(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년12월17일
(11) 등록번호 10-2056963
(24) 등록일자 2019년12월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/24 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/241 (2013.01)
C07K 16/244 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7020580
(22) 출원일자(국제) 2014년12월24일
심사청구일자 2017년11월17일
(85) 번역문제출일자 2016년07월27일
(65) 공개번호 10-2016-0103109
(43) 공개일자 2016년08월31일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/072336
(87) 국제공개번호 WO 2015/103072
국제공개일자 2015년07월09일
(30) 우선권주장
PCT/CN2013/090923 2013년12월30일 중국(CN)
(56) 선행기술조사문헌
WO2010145792 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
에피맙 바이오테라퓨틱스 인코포레이티드
중국 상하이 201112 #56 푸 치 로드 1335 내
(72) 발명자
우 쳉빈
중국 상하이 201112 푸 치 로드 1335 #56
(74) 대리인
특허법인태평양

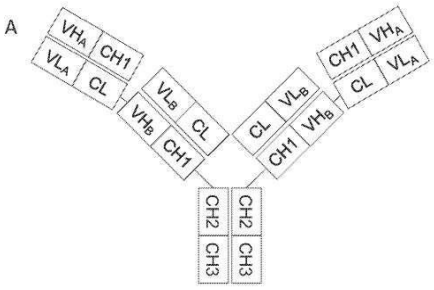
전체 청구항 수 : 총 35 항 심사관 : 이수정

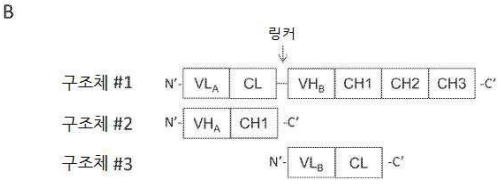
(54) 발명의 명칭 **FABS-인-탠덤 면역글로불린 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 2개 또는 그 이상의 항원, 또는 2개 또는 그 이상의 에피토프에 결합할 수 있는 다가 및 다중특이적 결합 단백질을 제공한다. 본 발명은 또한, 다양한 질환의 예방 또는 치료를 위해, 또는 시험관내 또는 생체내에서 특이적 항원을 검출하기 위해 이런 결합 단백질을 이용하는 방법을 비롯하여, 이런 다가 및 다중특이적 결합 단백질을 만들고 이용하는 방법을 제공한다.

대 표 도





(52) CPC특허분류
C07K 16/2809 (2013.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/2887 (2013.01)
C07K 16/468 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/64 (2013.01)
C07K 2317/66 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/90 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

3개의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 이중특이적 결합 단백질로서,

첫 번째 폴리펩티드 사슬은 아미노로부터 카르복실 말단으로 (ⅰ) VL_A-CL-VH_B-CH1-Fc를 포함하거나, (ii) VH_B-CH1-VL_A-CL-Fc를 포함하며, 이때 상기 VL_A-CL-VH_B-CH1-Fc의 CL은 VH_B에 직접적으로 융합되고, 상기 VH_B-CH1-VL_A-CL-Fc의 CH1은 VL_A에 직접적으로 융합되며, 가변 도메인과 불변 도메인 사이에는 삽입된 링커가 없고;

두 번째 폴리펩티드 사슬은 아미노로부터 카르복실 말단으로 VH_A-CH1을 포함하고, 이때 VH_A 및 CH1 사이에는 삽입된 링커가 없고; 및

및 세 번째 폴리펩티드 사슬은 아미노로부터 카르복실 말단으로 VL_B-CL을 포함하고, 이때 VL_B 및 CL 사이에는 삽입된 링커가 없으며;

A는 첫 번째 에피토프 또는 항원이고, B는 두 번째 에피토프 또는 항원이며, 상기 A 및 B는 동일한 항원의 상이한 에피토프 또는 상이한 항원이고;

VL_A는 에피토프 또는 항원 A에 결합하는 첫번째 부모 단일클론 항체의 경쇄 가변 도메인이고, CL은 항체 경쇄 불변 도메인이고, VH_B는 에피토프 또는 항원 B에 결합하는 두번째 부모 항체의 중쇄 가변 도메인이고, CH1은 항체 중쇄의 첫 번째 불변 도메인이고, VH_A는 에피토프 또는 항원 A에 결합하는 상기 첫번째 부모 항체의 중쇄 가변 도메인이고, VL_B는 에피토프 또는 항원 B에 결합하는 상기 두번째 부모 항체의 경쇄 가변 도메인이고; 및

2개의 상기 첫번째 폴리펩티드 사슬, 2개의 상기 두번째 폴리펩티드 사슬, 및 2개의 상기 세번째 폴리펩티드 사슬은 6개의 폴리펩티드 사슬 및 4개의 Fab 결합 영역을 포함하는 이중 특이적인 사가 결합 단백질을 제공하기 위해 결합될 수 있고, 상기 결합 단백질은 에피토프 또는 항원 A 및 에피토프 또는 항원 B 모두에 결합하는 이중특이적 결합 단백질.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 Fc는 인간 IgG1의 Fc인 결합 단백질.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 Fc는 서열번호 20에 따른 것인 결합 단백질.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 Fc는 변이체 Fc인 결합 단백질.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 결합 단백질은 IL-1α 및 IL-1β; IL-12 및 IL-18; TNFα 및 IL-23; TNFα 및 IL-13; TNFα 및 IL-18; TNFα 및 IL-12; TNFα 및 IL-1베타; TNFα 및 MIF; TNFα 및 IL-6; TNFα 및 IL-6 수용체; TNFα 및 IL-17; IL-17 및 IL-20; IL-17 및 IL-23; TNFα 및 IL-15; TNFα 및 VEGF; VEGFR 및 EGFR; IL-13 및 IL-9; IL-13 및 IL-4; IL-13 및 IL-5; IL-13 및 IL-25; IL-13 및 TARC; IL-13 및 MDC; IL-13 및 MIF; IL-13 및 TGF-β; IL-13

및 LHR 효현제; IL-13 및 CL25; IL-13 및 SPRR2a; IL-13 및 SPRR2b; IL-13 및 ADAM8; TNFα 및 PGE4; IL-13 및 PED2; 및 TNFα 및 PEG2;로 이루어진 군으로부터 선택되는 사이토킨의 쌍에 결합할 수 있는 결합 단백질.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 결합 단백질은 인간 IL-17 및 인간 IL-20에 결합하는 결합 단백질.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 결합 단백질은 항-IL-17 항체 LY 및 항-IL-20 항체 15D2로부터 유래된 가변 중쇄와 경쇄를 포함하는 결합 단백질.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 결합 단백질은 서열번호 15에 따른 아미노산 서열을 포함하는 첫 번째 폴리펩티드 사슬; 서열번호 21에 따른 아미노산 서열을 포함하는 두 번째 폴리펩티드 사슬; 및 서열번호 23에 따른 서열을 포함하는 세 번째 폴리펩티드 사슬을 포함하는 결합 단백질.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 결합 단백질은 CD138 및 CD20; CD138 및 CD40; CD19 및 CD20; CD20 및 CD3; CD3 및 CD33; CD16 및 CD33; CD3 및 CD133; CD38 및 CD138; CD38 및 CD20; CD20 및 CD22; CD38 및 CD40; CD40 및 CD20; CD-8 및 IL-6; CSPGs 및 RGM A; CTLA-4 및 BTNO2; IGF1 및 IGF2; IGF1 또는 IGF2 및 ErbB2; IGF-1R 및 EGFR; EGFR 및 CD13; IGF-1R 및 ErbB3; EGFR-2 및 IGFR; VEGFR-2 및 Met; VEGF-A 및 안지오포이에틴-2 (Ang-2); IL-12 및 TWEAK; IL-13 및 IL-1베타; MAG 및 RGM A; NgR 및 RGM A; NogoA 및 RGM A; OMGp 및 RGM A; PD-L1 및 CTLA-4; PD-1 및 CTLA-4; PD-1 및 TIM-3; PD-1 및 BTLA; CD137 및 CD20; CD137 및 EGFR; CD137 및 Her-2; CD137 및 PD-1; CD137 및 PD-L1; VEGF 및 PD-L1; EGFR 및 PD-1; PD-1 및 PD-L1; Lag-3 및 TIM-3; OX40 및 PD-1; TIM-3 및 PD-L1; EGFR 및 DLL-4; PDGFR 및 VEGF; EpCAM 및 CD3; Her2 및 CD3; CD19 및 CD3; EGFR 및 Her3; CD16a 및 CD30; CD30 및 PSMA; EGFR 및 CD3; CEA 및 CD3; TROP-2 및 HSG; TROP-2 및 CD3; VEGF 및 EGFR; HGF 및 VEGF; VEGF 및 VEGF (상이한 에피토프); EGFR 및 cMet; PDGF 및 VEGF; VEGF 및 DLL-4; OX40 및 PD-L1; ICOS 및 PD-1; ICOS 및 PD-L1; Lag-3 및 PD-1; Lag-3 및 PD-L1; Lag-3 및 CTLA-4; ICOS 및 CTLA-4; CD47 및 CD20; RGM A 및 RGM B; Te38 및 TNFα; TNFα 및 Blys; TNFα 및 CD-22; TNFα 및 CTLA-4 도메인; TNFα 및 GP130; TNFα 및 IL-12p40; 및 TNFα 및 RANK 리간드;로 이루어진 군으로부터 선택되는 표적의 쌍에 결합할 수 있는 결합 단백질.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 결합 단백질은 인간 CD3 및 인간 CD20에 결합할 수 있는 결합 단백질.

청구항 11

청구항 10에 있어서,

상기 결합 단백질은 항-CD3 항체 OKT3 및 항-CD20 항체 오파투무맙으로부터 유래된 가변 중쇄와 경쇄를 포함하는 결합 단백질.

청구항 12

청구항 1에 있어서,

상기 결합 단백질은 서열번호 41에 따른 아미노산 서열을 포함하는 첫 번째 폴리펩티드 사슬; 서열번호 44에 따른 아미노산 서열을 포함하는 두 번째 폴리펩티드 사슬; 및 서열번호 46에 따른 아미노산 서열을 포함하는 세

번째 폴리펩티드 사슬을 포함하는 결합 단백질.

청구항 13

청구항 1에 있어서,

상기 결합 단백질은 CTLA-4 상에서 하나 또는 그 이상의 에피토프에 결합할 수 있는 결합 단백질.

청구항 14

청구항 1에 있어서,

상기 결합 단백질은 PD-1 상에서 하나 또는 그 이상의 에피토프에 결합할 수 있는 결합 단백질.

청구항 15

청구항 1에 있어서,

상기 결합 단백질은 T 세포 상에서 면역 체크포인트 단백질인 단백질 상에서 하나 또는 그 이상의 에피토프에 결합할 수 있는 결합 단백질.

청구항 16

청구항 15에 있어서,

상기 면역 체크포인트 단백질은 TIM-3, Lag3, ICOS, BTLA, CD160, 2B4, KIR, CD137, CD27, OX40, CD40L 및 A2aR로 이루어진 군으로부터 선택되는 결합 단백질.

청구항 17

청구항 1에 있어서,

상기 결합 단백질은 면역 체크포인트 활성에 관련되는 단백질 상에서 하나 또는 그 이상의 에피토프에 결합할 수 있는 결합 단백질.

청구항 18

청구항 17에 있어서,

상기 면역 체크포인트 활성에 관련되는 단백질은 PD-L1, PD-L2, 갈렉틴9, HVEM, CD48, B7-1, B7-2, ICOSL, B7-H3, B7-H4, CD137L, OX40L, CD70 및 CD40으로 이루어진 군으로부터 선택되는 결합 단백질.

청구항 19

청구항 1 내지 청구항 18 중 어느 하나의 항에 있어서,

상기 결합 단백질은 단일특이적 항체 또는 항체 단편에 비하여 유사한 또는 더욱 큰 친화성으로 각 항원에 결합하는 결합 단백질.

청구항 20

청구항 1 내지 청구항 18 중 어느 하나의 항에 있어서,

상기 결합 단백질은 면역부착 분자, 영상 작용제, 치료적 작용제 및 세포독성 작용제로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용제에 접합되는 결합 단백질.

청구항 21

청구항 1 내지 청구항 18 중 어느 하나의 항의 결합 단백질 및 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 22

청구항 1 내지 청구항 18 중 어느 하나의 항의 결합 단백질 및 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용되는 담체

를 포함하는 염증성 질환, 자가면역 질환, 신경변성 질환, 암, 패혈증, 대사 장애, 또는 척수 손상의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 23

청구항 22에 있어서,

상기 염증성 질환, 자가면역 질환, 또는 신경변성 질환은 천식, 류마티스성 관절염, 전신성 홍반성 루푸스(SLE), 다발성 경화증, 알츠하이머병 및 파킨슨병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 약학적 조성물.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

청구항 1에 있어서,

상기 결합 단백질은 서열번호 87에 따른 아미노산 서열을 포함하는 첫 번째 폴리펩티드 사슬; 서열번호 89에 따른 아미노산 서열을 포함하는 두 번째 폴리펩티드 사슬; 및 서열번호 91에 따른 서열을 포함하는 세 번째 폴리펩티드 사슬을 포함하는 결합 단백질.

청구항 27

청구항 5에 있어서,

상기 결합 단백질은 인간 TNFα 및 인간 IL-17에 결합할 수 있는 결합 단백질.

청구항 28

청구항 1에 있어서,

상기 결합 단백질은 서열번호 92에 따른 아미노산 서열을 포함하는 첫 번째 폴리펩티드 사슬; 서열번호 95에 따른 아미노산 서열을 포함하는 두 번째 폴리펩티드 사슬; 및 서열번호 97에 따른 서열을 포함하는 세 번째 폴리펩티드 사슬을 포함하는 결합 단백질.

청구항 29

청구항 9에 있어서,

상기 결합 단백질은 인간 CTLA-4 및 인간 PD-1에 결합할 수 있는 결합 단백질.

청구항 30

IL-17 및 IL-20에 결합할 수 있는 청구항 1에 따른 결합 단백질 및 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 류마티스성 관절염, 건선, 골다공증, 뇌졸중, 간 질환 및 구강암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환의 치료용 약학적 조성물.

청구항 31

CD3 및 CD20에 결합할 수 있는 청구항 1에 따른 결합 단백질 및 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 B 세포 암의 치료용 약학적 조성물.

청구항 32

청구항 31에 있어서,

상기 B 세포 암은 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종 [NHL], 전구체 B 세포 림프모구성 백혈병, 전구체 B 세포 림프모구성 림프종, 성숙 B 세포 신생물, B 세포 만성 림프성 백혈병/작은 림프구성 림프종, B 세포 전림프구성

백혈병, 림프구형질세포성 림프종, 외투 세포 림프종, 소포 림프종, 피부 난포 센터 림프종, 변연대 B 세포 림프종, 모양 세포성 백혈병, 미만성 큰 B 세포 림프종, 버킷 림프종, 형질세포종, 형질 세포 골수종, 이식후 림프세포증식성 질환, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 및 역형성 큰-세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 약학적 조성물.

청구항 33

TNFα 및 IL-17에 결합할 수 있는 청구항 1에 따른 결합 단백질 및 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 자가면역 또는 염증성 질환의 치료용 약학적 조성물.

청구항 34

청구항 33에 있어서,

상기 자가면역 질환은 크론병, 건선, 관절염, 다발성 경화증, 강직성 척추염, 척추 관절병증, 전신성 홍반성 루푸스, 포도막염, 패혈증, 신경변성 질환, 뉴런 재생, 척수 손상, 원발성 및 전이성 암, 호흡기 장애 천식, 알레르기성 및 비알레르기성 천식, 감염으로 인한 천식, 호흡기 합포체 바이러스 (RSV)로 감염으로 인한 천식, 만성 폐쇄성 폐질환 (COPD), 기도 염증을 수반하는 상태, 호산구증가증, 섬유증 및 과잉 점액 생산, 낭포성 섬유증, 폐섬유증, 아토피성 장애, 아토피성 피부염, 두드러기, 습진, 알레르기성 비염, 알레르기성 위장염, 피부의 염증성 또는 자가면역 상태, 위장관 장기의 염증성 또는 자가면역 상태, 염증성 장 질환 (IBD), 궤양성 대장염, 간의 염증성 또는 자가면역 상태, 간경변증, 간 섬유증, B형 또는 C형 간염 바이러스에 의해 유발된 간 섬유증, 경피증, 종양 또는 암, 간세포 암종, 교모세포종, 림프종, 호지킨 림프종, 바이러스 감염, 세균 감염, 기생충 감염, HTLV-1 감염, 보호 유형 1 면역 반응의 발현의 억제 및 예방접종 동안 보호 유형 1 면역 반응의 발현의 억제로 이루어진 군으로부터 선택되는 약학적 조성물.

청구항 35

청구항 34에 있어서,

상기 자가면역 질환은 류마티스성 관절염, 전신성 홍반성 루푸스, 또는 다발성 경화증인 약학적 조성물.

청구항 36

CTLA-4 및 PD-1에 결합할 수 있는 청구항 1에 따른 결합 단백질 및 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암의 치료용 약학적 조성물.

청구항 37

청구항 36에 있어서,

상기 암은 흑색종, 신장암, 전립선암, 췌장 선암종, 유방암, 결장암, 폐암, 식도암, 두경부의 편평상피 세포 암종, 간암, 난소암, 자궁경부암, 갑상선암, 교모세포종, 신경교종, 백혈병, 림프종, 또는 다른 신생물 악성인 약학적 조성물.

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 참조로서 편입

[0002] 본 출원은 2013년 12월 30일자 제출된 국제 출원 번호 PCT/CN2013/090923에 우선권을 주장하고, 이것은 전체적으로 본원에서 참조로서 편입된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 다가 및 다중특이적 결합 단백질, 그리고 다가 및 다중특이적 결합 단백질을 만들고 이용하는 방법에 관계한다.

[0005] 전자적으로 제출된 텍스트 파일의 설명

[0006] 본원과 함께 전자적으로 제출된 텍스트 파일의 내용은 전체적으로 본원에 참조로서 편입된다: 서열 목록의 컴퓨터 판독가능한 형식 사본 (파일명: EPBI_001_01WO_SeqList_ST25.txt, 기록된 날짜: 2014년 12월 2일, 파일 크기 98 KB).

배 경 기 술

[0007] 발명의 배경

[0008] 이중특이적 또는 다중특이적 항체는 다양한 염증성 질환, 암, 그리고 다른 장애의 치료에 유용한 분자를 제조하려는 시도에서 산출되었다.

[0009] 이중특이적 항체는 이중특이적 항체의 원하는 특이성을 갖는 뮤린 단일클론 항체를 발현하는 2개의 상이한 하이브리도마 세포주의 체성 융합에 근거하여, 쿠아드로마 기술 (참조: Milstein, C. and A.C. Cuello, Nature, 1983. 305(5934): p. 537-40)을 이용하여 생산되었다. 이중특이적 항체는 또한, 2개의 상이한 mAb의 화학적 접합에 의해 생산될 수 있다 (참조: Staerz, U.D., et al., Nature, 1985. 314(6012): p. 628-31). 다른 접근법은 2개의 상이한 단일클론 항체 또는 더욱 작은 항체 단편의 화학적 접합을 이용하였다 (참조: Brennan, M., et al., Science, 1985. 229(4708): p. 81-3).

[0010] 다른 방법은 2개의 부모 항체 및 이종이중기능성 교차연결제의 연계이다. 특히, 2개의 상이한 Fab 단편은 그들의 힌지 시스테인 잔기에서 부위-지향된 방식으로 화학적으로 교차연결되었다 (참조: Glennie, M.J., et al., J Immunol, 1987. 139(7): p. 2367-75).

[0011] 다른 재조합 이중특이적 항체 형식이 최근에 개발되었다 (참조: Kriangkum, J., et al., Biomol Eng, 2001. 18(2): p. 31-40). 이들 사이에서 탠덤 단일 사슬 Fv 분자 및 디아바디, 그리고 이들의 다양한 유도체가 재조합 이중특이적 항체의 작제에 이용되었다. 정상적으로, 이들 분자의 작제는 상이한 항원을 인식하는 2개의 단일 사슬 Fv (scFv) 단편으로부터 시작된다 (참조: Economides, A.N., et al., Nat Med, 2003. 9(1): p. 47-52). 탠덤 scFv 분자 (taFv)는 2개의 scFv 분자를 추가 펩티드 링커와 단순히 연결하는 단순한 형식을 나타낸다. 이들 탠덤 scFv 분자 내에 존재하는 2개의 scFv 단편은 별개의 접힘 실체를 형성한다. 다양한 링커가 이들 두 scFv 단편 및 최대 63개 잔기의 길이를 갖는 링커를 연결하는데 이용될 수 있다 (참조: Nakanishi, K., et al.. Annu Rev Immunol, 2001. 19: p. 423-74).

[0012] 최근 연구에서, CD28 및 흑색종-연관된 프로테오글리칸에 대해 지향된 탠덤 scFv의 유전자도입 토끼와 소에 의한 생체내 발현이 보고되었다 (참조: Gracie, J.A., et al., J Clin Invest, 1999. 104(10): p. 1393-401). 이러한 구조체에서, 이들 두 scFv 분자는 CH1 링커에 의해 연결되었고, 그리고 100 mg/L까지의 이중특이적 항체의 혈청 농도가 밝혀졌다. 소수의 연구는 매우 짧은 Ala3 링커 또는 긴 글리신/세린-풍부한 링커를 이용하여, 세균에서 가용성 탠덤 scFv 분자의 발현을 보고하였다 (참조: Leung, B.P., et al., J Immunol, 2000. 164(12): p. 6495-502; Ito, A., et al., J Immunol, 2003. 170(9): p. 4802-9; Karni, A., et al., J Neuroimmunol, 2002. 125(1-2): p. 134-40).

[0013] 최근 연구에서, 3 또는 6개 잔기의 길이를 갖는 무작위화된 중앙 링커를 내포하는 탠덤 scFv 레퍼토리의 파지 전시는 이들 분자를 농축하였는데, 이들은 세균에서 가용성 및 활성 형태로 생산된다. 이러한 접근법은 6개 아미노산 잔기 링커를 갖는 바람직한 탠덤 scFv 분자의 단리를 유발하였다 (참조: Arndt, M. and J. Krauss,

Methods Mol Biol, 2003. 207: p. 305-21).

[0014] 이중특이적 디아바디 (Db)는 발현을 위해 디아바디 형식을 활용한다. 디아바디는 VH와 VL 도메인을 연결하는 링커의 길이를 대략 5개 잔기까지 감소시킴으로써 scFv 단편으로부터 생산된다 (참조: Peipp, M. and T. Valerius, Biochem Soc Trans, 2002. 30(4): p. 507-11). 링커 크기의 이러한 감소는 VH와 VL 도메인의 교차혼합 짝짓기에 의한 두 폴리펩티드 사슬의 이합체화를 용이하게 한다. 이중특이적 디아바디는 동일한 세포 내에서 구조 VHA-VLB 및 VHB-VLA (VH-VL 형상) 또는 VLA-VHB 및 VLB-VHA (VL-VH 형상)을 갖는 2개의 폴리펩티드 사슬을 발현함으로써 생산된다. 최근 비교 연구는 가변 도메인의 정향이 활성 결합 부위의 발현과 형성에 영향을 줄 수 있다는 것을 증명한다 (참조: Mack, M., G. Riethmuller, and P. Kufer, Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(15): p. 7021-5).

[0015] 이중특이적 디아바디의 산출을 강행하는 한 가지 접근법은 구멍 내로 마디 디아바디의 생산이다 (참조: Holliger, P., T. Prospero, and G. Winter, Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(14): p. 6444-8.18). 이것은 HER2 및 CD3에 대해 지향된 이중특이적 디아바디에 대해 증명되었다. 큰 마디가 Val37을 Phe로 교환하고 Leu45를 Trp로 교환함으로써 VH 도메인에 도입되었고, 그리고 상보성 구멍이 항- HER2 또는 항-CD3 가변 도메인 중에서 어느 하나에서 Phe98을 Met으로 돌연변이시키고 Tyr87을 Ala로 돌연변이시킴으로써 VL 도메인에서 생산되었다. 이러한 접근법을 이용함으로써, 이중특이적 디아바디의 생산이 부모 디아바디에 의해 72%로부터 구멍 내로 마디 디아바디에 의해 90% 초과로 증가될 수 있었다.

[0016] 단일 사슬 디아바디 (scDb)는 이중특이적 디아바디-유사 분자의 형성을 향상시키는 대안 전략을 나타낸다 (참조: Holliger, P. and G. Winter, Cancer Immunol Immunother, 1997. 45(3-4): p. 128-30; Wu, A.M., et al., Immunotechnology, 1996. 2(1): p. 21-36). 이중특이적 단일 사슬 디아바디는 2개의 디아바디-형성 폴리펩티드 사슬을 대략 15개 아미노산 잔기의 길이를 갖는 추가 중앙 링커로 연결함으로써 생산된다. 결과적으로, 단위체(monomeric) 단일 사슬 디아바디에 상응하는 분자량 (50-60 kDa)을 갖는 모든 분자는 이중특이적이다. 여러 연구는 이중특이적 단일 사슬 디아바디가 세균 내에 가용성 및 활성 형태로 발현되고, 대다수의 정제된 분자가 단위체로서 존재한다는 것을 증명하였다 (참조: Holliger, P. and G. Winter, Cancer Immunol Immunother, 1997. 45(3-4): p. 128-30; Wu, A.M., et al., Immunotechnology, 1996. 2(1): p. 21-36; Pluckthun, A. and P. Pack, Immunotechnology, 1997. 3(2): p. 83-105; Ridgway, J.B., et al., Protein Eng, 1996. 9(7): p. 617-21).

[0017] 디아바디는 Fc에 융합되어 디-디아바디로 명명된 더욱 Ig-유사 분자가 산출되었다 (참조: Lu, D., et al., J Biol Chem, 2004. 279(4): p. 2856-65). 이에 더하여, IgG의 중쇄에서 2개의 Fab 반복을 포함하고 4개의 항원 분자에 결합할 수 있는 다가 항체 구조체가 설명되었다 (참조: US 특허 8,722,859 B2, 그리고 Miller, K., et al., J Immunol, 2003. 170(9): p. 4854-61).

[0018] 가장 최근 실례는 사가 IgG-단일-사슬 가변 단편 (scFv) 융합 (Dong J, et al. 2011 MAbs 3:273-288; Coloma MJ, Morrison SL 1997 Nat Biotechnol 15:159-163; Lu D, et al. 2002 J Immunol Methods 267:213-226), 카투막소맙, 삼중기능성 쥐/생쥐 하이브리드 이중특이적 상피 세포 부착 분자-CD3 항체 (Lindhofer H, et al 1995 J Immunol 155:219-225), 이중특이적 CD19-CD3 scFv 항체 블리나투모맙 (Bargou R, et al. 2008 Science 321:974-977), "이중-작용 Fab" (DAF) 항체 (BostromJ, et al. 2009 Science 323:1610-1614), 촉매성 항체에 공유 연결된 약물작용발생단 펩티드 (Doppalapudi VR, et al. 2010 Proc Natl Acad Sci USA 107:22611-22616), 이중특이적 항체를 산출하기 위한 절반 IgG4 분자 사이에 역동적 교환의 이용 (van der Neut Kolfschoten M, et al. 2007 Science 317:1554-1557; Stubenrauch K, et al. 2010 Drug Metab Dispos 38:84-91), 또는 이중특이적 항체의 한쪽 절반의 항원 결합 단편 (Fab) 이내에 중쇄와 경쇄 도메인의 교환 (CrossMab 형식) (Schaefer Wet al 2011Proc Natl Acad Sci 108:11187-92)이다.

[0019] 이중 항원 결합 기능을 갖는 단일 분자 실체, 그리고 이런 다가 및 다중특이적 결합 단백질을 산출하는 방법이 당분야에서 요구된다. 본 발명은 이런 저런 문제를 다룬다.

발명의 내용

[0020] **발명의 요약**

[0021] 본 발명은 다가와 다중특이적 결합 단백질, 그리고 이런 결합 단백질을 만들고 이용하는 방법을 제공한다. 한 구체예에서, 본원에서 제공된 다가 및 다중특이적 결합 단백질은 Fabs-인-탠덤 면역글로불린 (FIT-Ig)이고, 그리고 동일한 항원의 2개 또는 그 이상의 항원, 또는 2개 또는 그 이상의 에피토프, 또는 동일한 에피토프의 2개

또는 그 이상의 사본에 결합할 수 있다. 본원에서 제공된 다가 및 다중특이적 결합 단백질은 급성과 만성 염증성 질환 및 장애, 자가면역 질환, 암, 척수 손상, 패혈증, 그리고 다른 질환, 장애 및 상태의 치료 및/또는 예방에 유용하다. 다가 및 다중특이적 결합 단백질을 포함하는 약학적 조성물이 본원에서 제공된다. 이에 더하여, 이런 FIT-Ig를 만들기 위한 핵산, 재조합 발현 벡터, 그리고 숙주 세포가 본원에서 제공된다. 생체내 또는 시험관내에서 특이적 항원을 검출하기 위해 본 발명의 FIT-Ig를 이용하는 방법 역시 본 발명에 의해 포괄된다.

[0022] 본 발명은 예로서, 높은 친화성으로 2개 또는 그 이상의 항원에 결합할 수 있는 결합 단백질의 패밀리를 제공한다. 한 양상에서, 본 발명은 2가지 부모 단일클론 항체: 항원 A에 결합하는 mAb A, 그리고 항원 B에 결합하는 mAb B를 이용하여 이중특이적 결합 단백질을 작제하는 접근법을 제공한다. 본원에서 개시된 결합 단백질은 한 구체예에서, 항원, 사이토킨, 케모킨, 사이토킨 수용체, 케모킨 수용체, 사이토킨- 또는 케모킨-관련된 분자, 또는 세포 표면 단백질에 결합할 수 있다.

[0023] 따라서, 한 양상에서, 2개 또는 그 이상의 항원에 결합할 수 있는 결합 단백질이 제공된다. 한 구체예에서, 본 발명은 최소한 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 결합 단백질을 제공하고, 여기서 이들 폴리펩티드 사슬은 쌍을 이루어 2개 또는 그 이상의 항원에 결합할 수 있는 IgG-유사 분자를 형성한다. 한 구체예에서, 결합 단백질은 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 폴리펩티드 사슬을 포함한다. 한 구체예에서, 결합 단백질은 최소한 하나의 VL_A, 최소한 하나의 VL_B, 최소한 하나의 VH_A, 최소한 하나의 VH_B, 최소한 하나의 CL, 그리고 최소한 하나의 CH1을 포함하고, 여기서 VL은 경쇄 가변 도메인이고, VH는 중쇄 가변 도메인이고, CL은 경쇄 불변 도메인이고, CH1은 중쇄의 첫 번째 불변 도메인이고, A는 첫 번째 항원이고, 그리고 B는 두 번째 항원이다. 추가 구체예에서, 첫 번째 폴리펩티드 사슬은 VL_A, CL, VH_B, 그리고 CH1을 포함한다. 추가 구체예에서, 결합 단백질은 Fc를 더욱 포함한다. 다른 구체예에서, Fc 영역은 변이체 Fc 영역이다. 추가 구체예에서, 변이체 Fc 영역은 변형된 작동체 기능, 예를 들면, ADCC 또는 CDC를 전시한다. 다른 구체예에서, 변이체 Fc 영역은 하나 또는 그 이상의 FcγR에 대한 변형된 친화성 또는 결합력을 전시한다.

[0024] 한 구체예에서, 결합 단백질은 3개의 폴리펩티드 사슬을 포함하고, 여기서 첫 번째 폴리펩티드 사슬은 VL_A, CL, VH_B, 그리고 CH1을 포함하고, 두 번째 폴리펩티드 사슬은 VH_A 및 CH1을 포함하고, 그리고 세 번째 폴리펩티드 사슬은 VL_B 및 CL을 포함한다. 추가 구체예에서, 결합 단백질의 첫 번째 폴리펩티드 사슬은 Fc를 더욱 포함한다. 다른 구체예에서, 결합 단백질은 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함하고, 여기서 첫 번째 폴리펩티드 사슬은 VL_A, CL, VH_B, 그리고 CH1을 포함하고, 두 번째 폴리펩티드 사슬은 VH_A, CH1, VL_B, 그리고 CL을 포함한다. 추가 구체예에서, 첫 번째 폴리펩티드 사슬은 Fc를 더욱 포함한다.

[0025] 한 구체예에서, 결합 단백질은 3개의 폴리펩티드 사슬을 포함하고, 그리고 동시형질감염 동안 이들의 상응하는 cDNA는 1:1:1, 1:1.5:1, 1:3:1, 1:1:1.5, 1:1:3, 1:1.5:1.5, 1:3:1.5, 1:1.5:3, 또는 1:3:3의 첫 번째:두 번째:세 번째의 몰 비율에서 존재한다. 다른 구체예에서, 결합 단백질은 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함하고, 그리고 동시형질감염 동안 이들의 상응하는 cDNA는 1:1, 1:1.5, 또는 1:3의 첫 번째:두 번째의 몰 비율, 또는 임의의 소정의 형질감염에서 단위체 FIT-Ig 분획물을 최대화하는 노력에서 최적화를 통한 임의의 다른 비율에서 존재한다.

[0026] 한 구체예에서, 본 발명의 결합 단백질은 펩티드 링커를 포함하지 않는다. 한 구체예에서, 본 발명의 결합 단백질은 최소한 하나의 아미노산 또는 폴리펩티드 링커를 포함한다. 추가 구체예에서, 링커는 G,GS, SG,GGS, GSG, SGG, GGG, GGGS, SGGG, GGGGS, GGGGSGS, GGGGSGS, GGGGSGGS, GGGGSGGGGS, GGGGSGGGGSGGGGS, AKTTPKLEEGEFSEAR, AKTTPKLEEGEFSEARV, AKTTPKLGG, SAKTTPKLGG, AKTTPKLEEGEFSEARV, SAKTTP, SAKTTPKLGG, RADAAP, RADAAPTVS, RADAAAAGGPGS, $RADAAAA(G_4S)_4$, SAKTTP, SAKTTPKLGG, SAKTTPKLEEGEFSEARV, ADAAP, ADAAPTVSIFPP, TVAAP, TVAAPSVFIFPP, QPKAAP, QPKAAPSVTLFPP, AKTTPP, AKTTPPSVTPLAP, AKTTAP, AKTTAPSVYPLAP, ASTKGP, ASTKGPSVFPLAP, GENKVEYAPALMALS, GPAKELTPLKEAKVS, 그리고 GHEAAAVMQVQYPAS로 이루어진 군으로부터 선택된다. 링커는 또한, 생체내 개열가능한 펩티드 링커, 프로테아제 (가령, MMPs) 민감한 링커, 기존 문헌 (Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals: Applications and Challenges, edited by Stefan R. Schmidt)에서 설명된 바와 같이 환원 등에 의해 개열될 수 있는 이황화 결합-기초된 링커, 또는 당분야에서 공지된 임의의 개열가능한 링커일 수 있다. 이런 개열가능한 링커는 조직/세포 침투와 분포를 향상시키고, 표적에 결합을 증강하고, 잠재적 부작용을 감소시키고, 그리고 2가지 상이한 Fab 영역의 생체내 기능적 및 물리적 반감기를 조정하기 위해, 끝 Fab를 생체내에서 다양한 목적으로 방출하는데 이용될 수 있다.

[0027] 한 구체예에서, 결합 단백질은 아미노로부터 카르복실 말단으로 VL_A-CL-VH_B-CH1-Fc를 포함하는 첫 번째 폴리펩티드, 아미노로부터 카르복실 말단으로 VH_A-CH1을 포함하는 두 번째 폴리펩티드 사슬, 그리고 아미노로부터 카르복실 말단으로 VL_B-CL을 포함하는 세 번째 폴리펩티드 사슬을 포함하고; 여기서 VL은 경쇄 가변 도메인이고, CL은 경쇄 불변 도메인이고, VH는 중쇄 가변 도메인이고, CH1은 중쇄의 첫 번째 불변 도메인이고, A는 첫 번째 에피토프 또는 항원이고, 그리고 B는 두 번째 에피토프 또는 항원이다. 한 구체예에서, Fc 영역은 인간 IgG1이다. 다른 구체예에서, Fc 영역은 변이체 Fc 영역이다. 추가 구체예에서, Fc 영역의 아미노산 서열은 서열번호 20과 최소한 65%, 최소한 70%, 최소한 75%, 최소한 80%, 최소한 85%, 최소한 90%, 최소한 95%, 최소한 99%, 또는 100% 동일하다. 추가 구체예에서, 첫 번째 폴리펩티드 사슬의 CL은 VH_B에 직접적으로 융합된다. 다른 구체예에서, 첫 번째 폴리펩티드 사슬의 CL은 아미노산 또는 올리고펩티드 링커를 통해 VH_B에 연결된다. 추가 구체예에서, 링커는 GSG (서열번호 26) 또는 GGGGSGS (서열번호 28)이다.

[0028] 다른 구체예에서, 결합 단백질은 아미노로부터 카르복실 말단으로 VH_B-CH1-VL_A-CL-Fc를 포함하는 첫 번째 폴리펩티드, 아미노로부터 카르복실 말단으로 VH_A-CH1을 포함하는 두 번째 폴리펩티드 사슬, 그리고 아미노로부터 카르복실 말단으로 VL_B-CL을 포함하는 세 번째 폴리펩티드 사슬을 포함하고; 여기서 VL은 경쇄 가변 도메인이고, CL은 경쇄 불변 도메인이고, VH는 중쇄 가변 도메인이고, CH1은 중쇄의 첫 번째 불변 도메인이고, A는 첫 번째 에피토프 또는 항원이고, 그리고 B는 두 번째 에피토프 또는 항원이다. 한 구체예에서, Fc 영역은 인간 IgG1이다. 다른 구체예에서, Fc 영역은 변이체 Fc 영역이다. 추가 구체예에서, Fc 영역의 아미노산 서열은 서열번호 20과 최소한 65%, 최소한 70%, 최소한 75%, 최소한 80%, 최소한 85%, 최소한 90%, 최소한 95%, 최소한 99%, 또는 100% 동일하다. 한 구체예에서, 첫 번째 폴리펩티드 사슬의 CH1은 VL_A에 직접적으로 융합된다. 다른 구체예에서, 첫 번째 폴리펩티드 사슬의 CH1은 아미노산 또는 올리고펩티드 링커를 통해 VL_A에 연결된다. 추가 구체예에서, 링커는 GSG (서열번호 26) 또는 GGGGSGS (서열번호 28)이다.

[0029] 다른 구체예에서, 결합 단백질은 아미노로부터 카르복실 말단으로 VL_A-CL-VH_B-CH1-Fc를 포함하는 첫 번째 폴리펩티드, 그리고 아미노로부터 카르복실 말단으로 VH_A-CH1-VL_B-CL을 포함하는 두 번째 폴리펩티드 사슬을 포함하고; 여기서 VL은 경쇄 가변 도메인이고, CL은 경쇄 불변 도메인이고, VH는 중쇄 가변 도메인이고, CH1은 중쇄의 첫 번째 불변 도메인이고, A는 첫 번째 에피토프 또는 항원이고, 그리고 B는 두 번째 에피토프 또는 항원이다. 한 구체예에서, Fc 영역은 인간 IgG1이다. 다른 구체예에서, Fc 영역은 변이체 Fc 영역이다. 추가 구체예에서, Fc 영역의 아미노산 서열은 서열번호 20과 최소한 65%, 최소한 70%, 최소한 75%, 최소한 80%, 최소한 85%, 최소한 90%, 최소한 95%, 최소한 99%, 또는 100% 동일하다. 추가 구체예에서, 첫 번째 폴리펩티드 사슬의 CL은 VH_B에 직접적으로 융합된다. 다른 구체예에서, 첫 번째 폴리펩티드 사슬의 CL은 아미노산 또는 올리고펩티드 링커를 통해 VH_B에 연결된다. 추가 구체예에서, 링커는 GSG (서열번호 26) 또는 GGGGSGS (서열번호 28)이다.

[0030] 다른 구체예에서, 결합 단백질은 아미노로부터 카르복실 말단으로 VH_B-CH1-VL_A-CL-Fc를 포함하는 첫 번째 폴리펩티드, 그리고 아미노로부터 카르복실 말단으로 VL_B-CL-VH_A-CH1을 포함하는 두 번째 폴리펩티드 사슬을 포함하고; 여기서 VL은 경쇄 가변 도메인이고, CL은 경쇄 불변 도메인이고, VH는 중쇄 가변 도메인이고, CH1은 중쇄의 첫 번째 불변 도메인이고, A는 첫 번째 에피토프 또는 항원이고, 그리고 B는 두 번째 에피토프 또는 항원이다. 한 구체예에서, Fc 영역은 인간 IgG1이다. 다른 구체예에서, Fc 영역은 변이체 Fc 영역이다. 추가 구체예에서, Fc 영역의 아미노산 서열은 서열번호 20과 최소한 65%, 최소한 70%, 최소한 75%, 최소한 80%, 최소한 85%, 최소한 90%, 최소한 95%, 최소한 99%, 또는 100% 동일하다. 한 구체예에서, 첫 번째 폴리펩티드 사슬의 CH1은 VL_A에 직접적으로 융합된다. 다른 구체예에서, 첫 번째 폴리펩티드 사슬의 CH1은 아미노산 또는 올리고펩티드 링커를 통해 VL_A에 연결된다. 추가 구체예에서, 링커는 GSG (서열번호 26) 또는 GGGGSGS (서열번호 28)이다.

[0031] 본 발명의 결합 단백질은 사이토킨의 쌍에 결합할 수 있다. 가령, 본 발명의 결합 단백질은 IL-1α 및 IL-1β; IL-12 및 IL-18, TNFα 및 IL-23, TNFα 및 IL-13; TNF 및 IL-18; TNF 및 IL-12; TNF 및 IL-1베타; TNF 및 MIF; TNF 및 IL-6, TNF 및 IL-6 수용체, TNF 및 IL-17; IL-17 및 IL-20; IL-17 및 IL-23; TNF 및 IL-15; TNF 및 VEGF; VEGFR 및 EGFR; PDGFR 및 VEGF, IL-13 및 IL-9; IL-13 및 IL-4; IL-13 및 IL-5; IL-13 및 IL-25; IL-13 및 TARC; IL-13 및 MDC; IL-13 및 MIF; IL-13 및 TGF-β; IL-13 및 LHR 효현제; IL-13 및 CL25; IL-13 및 SPRR2a; IL-13 및 SPRR2b; IL-13 및 ADAM8; 그리고 TNFα 및 PGE4, IL-13 및 PED2, TNF 및 PEG2로 이루어진

군으로부터 선택되는 사이토킨의 쌍에 결합할 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 결합 단백질은 IL-17 및 IL-20에 결합할 수 있다. 본 발명의 결합 단백질은 한 구체예에서, IL-17 및 IL-20에 결합할 수 있고, 그리고 항-IL-17 항체 LY 및 항-IL-20 항체 15D2로부터 유래된 가변 중쇄와 경쇄를 포함한다. 한 구체예에서, 본 발명의 결합 단백질은 IL-17 및 TNF에 결합할 수 있다. 본 발명의 결합 단백질은 한 구체예에서, IL-17 및 TNF에 결합할 수 있고, 그리고 항-IL-17 항체 LY 및 항-TNF 항체 골리무맙으로부터 유래된 가변 중쇄와 경쇄를 포함한다.

[0032] 한 구체예에서, 본 발명의 결합 단백질은 IL-17 및 IL-20에 결합하고, 그리고 서열번호 15, 25 및 27로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 구성되거나, 또는 이것으로 구성되는 첫 번째 폴리펩티드; 서열번호 21에 따른 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 구성되거나, 또는 이것으로 구성되는 두 번째 폴리펩티드 사슬; 그리고 서열번호 23에 따른 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 구성되거나, 또는 이것으로 구성되는 세 번째 폴리펩티드 사슬을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 결합 단백질은 IL-27 및 IL-20에 결합하고, 그리고 서열번호 15, 25 및 27로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 구성되거나, 또는 이것으로 구성되는 첫 번째 폴리펩티드 사슬, 그리고 서열번호 29, 30 및 31로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 구성되거나, 또는 이것으로 구성되는 두 번째 폴리펩티드 사슬을 포함한다.

[0033] 한 구체예에서, 본 발명의 결합 단백질은 TNF 및 IL-17에 결합하고, 그리고 서열번호 87에 따른 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 구성되거나, 또는 이것으로 구성되는 첫 번째 폴리펩티드; 서열번호 89에 따른 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 구성되거나, 또는 이것으로 구성되는 두 번째 폴리펩티드 사슬; 그리고 서열번호 91에 따른 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 구성되거나, 또는 이것으로 구성되는 세 번째 폴리펩티드 사슬을 포함한다.

[0034] 다른 구체예에서, 결합 단백질은 CD137 및 CD20, CD137 및 EGFR, CD137 및 Her-2, CD137 및 PD-1, CD137 및 PDL-1, VEGF 및 PD-L1, Lag-3 및 TIM-3, OX40 및 PD-1, TIM-3 및 PD-1, TIM-3 및 PDL-1, EGFR 및 DLL-4, CD138 및 CD20; CD138 및 CD40; CD19 및 CD20; CD20 및 CD3; CD3 및 CD33; CD3 및 CD133; CD47 및 CD20, CD38 및 CD138; CD38 및 CD20; CD20 및 CD22; CD38 및 CD40; CD40 및 CD20; CD-8 및 IL-6; CSPGs 및 RGM A; CTLA-4 및 BTNO2; IGF1 및 IGF2; IGF1/2 및 ErbB2; IGF-1R 및 EGFR; EGFR 및 CD13; IGF-1R 및 ErbB3; EGFR-2 및 IGFR; VEGFR-2 및 Met; VEGF-A 및 안지오포이에틴-2 (Ang-2); IL-12 및 TWEAK; IL-13 및 IL-1베타; PDGFR 및 VEGF, EpCAM 및 CD3, Her2 및 CD3, CD19 및 CD3, EGFR 및 Her3, CD16a 및 CD30, CD30 및 PSMA, EGFR 및 CD3, CEA 및 CD3, TROP-2 및 HSG, TROP-2 및 CD3, MAG 및 RGM A; NgR 및 RGM A; NogoA 및 RGM A; OMGp 및 RGM A; PDL-1 및 CTLA-4; CTLA-4 및 PD-1; PD-1 및 TIM-3; RGM A 및 RGM B; Te38 및 TNF α; TNF α 및 Blys; TNF α 및 CD-22; TNF α 및 CTLA-4 도메인; TNF α 및 GP130; TNF α 및 IL-12p40; 그리고 TNF α 및 RANK 리간드, 인자 IXa, 인자 X로 이루어진 군으로부터 선택되는 표적의 쌍에 결합할 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 결합 단백질은 CD3 및 CD20에 결합할 수 있다. 본 발명의 결합 단백질은 한 구체예에서, CD3 및 CD20에 결합할 수 있고, 그리고 항-CD3 항체 OKT3 및 항-CD20 항체 오파투무맙으로부터 유래된 가변 중쇄와 경쇄를 포함한다. 한 구체예에서, 본 발명의 결합 단백질은 CTLA-4 및 PD-1에 결합할 수 있다. 본 발명의 결합 단백질은 한 구체예에서, CTLA-4 및 PD-1에 결합할 수 있고, 그리고 CTLA-4 항체 이필리무맙 및 PD-1 항체 니볼루맙으로부터 유래된 가변 중쇄와 경쇄를 포함한다.

[0035] 한 구체예에서, 본 발명의 결합 단백질은 CD3 및 CD20에 결합하고, 그리고 서열번호 41 및 48로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 구성되거나, 또는 이것으로 구성되는 첫 번째 폴리펩티드 사슬; 서열번호 44에 따른 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 구성되거나, 또는 이것으로 구성되는 두 번째 폴리펩티드 사슬; 그리고 서열번호 46에 따른 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 구성되거나, 또는 이것으로 구성되는 세 번째 폴리펩티드 사슬을 포함한다.

[0036] 한 구체예에서, 본 발명의 결합 단백질은 CTLA-4 및 PD-1에 결합하고, 그리고 서열번호 92에 따른 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 구성되거나, 또는 이것으로 구성되는 첫 번째 폴리펩티드 사슬; 서열번호 95에 따른 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 구성되거나, 또는 이것으로 구성되는 두 번째 폴리펩티드 사슬; 그리고 서열번호 97에 따른 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 구성되거나, 또는 이것으로 구성되는 세 번째 폴리펩티드 사슬을 포함한다.

[0037] 한 구체예에서, 본원에서 제공된 결합 단백질은 CTLA-4 상에서 하나 또는 그 이상의 에피토프에 결합할 수 있다. 한 구체예에서, 본원에서 제공된 결합 단백질은 PD-1 상에서 하나 또는 그 이상의 에피토프에 결합할 수 있다.

[0038] 한 구체예에서, 결합 단백질은 T 세포 상에서 하나 또는 그 이상의 면역 체크포인트 단백질, 예를 들면, 예로서 TIM-3, Lag3, ICOS, BTLA, CD160, 2B4, KIR, CD137, CD27, OX40, CD40L, 그리고 A2aR에서 하나 또는 그 이상의 에피토프에 결합할 수 있다. 다른 구체예에서, 결합 단백질은 면역 체크포인트 경로와 관련되는 하나 또는 그 이상의 종양 세포 표면 단백질, 예를 들면, 예로서 PD-L1, PD-L2, Galectin9, HVEM, CD48, B7-1, B7-2, ICOSL, B7-H3, B7-H4, CD137L, OX40L, CD70, 그리고 CD40에서 하나 또는 그 이상의 에피토프에 결합할 수 있다.

[0039] 한 양상에서, 본 발명은 본원에서 설명된 결합 단백질을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 한 구체예에서, 전술한 청구항 중에서 어느 한 항의 결합 단백질 및 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물이 본원에서 제공된다.

[0040] 다른 양상에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에서 염증성 질환, 자가면역 질환, 신경변성 질환, 암, 패혈증, 또는 척수 손상을 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다. 한 구체예에서, 상기 방법은 본원에서 제공된 결합 단백질 중에서 하나 또는 그 이상, 또는 본원에서 제공된 결합 단백질 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 하나 또는 그 이상의 약학적 조성물의 효과량을 개체에 투여하는 것을 포함한다. 염증성 질환, 자가면역 질환, 신경변성 질환, 암, 또는 척수 손상의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조에서 본원에서 설명된 결합 단백질의 용도 역시 본원에서 제공된다. 한 구체예에서, 염증성 질환, 자가면역 질환, 또는 신경변성 질환은 천식, 류마티스성 관절염, 전신성 홍반성 루푸스, 다발성 경화증, 알츠하이머병, 또는 파킨슨병으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0041] 한 구체예에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에서 류마티스성 관절염, 건선, 골다공증, 뇌졸중, 간 질환, 또는 구강암을 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에서 설명된 FIT-Ig 결합 단백질을 개체에 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 결합 단백질은 IL-17 및 IL-20에 결합할 수 있다. 추가 구체예에서, FIT-Ig 결합 단백질은 서열번호 15, 25 및 27에서 선택되는 아미노산 서열; 그리고 서열번호 21에 따른 아미노산 서열; 그리고 서열번호 23에 따른 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, FIT-Ig 결합 단백질은 서열번호 15, 25 및 27에서 선택되는 아미노산 서열; 그리고 서열번호 29, 30 및 31에서 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0042] 한 구체예에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에서 B 세포 암을 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 FIT-Ig 결합 단백질을 개체에 투여하는 것을 포함하고, 여기서 FIT-Ig 결합 단백질은 하나 또는 그 이상의 B 세포 항원에 결합할 수 있다. 추가 구체예에서, FIT-Ig 결합 단백질은 CD20에 결합할 수 있다. 추가 구체예에서, FIT-Ig 결합 단백질은 CD20 및 다른 항원에 결합할 수 있다. 추가 구체예에서, 결합 단백질은 CD3 및 CD20에 결합할 수 있다. 추가 구체예에서, 암은 B 세포 암이다. 또 다른 구체예에서, B 세포 암은 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종 [NHL], 전구체 B 세포 림프모구성 백혈병/림프종, 성숙 B 세포 신생물, B 세포 만성 림프성 백혈병/작은 림프구성 림프종, B 세포 전림프구성 백혈병, 림프구형질세포성 림프종, 외투 세포 림프종, 소포 림프종, 피부 난포 센터 림프종, 변연대 B 세포 림프종, 모양 세포성 백혈병, 미만성 큰 B 세포 림프종, 버킷 림프종, 형질세포종, 형질 세포 골수종, 이식후 림프세포증식성 질환, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 그리고 역형성 큰-세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에서 B 세포 암을 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 FIT-Ig 결합 단백질을 개체에 투여하는 것을 포함하고, 여기서 FIT-Ig 결합 단백질은 서열번호 41 또는 48에 따른 아미노산 서열; 서열번호 44에 따른 아미노산 서열, 그리고 서열번호 46에 따른 아미노산 서열을 포함한다.

[0043] 한 구체예에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에서 자가면역 질환, 염증성 질환, 또는 감염을 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에서 설명된 FIT-Ig 결합 단백질을 개체에 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 결합 단백질은 TNF 및 IL-17에 결합할 수 있다. 추가 구체예에서, FIT-Ig 결합 단백질은 서열번호 87, 89 및 91에 따른 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 자가면역 또는 염증성 질환을 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 FIT-Ig 결합 단백질을 개체에 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 결합 단백질은 TNF 및 IL-17에 결합할 수 있고, 그리고 여기서 자가면역 또는 염증성 질환은 크론병, 건선 (플라크 건선 포함), 관절염 (류마티스성 관절염, 건선성 관절염, 골관절염, 또는 소아성 특발성 관절염 포함), 다발성 경화증, 강직성 척추염, 척추 관절병증, 전신성 홍반성 루푸스, 포도막염, 패혈증, 신경변성 질환, 뉴런 재생, 척수 손상, 원발성 및 전이성 암, 호흡기 장애; 천식; 알레르기성 및 비알레르기성 천식; 감염으로 인한 천식; 호흡기 합포체 바이러스 (RSV)로 감염으로 인한 천식; 만성 폐쇄성 폐질환 (COPD); 기도 염증을 수반하는 상태; 호산구증가증; 섬유증 및 과잉 점액 생산; 낭포성 섬유증; 폐섬유증; 아토피성 장애; 아토피성 피부염; 두드러기; 습진; 알레르기성 비염; 알레르기성 위장염; 피부의 염증성 및/또는 자가면역 상태; 위장관 장기의 염증성 및/또는 자가면역 상태; 염증성 장 질환 (IBD); 궤양성 대장염; 간의 염증성 및/또는 자가면

역 상태; 간경변증; 간 섬유증; 그리고 B형 및/또는 C형 간염 바이러스에 의해 유발된 간 섬유증; 경피증으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 구체예에서, 다른 구체예에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에서 암을 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에서 설명된 FIT-Ig 결합 단백질을 개체에 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 결합 단백질은 TNF 및 IL-17에 결합할 수 있다. 추가 구체예에서, 암은 간세포 암종; 교모세포종; 림프종; 또는 호지킨 림프종이다. 다른 구체예에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에서 감염을 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에서 설명된 FIT-Ig 결합 단백질을 개체에 투여하는 것을 포함하고, 여기서 감염은 바이러스 감염, 세균 감염, 기생충성 감염, HTLV-1 감염이다. 한 구체예에서, 본 발명은 보호 유형 1 면역 반응의 발현의 억제, 그리고 예방접종 동안 보호 유형 1 면역 반응의 발현의 억제를 위한 방법을 제공한다.

[0044] 한 구체예에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에서 류마티스성 관절염을 치료하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 FIT-Ig 결합 단백질을 개체에 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 결합 단백질은 서열번호 87, 89 및 91에 따른 서열을 포함한다.

[0045] 한 구체예에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에서 암을 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에서 설명된 FIT-Ig 결합 단백질을 개체에 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 결합 단백질은 CTLA-4 및 PD-1에 결합할 수 있다. 추가 구체예에서, FIT-Ig 결합 단백질은 서열번호 92, 95 및 97을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에서 암을 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공하고, 여기서 상기 결합 단백질은 CTLA-4 및 PD-1에 결합할 수 있고, 그리고 여기서 암은 전형적으로 면역요법에 반응성인 암이다. 다른 구체예에서, 암은 면역요법과 연관되지 않은 암이다. 다른 구체예에서, 암은 난치성 또는 재발하는 악성인 암이다. 다른 구체예에서, 결합 단백질은 종양 세포의 성장 또는 생존을 저해한다. 다른 구체예에서, 암은 흑색종 (가령, 전이성 악성 흑색종), 신장암 (가령, 투명 세포 암종), 전립선암 (가령, 호르몬 난치성 전립선 선암종), 췌장 선암종, 유방암, 결장암, 폐암 (가령, 비소세포 폐암), 식도암, 두경부의 편평상피 세포 암종, 간암, 난소암, 자궁경부암, 갑상선암, 교모세포종, 신경교종, 백혈병, 림프종, 그리고 다른 신생물 악성으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0046] 한 구체예에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에서 흑색종을 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에서 설명된 FIT-Ig 결합 단백질을 개체에 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 결합 단백질은 CTLA-4 및 PD-1에 결합할 수 있다. 추가 구체예에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에서 흑색종을 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공하고, 여기서 상기 방법은 서열번호 92, 95 및 97에 따른 아미노산 서열을 포함하는 FIT-Ig 결합 단백질을 개체에 투여하는 것을 포함한다.

[0047] 다른 구체예에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체에서 감염 또는 감염성 질환을 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에서 설명된 FIT-Ig 결합 단백질을 개체에 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 결합 단백질은 CTLA-4 및 PD-1에 결합할 수 있다. 한 구체예에서, FIT-Ig 결합 단백질은 병원체, 독소, 그리고 자가항원에 대한 면역 반응을 자극하기 위해 단독으로 또는 백신과 합동으로 투여된다. 이런 이유로, 한 구체예에서, 본원에서 제공된 결합 단백질은 인간에 감염성인 바이러스, 예를 들면, 하지만 제한 없이, 인간 면역결핍 바이러스, 간염 바이러스 부류 A, B와 C, 엡스타인 바르 바이러스, 인간 시토메갈로바이러스, 인간 유두종 바이러스, 헤르페스 바이러스, 세균, 진균 기생충, 또는 다른 병원체에 대한 면역 반응을 자극하는데 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0048] **도면의 간단한 설명**

도면1A는 3가지 구조체, 예를 들면, FIT1-Ig, FIT2-Ig, 그리고 FIT3-Ig로 구성되는 FIT-Ig의 구조를 보여준다. **도면 1B**는 이런 FIT1-Ig를 제조하는데 이용된 3가지 구조체를 보여준다.

도면 2A는 2개의 구조체로 구성되는 FIT-Ig의 기본 구조를 보여준다. **도면 2B**는 이런 FIT-Ig를 제조하는데 이용된 2가지 구조체를 보여준다.

도면 3은 Biacore에 의해 계측될 때, FIT1-Ig의 이중-특이적 항원 결합을 제공한다. 도면 3의 위쪽 패널은 FIT1-Ig가 먼저 IL-17, 그 이후에 IL-20에 의해 포화된 Biacore 결합 검정의 결과를 보여준다. 도면 3의 아래쪽 패널은 FIT1-Ig가 먼저 IL-20, 그 이후에 IL-17에 의해 포화된 Biacore 검정의 결과를 보여준다.

도면 4는 PEG-유도된 침전에 의해 계측될 때, 다양한 pH에서 항-IL-17/IL-20 FIT Ig 또는 단일클론 항체 리툭시

맙의 용해도를 보여준다.

도면 5는 DG44 (5A와 5B) 및 CHO-S (5C와 5D) 시스템 둘 모두에서 안정된 CHO 세포주 개발의 안정성을 보여준다.

도면 6은 ELISA에 의해 사정될 때, FIT10-Ig 또는 부모 항체 이필리무맙 및 니볼루맙에 의한 CTLA-4 (6A) 또는 PD-1 (도면 6B)에 결합을 보여준다.

도면 7은 CTLA-4 및 PD-1 둘 모두에 대하여 FIT10-Ig의 복수 결합 연구를 보여준다. CTLA-4, 그 이후에 PD-1에 결합; 그리고 PD-1, 그 이후에 CTLA-4에 결합 둘 모두 도면 7에서 지시된 바와 같이 도시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] **상세한 설명**

[0050] 본 발명은 다가 및 다중특이적 결합 단백질, 이들 결합 단백질을 만드는 방법, 그리고 급성과 만성 염증성 질환과 장애, 암 및 다른 질환의 예방 및/또는 치료에서 이들의 용도에 관계한다. 본 발명은 2개 또는 그 이상의 항원에 결합할 수 있는 다가 및/또는 다중특이적 결합 단백질과 관련된다. 구체적으로, 본 발명은 Fabs-인-탠덤 면역글로불린 (FIT-Ig), 그리고 이들의 약학적 조성물뿐만 아니라 이런 FIT-Ig를 만들기 위한 핵산, 재조합 발현 벡터 및 숙주 세포에 관계한다. 생체내 또는 시험관내에서 특이적 항원을 검출하기 위해 본 발명의 FIT-Ig를 이용하는 방법 역시 본 발명에 의해 포괄된다.

[0051] 본원에서 제공된 결합 단백질의 신규한 패밀리는 예로서, 높은 친화성으로 2개 또는 그 이상의 항원에 결합할 수 있다. 구체적으로, 본 발명은 2가지 부모 단일클론 항체: 항원 a에 결합하는 mAb A; 그리고 항원 b에 결합하는 mAb B를 이용하여 이중특이적 결합 단백질을 작제하는 접근법을 제공한다.

[0052] 한 양상에서, 본 발명은 첫 번째 항원 또는 에피토프에 특정한 가변 경쇄, 첫 번째 경쇄 불변 도메인, 두 번째 항원 또는 에피토프에 특정한 가변 중쇄, 첫 번째 중쇄 CH1, 첫 번째 항원 또는 에피토프에 특정한 가변 중쇄, 두 번째 중쇄 CH1, 두 번째 항원 또는 에피토프에 특정한 가변 중쇄, 그리고 두 번째 경쇄 불변 도메인을 포함하는 결합 단백질을 제공한다. 한 구체예에서, 결합 단백질은 Fc 영역을 더욱 포함한다. 결합 단백질은 결합 단백질의 성분 중에서 2개 또는 그 이상을 연결하는 하나 또는 그 이상의 아미노산 또는 폴리펩티드 링커를 더욱 포함할 수 있다. 가령, 결합 단백질은 경쇄 가변 영역을 경쇄 불변 영역에 연결하는 폴리펩티드 링커를 포함할 수 있다.

[0053] 한 구체예에서, 본 발명은 VL_A-CL-(X1)n-VH_B-CH1-(X2)n을 포함하는 폴리펩티드 사슬을 포함하는 결합 단백질을 제공하고, 여기서 VLA는 mAb A의 경쇄 가변 도메인이고, CL은 경쇄 불변 도메인이고, X1은 아미노산 또는 올리고펩티드 링커를 나타내고, VH_B는 mAb B의 중쇄 가변 도메인이고, CH1은 중쇄의 첫 번째 불변 도메인이고, X2는 Fc 영역 또는 상이한 이합체화 도메인을 나타내고, 그리고 n은 0 또는 1이다.

[0054] 한 구체예에서, 본 발명은 3개의 상이한 폴리펩티드 사슬을 포함하는 결합 단백질 (**도면 1**)을 제공하고, 여기서 첫 번째 폴리펩티드 사슬 (구조체 #1)은 VL_A-CL-(X1)n-VH_B-CH1-(X2)n을 포함하고, 여기서 VLA는 mAb A의 경쇄 가변 도메인이고, CL은 경쇄 불변 도메인이고, X1은 아미노산 또는 올리고펩티드 링커를 나타내고, VH_B는 mAb B의 중쇄 가변 도메인이고, CH1은 중쇄의 첫 번째 불변 도메인이고, X2는 Fc 영역 또는 상이한 이합체화 도메인을 나타내고, 그리고 n은 0 또는 1이다. 두 번째 폴리펩티드 사슬 (구조체 #2)은 VH_A-CH1을 포함하고, 여기서 VH_A는 mAb A의 중쇄 가변 도메인이고, 그리고 CH1은 중쇄의 첫 번째 불변 도메인이다. 세 번째 폴리펩티드 사슬 (구조체 #3)은 VL_B-CL을 포함하고, 여기서 VL_B는 mAb B의 경쇄 가변 도메인이고, 그리고 CL은 경쇄의 불변 도메인이다.

[0055] 다른 구체예에서, 본 발명은 가변 도메인의 순서가 역전되는 점을 제외하고, 이전 구체예와 유사한 전반적인 분자 설계를 갖는 3개의 상이한 폴리펩티드 사슬을 포함하는 결합 단백질을 제공한다. 상기 구체예에서 첫 번째 폴리펩티드 사슬은 VH_B-CH1-(X1)n-VL_A-CL-(X2)n을 포함하고, 여기서 VL_A는 mAb A의 경쇄 가변 도메인이고, CL은 경쇄 불변 도메인이고, X1은 아미노산 또는 올리고펩티드 링커를 나타내고, VH_B는 mAb B의 중쇄 가변 도메인이고, CH1은 중쇄의 첫 번째 불변 도메인이고, X2는 Fc 영역 또는 상이한 이합체화 도메인을 나타내고, 그리고 n은 0 또는 1이다. 두 번째 폴리펩티드 사슬은 VH_A-CH1을 포함하고, 여기서 VH_A는 mAb A의 중쇄 가변 도메인이고,

그리고 CH1은 중쇄의 첫 번째 불변 도메인이다. 세 번째 폴리펩티드 사슬은 VL_B-CL을 포함하고, 여기서 VL_B는 mAb B의 경쇄 가변 도메인이고, 그리고 CL은 경쇄의 불변 도메인이다.

[0056] 다른 구체예에서, 본 발명은 2개의 상이한 폴리펩티드 사슬을 포함하는 결합 단백질 (**도면 2**)을 제공하고, 여기서 첫 번째 폴리펩티드 사슬 (구조체 #1)은 VL_A-CL-(X1)n-VH_B-CH1-(X2)n을 포함하고, 여기서 VL_A는 mAb A의 경쇄 가변 도메인이고, CL은 경쇄 불변 도메인이고, X1은 아미노산 또는 올리고펩티드 링커를 나타내고, VH_B는 mAb B의 중쇄 가변 도메인이고, CH1은 중쇄의 첫 번째 불변 도메인이고, X2는 Fc 영역 또는 상이한 이합체화 도메인을 나타내고, 그리고 n은 0 또는 1이다. 두 번째 폴리펩티드 사슬 (구조체 #4)은 VH_A-CH1-(X3)n-VL_B-CL을 포함하고, 여기서 VH_A는 mAb A의 중쇄 가변 도메인이고, CH1은 중쇄의 첫 번째 불변 도메인이고, X3은 불변 도메인이 아닌 아미노산 또는 폴리펩티드를 나타내고, n은 0 또는 1이고, VL_B는 mAb B의 경쇄 가변 도메인이고, 그리고 CL은 경쇄의 불변 도메인이다.

[0057] 다른 구체예에서, 본 발명은 가변 도메인의 순서가 역전되는 점을 제외하고, 이전 구체예와 유사한 전반적인 분자 설계를 갖는 2개 폴리펩티드 사슬을 포함하는 결합 단백질을 제공한다. 이러한 구체예에서, 첫 번째 폴리펩티드 사슬은 VH_B-CH1-(X1)n-VL_A-CL-(X2)n을 포함하고, 여기서 VL_A는 mAb A의 경쇄 가변 도메인이고, CL은 경쇄 불변 도메인이고, X1은 아미노산 또는 올리고펩티드 링커를 나타내고, VH_B는 mAb B의 중쇄 가변 도메인이고, CH1은 중쇄의 첫 번째 불변 도메인이고, X2는 Fc 영역 또는 상이한 이합체화 도메인을 나타내고, 그리고 n은 0 또는 1이다. 두 번째 폴리펩티드 사슬은 VL_B-CL-(X3)n-VH_A-CH1을 포함하고, 여기서 VH_A는 mAb A의 중쇄 가변 도메인이고, CH1은 중쇄의 첫 번째 불변 도메인이고, X3은 아미노산 또는 올리고펩티드 링커를 나타내고, n은 0 또는 1이고, VL_B는 mAb B의 경쇄 가변 도메인이고, 그리고 CL은 경쇄의 불변 도메인이다.

[0058] 한 구체예에서, 결합 단백질에서 VH와 VL 도메인은 뮤린 중쇄/경쇄 가변 도메인, 완전 인간 중쇄/경쇄 가변 도메인, CDR 합체된 중쇄/경쇄 가변 도메인, 인간화 중쇄/경쇄 가변 도메인, 그리고 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직한 구체예에서 VH_A/VL_A 및 VH_B/VL_B는 동일한 항원에 결합할 수 있다. 다른 구체예에서 VH_A/VL_A 및 VH_B/VL_B는 상이한 항원에 결합할 수 있다.

[0059] 한 구체예에서, 첫 번째 폴리펩티드 사슬은 VL_A-CL-VH_B-CH1-Fc를 포함하고, 그리고 첫 번째 폴리펩티드 사슬의 CL 및 VH_B는 직접적으로 함께 융합된다. 다른 구체예에서, CL 및 VH_B는 아미노산 또는 올리고펩티드 링커에 의해 연결된다. 다른 구체예에서, 첫 번째 폴리펩티드 사슬은 VH_B-CH1-VL_A-CL-Fc를 포함하고, 그리고 CH1 및 VL_A는 직접적으로 함께 융합된다. 다른 구체예에서, CH1 및 VL_A는 아미노산 또는 올리고펩티드 링커에 의해 연결된다. 추가 구체예에서, 올리고- 또는 폴리펩티드 링커는 유연성을 제공하는 임의의 합리적인 서열의 1개 또는 그 이상의 아미노산을 포함한다. 바람직하게는, 링커는 G,GS, SG, GGS, GSG, SGG, GGG, GGGS, SGGG, GGGGS, GGGGSGS, GGGGSGS, GGGGSGGS, GGGGSGGGGS, GGGGSGGGGSGGGGS, AKTTPKLEEGEFSEAR, AKTTPKLEEGEFSEARV, AKTTPKLGG, SAKTTPKLGG, AKTTPKLEEGEFSEARV, SAKTTP, SAKTTPKLGG, RADAAP, RADAAPTVS, RADAAAAGGPGS, RADAAAA$(G_4S)_4$, SAKTTP, SAKTTPKLGG, SAKTTPKLEEGEFSEARV, ADAAP, ADAAPTVSIFPP, TVAAP, TVAAPSVFIFPP, QPKAAP, QPKAAPSVTLFPP, AKTTPP, AKTTPPSVTPLAP, AKTTAP, AKTTAPSVYPLAP, ASTKGP, ASTKGPSVFPLAP, GENKVEYAPALMALS, GPAKELTPLKEAKVS, 그리고 GHEAAAVMQVQYPAS로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 링커의 아미노산 서열은 서열번호 26, 28, 그리고 49-86으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 한 구체예에서, 링커는 GSG (서열번호 26) 또는 GGGGSGS (서열번호 28)이다. 링커는 또한, 생체내 개열가능한 펩티드 링커, 프로테아제 (가령, MMPs) 민감한 링커, 기존 문헌 (Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals: Applications and Challenges, Stefan R. Schmidt에 의해 편집됨)에서 설명된 바와 같이 환원 등에 의해 개열될 수 있는 이황화 결합-기초된 링커, 또는 당분야에서 공지된 임의의 개열가능한 링커일 수 있다. 이런 개열가능한 링커는 조직/세포 침투와 분포를 향상시키고, 표적에 결합을 증강하고, 잠재적 부작용을 감소시키고, 그리고 2가지 상이한 Fab 영역의 생체내 기능적 및 물리적 반감기를 조정하기 위해, 끝 Fab를 생체내에서 다양한 목적으로 방출하는데 이용될 수 있다. 한 구체예에서, 결합 단백질은 Fc 영역을 포함한다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "Fc 영역"은 IgG 중쇄의 C 말단 영역을 지칭한다. 인간 IgGl Fc 영역을 내포하는 아미노산 서열의 실례는 서열번호 20이다. IgG의 Fc 영역은 2개의 불변 도메인, CH2 및 CH3을 포함한다.

[0060] 한 구체예에서, Fc 영역은 변이체 Fc 영역이다. 한 구체예에서, 변이체 Fc 영역은 부모 Fc 영역에 비하여, 하나

또는 그 이상의 아미노산 변형, 예를 들면, 치환, 결실, 또는 삽입을 갖는다. 추가 구체예에서, Fc 영역의 아미노산 변형은 부모 Fc 영역 활성에 비하여 작동체 기능 활성을 변경한다. 가령, 한 구체예에서, 변이체 Fc 영역은 변경된 (즉, 증가된 또는 감소된) 항체-의존성 세포독성 (ADCC), 보체 매개된 세포독성 (CDC), 식균작용, 옵소닌화, 또는 세포 결합을 가질 수 있다. 다른 구체예에서, Fc 영역의 아미노산 변형은 부모 Fc 영역에 비하여 FcγR에 대한 변이체 Fc 영역의 친화성을 변경 (즉, 증가 또는 감소)할 수 있다. 가령, 변이체 Fc 영역은 FcγRI, FcγRII, FcγRIII에 대한 친화성을 변경할 수 있다.

[0061] 한 바람직한 구체예에서, 본원에서 제공된 결합 단백질은 하나 또는 그 이상의 표적에 결합할 수 있다. 한 구체예에서, 표적은 사이토킨, 세포 표면 단백질, 효소 및 수용체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, 결합 단백질은 하나 또는 그 이상의 표적의 생물학적 기능을 조정할 수 있다. 더욱 바람직하게는, 결합 단백질은 하나 또는 그 이상의 표적을 중화시킬 수 있다.

[0062] 한 구체예에서, 본 발명의 결합 단백질은 림포카인, 모노카인, 그리고 폴리펩티드 호르몬으로 이루어진 군으로부터 선택되는 사이토킨에 결합할 수 있다. 추가 구체예에서, 결합 단백질은 IL-1α 및 IL-1β; IL-12 및 IL-18, TNFα 및 IL-23, TNFα 및 IL-13; TNF 및 IL-18; TNF 및 IL-12; TNF 및 IL-1베타; TNF 및 MIF; TNF 및 IL-6, TNF 및 IL-6 수용체, TNF 및 IL-17; IL-17 및 IL-20; IL-17 및 IL-23; TNF 및 IL-15; TNF 및 VEGF; VEGFR 및 EGFR; PDGFR 및 VEGF, IL-13 및 IL-9; IL-13 및 IL-4; IL-13 및 IL-5; IL-13 및 IL-25; IL-13 및 TARC; IL-13 및 MDC; IL-13 및 MIF; IL-13 및 TGF-β; IL-13 및 LHR 효현제; IL-13 및 CL25; IL-13 및 SPRR2a; IL-13 및 SPRR2b; IL-13 및 ADAM8; 그리고 TNFα 및 PGE4, IL-13 및 PED2, TNF 및 PEG2로 이루어진 군으로부터 선택되는 사이토킨의 쌍에 결합할 수 있다.

[0063] 다른 구체예에서, 본 발명의 결합 단백질은 CD137 및 CD20, CD137 및 EGFR, CD137 및 Her-2, CD137 및 PD-1, CD137 및 PDL-1, VEGF 및 PD-L1, Lag-3 및 TIM-3, OX40 및 PD-1, TIM-3 및 PD-1, TIM-3 및 PDL-1, EGFR 및 DLL-4, VEGF 및 EGFR, HGF 및 VEGF, VEGF 및 VEGF (동일한 또는 상이한 에피토프), VEGF 및 Ang2, EGFR 및 cMet, PDGF 및 VEGF, VEGF 및 DLL-4, OX40 및 PD-L1, ICOS 및 PD-1, ICOS 및 PD-L1, Lag-3 및 PD-1, Lag-3 및 PD-L1, Lag-3 및 CTLA-4, ICOS 및 CTLA-4, CD138 및 CD20; CD138 및 CD40; CD19 및 CD20; CD20 및 CD3; CD3 및 CD33; CD3 및 CD133; CD38 & CD138; CD38 및 CD20; CD20 및 CD22; CD38 및 CD40; CD40 및 CD20; CD47 및 CD20, CD-8 및 IL-6; CSPGs 및 RGM A; CTLA-4 및 BTNO2; CTLA-4 및 PD-1; IGF1 및 IGF2; IGF1/2 및 ErbB2; IGF-1R 및 EGFR; EGFR 및 CD13; IGF-1R 및 ErbB3; EGFR-2 및 IGFR; Her2 및 Her2 (동일한 또는 상이한 에피토프); 인자 IXa, 인자 X, VEGFR-2 및 Met; VEGF-A 및 안지오포이에틴-2 (Ang-2); IL-12 및 TWEAK; IL-13 및 IL-1베타 ; MAG 및 RGM A; NgR 및 RGM A; NogoA 및 RGM A; OMGp 및 RGM A; PDL-1 및 CTLA-4; PD-1 및 TIM-3; RGM A 및 RGM B; Te38 및 TNFα; TNFα 및 Blys; TNFα 및 CD-22; TNFα 및 CTLA-4 도메인; TNFα 및 GP130; TNFα 및 IL-12p40; 그리고 TNFα 및 RANK 리간드로 이루어진 군으로부터 선택되는 표적의 쌍에 결합할 수 있다.

[0064] 한 구체예에서, 결합 단백질은 인간 IL-17 및 인간 IL-20에 결합할 수 있다. 추가 구체예에서, 결합 단백질은 인간 IL-17 및 인간 IL-20에 결합할 수 있고, 그리고 서열번호 15, 25 및 27로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열과 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 100% 동일한 FIT-Ig 폴리펩티드 사슬 #1 서열; 서열번호 21과 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 100% 동일한 폴리펩티드 사슬 #2 서열; 그리고 서열번호 23과 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 100% 동일한 폴리펩티드 사슬 #3 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, 결합 단백질은 인간 IL-17 및 인간 IL-20에 결합할 수 있고, 그리고 서열번호 15, 25 및 27로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열과 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 100% 동일한 FIT-Ig 폴리펩티드 사슬 #1 서열; 그리고 서열번호 29, 30 및 31로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열과 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 100% 동일한 폴리펩티드 사슬 #4를 포함한다.

[0065] 한 구체예에서, 결합 단백질은 인간 CD3 및 인간 CD20에 결합할 수 있다. 추가 구체예에서, 결합 단백질은 서열번호 41 및 48로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열과 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 100% 동일한 FIT-Ig 폴리펩티드 사슬 #1 서열; 서열번호 44와 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 100% 동일한 폴리펩티드 사슬 #2 서열; 그리고 서열번호 46과 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 100% 동일한 폴리펩티드 사슬 #3 서열을 포함한다.

[0066] 한 구체예에서, 결합 단백질은 인간 IL-17 및 인간 TNF에 결합할 수 있다. 추가 구체예에서, 결합 단백질은 인간 IL-17 및 인간 TNF에 결합할 수 있고, 그리고 서열번호 87과 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약

90%, 약 95%, 약 99%, 또는 100% 동일한 FIT-Ig 폴리펩티드 사슬 #1 서열; 서열번호 89와 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 100% 동일한 폴리펩티드 사슬 #2 서열; 그리고 서열번호 91과 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 100% 동일한 폴리펩티드 사슬 #3 서열을 포함한다.

[0067] 한 구체예에서, 결합 단백질은 인간 CTLA-4 및 인간 PD-1에 결합할 수 있다. 추가 구체예에서, 결합 단백질은 인간 CTLA-4 및 인간 PD-1에 결합할 수 있고, 그리고 서열번호 92와 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 100% 동일한 FIT-Ig 폴리펩티드 사슬 #1 서열; 서열번호 95와 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 100% 동일한 폴리펩티드 사슬 #2 서열; 그리고 서열번호 97과 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 100% 동일한 폴리펩티드 사슬 #3 서열을 포함한다.

[0068] 다른 구체예에서, 본 발명의 결합 단백질은 BMP1, BMP2, BMP3B (GDF10), BMP4, BMP6, BMP8, CSF1 (M-CSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), EPO, FGF1 (aFGF), FGF2 (bFGF), FGF3 (int-2), FGF4 (HST), FGF5, FGF6 (HST-2), FGF7 (KGF), FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF12B, FGF14, FGF16, FGF17, FGF19, FGF20, FGF21, FGF23, IGF1, IGF2, IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNB1, IFNG, IFNW1, FIL1, FIL1 (엡실론), FIL1 (제타), IL1A, IL1B, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12A, IL12B, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL17B, IL18, IL19, IL20, IL22, IL23, IL24, IL25, IL26, IL27, IL28A, IL28B, IL29, IL30, PDGFA, FGER1, FGFR2, FGFR3, EGFR, ROR1, 2B4, KIR, CD137, CD27, OX40, CD40L, A2aR, CD48, B7-1, B7-2, ICOSL, B7-H3, B7-H4, CD137L, OX40L, CD70, CD40, PDGFB, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, LTA (TNF-b), LTB, TNF (TNF-a), TNFSF4 (OX40 리간드), TNFSF5 (CD40 리간드), TNFSF6 (FasL), TNFSF7 (CD27 리간드), TNFSF8 (CD30 리간드), TNFSF9 (4-1BB 리간드), TNFSF10 (TRAIL), TNFSF11 (TRANCE), TNFSF12 (APO3L), TNFSF13 (에이프릴), TNFSF13B, TNFSF14 (HVEM-L), TNFSF15 (VEGI), TNFSF18, FIGF (VEGFD), VEGF, VEGFB, VEGFC, IL1R1, IL1R2, IL1RL1, IL1RL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3RA, IL4R, IL5RA, IL6R, IL7R, IL8RA, IL8RB, IL9R, IL10RA, IL10RB, IL11RA, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL15RA, IL17R, IL18R1, IL20RA, IL21R, IL22R, IL1HY1, IL1RAP, IL1RAPL1, IL1RAPL2, IL1RN, IL6ST, IL18BP, IL18RAP, IL22RA2, AIF1, HGF, LEP (렙틴), PTN, 그리고 THPO로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 또는 2개의 사이토킨, 사이토킨-관련된 단백질, 그리고 사이토킨 수용체에 결합할 수 있다.

[0069] 본 발명의 결합 단백질은 CCL1 (I-309), CCL2 (MCP -1 / MCAF), CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (mcp-2), CCL11 (에오탁신), CCL13 (MCP-4), CCL15 (MIP-1d), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19 (MIP-3b), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (SLC / 엑소더스-2), CCL22 (MDC / STC-1), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2 / 에오탁신-2), CCL25 (TECK), CCL26 (에오탁신-3), CCL27 (CTACK / ILC), CCL28, CXCL1 (GRO1), CXCL2 (GRO2), CXCL3 (GRO3), CXCL5 (ENA-78), CXCL6 (GCP-2), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP 10), CXCL11 (I-TAC), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL16, PF4 (CXCL4), PPBP (CXCL7), CX3CL1 (SCYD1), SCYE1, XCL1 (림포탁틴), XCL2 (SCM-1b), BLR1 (MDR15), CCBP2 (D6 / JAB61), CCR1 (CKR1 / HM145), CCR2 (mcp-1RB / RA), CCR3 (CKR3 / CMKBR3), CCR4, CCR5 (CMKBR5 / ChemR13), CCR6 (CMKBR6 / CKR-L3 / STRL22 / DRY6), CCR7 (CKR7 / EBI1), CCR8 (CMKBR8 / TER1 / CKR-L1), CCR9 (GPR-9-6), CCRL1 (VSHK1), CCRL2 (L-CCR), XCR1 (GPR5 / CCXCR1), CMKLR1, CMKOR1 (RDC1), CX3CR1 (V28), CXCR4, GPR2 (CCR10), GPR31, GPR81 (FKSG80), CXCR3 (GPR9/CKR-L2), CXCR6 (TYMSTR /STRL33 / Bonzo), HM74, IL8RA (IL8Ra), IL8RB (IL8Rb), LTB4R (GPR16), TCP10, CKLFSF2, CKLFSF3, CKLFSF4, CKLFSF5, CKLFSF6, CKLFSF7, CKLFSF8, BDNF, C5R1, CSF3, GRCC10 (C10), EPO, FY (DARC), GDF5, HIF1A, IL8, PRL, RGS3, RGS13, SDF2, SLIT2, TLR2, TLR4, TREM1, TREM2, 그리고 VHL로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 케모킨, 케모킨 수용체, 그리고 케모킨-관련된 단백질에 결합할 수 있다.

[0070] 다른 구체예에서, 본 발명의 결합 단백질은 세포 표면 단백질, 예를 들면, 예로서, 인테그린에 결합할 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 결합 단백질은 키나아제 및 프로테아제로 이루어진 군으로부터 선택되는 효소에 결합할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 결합 단백질은 림포카인 수용체, 모노카인 수용체, 그리고 폴리펩티드 호르몬 수용체로 이루어진 군으로부터 선택되는 수용체에 결합할 수 있다.

[0071] 한 구체예에서, 결합 단백질은 다가이다. 다른 구체예에서, 결합 단백질은 다중특이적이다. 앞서 설명된 다가 및 또는 다중특이적 결합 단백질은 특히, 치료적 관점으로부터 바람직한 성질을 갖는다. 가령, 다가 및 또는 다중특이적 결합 단백질은 (1) 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 의해 이가 항체보다 빨리 내재화 (및/또는 이화)될 수 있고; (2) 효현제 항체일 수 있고; 및/또는 (3) 다가 항체가 결합할 수 있는 항원을 발현하는 세

포의 세포 사멸 및/또는 아폽토시스를 유도할 수 있다. 다가 및 또는 다중특이적 결합 단백질의 최소한 한 가지 항원 결합 특이성을 제공하는 "부모 항체"는 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 의해 내재화되고 (및/또는 이화되고); 및/또는 효현제, 세포 사멸-유도, 및/또는 아폽토시스-유도 항체일 수 있는 것일 수 있고, 그리고 본원에서 설명된 바와 같은 다가 및 또는 다중특이적 결합 단백질은 이들 성질 중에서 한 가지 또는 그 이상에서 향상(들)을 전시할 수 있다. 게다가, 부모 항체는 이들 성질 중에서 임의의 한 가지 또는 그 이상을 결여할 수 있지만, 본원에서 설명된 바와 같은 다가 결합 단백질로서 작제될 때 이들 성질이 부여될 수 있다.

[0072] 다른 구체예에서, 본 발명의 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명에 의해 계측될 때, 하나 또는 그 이상의 표적에 대해 최소한 약 $10^{2}M^{-1}s^{-1}$; 최소한 약 $10^{3}M^{-1}s^{-1}$; 최소한 약 $10^{4}M^{-1}s^{-1}$; 최소한 약 $10^{5}M^{-1}s^{-1}$; 그리고 최소한 약 $10^{6}M^{-1}s^{-1}$로 이루어진 군으로부터 선택되는 온 레이트 상수 (Kon)를 갖는다. 바람직하게는, 본 발명의 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명에 의해 계측될 때, 하나 또는 그 이상의 표적에 대해 $10^{2}M^{-1}s^{-1}$ 내지 $10^{3}M^{-1}s^{-1}$; $10^{3}M^{-1}s^{-1}$ 내지 $10^{4}M^{-1}s^{-1}$; $10^{4}M^{-1}s^{-1}$ 내지 $10^{5}M^{-1}s^{-1}$; 또는 $10^{5}M^{-1}s^{-1}$ 내지 $10^{6}M^{-1}s^{-1}$의 온 레이트 상수 (Kon)를 갖는다.

[0073] 다른 구체예에서, 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명에 의해 계측될 때, 하나 또는 그 이상의 표적에 대해 기껏해야 약 $10^{-3}s^{-1}$; 기껏해야 약 $10^{-4}s^{-1}$; 기껏해야 약 $10^{-5}s^{-1}$; 그리고 기껏해야 약 $10^{-6}s^{-1}$로 이루어진 군으로부터 선택되는 오프 레이트 상수 (Koff)를 갖는다. 바람직하게는, 본 발명의 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명에 의해 계측될 때, 하나 또는 그 이상의 표적에 대해 $10^{-3}s^{-1}$ 내지 $10^{-4}s^{-1}$; $10^{-4}s^{-1}$ 내지 $10^{-5}s^{-1}$; 또는 $10^{-5}s^{-1}$ 내지 $10^{-6}s^{-1}$의 오프 레이트 상수 (Koff)를 갖는다.

[0074] 다른 구체예에서, 결합 단백질은 하나 또는 그 이상의 표적에 대해 기껏해야 약 10^{-7} M; 기껏해야 약 10^{-8} M; 기껏해야 약 10^{-9} M; 기껏해야 약 10^{-10} M; 기껏해야 약 10^{-11} M; 기껏해야 약 10^{-12} M; 그리고 기껏해야 10^{-13} M으로 이루어진 군으로부터 선택되는 해리 상수 (K_D)를 갖는다. 바람직하게는, 본 발명의 결합 단백질은 IL-12 또는 IL-23에 대해 10^{-7} M 내지 10^{-8} M; 10^{-8} M 내지 10^{-9} M; 10^{-9} M 내지 10^{-10} M; 10^{-10} 내지 10^{-11} M; 10^{-11} M 내지 10^{-12} M; 또는 10^{-12} M 내지 10^{-13} M의 해리 상수 (K_D)를 갖는다.

[0075] 다른 구체예에서, 앞서 설명된 결합 단백질은 면역부착 분자, 영상 작용제, 치료적 작용제, 그리고 세포독성 작용제로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용제를 더욱 포함하는 접합체이다. 한 구체예에서, 영상 작용제는 방사성표지, 효소, 형광 라벨, 발광 라벨, 생물발광 라벨, 자성 라벨, 그리고 비오틴으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 구체예에서, 영상 작용제는 ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho, 그리고 ^{153}Sm으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방사성표지이다. 한 구체예에서, 치료적 또는 세포독성 작용제는 면역억제제, 면역자극성 작용제, 대사길항물질, 알킬화제, 항균제, 성장 인자, 사이토킨, 항신생혈관제, 항유사분열성 작용제, 안트라사이클린, 독소, 그리고 아폽토시스성 작용제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 결합 단백질은 작용제에 직접적으로 접합된다. 다른 구체예에서, 결합 단백질은 링커를 거쳐 작용제에 접합된다. 적합한 링커는 본원에서 개시된 아미노산 및 폴리펩티드 링커를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 링커는 개열가능하거나 또는 비개열가능할 수 있다.

[0076] 다른 구체예에서, 앞서 설명된 결합 단백질은 결정화된 결합 단백질이고 결정으로서 존재한다. 바람직하게는, 결정은 담체-없는 약학적 제어된 방출 결정이다. 더욱 바람직하게는, 결정화된 결합 단백질은 상기 결합 단백질의 가용성 대응물보다 더욱 큰 생체내 반감기를 갖는다. 가장 바람직하게는, 결정화된 결합 단백질은 생물학적 활성을 유지한다.

[0077] 다른 구체예에서, 앞서 설명된 결합 단백질은 당화된다. 바람직하게는, 당화는 인간 당화 패턴이다.

[0078] 본 발명의 한 가지 양상은 상기 개시된 결합 단백질 중에서 임의의 한 가지를 인코딩하는 단리된 핵산과 관련된다. 추가 구체예는 상기 개시된 단리된 핵산을 포함하는 벡터를 제공하고, 여기서 상기 벡터는 pcDNA; pTT (Durocher et al., *Nucleic Acids Research* 2002, Vol 30, No.2); pTT3 (추가 복수 클로닝 부위를 갖는 pTT; pEFBOS (Mizushima, S. and Nagata, S., (1990) *Nucleic acids Research* Vol 18, No. 17); pBV; pJV; pcDNA3.1 TOPO, pEF6 TOPO 및 pBJ로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다중특이적 결합 단백질 및 이들을 만드는 방법이 제공된다. 결합 단백질은 다양한 기술을 이용하여 산출될 수 있다. 발현 벡터, 숙주 세포 및 결합 단백질을 산출하는 방법이 본 발명에서 제공된다.

[0079] 다중클론 Ab, 단일클론 Ab, 및 또는 관심되는 항원에 결합할 수 있는 수용체를 비롯하여, 본 발명의 결합 단백질의 항원 결합 가변 도메인은 부모 결합 단백질로부터 획득될 수 있다. 이들 부모 결합 단백질은 자연발생이거나 또는 재조합 기술에 의해 산출될 수 있다. 당업자는 하이브리도마 기술의 이용, 선별된 림프구 항체 방법(SLAM), 파지, 효모, 또는 RNA-단백질 융합 전시 또는 다른 라이브러리의 이용, 인간 면역글로불린 좌위의 최소한 일부를 포함하는 비인간 동물의 면역화, 그리고 키메라, CDR-합체된 및 인간화 항체의 제조를 포함하지만 이들에 한정되지 않는, 항체 및/또는 단리된 수용체를 생산하기 위한 많은 방법에 충분히 익숙하다. 가령, US 특허 공개 번호 20090311253 A1을 참조한다. 가변 도메인은 또한, 친화성 성숙 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 결합 단백질의 결합 가변 도메인은 또한, 당분야에서 공지된 추출 절차 (가령, 용매, 세정제, 및/또는 친화성 정제를 이용)에 의해 획득되거나, 또는 당분야에서 공지된 생물물리학적 방법 (가령, X선 결정학, NMR, 간섭측정, 및/또는 컴퓨터 모형화)에 의해 결정된, 단리된 수용체 분자로부터 획득될 수 있다.

[0080] 결합 단백질 분자에서 요망되는 최소한 하나 또는 그 이상의 성질을 갖는 부모 결합 단백질을 선별하는 것을 포함하는 구체예가 제공된다. 한 구체예에서, 요망되는 성질은 항체 파라미터를 특징짓는데 이용되는 것들, 예를 들면, 예로서, 항원 특이성, 항원에 대한 친화성, 효능, 생물학적 기능, 에피토프 인식, 안정성, 용해도, 생산 효율, 면역원성, 약물동력학, 생체이용률, 조직 교차반응성, 또는 이종상동성 항원 결합 중에서 한 가지 또는 그 이상이다. 가령, US 특허 공개 번호 20090311253을 참조한다.

[0081] 다중특이적 항체는 또한, 항원 결합 도메인 중에서 하나 또는 그 이상이 비-기능적이도록 만들어지도록 설계될 수 있다. 가변 도메인은 본원에서 설명된 방법 중에서 임의의 한 가지에 의해 산출된 부모 결합 단백질로부터 재조합 DNA 기술을 이용하여 획득될 수 있다. 한 구체예에서, 가변 도메인은 뮤린 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인이다. 다른 구체예에서, 가변 도메인은 CDR 합체된 또는 인간화 가변적 중쇄 또는 경쇄 도메인이다. 한 구체예에서, 가변 도메인은 인간 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인이다.

[0082] 한 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 불변 도메인은 재조합 DNA 기술을 이용하여 가변 도메인에 연결된다. 한 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 중쇄 가변 도메인을 포함하는 서열은 중쇄 불변 도메인에 연결되고, 그리고 하나 또는 그 이상의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 서열은 경쇄 불변 도메인에 연결된다. 한 구체예에서, 불변 도메인은 각각, 인간 중쇄 불변 도메인 및 인간 경쇄 불변 도메인이다. 한 구체예에서, 중쇄는 Fc 영역에 더욱 연결된다. Fc 영역은 선천적 서열 Fc 영역 또는 변이체 Fc 영역일 수 있다. 다른 구체예에서, Fc 영역은 인간 Fc 영역이다. 다른 구체예에서, Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, 또는 IgD로부터 Fc 영역을 포함한다.

[0083] 추가적으로, 본원에서 제공된 결합 단백질은 세포내 전달 (내재화 수용체 및 세포내 분자를 표적화), 뇌 내부에 전달 (혈액 뇌 장벽을 교차하기 위해 트랜스페린 수용체 및 CNS 질환 매개체를 표적화)을 비롯하여, 조직 특이적 전달 (증강된 국부 PK, 따라서 더욱 높은 효력 및/또는 더욱 낮은 독성을 위해 조직 마커 및 질환 매개체를 표적으로 한다)에 이용될 수 있다. 결합 단백질은 또한, 항원의 비-중화 에피토프에 결합을 통해 항원을 특정한 위치로 전달하고, 또한 항원의 반감기를 증가시키는 운반 단백질로서 역할을 할 수 있다. 게다가, 결합 단백질은 환자 내로 이식된 의료 장치에 물리적으로 연결되거나 또는 이들 의료 장치를 표적으로 하도록 설계될 수 있다 (참조: Burke et al. (2006) Advanced Drug Deliv. Rev. 58(3): 437-446; Hildebrand et al. (2006) Surface and Coatings Technol. 200(22-23): 6318-6324; Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis, Wu (2006) Biomaterials 27(11):2450-2467; Mediation of the cytokine network in the implantation of orthopedic devices, Marques (2005) Biodegradable Systems in Tissue Engineer. Regen. Med. 377-397). 적절한 유형의 세포를 의학적 이식물의 부위로 지향시키는 것은 치유하고 정상적인 조직 기능을 복원하는 것을 증진할 수 있다. 대안으로, 장치에 연계된 또는 표적화된 수용체 항체 융합 단백질에 의해 장치 이식 시에 방출되는 매개체 (사이토킨을 포함하지만 이들에 한정되지 않음)의 저해 역시 제공된다.

[0084] 한 양상에서, 숙주 세포는 상기 개시된 벡터로 형질전환된다. 한 구체예에서, 숙주 세포는 원핵 세포이다. 추가 구체예에서, 숙주 세포는 대장균 (*Escherecia coli*)이다. 다른 구체예에서, 숙주 세포는 진핵 세포이다. 추가 구체예에서, 진핵 세포는 원생생물 세포, 동물 세포, 식물 세포 및 진균 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 숙주 세포는 293, COS, NS0, 그리고 CHO 및; 또는 진균 세포, 예를 들면, 사카로미세스 세레비지애 (Saccharomyces cerevisiae); 또는 곤충 세포, 예를 들면, Sf9를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 포유류 세포이다.

[0085] 본 발명의 다른 양상은 상기 개시된 결합 단백질을 생산하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 개시된 숙주 세포 중에서 임의의 한 가지를, 결합 단백질을 생산하는데 충분한 조건 하에 배양 배지에서 배양하는 것을 포함

한다. 바람직하게는, 이러한 방법에 의해 생산된 결합 단백질 중에서 50%-75%는 이중 특이적 사가 결합 단백질이다. 더욱 바람직하게는, 이러한 방법에 의해 생산된 결합 단백질 중에서 75%-90%는 이중 특이적 사가 결합 단백질이다. 가장 바람직하게는, 생산된 결합 단백질 중에서 90%-95%는 이중 특이적 사가 결합 단백질이다.

[0086] 다른 구체예는 상기 개시된 방법에 따라 생산된 결합 단백질을 제공한다.

[0087] 한 구체예는 결합 단백질의 방출을 위한 조성물을 제공하고, 여기서 조성물은 상기 개시된 바와 같은 결정화된 결합 단백질 및 한 가지 성분; 그리고 최소한 하나의 중합성 담체를 차례로 포함하는 제제를 포함한다. 바람직하게는, 중합성 담체는 폴리 (아크릴산), 폴리 (시아노아크릴레이트), 폴리 (아미노산), 폴리 (무수물), 폴리 (덱시펩티드), 폴리 (에스테르), 폴리 (젖산), 폴리 (젖산-코-글리콜산) 또는 PLGA, 폴리 (b-히드록시부티레이트), 폴리 (카프로락톤), 폴리 (디옥사논); 폴리 (에틸렌 글리콜), 폴리 ((히드록시프로필) 메타크릴아미드, 폴리 [(오르가노)포스파젠], 폴리 (오르소 에스테르), 폴리 (비닐 알코올), 폴리 (비닐피롤리돈), 말레산 무수물-알킬 비닐 에테르 공중합체, 플루로닉 폴리올, 알부민, 알긴산염, 셀룰로오스 및 셀룰로오스 유도체, 콜라겐, 피브린, 젤라틴, 히알루론산, 올리고당류, 글리코사미노글리칸, 황산화된 다당류, 이들의 블렌드 및 공중합체로 이루어진 군 중에서 하나 또는 그 이상에서 선택되는 중합체이다. 바람직하게는, 상기 성분은 알부민, 수크로오스, 트레할로스, 락티톨, 젤라틴, 히드록시프로필-β- 시클로덱스트린, 메톡시폴리에틸렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 구체예는 포유동물을 치료하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 개시된 조성물의 효과량을 포유동물에 투여하는 단계를 포함한다.

[0088] 본 발명은 또한, 상기 개시된 바와 같은 결합 단백질 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 약학적으로 허용되는 담체는 인산염 완충액 또는 식염수를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 다른 통상적인 비경구 운반제는 인산나트륨 용액, 링거 덱스트로스, 덱스트로스 및 염화나트륨, 젖산 링거, 또는 고정유를 포함한다. 정맥내 운반제는 유체와 영양소 보충물, 전해질 보충물, 예를 들면, 링거의 덱스트로스에 기초된 것들, 기타 등등을 포함한다. 보존제 및 다른 첨가제, 예를 들면, 항균제, 항산화제, 킬레이트화제, 그리고 불활성 가스 등이 또한 존재할 수 있다. 더욱 구체적으로, 주사가능 이용에 적합한 약학적 조성물은 무균 수용액 (수용성인 경우에) 또는 분산액, 그리고 무균 주사가능 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 무균 분말을 포함한다. 담체는 예로서, 물, 에탄올, 폴리올 (가령, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 그리고 액체 폴리에틸렌 글리콜, 기타 등등), 그리고 이들의 적합한 혼합물을 내포하는 용매 또는 분산 매체일 수 있다. 일부 경우에, 등장성 작용제, 예를 들면, 당, 다가알코올, 예를 들면, 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 조성물 내에 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사가능 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연하는 작용제, 예를 들면, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물 내에 포함함으로써 달성될 수 있다.

[0089] 추가 구체예에서, 약학적 조성물은 장애를 치료하기 위한 최소한 하나의 추가 치료적 작용제를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 작용제는 치료적 작용제, 영상 작용제, 세포독성 작용제, 혈관형성 저해제 (항-VEGF 항체 또는 VEGF-트랩을 포함하지만 이들에 한정되지 않음); 키나아제 저해제 (KDR과 TIE-2 저해제를 포함하지만 이들에 한정되지 않음); 동시자극 분자 차단제 (항-B7.1, 항-B7.2, CTLA4-Ig, 항-PD-1, 항-CD20을 포함하지만 이들에 한정되지 않음); 부착 분자 차단제 (항-LFA-1 Abs, 항-E/L 셀렉틴 Abs, 소형 분자 저해제를 포함하지만 이들에 한정되지 않음); 항사이토킨 항체 또는 이의 기능적 단편 (항-IL-18, 항-TNF, 항-IL-6/사이토킨 수용체 항체를 포함하지만 이들에 한정되지 않음); 메토트렉사트; 시클로스포린; 라파마이신; FK506; 검출가능한 라벨 또는 리포터; TNF 길항제; 항류마티스제; 근이완제, 마약, 비-스테로이드 항염증성 약물 (NSAID), 진통제, 마취제, 진정제, 국부 마취제, 신경근 차단제, 항균제, 항건선제, 코르티코스테로이드, 동화작용 스테로이드, 에리트로포이에틴, 면역화제, 면역글로불린, 면역억제제, 성장 호르몬, 호르몬 대체 약물, 방사성의약품, 항우울제, 항정신병약, 자극제, 천식 약제, 베타 효현제, 흡입된 스테로이드, 에피네프린 또는 유사체, 사이토킨, 그리고 사이토킨 길항제로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0090] 다른 양상에서, 본 발명은 상기 개시된 결합 단백질에 의해 결합될 수 있는 표적 또는 표적들이 유해한 장애로 고통받는 인간 개체를 치료하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 인간 개체에서 표적 또는 표적들의 활성이 저해되고 장애의 치료 또는 예방이 달성되도록 상기 개시된 결합 단백질을 인간 개체에 투여하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 질환 또는 장애는 염증성 병태, 자가면역 질환, 또는 암이다. 한 구체예에서, 질환 또는 장애는 관절염, 골관절염, 소아성 만성 관절염, 폐혈성 관절염, 라임 관절염, 건선성 관절염, 반응성 관절염, 척추관절병증, 전신성 홍반성 루푸스, 크론병, 궤양성 대장염, 염증성 장 질환, 인슐린 의존성 당뇨병, 갑상선염, 천식, 알레르기 질환, 건선, 피부염 경피증, 이식편 대 숙주 질환, 장기 이식 거부반응, 장기 이식과 연관된 급성 또는 만성 면역 질환, 사르코이드증, 죽상경화증, 파종성 혈관내 응고, 가와사키병, 그레이브스병, 신증후군, 만성 피로 증후군, 베게너 육아종증, 헤노흐 쉔라인 자반병, 신장의 현미경적 맥관염, 만성 활성 간

염, 포도막염, 패혈성 쇼크, 독성 쇼크 증후군, 패혈증 증후군, 악액질, 감염성 질환, 기생충 질환, 획득된 면역결핍 증후군, 급성 횡단 척수염, 헌팅턴 무도병, 파킨슨병, 알츠하이머병, 뇌졸중, 원발성 담즙성 간경변, 용혈성 빈혈, 악성, 심부전, 심근 경색, 애디슨병, 산발성, 다선성 결핍 유형 I 및 다선성 결핍 유형 II, 슈미트 증후군, 성체 (급성) 호흡 곤란 증후군, 탈모증, 원형탈모증, 혈청반응음성 관절병증, 관절병증, 라이터병, 건선성 관절병증, 궤양성 대장염 관절병증, 장병성 활액막염, 클라미디아, 예르시니아 및 살모넬라 연관된 관절병증, 척추관절병증, 죽종성 질환/동맥경화증, 아토피성 알레르기, 자가면역 수포성 질환, 심상성 천포창, 낙엽성 천포창, 유천포창, 선형 IgA 질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 쿰스 양성 용혈성 빈혈, 후천성 악성 빈혈, 소아성 악성 빈혈, 근육통성 뇌염/로얄 프리병, 만성 점막피부 칸디다증, 거대 세포 동맥염, 원발성 경화성 간염, 잠재성 자가면역 간염, 후천성 면역 결핍 증후군, 후천성 면역 결핍 관련된 질환, B형 간염, C형 간염, 통상적인 변화된 면역결핍 (통상적인 가변적 저감마글로불린혈증), 확장 심근병증, 여성 불임, 난소 기능상실, 미성숙 난소 기능상실, 섬유증 폐 질환, 잠재성 섬유성 폐포염, 염증후 간질성 폐 질환, 간질성 폐렴, 결합 조직병 연관된 간질성 폐 질환, 혼합 결합 조직병 연관된 폐 질환, 전신 경화증 연관된 간질성 폐 질환, 류마티스성 관절염 연관된 간질성 폐 질환, 전신성 홍반성 루푸스 연관된 폐 질환, 피부근염/다발근육염 연관된 폐 질환, 쇼그렌병 연관된 폐 질환, 강직성 척추염 연관된 폐 질환, 맥관염 미만성 폐 질환, 혈철증 연관된 폐 질환, 약물 유발된 간질성 폐 질환, 섬유증, 방사선 섬유증, 폐색성 세기관지염, 만성 호산구성 폐렴, 림프구성 침윤성 폐 질환, 감염후 간질성 폐 질환, 통풍성 관절염, 자가면역 간염, 유형-1 자가면역 간염 (고전적 자가면역 또는 루포이드 간염), 유형-2 자가면역 간염 (항-LKM 항체 간염), 자가면역 매개된 저혈당증, 흑색극세포증을 동반한 유형 B 인슐린 저항성, 부갑상선저하증, 장기 이식과 연관된 급성 면역 질환, 장기 이식과 연관된 만성 면역 질환, 골관절증, 원발성 경화 담관염, 건선 유형 1, 건선 유형 2, 특발성 백혈구 감소증, 자가면역 호중구감소증, 신장병 NOS, 사구체신염, 신장의 현미경적 맥관염, 라임병, 원반모양 홍반성 루푸스, 남성 불임 특발성 또는 NOS, 정자 자가면역, 다발성 경화증 (모든 아형), 교감성 안염, 결합 조직병에 이차적인 폐 고혈압, 굿파스처 증후군, 결절성 다발동맥염의 폐 현시, 급성 류마티스열, 류마티스성 척추염, 스틸병, 전신 경화증, 쇼그렌 증후군, 다카야수병/동맥염, 자가면역 혈소판감소증, 특발성 혈소판감소증, 자가면역 갑상선 질환, 갑상선기능항진증, 갑상선종성 자가면역 갑상선기능저하증 (하시모토병), 위축성 자가면역 갑상선기능저하증, 원발성 점액수종, 수정체성 포도막염, 원발성 맥관염, 백반증 급성 간 질환, 만성 간 질환, 알코올 간경화, 알코올-유도된 간손상, 콜레오사타티스, 특이체질성 간 질환, 약물 유발 간염, 비알코올성 지방간염, 알레르기와 천식, 그룹 B 연쇄상구균 (GBS) 감염, 정신 장애 (가령, 우울증 및 정신분열병), Th2 유형과 Th1 유형 매개된 질환, 급성과 만성 통증 (상이한 형태의 통증), 그리고 암, 예를 들면, 폐, 유방, 위, 방광, 결장, 췌장, 난소, 전립선 및 직장 암과 조혈 악성 (백혈병 및 림프종), 무베타지방단백혈증, 말단청색증, 급성과 만성 기생충성 또는 감염성 과정, 급성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 급성 또는 만성 세균 감염, 급성 췌장염, 급성 신부전, 선암종, 공기 이소성 박동, AIDS 치매 복합체, 알코올-유도된 간염, 알레르기 결막염, 알레르기 접촉성 피부염, 알레르기성 비염, 동종이식 거부반응, 알파-1- 항트립신 결핍, 근위축성 측삭 경화증, 빈혈, 협심증, 전각 세포 변성, 항 cd3 요법, 항인지질 증후군, 항-수용체 과민 반응, 대동맥류와 말초 동맥류, 대동맥 박리, 동맥성 고혈압, 동맥경화증, 동정 맥루, 운동실조, 심방 세동 (지속성 또는 발작성), 심방 조동, 방실 차단, B 세포 림프종, 골이식 거부반응, 골수 이식 (BMT) 거부반응, 다발 갈래 차단, 버킷 림프종, 화상, 심장 부정맥, 심장성 기절 증후군, 심장 종양, 심근병증, 심폐 우회로 염증 반응, 연골 이식 거부반응, 소뇌 피질성 변성, 소뇌 장애, 무질서한 또는 다초점성 심방 빈맥, 화학요법 연관된 장애, 만성 골수성 백혈병 (CML), 만성 알코올중독, 만성 염증성 병리, 만성 림프성 백혈병 (CLL), 만성 폐쇄성 폐질환 (COPD), 만성 살리실산염 중독, 대장 암종, 울혈성 심부전, 결막염, 접촉성 피부염, 폐심장증, 관상 동맥 질환, 크로이츠펠트 야콥병, 배양 음성 패혈증, 낭포성 섬유증, 사이토킨 요법 연관된 장애, 권투 선수 치매, 탈수초성 질환, 뎅기 출혈열, 피부염, 피부학적 질환, 당뇨병, 진성 당뇨병, 당뇨병성 동맥경화 질환, 광범위 루이체병, 확장성 울혈성 심근병증, 기저핵의 장애, 중년에 다운 증후군, CNS 도파민 수용체를 차단하는 약물에 의해 유도된 약물 유발된 운동 장애, 약물 감수성, 습진, 뇌척수염, 심내막염, 내분비병증, 후두개염, 엡스타인 바르 바이러스 감염, 홍색사지 통증, 추체외로와 소뇌 장애, 가족성 혈구탐식성 림프조직구증, 태아 흉선 이식물 거부반응, 프리드리히 운동실조증, 기능적 말초 동맥성 장애, 진균 패혈증, 가스 괴저, 위궤양, 사구체신염, 임의의 장기 또는 조직의 이식편 거부반응, 그람 음성 패혈증, 그람 양성 패혈증, 세포내 생물체로 인한 육아종, 모양 세포성 백혈병, 할러포르덴 스파츠 질환, 하시모토 갑상선염, 고초열, 심장 이식 거부반응, 혈색소침착증, 혈액투석, 용혈성 요독 증후군/혈전용해 혈소판감소성 자반병, 출혈, 간염 (A형), 히스 다발 부정맥증, HIV 감염/HIV 신경병증, 호지킨병, 운동과다성 운동 장애, 과민 반응, 과민성 폐렴, 고혈압, 운동감소성 운동 장애, 시상하부 뇌하수체 부신 축 평가, 특발성 애디슨병, 특발성 폐섬유증, 항체 매개된 세포독성, 무력, 영아 척수 근위축증, 대동맥의 염증, 인플루엔자 a, 전리 방사선 노출, 홍채모양체염/포도막염/시신경염, 허혈- 재관류 손상, 허혈성 뇌졸중,

소아성 류마티스양 관절염, 소아 척수근 위축증, 카포시 육종, 신장 이식 거부반응, 레지오넬라, 리슈만편모충증, 나병, 피질척수 시스템의 병변, 지방부종, 간 이식 거부반응, 림프부종, 말라리아, 악성 림프종, 악성 조직구증, 악성 흑색종, 수막염, 수막구균혈증, 물질대사/특발성, 편두통, 미토콘드리아 다계통 장애, 혼합 결합 조직병, 단일클론 감마글로불린병증, 다발성 골수종, 다계통 변성 (Mencel Dejerine- Thomas Shi-Drager 및 Machado-Joseph), 중증 근무력증, 세포내 계형 결핵균, 결핵, 골수이형성 증후군, 심근 경색, 심근 허혈성 장애, 코인두 암종, 신생아 만성 폐 질환, 신장염, 신장증, 신경변성 질환, 신경원성 I 근위축, 호중구감소성 열병, 비호지킨 림프종, 복부 대동맥과 이의 분지의 폐색, 폐쇄성 동맥성 장애, okt3 요법, 고환염/부고환염, 고환염/정관절제술 역방향 절차, 장기비대, 골다공증, 췌장 이식 거부반응, 췌장 암종, 악성의 부종양성 증후군/고칼슘혈증, 부갑상선 이식 거부반응, 골반 염증 질환, 연중 비염, 심장막 질환, 말초 죽상경화성 질환, 말초 혈관 장애, 복막염, 악성 빈혈, 폐포자충 폐렴, 폐렴, POEMS 증후군 (다발신경병증, 장기비대, 내분비병증, 단일클론 감마글로불린병증, 그리고 피부 변화 증후군), 관류후 증후군, 펌프후 증후군, MI 심장절개술후 증후군, 전자간증, 진행성 핵상 마비, 원발성 폐 고혈압, 방사선 요법, 레이노 현상과 질환, 레이노병, 레프섬병, 규칙적인 좁은 QRS 빈맥, 신장혈관성 고혈압, 재관류 손상, 제한 심근병증, 육종, 경피증, 노인성 무도병, 루이체 유형의 노인성 치매, 혈청반응음성 관절병증, 쇼크, 겸상 적혈구성 빈혈, 피부 동종이식 거부반응, 피부 변화 증후군, 소장 이식 거부반응, 고형 종양, 특정한 부정맥증, 척수성 운동실조증, 척수소뇌 변성, 연쇄상구균 근염, 소뇌의 구조적 병변, 아급성 경화성 범뇌염, 실신, 심혈관계의 매독, 전신 아나필락시스, 전신성 염증성 반응 증후군, 전신 개시 소아성 류마티스양 관절염, T-세포 또는 FAB ALL, 모세관확장증, 폐쇄성 혈전혈관염, 혈소판감소증, 독성, 이식조직, 외상/출혈, 유형 III 과민 반응, 유형 IV 과민성, 불안정 협심증, 요독증, 요로성 패혈증, 두드러기, 판막성 심장 질환, 정맥류, 맥관염, 정맥성 질환, 정맥 혈전증, 심실 세동, 바이러스와 진균 감염, 활력 뇌염/무균 수막염, 활력-연관된 혈구탐식 증후군, 베르니케 코르사코프 증후군, 윌슨병, 임의의 장기 또는 조직의 이종이식편 거부반응을 포함하는 군으로부터 선택된다.

[0091] 다른 양상에서 본 발명은 장애로 고통받는 환자를 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 앞서 논의된 바와 같이, 두 번째 작용제의 투여 전에, 투여와 동시에, 또는 투여 후에 상기 개시된 결합 단백질 중에서 임의의 한 가지를 투여하는 단계를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 두 번째 작용제는 부데노시드, 표피 성장 인자, 코르티코스테로이드, 시클로스포린, 술파살라진, 아미노살리실레이트, 6-메르캅토푸린, 아자티오프린, 메트로니다졸, 리폭시게나아제 저해제, 메살라민, 올살라진, 발살라지드, 항산화제, 트롬복산 저해제, IL-1 수용체 길항제, 항-IL-1β 단일클론 항체, 항-IL-6 단일클론 항체, 성장 인자, 엘라스타아제 저해제, 피리디닐-이미다졸 화합물, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-23, EMAP-II, GM-CSF, FGF, 그리고 PDGF의 항체 또는 효현제, CD2, CD3, CD4, CD8, CD-19, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 또는 이들의 리간드의 항체, 메토트렉사트, 시클로스포린, FK506, 라파마이신, 미코페놀레이트 모페틸, 레플루노미드, NSAIDs, 이부프로펜, 코르티코스테로이드, 프레드니솔론, 포스포디에스테라아제 저해제, 아덴소신 효현제, 항혈전 작용제, 보체 저해제, 아드레날린성 작용제, IRAK, NIK, IKK, p38, MAP 키나아제 저해제, IL-1β 전환 효소 저해제, TNFα 전환 효소 저해제, T-세포 신호전달 저해제, 금속단백질가수분해효소 저해제, 술파살라진, 아자티오프린, 6-메르캅토푸린, 앤지오텐신 전환 효소 저해제, 가용성 사이토킨 수용체, 가용성 p55 TNF 수용체, 가용성 p75 TNF 수용체, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, 항염증성 사이토킨, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 및 TGFβ로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0092] 한 구체예에서, 상기 개시된 약학적 조성물은 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 관절내, 기관지내, 복강내, 관절내, 연골내, 강내, 복내, 소뇌내, 뇌실내, 결장내, 자궁경부내, 위내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심막내, 복막내, 흉강내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척주내, 활막내, 흉곽내, 자궁내, 방광내, 일시 주사, 질, 직장, 협측, 설하, 비내, 그리고 경피에서 선택되는 최소한 하나의 방식에 의해 개체에 투여된다.

[0093] 본 발명의 한 가지 양상은 본 발명의 최소한 하나의 결합 단백질에 대한 최소한 하나의 항이디오타입 항체를 제공한다. 항이디오타입 항체는 본 발명의 결합 단백질 내로 통합될 수 있는 면역글로불린 분자, 예를 들면, 하지만 제한 없이, 중쇄 또는 경쇄의 최소한 하나의 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 이의 리간드 결합 부분, 중쇄 또는 경쇄 가변 영역, 중쇄 또는 경쇄 불변 영역, 프레임워크 영역, 또는; 이들의 임의의 부분의 최소한 일부를 포함하는 임의의 단백질 또는 펩티드 내포 분자를 포함한다.

[0094] 다른 구체예에서, 본 발명의 결합 단백질은 ABCF1; ACVR1; ACVR1B; ACVR2; ACVR2B; ACVRL1; ADORA2A; 아그레칸; AGR2; AICDA; AIF1; AIG1; AKAP1; AKAP2; AMH; AMHR2; ANGPT1; ANGPT2; ANGPTL3; ANGPTL4; ANPEP; APC; APOC1; AR; AZGP1 (아연-a-당단백질); B7.1; B7.2; BAD; BAFF; BAG1; BAI1; BCL2; BCL6; BDNF; BLNK; BLR1 (MDR15); BlyS; BMP1; BMP2; BMP3B (GDF10); BMP4; BMP6; BMP8; BMPR1A; BMPR1B; BMPR2; BPAG1 (플렉

틴); BRCA1; C19orf10 (IL27w); C3; C4A; C5; C5R1; CANT1; CASP1; CASP4; CAV1; CCBP2 (D6 / JAB61); CCL1 (I-309); CCL11 (에오탁신); CCL13 (MCP-4); CCL15 (MIP-1d); CCL16 (HCC-4); CCL17 (TARC); CCL18 (PARC); CCL19 (MIP-3b); CCL2 (MCP -1); MCAF; CCL20 (MIP-3a); CCL21 (MIP-2); SLC; 엑소더스-2; CCL22 (MDC / STC-1); CCL23 (MPIF-1); CCL24 (MPIF-2 / 에오탁신-2); CCL25 (TECK); CCL26 (에오탁신-3); CCL27 (CTACK / ILC); CCL28; CCL3 (MIP-1a); CCL4 (MIP-1b); CCL5 (RANTES); CCL7 (MCP-3); CCL8 (mcp-2); CCNA1; CCNA2; CCND1; CCNE1; CCNE2; CCR1 (CKR1 / HM145); CCR2 (mcp-1RB / RA);CCR3 (CKR3 / CMKBR3); CCR4; CCR5 (CMKBR5 / ChemR13); CCR6 (CMKBR6 / CKR-L3 / STRL22 / DRY6); CCR7 (CKR7 / EBI1); CCR8 (CMKBR8 / TER1 / CKR-L1); CCR9 (GPR-9-6); CCRL1 (VSHK1); CCRL2 (L-CCR); CD164; CD19; CD1C; CD20; CD200; CD-22; CD24; CD28; CD3; CD37; CD38; CD3E; CD3G; CD3Z; CD4; CD40; CD40L; CD44; CD45RB; CD47, CD48, CD52; CD69; CD70, CD72; CD74; CD79A; CD79B; CD8; CD80; CD81; CD83; CD86; CD137, CD138, B7-1, B7-2, ICOSL, B7-H3, B7-H4, CD137L, OX40L, CDH1 (E-카드헤린); CDH10; CDH12; CDH13; CDH18; CDH19; CDH20; CDH5; CDH7; CDH8; CDH9; CDK2; CDK3; CDK4; CDK5; CDK6; CDK7; CDK9; CDKN1A (p21Wap1/Cip1); CDKN1B (p27Kip1); CDKN1C; CDKN2A (p16INK4a); CDKN2B; CDKN2C; CDKN3; CEBPB; CER1; CHGA; CHGB; 키틴분해효소; CHST10; CKLFSF2; CKLFSF3; CKLFSF4; CKLFSF5; CKLFSF6; CKLFSF7; CKLFSF8; CLDN3; CLDN7 (클라우딘-7); CLN3; CLU (클러스테린); CMKLR1; CMKOR1 (RDC1); CNR1; COL18A1; COL1A1; COL4A3; COL6A1; CR2; CRP; CSF1 (M-CSF); CSF2 (GM-CSF); CSF3 (GCSF); CTLA-4; CTNNB1 (b-카테닌); CTSB (카텝신 B); CX3CL1 (SCYD1); CX3CR1 (V28); CXCL1 (GRO1); CXCL10 (IP-10); CXCL11 (I-TAC / IP-9); CXCL12 (SDF1); CXCL13; CXCL14; CXCL16; CXCL2 (GRO2); CXCL3 (GRO3); CXCL5 (ENA-78 / LIX); CXCL6 (GCP-2); CXCL9 (MIG); CXCR3 (GPR9/CKR-L2); CXCR4; CXCR6 (TYMSTR /STRL33 / Bonzo); CYB5; CYC1; CYSLTR1; DAB2IP; DES; DKFZp451J0118; DNCL1; DPP4; E2F1; ECGF1; EDG1; EFNA1; EFNA3; EFNB2; EGF; EGFR; ELAC2; ENG; ENO1; ENO2; ENO3; EPHB4; EPO; ERBB2 (Her-2); EREG; ERK8; ESR1; ESR2; F3 (TF); FADD; FasL; FASN; FCER1A; FCER2; FCGR3A; FGF; FGF1 (aFGF); FGF10; FGF11; FGF12; FGF12B; FGF13; FGF14; FGF16; FGF17; FGF18; FGF19; FGF2 (bFGF); FGF20; FGF21; FGF22; FGF23; FGF3 (int-2); FGF4 (HST); FGF5; FGF6 (HST-2); FGF7 (KGF); FGF8; FGF9; FGFR3; FIGF (VEGFD); FIL1 (엡실론); FIL1 (제타); FLJ12584; FLJ25530; FLRT1 (섬유결합소); FLT1; FOS; FOSL1 (FRA-1); FY (DARC); GABRP (GABAa); GAGEB1; GAGEC1; GALNAC4S-6ST; GATA3; GDF5; GFI1; GGT1; GM-CSF; GNAS1; GNRH1; GPR2 (CCR10); GPR31; GPR44; GPR81 (FKSG80); GRCC10 (C10); GRP; GSN (겔솔린); GSTP1; HAVCR2; HDAC4; HDAC5; HDAC7A; HDAC9; HGF; HIF1A; HIP1; 히스타민 및 히스타민 수용체; HLA-A; HLA-DRA; HM74; HMOX1; HUMCYT2A; ICEBERG; ICOSL; ID2; IFN-a; IFNA1; IFNA2; IFNA4; IFNA5; IFNA6; IFNA7; IFNB1; IFN감마; IFNW1; IGBP1; IGF1; IGF1R; IGF2; IGFBP2; IGFBP3; IGFBP6; IL-1; IL10; IL10RA; IL10RB; IL11; IL11RA; IL-12; IL12A; IL12B; IL12RB1; IL12RB2; IL13; IL13RA1; IL13RA2; IL14; IL15; IL15RA; IL16; IL17; IL17B; IL17C; IL17R; IL18; IL18BP; IL18R1; IL18RAP; IL19; IL1A; IL1B; IL1F10; IL1F5; IL1F6; IL1F7; IL1F8; IL1F9; IL1HY1; IL1R1; IL1R2; IL1RAP; IL1RAPL1; IL1RAPL2;IL1RL1;IL1RL2 IL1RN; IL2; IL20; IL20RA; IL21R; IL22; IL22R; IL22RA2; IL23; IL24; IL25; IL26; IL27; IL28A; IL28B; IL29; IL2RA; IL2RB; IL2RG; IL3; IL30; IL3RA; IL4; IL4R; IL5; IL5RA; IL6; IL6R; IL6ST (당단백질 130); IL7; IL7R; IL8; IL8RA; IL8RB; IL8RB; IL9; IL9R; ILK; INHA; INHBA; INSL3; INSL4; IRAK1; IRAK2; ITGA1; ITGA2; ITGA3; ITGA6 (a6 인테그린); ITGAV; ITGB3; ITGB4 (b 4 인테그린); JAG1; JAK1; JAK3; JUN; K6HF; KAI1; KDR; KITLG; KLF5 (GC 박스 BP); KLF6; KLK10; KLK12; KLK13; KLK14; KLK15; KLK3; KLK4; KLK5; KLK6; KLK9; KRT1; KRT19 (케라틴 19); KRT2A; KRTHB6 (모발-특이적 유형 II 케라틴); LAMA5; LEP (렙틴); Lingo-p75; Lingo-Troy; LPS; LTA (TNF-b); LTB; LTB4R (GPR16); LTB4R2; LTBR; MACMARCKS; MAG 또는 Omgp ; MAP2K7 (c-Jun); MDK; MIB1; 미드킨; MIF; MIP-2; MKI67 (Ki-67); MMP2; MMP9; MS4A1; MSMB; MT3 (메탈로티오넥틴-III); MTSS1; MUC1 (점액소); MYC; MYD88; NCK2; 뉴로칸; NFKB1; NFKB2; NGFB (NGF); NGFR; NgR-Lingo; NgR-Nogo66 (Nogo); NgR-p75; NgR-Troy; NME1 (NM23A); NOX5; NPPB; NR0B1; NR0B2; NR1D1; NR1D2; NR1H2; NR1H3; NR1H4; NR1I2; NR1I3; NR2C1; NR2C2; NR2E1; NR2E3; NR2F1; NR2F2; NR2F6; NR3C1; NR3C2; NR4A1; NR4A2; NR4A3; NR5A1; NR5A2; NR6A1; NRP1; NRP2; NT5E; NTN4; ODZ1; OPRD1; PCSK9; P2RX7; PAP; PART1; PATE; PAWR; PCA3; PCNA; PD-1; PD-L1; 알파4베타7, OX40, GITR, TIM-3, Lag-3, B7-H3, B7-H4, GDF8, CGRP, Lingo-1, 인자 IXa, 인자 X, ICOS, GARP, BTLA, CD160, ROR1, 2B4, KIR, CD27, OX40, CD40L, A2aR, PDGFA; PDGFB; PECAM1; PF4 (CXCL4); PGF; PGR; 포스파칸; PIAS2; PIK3CG; PLAU (uPA); PLG; PLXDC1; PPBP (CXCL7); PPID; PR1; PRKCQ; PRKD1; PRL; PROC; PROK2; PSAP; PSCA; PTAFR; PTEN; PTGS2 (COX-2); PTN; RAC2 (p21Rac2); RARB; RGS1; RGS13; RGS3; RNF110 (ZNF144); ROBO2; S100A2; SCGB1D2 (리포필린 B); SCGB2A1 (맘마글로빈 2); SCGB2A2 (맘마글로빈 1); SCYE1 (내피 단핵구-활성화 사이토킨); SDF2; SERPINA1; SERPINA3; SERPINB5 (마스핀); SERPINE1 (PAI-1); SERPINF1; SHBG; SLA2; SLC2A2; SLC33A1; SLC43A1; SLIT2; SPP1; SPRR1B (Spr1); ST6GAL1; STAB1; STAT6; STEAP; STEAP2; TB4R2; TBX21;

TCP10; TDGF1; TEK; TGFA; TGFB1; TGFB1I1; TGFB2; TGFB3; TGFBI; TGFBR1; TGFBR2; TGFBR3; TH1L; THBS1 (트롬보스폰딘-1); THBS2; THBS4; THPO; TIE (Tie-1); TIMP3; 조직 인자; TLR10; TLR2; TLR3; TLR4; TLR5; TLR6; TLR7; TLR8; TLR9; TNF; TNF-a; TNFAIP2 (B94); TNFAIP3; TNFRSF11A; TNFRSF1A; TNFRSF1B; TNFRSF21; TNFRSF5; TNFRSF6 (Fas); TNFRSF7; TNFRSF8; TNFRSF9; TNFSF10 (TRAIL); TNFSF11 (TRANCE); TNFSF12 (APO3L); TNFSF13 (에이프릴); TNFSF13B; TNFSF14 (HVEM-L); TNFSF15 (VEGI); TNFSF18; TNFSF4 (OX40 리간드); TNFSF5 (CD40 리간드); TNFSF6 (FasL); TNFSF7 (CD27 리간드); TNFSF8 (CD30 리간드); TNFSF9 (4-1BB 리간드); TOLLIP; Toll-유사 수용체; TOP2A (국소이성화효소 Iia); TP53; TPM1; TPM2; TRADD; TRAF1; TRAF2; TRAF3; TRAF4; TRAF5; TRAF6; TREM1; TREM2; TRPC6; TSLP; TWEAK; VEGF; VEGFB; VEGFC; 베르시칸; VHL C5; VLA-4; XCL1 (림포탁틴); XCL2 (SCM-1b); XCR1 (GPR5 / CCXCR1); YY1; 그리고 ZFPM2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 표적에 결합할 수 있다.

[0095] 2개 또는 그 이상의 항원에 결합하는 능력을 고려하면, 본 발명의 결합 단백질은 전통적인 면역검정, 예를 들면, 효소 연결된 면역흡착 검정 (ELISA), 방사면역검정 (RIA) 또는 조직 면역조직화학을 이용하여, 항원 (가령, 생물학적 표본, 예를 들면, 혈청 또는 혈장에서)을 검출하는데 이용될 수 있다. FIT-Ig는 결합된 또는 결합되지 않은 항체의 검출을 용이하게 하는 검출가능한 물질로 직접적으로 또는 간접적으로 표지화된다. 적합한 검출가능한 물질은 다양한 효소, 보결분자단, 형광 물질, 발광 물질 및 방사성 물질을 포함한다. 적합한 효소의 실례는 양고추냉이 과산화효소, 알칼리 인산분해효소, *-갈락토시다아제, 또는 아세틸콜린 에스테라아제를 포함한다; 적합한 보결분자단 복합체의 실례는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함한다; 적합한 형광 물질의 실례는 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시안산염, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 염화물 또는 피코에리트린을 포함한다; 발광 물질의 실례는 루미놀을 포함한다; 그리고 적합한 방사성 물질의 실례는 3H, 14C, 35S, 90Y, 99Tc, 111In, 125I, 131I, 177Lu, 166Ho, 또는 153Sm을 포함한다.

[0096] 본 발명의 결합 단백질은 한 구체예에서, 시험관내와 생체내 둘 모두에서 항원의 활성을 중화시킬 수 있다. 따라서, 이런 FIT-Ig는 예로서, 항원을 내포하는 세포 배양액에서, 인간 개체에서 또는 본 발명의 결합 단백질이 교차 반응하는 항원을 갖는 다른 포유류 개체에서 항원 활성을 저해하는데 이용될 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명은 항원 활성이 유해한 질환 또는 장애로 고통받는 개체에서 항원 활성을 감소시키기 위한 방법을 제공한다. 본 발명의 결합 단백질은 치료적 목적으로 인간 개체에 투여될 수 있다.

[0097] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "항원 활성이 유해한 장애"는 이러한 장애로 고통받는 개체에서 항원의 존재가 장애의 병태생리학을 책임지거나 또는 장애의 악화에 기여하는 인자인 것으로 나타났거나 또는 의심되는 질환 및 다른 장애를 포함하는 것으로 의도된다. 따라서, 항원 활성이 유해한 장애는 항원 활성의 감소가 장애의 증상 및/또는 진행을 경감할 것으로 예상되는 장애이다. 이런 장애는 예로서, 장애로 고통받는 개체의 생물학적 유체 내에 항원의 농도에서 증가 (가령, 개체의 혈청, 혈장, 윤활액 등에서 항원의 농도에서 증가)에 의해 증거될 수 있다. 본 발명의 결합 단백질로 치료될 수 있는 장애의 무제한적 실례는 아래에서 및 본 발명의 항체의 약학적 조성물에 관계하는 섹션에서 논의된 장애를 포함한다.

[0098] 본 발명의 FIT-Ig는 하나의 항원 또는 복수 항원에 결합할 수 있다. 이런 항원은 다음의 데이터베이스에서 열거된 표적을 포함하지만 이들에 한정되지 않고, 이들 데이터베이스는 본원에 참조로서 편입된다. 이들 표적 데이터베이스는 다음의 목록을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다:

[0099] ● 치료 표적 (http://xin.cz3.nus.edu.sg/group/cjttd/ttd.asp);

[0100] ● 사이토킨 및 사이토킨 수용체 (http://www.cytokinewebfacts.com/, http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi, 그리고

[0101] ● http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/cgf/CGF_Database/cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/indexR.html);

[0102] ● 케모킨 (http://cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/CK/Chemokine.html);

[0103] ● 케모킨 수용체 및 GPCRs (http://csp.medic.kumamoto-u.ac.jp/CSP/Receptor.html, http://www.gpcr.org/7tm/);

[0104] ● 후각 수용기 (http://senselab.med.yale.edu/senselab/ORDB/default.asp);

[0105] ● 수용체 (http://www.iuphar-db.org/iuphar-rd/list/index.htm);

[0106] ● 암 표적 (http://cged.hgc.jp/cgi-bin/input.cgi);

[0107] ● 잠재적 항체 표적으로서 분비된 단백질 (http://spd.cbi.pku.edu.cn/);

[0108] ● 단백질 키나아제 (http://spd.cbi.pku.edu.cn/), 그리고

[0109] ● 인간 CD 마커 (http://content.labvelocity.com/tools/6/1226/CD_table_final_locked.pdf) 및 (Zola H, 2005 CD molecules 2005: human cell differentiation molecules Blood, 106:3123-6).

[0110] FIT-Ig는 효력/안전성을 증강하고 및/또는 환자 적용범위를 증가하기 위해, 2개의 상이한 표적을 동시에 차단하는 치료적 작용제로서 유용하다. 이런 표적은 가용성 표적 (IL-13 및 TNF) 및 세포 표면 수용체 표적 (VEGFR 및 EGFR)을 포함할 수 있다. 이것은 또한, 암 요법을 위해 종양 세포 및 T 세포 (Her2 및 CD3) 사이에, 또는 자가면역/이식을 위해 자가반응성 세포 및 작동체 세포 사이에, 또는 임의의 소정의 질환에서 질환 유발 세포를 제거하기 위해 임의의 표적 세포 및 작동체 세포 사이에 전향된 세포독성을 유도하는데 이용될 수 있다.

[0111] 이에 더하여, FIT-Ig는 이것이 동일한 수용체 상에서 2개의 상이한 에피토프를 표적으로 하도록 설계될 때, 수용체 군집화 및 활성화를 촉발하는데 이용될 수 있다. 이것은 효현성 및 길항성 항-GPCR 치료제를 만드는데 있어서 이익을 가질 수 있다. 이러한 경우에, FIT-Ig는 군집화/신호전달 (2개의 세포 표면 분자) 또는 신호전달 (1개의 분자 상에)을 위해 하나의 세포 상에서 2개의 상이한 에피토프를 표적으로 하는데 이용될 수 있다. 유사하게, FIT-Ig 분자는 CTLA-4 세포외 도메인의 2개의 상이한 에피토프 (또는 동일한 에피토프의 2개 사본)을 표적으로 하여 면역 반응의 하향조절을 야기함으로써 CTLA-4 결찰, 그리고 음성 신호를 촉발하도록 설계될 수 있다. CTLA-4는 다수의 면역학적 장애의 치료적 처치를 위한 임상적으로 검증된 표적이다. CTLA-4/B7 상호작용은 세포 주기 진행, IL-2 생산, 그리고 활성화 이후에 T 세포의 증식을 약화시킴으로써 T 세포 활성화를 음성으로 조절하고, 그리고 CTLA-4 (CD152) 포용은 T 세포 활성화를 하향조절하고 면역 관용의 유도를 증진할 수 있다. 하지만, CTLA-4의 효현성 항체 포용에 의해 T 세포 활성화를 약화시키는 전략은 실패하였는데, 그 이유는 CTLA-4 활성화가 결찰을 필요로 하기 때문이다. CTLA-4/B7의 분자 상호작용은 결정 구조 분석 (Stamper 2001 Nature410:608)에 의해 증명된 바와 같이, "편중된 지퍼" 어레이이다. 하지만, 항-CTLA-4 단일클론 항체를 비롯하여, 현재 가용한 CTLA-4 결합 시약 중에서 어느 것도 결찰 성질을 갖지 않는다. 이러한 문제를 다루려는 여러 시도가 있었다. 한 가지 경우에, 세포 구성원-결합된 단일 사슬 항체가 산출되었고, 그리고 생쥐에서 동종이계 거부반응을 유의미하게 저해하였다 (Hwang 2002 JI 169:633). 별개의 사례에서, CTLA-4에 대한 인공 APC 표면-연결된 단일 사슬 항체가 산출되었고 T 세포 반응을 약화시키는 것으로 증명되었다 (Griffin 2000 JI 164:4433). 양쪽 사례에서, CTLA-4 결찰은 인공 시스템에서 가깝게 국부화된 구성원-결합된 항체들에 의해 달성되었다. 이들 실험이 CTLA-4 음성 신호전달을 촉발함에 의한 면역 하향조절에 대한 개념 증거를 제공하긴 하지만, 이들 보고에서 이용된 시약은 치료적 이용에 적합하지 않다. 이를 위해, CTLA-4 결찰이 CTLA-4 세포외 도메인의 2개의 상이한 에피토프 (또는 동일한 에피토프의 2개 사본)를 표적으로 하는 FIT-Ig 분자를 이용함으로써 달성될 수 있다. 이론적 근거는 IgG의 두 결합 부위에 걸쳐있는 거리, 대략 150-170Å이 CTLA-4의 활성 결찰이 발생하기에는 너무 크다는 점이다 (2개의 CTLA-4 동종이합체 사이에 30-50 Å). 하지만 FIT-Ig (한쪽 팔) 상에서 두 결합 부위 사이에 거리는 30-50 Å 범위로 훨씬 짧고, CTLA-4의 적절한 결찰을 허용한다.

[0112] 유사하게, FIT-Ig는 세포 표면 수용체 복합체의 2개의 상이한 구성원 (가령, IL-12R 알파와 베타)을 표적으로 할 수 있다. 게다가, FIT-Ig는 표적 가용성 단백질/병원체의 급속한 소실을 주동하기 위해 CR1 및 가용성 단백질/병원체를 표적으로 할 수 있다.

[0113] 추가적으로, 본 발명의 FIT-Ig는 세포내 전달 (내재화 수용체 및 세포내 분자를 표적화), 뇌 내부에 전달 (혈액 뇌 장벽을 교차하기 위해 트랜스페린 수용체 및 CNS 질환 매개체를 표적화)을 비롯하여, 조직 특이적 전달 (증강된 국부 PK, 따라서 더욱 높은 효력 및/또는 더욱 낮은 독성을 위해 조직 마커 및 질환 매개체를 표적으로 한다)에 이용될 수 있다. FIT-Ig은 또한, 항원의 비-중화 에피토프에 결합을 통해 항원을 특정한 위치로 전달하고, 또한 항원의 반감기를 증가시키는 운반 단백질로서 역할을 할 수 있다. 게다가, FIT-Ig는 환자 내로 이식된 의료 장치에 물리적으로 연결되거나 또는 이들 의료 장치를 표적으로 하도록 설계될 수 있다 (Burke, Sandra E.; Kuntz, Richard E.; Schwartz, Lewis B. Zotarolimus (ABT-578) eluting stents. Advanced Drug Delivery Reviews (2006), 58(3), 437-446. ; Surface coatings for biological activation and functionalization of medical devices. Hildebrand, H. F.; Blanchemain, N.; Mayer, G.; Chai, F.; Lefebvre, M.; Boschin, F. Surface and Coatings Technology (2006), 200(22-23), 6318-6324. ; Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis. Wu, Peng; Grainger, David W. Biomaterials (2006), 27(11), 2450-2467. ; Mediation of the cytokine network in the implantation of orthopedic devices. Marques, A. P.; Hunt, J. A.; Reis, Rui L. Biodegradable Systems in Tissue

Engineering and Regenerative Medicine (2005), 377-397; Page: 52

[0114] Mediation of the cytokine network in the implantation of orthopedic devices. Marques, A. P.; Hunt, J. A.; Reis, Rui L. Biodegradable Systems in Tissue Engineering 및 Regenerative Medicine (2005), 377-397.) 간단히 말하면, 적절한 유형의 세포를 의학적 이식물의 부위로 지향시키는 것은 치유하고 정상적인 조직 기능을 복원하는 것을 증진할 수 있다. 대안으로, 장치에 연계된 또는 표적화된 FIT-Ig에 의해 장치 이식 시에 방출되는 매개체 (사이토킨을 포함하지만 이들에 한정되지 않음)의 저해 역시 제공된다. 가령, 스텐트가 차단된 동맥을 청소하고 심장 근육으로 혈액의 흐름을 향상시키기 위한 중재적 심장학에서 수년 동안 이용되었다. 하지만, 전통적인 나금속 스텐트는 일부 환자에서 재협착 (치료된 구역에서 동맥의 재좁아짐)을 유발하는 것으로 알려져 있었고 혈전을 야기할 수 있다. 최근에, 혈액 전역에서 순환하는 내피 선조체 세포 (EPC)를 포획함으로써 재협착을 감소시키고 혈전이 발생하는 것을 예방하는 항-CD34 항체 코팅된 스텐트가 설명되었다. 내피 세포는 혈관에 정렬하고, 혈액이 부드럽게 흐르도록 허용하는 세포이다. EPC는 스텐트의 단단한 표면에 부착되어 부드러운 층을 형성하는데, 이것은 치유를 증진할 뿐만 아니라 스텐트의 이용과 이전에 연관되었던 합병증인 재협착 및 혈전을 예방한다 (Aoji et al . 2005 J Am Coll Cardiol. 45(10):1574-9). 스텐트를 필요로 하는 환자에 대한 결과를 향상시키는 것에 더하여, 심혈관 우회로 조성술을 필요로 하는 환자에 대한 함의 또한 있다. 가령, 항-EPC 항체로 코팅된 보철 맥관 도관 (인공 동맥)은 우회로 조성술 이식편을 위해 환자 다리 또는 팔로부터 동맥을 이용하는 필요를 제거할 것이다. 이것은 수술 및 마취 횟수를 감소시킬 것이고, 이로 인해 차례로, 관상 수술 사망자가 감소될 것이다. FIT-Ig는 이것이 세포 표면 마커 (가령, CD34)뿐만 아니라, 세포 모집을 용이하게 하기 위해 이식된 장치 상에 코팅되었던 단백질 (또는 지질 및 다당류를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 임의의 종류의 에피토프)에 결합하는 방식으로 설계된다. 이런 접근법은 또한, 일반적으로 다른 의학적 이식물에 적용될 수 있다. 대안으로, FIT-Ig는 의료 장치 상에 코팅될 수 있고, 그리고 이식 및 장치로부터 모든 FIT의 방출 (또는 이미 적하된 FIT-Ig의 노화 및 변성을 비롯하여, 추가 새로운 FIT-Ig를 필요로 할 수 있는 임의의 다른 필요 시에), 상기 장치는 환자에 새로운 FIT-Ig의 전신 투여에 의해 재부하될 수 있었고, 여기서 FIT-Ig는 한 세트의 결합 부위를 갖는 관심되는 표적 (사이토킨, 세포 표면 마커 (가령, CD34) 등) 및 다른 세트의 결합 부위를 갖는, 장치 상에 코팅된 표적 (지질, 다당류 및 중합체를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 단백질, 임의의 종류의 에피토프 포함)에 결합하도록 설계된다. 이러한 기술은 코팅된 이식물의 유용성을 연장하는 이점을 갖는다.

[0115] 본 발명의 FIT-Ig 분자는 또한, 다양한 질환을 치료하기 위한 치료적 분자로서 유용하다. 이런 FIT-Ig 분자는 특정한 질환에 관련된 하나 또는 그 이상의 표적에 결합할 수 있다. 다양한 질환에서 이런 표적의 실례가 아래에 설명된다.

[0116] C5, CCL1 (I-309), CCL11 (에오탁신), CCL13 (mcp-4), CCL15 (MIP-1d), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19, CCL2 (mcp-1), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (MIP-2), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2 / 에오탁신-2), CCL25 (TECK), CCL26, CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (mcp-3), CCL8 (mcp-2), CXCL1, CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC / IP-9), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL2, CXCL3, CXCL5 (ENA-78 / LIX), CXCL6 (GCP-2), CXCL9, IL13, IL8, CCL13 (mcp-4), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CX3CR1, IL8RA, XCR1 (CCXCR1), IFNA2, IL10, IL13, IL17C, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9, IL22, IL5, IL8, IL9, LTA, LTB, MIF, SCYE1 (내피 단핵구-활성화 사이토킨), SPP1, TNF, TNFSF5, IFNA2, IL10RA, IL10RB, IL13, IL13RA1, IL5RA, IL9, IL9R, ABCF1, BCL6, C3, C4A, CEBPB, CRP, ICEBERG, IL1R1, IL1RN, IL8RB, LTB4R, TOLLIP, FADD, IRAK1, IRAK2, MYD88, NCK2, TNFAIP3, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF5, TRAF6, ACVR1, ACVR1B, ACVR2, ACVR2B, ACVRL1, CD28, CD3E, CD3G, CD3Z, CD69, CD80, CD86, CNR1, CTLA-4, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, FCGR3A, GPR44, HAVCR2, OPRD1, P2RX7, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, BLR1, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CX3CL1, CX3CR1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCR4, GPR2, SCYE1, SDF2, XCL1, XCL2, XCR1, AMH, AMHR2, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2, C19orf10 (IL27w), CER1, CSF1, CSF2, CSF3, DKFZp451J0118, FGF2, GFI1, IFNA1, IFNB1, IFNG, IGF1, IL1A, IL1B, IL1R1, IL1R2, IL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3, IL4, IL4R, IL5, IL5RA, IL6, IL6R, IL6ST, IL7, IL8, IL8RA, IL8RB, IL9, IL9R, IL10, IL10RA, IL10RB, IL11, IL11RA, IL12A, IL12B, IL12RB1, IL12RB2, IL13, IL13RA1, IL13RA2, IL15, IL15RA, IL16, IL17, IL17R, IL18, IL18R1, IL19, IL20, KITLG, LEP, LTA, LTB, LTB4R, LTB4R2, LTBR, MIF, NPPB, PDGFB, TBX21, TDGF1, TGFA, TGFB1, TGFB1I1, TGFB2, TGFB3, TGFBI, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, TH1L, TNF, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF7, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFRSF11A, TNFRSF21,

TNFSF4, TNFSF5, TNFSF6, TNFSF11, VEGF, ZFPM2, 그리고 RNF110 (ZNF144)을 비롯한 많은 단백질이 일반적인 자가면역 및 염증 반응에 연루되었다. 상기 열거된 표적 중에서 하나 또는 그 이상에 결합할 수 있는 FIT-Igs 또한 예기된다.

[0117] 알레르기 천식은 호산구증가증의 존재, 술잔 세포 이형성, 상피 세포 변경, 기도 과다반응 (AHR), 그리고 Th2 및 Th1 사이토킨 발현뿐만 아니라 상승된 혈청 IgE 수준에 의해 특징화된다. 현재, 기도 염증이 염증 세포, 예를 들면, T 세포, B 세포, 호산구, 비만 세포 및 대식세포, 그리고 사이토킨 및 케모킨을 비롯한 이들의 분비된 매개체의 복합적 상호작용을 수반하는, 천식의 병인에 근원적인 핵심 인자인 것으로 폭넓게 인정된다. 코르티코스테로이드가 현재, 천식에 대한 가장 중요한 항염증성 치료제이긴 하지만, 이들의 작용 기전은 비특이적이고 특히, 소아 환자 개체군에서 안정성 우려가 존재한다. 이런 이유로, 더욱 특정하고 표적화된 요법의 개발이 보증된다. 생쥐에서 IL-13이 호산성 염증과는 관계없이, AHR, 점액 분비과다 및 기도 섬유증을 비롯한 천식의 많은 특질을 모방한다는 것을 뒷받침하는 증가하는 증거가 있다 (Finotto et al., International Immunology (2005), 17(8), 993-1007; Padilla et al., Journal of Immunology (2005), 174(12), 8097-8105).

[0118] IL-13은 천식과 연관된 병리학적 반응을 유발함에 있어서 중심적인 역할을 하는 것으로 연루되었다. 폐에서 IL-13의 효과를 감소시키기 위한 항-IL-13 단일클론 항체 요법의 개발은 천식에 대한 신규한 치료법으로서 상당한 희망을 제공하는 흥미로운 새로운 접근법이다. 하지만 차별적 면역학적 경로의 다른 매개체 역시 천식 병인에 관련되고, 그리고 IL-13에 더하여, 이들 매개체를 차단하는 것은 추가 치료적 이익을 제공할 수 있다. 이런 표적 쌍은 IL-13 및 친염증성 사이토킨, 예를 들면, 종양 괴사 인자-α (TNF-α)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. TNF-α는 천식에서 염증 반응을 증폭할 수 있고 질환 심각도에 연계될 수 있다 (McDonnell, et al., Progress in Respiratory Research (2001), 31(New Drugs for Asthma, Allergy and COPD), 247-250.). 이것은 IL-13 및 TNF-α 둘 모두를 차단하는 것이 특히, 심각한 기도 질환에서 유익한 효과를 가질 수 있다는 것을 암시한다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 FIT-Ig는 표적 IL-13 및 TNFα에 결합하고 천식을 치료하는데 이용된다.

[0119] 동물 모형, 예를 들면, OVA-유도된 천식 생쥐 모형 (여기서 염증 및 AHR 둘 모두 사정될 수 있다)은 당분야에서 공지되고, 그리고 천식을 치료하는 다양한 FIT-Ig 분자의 능력을 결정하는데 이용될 수 있다. 천식을 연구하기 위한 동물 모형은 Coffman, et al., Journal of Experimental Medicine (2005), 201(12), 1875-1879; Lloyd, et al., Advances in Immunology (2001), 77, 263-295; Boyce et al., Journal of Experimental Medicine (2005), 201(12), 1869-1873; 그리고 Snibson, et al., Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology (2005), 35(2), 146-52에서 개시된다. 이들 표적 쌍의 일과적인 안전성 사정에 더하여, 면역억제의 정도에 대한 특정한 시험이 보증되고, 그리고 최고 표적 쌍을 선별하는데 도움이 될 수 있다 (참조: Luster et al., Toxicology (1994), 92(1-3), 229-43; Descotes, et al., Developments in biological standardization (1992), 77 99-102; Hart et al., Journal of Allergy and Clinical Immunology (2001), 108(2), 250-257).

[0120] 상기 개시된 이론적 근거에 근거하고 효력 및 안전성에 대한 동일한 평가 모형을 이용하여, FIT-Ig 분자가 결합하고 천식을 치료하는데 유용할 수 있는 표적의 다른 쌍이 결정될 수 있다. 바람직하게는, 이런 표적은 IL-13 및 IL-1베타, 그 이유는 IL-1베타 역시 천식에서 염증 반응에 연루되기 때문이다; IL-13 및 염증에 관련되는 사이토킨 및 케모킨, 예를 들면, IL-13 및 IL-9; IL-13 및 IL-4; IL-13 및 IL-5; IL-13 및 IL-25; IL-13 및 TARC; IL-13 및 MDC; IL-13 및 MIF; IL-13 및 TGF-β; IL-13 및 LHR 효현제; IL-13 및 CL25; IL-13 및 SPRR2a; IL-13 및 SPRR2b; 그리고 IL-13 및 ADAM8을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 본 발명은 또한, CSF1 (MCSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), FGF2, IFNA1, IFNB1, IFNG, 히스타민 및 히스타민 수용체, IL1A, IL1B, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12A, IL12B, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18, IL19, KITLG, PDGFB, IL2RA, IL4R, IL5RA, IL8RA, IL8RB, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL18R1, TSLP, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22, CCL24,CX3CL1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, XCL1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CX3CR1, GPR2, XCR1, FOS, GATA3, JAK1, JAK3, STAT6, TBX21, TGFB1, TNFSF6, YY1, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, LTB4R, TB4R2, LTBR, 그리고 키틴분해효소로 이루어진 군으로부터 선택되는, 천식에 관련된 하나 또는 그 이상의 표적에 결합할 수 있는 FIT-Ig를 예기한다.

[0121] 전신병인 류마티스성 관절염 (RA)은 관절의 윤활막에서 만성 염증성 반응에 의해 특징화되고 연골의 변성 및 관절근접 뼈의 부식과 연관된다. TNF, 케모킨 및 성장 인자를 비롯한 많은 친염증성 사이토킨이 병든 관절에서 발현된다. RA의 생쥐 모형에 항-TNF 항체 또는 sTNFR 융합 단백질의 전신 투여는 항염증성 및 관절 보호성인 것으

로 나타났다. RA 환자에서 TNF의 활성이 정맥내 투여된 인플릭시맙, 키메라 항-TNF 단일클론 항체 (mAB)로 차단되었던 임상적 조사 (Harriman G, Harper LK, Schaible TF. 1999 Summary of clinical trials in rheumatoid arthritis using infliximab, an anti-TNFalpha treatment. Ann Rheum Dis 58 Suppl 1:I61-4.)는 TNF가 IL-6, IL-8, MCP-1 및 VEGF 생산, 면역 및 염증 세포의 관절 내로 모집, 혈관형성, 그리고 매트릭스 금속단백질가수분해효소-1 및 -3의 혈액 수준의 감소를 조절한다는 증거를 제공하였다. 류마티스성 관절염에서 염증성 경로의 더욱 우수한 이해는 류마티스성 관절염에 관련된 다른 치료 표적의 확인을 야기하였다. 유망한 치료제, 예를 들면, 인터류킨-6 길항제 (MRA), CTLA4Ig (아바타셉트, Genovese Mc et al 2005 Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition. N Engl J Med. 353:1114-23.), 그리고 항-B 세포 요법 (리툭시맙, Okamoto H, Kamatani N. 2004 Rituximab for rheumatoid arthritis. N Engl J Med. 351:1909)이 지난 한 해 동안 무작위 대조 시험에서 이미 시험되었다. 인터류킨-15, 인터류킨-17 및 인터류킨-18을 비롯한 다른 사이토킨이 확인되었고 동물 모형에서 유익한 것으로 나타났고, 그리고 이들 작용제의 임상 시험이 현재 진행 중에 있다. 항-TNF 및 다른 매개체를 합동하는 이중-특이적 항체 요법은 임상 효능 및/또는 환자 적용범위를 증강하는데 큰 잠재력을 갖는다. 가령, TNF 및 VEGF 둘 모두를 차단하는 것은 염증 및 혈관형성을 잠재적으로 근절할 수 있는데, 이들 둘 모두 RA의 병태생리학에 관련된다. TNF 및 IL-18; TNF 및 IL-12; TNF 및 IL-23; TNF 및 IL-1베타; TNF 및 MIF; TNF 및 IL-17; 그리고 TNF 및 IL-15를 포함하지만 이들에 한정되지 않는, RA에 관련된 표적의 다른 쌍을 특정한 FIT-Ig Ig로 차단하는 것 또한 예기된다. 이들 표적 쌍의 일과적인 안전성 사정에 더하여, 면역억제의 정도에 대한 특정한 시험이 보증되고 최고 표적 쌍을 선별하는데 도움이 될 수 있다 (참조: Luster et al., Toxicology (1994), 92(1-3), 229-43; Descotes, et al., Developments in biological standardization (1992), 77 99-102; Hart et al., Journal of Allergy and Clinical Immunology (2001), 108(2), 250-257). FIT-Ig Ig 분자가 류마티스성 관절염의 치료에 유용할 지의 여부는 전임상 동물 RA 모형, 예를 들면, 콜라겐-유도된 관절염 생쥐 모형을 이용하여 사정될 수 있다. 다른 유용한 모형은 또한, 당분야에서 널리 공지된다 (참조: Brand DD., Comp Med. (2005) 55(2):114-22).

[0122] 전신성 홍반성 루푸스 (SLE)의 면역병원적 홀마크는 다중클론 B 세포 활성화인데, 이것은 고글로불린혈증, 자가항체 생산 및 면역복합체 형성을 야기한다. 근본적인 이상은 전신 T 세포 조절장애로 인해, 금지된 B 세포 클론을 억제하는데 있어서 T 세포의 실패인 것으로 보인다. 이에 더하여, B 및 T-세포 상호작용은 여러 사이토킨, 예를 들면, IL-10뿐만 아니라 두 번째 신호를 개시하는 동시자극성 분자, 예를 들면, CD40 및 CD40L, B7 및 CD28 및 CTLA-4에 의해 가능해진다. 이들 상호작용은 면역복합체 및 아폽토시스성 물질의 손상된 식균 소실과 함께, 결과의 조직 손상을 갖는 면역 반응을 영속시킨다. 다음의 표적이 SLE에 관련될 수 있고, 그리고 치료적 개입을 위한 FIT-Ig 접근법에 잠재적으로 이용될 수 있다: B 세포 표적화된 요법: CD-20, CD-22, CD-19, CD28, CD4, CD80, HLA-DRA, IL10, IL2, IL4, TNFRSF5, TNFRSF6, TNFSF5, TNFSF6, BLR1, HDAC4, HDAC5, HDAC7A, HDAC9, ICOSL, IGBP1, MS4A1, RGS1, SLA2, CD81, IFNB1, IL10, TNFRSF5, TNFRSF7, TNFSF5, AICDA, BLNK, GALNAC4S-6ST, HDAC4, HDAC5, HDAC7A, HDAC9, IL10, IL11, IL4, INHA, INHBA, KLF6, TNFRSF7, CD28, CD38, CD69, CD80, CD83, CD86, DPP4, FCER2, IL2RA, TNFRSF8, TNFSF7, CD24, CD37, CD40, CD72, CD74, CD79A, CD79B, CR2, IL1R2, ITGA2, ITGA3, MS4A1, ST6GAL1, CD1C, CHST10, HLA-A, HLA-DRA, 그리고 NT5E.; 동시자극성 신호: CTLA-4 또는 B7.1/B7.2; B 세포 생존의 저해: BlyS, BAFF; 보체 비활성화: C5; 사이토킨 조정: 핵심 원리는 임의의 조직에서 순 생물학적 반응이 친염증성 또는 항염증성 사이토킨의 국부 수준 사이에 균형의 결과라는 것이다 (참조: Sfikakis PP et al 2005 Curr Opin Rheumatol 17:550-7). SLE는 혈청 IL-4, IL-6, IL-10에서 방증된 상승을 갖는 Th-2 주동된 질환인 것으로 고려된다. IL-4, IL-6, IL-10, IFN-a, 그리고 TNF-a로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 표적에 결합할 수 있는 FIT-Ig Ig 역시 예기된다. 상기 논의된 표적의 조합은 SLE에 대한 치료 효력을 증강할 것이데, 이것은 다수의 루푸스 전임상 모형에서 시험될 수 있다 (참조: Peng SL (2004) Methods Mol Med.;102:227-72).

[0123] 다발성 경화증 (MS)은 거의 알려지지 않은 병인을 갖는 복합적인 인간 자가면역-유형 질환이다. 신경계 전역에서 미엘린 염기성 단백질 (MBP)의 면역학적 파괴가 다발성 경화증의 주요 병리이다. MS는 CD4+ 및 CD8+ T 세포에 의한 침윤을 수반하는 복잡한 병리 및 중추신경계 이내에 반응의 질환이다. CNS에서 사이토킨, 반응성 질소종 및 공동자극 분자의 발현이 MS에서 모두 설명되었다. 주요 고려 사항은 자가면역의 발달에 기여하는 면역학적 기전이다. 특히, 항원 발현, 사이토킨 및 백혈구 상호작용, 그리고 다른 T-세포, 예를 들면, Th1 및 Th2 세포를 균형잡고/조정하는데 도움을 주는 조절 T-세포가 치료 표적 확인을 위한 중요한 분야이다.

[0124] IL-12는 APC에 의해 생산되고 Th1 작동체 세포의 분화를 증진하는 친염증성 사이토킨이다. IL-12는 MS를 앓는 환자의 발달 병변에서 뿐만 아니라 EAE-영향을 받은 동물에서 생산된다. 이전에, IL-12 경로에서 간섭이 설치류에서 EAE를 효과적으로 예방하고, 그리고 항-IL-12 mAb를 이용한 IL-12p40의 생체내 중화가 통상적인 마모셋에

서 미엘린-유도된 EAE 모형에서 유익한 효과를 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0125] TWEAK는 세포 유형에 따라 친염증성, 증식성 또는 아폽토시스성 효과를 갖는, 중추신경계 (CNS)에서 구조성으로 발현된 TNF 패밀리의 구성원이다. 이의 수용체, Fn14는 CNS에서 내피 세포, 반응성 별아교세포 및 뉴런에 의해 발현된다. TWEAK 및 Fn14 mRNA 발현은 실험적 자가면역 뇌척수염 (EAE) 동안 척수에서 증가하였다. C57BL/6 생쥐에서 미엘린 희소돌기아교세포 당단백질 (MOG) 유도된 EAE에서 항-TWEAK 항체 치료는 생쥐가 기폭 시기 후 치료될 때 질환 심각도 및 백혈구 침윤의 감소를 유발하였다.

[0126] 본 발명의 한 가지 양상은 IL-12, TWEAK, IL-23, CXCL13, CD40, CD40L, IL-18, VEGF, VLA-4, TNF, CD45RB, CD200, IFN감마, GM-CSF, FGF, C5, CD52, 그리고 CCR2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상, 바람직하게는 2개의 표적에 결합할 수 있는 FIT-Ig Ig 분자와 관련된다. 바람직한 구체예는 MS의 치료에 유익한 치료적 작용제로서 이중-특이적 항-IL-12/TWEAK FIT-Ig Ig를 포함한다. MS를 치료하는 FIT-Ig 분자의 유용성을 사정하기 위한 여러 동물 모형이 당분야에서 공지된다 (참조: Steinman L, et al., (2005) Trends Immunol. 26(11):565-71; Lublin FD., et al., (1985) Springer Semin Immunopathol.8(3):197-208; Genain CP, et al., (1997) J Mol Med. 75(3):187-97; Tuohy VK, et al., (1999) J Exp Med. 189(7):1033-42; Owens T, et al., (1995) Neurol Clin.13(1):51-73; 그리고 't Hart BA, et al., (2005) J Immunol 175(7):4761-8. 이들 표적 쌍의 일과적인 안전성 사정에 더하여, 면역억제의 정도에 대한 특정한 시험이 보증되고 최고 표적 쌍을 선별하는데 도움이 될 수 있다 (참조: Luster et al., Toxicology (1994), 92(1-3), 229-43; Descotes, et al., Developments in biological standardization (1992), 77 99-102; Jones R. 2000 Rovelizumab (ICOS Corp). IDrugs.3(4):442-6).

[0127] 패혈증의 병태생리학은 그람 음성 생물체 (지질다당류 [LPS], 지질 A, 내독소) 및 그람 양성 생물체 (리포테이코산, 펩티도글리칸) 둘 모두의 외막 성분에 의해 시작된다. 이들 외막 성분은 단핵구의 표면 상에서 CD14 수용체에 결합할 수 있다. 최근에 설명된 toll-유사 수용체에 의해서, 신호가 이후, 세포에 전파되고, 친염증성 사이토킨 종양 괴사 인자-알파 (TNF-알파) 및 인터류킨-1 (IL-I)의 궁극적인 생산을 야기한다. 압도적인 염증성 및 면역 반응은 패혈성 쇼크의 필수적인 특질이고, 그리고 패혈증에 의해 유도된 조직 피해, 복수 장기 부전 및 사망의 병인에서 중심 부분을 수행한다. 사이토킨, 특히 종양 괴사 인자 (TNF) 및 인터류킨 (IL)-1은 패혈성 쇼크의 결정적인 매개체인 것으로 나타났다. 이들 사이토킨은 조직에 대한 직접적인 독성 효과를 갖는다; 이들은 또한, 포스포리파아제 A2를 활성화시킨다. 이런 저런 효과는 혈소판 활성화 인자의 증가된 농도, 산화질소 신타아제 활성의 증진, 호중구에 의한 조직 침윤의 증진, 그리고 호중구 활성의 증진을 야기한다.

[0128] 패혈증 및 패혈성 쇼크의 치료는 임상적 난제로서 남아있고, 그리고 염증 반응을 목표로 하는 생물학적 반응 조절제 (즉, 항-TNF, 항-MIF)로 최근 전향적 시험은 단지 근소한 임상적 이익만을 보여주었다. 최근에, 관심이 면역 억제의 동행 기간을 역전시키는 것을 목표로 하는 요법을 향하여 이동하였다. 실험 동물 및 중환자에서 연구는 림프구양 장기 및 일부 실질성 조직의 증가된 아폽토시스가 이러한 면역 억제, 아네르기, 그리고 장기 시스템 기능장애에 기여한다는 것을 증명하였다. 패혈증 증후군 동안, 림프구 아폽토시스가 IL-2의 부재에 의해, 또는 글루코코르티코이드, 그랜자임, 또는 이른바 '사망' 사이토킨: 종양 괴사 인자 알파 또는 Fas 리간드의 방출에 의해 촉발될 수 있다. 아폽토시스는 세포질 및/또는 미토콘드리아 카스파제의 자가활성화를 통해 진행되는데, 이것은 Bcl-2 패밀리의 친아폽토시스성 및 항아폽토시스성 구성원에 의해 영향을 받을 수 있다. 실험 동물에서, 아폽토시스의 저해제로 치료는 림프구양 세포 아폽토시스를 예방할 수 있을 뿐만 아니라; 결과를 향상시킬 수 있다. 비록 항아폽토시스성 작용제로 임상 시험이 대부분, 그들의 투여 및 조직 표적화와 연관된 기술적 곤란으로 인해 갈 길이 멀긴 하지만, 림프구 아폽토시스의 저해는 패혈성 환자에 대한 매력적인 치료 표적을 나타낸다. 유사하게, 이중-특이적 작용제는 염증성 매개인자 및 아폽토시스성 매개체 둘 모두를 표적으로 하고, 이익을 부가할 수 있었다. 본 발명의 한 가지 양상은 TNF, IL-1, MIF, IL-6, IL-8, IL-18, IL-12, IL-23, FasL, LPS, Toll-유사 수용체, TLR-4, 조직 인자, MIP-2, ADORA2A, CASP1, CASP4, IL10, IL1B, NFKB1, PROC, TNFRSF1A, CSF3, IL10, IL1B, IL6, ADORA2A, CCR3, IL10, IL1B, IL1RN, MIF, NFKB1, PTAFR, TLR2, TLR4, GPR44, HMOX1, 미드킨, IRAK1, NFKB2, SERPINA1, SERPINE1, 그리고 TREM1로 이루어진 군으로부터 선택되는, 패혈증에 관련된 하나 또는 그 이상의 표적, 바람직하게는 2개의 표적에 결합할 수 있는 FIT-Ig Ig와 관련된다. 패혈증에 대한 이런 FIT-Ig Ig의 효력은 당분야에서 공지된 전임상 동물 모형에서 사정될 수 있다 (참조: Buras JA, et al.,(2005) Nat Rev Drug Discov. 4(10):854-65 및 Calandra T, et al., (2000) Nat Med. 6(2):164-70).

[0129] 만성 신경변성 질환은 통상적으로, 뉴런 기능의 진행성 상실 (뉴런 세포 사멸, 탈수초화), 이동성의 상실 및 기억의 상실에 의해 특징화되는 연령-의존성 질환이다. 만성 신경변성 질환 (가령, 알츠하이머병)에 근원적인 기

전의 부상하는 지식은 복합적 병인을 보여주고, 그리고 다양한 인자, 예를 들면, 연령, 혈당 상태, 아밀로이드 생산 및 다합체화, 수용체 RAGE (AGE에 대한 수용체)에 결합하는 진행된 당화-단부 산물 (AGE)의 축적, 증가된 뇌 산화 스트레스, 감소된 대뇌 혈류, 염증성 사이토킨 및 케모킨의 방출을 포함하는 신경염증, 뉴런 기능장애 및 소교 세포 활성화가 이들의 발달 및 진행에 기여하는 것으로 인식되었다. 따라서 이들 만성 신경변성 질환은 복수 세포 유형 및 매개체 사이에 복합적 상호작용을 나타낸다. 이런 질환에 대한 치료 전략은 제한되고, 그리고 염증성 과정을 비특이적 항염증제 (가령, 코르티코스테로이드, COX 저해제) 또는 뉴런 상실 및/또는 시냅스 기능을 예방하는 작용제로 차단하는 것으로 주로 구성된다. 이들 치료는 질환 진행을 중단시키는데 실패한다. 최근 연구는 더욱 표적화된 요법, 예를 들면, 가용성 A-β 펩티드 (A-b 올리고머성 형태 포함)에 대한 항체가 질환 진행을 중단시킬 수 있을 뿐만 아니라 기억을 유지하는데 도움을 줄 수 있다는 것을 암시한다. 이들 예비적 관찰 결과는 하나 이상의 질환 매개체 (가령, A-β 및 친염증성 사이토킨, 예를 들면, TNF)를 표적으로 하는 특정한 요법이 단일 질환 기전 (가령, 가용성 A-β단독)을 표적으로 하는 요법에서 관찰되는 것보다 만성 신경변성 질환에 대한 훨씬 우수한 치료 효력을 제공할 수 있다는 것을 암시한다 (참조: C.E. Shepherd, et al, Neurobiol Aging. 2005 Oct 24; Nelson RB., Curr Pharm Des. 2005;11:3335; William L. Klein.; Neurochem Int. 2002 ;41:345; Michelle C Janelsins, et al., J Neuroinflammation. 2005 ;2:23; Soloman B., Curr Alzheimer Res. 2004;1:149; Igor Klyubin, et al., Nat Med. 2005;11:556-61; Arancio O, et al., EMBO Journal (2004) 1-10; Bornemann KD, et al., Am J Pathol. 2001;158:63; Deane R, et al., Nat Med. 2003;9:907-13; 그리고 Eliezer Masliah, et al., Neuron. 2005;46:857).

[0130] 본 발명의 FIT-Ig 분자는 만성 신경변성 질환, 예를 들면, 알츠하이머병에 관련된 하나 또는 그 이상의 표적에 결합할 수 있다. 이런 표적은 AD 병인에 연루된 임의의 매개체 (가용성 또는 세포 표면), 예를 들면, AGE (S100 A, 암포테린), 친염증성 사이토킨 (가령, IL-1), 케모킨 (가령, MCP 1), 신경 재생을 저해하는 분자 (가령, Nogo, RGM A), 신경돌기 성장을 증강하는 분자 (뉴로트로핀)를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. FIT-Ig 분자의 효력은 전임상 동물 모형, 예를 들면, 아밀로이드 전구체 단백질 또는 RAGE를 과다발현하고 알츠하이머병-유사 증상이 발달하는 유전자도입 생쥐에서 검증될 수 있다. 이에 더하여, FIT-Ig 분자가 작제되고 동물 모형에서 효력에 대해 시험될 수 있고, 그리고 최고 치료적 FIT-Ig가 인간 환자에서 시험을 위해 선별될 수 있다. FIT-Ig 분자는 또한, 다른 신경변성 질환, 예를 들면, 파킨슨병의 치료에 이용될 수 있다. 알파-시누클레인이 파킨슨병의 병리에 관련된다. 알파-시누클레인 및 염증성 매개인자, 예를 들면, TNF, IL-1, MCP-1을 표적으로 할 수 있는 FIT-Ig는 파킨슨병에 대한 효과적인 요법으로서 입증될 수 있고 본 발명에서 예기된다.

[0131] 병리학적 기전에 관한 지식의 증가에도 불구하고, 척수 손상 (SCI)은 여전히 치명적인 질환이고, 그리고 높은 의료 수요에 의해 특징화되는 의학적 징조를 나타낸다. 대부분의 척수 손상은 타박상 또는 압축 손상이고, 그리고 일차 손상은 통상적으로, 초기 손상을 더욱 악화시키고 병변 구역의 때때로 10-배보다 많은 유의미한 확대를 유발하는 이차 손상 기전 (염증성 매개인자, 예를 들면, 사이토킨 및 케모킨)이 뒤따른다. SCI에서 이들 일차와 이차 기전은 다른 수단, 예를 들면, 뇌졸중에 의해 유발된 뇌 손상에서 것들과 매우 유사하다. 어떤 만족스러운 치료도 존재하지 않고, 그리고 메틸프레드니솔론 (MP)의 고분량 일시 주사가 손상후 8 시간의 좁은 시간 윈도우 이내에 이용되는 유일한 요법이다. 이러한 치료는 하지만, 임의의 유의미한 기능적 회복을 유발하지 않으면서, 이차 손상을 단지 예방하는 것으로만 의도된다. 이것은 명백한 효력의 결여, 그리고 차후 감염 및 심각한 조직병리학적 근육 변화를 동반한 면역억제와 같은 심각한 부정적인 효과로 인해 많은 비판을 받고 있다. 내인성 재생 잠재력을 자극하는 어떤 다른 약물, 생물제제 또는 소형 분자도 승인된 적이 없지만, 유망한 치료 원리 및 약물 후보가 최근에, SCI의 동물 모형에서 효력을 보여주었다. 상당한 정도까지, 인간 SCI에서 기능적 회복의 결여는 병변 부위에서, 반흔 조직에서, 미엘린에서 뿐만 아니라 손상-연관된 세포에서 신경돌기 성장을 저해하는 인자에 의해 유발된다. 이런 인자는 미엘린-연관된 단백질 NogoA, OMgp 및 MAG, RGM A, 반흔-연관된 CSPG (콘드로이틴 황산염 프로테오글리칸), 그리고 반응성 별아교세포에서 저해성 인자 (일부 세마포린 및 에프린)이다. 하지만, 병변 부위에서 성장 저해성 분자뿐만 아니라 신경돌기 성장 자극 인자, 예를 들면, 뉴로트로핀, 라미닌, L1 등이 발견된다. 신경돌기 성장 저해성 및 성장 증진성 분자의 이러한 앙상블은 NogoA 또는 RGM A와 같은 단일 인자를 차단하는 것이 설치류 SCI 모형에서 유의미한 기능적 회복을 유발하였다는 것을 설명할 수 있는데, 그 이유는 저해성 영향의 감소가 균형을 성장 저해로부터 성장 증진으로 이동시킬 수 있었기 때문이다. 하지만, 단일 신경돌기 생장 저해성 분자를 차단하는 것에서 관찰된 회복은 완전하지 않았다. 더욱 빠르고 더욱 확연한 회복을 달성하기 위해, 2가지 신경돌기 생장 저해성 분자, 예를 들면, Nogo 및 RGM A를 차단하거나, 또는 신경돌기 생장 저해성 분자를 차단하고 신경돌기 생장 증강성 분자, 예를 들면, Nogo 및 뉴로트로핀의 기능을 증강하거나, 또는 신경돌기 생장 저해성 분자, 예를 들면, Nogo 및 친염증성 분자, 예를 들면, TNF를 차단하는 것이 바람직할 수 있다 (참조: McGee AW, et al., Trends Neurosci. 2003;26:193; Marco Domeniconi, et

al., J Neurol Sci. 2005;233:43; Milan Makwanal, et al., FEBS J. 2005;272:2628; Barry J. Dickson, Science. 2002;298:1959; Felicia Yu Hsuan Teng, et al., J Neurosci Res. 2005;79:273; Tara Karnezis, et al., Nature Neuroscience 2004; 7, 736; Gang Xu, et al., J. Neurochem.2004; 91; 1018).

[0132] 예기된 다른 FIT-Ig는 표적 쌍, 예를 들면, NgR 및 RGM A; NogoA 및 RGM A; MAG 및 RGM A; OMGp 및 RGM A; RGM A 및 RGM B; CSPGs 및 RGM A; 아그레칸, 미드킨, 뉴로칸, 베르시칸, 포스파칸, Te38 및 TNF-a; 수상돌기 & 축삭돌기 발아를 증진하는 항체와 합동된 Aβ 글로불로머-특이적 항체에 결합할 수 있는 것들이다. 수상돌기 병리는 AD의 극초기 징후이고, 그리고 NOGO A가 수상돌기 성장을 제한하는 것으로 알려져 있다. 이런 유형의 ab는 SCI-후보 (미엘린-단백질) Ab 중에서 한 가지와 합동될 수 있다. 다른 FIT-Ig 표적은 NgR-p75, NgR-Troy, NgR-Nogo66 (Nogo), NgR-Lingo, Lingo-Troy, Lingo-p75, MAG 또는 Omgp의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 추가적으로, 표적은 또한, 신경돌기의 저해에 연루된 임의의 매개체 (가용성 또는 세포 표면), 예를 들면, Nogo, Ompg, MAG, RGM A, 세마포린, 에프린, 가용성 A-b, 친염증성 사이토킨 (가령, IL-1), 케모킨 (가령, MIP 1a), 신경재생을 저해하는 분자를 포함할 수 있다. 항-nogo / 항-RGM A 또는 유사한 FIT-Ig 분자의 효력은 척수 손상의 전임상 동물 모형에서 검증될 수 있다. 이에 더하여, 이들 FIT-Ig 분자는 작제되고 동물 모형에서 효력에 대해 시험될 수 있고, 그리고 최고 치료적 FIT-Ig가 인간 환자에서 시험을 위해 선별될 수 있다. 이에 더하여, 단일 수용체, 예를 들면, 3개의 리간드 Nogo, Ompg 및 MAG에 결합하는 Nogo 수용체, 그리고 A-b 및 S100 A에 결합하는 RAGE 상에서 2개의 상이한 리간드 결합 부위를 표적으로 하는 FIT-Ig 분자가 작제될 수 있다. 게다가, 신경돌기 생장 저해제, 예를 들면, nogo 및 nogo 수용체는 또한, 다발성 경화증과 같은 면역질환에서 신경 재생을 예방하는데 있어서 일정한 역할을 수행한다. nogo-nogo 수용체 상호작용의 저해는 다발성 경화증의 동물 모형에서 회복을 증강하는 것으로 나타났다. 이런 이유로, 하나의 면역 매개체, 예를 들면, IL-12와 같은 사이토킨 및 신경돌기 생장 저해제 분자, 예를 들면, nogo 또는 RGM의 기능을 차단할 수 있는 FIT-Ig 분자는 면역 또는 신경돌기 생장 저해제 분자 단독을 차단하는 것보다 더욱 빠르고 더욱 큰 효력을 제공할 수 있다.

[0133] 단일클론 항체 요법은 암에 대한 중요한 치료적 양상으로서 부상하였다 (von Mehren M, et al 2003 Monoclonal antibody therapy for cancer. Annu Rev Med.;54:343-69). 항체는 아폽토시스, 전향된 세포독성을 유도하거나, 리간드-수용체 상호작용을 간섭하거나, 또는 신생물 표현형에 결정적인 단백질의 발현을 예방함으로써, 항종양 효과를 발휘할 수 있다. 이에 더하여, 항체는 종양 미세환경의 성분을 표적으로 하고, 활력 구조, 예를 들면, 종양-연관된 맥관구조의 형성을 섭동할 수 있다. 항체는 또한, 리간드가 성장 인자인 수용체, 예를 들면, 표피 성장 인자 수용체를 표적으로 할 수 있다. 항체는 따라서, 세포 성장을 자극하는 자연 리간드가 표적화된 종양 세포에 결합하는 것을 저해한다. 대안으로, 항체는 항-이디오타입 네트워크, 보체 매개된 세포독성, 또는 항체-의존성 세포 세포독성 (ADCC)을 유도할 수 있다. 2개의 별개의 종양 매개체를 표적으로 하는 이중-특이적 항체의 이용은 아마도, 단일특이적 요법과 비교하여 추가 이익을 제공할 것이다. 종양학적 질환을 치료하기 위해 표적의 다음의 쌍에 결합할 수 있는 FIT-Ig Ig 역시 예기된다: IGF1 및 IGF2; IGF1/2 및 ErbB2; VEGFR 및 EGFR; CD20 및 CD3, CD138 및 CD20, CD38 및 CD20, CD38 & CD138, CD40 및 CD20, CD138 및 CD40, CD38 및 CD40. 다른 표적 조합은 EGF/erb-2/erb-3 패밀리의 하나 또는 그 이상의 구성원을 포함한다. FIT-Ig Ig가 결합할 수 있는, 종양학적 질환에 관련된 다른 표적 (하나 또는 그 이상)은 다음과 같이 이루어진 군으로부터 선택되는 것들을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다: CD52, CD20, CD19, CD3, CD4, CD8, BMP6, IL12A, IL1A, IL1B, IL2, IL24, INHA, TNF, TNFSF10, BMP6, EGF, FGF1, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF2, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, GRP, IGF1, IGF2, IL12A, IL1A, IL1B, IL2, INHA, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, VEGF, CDK2, EGF, FGF10, FGF18, FGF2, FGF4, FGF7, IGF1, IGF1R, IL2, VEGF, BCL2, CD164, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, CDKN3, GNRH1, IGFBP6, IL1A, IL1B, ODZ1, PAWR, PLG, TGFB1I1, AR, BRCA1, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK9, E2F1, EGFR, ENO1, ERBB2, ESR1, ESR2, IGFBP3, IGFBP6, IL2, INSL4, MYC, NOX5, NR6A1, PAP, PCNA, PRKCQ, PRKD1, PRL, TP53, FGF22, FGF23, FGF9, IGFBP3, IL2, INHA, KLK6, TP53, CHGB, GNRH1, IGF1, IGF2, INHA, INSL3, INSL4, PRL, KLK6, SHBG, NR1D1, NR1H3, NR1I3, NR2F6, NR4A3, ESR1, ESR2, NR0B1, NR0B2, NR1D2, NR1H2, NR1H4, NR1I2, NR2C1, NR2C2, NR2E1, NR2E3, NR2F1, NR2F2, NR3C1, NR3C2, NR4A1, NR4A2, NR5A1, NR5A2, NR6A1, PGR, RARB, FGF1, FGF2, FGF6, KLK3, KRT1, APOC1, BRCA1, CHGA, CHGB, CLU, COL1A1, COL6A1, EGF, ERBB2, ERK8, FGF1, FGF10, FGF11, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF2, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, GNRH1, IGF1, IGF2, IGFBP3, IGFBP6, IL12A, IL1A, IL1B, IL2, IL24, INHA, INSL3, INSL4, KLK10, KLK12, KLK13, KLK14, KLK15, KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK9, MMP2, MMP9, MSMB, NTN4, ODZ1, PAP, PLAU, PRL, PSAP, SERPINA3, SHBG, TGFA, TIMP3, CD44, CDH1, CDH10, CDH19, CDH20, CDH7, CDH9, CDH1, CDH10, CDH13, CDH18, CDH19, CDH20, CDH7, CDH8, CDH9, ROBO2, CD44, ILK, ITGA1,

APC, CD164, COL6A1, MTSS1, PAP, TGFB1I1, AGR2, AIG1, AKAP1, AKAP2, CANT1, CAV1, CDH12, CLDN3, CLN3, CYB5, CYC1, DAB2IP, DES, DNCL1, ELAC2, ENO2, ENO3, FASN, FLJ12584, FLJ25530, GAGEB1, GAGEC1, GGT1, GSTP1, HIP1, HUMCYT2A, IL29, K6HF, KAI1, KRT2A, MIB1, PART1, PATE, PCA3, PIAS2, PIK3CG, PPID, PR1, PSCA, SLC2A2, SLC33A1, SLC43A1, STEAP, STEAP2, TPM1, TPM2, TRPC6, ANGPT1, ANGPT2, ANPEP, ECGF1, EREG, FGF1, FGF2, FIGF, FLT1, JAG1, KDR, LAMA5, NRP1, NRP2, PGF, PLXDC1, STAB1, VEGF, VEGFC, ANGPTL3, BAI1, COL4A3, IL8, LAMA5, NRP1, NRP2, STAB1, ANGPTL4, PECAM1, PF4, PROK2, SERPINF1, TNFAIP2, CCL11, CCL2, CXCL1, CXCL10, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL9, IFNA1, IFNB1, IFNG, IL1B, IL6, MDK, EDG1, EFNA1, EFNA3, EFNB2, EGF, EPHB4, FGFR3, HGF, IGF1, ITGB3, PDGFA, TEK, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFBR1, CCL2, CDH5, COL18A1, EDG1, ENG, ITGAV, ITGB3, THBS1, THBS2, BAD, BAG1, BCL2, CCNA1, CCNA2, CCND1, CCNE1, CCNE2, CDH1 (E-카드헤린), CDKN1B (p27Kip1), CDKN2A (p16INK4a), COL6A1, CTNNB1 (b-카테닌), CTSB (카텝신 B), ERBB2 (Her-2), ESR1, ESR2, F3 (TF), FOSL1 (FRA-1), GATA3, GSN (겔솔린), IGFBP2, IL2RA, IL6, IL6R, IL6ST (당단백질 130), ITGA6 (a6 인테그린), JUN, KLK5, KRT19, MAP2K7 (c-Jun), MKI67 (Ki-67), NGFB (NGF), NGFR, NME1 (NM23A), PGR, PLAU (uPA), PTEN, CTLA-4, OX40, GITR, TIM-3, Lag-3, B7-H3, B7-H4, GDF8, CGRP, Lingo-1, ICOS, GARP, BTLA, CD160, ROR1, SERPINB5 (마스핀), SERPINE1 (PAI-1), TGFA, THBS1 (트롬보스폰딘-1), TIE (Tie-1), TNFRSF6 (Fas), TNFSF6 (FasL), TOP2A (국소이성화효소 Iia), TP53, AZGP1 (아연-a-당단백질), BPAG1 (플렉틴), CDKN1A (p21Wap1/Cip1), CLDN7 (클라우딘-7), CLU (클러스테린), ERBB2 (Her-2), FGF1, FLRT1 (섬유결합소), GABRP (GABAa), GNAS1, ID2, ITGA6 (a6 인테그린), ITGB4 (b 4 인테그린), KLF5 (GC 상자 BP), KRT19 (케라틴 19), KRTHB6 (모발-특이적 유형 II 케라틴), MACMARCKS, MT3 (메탈로티오넥틴-III), MUC1 (점액소), PTGS2 (COX-2), RAC2 (p21Rac2), S100A2, SCGB1D2 (리포필린 B), SCGB2A1 (맘마글로빈 2), SCGB2A2 (맘마글로빈 1), SPRR1B (Spr1), THBS1, THBS2, THBS4, 그리고 TNFAIP2 (B94).

[0134] 한 구체예에서, 본원에서 제공된 조성물 및 방법으로 치료되거나 또는 진단될 수 있는 질환은 유방, 결장, 직장, 폐, 인두중앙부, 하인두, 식도, 위, 췌장, 간, 담낭 및 담관, 소장, 요로 (신장, 방광 및 요로상피 포함), 여성 생식기 (자궁경부, 자궁 및 난소뿐만 아니라 융모막암종 및 임신성 영양막병 포함), 남성 생식기 (전립선, 정낭, 고환 및 생식세포 종양 포함), 내분비선 (갑상선, 부신 및 뇌하수체 포함), 그리고 피부의 암종뿐만 아니라 혈관종, 흑색종, 육종 (뼈 및 연조직으로부터 발생하는 것들뿐만 아니라 카포시 육종 포함), 뇌, 신경, 눈 및 수막의 종양 (성상세포종, 신경교종, 교모세포종, 망막모세포종, 신경종, 신경모세포종, 신경초종 및 수막종 포함), 조혈 악성으로부터 발생하는 고형 종양, 예를 들면, 백혈병, 그리고 림프종 (호지킨 및 비호지킨 림프종 둘 모두)을 비롯한 원발성 및 전이성 암을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0135] 한 구체예에서, 본원에서 제공된 항체 또는 이들의 항원 결합 부분은 단독으로 또는 방사선요법 및/또는 다른 화학요법 작용제와 합동으로 이용될 때, 암을 치료하거나 또는 본원에서 설명된 종양으로부터 전이의 예방에 이용된다.

[0136] 본 발명의 다른 구체예에 따라, 인간 면역 작동체 세포는 인간 림프구양 세포 계통의 구성원이다. 이러한 구체예에서, 작동체 세포는 유리하게는, 인간 T 세포, 인간 B 세포 또는 인간 자연 킬러 (NK) 세포일 수 있다. 유리하게는, 이런 세포는 표적 세포에 대한 세포독성 또는 아폽토시스성 효과를 가질 것이다. 특히 유리하게는, 인간 림프구양 세포는 세포독성 T 세포인데, 이것은 활성화될 때, 표적 세포에 대한 세포독성 효과를 발휘한다. 이러한 구체예에 따라, 이후, 인간 작동체 세포의 동원된 활성은 이러한 세포의 세포독성 활성이다.

[0137] 바람직한 구체예에 따라, 세포독성 T 세포의 활성화는 본 발명의 이러한 구체예의 이중특이적 항체에 의한, 세포독성 T 세포의 표면 상에서 작동체 항원으로서 CD3 항원의 결합을 통해 일어날 수 있다. 인간 CD3 항원은 보조 T 세포 및 세포독성 T 세포 둘 모두에서 존재한다. 인간 CD3은 다분자 T 세포 복합체의 일부로서 T 세포 상에서 발현되고 3개의 상이한 사슬: CD3-엡실론, CD3-델타 및 CD3-감마를 포함하는 항원을 표시한다.

[0138] T 세포의 세포독성 잠재력의 활성화는 복합적 현상인데, 이것은 복수 단백질의 상호작용을 필요로 한다. T 세포 수용체 ("TCR") 단백질은 2개의 상이한 당단백질 아단위로 구성되는 막 결합된 이황화 연결된 이형이합체이다. TCR은 항원 제시 세포 ("APCs")의 표면 상에서, 주요 조직적합성 복합체 ("MHC")에 결합된 외래 펩티드성 항원을 인식하고 여기에 결합하는데, 상기 항원은 그 자체가 MHC 단백질의 고도로 다양한 부류의 구성원에 결합되고 제공되었다.

[0139] 비록 가변적 TCR이 상기 개설된 바와 같이 외래 항원에 결합하긴 하지만, 이러한 결합이 일어났던 T 세포에 신호전달은 TCR과 연관된 다른, 불변, 신호전달 단백질의 존재에 의존한다. 연관된 형태에서 이들 신호전달 단백질은 본원에서 CD3 항원으로서 총칭되는 CD3 복합체로서 총칭된다.

[0140] T 세포 세포독성의 활성화는 이후, 먼저 그 자체가 별개의 세포 상에 위치된 외래 항원에 결합된 MHC 단백질과 TCR의 결합에 정상적으로 의존한다. 이러한 초기 TCR-MHC 결합이 일어났을 때에만, T 세포 클론 확장 및 궁극적으로, T 세포 세포독성을 책임지는 CD3-의존성 신호전달 캐스케이드가 뒤따를 수 있다.

[0141] 하지만, 본 발명의 이중특이적 항체의 첫 번째 또는 두 번째 부분에 의한 인간 CD3 항원의 결합은 독립된 TCR-MHC 결합의 부재에서, T 세포가 다른 세포에 대한 세포독성 효과를 발휘하도록 활성화시킨다. 이것은 T 세포가 클론에 의해 독립된 방식, 다시 말하면, T 세포에 의해 운반된 특정한 TCR 클론과는 관계가 없는 방식으로, 세포독성적으로 활성화될 수 있다는 것을 의미한다. 이것은 단지 일정한 클론 동일성의 특정한 T 세포보다는 전체 T 세포 구획의 활성화를 허용한다.

[0142] 전술한 논의에 비추어, 이후 본 발명의 특히 바람직한 구체예는 작동체 항원이 인간 CD3 항원인 이중특이적 항체를 제공한다. 본 발명의 이러한 구체예에 따른 이중특이적 항체는 총 2 또는 3개의 항체 가변 도메인을 가질 수 있다.

[0143] 본 발명의 추가 구체예에 따라, 본 발명의 이중특이적 항체에 의해 결합된 다른 림프구양 세포-연관된 작동체 항원은 인간 CD16 항원, 인간 NKG2D 항원, 인간 NKp46 항원, 인간 CD2 항원, 인간 CD28 항원 또는 인간 CD25 항원일 수 있다.

[0144] 본 발명의 다른 구체예에 따라, 인간 작동체 세포는 인간 골수성 계통의 구성원이다. 유리하게는, 작동체 세포는 인간 단핵구, 인간 호중구성 과립구 또는 인간 수지상 세포일 수 있다. 유리하게는, 이런 세포는 표적 세포에 대한 세포독성 또는 아폽토시스성 효과를 가질 것이다. 본 발명의 이중특이적 항체에 의해 결합될 수 있는 이러한 구체예에서 유리한 항원은 인간 CD64 항원 또는 인간 CD89 항원일 수 있다.

[0145] 본 발명의 다른 구체예에 따라, 표적 항원은 질환 상태에서 표적 세포 또는 작동체 세포 상에서 독특하게 발현되지만, 건강한 상태에서 비-발현된, 낮은 수준에서 발현된 또는 비-접근가능한 정도로 남아있는 항원이다. 본 발명의 이중특이적 항체에 의해 특이적으로 결합될지도 모르는 이런 표적 항원의 실례는 유리하게는, EpCAM, CCR5, CD19, HER-2 neu, HER-3, HER-4, EGFR, PSMA, CEA, MUC-1 (점액소), MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, βhCG, Lewis-Y, CD20, CD33, CD30, 강글리오시드 GD3, 9-O-아세틸-GD3, GM2, Globo H, 푸코실 GM1, 폴리 SA, GD2, 카르보안하이드라아제 IX (MN/CA IX), CD44v6, 소닉 헤지호그 (Shh), Wue-1, 형질 세포 항원, (막-결합된) IgE, 흑색종 콘드로이틴 황산염 프로테오글리칸 (MCSP), CCR8, TNF-알파 전구체, STEAP, 메소텔린, A33 항원, 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), Ly-6; 데스모글레인 4, E-카드헤린 네오에피토프, 태아 아세틸콜린 수용체, CD25, CA19-9 마커, CA-125 마커 및 뮬러관 저해 물질 (MIS) 수용체 유형 II, sTn (시알화된 Tn 항원; TAG-72), FAP (섬유모세포 활성화 항원), 엔도시알린, EGFRvIII, LG, SAS 및 CD63에서 선택될 수 있다.

[0146] 특정한 구체예에 따라, 이중특이적 항체에 의해 특이적으로 결합된 표적 항원은 암-관련된 항원, 다시 말하면, 악성 상태에 관련된 항원일 수 있다. 이런 항원은 악성 세포 상에서 발현되거나 또는 접근가능하고, 반면 상기 항원은 비악성 세포 상에서 존재하지 않거나, 유의미하게 존재하지 않거나, 또는 접근가능하지 않다. 따라서, 본 발명의 이러한 구체예에 따른 이중특이적 항체는 표적 항원을 보유하거나, 또는 표적 항원을 접근가능하게 만드는 악성 표적 세포에 대항하여 인간 면역 작동체 세포의 활성을 동원하는 이중특이적 항체이다.

[0147] 유전자 요법: 특정한 구체예에서, 본원에서 제공된 결합 단백질 또는 본원에서 제공된 다른 예방적 또는 치료적 작용제를 인코딩하는 핵산 서열이 유전자 요법에 의하여, 장애 또는 이의 하나 또는 그 이상의 증상을 치료하거나, 예방하거나, 관리하거나, 또는 개선하기 위해 투여된다. 유전자 요법은 발현된 또는 발현가능 핵산의 개체에 투여에 의해 수행된 치료를 지칭한다. 이러한 구체예에서, 핵산은 예방적 또는 치료적 효과를 매개하는 본원에서 제공된 그들의 인코딩된 항체 또는 예방적 또는 치료적 작용제를 생산한다.

[0148] 당분야에서 가용한 유전자 요법을 위한 임의의 방법이 본원에서 제공된 방법에서 이용될 수 있다. 유전자 요법의 방법의 전반적인 검토를 위해, Goldspiel et al. (1993) Clin. Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu (1991) Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev (1993) Ann Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan (1993) Science 260:926-932; Morgan and Anderson (1993) Ann Rev. Biochem. 62:191-217; 그리고 May (1993) TIBTECH 11(5):155-215를 참조한다. 이용될 수 있는 재조합 DNA 기술의 당분야에서 통상적으로 공지된 방법은 Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley &Sons, NY (1993); 그리고 Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)에서 설명된다. 유전자 요법의 다양한 방법의 상세한 설명은 US 특허 공개 번호 US20050042664에서 개시된다.

[0149] 진단학: 본원에서 개시는 또한, 진단적 검정 방법, 하나 또는 그 이상의 결합 단백질을 내포하는 진단 키트, 그

리고 자동화된 및/또는 반자동화된 시스템에서 이용을 위한 방법 및 키트의 적응을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 진단적 적용을 제공한다. 제공된 방법, 키트 및 적응은 개체에서 질환 또는 장애의 검출, 모니터링, 및/또는 치료에서 이용될 수 있다. 이것은 아래에 더욱 석명된다.

[0150] A. 검정의 방법: 본 발명은 또한, 본원에서 설명된 바와 같은 최소한 하나의 결합 단백질을 이용한 시험 표본에서, 피분석물, 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도를 결정하기 위한 방법을 제공한다. 당분야에서 공지된 바와 같은 임의의 적절한 검정이 상기 방법에서 이용될 수 있다. 실례는 면역검정 및/또는 질량 분광분석법을 이용한 방법을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 본 발명에 의해 제공된 면역검정은 그 중에서도 특히, 샌드위치 면역검정, 방사면역검정 (RIA), 효소 면역검정 (EIA), 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA), 경쟁적-저해 면역검정, 형광 분극 면역검정 (FPIA), 효소 다중 면역검정 기술 (EMIT), 생물발광 공명 에너지 전달 (BRET), 그리고 균질한 화학발광 검정을 포함할 수 있다. 화학발광 마이크로입자 면역검정, 특히 ARCHITECT® 자동 분석기 (Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill.)를 이용한 것은 면역검정의 실례이다. 질량 분광분석법을 이용한 방법이 본 발명에 의해 제공되고, 그리고 MALDI (매트릭스-보조된 레이저 탈착/이온화) 또는 SELDI (표면-증강된 레이저 탈착/이온화)를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0151] 면역검정 및 질량 분광분석법을 이용하여 생물학적 시험 표본을 수집하고, 취급하고, 처리하고, 그리고 분석하기 위한 방법은 당업자에게 널리 공지될 것이고, 본 발명의 실시를 위해 제공된다 (US 2009-0311253 A1).

[0152] B. 키트: 시험 표본에서 피분석물, 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도에 대해 시험 표본을 검정하기 위한 키트 역시 제공된다. 키트는 피분석물, 또는 이의 단편에 대해 시험 표본을 검정하기 위한 최소한 하나의 성분, 그리고 피분석물, 또는 이의 단편에 대해 시험 표본을 검정하기 위한 사용설명서를 포함한다. 피분석물, 또는 이의 단편에 대해 시험 표본을 검정하기 위한 최소한 하나의 성분은 본원에서 개시된 바와 같은 결합 단백질, 및/또는 항-피분석물 결합 단백질 (또는 이의 단편, 변이체, 또는 변이체의 단편)을 포함하는 조성물을 포함할 수 있고, 상기 조성물은 임의선택적으로, 고체상 위에 고정된다. 임의선택적으로, 키트는 단리된 또는 정제된 피분석물을 포함할 수 있는 구경측정기 또는 컨트롤을 포함할 수 있다. 키트는 면역검정 및/또는 질량 분광분석법에 의해 피분석물에 대해 시험 표본을 검정하기 위한 최소한 하나의 성분을 포함할 수 있다. 피분석물, 결합 단백질, 및/또는 항-피분석물 결합 단백질, 또는 이들의 단편을 포함하는 키트 성분은 임의의 공지된 검출가능한 라벨을 이용하여 임의선택적으로 표지화될 수 있다. 본 발명의 실시를 위해 제공된, 창출을 위한 재료와 방법은 당업자에게 공지될 것이다 (US 2009-0311253 A1).

[0153] C. 키트 및 방법의 적응: 키트 (또는 이의 성분)뿐만 아니라 검정, 예를 들면, 본원에서 설명된 바와 같은 면역검정에 의해 시험 표본에서 피분석물의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 방법은 예로서, U.S. 특허 번호 5,089,424 및 5,006,309에서 설명된 바와 같은, 그리고 예로서, Abbott Laboratories (Abbott Park, Ill.)에 의해 ARCHITECT®로서 상업적으로 시판된 바와 같은 다양한 자동화된 및 반자동화된 시스템 (고체상이 마이크로입자를 포함하는 것들 포함)에서 이용을 위해 적응될 수 있다. Abbott Laboratories로부터 가용한 다른 플랫폼은 AxSYM®, IMx® (가령, U.S. 특허 번호 5,294,404를 참조한다), PRISM®, EIA (비드), 그리고 Quantum™ II뿐만 아니라 다른 플랫폼을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 추가적으로, 이들 검정, 키트 및 키트 성분은 다른 형식에서, 예를 들면, 전기화학적 또는 다른 손바닥크기 또는 현장 진단 검정 시스템에서 이용될 수 있다. 본 발명은 예로서, 샌드위치 면역검정을 수행하는 상업적인 Abbott 현장 진단 (i-STAT®, Abbott Laboratories) 전기화학적 면역검정 시스템에 적용가능하다. 면역센서 및 단일 이용 시험 장치에서 이들의 제조 및 작업 방법은 예로서, U.S. 특허 번호 5,063,081, 7,419,821 및 7,682,833; 그리고 US 공개 번호 20040018577, 20060160164 및 US 20090311253에서 설명된다. 본원에서 설명된 방법의 다른 적합한 변형 및 적응이 명백하고 본원에서 개시된 구체예의 범위로부터 벗어나지 않으면서 적합한 등가물을 이용하여 만들어질 수 있다는 것은 당업자에게 쉽게 명확할 것이다. 일정한 구체예가 현재 상세하게 설명되었기 때문에, 이들은 다음 실시예를 참조하면 더욱 명확하게 이해될 것이고, 이들 실시예는 단지 예시의 목적으로만 포함되고 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0154] 비록 전술한 발명이 이해의 명료함을 위해 예시 및 실례로서 다소간 상세하게 설명되긴 했지만, 본 발명의 교시에 비추어 일정한 변화 및 변형이 첨부된 청구항의 사상 또는 범위로부터 벗어나지 않으면서 만들어질 수 있다는 것은 당업자에게 쉽게 명확할 것이다. 다음 실시예는 제한이 아닌 단지 예시의 방식에 의해 제공된다. 당업자는 변화되거나 또는 변형되어도 본질적으로 유사한 결과를 산출하는 다양한 비-결정적인 파라미터를 쉽게 인식할 것이다.

[0155] **실시예**

[0156] **실시예 1. 항-IL17/IL-20 Fabs-인-탠덤 면역글로불린 (FIT-Ig)의 작제, 발현, 정제, 그리고 분석**

[0157] FIT-Ig 기술을 증명하기 위해, 우리는 일군의 항-IL-17/IL-20 FIT-Ig 분자: FIT1-Ig, FIT2-Ig, 그리고 FIT3-Ig을 산출하였는데, 이들 모두 **도면 1**에서 보여지는 바와 같이, 3개의 상이한 폴리펩티드를 내포하고, 여기서 항원 A는 IL-17이고 항원 B는 IL-20이다. IL-17 및 IL-20에 결합할 수 있는 FIT-Ig를 산출하는데 이용된 DNA 구조체는 **도면 1B**에서 예시된다. 간단히 말하면, 부모 mAb는 2개의 높은 친화성 항체, 항-IL-17 (클론 LY) (U.S. 특허 번호 7,838,638) 및 항-hIL-20 (클론 15D2) (U.S. 특허 출원 공개 번호 US2014/0194599)를 포함하였다. FIT-Ig 구조체 #1을 산출하기 위해, LY의 VL-CL은 직접적으로 (FIT1-Ig), 또는 3개 아미노산 (FIT2-Ig) 또는 7개 아미노산 (FIT3-Ig)의 링커를 통해, 15D2 중쇄의 N 말단에 융합되었다 (**표 1**에서 보여지는 바와 같이). 구조체 #2는 LY의 VH-CH1이고, 그리고 세 번째 구조체는 15D2의 VL-CL이다. 각 FIT-Ig에 대한 이들 3개의 구조체는 293 세포에서 동시형질감염되어, FIT-Ig 단백질의 발현 및 분비를 유발하였다.

[0158] 우리는 또한, 일군의 항-IL-17/IL-20 FIT-Ig 분자: FIT4-Ig, FIT5-Ig, 그리고 FIT6-Ig를 산출하였는데, 이들은 각각, **도면 2**에서 보여지는 바와 같이, 2개의 상이한 폴리펩티드를 내포한다. IL-17 및 IL-20에 결합할 수 있는 FIT-Ig를 산출하는데 이용된 DNA 구조체는 **도면 2B**에서 예시되는데, 여기서 항원 A는 IL-17이고 항원 B는 IL-20이다. 간단히 말하면, 부모 mAb는 2개의 높은 친화성 항체, 항-IL-17 (클론 LY) 및 항-hIL-20 (클론 15D2)을 포함하였다. FIT-Ig 구조체 #1을 산출하기 위해, LY의 VL-CL은 직접적으로 (FIT4-Ig), 또는 3개 아미노산 (FIT5-Ig) 또는 7개 아미노산 (FIT6-Ig)의 링커를 통해, 15D2 중쇄의 N 말단에 융합되었다 (**표 1**에서 보여지는 바와 같이). FIT-Ig 구조체 #4를 산출하기 위해, LY의 VH-CH1은 직접적으로 (FIT4-Ig), 또는 3개 아미노산 (FIT5-Ig) 또는 7개 아미노산 (FIT6-Ig)의 링커를 통해, 15D2 경쇄의 N 말단에 융합되었다. 각 FIT-Ig에 대한 2개의 DNA 구조체 (구조체 #1 및 #4)는 293 세포에서 동시형질감염되어, FIT-Ig 단백질의 발현 및 분비를 유발하였다. PCR 클로닝의 상세한 절차는 아래에 설명된다.

[0159] **실시예 1.1: 항-IL-17/IL-20 FIT-Ig 분자의 분자 클로닝:**

[0160] 구조체 #1 클로닝을 위해, LY 경쇄는 경쇄 신호 서열에서 어닐링하는 전방 프라이머 및 경쇄의 C 말단에서 어닐링하는 후방 프라이머를 이용한 PCR에 의해 증폭되었다. 15D2 중쇄는 15D2 VH의 N 말단에 어닐링하는 전방 프라이머 및 CH의 C 말단에서 어닐링하는 후방 프라이머를 이용한 PCR에 의해 증폭되었다. 이들 2개 PCR 단편은 겔 정제되고, 그리고 신호 펩티드 및 CH 프라이머 쌍을 이용한 중복 PCR에 의해 합동되었다. 합동된 PCR 산물은 인간 Fc 서열을 이미 내포하는 293 발현 벡터 내로 클로닝되었다.

표 1

[0161] **항-IL-17/IL-20 FIT-Ig 분자 및 DNA 구조체.**

FIT-Ig 분자	구조체 #1	링커	구조체 #2	구조체 #3	구조체 #4
FIT1-Ig	VL_{17}-CL-VH_{20}-CH1-Fc	링커 없음	VH_{17}-CH1	VL_{20}-CL	
FIT2-Ig	VL_{17}-CL-링커-VH_{20}-CH1-Fc	GSG	VH_{17}-CH1	VL_{20}-CL	
FIT3-Ig	VL_{17}-CL-링커-VH_{20}-CH1-Fc	GGGGSGS	VH_{17}-CH1	VL_{20}-CL	
FIT4-Ig	VL_{17}-CL-VH_{20}-CH1-Fc	링커 없음			VH_{17}-CH1-VL_{20}-CL
FIT5-Ig	VL_{17}-CL-링커-VH_{20}-CH1-Fc	GSG			VH_{17}-CH1-링커-VL_{20}-CL
FIT6-Ig	VL_{17}-CL-링커-VH_{20}-CH1-Fc	GGGGSGS			VH_{17}-CH1-링커-VL_{20}-CL

[0162] 구조체 #2 클로닝을 위해, LY VH-CH1은 중쇄 신호 서열 펩티드에서 어닐링하는 전방 프라이머 및 CH1의 C 말단에서 어닐링하는 후방 프라이머를 이용한 PCR에 의해 증폭되었다. PCR 산물은 293 발현 벡터 내로 클로닝 전에 겔 정제되었다.

[0163] 구조체 #3의 경우에, 15D2 경쇄는 경쇄 신호 펩티드의 N 말단에 어닐링하는 전방 프라이머 및 CL의 말단에 어닐링하는 후방 프라이머를 이용한 PCR에 의해 증폭되었다. PCR 산물은 293 발현 벡터 내로 클로닝 전에 겔 정제되었다.

[0164] 구조체 #4 클로닝을 위해, LY VH-CH1은 중쇄 신호 펩티드의 N 말단에 어닐링하는 전방 프라이머 및 CH1의 말단에 어닐링하는 후방 프라이머를 이용한 PCR에 의해 증폭되었다. 15D2 VL은 15D2 VL의 말단에 어닐링하는 프라이머를 이용하여 증폭되었다. 양쪽 PCR 산물은 겔 정제되고 중복 PCR에 의해 합동되었다. 합동된 PCR 산물은 겔

정제되고 293 발현 벡터에서 클로닝되었다. **표 2**는 상기 분자 클로닝에 이용된 PCR 프라이머의 서열을 보여준다.

표 2

[0165] **항-IL-17/항-CD20 FIT-Ig의 분자 작제에 이용된 PCR 프라이머**

P1: 5' CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAG 3'	서열번호 1
P2: 5'GCTGGACCTGAGAGCCTGAACCGCCACCACCACACTCTCCCCTGTTGAAGC 3'	서열번호 2
P3: 5' GGTGGTGGCGGTTCAGGCTCTCAGGTCCAGCTTGTGCAATCTGGCGCCGAGG3'	서열번호 3
P4: 5' GTCTGCGGCCGCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAG 3'	서열번호 4
P5: 5' TAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTC 3'	서열번호 5
P6: 5' CGGCGCCAGATTGCACAAGCTGGACCTGGCCTGAACCACACTCTCCCCTGTTGAAGCTC3'	서열번호 6
P7: 5' GCTGGACCTGAGAGCCTGAACCGCCACCACCACACTCTCCCCTGTTGAAGC3'	서열번호 7
P8: 5' GGTGGTGGCGGTTCAGGCTCTCAGGTCCAGCTTGTGCAATCTGGCGCCGAGG3'	서열번호 8
P9: 5' TACCTCGGCGCCAGATTGCACAAGCTGGACCTGACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTG3'	서열번호 9
P10: 5' CATGACACCTTAACAGAGGCCCCAGGTCGTTTTACCTCGGCGCCAGATTGCACAAG3'	서열번호 10
P11: 5' CAATAAGCTTTACATGACACCTTAACAGAGGCCCCAG3'	서열번호 11
P12: 5' TCGAGCGGCCGCTCAACAAGATTTGGGCTCAACTTTCTTG3'	서열번호 12
P13: 5'GCTGCTGCTGTGGTTCCCCGGCTCGCGATGCGCTATACAGTTGACACAGTC3'	서열번호 13
P14: 5' GAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACGCTTGATCTCTACCTTTGTTC 3'	서열번호 14

[0166] hIL-17/hIL-20 FIT1-Ig, FIT2-Ig, FIT3-Ig, FIT4-Ig, FIT5-Ig, 그리고 FIT6-Ig의 최종 서열은 **표 3**에서 열거된다.

표 3

항-IL-17/IL-20 FIT-Ig 분자의 아미노산 서열

단백질 / 단백질 영역	서열 식별자	서열 12345678901234567890
항-IL-17/IL-20 FIT1-Ig 폴리펩티드 #1	서열 번호:15	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLVHSRGNTY LHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFIGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHLPFTFGQGTKLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECQVQ LVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTNDIIHWVRQA PGQRLEWMGWINAGYGNTQYSQNFQDRVSITRDTSAS TAYMELISLRSEDTAVYYCAREPLWFGESSPHDYYGM DVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
LY VL	서열 번호:16	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLVHSRGNTY LHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFIGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHLPFTFGQGTKLEI K
CL	서열 번호:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
링커		없음
15D2 VH	서열 번호:18	QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTNDIIHWV RQAPGQRLEWMGWINAGYGNTQYSQNFQDRVSITRDT SASTAYMELISLRSEDTAVYYCAREPLWFGESSPHDY YGMDVWGQGTTVTVSS
CH1	서열 번호:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
Fc	서열 번호:20	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK*
		QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTDYHIHWV RQAPGQGLEWMGVINPMYGTTDYNQRFKGRVTITADE

[0167]

[0168]

단백질 / 단백질 영역	서열 식별자	서열 12345678901234567890
항-IL-17/IL-20 FIT1-Ig 폴리펩티드 #2	서열 번호:21	STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYDYFTGTGVYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
LY VH	서열 번호:22	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTDYHIHWV RQAPGQGLEWMGVINPMYGTTDYNQRFKGRVTITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYDYFTGTGVYWGQ GTLVTVSS
CH1	서열 번호:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
항-IL-17/IL-20 FIT1-Ig 폴리펩티드 #3	서열 번호:23	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
15D2 VL	서열 번호:24	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK
CL	서열 번호:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
항-IL-17/IL-20 FIT2-Ig 폴리펩티드 #1	서열 번호:25	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLVHSRGNTY LHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFIGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHLPFTFGQGTKLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGSG QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTNDIIHWV RQAPGQRLEWMGWINAGYGNTQYSQNFQDRVSITRDT SASTAYMELISLRSEDTAVYYCAREPLWFGESSPHDY YGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK*
LY VL	서열 번호:16	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLVHSRGNTY LHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFIGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHLPFTFGQGTKLEI K
CL	서열	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA

[0169]

단백질 / 단백질 영역	서열 식별자	서열 12345678901234567890
	번호:17	KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
링커	서열 번호:26	GSG
15D2 VH	서열 번호:18	QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTNDIIHWV RQAPGQRLEWMGWINAGYGNTQYSQNFQDRVSITRDT SASTAYMELISLRSEDTAVYYCAREPLWFGESSPHDY YGMDVWGQGTTVTVSS
CH1	서열 번호:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
Fc	서열 번호:20	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK*
항-IL-17/IL-20 FIT2-Ig 폴리펩티드 #2	서열 번호:21	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTDYHIHWV RQAPGQGLEWMGVINPMYGTTDYNQRFKGRVTITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYDYFTGTGVYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
LY VH	서열 번호:22	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTDYHIHWV RQAPGQGLEWMGVINPMYGTTDYNQRFKGRVTITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYDYFTGTGVYWGQ GTLVTVSS
CH1	서열 번호:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
항-IL-17/IL-20 FIT2-Ig 폴리펩티드 #3	서열 번호:23	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
15D2 VL	서열 번호:24	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK
CL	서열 번호:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
항-IL-17/IL-20 FIT3-Ig 폴리펩티드 #1	서열 번호:27	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLVHSRGNTY LHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFIGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHLPFTFGQGTKLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE

[0170]

단백질 / 단백질 영역	서열 식별자	서열 12345678901234567890
		AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGG GSGSQVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTNDI IHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGNTQYSQNFQDRVSI TRDTSASTAYMELISLRSEDTAVYYCAREPLWFGESS PHDYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK*
LY VL	서열 번호:16	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLVHSRGNTY LHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFIGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHLPFTFGQGTKLEI K
CL	서열 번호:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
링커	서열 번호:28	GGGGSGS
15D2 VH	서열 번호:18	QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTNDIIHWV RQAPGQRLEWMGWINAGYGNTQYSQNFQDRVSITRDT SASTAYMELISLRSEDTAVYYCAREPLWFGESSPHDY YGMDVWGQGTTVTVSS
CH1	서열 번호:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
Fc	서열 번호:20	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK*
항-IL-17/IL-20 FIT3-Ig 폴리펩티드 #2	서열 번호:21	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTDYHIHWV RQAPGQGLEWMGVINPMYGTTDYNQRFKGRVTITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYDYFTGTGVYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
LY VH	서열 번호:22	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTDYHIHWV RQAPGQGLEWMGVINPMYGTTDYNQRFKGRVTITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYDYFTGTGVYWGQ

단백질 / 단백질 영역	서열 식별자	서열 12345678901234567890
		GTLVTVSS
CH1	서열 번호:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
항-IL-17/IL-20 FIT3-Ig 폴리펩티드 #3	서열 번호:23	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
15D2 VL	서열 번호:24	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK
CL	서열 번호:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
항-IL-17/IL-20 FIT4-Ig 폴리펩티드 #1	서열 번호:15	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLVHSRGNTY LHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFIGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHLPFTFGQGTKLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECQVQ LVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTNDIIHWVRQA PGQRLEWMGWINAGYGNTQYSQNFQDRVSITRDTSAS TAYMELISLRSEDTAVYYCAREPLWFGESSPHDYYGM DVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
LY VL	서열 번호:16	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLVHSRGNTY LHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFIGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHLPFTFGQGTKLEI K
CL	서열 번호:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
링커		없음
15D2 VH	서열 번호:18	QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTNDIIHWV RQAPGQRLEWMGWINAGYGNTQYSQNFQDRVSITRDT SASTAYMELISLRSEDTAVYYCAREPLWFGESSPHDY YGMDVWGQGTTVTVSS

[0171]

단백질 / 단백질 영역	서열 식별자	서열 12345678901234567890
CH1	서열 번호:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
Fc	서열 번호:20	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK*
항-IL-17/IL-20 FIT4-Ig 폴리펩티드 #4	서열 번호:29	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTDYHIHWV RQAPGQGLEWMGVINPMYGTTDYNQRFKGRVTITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYDYFTGTGVYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
LY VH	서열 번호:22	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTDYHIHWV RQAPGQGLEWMGVINPMYGTTDYNQRFKGRVTITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYDYFTGTGVYWGQ GTLVTVSS
CH1	서열 번호:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
링커		없음
15D2 VL	서열 번호:24	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK
CL	서열 번호:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
항-IL-17/IL-20 FIT5-Ig 폴리펩티드 #1	서열 번호:25	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLVHSRGNTY LHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFIGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHLPFTFGQGTKLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGSG QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTNDIIHWV RQAPGQRLEWMGWINAGYGNTQYSQNFQDRVSITRDT SASTAYMELISLRSEDTAVYYCAREPLWFGESSPHDY YGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG

[0172]

[0173]

단백질 / 단백질 영역	서열 식별자	서열 12345678901234567890
		TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK*
LY VL	서열 번호:16	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLVHSRGNTY LHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFIGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHLPFTFGQGTKLEI K
CL	서열 번호:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
링커	서열 번호:26	GSG
15D2 VH	서열 번호:18	QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTNDIIHWV RQAPGQRLEWMGWINAGYGNTQYSQNFQDRVSITRDT SASTAYMELISLRSEDTAVYYCAREPLWFGESSPHDY YGMDVWGQGTTVTVSS
CH1	서열 번호:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
Fc	서열 번호:20	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK*
항-IL-17/IL-20 FIT5-Ig 폴리펩티드 #4	서열 번호:30	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTDYHIHWV RQAPGQGLEWMGVINPMYGTTDYNQRFKGRVTITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYDYFTGTGVYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC GSGAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALA WYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
LY VH	서열 번호:22	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTDYHIHWV RQAPGQGLEWMGVINPMYGTTDYNQRFKGRVTITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYDYFTGTGVYWGQ

단백질 / 단백질 영역	서열 식별자	서열 12345678901234567890
		GTLVTVSS
CH1	서열 번호:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
링커	서열 번호:26	GSG
15D2 VL	서열 번호:24	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK
CL	서열 번호:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
항-IL-17/IL-20 FIT6-Ig 폴리펩티드 #1	서열 번호:27	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLVHSRGNTY LHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFIGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHLPFTFGQGTKLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGG GSGSQVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTNDI IHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGNTQYSQNFQDRVSI TRDTSASTAYMELISLRSEDTAVYYCAREPLWFGESS PHDYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK*
LY VL	서열 번호:16	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLVHSRGNTY LHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFIGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHLPFTFGQGTKLEI K
CL	서열 번호:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
링커		GGGGSGS
15D2 VH	서열 번호:18	QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTNDIIHWV RQAPGQRLEWMGWINAGYGNTQYSQNFQDRVSITRDT SASTAYMELISLRSEDTAVYYCAREPLWFGESSPHDY YGMDVWGQGTTVTVSS
CH1	서열 번호:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

[0174]

단백질 / 단백질 영역	서열 식별자	서열 12345678901234567890
Fc	서열 번호:20	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK*
항-IL-17/IL-20 FIT6-Ig 폴리펩티드 #4	서열 번호:31	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTDYHIHWV RQAPGQGLEWMGVINPMYGTTDYNQRFKGRVTITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYDYFTGTGVYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC GGGGSGSAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS SALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
LY VH	서열 번호:22	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTDYHIHWV RQAPGQGLEWMGVINPMYGTTDYNQRFKGRVTITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYDYFTGTGVYWGQ GTLVTVSS
CH1	서열 번호:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
링커	서열 번호:28	GGGGSGS
15D2 VL	서열 번호:24	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK
CL	서열 번호:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

[0175]

[0176] **실시예 1.2: 항-IL-17/IL-20 FIT-Ig 단백질의 발현, 정제, 그리고 분석:**

[0177] 각 FIT-Ig의 모든 DNA 구조체는 pBOS 기초된 벡터 내로 하위클로닝되었고, 그리고 정확도를 담보하기 위해 염기서열결정되었다. 각 FIT-Ig의 구조체 #1, #2 및 #3 (1, 2 및 3), 또는 각 FIT-Ig의 구조체 #1 및 #4 (4, 5 및 6)은 293E 세포에서 폴리에틸렌이민 (PEI)을 이용하여 일시적으로 공동발현되었다. 간단히 말하면, FreeStyle™ 293 발현 배지에서 DNA는 1:2의 DNA 대 PEI 비율의 최종 농도로 PEI와 혼합되고, 실온에서 15분 (20분 이내) 동안 배양되고, 그리고 이후, 60 μg DNA/120ml 배양액에서 293E 세포에 첨가되었다 (1.0-1.2 x 10^6/ml, 세포 생존력 > 95%). 진탕기에서 6-24 시간 배양 후, 펩톤이 37℃, 8% CO_2에서 125 rpm/분에서 진탕하면서, 5%의 최종 농도에서 형질감염된 세포에 첨가되었다. 6번째 - 7번째 일자에, 상층액은 원심분리 및 여과에 의해 수확되었고, 그리고 FIT-Ig 단백질은 제조업체의 사용설명서에 따라, 단백질 A 크로마토그래피 (Pierce, Rockford, IL)를 이용하여 정제되었다. 단백질은 SDS-PAGE에 의해 분석되고, 그리고 그들의 농도가 A280 및 BCA (Pierce, Rockford, IL)에 의해 결정되었다.

[0178] FIT1-Ig, FIT2-Ig, 그리고 FIT3-Ig의 발현을 위해, 구조체 #1:#2:#3 = 1:1:1, 구조체 #1:#2:#3 = 1:1.5:1.5, 그리고 구조체 #1:#2:#3 = 1:3:3을 비롯하여 이들 3개 구조체의 상이한 DNA 몰 비율이 이용되었다 (**표 4**). FIT-Ig 단백질은 단백질 A 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 정제 수율 (7-16 mg/L)은 각 단백질에 대한 발현 배지의 hIgG 정량과 일치하였다. 정제된 FIT-Ig의 조성 및 순도는 환원된 조건 및 비-환원된 조건 둘 모두에서 SDS-PAGE에 의해 분석되었다. 비-환원된 조건에서, FIT-Ig는 대략 250 KDa의 단일 띠로서 이주하였다. 환원 조건에서, 각 FIT-Ig 단백질은 2개의 띠를 산출하였는데, 더욱 높은 MW 띠는 대략 75 KDa의 구조체 #1이고, 그리고 더욱 낮은 MW 띠는 대략 25 KDa에서 중복된 양쪽 구조체 #2와 #3에 상응한다. SDS-PAGE는 각 FIT-Ig가 단일 종류로서 발현되고, 그리고 3개의 폴리펩티드 사슬이 효율적으로 짝짓기되어 IgG-유사 분자를 형성한다는 것을 보여주었다. 이들 사슬의 크기뿐만 아니라 FIT-Ig 분자의 전장 단백질은 아미노산 서열에 근거된 그들의 계산된 분자 질량과 일치한다.

표 4

[0179] **hIL-17/IL-20 FIT-Ig 단백질의 발현 및 SEC 분석**

FIT-Ig 단백질	DNA 비율: 구조체 1:2:3	발현 수준 (mg/L)	SEC에 의한 % 피크 단위체 분율
FIT1-Ig	1:1:1	15.16	92.07
	1:1.5:1.5	14.73	95.49
	1:3:3	9.87	97.92
FIT2-Ig	1:1:1	15.59	90.92
	1:1.5:1.5	12.61	94.73
	1:3:3	7.03	97.29
FIT3-Ig	1:1:1	15.59	91.47
	1:1.5:1.5	15.16	94.08
	1:3:3	7.75	97.57

[0180] 용해 상태에서 FIT-Ig의 물리적 성질을 더욱 연구하기 위해, 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)가 각 단백질을 분석하는데 이용되었다. FIT-Ig의 SEC 분석을 위해, PBS에서 정제된 FIT-Ig가 TSKgel SuperSW3000, 300 x 4.6 mm 칼럼 (TOSOH)에 적용되었다. HPLC 기기, 모형 U3000 (DIONEX)이 SEC에 이용되었다. 모든 단백질은 280 nm 및 214 nm에서 UV 검출을 이용하여 결정되었다. 용리는 0.25 mL/분의 유속에서 등용매성이었다. 3개의 FIT-Ig 단백질 모두 단일 주요 피크를 전시하였는데, 이것은 단위체 단백질로서 물리적 균질성을 증명하였다 (**표 4**). 구조체 #1:#2:#3 = 1:3:3의 비율은 3개의 FIT-Ig 단백질 모두에 대한 SEC에 의해 더욱 우수한 단위체 프로필을 보여주었다 (**표 4**).

[0181] **표 4**는 또한, 모든 FIT-Ig 단백질의 발현 수준이 규칙적인 mAb의 것에 필적한다는 것을 보여주는데, 이것은 FIT-Ig가 포유류 세포에서 효율적으로 발현될 수 있다는 것을 지시한다. FIT4-Ig, FIT5-Ig, 그리고 FIT6-Ig의 발현의 경우에, 구조체 #1:#4의 DNA 정액 = 1:1이고, 그리고 발현 수준이 1-10 mg/L의 범위에 있었고, 그리고 SEC에 의해 결정될 때 **%** 피크 단위체 분율이 58-76%의 범위에 있었다. 이러한 특정 mAb 조합 (LY 및 15D2)에 근거하여, 3-폴리펩티드 FIT-Ig 구조체 (FIT1-Ig, FIT2-Ig, 그리고 FIT3-Ig)는 2-폴리펩티드 FIT-Ig 구조체 (FIT4-Ig, FIT5-Ig, 그리고 FIT6-Ig)보다 더욱 우수한 발현 프로필을 보여주었고, 이런 이유로 FIT1-Ig, FIT2-Ig, 그리고 FIT3-Ig은 기능적 성질에 대해 더욱 분석되었다.

[0182] **실시예 1.3 항-IL-17/IL-20 FIT-Ig의 항원 결합 친화성의 결정**

[0183] rhIL-17 및 rhIL-20에 FIT-Ig 결합의 동역학은 25℃에서 HBS-EP (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 그리고 0.005% 계면활성제 P20)를 이용한 Biacore X100 기기 (Biacore AB, Uppsala, Sweden)로 표면 플라스몬 공명 (**표 5**)에 의해 결정되었다. 간단히 말하면, 염소 항인간 IgG Fcγ 단편 특정한 다중클론 항체 (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL)가 제조업체의 사용설명서에 따라, 표준 아민 연계 키트를 이용하여 CM5 연구 등급 바이오센서 칩을 교차하여 직접적으로 고정되었다. 정제된 FIT-Ig 표본은 염소 항인간 IgG Fc 특정한 반응 표면을 교차하여 포획을 위해 HEPES-완충된 식염수에서 희석되고 5 μl/분의 유속에서 반응 매트릭스 위에 주입되었다. 연관 및 해리 속도 상수, kon (M-1s-1) 및 koff (s-1)가 30 μL/분의 연속 유속 하에 결정되었다. 속도 상수는 1.25 내지 1000 nM의 범위에서 변하는 10가지 상이한 항원 농도에서 활동적 결합 계측을 함으로써 도출되었다. FIT-Ig 및 표적 단백질 사이에 반응의 평형 해리 상수 (M)가 이후, 다음의 공식에 의해 활동적 속도 상수로부터 계산되었다: KD = koff/kon. 항원 표본의 분취량이 또한, 임의의 비특이적 결합 배경을 기록하고 감산하여 대다수의 굴절률 변화 및 주입 잡음을 제거하기 위해, 블랭크 참조 및 반응 CM 표면 위에 동시에 주입되었다. 표면은 10 μL/분의 유속에서 10 mM 글리신 (pH 1.5)의 2번 차후 25 ml 주입으로 재건되었다. 항-Fc 항체 고정된 표면은 완전하게 재건되고, 그리고 12회 주기에 걸쳐 그들의 완전한 포획 능력을 유지하였다.

표 5

[0184] **항-IL-17/IL-20 FIT-Ig 분자의 기능적 특성화**

mAb 또는 FIT-Ig	항원	Biacore에 의한 결합 동역학	중화 효능 IC_{50} (pM)

		k_{on} (M^{-1} s^{-1})	k_{off} (s^{-1})	K_d (M)	
LY	hIL-17	8.24E+5	1.80E-5	2.18E-11	101
FIT1-Ig	hIL-17	1.07E+7	3.88E-5	3.64E-12	102
FIT2-Ig	hIL-17	9.24E+6	1.53E-5	1.65E-12	137
FIT3-Ig	hIL-17	8.71E+6	9.58E-6	1.10E-12	146
15D2	hIL-20	1.70E+6	8.30E-5	5.00E-11	50
FIT1-Ig	hIL-20	1.40E+6	3.82E-5	2.73E-11	54
FIT2-Ig	hIL-20	1.80E+6	3.50E-5	1.95E-11	50
FIT3-Ig	hIL-20	1.40E+6	3.82E-5	2.73E-11	72

[0185] Biacore 분석은 hIL-17 및 hIL-20에 이들 3개의 FIT-Ig의 전반적인 결합 파라미터가 유사하다는 것을 지시하였는데, 이들 FIT-Ig의 친화성은 부모 mAb LY 및 15D2의 친화성에 매우 근접하고, 그리고 어느 한쪽 항원 결합 도메인에 대한 결합 친화성의 상실이 없었다 (**표 5**).

[0186] 이에 더하여, FIT-Ig의 사가 이중-특이적 항원 결합 역시 Biacore에 의해 분석되었다. FIT1-Ig는 먼저, Biacore 센서 칩 상에서 염소 항인간 Fc 항체를 통해 포획되었고, 그리고 첫 번째 항원이 주입되고 결합 신호가 관찰되었다. FIT1-Ig가 첫 번째 항원에 의해 포화됨에 따라서, 두 번째 항원이 이후 주입되고 두 번째 신호가 관찰되었다. 이것은 먼저 IL-17, 이후 IL-20을 주입함으로써 또는 FIT2-Ig의 경우에 먼저 IL-20, 그 이후에 IL-17을 주입함으로써 행위되었다 (**도면 3**). 어느 한쪽 서열에서, 이중-결합 활성이 검출되었고, 그리고 양쪽 항원 결합이 25-30 RU에서 포화되었다. 유사한 결과가 FIT2-Ig 및 FIT3-Ig에 대해 획득되었다. 따라서 각 FIT-Ig는 양쪽 항원에 이중-특이적 사가 분자로서 동시에 결합할 수 있었다.

[0187] FIT-Ig의 발현 프로필 및 이중-결합 성질은 FIT-Ig 분자 내에서, 양쪽 VL-CL이 그들의 상응하는 VH-CH1과 정확하게 짝짓기되어 2개의 기능적 결합 도메인을 형성하고, 그리고 단일 단위체, 사가, 그리고 이중특이적 전장 FIT-Ig 단백질로서 발현된다는 것을 명확하게 증명하였다. 이것은 사가이지만 한 표적 항원에 단일특이적 결합 활성을 전시하였던 다가 항체 유형의 분자와 대조적이다 (Miller and Presta, US 특허 8722859).

[0188] **실시예 1.4 항-IL-17/IL-20 FIT-Ig의 생물학적 활성의 결정**

[0189] IL-17 기능을 중화시키는 FIT-Ig의 생물학적 활성은 GROα 생물학적 검정을 이용하여 계측되었다. 간단히 말하면, Hs27 세포가 96 웰 평판 내로 10000개 세포/50μL/웰에서 파종되었다. FIT-Ig 또는 항-IL-17 대조 항체 (25 μL)가 2.5 nM에서 시작 농도, 그 이후에 5 pM까지 1:2 연속 희석액으로 2중 웰에 첨가되었다. IL-17A (25 μL)가 이후, 각 웰에 첨가되었다. IL-17A의 최종 농도는 0.3 nM이었다. 세포 배양 상층액이 수집되기 전 17 시간 동안, 세포가 37℃에서 배양되었다. 세포 배양 상층액에서 GRO-α의 농도가 제조업체 (R&D systems)의 프로토콜에 따라서, 인간 CACL1/GRO 알파 Quantikine 키트에 의해 계측되었다.

[0190] IL-20 기능을 중화시키는 FIT-Ig의 생물학적 활성은 IL-20R^{+} BAF3 세포 증식 검정을 이용하여 계측되었다. 간단히 말하면, 0.8 nM에서 25μL의 재조합 인간 IL-20이 96-웰 평판의 각 웰에 첨가되었다 (IL-20의 최종 농도는 0.2 nM이다). 항-IL20 항체 또는 FIT-Ig 또는 다른 대조 항체가 400 nM (작업 농도는 100 nM이었다), 그 이후에 5-배 연속 희석액으로 희석되었고 96-웰 검정 평판 (웰마다 25μL)에 첨가되었다. IL-20 수용체로 안정되게 형질감염된 BaF3 세포는 이후, 50 μL RPMI 1640 + 10% FBS, 800μg/ml의 농도에서 히그로마이신 B, 800μg/ml의 농도에서 G418의 용적에서 10000개 세포/웰의 농도로 각 웰에 첨가되었다. 48-시간 배양 후, 100μL CellTiter-Glo 발광 완충액이 각 웰에 첨가되었다. 내용물이 세포 용해를 유도하기 위해 궤도 진탕기에서 2 분 동안 혼합되었고, 그리고 평판이 발광 신호를 안정시키기 위해 10 분 동안 실온에서 배양되었다. 발광이 SpectraMax M5에 의해 기록되었다.

[0191] **표 5**에서 보여지는 바와 같이, 모든 FIT-Ig는 hIL-20 및 hIL-17 둘 모두를 중화시킬 수 있었는데, 친화성이 부모 항체의 것과 유사하였다. Biacore 및 세포-기초된 중화 검정 둘 모두를 이용한 기능적 분석에 근거하여, 3개의 FIT-Ig 모두 부모 mAb의 활성을 완전히 유지하는 것으로 보인다. 이들 3개의 FIT-Ig 사이에 어떤 유의미한 기능적 차이도 없었는데, 이것은 링커가 임의선택적이고, 그리고 FIT-Ig 구조체가 2개의 Fab 결합 영역 사이에 펩티드 스페이서의 부재에서 이중 결합을 허용할 만큼 충분한 유연성 및 특수한 치수를 제공하였다는 것을 지시한다. 이것은 DVD-Ig 유형의 분자와 대조적인데, 상기 분자의 경우에 2개의 폴리펩티드 사슬 각각에서 2개의 가변 도메인 사이에 링커가 더욱 낮은 (2번째) 가변 도메인의 활성을 유지하는데 필요하다.

[0192] **실시예 1.5 항-IL-17/IL-20 FIT-Ig의 안정성 연구**

[0193] 구연산염 완충액 (pH=6.0)에서 FIT1-Ig 단백질 표본은 일정한 4 ℃, 25 ℃ 및 40 ℃에서 1 일, 3 일 또는 7 일 동안 개별적으로 배양되었다; 유사하게, FIT1-Ig 단백질 표본은 1회, 2회 또는 3회 동결 해동되었다. 모든 표본의 무손상 전체 단위체 단백질의 분획물이 SEC-HPLC에 의해 검출되었는데, 10 μg의 각 단백질 표본이 15 분 동안 유속 0.3 mL/분에서, Superdex200 5/150 GL을 구비하는 Utimate 3000 HPLC 내로 주입되었고, 그리고 데이터가 제조업체에 의해 공급된 Chromeleon 소프트웨어를 이용하여 기록되고 분석되었다. **표 6**은 FIT1-Ig 및 FIT3-Ig이 이들 열-공격된 조건 하에, 완전한 무손상 단위체 분자로서 남아있었다는 것을 보여준다.

표 6

[0194] **SEC에 의해 % 전체 단위체 분율을 계측함으로써 FIT-Ig의 안정성 분석**

온도 (℃)	시간 (일자)	FIT1-Ig	FIT3-Ig
	0 (시작)	98.74	98.60
4	1	98.09	97.78
	3	97.81	97.45
	7	97.63	97.65
	1	99.00	98.26
25	3	99.00	98.01
	7	98.86	98.53
	1	98.95	98.50
40	3	98.94	98.35
	7	98.82	98.37
1X 동결 해동		98.89	98.21
2X 동결 해동		95.37	98.21
3X 동결 해동		95.24	98.35

[0195] **실시예 1.6 항-IL-17/IL-20 FIT-Ig의 용해도 연구**

[0196] FIT1-Ig의 용해도는 증가하는 농도의 PEG6000의 존재에서 침전의 징후를 계측함으로써 분석되었다 (PEG6000은 Shanghai lingfeng chemical reagent co. Ltd로부터 구입되었다). 간단히 말하면, PEG6000의 존재에서 단백질의 용해도는 PEG6000 농도 (0, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% 및 30%)의 함수로서 획득되었다. 용해도 연구는 6.0의 용액 pH에서 25 ℃의 온도에서 수행되었다. 간단히 말하면, 단백질은 성분의 원하는 농도를 얻기 위해, 단백질의 완충된 원액의 적절한 양, PEG 및 완충액을 혼합함으로써 침전되었다. 최종 부피가 최대 200 μl로 만들어졌고, 그리고 단백질의 농도가 1.0 mg/mL에서 세팅되었다. 최종 용액은 충분히 혼합되고 16 시간 동안 평형화되었다. 평형화 후, 용액은 단백질 침전물을 분리하기 위해 13000 rpm에서 10 분 동안 원심분리되었다. 단백질 용해도가 Spectra Max Plus384 (Molecular Device)를 이용하여 280 nm에서 계측되고 상층액의 흡광도로부터 획득되고, 그리고 농도를 계산하는 것이 단백질 농도의 표준 곡선에 근거되었다 (**도면 4A**). 우리는 또한, 3가지 상이한 pH 조건 하에 동일한 실험적 방법을 이용하여 상업적인 항체 리툭산을 분석하였다 (**도면 4B**). 단백질 용해도는 pH 조건에 의존하고, 그리고 FIT-Ig의 예측된 용해도는 단일클론 항체의 범위 안에 있을 것으로 보인다.

[0197] **실시예 1.7 항-IL-17/IL-20 FIT-Ig의 약동학적 연구**

[0198] FIT1-Ig의 약동학적 성질은 수컷 Sprague-Dawley (SD) 쥐에서 사정되었다. FIT-Ig 단백질이 경정맥 삽관을 통해 또는 등면 피부 아래 피하로 5 mg/kg의 단일 정맥내 용량에서 수컷 SD 쥐에 투여되었다. 혈청 표본은 꼬리 정맥을 통해 0, 5, 15 및 30 분; 1, 2, 4, 8 및 24 시간; 그리고 2, 4, 7, 10, 14, 21 및 28 일 연속 방혈에서 표본추출로 28 일의 기간에 걸쳐 상이한 시점에서 수집되었고, 그리고 인간 IL-17 포획 및/또는 인간 IL-20 포획 ELISA에 의해 분석되었다. 간단히 말하면, ELISA 평판이 염소 항-비오틴 항체 (5 μg/ml, 4℃, 하룻밤 동안)로 코팅되고, Superblock (Pierce)로 차단되고, 그리고 실온에서 2 시간 동안 10% Superblock TTBS 내에 50 ng/ml에서 비오틴화된 인간 IL-17 (IL-17 포획 ELISA) 또는 IL-20 (IL-20 포획 ELISA)와 함께 배양되었다. 혈청 표본은 계열 희석되고 (0.5% 혈청, TTBS에서 10% Superblock) 실온에서 30 분 동안 평판에서 배양되었다. 검출은 HRP-표지화된 염소 항인간 항체로 수행되었고, 그리고 농도는 4개 파라미터 로지스틱 적합을 이용한 표준 곡선의 도움으로 결정되었다. 특히 피하 군에서 여러 동물은 아마도, 항인간 반응의 발달로 인해, 10 일자 이후에 FIT-Ig 농도에서 갑작스러운 하락을 보여주었다. 이들 동물은 최종 계산으로부터 제거되었다. 약동학적 파라미터에 대한 값은 WinNonlin 소프트웨어 (Pharsight Corporation, Mountain View, Calif.)를 이용한 비-구획 모

형에 의해 결정되었다.

[0199] 쥐 PK 연구에서, FIT1-Ig 혈청 농도는 2가지 상이한 ELISA 방법에 의해 결정될 때 매우 유사하였는데, 이것은 상기 분자가 무손상이고, 그리고 생체내에서 양쪽 항원에 결합할 수 있다는 것을 지시한다. IV 투약 시에, FIT1-Ig는 전통적인 IgG 분자의 PK 프로필과 유사한, 분포 시기, 그 이후에 제거 시기로 구성되는 이상성 약동학적 프로필을 전시하였다. 이들 2가지 상이한 분석법에 근거하여 계산된 약동학적 파라미터는 매우 유사하고 **표 7**에서 도시된다. FIT-Ig의 소실은 낮은데 (~12 mL/일/kg), 낮은 용적의 분포 (Vss ~130 mL/kg)는 긴 반감기 (T1/2>10 일)를 유발하였다. 피하 투여 이후에, FIT-Ig는 천천히 흡수되는데, 대략 26.9 μg/ml의 최대 혈청 농도가 투약후 4 일에 도달되었다. 말단 반감기는 약 11 일이고, 그리고 피하 생체이용률은 100%에 가까웠다. 이들 결과에 의해 증명된 바와 같이, FIT1-Ig의 성질은 생체내에서 전통적인 IgG 분자와 매우 유사한데, 이것은 필적하는 투약 섭생을 이용한 치료적 적용에 대한 잠재력을 지시한다.

[0200] FIT-Ig의 약물동력학 연구는 다중특이적 Ig-유사 생물제제 개발의 분야에서 놀라운 돌파구를 증명하였다. 쥐 약동학적 시스템은 제약 산업에서 치료적 mAb의 전임상 평가에 통상적으로 이용되고, 그리고 이것은 인간에서 mAb의 약동학적 프로필을 훌륭하게 예측한다. FIT-Ig의 긴 반감기 및 낮은 소실은 치료적 mAb와 유사하게, 덜 빈번한 투약에서 만성 징후에 대한 이의 치료적 유용성을 가능하게 할 것이다. 이에 더하여, IgG보다 100-kDa 큰 FIT-Ig는 PK 연구로부터 이의 IgG-유사 분포 용적 파라미터에 근거하여, 조직 내로 효율적으로 침투하는 것으로 보였다.

표 7

SD 쥐에서 FIT1-Ig의 약물동력학 분석

[0201]

	IV					
PK 파라미터	CL	Vss	베타 $t_{1/2}$	AUC	MRT	
단위	mL/일/kg	mL/kg	일	일*μg/mL	일	
IL-17 ELISA	12.2	131	10.8	411	10.7	
IL-20 ELISA	11.9	128	10.8	421	10.7	
	SC					
PK 파라미터	$T_{최대}$	$C_{최대}$	$t_{1/2}$	AUC_{INF}	CL/F	F
단위	일	ug/mL	일	일*ug/mL	mL/일/kg	%
IL-17 ELISA	4.00	26.9	11.0	406	12.4	103.5
IL-20 ELISA	4.00	23.1	10.4	350	14.3	86.4

[0202] **실시예 1.8 FIT-Ig의 안정된 CHO 세포주 개발 연구**

[0203] FIT-Ig는 일시적으로-형질감염된 293E 세포에서 효율적으로 발현되는 것으로 관찰되었다. FIT-Ig의 제조 실행가능성을 더욱 결정하기 위해, 안정된 형질감염이 CHO-DG44 및 CHO-S 세포주 둘 모두에서 수행되었고, 그리고 차후 클론 선별뿐만 아니라 생산성 분석이 수행되었다. 간단히 말하면, CHO 세포는 자유 pCHO 벡터 (Life Technologies)에서 하위클로닝된 400 μl 형질감염 용액 + 20ug DNA (CHO DG44 세포의 경우) 또는 25 μg DNA (CHO-S 세포의 경우)로 $8x10^6$ 세포로 전기천공에 의해 형질감염되었다. 안정된 세포주 선별은 일과적인 절차를 이용하여 행위되었다. 간단히 말하면, CHO-DG44 선별을 위해, 형질감염 시에, 안정된 풀이 선택되었고 (-HT/2P/400G, 여기서 P는 μg/mL 퓨로마이신이고, G는 μg/mL G418이다), 그리고 단백질 생산이 IgG ELISA에 의해 분석되었다. 상위 풀이 선택되고, 그리고 증가하는 농도의 MTX (50, 100, 200 및 500 nM)로 여러 라운드의 증폭, 그 이후에 IgG ELISA에 의한 단백질 생산의 분석이 진행되었다. 이들 상위 풀은 이후, 하위클로닝을 위해 선별되었다. CHO-S 세포 선별을 위해, 일차 시기 선별이 10P/400G/100M (M은 nM MTX이다)을 내포하는 배지에서 수행되고, 그 이후에 단백질 생산의 분석이 뒤를 이었다. 이후, 상위 풀이 선택되고, 그리고 30P/400G/500M 또는 50P/400G/1000M에서 이차 시기 선별, 그 이후에 ELISA에 의한 단백질 생산 계측이 진행되었다. 이들 상위 풀은 이후, 하위클로닝을 위해 선별되었다. 단백질 생산성 분석을 위해, 완전히 회수된 세포 풀 (생존력 >90%)이 125-mL 진탕 플라스크에서 30 mL 새로운 배지 (6 mM L-글루타민으로 보충된 CD FortiCHO™ 배지)를 이용하여 5 x 10^5 생존가능 세포/mL (CHO DG44) 또는 3 x 10^5 생존가능 세포/mL (CHO-S)에서 파종되었다. 이들 세포는 37℃, 80% 상대 습도, 8% CO2, 그리고 130 rpm에서 진탕 플랫폼에서 배양되었다. 표본은 배양 생존력이 50% 아래로 하락하거나 또는 배양의 14일자가 도달될 때까지 세포 밀도, 생존력, 그리고 생산성을 결정하기 위해 매일

또는 규칙적인 간격에서 (가령, 0, 3, 5, 7, 10, 12 및 14 일자에) 배양된다. 표본추출 후, 이들 배양액에 필요에 따라, 글루코오스를 공급한다.

[0204] FIT1-Ig CHO 안정된 세포주 개발의 전반적인 과정은 CHO 세포에서 단일클론 항체 개발의 것과 유사한 특질을 보여주었다. 가령, 2P/400G 하에 DG44 풀 분석 동안, VCD는 10-12 일자까지 약 1.3E7까지 계속 증가하였고, 반면 세포 생존력은 13-14 일자까지 80%를 초과하여 유지되었고, 그리고 생산성은 14 일자에 거의 40 mg/mL에 도달하였다 (**도면 5A**). 5P/400G/50M에서 증폭 시에, 생산성은 14 일자에 50 mg/mL 초과에 도달하였다 (**도면 5B**). CHO-S 세포 선별의 경우에, 역가는 1 단계 선별 동안 200 mg/mL 초과 (**도면 5C**), 그리고 2 단계 선별에서 370 mg/mL 초과 (**도면 5D**)에 도달하였다. 생산성의 이들 수준은 우리 실험실에서 규칙적인 인간 mAb 개발에 대해 이전에 관찰되었던 것과 유사한데, 이것은 FIT-Ig가 상업적인 적용을 위한 mAb-유사 제조 실행가능성을 전시한다는 것을 암시한다.

[0205] **실시예 2: 항-CD3/CD20 Fabs-인-탠덤 면역글로불린 (FIT-Ig)의 작제, 발현, 그리고 정제**

[0206] FIT-Ig가 세포 표면 항원에 결합할 수 있는 지를 증명하기 위해, 우리는 **도면 1**에서 보여지는 바와 같이, 3-폴리펩티드 구조체인 항-CD3/CD20 FIT-Ig 분자 FIT7-Ig 및 FIT8-Ig를 산출하였다. 세포 표면 CD3 및 CD20에 결합할 수 있는 FIT-Ig를 산출하는데 이용된 구조체는 **도면 1B**에서 예시된다. 간단히 말하면, 부모 mAb는 2개의 높은 친화성 항체, 항-CD3 (OKT3) 및 항-CD20 (오파투무맙)을 포함한다. FIT7-Ig 구조체 #1을 산출하기 위해, OKT3의 VL-CL은 직접적으로 (FIT7-Ig), 또는 7개 아미노산 (FIT8-Ig)의 링커를 통해, 오파투무맙 중쇄의 N 말단에 융합되었다 (**표 8**에서 보여지는 바와 같이). 구조체 #2는 OKT3의 VH-CH1이고, 그리고 세 번째 구조체는 오파투무맙의 VL-CL이다. FIT-Ig에 대한 이들 3개의 구조체는 293 세포에서 동시형질감염되어, FIT-Ig 단백질의 발현 및 분비를 유발하였다. PCR 클로닝을 위한 상세한 절차는 아래에 설명된다:

[0207] **실시예 2.1 항-CD3/CD20 FIT-Ig의 분자 클로닝:**

[0208] 분자 클로닝 방법은 항-hIL-17/hIL-20 FIT-Ig에서와 유사하다.

표 8

[0209] 항-CD3/CD20 FIT-Ig 분자 및 구조체.

FIT-Ig 분자	구조체 #1	링커	구조체 #2	구조체 #3
FIT7-Ig	VL_{CD3}-CL-VH_{CD20}-CH1-Fc	링커 없음	VH_{CD3}-CH1	VL_{CD20}-CL
FIT8-Ig	VL_{CD3}-CL-링커-VH_{CD20}-CH1-Fc	GGGGSGS	VH_{CD3}-CH1	VL_{CD20}-CL

[0210] **표 9**는 상기 분자 작제에 이용된 PCR 프라이머의 서열을 보여준다.

표 9

[0211] **항-IL-17/IL-20 FIT-Ig의 분자 작제에 이용된 PCR 프라이머**

	서열 번호
P4: GTCTGCGGCCGCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAG	32
P12: TCGAGCGGCCGCTCAACAAGATTTGGGCTCAACTTTCTTG	33
P20: CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTG	34
P22:GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG	35
P23: TACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG	36
P24: TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA	37
P25:CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTG	38
P28: GCTGCTGCTGTGGTTCCCCGGCTCGCGATGCGAAATTGTGTTGACACAGTC	39
P29: AAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCC	40

[0212] 항-CD3/CD20 FIT-Ig의 최종 서열은 **표 10**에서 설명된다.

표 10

항-CD3/CD20 FIT-Ig 의 아미노산 서열

단백질 / 단백질 영역	서열 식별자	서열 12345678901234567890
OKT3/오파투무맙 FIT7-Ig 폴리펩티드 #1	서열 번호:41	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWY QQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSY SLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEI NRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GECEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDY AMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGR FTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQY GNYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*
OKT3 VL	서열 번호:42	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWY QQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSY SLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEI N
CL	서열 번호:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
링커		없음
오파투무맙 VH	서열 번호:43	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMH WVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTI SRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNY YYGMDVWGQGTTVTVSS
CH1	서열 번호:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
Fc	서열 번호:20	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK*
OKT3/오파투무맙	서열	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH

[0213]

[0214]

단백질 / 단백질 영역	서열 식별자	서열 12345678901234567890
FIT7-Ig 폴리펩티드 #2	번호:44	WVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYC LDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSC
OKT3 VH	서열 번호:45	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH WVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYC LDYWGQGTTLTVSS
CH1	서열 번호:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
OKT3/오파투무맙 FIT7-Ig 폴리펩티드 #3	서열 번호:46	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC*
오파투무맙 VL	서열 번호:47	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLE IK
CL	서열 번호:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC*
OKT3/오파투무맙 FIT8-Ig 폴리펩티드 #1	서열 번호:48	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWY QQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSY SLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEI NRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GECGGGGSGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAAS GFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGY ADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTALYY CAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL

[0215]

단백질 / 단백질 영역	서열 식별자	서열 12345678901234567890
		HNHYTQKSLSLSPGK*
OKT3 VL	서열 번호:42	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWY QQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSY SLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEI N
CL	서열 번호:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
링커	서열 번호:28	GGGGSGS
오파투무맙 VH		EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMH WVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTI SRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNY YYGMDVWGQGTTVTVSS
CH1	서열 번호:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
Fc	서열 번호:20	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK*
OKT3/오파투무맙 FIT8-Ig 폴리펩티드 #2	서열 번호:44	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH WVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYC LDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSC
OKT3 VH	서열 번호:45	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH WVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYC LDYWGQGTTLTVSS
CH1	서열 번호:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
OKT3/오파투무맙 FIT8-Ig 폴리펩티드 #3	서열 번호:46	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC*
오파투무맙 VL	서열	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAW

[0216]

단백질 / 단백질 영역	서열 식별자	서열 12345678901234567890
	번호:47	YQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLE IK
CL	서열 번호:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC*

[0217] **실시예 2.2 항-CD3/CD20 FIT-Ig의 발현 및 정제:**

[0218] 각 FIT-Ig의 모든 DNA 구조체는 pBOS 기초된 벡터 내로 하위클로닝되었고, 그리고 정확도를 담보하기 위해 염기서열결정되었다. 각 FIT-Ig의 구조체 #1, #2 및 #3은 293E 세포에서 폴리에틸렌이민 (PEI)을 이용하여 일시적으로 공동발현되었다. 간단히 말하면, FreeStyle™ 293 발현 배지에서 DNA는 1:2의 DNA 대 PEI 비율의 최종 농도로 PEI와 혼합되고, 실온에서 15분 (20분 이내) 동안 배양되고, 그리고 이후, 60 μg DNA/120ml 배양액에서

293E 세포에 첨가되었다 (1.0-1.2 x 10^6/ml, 세포 생존력 > 95%). 진탕기에서 6-24 시간 배양 후, 37℃, 8% CO_2에서 125 rpm/분에서 진탕하면서, 펩톤을 5%의 최종 농도에서 형질감염된 세포에 첨가한다. 6번째 - 7번째 일자에, 상층액은 원심분리 및 여과에 의해 수확되었고, 그리고 FIT-Ig 단백질은 제조업체의 사용설명서에 따라, 단백질 A 크로마토그래피 (Pierce, Rockford, IL)를 이용하여 정제되었다. 단백질은 SDS-PAGE에 의해 분석되고, 그리고 그들의 농도가 A280 및 BCA (Pierce, Rockford, IL)에 의해 결정되었다 (**표 11**).

표 11

[0219] **항-CD3/CD20 FIT-Ig 단백질의 발현 및 SEC 분석**

FIT-Ig 단백질	DNA 비율: 구조체 1:2:3	발현 수준 (mg/L)	SEC에 의한 % 피크 단위체 분율
FIT7-Ig	1:3:3	21.3	99.53
FIT8-Ig	1:3:3	25.6	99.16

[0220] **실시예 2.3 항-CD3/CD20 FIT-Ig 분자의 결합 활성:**

[0221] 양쪽 표적에 항-CD3/CD20 FIT-Ig의 결합은 세포 표면 상에서 CD3을 발현하는 Jurkat 세포뿐만 아니라 세포 표면 상에서 CD20을 발현하는 Raji 세포를 이용하여, FACS에 의해 분석되었다. 간단히 말하면, 5 x 10^5 세포가 얼음 같이 차가운 PBS에서 세척되었고 얼음 위에서 1 시간 동안 2% FBS로 차단되었다. 세포는 얼음 위에서 1 시간 동안 항체, FIT-Ig (100 nM), 또는 아이소타입 대조와 함께 배양되었고 PBS로 3 회 세척되었다. 이차 항체 (Alexa Fluor 488로 표지화된 염소 항인간 IgG, Invitrogen)가 첨가되고, 그리고 얼음 위에서 1 시간 동안 어둠 하에 세포와 함께 배양되고, 그 이후에 PBS로 3회 세척이 뒤를 이었다. 표본은 FACs calibur에서 분석되었다. 세포 표면 결합은 FIT7-Ig 및 FIT8-Ig 둘 모두 농도 의존성 방식으로, 세포 표면 항원 CD3 및 CD20 둘 모두에 결합할 수 있었다는 것을 보여준다. 부모 mAb의 결합 활성과 비교하여, FIT-Ig는 Jurkat 세포에서 CD3에 대한 감소된 결합 강도, 하지만 Raji 세포에서 CD20에 대한 증강된 결합 강도를 보여주었다. 모든 결합 연구에서, FIT7-Ig 및 FIT8-Ig는 양쪽 항원에 대해 유사한 결합 활성을 보여주었는데, 이것은 링커가 FIT8-Ig의 결합 능력에 대한 유의미한 충격을 주지 않았다는 것을 지시한다 (**표 12**).

표 12

[0222] **항-CD3/CD20 FIT-Ig 단백질의 세포 표면 항원 결합 연구**

FIT-Ig 단백질	항원 (세포주)	FACS (MFI)에 의한 결합 강도
OKT3		399
FIT7-Ig	CD3 (Jurkat)	159
FIT8-Ig		211
오파투무맙		181
FIT7-Ig	CD20 (Raji)	291
FIT8-Ig		274

[0223] **실시예 3: 항-TNF/IL-17 Fabs-인-탠덤 면역글로불린 (FIT-Ig)의 작제, 발현, 그리고 정제**

[0224] 인간 IL-17 및 인간 TNFα에 결합할 수 있는 다른 FIT-Ig (FIT9-Ig) 역시 **도면 1**에서 보여지는 바와 같이, 3-폴리펩티드 구조체에서 항-IL-17 mAb 클론 LY 및 항-TNF mAb 골리무맙을 이용하여 산출되었다. FIT9-Ig 구조체 #1을 산출하기 위해, 골리무맙의 VL-CL이 LY 중쇄의 N 말단에 직접적으로 융합되었다 (**표 13**에서 보여지는 바와 같이). 구조체 #2는 골리무맙의 VH-CH1이고, 그리고 세 번째 구조체는 LY의 VL-CL이다. FIT9-Ig에 대한 이들 3개의 구조체는 293 세포에서 동시형질감염되어, FIT9-Ig 단백질의 발현 및 분비를 유발하였다. 항-TNF/IL-17 FIT-Ig의 최종 서열은 **표 14**에서 설명된다.

[0225] **실시예 3.1 항-TNF/IL-17 FIT-Ig의 분자 클로닝:**

[0226] 분자 클로닝 방법은 항-hIL-17/hIL-20 FIT-Ig에서와 유사하다

표 13

[0227] 항-TNF/IL-17 FIT-Ig 분자 및 구조체.

FIT-Ig 분자	구조체 #1	링커	구조체 #2	구조체 #3
FIT9-Ig	VL_{TNF}-CL-VH_{IL-17}-CH1-Fc	링커 없음	VH_{TNF}-CH1	VL_{IL-17}-CL

표 14

항-TNF/IL-17 FIT-Ig 분자의 아미노산 서열

단백질 단백질 영역	서열 식별자	서열 12345678901234567890
항-IL-TNF/IL-17 FIT9-Ig 폴리펩티드 #1	**서열 번호:87**	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVYSYLA WYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQRSNWPPFTFGP GTKVDIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECQ VQLVQSGAEVKKPGSS VKVSCKASGYSFTDYHI HWVRQAPGQGLEWMG VINPMYGTTDYNQRFK GRVTITADESTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCAR YDYFTGTGVYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK*

[0228]

항-TNF/IL-17 FIT-Ig 분자의 아미노산 서열

단백질 단백질 영역	서열 식별자	서열 12345678901234567890
골리무맙 VL	**서열 번호:88**	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVYSYLA WYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQRSNWPPFTFGP GTKVDIK
CL	**서열 번호:17**	RTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
링커		없음
LY VH	**서열 번호:22**	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGYSFTDY HIHWVRQAPGQGLEW MGVINPMYGTTDYNQR FKGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYC ARYDYFTGTGVYWGQ GTLVTVSS
CH1	**서열 번호:19**	ASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVE PKSC
Fc	**서열 번호:20**	DKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDS

[0229]

항-TNF/IL-17 FIT-Ig 분자의 아미노산 서열

단백질 단백질 영역	서열 식별자	서열 12345678901234567890
		DGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK*
항-TNF/IL-17 FIT9-Ig 폴리펩티드 #2	**서열 번호:89**	QVQLVESGGGVVQPGR SLRLSCAASGFIFSSYA MHWVRQAPGNGLEWV AFMSYDGSNKKYADSV KGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYC ARDRGIAAGGNYYYYG MDVWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPK SC
골리무맙 VH	**서열 번호:90**	QVQLVESGGGVVQPGR SLRLSCAASGFIFSSYA MHWVRQAPGNGLEWV AFMSYDGSNKKYADSV KGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYC ARDRGIAAGGNYYYYG MDVWGQGTTVTVSS
CH1	**서열 번호:19**	ASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVE PKSC
항-IL-TNF/IL-17 FIT9-Ig 폴리펩티드 #3	**서열 번호:91**	DIVMTQTPLSLSVTPGQ PASISCRSSRSLVHSRG NTYLHWYLQKPGQSPQ LLIYKVSNRFIGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCSQSTHLPF TFGQGTKLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTAS

[0230]

항-TNF/IL-17 FIT-Ig 분자의 아미노산 서열

단백질 단백질 영역	서열 식별자	서열 12345678901234567890
		VVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGE C*
LY VL	**서열 번호:16**	DIVMTQTPLSLSVTPGQ PASISCRSSRSLVHSRG NTYLHWYLQKPGQSPQ LLIYKVSNRFIGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCSQSTHLPF TFGQGTKLEIK
CL	**서열 번호:17**	RTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC*

[0231]

[0232] **실시예 3.2 항-TNF/IL-17 FIT-Ig 단백질의 발현, 정제, 그리고 분석:**

[0233] 각 FIT-Ig의 모든 DNA 구조체는 pBOS 기초된 벡터 내로 하위클로닝되었고, 그리고 정확도를 담보하기 위해 염기서열결정되었다. FIT9-Ig의 구조체 #1, #2 및 #3은 앞서 설명된 바와 같이 293E 세포에서 폴리에틸렌이민 (PEI)을 이용하여 일시적으로 공동발현되었고, 그리고 FIT9-Ig 단백질은 단백질 A 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 발현 수준은 10-23 mg/L이었다. 정제된 단백질은 IL-17 (Hs27 세포에 의한 GROα의 생산) 및 TNF (L929 세포에 의한 IL-8의 생산)에 대한 세포-기초된 검정을 이용하여 기능적 분석에 종속되었다. 인간 TNF에 대항하여 FIT9-Ig의 중화 효능은 11.6 pM이었고 (동일한 실험에서 골리무맙에 의한 15.9 pM과 비교하여), 인간 IL-17에 대항하여 122 pM (동일한 실험에서 LY에 의한 51.5 pM과 비교하여)이었다. 전반적으로, FIT9-Ig는 부모 mAb의 생물학적 활성을 유지하였다.

[0234] **실시예 4: 항-CTLA-4/PD-1 Fabs-인-탠덤 면역글로불린 (FIT-Ig)의 작제, 발현, 그리고 정제**

[0235] 인간 CTLA-4 및 인간 PD-1에 결합할 수 있는 다른 FIT-Ig (FIT10-Ig)가 **도면 1**에서 보여지는 바와 같이, 3-폴리펩티드 구조체에서 항-CTLA-4 mAb 이필리무맙, 그리고 항-PD-1 mAb 니볼루맙을 이용하여 산출되었다. FIT10-Ig 구조체 #1을 산출하기 위해, 이필리무맙의 VL-CL은 니볼루맙 중쇄의 N 말단에 직접적으로 융합되었다 (**표 15**에서 보여지는 바와 같이). 구조체 #2는 이필리무맙의 VH-CH1이고, 그리고 세 번째 구조체는 니볼루맙의 VL-CL이다. FIT10-Ig에 대한 이들 3개의 구조체는 293 세포에서 동시형질감염되어, FIT10-Ig 단백질의 발현 및 분비를 유발하였다.

[0236] **실시예 4.1 항-CTLA-4/PD-1 FIT-Ig의 분자 클로닝:**

[0237] 분자 클로닝 방법은 항-hIL-17/hIL-20 FIT-Ig에서와 유사하다. 항- CTLA-4/PD-1 FIT-Ig의 최종 서열은 **표 16**에서 설명된다.

표 15

[0238] 항-CTLA-4/PD-1 FIT-Ig 분자 및 구조체.

FIT-Ig 분자	구조체 #1	링커	구조체 #2	구조체 #3
FIT10-Ig	VL_{CTLA-4}-CL-VH_{PD-1}-CH1-Fc	링커 없음	VH_{CTLA-4}-CH1	VL_{PD-1}-CL

표 16

항-CTLA-4/PD-1 FIT-Ig 분자의 아미노산 서열

단백질 단백질 영역	서열 식별자	서열 1234567890123456789**0**
항-CTLA-4/PD-1 FIT10-Ig 폴리펩티드 #1	**서열 번호:92**	EIVLTQSPGTLSLSPGER ATLSCRASQSVGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYG AFSRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQQYGSSPWTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECQ VQLVESGGGVVQPGRS LRLDCKASGITFSNSGM HWVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSKRYYADSVK GRFTISRDNSKNTLFLQ MNSLRAEDTAVYYCAT NDDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSP

[0239]

단백질 단백질 영역	서열 식별자	서열 12345678901234567890
		GK*
이필리무맙 VL	서열 번호:93	EIVLTQSPGTLSLSPGER ATLSCRASQSVGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYG AFSRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQQYGSSPWTFGQ GTKVEIK
CL	서열 번호:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
링커		없음
니볼루맙 VH	서열 번호:94	QVQLVESGGGVVQPGR SLRLDCKASGITFSNSG MHWVRQAPGKGLEWV AVIWYDGSKRYYADSV KGRFTISRDNSKNTLFL QMNSLRAEDTAVYYC ATNDDYWGQGTLVTV SS
CH1	서열 번호:19	ASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVE PKSC
Fc	서열 번호:20	DKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDS

[0240]

단백질 단백질 영역	서열 식별자	서열 12345678901234567890
		DGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK*
항-CTLA-4/PD-1 FIT10-Ig 폴리펩티드 #2	서열 번호:95	QVQLVESGGGVVQPGR SLRLSCAASGFTFSSYT MHWVRQAPGKGLEWV TFISYDGNNKYYADSV KGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAIYYCA RTGWLGPFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSC
이필리무맙 VH	서열 번호:96	QVQLVESGGGVVQPGR SLRLSCAASGFTFSSYT MHWVRQAPGKGLEWV TFISYDGNNKYYADSV KGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAIYYCA RTGWLGPFDYWGQGT LVTVSS
CH1	서열 번호:19	ASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVE PKSC
항-CTLA-4/PD-1 FIT10-Ig 폴리펩티드 #3	서열 번호:97	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQSSNWPRTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKA

[0241]

단백질 단백질 영역	서열 식별자	서열 12345678901234567890
		DYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC*
니볼루맙 VL	서열 번호:98	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQSSNWPRTFGQG TKVEIK
CL	서열 번호:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC*

[0242]

[0243] **실시예 4.2 항-CTLA-4/PD-1 FIT-Ig 단백질의 발현, 정제, 그리고 기능적 분석:**

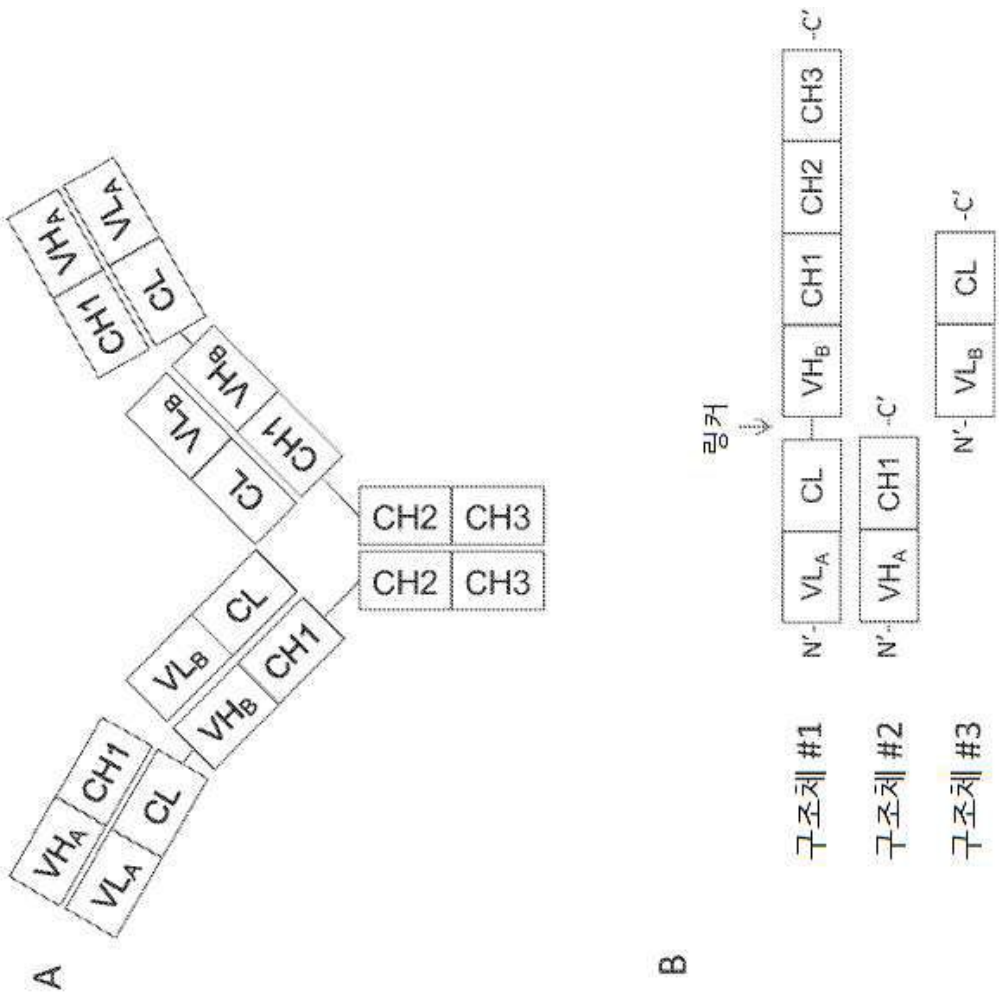
[0244] 각 FIT-Ig의 모든 DNA 구조체는 pBOS 기초된 벡터 내로 하위클로닝되었고, 그리고 정확도를 담보하기 위해 염기서열결정되었다. FIT10-Ig의 구조체 #1, #2 및 #3은 앞서 설명된 바와 같이 293E 세포에서 폴리에틸렌이민(PEI)을 이용하여 일시적으로 공동발현되었고, 그리고 FIT9-Ig 단백질은 98% 단위체 전체 단백질까지 단백질 A 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 발현 수준은 최대 43 mg/L이었다. 정제된 단백질은 재조합 CTLA-4Ig와 PD-1에 대한 ELISA를 이용한 결합 분석에 종속되었다. 간단히 말하면, CTLA-4에 결합을 위해, 인간 CTLA-4Ig (R&D systems)가 96-웰 평판에 고정되었고, 그 이후에 일과적인 세척 및 차단 절차가 뒤를 이었다. 이후, FIT-10-Ig 또는 이필리무맙이 다양한 농도에서 평판에 첨가되었고, 그 이후에 배양 및 복수 세척 단계가 뒤를 이었고, 그리고 항인간 Fab -HRP로 검출되었다. PD-1에 결합을 위해, 인간 PD-1 (his 태그를 가짐) (R&D systems)이 96-웰 평판에 고정되었고, 그 이후에 일과적인 세척 및 차단 절차가 뒤를 이었다. 이후, FIT-10-Ig 또는 니볼루맙이 다양한 농도에서 평판에 첨가되었고, 그 이후에 배양 및 복수 세척 단계가 뒤를 이었고, 그리고 항인간 Fc -HRP로 검출되었다 (**도면 6**). FIT10-Ig는 각각, 부모 mAb 이필리무맙 및 니볼루맙과 유사한 활성으로, CTLA-4 (A) 및 PD-1 (B) 둘 모두에 결합할 수 있었던 것으로 보인다.

[0245] 이에 더하여, FIT10-Ig가 재조합 CTLA-4 및 PD-1에 동시에 결합할 수 있는 지를 결정하기 위해, OctetRed를 이용한 복수-항원 결합 연구가 행위되었다. 간단히 말하면, FIT10-Ig가 10 μg/ml의 농도에서 AR2G 센서에 고정되었고, 그 이후에 80 nM의 농도로, 검정 완충액 (PBS pH 7.4, 0.1% BSA, 0.02% Tween)에서 CTLA-4Ig 그리고 이후, PD-1 (또는 PD-1 먼저, 이후 CTLA-4Ig)의 결합이 뒤를 이었다. 실험의 종결점에서, 표면은 pH1.5에서 10 mM 글리신으로 5회 재건되었다 (**도면 7**). 이러한 실험은 FIT10-Ig가 CTLA-4에 이미 결합되었을 때, 이것이 PD-1에 결합할 수 있었고, 그리고 그 반대도 또한 같았다는 것을 보여주는데, 이것은 FIT10-Ig가 CTLA-4Ig 및 PD-1 둘 모두에 동시에 결합할 수 있었다는 것을 지시한다.

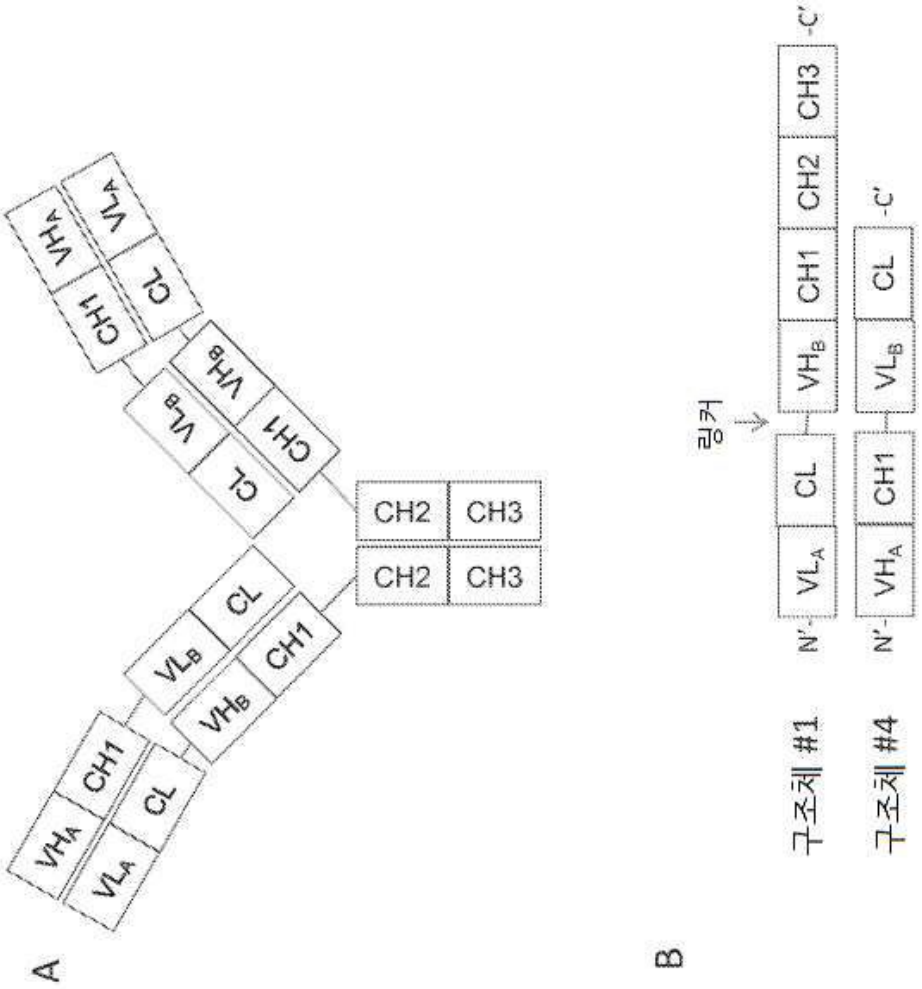
[0246] 본 명세서에서 인용된 모든 간행물, 특허 출원, 그리고 허여된 특허는 마치 각 개별 간행물, 특허 출원, 또는 허여된 특허가 참조로서 편입되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 지시되는 것처럼 본원에 참조로서 편입된다.

도면

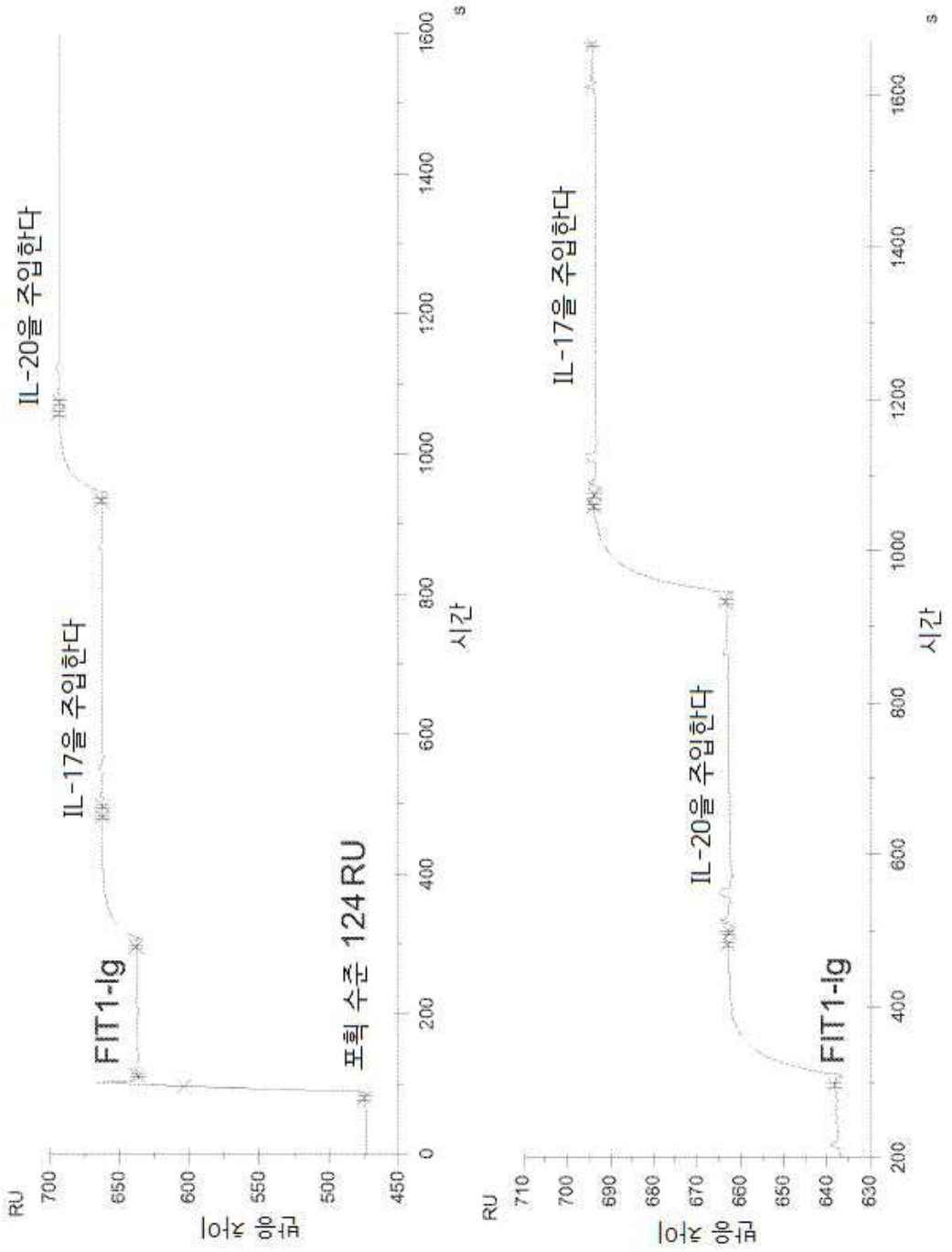
도면1


A
VHA
VLA
CH1
CL
VHB
VLB
CH1
CL
CH2
CH3
CH2
CH3
B
링커
VLA
CL
VHB
CH1
CH2
CH3
-C'
N'-
구조체 #1
VHA
CH1
-C'
N'-
구조체 #2
VLB
CL
-C'
N'-
구조체 #3

도면2

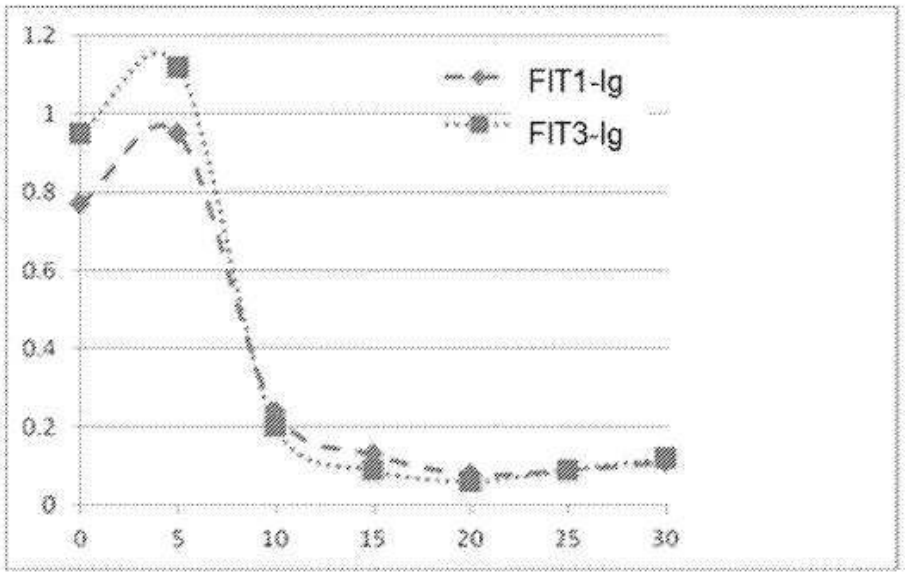

A
VHA
VLA
CH1
CL
VLB
VHB
CH1
CL
CH2
CH3
CH2
CH3
B
링커
N'
VLA
CL
VHB
CH1
CH2
CH3
-C'
구조체 #1
N'
VHA
CH1
VLB
CL
-C'
구조체 #4

도면3

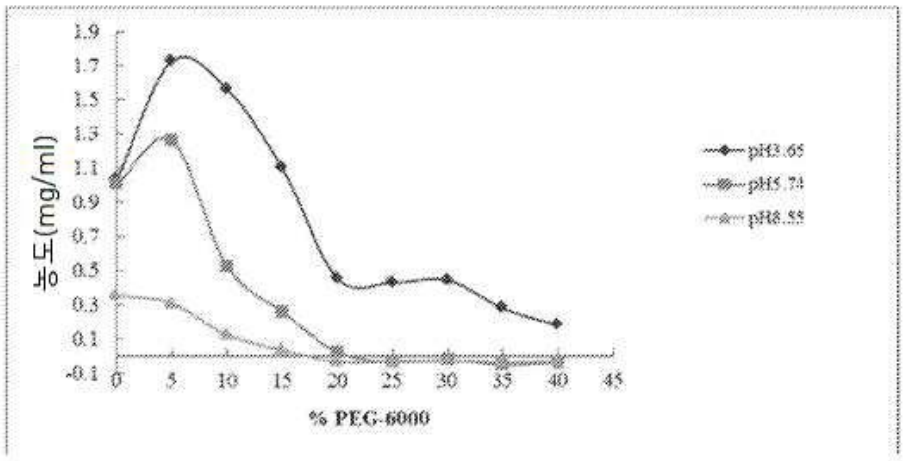

IL-20을 주입한다
IL-17을 주입한다
FIT1-Ig
포획 수준 124 RU
RU
결합 차이
시간
s
IL-17을 주입한다
IL-20을 주입한다
FIT1-Ig
RU
결합 차이
시간
s

도면4

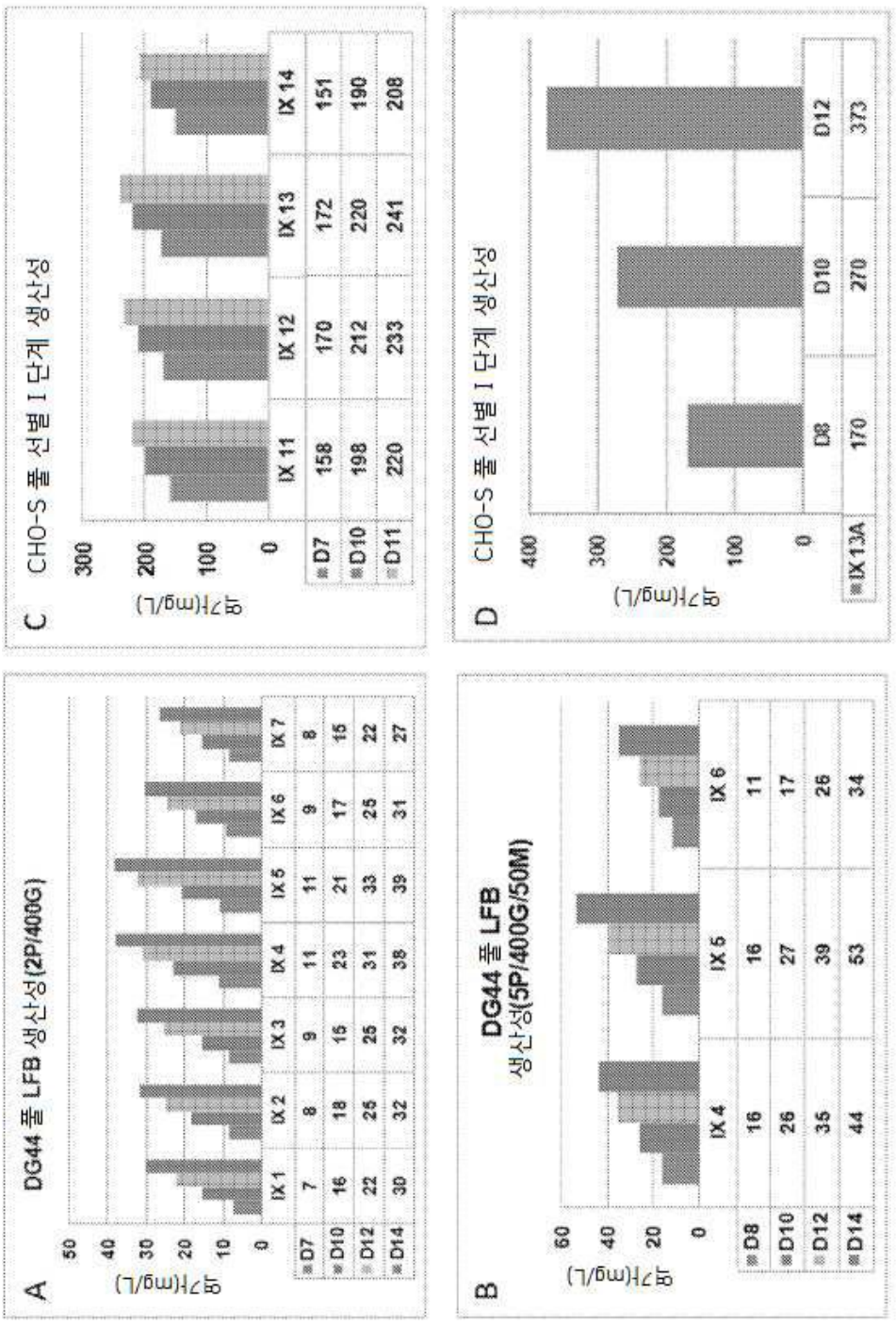
A. FIT-Ig의 PEG-유도된 침전



B. 리툭산의 PEG-유도된 침전

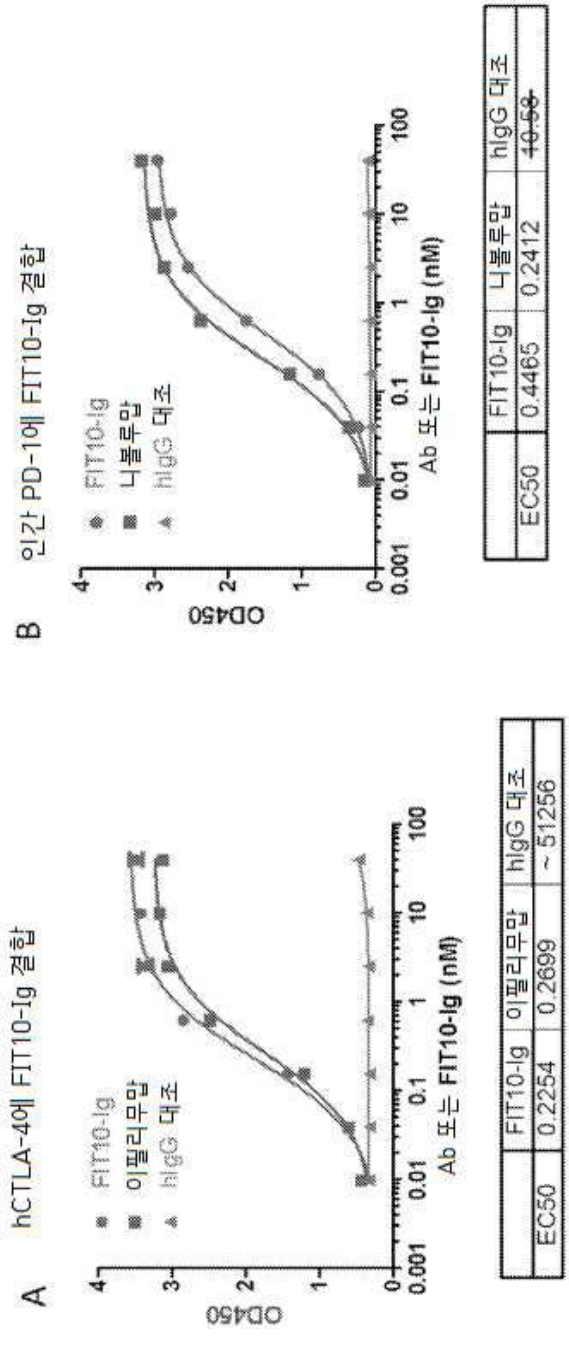


도면5



D:일자. IX 1-15: 클론 번호

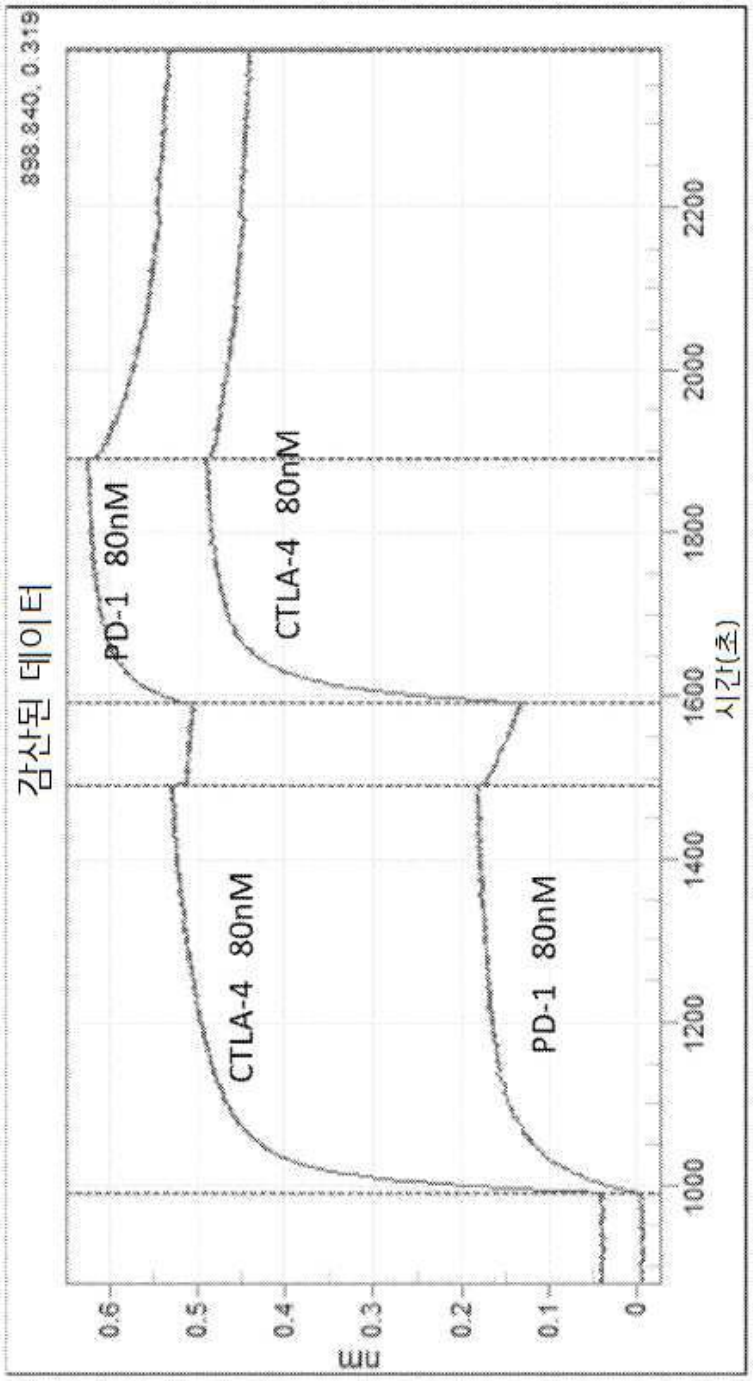
도면6



	FIT10-Ig	이필리무맙	hIgG 대조
EC50	0.2254	0.2699	~ 51256

	FIT10-Ig	니볼루맙	hIgG 대조
EC50	0.4465	0.2412	~~40.58~~

도면7



서 열 목 록

<110> Epimab BioTherapeutics INC.

<120> FABS-IN-TANDEM IMMUNOGLOBULIN AND USES THEREOF

<130> 2016-FPA-7589

<150> PCT/CN2013/090923

<151> 2013-12-30

<160> 98

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 1

caggtgcagc tggtgcagag cggcgccgaa g 31

<210> 2

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 2

gctggacctg agagcctgaa ccgccaccac cacactctcc cctgttgaag c 51

<210> 3

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 3

ggtggtggcg gttcaggctc tcaggtccag cttgtgcaat ctggcgccga gg 52

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 4

gtctgcggcc gctcatttac ccggagacag ggagag 36

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 5

taagcgtacg gtggctgcac catctgtctt c 31

<210> 6

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 6

cggcgccaga ttgcacaagc tggacctggc ctgaaccaca ctctcccctg ttgaagctc 59

<210> 7

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 7

gctggacctg agagcctgaa ccgccaccac cacactctcc cctgttgaag c 51

<210> 8

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 8

ggtggtggcg gttcaggctc tcaggtccag cttgtgcaat ctggcgccga gg 52

<210> 9

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 9

tacctcggcg ccagattgca caagctggac ctgacactct cccctgttga agctctttg 59

<210> 10

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 10

catgacacct taacagaggc cccaggtcgt tttacctcgg cgccagattg cacaag 56

<210> 11

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 11

caataagctt tacatgacac cttaacagag gccccag 37

<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 12

tcgagcggcc gctcaacaag atttgggctc aactttcttg 40

<210> 13

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 13

gctgctgctg tggttccccg gctcgcgatg cgctatacag ttgacacagt c 51

<210> 14

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 14

gaagatgaag acagatggtg cagccaccgt acgcttgatc tctacctttg ttc 53

<210> 15

<211> 676

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-IL-17/IL-20 FIT1-Ig polypeptide

<400> 15

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ile Gly Val Pro
50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gln Val Gln Leu Val

210 215 220

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

225 230 235 240

Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Asp Ile Ile His Trp Val

245 250 255

Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Ala

260 265 270

Gly Tyr Gly Asn Thr Gln Tyr Ser Gln Asn Phe Gln Asp Arg Val Ser

275 280 285

Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ile Ser

290 295 300

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

305 310 315 320

Trp Phe Gly Glu Ser Ser Pro His Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

385 390 395 400

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

405 410 415

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

420 425 430

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

Ser Pro Gly Lys

675

<210> 16

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

100 105 110

<210> 17
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 17
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

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

100 105

<210> 18

<211> 127

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 18

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Asp

20 25 30

Ile Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Tyr Gly Asn Thr Gln Tyr Ser Gln Asn Phe

50 55 60

Gln Asp Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Pro Leu Trp Phe Gly Glu Ser Ser Pro His Asp Tyr Tyr

100 105 110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 19

<211> 103

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

100

<210> 20

<211> 227

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

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

<210> 21
<211> 222
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Anti-IL-17/IL-20 FIT1-Ig polypeptide

<400> 21
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Val Ile Asn Pro Met Tyr Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

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

210 215 220

<210> 22
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 22
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Val Ile Asn Pro Met Tyr Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe

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

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 23

<211>

214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-IL-17/IL-20 FIT1-Ig polypeptide

<400> 23

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 Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala

20 25 30

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

35 40 45

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 24

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 24

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 Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala

20 25 30

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

35 40 45

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 25

<211> 679

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-IL-17/IL-20 FIT2-Ig polypeptide

<400> 25

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Arg Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ile Gly Val Pro

50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95
Thr His Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

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

195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Ser Gly Gln Val
210 215 220
Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Arg Pro Gly Ala Ser Val
225 230 235 240
Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Asp Ile Ile
245 250 255
His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Trp

260 265 270

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

340 345 350
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
355 360 365
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
370 375 380
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
385 390 395 400
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
405 410 415

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

485 490 495
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
500 505 510

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
515 520 525

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
530 535 540

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
545 550 555 560

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
565 570 575

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
580 585 590

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
595 600 605

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
610 615 620

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

625 630 635 640

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
645 650 655

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
660 665 670

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
675

<210> 26

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 26

Gly Ser Gly

1

<210> 27

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-IL-17/IL-20 FIT3-Ig polypeptide

<400> 27

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ile Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

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

195 200 205

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

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

260 265 270
Trp Met Gly Trp Ile Asn Ala Gly Tyr Gly Asn Thr Gln Tyr Ser Gln
275 280 285
Asn Phe Gln Asp Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr
290 295 300
Ala Tyr Met Glu Leu Ile Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
305 310 315 320
Tyr Cys Ala Arg Glu Pro Leu Trp Phe Gly Glu Ser Ser Pro His Asp
325 330 335

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

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

465 470 475 480

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
485 490 495
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
500 505 510
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
515 520 525
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
530 535 540
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser

545 550 555 560
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
565 570 575
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
580 585 590
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
595 600 605
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
610 615 620

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
625 630 635 640
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
645 650 655
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
660 665 670
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
675 680

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 28

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser

1 5

<210> 29

<211> 436

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-IL-17/IL-20 FIT4-Ig polypeptide

<400> 29

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Met Tyr Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Tyr Asp Tyr Phe Thr Gly Thr Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

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

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

Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
325 330 335
Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
340 345 350
Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
355 360 365
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
370 375 380
Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr

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

Arg Gly Glu Cys

435

<210> 30

<211> 439

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-IL-17/IL-20 FIT5-Ig polypeptide

<400> 30

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Met Tyr Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Tyr Asp Tyr Phe Thr Gly Thr Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Ser
210 215 220

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

290 295 300
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro
305 310 315 320
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
325 330 335
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
340 345 350
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
355 360 365

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

435

<210> 31

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-IL-17/IL-20 FIT6-Ig polypeptide

<400> 31

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

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

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

Gly Val Ile Asn Pro Met Tyr Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Tyr Asp Tyr Phe Thr Gly Thr Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

115 120 125

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

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

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

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

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly

210 215 220

Gly Gly Ser Gly Ser Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu

225 230 235 240

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

325 330 335

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

340 345 350

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

355 360 365

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

370 375 380

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

385 390 395 400

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

405 410 415

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

420 425 430

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

435 440

<210> 32

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 32

gtctgcggcc gctcatttac ccggagacag ggagag 36

<210> 33

<211> 40

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 33

tcgagcggcc gctcaacaag atttgggctc aactttcttg 40

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 34

caggtccagc tgcagcagtc tg 22

<210> 35

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 35

gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc tcgcccgtca caaagagctt caacagggg 59

<210> 36

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 36

tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa gtcacccatc agggcctgag 50

<210> 37

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 37

tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 50

<210> 38

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 38

ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgtgaa gtgcagctgg tggagtctg 59

<210> 39

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 39

gctgctgctg tggttccccg gctcgcgatg cgaaattgtg ttgacacagt c 51

<210> 40

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 40

aagatgaaga cagatggtgc agccaccgta cgtttaatct ccagtcgtgt cc 52

<210> 41

<211> 665

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> OKT3/Ofatumumab FIT7-Ig polypeptide

<400> 41

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

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

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

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

195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
210 215 220

Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
225 230 235 240

Thr Phe Asn Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
245 250 255
Gly Leu Glu Trp Val Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly
260 265 270

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

340 345 350
Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
355 360 365
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
370 375 380
Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
385 390 395 400
Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
405 410 415

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

485 490 495

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

660 665

<210> 42

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 42

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

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

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

<210> 43
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 43
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

115 120
<210> 44

<211> 222

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> OKT3/Ofatumumab FIT7-Ig polypeptide

<400> 44

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

115 120 125

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

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

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

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

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

210 215 220

<210> 45

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 45

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 46

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> OKT3/Ofatumumab FIT7-Ig polypeptide

<400> 46

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

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

100 105

<210> 48
<211> 672
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> OKT3/Ofatumumab FIT8-Ig polypeptide
<400> 48
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

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

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

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Glu Val Gln Leu

210 215 220

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

225 230 235 240

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr Ala Met His Trp

245 250 255

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

260 265 270

Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe

275 280 285

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn

290 295 300

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

305 310 315 320

Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

325 330 335

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

340 345 350

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

355 360 365

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

370 375 380

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

385 390 395 400

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

405 410 415

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

420 425 430

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

435 440 445

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

450 455 460

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

465 470 475 480

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

485 490 495

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

580 585 590

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

595 600 605

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

610 615 620

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
625 630 635 640
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
645 650 655
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
660 665 670

<210> 49
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> peptide linker sequence
<400> 49
Gly Gly Ser

1

<210> 50
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> peptide linker sequence
<400> 50
Ser Gly Gly

1

<210> 51
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> peptide linker sequence
<400> 51
Gly Gly Gly

1

<210> 52
<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 52

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 53

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 53

Ser Gly Gly Gly

1

<210> 54

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 54

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 55

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 55

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 56

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 56

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 57

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

1 5 10 15

<210> 58

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 58

Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg

1 5 10 15

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 59

Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg

1 5 10 15

Val

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 60

Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly

1 5

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 61

Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly

1 5 10

<210> 62

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 62

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

1 5 10 15

<210> 63

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 63

Ser Ala Lys Thr Thr Pro

1 5

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 64

Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly

1 5 10

<210> 65

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 65

Arg Ala Asp Ala Ala Pro

1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 66

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser

1 5

<210> 67

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 67

Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ser

1 5 10

<210> 68

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 68

Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 69

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 69

Ser Ala Lys Thr Thr Pro
1 5

<210> 70

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 70

Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly
1 5 10

<210> 71

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 71

Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala
1 5 10 15

Arg Val

<210> 72

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 72

Ala Asp Ala Ala Pro

1 5

<210> 73

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 73

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

1 5 10

<210> 74

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 74

Thr Val Ala Ala Pro

1 5

<210> 75

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 75

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

1 5 10

<210> 76

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 76

Gln Pro Lys Ala Ala Pro

1 5

<210> 77

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

peptide linker sequence

<400> 77

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

1 5 10

<210> 78

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 78

Ala Lys Thr Thr Pro Pro

1 5

<210> 79

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 79

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Thr Pro Leu Ala Pro

1 5 10

<210> 80

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 80

Ala Lys Thr Thr Ala Pro

1 5

<210> 81

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 81

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro

1 5 10

<210> 82

<211> 6

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 82

Ala Ser Thr Lys Gly Pro

1 5

<210> 83

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 83

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

1 5 10

<210> 84

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 84

Gly Glu Asn Lys Val Glu Tyr Ala Pro Ala Leu Met Ala Leu Ser

1 5 10 15

<210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 85

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

1 5 10 15

<210> 86

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker sequence

<400> 86

Gly His Glu Ala Ala Ala Val Met Gln Val Gln Tyr Pro Ala Ser

1 5 10 15

<210> 87

<211> 664

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNF/IL-17 FIT9-Ig polypeptide

<400> 87

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Tyr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95
Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
210 215 220
Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
225 230 235 240
Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
245 250 255
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Val Ile Asn Pro Met Tyr Gly Thr
260 265 270

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

Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
325 330 335
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr

340 345 350
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
355 360 365
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
370 375 380
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
385 390 395 400
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
405 410 415

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

485 490 495
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
500 505 510
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
515 520 525
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
530 535 540
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

660

<210> 88

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Tyr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro

85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105

<210> 89

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNF/IL-17 FIT9-Ig polypeptide

<400> 89

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

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

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

35 40 45

Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

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

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

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

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

180 185 190

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

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val

210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys

225

<210> 90

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly

100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 91

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNF/IL-17 FIT9-Ig polypeptide

<400> 91

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

1 5 10 15

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

85 90 95
Thr His Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

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

<210> 92

<211> 658

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> CTLA-4/PD-1 FIT10-Ig polypeptide

<400> 92

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys

195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
210 215 220

Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser
225 230 235 240

Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
245 250 255
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys
260 265 270

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

340 345 350
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
355 360 365
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
370 375 380
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
385 390 395 400
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
405 410 415

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

Gly Lys

<210> 93

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser

20 25 30

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

100 105

<210> 94
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 94
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

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

<210> 95
<211> 221

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTLA-4/PD-1 FIT10-Ig polypeptide

<400> 95

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

210 215 220

<210> 96

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 97

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTLA-4/PD-1 FIT10-Ig polypeptide

<400> 97

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

35 40 45

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

115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 98
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 98
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105