	62.8	6.01	12.8	3.01	1.29

[0693] CL = 클리어런스,
[0694]

[0695] C_{max} = 최대 혈청 농도,

[0696] SD = 표준 편차.

도면

도면1a

(a) 항체 496g3의 CDR 서열

CDRH1: GFTFSDYNMA (서열 번호71)
 CDRH2: TITYEGRNTYYRDSVKG (서열 번호72)
 CDRH3: PPQYYEGSIYRLWFAH (서열 번호73)
 CDRL1: RADESVRTLMH (서열 번호74)
 CDRL2: LVSNSEI (서열 번호75)
 CDRL3: QQTWSDPWT (서열 번호76)

(b) 항체 496g3의 경쇄 가변 영역 (서열 번호77)

AIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCRADESVRTLMHWYQQKPGKAPKLLIYLVSNSEIGVPDRF
 SGSGSGTDFRLTISSLQPEDFATYYCQQTWSDPWTFGQGTKVEIK

(c) 항체 496g3의 중쇄 가변 영역 (서열 번호78)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYNMAWVRQAPGKGLEWVATITYEGRNTYYRD
 SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPPQYYEGSIYRLWFAHWGQGLVTVS
 S

(d) 항체 496g3의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 DNA (서열 번호79)

gcatccagctgacgcaatcgccctcctcgtgtcagcagcgtggcgatagggtcacgacacacgtcggccgatgaatcggtc
 cgcactctgatgcattggatcagcaaaagccgggaaaggccccgaagctgctcatctacctgtgagcaatccgagatcggagtc
 cggaccgcttcagcggctggcagcgggaaccgactccgctgactatctcctcgtgcaaccggaggactcgtactactactg
 cagcagacctggtcagatccgtggactttcggcgagggaaccaaagtggaaatcaagcggact

(e) 항체 496g3의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 DNA (서열 번호80)

gaagtgagctgggtggaatccggcgaggactggtgcagcccggatcattgagacttctgtgagcagcatcaggcttacttctc
 ggactacaatatggcatgggtgcgccaagcgcctgtaaggactggaatgggtcgcgactatcactatgagggcggaatactta
 ctatagggatagcgtcaaaagcgcctttaccatctcacgggacaacgctaagaactcctgtactcctcaaatgaactcactcaggc
 gaagatacggcctgtactactgtgcctcgcctccgcagctactacgaagggtccatctaccgccttgggtcgccttggggacag
 gaacgctggtgactgtgtcctc

(f) 항체 496g3의 경쇄 (VL-CL) (서열 번호81)

AIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCRADESVRTLMHWYQQKPGKAPKLLIYLVSNSEIGVPDRF
 SGSGSGTDFRLTISSLQPEDFATYYCQQTWSDPWTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQ
 LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLTLSKADY
 EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

(g) 항체 496g3의 중쇄 (VH-CH1) (서열 번호82)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYNMAWVRQAPGKGLEWVATITYEGRNTYYRD
 SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPPQYYEGSIYRLWFAHWGQGLVTVS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSG
 LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

도면1b

(h) 항체 496g3의 경쇄를 코딩하는 DNA (신호 서열 미함유) (서열 번호83)

gcgatccagctgacgcaatcgccgtcctcgctgtcagcgagcgtgggcataggggtcacgat
cacctgtcggggccgatgaatcgggtccgcactctgatgcattgggtatcagcaaaagccgggaa
aggccccgaagctgctcatctacctgggtgagcaattccgagatcggagtcccggaccgcttc
agcggtttcgggcagcgggaaccgacttccgcctgactatctcctcgctgcaaccggaggactt
cgctacttactactgcccagcagacctgggtcagatccgtggactttcgggcagggaaccaaaag
tggaaatcaagcggactgtcgcgcacacctcgggtgttcatctttccaccgtcagacgaacaa
cttaaaagcgggaactgcgtcgggtgtgcctccttaacaacttttacctagagaagccaa
ggtccagtggaaggtggacaatgcccttcaaagcggaaacagccaggagtccgtgaccgagc
aggactcaaaagattcgacttatagcttgtcgtccacgctcaccctgagcaaagcagactac
gaaaagcacaaggtgtacgcttgcgaagtgaccaccaaggcttgtcgagccccgtgaccaa
atccttcaaccggggagaatgc

(i) 항체 496g3의 중쇄를 코딩하는 DNA (신호 서열 미함유) (서열 번호84)

gaagtgcagctgggtggaatccggcggaggactgggtgcagcccgggtggatcattgagactttc
gtgtgcagcatcaggctttactttctcggactacaatatggcatgggtgcgccaagcgctg
gtaaaggactggaatgggtcgcgactatcacttatgaggggagggaatacttactatagggat
agcgtcaaaggacgctttaccatctcacgggacaacgctaagaactccctgtacctccaaat
gaactcactcagggcagaagatacggccgtgtactactgtgcctcgcctccgcagtactacg
aagggtccatctaccgcttttggttcgcccattggggacagggaacgctgggtgactgtgtcc
tcggcttcgaccaagggggcctcgggtgttccctctggcgcctagctccaagagcacttcagg
cggaacggctgccctcggatgcctggtaaggactacttcccagagcccgtgaccgtgtcat
ggaacagcggagctctgactagcggagtgcacaccttccggcgggtgctgcaaagctcaggc
ctgtactcgtctcctcagtggtcactgtcccgtcctcctcgtcggggactcaaacgtacat
ctgcaacgtcaatcacaaccgtcaaataccaaagtcgacaagaaggtcgagcctaagtcgt
gc

도면2a

(a) 항체 2109의 CDR 서열

CDRH1: GYTFDNYIH (서열 번호85)
 CDRH2: YINPSSAYAHYNEKFKT (서열 번호86)
 CDRH3: RYYSAMPFAY (서열 번호87)
 CDRL1: RASEDIYSGLA (서열 번호88)
 CDRL1: RASEDIYNGLA (서열 번호136)
 CDRL2: DSSTLHT (서열 번호89)
 CDRL2: NSNTLHT (서열 번호137)
 CDRL2: NSSTLHT (서열 번호138)
 CDRL2: DSNTLHT (서열 번호139)
 CDRL3: QQNYDFPLT (서열 번호90)

(b) 항체 2109 gL18의 경쇄 가변 영역 (서열 번호91) (비돌연변이된*)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYSGLA^WYQQKPGKVPKLLIYDSSTLHTGV
 PSRFSGTGSGTDYTLTISSLQPEDVATYFCQQNYDFPLTFGQGTKLEIKRT

(c) 항체 2109 gH2의 중쇄 가변 영역 (서열 번호92) (비돌연변이된*)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS^CAASGYTFDNYIHWVRQAPGKGLEWIGYINPSSAY
 AHYNEKFKTRFTISVDKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRYYSAMPFAYWGQG
 TLVTVSS

(d) 항체 2109 gL18의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 DNA (서열 번호93) (비돌연변이된*)

gatatacagatgacccaatcaccaagctctctgagtgctccggtggcgatcgcgttacaattacctgccgagctagcggagatatac
 tcaggactggcctggtaccagcaaaagcctggcaaaagtcctaaagctctgatctacgactccagtcacctgcacactggtgtgcca
 gccgcttagcggaaactggaactggaaccgactatacactgacgatttcctcactgcaaccggaagcgtggcaacctactctgtcag
 caaaactacgactcccctgacgttgggcaaggacaaagctggagatcaaacgtacc

(e) 항체 2109 gH2의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 DNA (서열 번호94) (비돌연변이된*)

gaagttcaactggtcgaaagcggaggtgggctcgtgaaacctggcggatctctgcgattgtcatgtgctgcaagcggctacacgttta
 ccgataactatataccactgggtgcaacaagcaccaggggaaggactggaatggattggatataaaccggagctccgcctacgcac
 actacaacgagaaatcaagacccgattcacatctccgtggacaagccaagaactccgcttacctgcaaatgaactctctgcccgc
 cgaagacactgccgtgtattactgcaccgccgatactatagcgtatgcccttgcctactggggacaaggacactggtcactgtct
 caagt

(f) 항체 2109 gL18의 경쇄 가변 영역 (서열 번호95) (돌연변이된 /)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYSGLA^WYQQKPGKVPKLLIYDSSTLHTGV
 PSRFSGTGSGTDYTLTISSLQPEDVATYFCQQNYDFPLTFGCGTKLEIKRT

(g) 항체 2109 gH2의 중쇄 가변 영역 (서열 번호96) (돌연변이된 /)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS^CAASGYTFDNYIHWVRQAPGKCLEWIGYINPSSAY
 AHYNEKFKTRFTISVDKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRYYSAMPFAYWGQG
 TLVTVSS

* 즉, 디설피드 결합을 위해 조작된 시스테인 부재

/ 즉, 디설피드 결합을 위해 조작된 시스테인 존재

도면2b

(h) 항체 2109 g L18의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 DNA (서열 번호97) (돌연변이된 ¹)

2109dsvL
 gatatccagatgaccagtcgacctccagcctctccgctccgctgggagacagagtgacgatcactgacagcatcagaggacatc
 tactctggccttgccttgatcagcagaagccgggaaagtgcccaaaactgctcatctatgactcctcaccctccacacgggagtgcc
 atcgcgcttcagcgggaccggtatctgggaccgactacaccctgaccattcatcgctccagccggagatgtgccacttactctgcc
 aacagaattacgactcccacttacttttggatgtggcactaagctcgaatcaagcgacc

(i) 항체 2109 gH2의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 DNA (서열 번호98) (돌연변이된 ¹)

gaaagtgcagttggtggagtcggggggagggtggtgaagccaggagatcattgcggtgtcatgtcggcttcgggctacacttca
 ctgacaattacattcactgggtgcaacaagcaccagggaagtgcctcgaatggattggctacatcaaccgtcaagcgatacggcca
 ttacaacgaaaagtcaagaccgggtcaccatctccgtggataagcgaaaacagcgcgtaccttcagatgaactccctcggggcc
 gaggataccgcttactactgactagacgggtactacagccatgccgttcgctactggggacaaggcactctggtcaccgtgt
 cgtcg

(j) 항체 2109 gH2gL18의 scFv (VH-VL) (서열 번호99) (비돌연변이된*)
 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFDNYIHWVRQAPGKCLEWIGYINPSSAY
 AHYNEKFKTRFTISVDKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRYYSSAMPFAYWGQG
 TLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYS
 GLAWYQKPKGKVPKLLIYDSSLTHTGVPSPRFSGTGSGTDYTLTISLQPEDVATYFCQ
 QNYDFPLTFGGTKLEIKRT

(k) 항체 2109 gH2gL18의 scFv (VH-VL)를 코딩하는 DNA (서열 번호100) (비돌연변이된*)

gaaagtcaactggtcgaagcggaggtgggctcgtgaaacctgcccgatctctcgattgcatgtgctgcaagcgggctacacgttta
 ccgataactatatacactgggtgcaacaagcaccagggaagggactggaatggattggatataatcccgagctccgctacgcac
 actacaacgagaaattcaagaccgattcaccatctccgtggacaagaactccgcttacctgcaaatgaactctctgcccgc
 cgaagacactgccgtgtattactgaccgccgatactatagcctatgcccttgcctactggggacaaggacactggtcactgtct
 caaagtggagggtggcgggtctggcgggtggcgggtccggtggcgggtggtatcgggaggtggcgggtctgatatacagatgaccaatcac
 caagctctctgagtgcttccgtggcgtatcgcttacaattacctgcccagctagcagggatatactcaggactggcctggtaccag
 caaaagcctggcaaaagtgcctaagctcctgatctacgactccagctaccctgcacactgggtggcaagccgctttagcggaaactggat
 ctggaaccgactatacactgacgatttctcactgcaaccggagacgtggcaacctactctgtcagcaaaactacgacttcccctgga
 cgtttgggcaagggcaaaagctggagatcaaacgtacc

(l) 항체 2109 gH2gL18의 dsscFv (VH-VL) (서열 번호101) (돌연변이된 ¹)
 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFDNYIHWVRQAPGKCLEWIGYINPSSAY
 AHYNEKFKTRFTISVDKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRYYSSAMPFAYWGQG
 TLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYS
 GLAWYQKPKGKVPKLLIYDSSLTHTGVPSPRFSGTGSGTDYTLTISLQPEDVATYFCQ
 QNYDFPLTFGGTKLEIKRT

(m) 항체 2109 gH2gL18의 dsscFv (VH-VL)를 코딩하는 DNA (서열 번호 102) (돌연변이된 ¹)

gaaagtgcagttggtggagtcggggggagggtggtgaagccaggagatcattgcggtgtcatgtcggcttcgggctacacttca
 ctgacaattacattcactgggtgcaacaagcaccagggaagtgcctcgaatggattggctacatcaaccgtcaagcgatacggcca
 ttacaacgaaaagtcaagaccgggtcaccatctccgtggataagcgaaaacagcgcgtaccttcagatgaactccctcggggcc
 gaggataccgcttactactgactagacgggtactacagccatgccgttcgctactggggacaaggcactctggtcaccgtgt

도면2c

cgtcgggaggaggaggctcgggtggaggcggatcgggtggcggaggagcggcggaggcgggtcggatatccagatgacccag
tcgccgtccagcctctccgcctccgtgggagacagagtgacgatcactgacagatcagaggacatctactctggccttgcttgta
tcagcagaagccgggaaaggtgcccaactgctcatctatgactcctcgaccctccacacgggagtgccatcgcgcttcagcgggac
cggatctgggaccgactacacctgaccatttcatcgctccagccggaggatgtgccactactctgccacaagaattacgactccc
acttactttggatgtggcactaagctcgaatcaagcgcacc

* 즉, 디솔피드 결합을 위해 조작된 시스테인 부재
/ 즉, 디솔피드 결합을 위해 조작된 시스테인 존재

(n) 래트 항체 2109의 경쇄 가변 영역 (서열 번호140)
DIVMTQSPASLSASLGETVTIECRASEDIYNGLAWYQQKPGKSPHLLIYNSNTLHTGV
PSRFSGTGSGTQYSLKINSLQSEDVATYFCQQNYDFPLTFGSGTKLELK

(o) 래트 항체 2109의 중쇄 가변 영역 (서열 번호133)
EVQLHQSGAALVKPGASVKLSCKTSGYTFDNYIHWVKQSPGKSLEWIGYINPSSAY
AHYNEKFKTKATLTVDKSTNTAYMELSRLTSEDSATYFCTRRYYSAMPFAYWGQG
TLVTVSS

(p) 인간 VK1 2-1(U) A20 JK2 수여자 프레임워크 (서열 번호141)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASLQSGV
PSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDVATYYCQKYNAPYTFGQGTKLEIK

(q) 인간 VH3 1-3 3-21 JH4 수여자 프레임워크 (서열 번호134)
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSTSY
IYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYFDYWGGTLVTVSS

(r) 항체 2109 gL1의 경쇄 가변 영역 (서열 번호142)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYNGLAWYQQKPGKVPKLLIYNSNTLHTG
VPSRFSGTGSGTDYTLTISLQPEDVATYFCQQNYDFPLTFGQGTKLEIK

(s) 항체 2109 gH1의 중쇄 가변 영역 (서열 번호135)
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCATSGYTFDNYIHWVRQAPGKGLEWIGYINPSSAY
AHYNEKFKTRFTISVDKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRYYSAMPFAYWGQG
TLVTVSS

도면3a

(a) 항체 645의 CDR 서열

CDRH1: GIDLSNYAIN (서열 번호103)
 CDRH2: IIWASGTTYATWAKG (서열 번호104)
 CDRH3: TVPGYSTAPYFDL (서열 번호105)
 CDRL1: QSSPSVWSNFLS (서열 번호106)
 CDRL2: EASKLTS (서열 번호107)
 CDRL3: GGGYSSISDTT (서열 번호108)

(b) 항체 645의 경쇄 가변 영역 (서열 번호109) (비돌연변이된*)

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITTCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTS~~GV~~PSR
 FSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCGGGYSSISD~~TT~~FGQGTKVEIKRT

(c) 항체 645의 중쇄 가변 영역 (서열 번호110) (비돌연변이된*)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA~~V~~SGIDLSNYAINWVRQAPGKLEWIGI~~I~~WASGTTYATW
 AKGRFTISRDN~~S~~KNTVY~~L~~QMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQ~~G~~TLVTVSS

(d) 항체 645의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 DNA (서열 번호111) (비돌연변이된*)

gatatccagatgaccagagtc~~ca~~agcagtg~~tt~~ccgccagcgtagcgcgactgtgactattacctgtcagtcctctccgagcgttgg
 tccaacttctgagctggtaccagcagaaaccgggtaagccccgaaactgctgactacgagcgtctaaactgacctctggtgtac
 cgtcccgttctctgctctggtctggtacgactctgacctctcctctctgcagccggaagacttgc~~aac~~gtactactg~~cg~~gt
 ggtggtactcttccatctctgacaccacgttcggtggaggcaccaaaagt~~g~~aaatcaaacgtacg

(e) 항체 645의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 DNA (서열 번호112) (비돌연변이된*)

gaggttcagctgctggagctcggaggcgggctgtccagcctggaggagcctgctctctgtg~~cag~~taagcggcatcgacctgt
 ccaactacgcgattaactgggta~~cg~~tcagcagcaccgggtaaggtctggaatggatcggcatcatctgggcctctggtacgaccttctac
 gctactgggccaagggtcttaccatctcccgtgacaactctaaaaacaccgtgtacctgcagatgaa~~ct~~ctctcgtg~~cg~~ggaaga
 cactgcggttactattgcgcgctaccgttccgggtacttactgcaccgtactcgcacctgtggggtcagggfactctggtaccgtct
 cgagt

(f) 항체 645의 경쇄 가변 영역 (서열 번호113) (돌연변이된 *f*)

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITTCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTS~~G~~
 VPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCGGGYSSISD~~TT~~FGCGTKVEIKRT

(g) 항체 645의 중쇄 가변 영역 (서열 번호114) (돌연변이된 *f*)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA~~V~~SGIDLSNYAINWVRQAPGK~~C~~LEWIGI~~I~~WASGTT~~F~~
 YATWAKGRFTISRDN~~S~~KNTVY~~L~~QMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQ
 GTLVTVSS

(h) 항체 645의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 DNA (서열 번호115) (돌연변이된 *f*)

도면3b

gacatccagatgacgcagtcaccatcgfccgtgtcagcatccgtgggagacagagtgaccattactgtcagtcctcgcacctcagctctg
 gtcgaatfttctgtcgtgggtatcaacaaaagccagggaagccccaaagctgctgatctacgaggccagcaactcacttcgggagtc
 cctagcagattctccggctcgggatcgggcaccgatttccctcaccattagctcactccaaccagaggattttgccactactactgc
 ggcggtggctacagctcaatctcagataaccatttcggatgcggtactaaggctcagattaagcgcact

(i) 항체 645의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 DNA (서열 번호 116) (돌연변이된 *f*)

gaaatgcagctcttgaatcgggtgggactggtgcagccgggaggtccctgaggctgagctgtgctgttccggcatcgacctt
 caaactacgccatcaattgggtgaggcaggcgccaggaaaatgtctcgaatggatcggatcatctgggctagcggactacctctat
 gcgagctgggccaaggacgggtcactatctcgcgcgataacagcaagaacaccgtgtacctccagatgaacagcctccgggctga
 ggacactgcagcttattactgcgcgagaacgggtgccgggtactcactgaccgtacttcgacttggggacagggaactctgtg
 accgtcagctcg

(j) 항체 645의 scFv (VH-VL) (서열 번호 117) (비돌연변이된*)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDL SNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
 FYATWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWG
 QGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASV GDRVTITCQSSPS
 VWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKL TSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT
 YYCGGGYSSISDITTFGCGTKVEIKRT

(k) 항체 645의 scFv (VH-VL)을 코딩하는 DNA (서열 번호 118) (비돌연변이된*)

gaggttcagctgctggagctggaggcggcctgtccagcctggaggagcctgcgtctctctgtcagtaagcggcatcgacctgt
 ccaactacgcgattaactgggtacgtcaggcaccgggtaaaggctcgaatggatcggcatcatctggcctctggtacaccttctac
 gctacttggccaaggtcgtttcaccatctcccgtgacaactcfaaaacaccgtgtacctgcagatgaactctctcgtcgcggaaga
 cactgcggttactattgcgcgctaccgttccggctattctactgcaccgtacttcgacctgtggggtcagggtactctggttaccgtct
 cgagtggaagggtggcgttctggcgggtggcgggtccgggtggcgggtggatcgggaggtggcgggttctgatatccagatgaccagagt
 ccaagcagtgfttccagcgtaggcgtatcgtgtactattacctgtcagtcctctccgagcgtttgtccaactcctgagctgtgacc
 agcagaaaaccgggtaagccccgaaactgctgatctacgaggcgtctaaactgacctctggtgtaccgtcccgttctctggctctggc
 tctgttacggacttactctgacctctctctctcagccggaagacttgcacagctactactcgggtggtgttactcttccatctctga
 caccacgtcgggtggaggcaccaaaagttgaaatcaaacgtacg

(l) 항체 645의 dsscFv (VH-VL) (서열 번호 119) (돌연변이된 *f*)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDL SNYAINWVRQAPGKCLEWIGI IWASGTTFYATW
 AKGRFTISRDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLVTVSSGGG
 GSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASV GDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAP
 KLLIYEASKL TSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDITTFGCGTKV
 EIKRT

* 즉, 디설피드 결합을 위해 조작된 시스테인 부재

f 즉, 디설피드 결합을 위해 조작된 시스테인 존재

도면3c

(m) 항체 645의 dsscFv (VH-VL)을 코딩하는 DNA (서열 번호120) (돌연변이된 /)

```

gaagtgcagctcttggaatcgggtggaggactggtgcagccgggaggttccctgaggctgag
ctgtgctgtgtccggcatcgacctttcaaactacgcatcaattgggtgaggcaggcgccag
gaaaatgtctcgaatggatcgggtatcatctgggctagcggaaactaccttctatgcgacgtgg
gccaagggacgggttcaactatctcgcgcgataaacagcaagaacaccgtgtacctccagatgaa
cagcctccgggctgaggacactgcagtctattactgcgcgagaacgggtgccgggctactcca
ctgcaccgtacttgcacttgtggggacagggaaactcttgtgaccgtcagctcgggaggagga
ggttcgggcgagggtgggtcgggaggaggtggaagcggaggaggcggatcggacatccagat
gacgcagtcaccatcgtccgtgtcagcatccgtgggagacagagtgaccattacttgtcagt
cctcgccctcagtcctggtcgaatcttctgtcgtgggtatcaacaaaagccagggaaagcccca
aagctgctgatctacgaggccagcaaaactcacttcgggagtccttagcagattctccggctc
gggatcgggcaccgatttcaccctcaccattagctcactccaaccagaggattttgccacct
actactgcggcgggtggctacagctcaatctcagataccactttcggatgcggtactaaggtc
gagattaagcgact
    
```

* 즉, 디설피드 결합을 위해 조작된 시스테인 부재

/ 즉, 디설피드 결합을 위해 조작된 시스테인 존재

도면4c

ctgcaacgtcaatcacaaaccgtcaaataccaaagtcgacaagaaggtcgagcctaagtcgt
 gcagcggaggaggtggatccggcggtggaggtagcgaagtgcagttgggtggagtcgggggga
 gggttggtgaagccaggaggtatcattgcggttgctatgtgcggttcgggctacactttcac
 tgacaattacattcactgggtgcgacaagcaccaggaagtgcctcgaatggattggctaca
 tcaaccggtcaagcgcatacgcccattacaacgaaaagtcaagaccggttcaccatctcc
 gtggataaaggcgaaaaaacagcgcgtaccttcagatgaactccctgcgggcccaggataccgc
 cgtttactactgcactagacggtactacagcgcgatgcccgttcgctactggggacaaggca
 ctctgggtcaccgtgtcgtcgggaggaggaggtcgggtggaggcggatcgggtggcggaggg
 agcggcggaggcgggttcggataccagatgacccagtcgcccgtccagcctctccgcctccgt
 gggagacagagtgcagatcacttgcagagcatcagaggacatctactctggccttgcttgg
 atcagcagaagccgggaaaggtgccaaaactgctcatctatgactcctcgaccctccacacg
 ggagtgccatcgcgcttcagcgggaccggatctgggaccgactacaccctgaccatttcac
 gctccagccggaggatggtgccaacttacttctgccaacagaattacgacttcccacttact
 ttggatgtggcactaagctcgaatcaagcgcacc

(g) 496.g3 HC-2109dsVHVL을 코딩하는 DNA (서열 번호143) (돌연변이된 scFvs *f*)

SGGGGSSGGGGS

gaggtcagctcgtcgaagcggcggaggactcgtgcagcctggaggctcattgcggtgtcatgtgccgagcggctcacctttccgacta
 taataggcctgggtgcgccaagctcctggaaagggtggaatgggtgccaccatcacttacgaggccggaacactactaccgcatcc
 gtaaggggcggttactatttcgaggacaacccaagaactcgtgtacctcaaatgaactccctccgcggaagataccgctgtatta
 ctgacctaccaccgcaatactacgaggagcatctacagactcgttgcacctggggccagggaacttggtagcctcagctcagcct
 ccactaaggccccagcgtgtccctcttctcctcctccaagtccacttctggcggcactgcagccttgggtgctcgtgaaggattactcc
 cgaaccctgaccgtgtcctggaactccggagccctgacctcgggagtgacaccttcccagcggctcctcagctccggcctgtactactc
 atcgtcgtgaccgtccctcagctcctcgggaaccagacttacatttgaacgtgaaccacaagccatccaaccaagggtggacaagaag
 gtagcctaaagagctgttcgggaggagcggttctgggtggcggaggatcggaggtgcagcttggagtcggtagggccttggaaacctg
 gcggaagcctgaggctgtcatgtccgctccggatacaccttcaactacatccactgggtgcgccaagctccgggaaagtccctgga
 atggattggctacattaaccctcctccgctcactcaacgaaaagtcaagaccgggtcaccatctcctgcgacaaggccaagaata
 gcctatctgcaaatgaacagcctccgcggaagataaccggtgtactactgcactcggagatactacagccatgccgttcgctactgg
 ggacagggcaccttgctaccgtgtcaagcggaggaggaggtcgggtggaggatcggggggaggaggaagcggagggggtgtcag
 atattcagatgactcagctccctcgtcctgagcgtcagtgggcgacaggggtaccattacgttgggctccgaggacatctactcaggac
 tcgctcgtatcaacagaagccgggaaagggtccgaagctcctgatctacgactcgtgcacctgcacactggcgtccatcccgatcttcggga
 acgggctcagggactgactacactcgtaccatttcaagcctgcagcctgaggatgtggcacttctctgccaacaaaactacgacttcccctt
 acctcggctcgggactaagctggagatcaagcggact

(h) 496.g3 HC-2109dsVHVL을 코딩하는 DNA (서열 번호144) (돌연변이된 scFvs *f*)

SGGGGSSGGGGS

gaagtgcagctggtagaatctggcggcggactggtgcagcctggcggatctctgagactgttctgtcccctccgctcaccttctccgactac
 aacatggcctgggtgcagagcctcctgcaaggaggtggaatgggtggccaatcacctacgaggccggaacactactaccgggactct
 gtaaggccggttaccatctctcgggacaacccaagaactcctgtacctgcagatgaacagcctgcgggcccaggacaccgctgtact
 actgtgtagccccctcagctactatgagggtccatctaccggtgtggttgcacctggggccagggcacactcgtgaccgtgtcctctgttc
 caccaggccctccgtgttctctcggccctccagcaagtcacctcctggcgaacagccgctcgggctgctcgtgaaggactacttccc
 cgagcccgtgacagtgcttggaaactctggcgcctcctcctcggcgtgcacaccttccagctgtgctgcagctcctccggcctgtactcctgtcc
 tccgtcgtgactgtcctcagctcctcgggacccagacactacatctgcaactgaaaccaagccccaacaccaagggtggacaagaagg
 tggaaaccaagctcctgcagcggaggcgggtgtcaggcggcggaggatctgagggtcagctgggaaagtgggggaggcctcgtgaacca
 ggcggcagctgagactgagctgcgctcctggttacacttaccgacaactacatcactgggtgcgcccaggcccaaggaaatgcctgg

도면4d

aatggatcggctacatcaaccctccagcgcctacgcccactacaacgagaagtcaagaccgcttccaccatcagcgtggacaaggctaaga
 atagcgcctactcagatgaactccctgagagctgaggataccgctgtattattgacccggcggtactactccgcatgccccttgcctactg
 gggacagggaaccctcgtgacagtgctagcggcggaggcgaagtgggtgggtggatctggggaggcggttctgggtggcgctctgat
 atccagatgaccagctcccagctcctctgtcctctgtggcgacagagtgaccatcacctgtcggcctccgaggacatctacttgcctg
 gcctggtatcagcagaaccggcaagtgcccaagctgctgatctacgactcctcacctgcacaccggcgtccctctagatttccggcac
 cggctctggcaccgactataccctgaccatctccagcctgagcctgaggacgtggccactctttgccagcagaactacgacttccctctgac
 cttcggctcggcaccacagctggaatcaagcggacctgatagctcagggctatca

(i) 496.g3 HC-2109dsVHVL (서열 번호127) (돌연변이된scFvs^f) 링커 I=SGGGGTGGGGS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYINMAWVRQAPGKGLEWVATITIEGRNTYYRD
 SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPPQYYEGSIYRLWFAHWGQGLVTVS
 SASTKGPSVFLAPSSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSG
 LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCSGGGGTGGGGSEVQLVESGG
 GLVKPGGSLRLSCAASGYTFDNYIHVWRQAPGKCLEWIGYINPSSAYAHYNEKFKTRFTIS
 VDKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRYYSAMPFAYWQGLVTVSSGGGSGGGSGGGG
 SGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVITCRASEDIYSGLAWYQQKPKVPKLLIYDSSLTHT
 GVPSRFRSGTGSSTDTLTISLQPEDVATYFCQQNYDFPLTFGGTKLEIKRT

(j) 496.g3 HC-2109dsVHVL을 코딩하는 DNA (서열 번호128) (돌연변이된 scFvs^f) 링커 I=SGGGGTGGGGS

gaagtgcagctggtggaatccggcggaggactggtgcagcccggatcattgagacttctgtgcagcatcaggcttactttctc
 ggactacaatfggcatgggtgcgccaaagcgcctgtaaaaggactggaatgggtcgcgactatcattatgaggggcgaatactta
 ctatagggatagcgtcaaaagcagctttaccatctcacgggacaacgtaagaactccctgacctcaaatgaactcactcaggcga
 gaagatagcggcctgtactactgtcctcgcctccgactactcgaagggtccatctaccgcttgggtcggcattggggacagg
 gaacgctggtgactgtctcctcggctcgaacaaaggccctcgggttccctctggcgcctaactccaagagcacttcaggcggaa
 ggctgccctcggatcctggtcaggactactccaagaccgctgaccgtgcatggaacagcggagctctgactagcggagtga
 caccttccggcgggtgctgcaaaagctcaggcctgtactcgtctcctcagtggtcactgtccctcctcctcctcgggactcaaacgta
 catctgcaacgtcaatcacaaaccgtcaaatcaaaagtcgacaagaaggtcgaagcctaagtcgtgcaatgggtggggcaccg
 gaggtggcgggtcagaagtgcagttggtgagtcggggggagggttggtaagccaggagatcattcgggtgcatgtcggctt
 cgggctacactttcactgacaaffactactgggtgcgacaagcaccagggaagtgcctcgaatggattggctacatcaaccgtca
 agcgcatacggcattacaacgaaaagttcaagaccgggtcaccatctccgtggataagcgaacaaacagcgcgtacttcagatg
 aactccctcggggccgagataaccgggttactactgactagacgggtactacagcggcatgccgttcgctactggggacaaggc
 actctggtcaccgtgtcgtcgggaggaggcctcgggtggaggcggatcgggtggcggaggagcggcggaggcgggttcggat
 atccagatgaccagctcggctcagcctcctccctcgggagacagagtgacgacacttgcagagcatcagaggacatctac
 tctggccttctgtgtatcagcgaagccgggaaaaggtgccaaactgctcatctatgactcctcggaccctccacacgggagtgccatc
 gcgcttcaagcggaccgactcggaccgactacaccctgaccatttcatcgtccagccggagatgftgccactactctgccaac
 agaattacgacttccacttcttggatgtggcactaagctcgaatcaagcgacc

* 즉, 디솔피드 결합을 위해 조작된 시스템 부재
 / 즉, 디솔피드 결합을 위해 조작된 시스템 존재

도면5a

(a) 496.g3 LC-645VHVL (서열 번호 129) (비돌연변이된scFvs*)

AIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCRADESVRTL~~MHWY~~QKPGKAPKLLIYLVSNSEIGVPDRF
 SGGSGTDFRLTIISSLPEDFATYYCQQTWSDPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQ
 LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSSTLTLSKADY
 EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECSSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA
 VSGIDL~~SNYAINWVRQAPGK~~LEWIGI IWASGTTFYATWAKGRFTISRDN~~SKNTVYLQ~~MNSL
 RAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ
 SPSSVSASVGDVRTITCQSSPSVWSN~~FLSWY~~QKPGKAPKLLIYEASKLTS~~GVPSR~~FRFSGSGS
 GTDFTLTIISSLPEDFATYYCGGGYSSISD~~TTFG~~QTKVEIKRT

(b) 496.g3 LC-645VHVL을 코딩하는 DNA (서열 번호 130) (비돌연변이된scFvs*)

cgcatccagctgacgcaatcggctcctcgtgtcagcgcagcgtggcgataggggtcacgatcacctgtcggccgatgaatcggtc
 cgcaactctgattggatcagcaaaagccgggaaaggccccgaagctgctcatctacctggtagcaattccgatcggagatcc
 cggaccgctcagcggctcggcagcggaaaccgactccgcctgactattcctcgtgcaaccgggacttcgctactactactgc
 cagcagacctggcagatccgtggactttcggcagggaaaccaaaagtggaatcaagcggactgtcggccaccttcggtgttcac
 ttccaccgtcagacgaacaactaaagcggaaactgcgtcgggtgtgtcctccttaacaactttaccctagagaagccaaggtccag
 tggaaagtgacaatgccctcaaaagcggaaacgccaggagtcctgaccgagcaggactcaaaagattcgactatagctgtcg
 tccagctcaccctgagcaaaagcagactacgaaagcacaaggtgtacgcttgcgaagtgacccaccaagcctgtcgagccccgt
 gaccaaatcctcaaccgggagaatgcagcgggtggcggaggctccggaggaggagatcagaggttcagctgctggagctgga
 ggccggctgtccagcctggaggagcctgcgtctctgtgacagtaagcggcaccgttccaactacgcgattaactgggtac
 gtcagcaccgggtaaggtcggatggatcggcatcatctggcctctgtgacgacctctacgctactggccaaaggtcgttc
 accatctcccgtgacaactctaaaacaccgtgtactcagatgaactctcgtgagcgaagactgcggttactattgcgcgct
 accgttcgggctattctactgaccgtactcggactgtgggtcagggtactctggtaccgtctcagagtgagggtggcgttctggc
 ggtggcgttccgggtggcgggtggatcgggaggtggcgttctgatatccagatgaccagagtcgaagcaggtttccgccagcgt
 ggagatcgtgactattacctgtcagctcctccgagcgttggccaactcctgagctggfaccagcagaaccgggtaaaagcccc
 gaaactcgtgatcagcggcgtctaaactgacctctggtgtaccgtcccgttctctggctctgctctgtacggactcactctgacc
 atctctctctcagccggaagacttgaacgtactactcgggtggtgtactcttccatctctgacaccacgttcgggtggagccacc
 aaagttgaaatcaaacgtacg

(c) 496.g3 LC-645dsVHVL (서열 번호 131) (돌연변이된scFvs)

AIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCRADESVRTL~~MHWY~~QKPGKAPKLLIYLVSNSEIGVPDRF
 SGGSGTDFRLTIISSLPEDFATYYCQQTWSDPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQ
 LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSSTLTLSKADY
 EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECSSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA
 VSGIDL~~SNYAINWVRQAPGK~~LEWIGI IWASGTTFYATWAKGRFTISRDN~~SKNTVYLQ~~MNSL
 RAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ
 SPSSVSASVGDVRTITCQSSPSVWSN~~FLSWY~~QKPGKAPKLLIYEASKLTS~~GVPSR~~FRFSGSGS
 GTDFTLTIISSLPEDFATYYCGGGYSSISD~~TTFG~~QTKVEIKRT

도면5b

(d) 496.g3 LC-645dsVHVL을 코딩하는 DNA (서열 번호132) (돌연변이된 scFvs *f*)

gcgatccagctgacgcaatcgccgtcctcgctgtcagcgagcgtggcgatagggtcacgat
cacctgtcgggcccgatgaatcgggtccgcactctgatgcatgggatcagcaaaagccgggaa
aggccccgaagctgctcatctacctgggtgagcaattccgagatcggagtcgccggaccgcttc
agcgggttcgggcagcgggaaccgacttccgcctgactatctcctcgtgcaaccgaggactt
cgctacttactactgccagcagactgggtcagatccgtggacttccgggcagggaaaccaaag
tggaaatcaagcggactgtcggcgcaccttcgggtgttcatcttccaccgtcagacgaacaa
cttaaaagcggaaactgctcgggtgtgtcctccttaacaacttttaccctagagaagccaa
gggtccagtggaaggtggacaatgcccttcaaaagcggaaacagccaggagtcctgtaccgagc
aggactcaaaagattcgcacttatagcttgtcgtccacgctcacctcagcaaaagcagactac
gaaaagcacaaggtgtacgcttgcaagtgaccaccaaggcttgcgagccccgtgaccaa
atccttcaaccggggagaatgcagcgggtggcggaggctccggaggaggagatcagaagtgc
agctcttggaaatcggtgagactgggtcagccgggaggttccctgaggctgagctgtgct
gtgtccggcatcgacttcaaaactacgccatcaattgggtgaggcaggcggcaggaaaatg
tctcgaatggatcgggtatcatctgggctagcggaaactacctctatgcgacgtgggccaagg
gacgggttactatctcgcgcgataacagcaagaacaccgtgtacctccagatgaacagcctc
cgggctgaggacactgcagcttattactgcgcgagaacgggtccgggctactcactgcacc
gtacttcgacttgtggggacagggaactcttgtgaccgtcagctcgggaggaggaggttcgg
gcggagggtgggtcgggaggaggtggaagcggaggaggcggatcggacatccagatgacgcag
tcaccatcgtccgtgtcagcatccgtgggagacagagtgaccattacttgtcagtcctcggc
ctcagctcgttgcgaatcttctgtcgtggtatcaacaaaagccagggaaagcccaaaagctgc
tgatctacgaggccagcaaaactcacttcgggagtccttagcagattctccggctcgggatcg
ggcaccgatctcaccctcacattagctcactccaaccagaggattttgccacctactactg
cggcgggtggctacagctcaatctcagataccactttcggatgcgggtactaaggctcagatta
agcgcact

(e) 496.g3 LC-645dsVHVL을 코딩하는 DNA (서열 번호145) (돌연변이된 scFvs *f*)

gcaatccaactgaccagagcccctcctcctcctccgcctcgtgggagacagagtacatcacttgcgggcccgatgagtcgtgagaactc
catgcaactggtatcagcaaaagccagggaagctccgaagctgctgatctactgggtcaaatccgagattggcgtgcctgaccggtcagcg
ggagcggatcaggcaccgactcagactcacgatctcatccctgcaaccggaagatttggccactactactccaacagacctgggtccgacccc
tggacatcggtcagggcaccaaggtcgaatcaagaggactgtggcgcctcctccgtttatcttccctcgtccgacgaacagctgaaatcc
ggaaccgacgctcgtgctcgtgtaacaattctaccgcgcaagccaaggtccagtggaaggcgaacacccctccagtcgggaaact
cccaggagtcggtagccaacaggattcgaaggactcgactactcctgtcctcgttgcacttgacctgtccaaggccgattacgagaagcataag
gtctacgcctgcaagtgaccatcaggggctgtatccccgtgaccaagagcttcaaccggggagtgctcgggaggaggaggtcaggga
ggaggggggtccgaagtgacgtgctggaatccggaggaggtcgggtcagccagggggttctcgtcggcttctcgtcgtcagcgggatcg
acctccaactacgcatcaatgggtgcgacaagctcgggaaagtgcctggagtgattggaatcatttggccagcggcactactcttac
gcgacttggcgaaagggtcctcaccatctcccgggacaattcgaagaacaccgtgtacttcagatgaacagcctgagagccgaggatacg
gccgtgtactactgtcagaggactgtcctggctactcagcccccctacttcatcttggggacagggcacactggcaccgtgtcatccgggt
ggaggaggatcggggggaggaggttccggaggcgggtgtagcggaggcggaggtccgacatcaaatgaccagtcctcgtcagcgtgtc
cgctcagtcggggacagagtaccatcacatccagctcctcggctcgttgggtcctcgttctcgtgtatcagcagaacccggaagg
ccccaaagctcatctacgaagctcaagctgaccagcgggtgcttcgaggttctcgtcgggatcaggcaccgacttaccctcacg
atctcagcctgcaaccggaggatttcgaacttactactcggcgggttacagctccattagcagaccaccttcggctcgggaccaaggt
cgagatcaagcgcact

도면5c

(f) 496.g3 LC-645dsVHVL을 코딩하는 DNA (서열 번호146) (돌연변이된 scFvs *f*)

```
gcatccagctgaccagagccctccagcctgtctcctctgtggcgacagagtaccatcacctgtcgggccgatgagtcctgacggaccct
gatgactgtgatcagcagaagccggcaaggccccaagctgtgatctacctggtgtccaactccgagatcggcgtgccgacagattctcc
ggctctggctctggcaccgactccggctgacctcttagcctgagcccaggacttcgccactactactgacagcagacttgaggcacc
ctggacctttggccagggcaccaggtggaaatcaagcggaccgtggcctccctcgtgttcatcttcccacctccgacgagcagctgaagt
ccggcaccgcttctgtctgtcctgctgaacaacttctacccccgagggccaaggtgagtggaaggtggacaacgccctcagtcggcaa
ctccaggaatccgtgaccgagcaggactccaaggacagcacctactccctgtctccaccctgacctgtccaagccgactacgagaagcac
aaggtgtacgcctcgaagtaccaccagggcctgtctagccccgtaccaagtctttcaaccggggcagtggttctggcggcggaggatctg
ggggagggcggatctgaagtgcagctgtggaatctggcggaggcctgtgacgcctggcggatctctgagactgtcctgtgccgtgccgatc
gacctgtccaactacgcatcaactgggtgcgacagggccctggcaagtgcctggaatggatcggcatcatctggcctccggcaccaccttca
cgccacctgggctaaggccggttaccatctcccgggacaactccaagaacaccgtgtacctgcagatgaactccctgcggcggcggagacac
gctgtactactgtctagaacctgcccggctactccaccgcccttacttctgtggggccagggaaacctcgtgacctgtctagcggga
ggcggaggtagtggcgggtggaagtggcggaggggtagtggtggcggggatctgatattcagatgaccagtcctccctcctcgtgtccg
cttccgtgggagatgcgtgacaatcacatgccagtcctccccctctgtgtggtccaacttctgtcttggatcagcagaacctgggaagctc
ctaaactctgatctatgagcctcaagtgacctcggcgtgcctctagattctctggcagcggcagcggaaaccgacttaccctgacctca
gtccctgcagcctaagatttctactattactgcggtggcggctacagctccatctccgataccaccttcggctcgggaacaaaagtggaaa
tcaaacgcacctgatagaagcttg
```

* 즉, 디설피드 결합을 위해 조작된 시스테인 부재
f 즉, 디설피드 결합을 위해 조작된 시스테인 존재

도면6

중쇄

```
1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 abc 55 60 65 70 75 80 abc 85 90 95 100 105 110
(서열 번호 133)
CA2109 EVQLHQSAAALVKPGASVKLSCKTSGYTFDNYIHWRQAPGKGLEWIGYINP SSAYAHYNEKFKTQATLTVDKSTNTAYMELSRLTSEDSATYFCTFRVYSAMPFAYWGQSTLIVTVSS
(서열 번호 134)
1-3 3-21 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCKTSGYTFSSYSMNWRQAPGKGLEWVSSISS STSYIYVADSVKGRFTISRDNARNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTFRVYSAMPFAYWGQSTLIVTVSS
(서열 번호 135)
CA2109gH1 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCKTSGYTFDNYIHWRQAPGKGLEWIGYINP SSAYAHYNEKFKTQFTISVDRKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTFRVYSAMPFAYWGQSTLIVTVSS
(서열 번호 92)
CA2109gH2 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCKTSGYTFDNYIHWRQAPGKGLEWIGYINP SSAYAHYNEKFKTQFTISVDRKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTFRVYSAMPFAYWGQSTLIVTVSS
```

약어 설명

CA2109 = 래트 가변 중쇄 서열
 1-3 3-21 = JH4를 갖는 인간 생식계열 수여자 프레임워크 VH3 서열 1-3 3-21
 CA2109gH1 & CA2109gH2 = 수여자 프레임워크로서 1-3 3-21 인간 생식계열을 사용한 CA2109 가변 중쇄의 인간화 이식

CDR은 진하게/밑줄로 표시된다.
 CA2019gH2에서 공여자 잔기는 진하게/이탤릭체로 표시되고, 강조 표시된다 : I48, G49, V71, K73, A78, T93

도면7

경쇄

1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105

(서열 번호 140)
CA2109 DIVMTQSPASLSASLG~~ETVTIE~~CRASEDIYNGLAWYQQKPKGKSPHLLIYNSNTLHTGVPSRFSGTGSGTQYSLKINSLQSE~~DVATYFCQQNYDFP~~ LTFGSGTKLEIK

(서열 번호 141)
2-1 (U)-A20 DIQMTQSPSSLSASVGD~~RVTITC~~RASQGISNVLAWYQQKPKGKPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDVATYYCKYNSAP YTFGGQTKLEIK

(서열 번호 142)
CA2109gL1 DIQMTQSPSSLSASVGD~~RVTITC~~RASEDIYNGLAWYQQKPKGKPKLLIYNSNTLHTGVPSRFSGTGSGTDYTLTISLQPEDVATYFCQQNYDFP LTFGGQTKLEIK

(서열 번호 147)
CA2109gL18 DIQMTQSPSSLSASVGD~~RVTITC~~RASEDIYSGLAWYQQKPKGKPKLLIYDSSTLHTGVPSRFSGTGSGTDYTLTISLQPEDVATYFCQQNYDFP LTFGGQTKLEIK

약어 설명

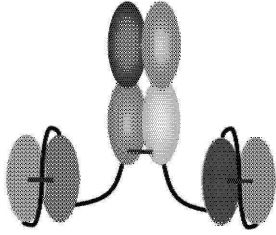
CA2109 = 래트 가변 경쇄 서열
2-1 (U)-A20 = JK2 를 갖는 인간 생식계열 수여자 프레임워크 VK1 2-1(U) A20
CA2109gL1 & CA2109gL18 = 수여자 프레임워크로서 VK1 2-1(U) A20을 사용한 CA2109 가변 경쇄의 인간화 이식

CDR은 진하게/밑줄로 표시된다.
공여자 잔기는 진하게/이탤릭체로 표시되고, 강조 표시된다: : T65, Y71, F87

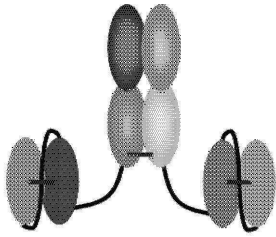
잠재적 아스파라긴 탈아미드화 부위를 제거하기 위한 CDRL1 및 CDRL2 내의 돌연변이는 진하게/이탤릭체로 표시되고, 강조 표시된다: S31, D50, S52

도면8

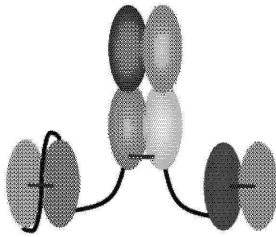
Fab-2x dsscFv 포맷 및 Fab-dsscFv-dsFv 포맷



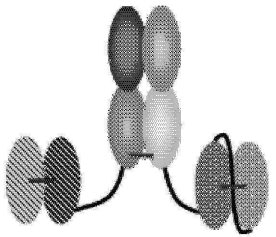
Fab#2-(HC)-dsscFv#3-(LC)-dsscFv#4



Fab#2-(LC)-dsscFv#3-(HC)-dsscFv#4

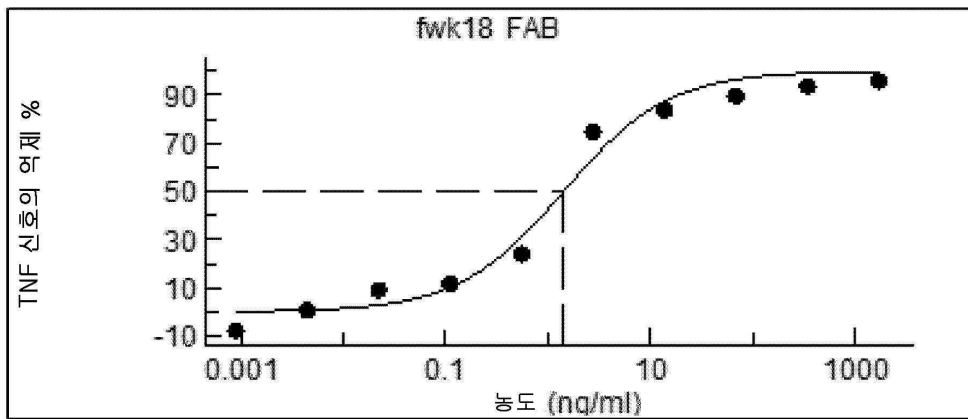


Fab-(HC)dsscFv-(LC)dsFv

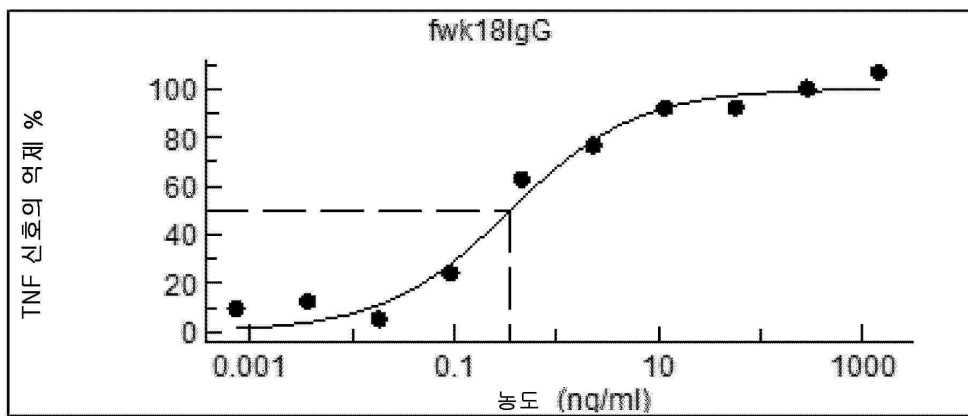


Fab-(HC)dsFv-(LC)dsscFv

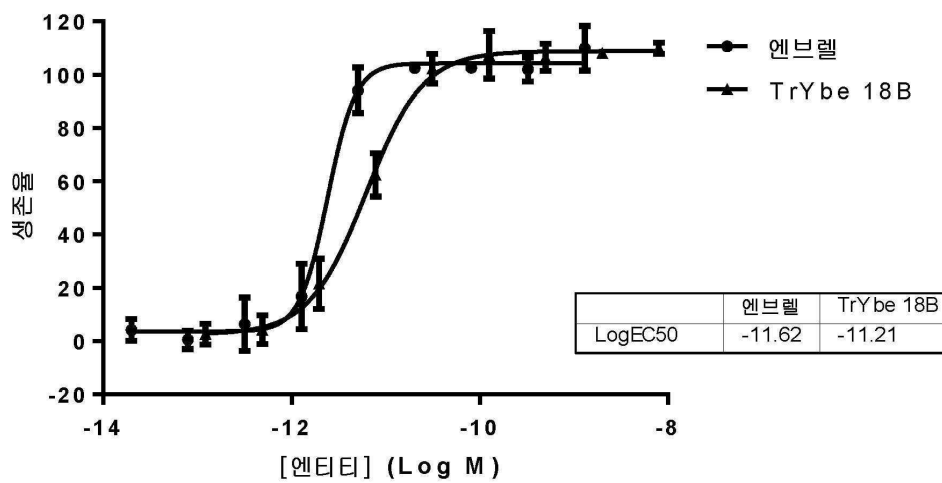
도면9a



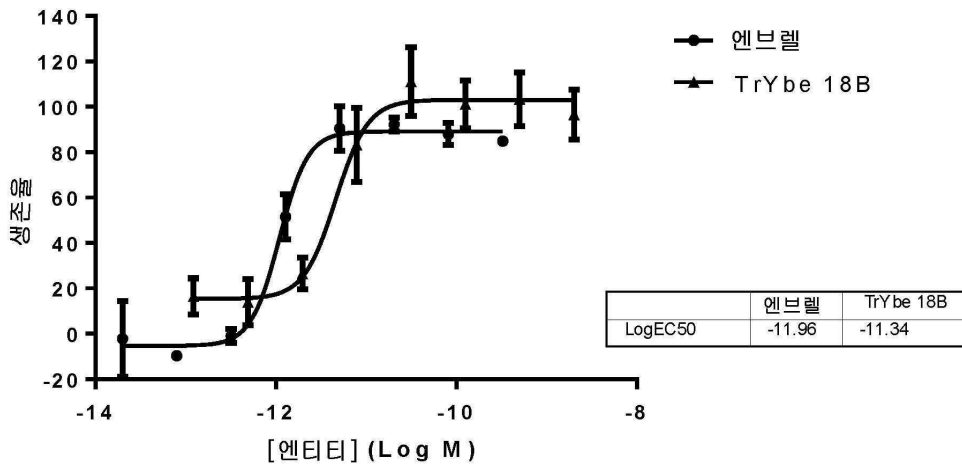
도면9b



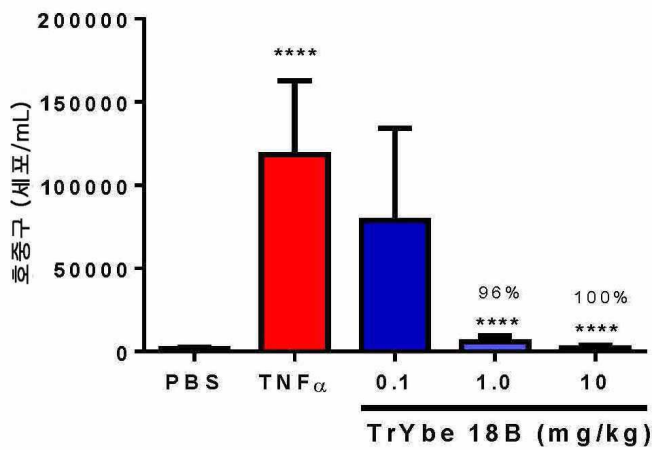
도면10a



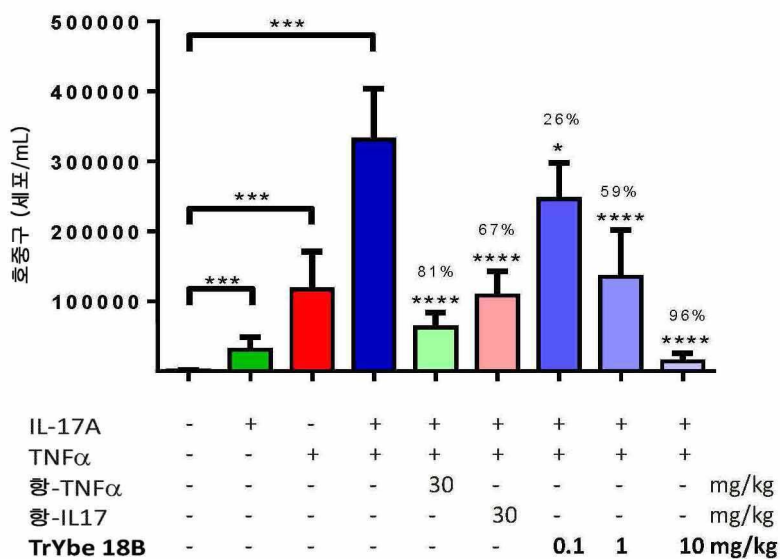
도면10b



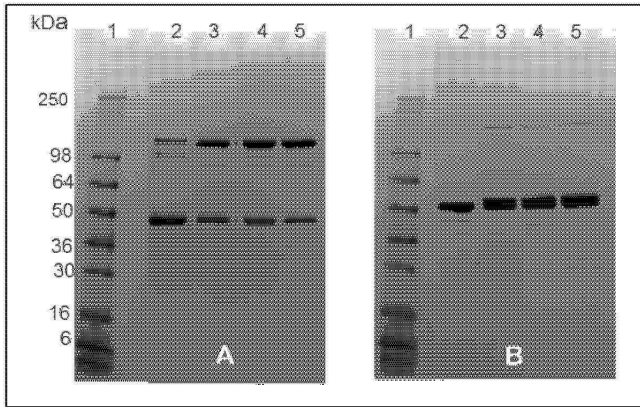
도면11



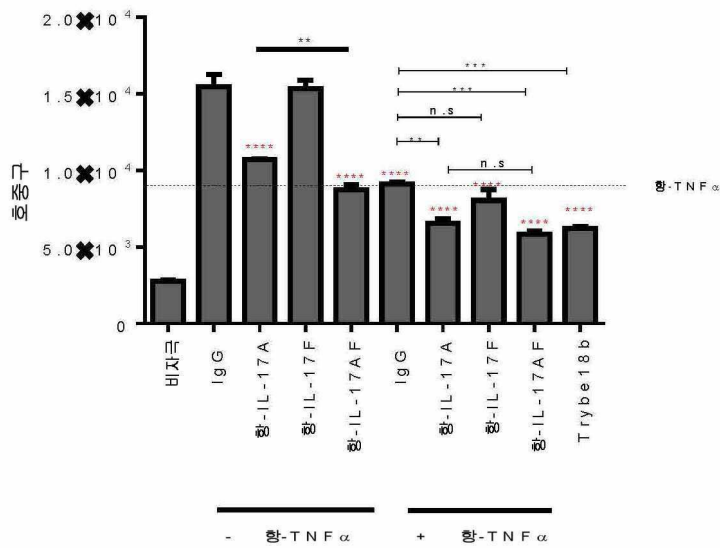
도면12



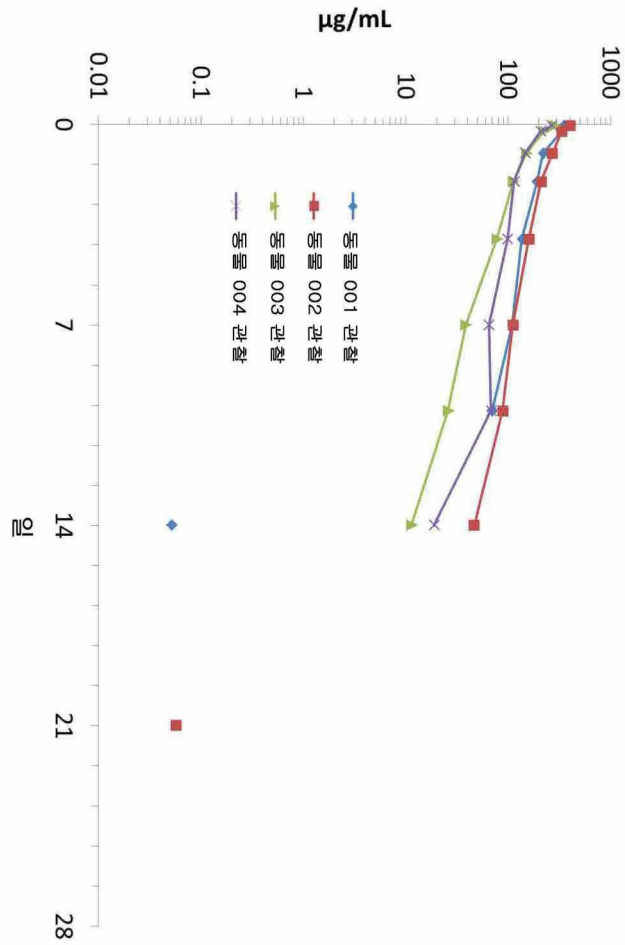
도면13



도면14



도면15



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> UCB Biopharma SPRL
- <120> Multi-specific antibody molecules having specificity for
TNF-alpha, IL-17A and IL-17F
- <130> PF0054-W0
- <150> GB1522391.0
- <151> 2015-12-18
- <160> 147
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 11
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide Linker

<400> 1

Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide Linker

<400> 2

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge linker

<400> 3

Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala

1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge linker

<400> 4

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge linker

<400> 5

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys

1 5 10 15

Pro Ala

<210> 6

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge linker

<400> 6

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys

1 5 10 15

Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

20

25

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge linker

<400> 7

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

1 5 10 15

Tyr Asn Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr

20

25

30

<210> 8

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge linker

<400> 8

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

1 5 10 15
 Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys Tyr
 20 25 30

<210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Hinge linker

<400> 9
 Asp Lys Thr His Thr Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

<210> 10
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Hinge linker

<400> 10
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 1 5 10 15

Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala
 20 25

<210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Hinge linker

<400> 11
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Ser Cys Pro Ala
 1 5 10

<210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 12

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu

1 5

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 13

Asp Lys Thr His Thr Ser

1 5

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 14

Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 16

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 17

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 17

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser

20

<210> 18

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 18

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20

25

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 19

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Gly Ala Ser Ala Ser

1 5 10

<210> 20

<211> 16

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Flexible linker
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa can be naturally occurring amino acid
 <400> 20

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser
 1 5 10 15

<210> 21
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Flexible linker
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)

<223> Xaa can be naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa can be naturally occurring amino acid
 <400> 21

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Ser Ala Ser
 20
 <210> 22
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Flexible linker
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)

<223> Xaa can be naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Xaa can be naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> Xaa can be naturally occurring amino acid

<400> 22

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser

 20 25

<210> 23

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa can be naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Xaa can be naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> Xaa can be naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> Xaa can be naturally occurring amino acid

<400> 23

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser

 20 25 30

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa can be naturally occurring amino acid

<400> 24

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Ser Gly Ala Ser Ala Ser

1 5 10

<210> 25

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Flexible linker

<400> 25

Pro Gly Gly Asn Arg Gly Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr

1 5 10 15

Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Ser His Tyr

 20 25

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 26

Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr

1 5 10

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 27

Ala Thr Thr Thr Gly Ser

1 5

<210> 28

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 28

Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Ser Pro Pro Ser Lys Glu

1 5 10 15

Ser His Lys Ser Pro

20

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 29

Gly Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

1 5 10 15

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 30

Gly Gly Gly Gly Ile Ala Pro Ser Met Val Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker
 <400> 31
 Gly Gly Gly Gly Lys Val Glu Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 32

Gly Gly Gly Gly Ser Met Lys Ser His Asp Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 33

Gly Gly Gly Gly Asn Leu Ile Thr Ile Val Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 34

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

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 35

Gly Gly Glu Lys Ser Ile Pro Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 36

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 36

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

1 5 10 15

Arg Pro

<210> 37

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 37

Tyr Pro Arg Ser Ile Tyr Ile Arg Arg Arg His Pro Ser Pro Ser Leu

1 5 10 15

Thr Thr

<210> 38

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 38

Thr Pro Ser His Leu Ser His Ile Leu Pro Ser Phe Gly Leu Pro Thr

1 5 10 15

Phe Asn

<210> 39

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 39

Arg Pro Val Ser Pro Phe Thr Phe Pro Arg Leu Ser Asn Ser Trp Leu

1 5 10 15

Pro Ala

<210> 40

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 40

Ser Pro Ala Ala His Phe Pro Arg Ser Ile Pro Arg Pro Gly Pro Ile

1 5 10 15

Arg Thr

<210> 41

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 41

Ala Pro Gly Pro Ser Ala Pro Ser His Arg Ser Leu Pro Ser Arg Ala

1 5 10 15

Phe Gly

<210> 42

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 42

Pro Arg Asn Ser Ile His Phe Leu His Pro Leu Leu Val Ala Pro Leu

1 5 10 15

Gly Ala

<210> 43

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 43

Met Pro Ser Leu Ser Gly Val Leu Gln Val Arg Tyr Leu Ser Pro Pro

1 5 10 15

Asp Leu

<210> 44

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 44

Ser Pro Gln Tyr Pro Ser Pro Leu Thr Leu Thr Leu Pro Pro His Pro

1 5 10 15

Ser Leu

<210> 45

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 45

Asn Pro Ser Leu Asn Pro Pro Ser Tyr Leu His Arg Ala Pro Ser Arg

1 5 10 15

Ile Ser

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 46

Leu Pro Trp Arg Thr Ser Leu Leu Pro Ser Leu Pro Leu Arg Arg Arg

1 5 10 15

Pro

<210> 47

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 47

Pro Pro Leu Phe Ala Lys Gly Pro Val Gly Leu Leu Ser Arg Ser Phe

1 5 10 15

Pro Pro

<210> 48

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 48

Val Pro Pro Ala Pro Val Val Ser Leu Arg Ser Ala His Ala Arg Pro

1 5 10 15

Pro Tyr

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 49

Leu Arg Pro Thr Pro Pro Arg Val Arg Ser Tyr Thr Cys Cys Pro Thr

1 5 10 15

Pro

<210> 50

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 50

Pro Asn Val Ala His Val Leu Pro Leu Leu Thr Val Pro Trp Asp Asn

1 5 10 15

Leu Arg

<210> 51

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 51

Cys Asn Pro Leu Leu Pro Leu Cys Ala Arg Ser Pro Ala Val Arg Thr

1 5 10 15

Phe Pro

<210> 52

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> rigid linker

<400> 52

Gly Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala

1 5 10

<210> 53

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> rigid linker

<400> 53

Pro Pro Pro Pro

1

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 54

Asp Leu Cys Leu Arg Asp Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 55

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 56

Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Gly Asp

1 5 10 15

<210> 57

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 57

Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10 15

Glu Asp Asp Glu

20

<210> 58

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 58

Gln Gly Leu Ile Gly Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10 15

Gly Arg Ser Val

20

<210> 59

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 59

Gln Gly Leu Ile Gly Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10 15

Gly Arg Ser Val Lys

20

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 60

Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp

1 5 10 15

<210> 61

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 61

Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu

1 5 10 15

Asp Asp

<210> 62

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 62

Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp

1 5 10 15

<210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 63

Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp

1 5 10 15

<210

> 64

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 64

Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Ala Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu

1 5 10 15

Asp Asp

<210> 65

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 65

Glu Val Arg Ser Phe Cys Thr Arg Trp Pro Ala Glu Lys Ser Cys Lys

1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly

20

<210> 66

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 66

Arg Ala Pro Glu Ser Phe Val Cys Tyr Trp Glu Thr Ile Cys Phe Glu

1 5 10 15

Arg Ser Glu Gln

20

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 67

Glu Met Cys Tyr Phe Pro Gly Ile Cys Trp Met

1 5 10

<210> 68

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 68

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 69

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> flexible linker

<400> 69

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 70

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> flexible linker

<400> 70

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 71

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequences of antibody 496g3 - CDRH1

<400> 71

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Asn Met Ala

1 5 10

<210> 72

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequences of antibody 496g3 - CDRH2

<400> 72

Thr Ile Thr Tyr Glu Gly Arg Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 73

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequences of antibody 496g3 - CDRH3

<400> 73

Pro Pro Gln Tyr Tyr Glu Gly Ser Ile Tyr Arg Leu Trp Phe Ala His

1 5 10 15

<210> 74

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequences of antibody 496g3 - CDRL1

<400> 74

Arg Ala Asp Glu Ser Val Arg Thr Leu Met His

1 5 10

<210> 75

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequences of antibody 496g3 - CDRL2

<400> 75

Leu Val Ser Asn Ser Glu Ile

1 5

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequences of antibody 496g3 - CDRL3

<400> 76

Gln Gln Thr Trp Ser Asp Pro Trp Thr

1 5

<210> 77

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain variable region of antibody 496g3

<400> 77

Ala Ile Gln Leu 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 Asp Glu Ser Val Arg Thr Leu

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Leu Val Ser Asn Ser Glu Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Arg Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp Ser Asp Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 78

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain variable region of antibody 496g3

<400> 78

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 Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

100 105 110

Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 79

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding Light Chain variable region of antibody 496g3

<400> 79

gcgatccagc tgacgcaatc gccgtcctcg ctgtcagcga gcgtgggcca tagggtcacg 60

atcacctgtc gggccgatga atcgggccgc actctgatgc attggtatca gcaaaagccg 120

ggaaaggccc cgaagctgct catctacctg gtgagcaatt ccgagatcgg agtcccggac 180
 cgcttcagcg gttcgggcag cggaaccgac ttccgcctga ctatttcctc gctgcaacce 240

 gaggacttcg ctacttacta ctgccagcag acctggtcag atccgtggac tttcgggcag 300
 ggaaccaaag tggaaatcaa gcggact 327
 <210> 80
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA encoding Heavy Chain variable region of antibody 496g3
 <400> 80
 gaagtgcagc tggtggaatc cggcggagga ctggtgcagc ccggtggatc attgagactt 60
 tcgtgtgcag catcaggctt tactttctcg gactacaata tggcatgggt gcgccaagcg 120
 cctggtaaag gactggaatg ggtcgcgact atcacttatg aggggcggaa tacttactat 180

 agggatagcg tcaaaggacg ctttaccatc tcacgggaca acgctaagaa ctccctgtac 240
 ctccaaatga actcactcag ggcagaagat acggccgtgt actactgtgc ctgcctccg 300
 cagtactacg aagggtccat ctaccgcctt tggttcgccc attggggaca gggaacgctg 360
 gtgactgtgt cctcg 375
 <210> 81
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Light chain (VL-CL) of antibody 496g3
 <400> 81
 Ala Ile Gln Leu 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 Asp Glu Ser Val Arg Thr Leu
 20 25 30
 Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Leu Val Ser Asn Ser Glu Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Arg Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

Ala Thr Ile Thr Tyr Glu Gly Arg Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys 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 Ser Pro Pro Gln Tyr Tyr Glu Gly Ser Ile Tyr Arg Leu Trp Phe
 100 105 110
 Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 130 135 140
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 210 215 220
 Pro Lys Ser Cys

225

<210> 83

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding light chain of antibody 496g3 (no signal sequence)

<400> 83

gcgatccagc tgacgcaatc gccgtcctcg ctgtcagcga gcgtgggcca tagggtcacg 60

atcacctgtc gggccgatga atcgggccgc actctgatgc attggtatca gcaaaagccg 120

ggaaggccc cgaagctgct catctacctg gtgagcaatt cggagatcgg agtcccggac 180
 cgcttcagcg gttcgggcag cggaaccgac ttccgcctga ctatttcctc gctgcaacce 240
 gaggacttcg ctacttacta ctgccagcag acctggtcag atccgtggac tttcgggcag 300

ggaaccaaag tggaaatcaa gcggactgtc gccgcacctt cgggtttcat ctttcaccg 360
 tcagacgaac aacttaaaag cggaactgcg tcggtggtgt gcctccttaa caacttttac 420
 cctagagaag ccaaggtcca gtggaagggtg gacaatgccc ttcaaagcgg aaacagccag 480
 gagtccgtga ccgagcagga ctcaaaagat tcgacttata gcttgtcgtc cacgctcacc 540
 ctgagcaaag cagactacga aaagcacaag gtgtacgctt gcgaagtgac ccaccaaggc 600
 ttgtcgagcc ccgtgaccaa atccttcaac cggggagaat gc 642

<210> 84

<211> 684

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding heavy chain of antibody 496g3 (no signal sequence)

<400> 84

gaagtgcagc tgggtggaatc cggcggagga ctggtgcagc ccggtggatc attgagactt 60
 tcgtgtgcag catcaggctt tactttctcg gactacaata tggcatgggt gcgccaagcg 120
 cctggtaaag gactggaatg ggtcgcgact atcacttatg aggggcggaa tacttactat 180
 agggatagcg tcaaaggacg ctttaccatc tcacgggaca acgctaagaa ctccctgtac 240
 ctccaaatga atcactcag ggcagaagat acggccgtgt actactgtgc ctgcctccg 300
 cagtactacg aagggtccat ctaccgctt tggttcgccc attggggaca gggaacgctg 360

gtgactgtgt cctcggett c gaccaagggg ccctcggtgt tccctctggc gectagctec 420
 aagagcactt caggcggaac ggctgcctc ggatgcctgg tcaaggacta cttcccagag 480
 ccctgaccg tgtcatggaa cagcggagct ctgactagcg gagtgcacac ctttcggcg 540
 gtgctgcaa gctcaggcct gtactcgtc tcctcagtgg tcaactgtcc gtcctccteg 600
 ctggggactc aaacgtacat ctgcaacgtc aatcacaac cgtcaaatac caaagtcgac 660
 aagaaggtcg agcctaagtc gtgc 684

<210> 85

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequences of antibody 2109 CDRH1

<400> 85

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Asn Tyr Ile His

1 5 10

<210> 86

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequences of antibody 2109 CDRH2

<400> 86

Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Ala Tyr Ala His Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Thr

<210> 87

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequences of antibody 2109 CDRH3

<400> 87

Arg Tyr Tyr Ser Ala Met Pro Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 88

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequences of antibody 2109 CDRL1

<400> 88

Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Gly Leu Ala

1 5 10

<210> 89

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequences of antibody 2109 CDRL2

<400> 89

Asp Ser Ser Thr Leu His Thr

1 5

<210>

90

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequences of antibody 2109 CDRL3

<400> 90

Gln Gln Asn Tyr Asp Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 91

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain variable region of antibody 2109 gL18

<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 Glu Asp Ile Tyr Ser Gly

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Thr Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Asn Tyr Asp Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr

100 105

<210> 92

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain variable region of antibody 2109 gH2

<400> 92

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Ala Tyr Ala His Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Thr Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ala Lys Asn Ser 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

Thr Arg Arg Tyr Tyr Ser Ala Met Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 93

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding Light Chain variable region of antibody 2109 gL18

<400> 93

gatatacaga tgaccaatc accaagctct ctgagtgctt ccgttggcga tcgcgttaca 60

attacctgcc gagctagcga ggatatatac tcaggactgg cctggtacca gcaaaagcct 120

ggcaaagtgc ctaagctcct gatctacgac tccagtaccc tgcacactgg tgtgccaagc 180

cgctttagcg gaactggatc tggaaccgac tatacactga cgatttcctc actgcaaccg 240

gaagacgtgg caacctactt ctgtcagcaa aactacgact tccccttgac gtttgggcaa 300
 gggacaaagc tggagatcaa acgtacc 327
 <210> 94
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA encoding Heavy Chain variable region of antibody 2109 gH2
 <400> 94
 gaagttcaac tggtcgaaag cggaggtggg ctctgaaac ctggcggatc tctgcgattg 60
 tcatgtgctg caagcggcta cacgtttacc gataactata tccactgggt gcgacaagca 120
 ccaggggaagg gactggaatg gattggatat attaaccga gctccgccta cgcacactac 180
 aacgagaaat tcaagaccg attcaccatc tccgtggaca aagccaagaa ctccgcttac 240
 ctgcaaatga actctctcgc ggccgaagac actgccgtgt attactgcac ccgccgatac 300
 tatagcgtc tgcctttgc ctactgggga caagggacac tggtcactgt ctcaagt 357
 <210> 95
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Light Chain variable region of antibody 2109 gL18
 <400> 95
 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 Glu Asp Ile Tyr Ser Gly
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ser Ser Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Thr Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Asn Tyr Asp Phe Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr

100 105

<210> 96

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain variable region of antibody 2109 gH2

<400> 96

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Ala Tyr Ala His Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Thr Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ala Lys Asn Ser 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

Thr Arg Arg Tyr Tyr Ser Ala Met Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 97

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding Light Chain variable region of antibody 2109 gL18

<400> 97

gatatccaga tgaccagtc gccgtccagc ctctccgct ccgtagggaga cagagtgacg 60

atcacttga gagcatcaga ggacatctac tctggccttg cttggtatca gcagaagccg 120

ggaaaggtgc ccaaactgct catctatgac tctcgcaccc tccacacggg agtgccatcg 180
 cgcttcagcg ggaccggatc tgggaccgac tacacctga ccatttcac gctccagccg 240
 gaggatgttg ccaattactt ctgccaacag aattacgact tcccacttac ttttgatgt 300
 ggcaactaagc tcgaaatcaa gcgcacc 327

<210> 98

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding Heavy Chain variable region of antibody 2109 gH2

<400> 98

gaagtgcagt tggtaggagtc ggggggaggg ttggtgaagc caggaggatc attgcggttg 60
 tcatgtgcgg cttcgggcta cactttcact gacaattaca ttactgggt gcgacaagca 120
 ccagggaagt gcctcgaatg gattggctac atcaaccgt caagcgcata cgcccattac 180
 aacgaaaagt tcaagaccg gttcaccatc tccgtggata aggcgaaaaa cagcgcgtac 240
 cttcagatga actccctcgc ggccgaggat accgccgttt actactgcac tagacggtac 300

tacagcgcca tgccgttcgc gtactgggga caaggcactc tggtcaccgt gtcgtcg 357

<210> 99

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> scFv (VH-VL) of antibody 2109 gH2gL18

<400> 99

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

<210> 100

<211> 744

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding scFv (VH-VL) of antibody 2109 gH2gL18

<400> 100

gaagttcaac tggtcgaaag cggaggtggg ctcgtgaaac ctggcggatc tctgcgattg 60
 tcatgtgctg caagcggcta cagtttacc gataactata tccactgggt gcgacaagca 120
 ccaggaagg gactggaatg gattggatat attaaccga gctccgccta cgcacactac 180

aacgagaaat tcaagaccg attcacatc tccgtggaca aagccaagaa ctccgcttac 240

ctgcaaatga actctctgcg ggccgaagac actgccgtgt attactgcac ccgccgatac 300

tatagcgcta tgcctttgac ctactgggga caaggacac tggctactgt ctcaagtgga 360

ggtggcgggt ctggcgggtg cggttccggt ggcggtggat cgggaggtgg cggttctgat 420

atacatatga cccaatcacc aagctctctg agtgcctccg ttggcgatcg cgttacaatt 480

acctgccgag ctacgagga tatatactca ggactggcct ggtaccagca aaagcctggc 540

aaagtgccta agctcctgat ctacgactcc agtaccctgc aactgggtgt gccaaagccg 600

tttagcggaa ctggatctgg aaccgactat aactgacga tttcctcact gcaaccggaa 660

gacgtggcaa cctacttctg tcagcaaac tacgacttcc ccttgacgtt tgggcaaggg 720

acaaagctgg agatcaaag tacc 744

<210> 101

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> dsscFv (VH-VL) of antibody 2109 gH2gL18

<400> 101

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Ala Tyr Ala His Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Thr Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ala Lys Asn Ser 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

Thr Arg Arg Tyr Tyr Ser Ala Met Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

aaggtgccca aactgctcat ctatgactcc tcgacctcc acacgggagt gccatcgcg 600

ttcagcggga ccggatctgg gaccgactac acctgacca ttcatcgct ccagccggag 660

gatgttgcca cttacttctg ccaacagaat tacgacttcc cacttacttt tggatgtggc 720

actaagctcg aaatcaagcg cacc 744

<210> 103

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequences of antibody 645 CDRH1

<400> 103

Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn

1 5 10

<210> 104

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequences of antibody 645 CDRH2

<400> 104

Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly

1 5 10 15

<210> 105

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequences of antibody 645 CDRH3

<400> 105

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

1 5 10

<210> 106

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequences of antibody 645 CDRL1

<400> 106

Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser

1 5 10

<210> 107

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequences of antibody 645 CDRL2

<400> 107

Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser

1 5

<210> 108

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequences of antibody 645 CDRL3

<400> 108

Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr

1 5 10

<210> 109

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain variable region of antibody 645

<400> 109

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn

 20 25 30

Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu

 35 40 45

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

<210> 110

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain variable region of antibody 645

<400> 110

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 111

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding Light Chain variable region of antibody 645

<400> 111

gatatccaga tgaccagag tccaagcagt gtttccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact 60
 attacctgtc agtcctctcc gagcgtttgg tccaacttcc tgagctggta ccagcagaaa 120
 ccgggtaaag ccccgaaact gctgatctac gaggcgtcta aactgacctc tgggtgtaccg 180
 tcccgtttct ctggctctgg ctctggtacg gacttcactc tgaccatctc ctctctgcag 240

ccggaagact ttgcaacgta ctactgcggt ggtgggttact cttccatctc tgacaccacg 300
 ttcggtggag gcaccaaagt tgaaatcaaa cgtacg 336

<210> 112

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding Heavy Chain variable region of antibody 645

<400> 112

gaggttcagc tgetggagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc 60
 tcttgtgcag taagcggcat cgacctgtcc aactacgca ttaactgggt acgtcaggca 120
 ccgggtaaag gtctggaatg gatcggcatc atctgggcct ctggtacgac cttctacgct 180

acttgggcca aaggtcgitt caccatctcc cgtgacaact ctaaaaacac cgtgtacctg 240
 cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggtttact attgcgcgcg taccgttccg 300
 ggctattcta ctgcaccgta cttcgacctg tggggtcagg gtactctggt taccgtctcg 360
 agt 363

<210> 113

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain variable region of antibody 645

<400> 113

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn

115 120

<210> 115

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding Light Chain variable region of antibody 645

<400> 115

gacatccaga tgacgcagtc accatcgtcc gtgtcagcat ccgtgggaga cagagtgacc 60

attacttgtc agtcctcgcc ctcagtctgg tcgaattttc tgtcgtggta tcaacaaaag 120

ccagggaaag ccccaaagct gctgatctac gaggccagca aactcacttc gggagtcct 180

agcagattct ccggctcggg atcgggcacc gatttcaccc tcaccattag ctcaactcaa 240

ccagaggatt ttgccaccta ctactcggc ggtggctaca gctcaatctc agataccact 300

ttcggatgcg gtactaaggt cgagattaag cgcact 336

<210> 116

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding Heavy Chain variable region of antibody 645

<400> 116

gaagtgcagc tcttggaaatc ggggtggagga ctggtgcagc cgggaggttc cctgaggctg 60

agctgtgctg tgtccggcat cgaccttca aactacgcca tcaattgggt gaggcaggcg 120

ccaggaaaat gtctcgaatg gatcggatc atctgggcta gcggaactac cttctatgcg 180

acgtgggcca agggacggtt cactatctcg cgcgataaca gcaagaacac cgtgtacctc 240

cagatgaaca gcctccgggc tgaggacact gcagtctatt actgcgcgag aacggtgccg 300

ggctactcca ctgcaccgta cttcgacttg tggggacagg gaactcttgt gaccgtcagc 360

tcg 363

<210> 117

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> scFv (VH-VL) of antibody 645

<400> 117

245

250

<210> 118

<211> 759

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding scFv (VH-VL) of antibody 645

<400> 118

gaggttcagc tgctggagtc tggaggcggg ctgtccagc ctggaggag cctgcgtctc 60
 tcttgtcag taagcggcat cgacctgtcc aactacgca ttaactgggt acgtcaggca 120
 ccgggtaaag gtctggaatg gatcggcatc atctggcct ctggtacgac cttctacgct 180

acttgggcca aaggtcgttt caccatctcc cgtgacaact ctaaaaacac cgtgtacctg 240
 cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggtttact attgcgcgcg taccgttccg 300
 ggctattcta ctgcaccgta cttcgacctg tggggtcagg gtactctggt taccgtctcg 360
 agtggaggtg gcggttctgg cggtggcgggt tccggtggcg gtggatcggg aggtggcgggt 420
 tctgatatcc agatgacca gagtccaagc agtgtttccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 480
 actattacct gtcagtcctc tccgagcgtt tggccaact tcctgagctg gtaccagcag 540
 aaaccgggta aagccccgaa actgctgac tacgagcgt ctaaactgac ctctggtgta 600

ccgtcccgtt tcctcggctc tggctctggt acggacttca ctctgacat ctctctctg 660
 cagccggaag actttgcaac gtactactgc ggtggtggtt actcttccat ctctgacacc 720
 acgttcggtg gaggcaccaa agttgaaatc aaacgtacg 759

<210> 119

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> dsscFv (VH-VL) of antibody 645

<400> 119

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
 130 135 140
 Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
 145 150 155 160
 Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
 165 170 175
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu
 180 185 190
 Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 195 200 205
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 210 215 220
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr
 225 230 235 240
 Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 245 250
 <210> 120
 <211> 759
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA encoding dsscFv (VH-VL) of antibody 645
 <400> 120

gaagtgcagc tcttggaaac gggtaggagga ctggtgcagc cgggaggttc cctgaggctg 60

agctgtgctg tgtccggcat cgacctttca aactacgcca tcaattgggt gaggcaggcg 120

ccaggaaaat gtctcgaatg gatcggatc atctgggcta gcggaactac cttctatgcg 180

acgtgggcca agggacggtt cactatctcg cgcgataaca gcaagaacac cgtgtacctc 240

cagatgaaca gcctccgggc tggagacact gcagtctatt actgcgcgag aacgggtccg 300

ggctactcca ctgcaccgta cttcgacttg tggggacagg gaactcttgt gaccgtcagc 360

tcgggaggag gaggttcggg cggaggtggg tcgggaggag gtggaagcgg aggaggcggg 420

tcggacatcc agatgacgca gtcaccatcg tccgtgtcag catccgtggg agacagagtg 480

accattactt gtcagtctc gccctcagtc tggtcgaatt tctgtcgtg gtatcaacaa 540

aagccaggga aagcccaaaa gctgctgac tacgaggcca gcaaactcac ttcgggagtc 600

cctagcagat tctccgctc gggatcgggc accgatttca ccctacat tagctcactc 660

caaccagagg atttgccac ctactactgc ggcggtggct acagctcaat ctcagatacc 720

actttcggat gcggtactaa ggtcgagatt aagcgcact 759

<210> 121

<211> 487

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 496.g3 HC-2109VHVL

<400> 121

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	Phe	Thr
Phe	Ser	Asp	Tyr
20	25	30	
Asn	Met	Ala	Trp
Val	Arg	Gln	Ala
Pro	Gly	Lys	Gly
Leu	Glu	Trp	Val
35	40	45	
Ala	Thr	Ile	Thr
Tyr	Glu	Gly	Arg
Asn	Thr	Tyr	Tyr
Arg	Asp	Ser	Val
50	55	60	
Lys	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 Ser Pro Pro Gln Tyr Tyr Glu Gly Ser Ile Tyr Arg Leu Trp Phe
 100 105 110

Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 130 135 140

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

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 210 215 220

Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 225 230 235 240

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser
 245 250 255

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Asn Tyr
 260 265 270

Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 275 280 285

Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Ala Tyr Ala His Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 290 295 300

Thr Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ala Lys Asn Ser Ala Tyr Leu
 305 310 315 320

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
 325 330 335

Arg Arg Tyr Tyr Ser Ala Met Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

aagagcactt caggcggaac ggctgccctc ggatgcctgg tcaaggacta cttcccagag 480
 cccgtgaccg tgtcatgga a cagcggagct ctgactagcg gagtgcacac ctttccggcg 540

gtgctgcaaa gctcaggcct gtactcgctc tcctcagtgg tcaactgtccc gtcctcctcg 600
 ctggggactc aaacgtacat ctgcaacgtc aatcacaac cgtcaaatac caaagtcgac 660
 aagaaggtcg agcctaagtc gtgcagcggg ggaggtggat ccggcgggtg aggtagcgaa 720
 gtccaactgg tcgaaagcgg aggtgggctc gtgaaacctg gcggatctct gcgattgtca 780
 tgtgctgcaa gcggctacac gtttaccgat aactatatcc actgggtgcg acaagcacca 840
 gggaaggac tggaatggat tggatatatt aacccgagct ccgcctacgc aactacaac 900
 gagaaattca agaccgatt caccatctcc gtggacaaag ccaagaactc cgcttacctg 960

caaatgaact ctctgcgggc cgaagacact gccgtgtatt actgcaccgc cggatactat 1020
 agcgtatgc cctttgcta ctggggacaa gggacactgg tcaactgtctc aagtggaggt 1080
 gcgggttctg gcgggtggcg ttccggtggc ggtggatcgg gaggtggcgg ttctgatata 1140
 cagatgacc aatcaccaag ctctctgagt gcttccgttg gcgatcgcgt tacaattacc 1200
 tgccgagcta gcgaggatat atactcagga ctggcctggt accagcaaaa gectggcaaa 1260
 gtgcctaagc tcctgatcta cgactccagt acctgcaca ctggtgtgcc aagccgcttt 1320
 agcggaaactg gatctggaac cgactataca ctgacgattt cctcactgca accggaagac 1380

gtggcaacct acttctgtca gcaaaactac gacttccct tgacgtttgg gcaagggaca 1440
 aagctggaga tcaaactgac c 1461

<210> 123

<211> 487

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 496.g3 HC-2109VHVL

<400> 123

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 Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60
 Lys 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 Ser Pro Pro Gln Tyr Tyr Glu Gly Ser Ile Tyr Arg Leu Trp Phe
 100 105 110
 Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 130 135 140
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160

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

 Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 225 230 235 240
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser
 245 250 255
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Asn Tyr
 260 265 270
 Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 275 280 285

 Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Ala Tyr Ala His Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 290 295 300

Thr Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ala Lys Asn Ser Ala Tyr Leu
 305 310 315 320
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
 325 330 335
 Arg Arg Tyr Tyr Ser Ala Met Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 340 345 350

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 355 360 365
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
 370 375 380
 Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
 385 390 395 400
 Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 405 410 415

Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ser Ser Thr Leu
 420 425 430
 His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Thr Gly Ser Gly Thr Asp
 435 440 445
 Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr
 450 455 460
 Phe Cys Gln Gln Asn Tyr Asp Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 465 470 475 480

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 485

<210> 124

<211> 1461

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding 496.g3 HC-2109VHVL

<400> 124

gaagtgcagc tgggtggaatc cggcggagga ctggtgcagc ccggtggatc attgagactt 60

tcgtgtgcag catcaggctt tactttctcg gactacaata tggcatgggt gcgccaagcg 120

cctggtaaag gactggaatg ggtcgcgact atcacttatg aggggcggaa tacttactat 180
 agggatagcg tcaaaggacg ctttaccatc tcacgggaca acgctaagaa ctccctgtac 240
 ctccaaatga actcactcag ggcagaagat acggccgtgt actactgtgc ctgcctccg 300

cagtactacg aagggtccat ctaccgcctt tggttcggcc attggggaca gggaacgctg 360
 gtgactgtgt cctcggcttc gaccaagggg ccctcgggtgt tccctctggc gcctagctcc 420
 aagagcactt caggcggaac ggctgccctc ggatgcctgg tcaaggacta cttcccagag 480
 cccgtgaccg tgtcatggaa cagcggagct ctgactagcg gagtgcacac ctttccggcg 540
 gtgctgcaaa gctcaggcct gtactcgtc tcctcagtgg tcaactgtccc gtctctctcg 600
 ctggggactc aaacgtacat ctgcaacgtc aatcacaac cgtcaaatac caaagtcgac 660
 aagaaggtcg agcctaagtc gtgcagtgga ggtgggggca ccggaggtgg cggttcagaa 720

gttcaactgg tcgaaagcgg aggtgggctc gtgaaacctg gcggatctct gcgattgtca 780
 tgtgctgcaa gcggctacac gtttaccgat aactatatcc actgggtgcg acaagcacca 840
 gggaagggac tggaatggat tggatataat aaccgagct ccgcctacgc aactacaac 900
 gagaaattca agaccegatt caccatctcc gtggacaaag ccaagaacte cgcttacctg 960
 caaatgaact ctctgcgggc cgaagacact gccgtgtatt actgcaccgc cgatactat 1020
 agcgtatgc ctttgccta ctggggacaa gggacactgg tcaactgtctc aagtggaggt 1080
 ggcggttctg gcggtggcgg ttccgggtggc ggtggatcgg gaggtggcgg ttctgatata 1140

cagatgacce aatcaccaag ctctctgagt gcttccgttg gcgatcgcgt tacaattacc 1200
 tgccgagcta gcgaggatat atactcagga ctggcctggg accagcaaaa gcctggcaaa 1260
 gtgcctaagc tcctgatcta cgactccagt accctgcaca ctggtgtgcc aagccgcttt 1320
 agcggaaactg gatctggaac cgactataca ctgacgattt cctactgca accggaagac 1380
 gtggcaacct acttctgtca gcaaaactac gacttccct tgacgtttgg gcaagggaca 1440
 aagctggaga tcaaactgac c 1461

<210> 125

<211> 487

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 496.g3 HC-2109dsVHVL

<400> 125

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

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

 305 310 315 320
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
 325 330 335
 Arg Arg Tyr Tyr Ser Ala Met Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 340 345 350
 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 355 360 365
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln

 370 375 380
 Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
 385 390 395 400
 Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 405 410 415
 Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ser Ser Thr Leu
 420 425 430
 His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Thr Gly Ser Gly Thr Asp

 435 440 445
 Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr
 450 455 460
 Phe Cys Gln Gln Asn Tyr Asp Phe Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr
 465 470 475 480
 Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 485

<210> 126

<211> 1461

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding 496.g3 HC-2109dsVHVL

<400

> 126

```

gaagtgcagc tgggtggaatc cggcggagga ctggtgcagc cgggtggatc attgagactt      60
tcgtgtgcag catcaggctt tactttctcg gactacaata tggcatgggt gcgccaagcg      120
cctggtaaag gactggaatg ggtcgcgact atcacttatg agggcgaggaa tacttactat      180
agggatagcg tcaaaggacg ctttaccatc tcacgggaca acgctaagaa ctccctgtac      240
ctccaaatga actcactcag ggcagaagat acggccgtgt actactgtgc ctgcctccg      300
cagtactacg aagggtccat ctaccgcctt tggttcgccc attggggaca gggaaacgctg      360
gtgactgtgt cctcggcttc gaccaagggg ccctcgggtgt tccctctggc gcctagctcc      420

aagagcactt caggcggaac ggctgccctc ggatgcctgg tcaaggacta cttcccagag      480
cccgtgaccg tgcacatgaa cagcggagct ctgactagcg gactgcacac ctttcggcgc      540
gtgctgcaaa gctcaggcct gtactcgtc tcctcagtgg tcactgtccc gtccctctcg      600
ctggggactc aaacgtacat ctgcaacgtc aatcacaaac cgtcaaatc caaagtcgac      660
aagaaggtcg agcctaagtc gtgcagcggg ggaggtggat cggcgggtgg aggtagcgaa      720
gtgcagttgg tggagtcggg gggaggggtg gtgaagccag gaggatcatt gcggttgta      780
tgtgcggctt cgggctacac ttctactgac aattacattc actgggtgcg acaagcacca      840

gggaagtgcc tcgaatggat tggctacatc aaccctcaa gcgcatacgc ccattacaac      900
gaaaagtcca agaccgggtt caccatctcc gtggataagg cgaaaaacag cgcgtacctt      960
cagatgaact ccctcggggc cgaggatacc gccgtttact actgcactag acggtactac      1020
agcgcacatc cgttcgcgta ctggggacaa ggcactctgg tcaccgtgtc gtcgggagga      1080
ggaggtctcg gtggaggcgg atcgggtggc ggagggagcg gcggaggcgg ttcggatata      1140
cagatgacc agtcgccgtc cagcctctcc gcctccgtgg gagacagagt gacgatcact      1200
tcgagagcat cagaggacat ctactctggc cttgcttggg atcagcagaa gccgggaaag      1260

gtgcccaaac tgctcatcta tgactcctcg accctccaca cgggagtgcc atcgcgcttc      1320
agcgggaccg gatctgggac cgactacacc ctgaccattt catcgtcca gccggaggat      1380
gttgccactt acttctgcca acagaattac gacttcccac ttacttttgg atgtggcact      1440
aagctcgaaa tcaagcgcac c                                     1461

```

<210> 127

<211> 487

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 496.g3 HC-2109dsVHVL

<400> 127

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 Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

Ala Thr Ile Thr Tyr Glu Gly Arg Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

Lys 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 Ser Pro Pro Gln Tyr Tyr Glu Gly Ser Ile Tyr Arg Leu Trp Phe
 100 105 110

Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 130 135 140

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

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 210 215 220

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

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

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

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

 Phe Cys Gln Gln Asn Tyr Asp Phe Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr

gttgccactt acttctgcca acagaattac gacttccac ttacttttgg atgtggcact 1440

aagctcgaag tcaagcgcac c 1461

<210> 129

<211> 478

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 496.g3 LC-645VHVL

<400> 129

Ala Ile Gln Leu 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 Asp Glu Ser Val Arg Thr Leu

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Leu Val Ser Asn Ser Glu Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Arg Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp Ser Asp Pro Trp

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

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 435 440 445
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp
 450 455 460
 Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 465 470 475

<210> 130

<211> 1434

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding 496.g3 LC-645VHVL

<400> 130

gcgatccagc tgacgcaatc gccgtcctcg ctgtcagcga gcgtgggcga tagggtcacg 60
 atcacctgtc gggccgatga atcgggtccgc actctgatgc attggtatca gcaaaagccg 120
 ggaaaggccc cgaagctgct catctacctg gtgagcaatt ccgagatcgg agtcccggac 180
 cgcttcagcg gttcgggcag cggaaccgac ttccgcctga ctatttctc gctgcaacce 240
 gaggacttgc ctacttacta ctgccagcag acctgggtcag atccgtggac tttcgggcag 300
 ggaaccaaag tggaaatcaa gcggtactgt gccgcacctt cgggtttcat ctttcaccg 360

 tcagacgaac aacttaaaag cggaactgcg tcggtggtgt gcctccttaa caacttttac 420
 cctagagaag ccaaggtcca gtggaagggt gacaatgccc ttcaaagcgg aaacagccag 480
 gagtccgtga ccgagcagga ctcaaagat tcgacttata gcttgtcgtc cacgctcacc 540
 ctgagcaaag cagactacga aaagcacaag gtgtacgctt gcgaagtgac ccaccaaggc 600
 ttgtcgagcc ccgtgaccaa atccttcaac cggggagaat gcagcgggtg cggaggtccc 660
 ggaggaggag gatcagaggt tcagctgctg gactctggag gcgggcttgt ccagcctgga 720
 gggagcctgc gtctctcttg tgcagtaagc ggcacgacc tgtccaacta cgcgattaac 780

 tgggtacgtc aggcaccggg taaaggtctg gaatggatcg gcatcatctg gcctctggt 840
 acgaccttct acgtacttg ggccaaaggt cgtttcacca tctccctga caactctaaa 900
 aacaccgtgt acctgcagat gaactctctg cgtgcggaag aactgcggt ttactattgc 960
 gcgctaccg ttccgggcta ttctactgca ccgtacttcg acctgtgggg tcagggtact 1020
 ctggttaccg tctcgagtgg aggtggcgggt tctggcggtg gcggttccgg tggcgggtgga 1080
 tcgggagggt gcggttctga tatccagatg acccagagtc caagcagtgt ttccgcagc 1140

gtaggcgatc gtgtgactat tacctgtcag tcctctccga gcgittggtc caacttctg 1200
 agctgttacc agcagaaacc gggtaaagcc cgaactgc tgatctacga ggcgtctaaa 1260
 ctgacctctg gtgtaccgtc ccgtttctct ggcctctggct ctggtacgga cttcaactctg 1320
 accatctcct ctctgcagcc ggaagacttt gcaacgtact actgcggtgg tggttactct 1380
 tccatctctg acaccacggt cggtggaggc accaaagtgg aatcaaagc tacg 1434

<210> 131

<211> 478

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 496.g3 LC-645dsVHVL

<400> 131

Ala Ile Gln Leu 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 Asp Glu Ser Val Arg Thr Leu
 20 25 30

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

Tyr Leu Val Ser Asn Ser Glu Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp Ser Asp Pro Trp
 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 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 210 215 220
 Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 225 230 235 240
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn
 245 250 255
 Tyr Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp
 260 265 270

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

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

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

405 410 415
 Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 420 425 430
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 435 440 445
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp
 450 455 460

Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 465 470 475

<210> 132

<211> 1434

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding 496.g3 LC-645dsVHVL

<400> 132

gcatccagc tgacgcaatc gccgtcctcg ctgtcagcga gcgtgggcga tagggtcacg 60
 atcacctgtc gggccgatga atcggctcgc actctgatgc attggtatca gcaaaagccg 120
 ggaaaggccc cgaagctgct catctacctg gtgagcaatt ccgagatcgg agtcccggac 180
 cgcttcagcg gttcgggcag cggaaccgac ttccgcctga ctatttctc gctgcaacce 240

 gaggacttcg ctacttacta ctgccagcag acctggtcag atccgtggac tttcgggcag 300
 ggaaccaaag tggaaatcaa gcggactgtc gccgcacctt cgggtttcat ctttccaccg 360
 tcagacgaac aacttaaaag cggaactgcg tcggtggtgt gcctccttaa caacttttac 420
 cctagagaag ccaaggtcca gtggaagggtg gacaatgccc ttcaaagcgg aaacagccag 480
 gagtccgtga ccgagcagga ctcaaagat tcgacttata gcttgtcgtc cacgctcacc 540
 ctgagcaaag cagactacga aaagcacaag gtgtacgctt gcgaagtgac ccaccaaggc 600
 ttgtcgagcc ccgtgaccaa atccttcaac cggggagaat gcagcgggtg cggaggtctc 660

 ggaggaggag gatcagaagt gcagctcttg gaatcgggtg gaggactggt gcagccggga 720
 ggttcctga ggetgagctg tgctgtgtcc ggcacgacc tttcaaaacta cgccatcaat 780
 tgggtgaggc aggcgccagg aaaatgtctc gaatggatcg gtatcatctg ggctagcggg 840
 actaccttct atgcgacgtg ggccaaggga cggttcacta tctcgcgcga taacagcaag 900
 aacaccgtgt acctccagat gaacagcctc cgggctgagg aactgcagt ctattactgc 960
 gcgagaacgg tgccgggcta ctccactgca ccgtacttcg acttgtgggg acaggggaact 1020

cttgtgaccg tcagctcggg aggaggaggt tcgggcggag gtgggtcggg aggaggtgga 1080

agcggaggag gcggatcgga catccagatg acgcagtcac catcgtccgt gtcagcatcc 1140

gtgggagaca gagtgacat tacttgtcag tcctcgcct cagtctggtc gaattttctg 1200

tcgtggtatc aacaaaagcc agggaaagcc ccaaagctgc tgatctacga ggccagcaaa 1260

ctcacttcgg gagtccctag cagattctcc ggctcgggat cgggcaccga tttcacctc 1320

accattagct cactccaacc agaggatttt gccacctact actgcggcgg tggctacagc 1380

tcaatctcag ataccacttt cggatgcggt actaaggtcg agattaagcg cact 1434

<210> 133

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rat variable heavy chain sequence of antibody 2109

<400> 133

Glu Val Gln Leu His Gln Ser Gly Ala Ala Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Ala Tyr Ala His Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Thr Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 134

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human germline acceptor framework VH3 sequence 1-3 3-21 with JH4

<400> 134

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

 Ser Ser Ile Ser Ser Ser Thr Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys 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 Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

<210> 135

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain variable region of antibody 2109 gH1

<400> 135

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Ala Tyr Ala His Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Thr Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ala Lys Asn Ser 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
 Thr Arg Arg Tyr Tyr Ser Ala Met Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 136

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequences of antibody 2109 CDRL1

<400> 136

Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Gly Leu Ala

1 5 10

<210> 137

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequences of antibody 2109 CDRL2

<400> 137

Asn Ser Asn Thr Leu His Thr

1 5

<210> 138

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequences of antibody 2109 CDRL2

<400> 138

Asn Ser Ser Thr Leu His Thr

1 5
 <210> 139
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR sequences of antibody 2109 CDRL2
 <400> 139

Asp Ser Asn Thr Leu His Thr

1 5
 <210> 140
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Light Chain variable region of rat antibody 2109
 <400> 140

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

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

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

<210> 141
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Human VK1 2-1(U) A20 JK2 acceptor framework

<400> 141

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 Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val 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 Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 142

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain variable region of antibody 2109 gL1

<400> 142

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 Glu Asp Ile Tyr Asn Gly
 20 25 30

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

Tyr Asn Ser Asn Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Asn Tyr Asp Phe Pro Leu

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 143

<211> 1461

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding 496.g3 HC-2109dsVHVL

<400> 143

```

gaggtgcagc tcgtcгааag cggcggagga ctctgcagc ctggaggctc attgctgttg      60
tcatgtgccg ccagcggctt caccttttcc gactataaca tggcctgggt gcgccaagct      120
cctggaaagg ggctggaatg ggtcgccacc atcacttacg agggccggaa cacctactac      180

cgcgattccg tgaaggggcg gttcactatt tcgctgggaca acgccaagaa ctctctgtac      240
cttcaaatga actccctccg cgcggaagat accgcccgtgt attactgcgc ctaccaccg      300
caatactacg agggaagcat ctacagactc tggttcgccc attggggcca gggaaactttg      360
gtgaccgtca gtcagcctc cactaagggc cccagcgtgt tccctcttgc tccgtctec      420
aagtccactt ctggcggcac tgcagccttg gggtgcctcg tgaaggatta cttccccgaa      480
cccgtgaccg tgtcctggaa ctccggagcc ctgacctcgg gagtgcacac cttcccagcg      540
gtgctccagt cctccggcct gtactcactc tcatcggtcg tgaccgtgcc gtccagctcc      600

ctgggaacce agacttacat ttgcaactg aaccacaagc catccaacac caaggtggac      660
aagaaggtgg agcctaagag ctgttcggga ggaggcggtt ctggtggcgg aggatcggag      720
gtgcagcttg tggagtccgg tggaggcctt gtgaaacctg gcggaagcct gaggctgtca      780
tgtgccgctt ccggatacac cttcactgac aactacatcc actgggtgcg ccaagctccg      840
ggaaagtgcc tggaatggat tggtacatt aaccctcct cgcctacgc cactacaac      900
gaaaagtcca agaccgggtt caccatctcc gtcgacaagg ccaagaatag cgctatctg      960
caaatgaaca gcctccgcgc ggaagatacc gcggtgtact actgcactcg gagatactac      1020

agcgcctatc cgttcgcgta ctggggacag ggcaccttgg tcaccgtgtc aagcggagga      1080
ggaggctccg gtggtggagg atcgggggga ggaggaagcg gaggggttg ttcagatatt      1140
cagatgactc agtccccttc gtcctgagc gcgtcagtgg gcgacagggt caccattacc      1200
tgtcgggctt ccgaggacat ctactcagga ctgcctggt atcaacagaa gccgggaaag      1260

```

gtccccgaagc tctgatcta cgactcgtcg accctgcaca ctggcgtgcc atccccgattt 1320
 tcgggaacgg gctcaggac tgactacact ctgaccattt caagcctgca gcctgaggat 1380
 gtggccactt acttctgcca acaaaactac gacttcccc ttaccttcgg ctgcgggact 1440

aagctggaga tcaagcggac t 1461

<210> 144

<211> 1480

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding 496.g3 HC-2109dsVHVL

<400> 144

gaagtgcagc tgggtggaatc tggcggcggga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 tcttgtgccg cctccggctt caccttctcc gactacaaca tggcctgggt gcgacaggct 120
 cctggcaagg gactggaatg ggtggccaca atcacctacg agggccgga cacctactac 180
 cgggactctg tgaagggccg gttcaccatc tctcgggaca acgccaagaa ctccctgtac 240

ctgcagatga acagcctcgc ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc tagccccct 300
 cagtactatg agggctccat ctaccggtg tggttcgccc attggggcca gggcacactc 360
 gtgaccgtgt cctctgcttc caccaaggc cctccgtgt tctcttggc cccttcagc 420
 aagtccacct ctggcggaac agccgctctg ggctgcctcg tgaaggacta cttccccgag 480
 cccgtgacag tgtcttggaa ctctggcgcc ctgacctccg gcgtgcacac ctttcagct 540
 gtgctgcagt cctccggcct gtaactccctg tctccgtcg tgactgtgcc ctccagctct 600
 ctgggcaccc agacctacat ctgcaactg aaccacaagc cctccaacac caaggtggac 660

aagaaggtgg aacccaagtc ctgcagcggga ggcggtggtt caggcggcgg aggatctgag 720
 gtgcagctgg tggaaagtgg gggaggcctc gtgaaaccag gcggcagtct gagactgagc 780
 tgcgccgctt ctggctacac ctttaccgac aactacatcc actgggtgcg ccaggcccca 840
 gggaaatgcc tggaatggat cggtacatc aaccctcca gcgcctacgc cactacaac 900
 gagaagtcca agaccgctt caccatcagc gtggacaagg ctaagaatag gcctacctg 960
 cagatgaact cctgagagc tgaggatacc gctgtgtatt attgcaccg gcggtactac 1020
 tccgcatgc ctttgetta ctggggacag ggaacctcg tgacagtgc tagcggcgga 1080

ggcggaaagtg gtggtggtgg atctggggga ggcggttctg gtggtggcgg ctctgatatc 1140
 cagatgacce agtccccag ctccctgtct gcctctgtgg gcgacagagt gaccatcacc 1200
 tgtcggcct ccgaggacat ctactctggc ctggcctggt atcagcagaa acccgcaag 1260

gtgcccaagc tgctgatcta cgactcctcc accctgcaca ccggcgtgcc ctctagattt 1320
 tccggcaccg gctctggcac cgactatacc ctgaccatct ccagcctgca gcctgaggac 1380
 gtggccacct acttttgcca gcagaactac gacttccttc tgaccttcgg ctgcggcacc 1440
 aagctggaaa tcaagcggac ctgatagctc gaggctatca 1480

<210> 145

<211> 1434

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding 496.g3 LC-645dsVHVL

<400> 145

gcaatccaac tgaccagag cccctcctcc ctctccgct ccgtgggaga cagagtgacc 60
 atcacttgcc gggccgatga gtccgtgaga actctcatgc actggtatca gcaaaagcca 120
 gggaaagctc cgaagctgct gatctacctg gtgtcaaatt ccgagattgg cgtgcctgac 180
 cggttcagcg ggagcggatc aggcaccgac ttcagactca cgatctcatc cctgcaaccg 240
 gaagattttg ccacgtacta ctgccaacag acctgggccg acccctggac attcggtcag 300

ggcaccaagg tcgaaatcaa gaggactgtg gccgctcctt ccgtgtttat ctccctccg 360
 tccgacgaac agctgaaatc cggaaccgcc agcgtcgtgt gcctgctgaa caatttctac 420
 ccgcgcaag ccaaggtcca gtggaaggtc gacaacgcc tccagtccgg aaactcccag 480
 gtagtcggtga ccgaacagga ttcgaaggac tcgacctact ccctgtctc gactttgacc 540
 ttgtccaagg ccgattacga gaagcataag gtctacgctt gcgaagtgac ccatcagggg 600
 ctgtcatccc ccgtgaccaa gagcttcaac cgcggggagt gctcgggagg aggaggctca 660
 ggaggagggg gttccgaagt gcagctgctg gaatccggag gaggtctggt gcagccaggg 720

ggttctctgc ggctttcctg cgctgtcagc gggatcgacc tctccaacta cgccatcaat 780
 tgggtgcgac aagctccggg aaagtgcctg gtagtgattg gaatcattg ggccagcggc 840
 actaccttct acgcgacttg ggcgaagggt cgcttcacca tctcccggga caattcgaag 900
 aacaccgtgt acttgagat gaacagcctg agagccgagg atacggccgt gtactactgt 960
 gcgaggactg tgcttgcta ctcgaccgcc ccctacttgc atctttgggg acagggcaca 1020
 ctggtcaccg tgicatccgg tggaggagga tcggggggag gaggttccgg aggcggtggt 1080
 agcggaggcg gaggttccga catccaaatg acccagtccc cgtcgagcgt gtccgcctca 1140

gtcggggaca gagtgacat cacatgccag tctcgcctt cggctctggt caacttctg 1200
 tcttggtatc agcagaaacc cggaaaggcc cccaagctgc tcatctacga agcctccaag 1260

ctgaccagcg gggcgccttc gaggttctct ggctcgggat caggcaccga ctttacctc 1320
 acgatttcga gcctgcaacc ggaggatttc gcaacttact actgcggcgg tggttacagc 1380
 tcatttagcg acaccacctt cggtcgcggg accaaggtcg agatcaagcg cact 1434
 <210> 146
 <211> 1447
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA encoding 496.g3 LC-645dsVHVL
 <400> 146

gccatccagc tgaccagag cccttccagc ctgtctgcct ctgtgggcga cagagtgacc 60
 atcacctgtc gggccgatga gtccgtgcgg accctgatgc actggtatca gcagaagccc 120
 ggcaaggccc ccaagctgct gatctacctg gtgtccaact ccgagatcgg cgtgcccgac 180
 agattctccg gctctggctc tggcaccgac ttccggctga ccatctctag cctgcagccc 240
 gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag acttggagcg acccctggac ctttggccag 300
 ggaccaaggg tggaaatcaa gcggaccgtg gccgctccct ccggttcat cttcccacct 360
 tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgct tctgtctgtg gcctgctgaa caactctac 420

ccccgcgagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagtccgg caactcccag 480
 gaatccgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctact ccctgtctc caccctgacc 540
 ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgctt gcgaagtgac ccaccagggc 600
 ctgtctagcc ccgtgaccaa gtctttcaac cggggcgagt gttctggcgg cggaggatct 660
 gggggaggcg gatctgaagt gcagctgctg gaatctggcg gaggcctggt gcagcctggc 720
 ggatctctga gactgtcctg tgccgtgtcc ggcacgacc tgtccaacta cgccatcaac 780
 tgggtgcgac aggccccctgg caagtgccctg gaatggatcg gcatcatctg gcctccggc 840

accaccttct acgccacctg ggctaagggc cggttcacca tctcccggga caactccaag 900
 aacaccgtgt acctgcagat gaactccctg cgggccgagg acaccgccgt gtactactgt 960
 gctagaaccg tgccccgcta ctccaccgcc cttactttg atctgtgggg ccagggaacc 1020
 ctctgaccg tgtctagcgg aggcggaggt agtggcggtg gtggaagtgg cggagggggt 1080
 agtggtgggc ggggatctga tattcagatg acccagtccc cctcctccgt gtccccttc 1140
 gtgggagatc gcgtgacaat cacatgccag tctccccct ctgtgtggtc caacttctg 1200
 tcttggatc agcagaaacc tgggaaggct cctaaactgc tgatctatga ggctccaag 1260

ctgacctccg gcgtgcctc tagattctct ggcagcggca gcggaaccga ctttacctg 1320

accatcagct ccctgcagcc tgaagatfff gctacctatt actgcggtgg cggctacagc 1380
 tccatctccg ataccacctt cggctgcgga acaaaagtgg aaatcaaacg cacctgatag 1440
 aagcttg 1447

<210> 147

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ligh Chain Variable region of antibody CA2109 gL18

<400> 147

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 Glu Asp Ile Tyr Ser Gly

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

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

 50 55 60
 Thr Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Asn Tyr Asp Phe Pro Leu

 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

 100 105