(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0008903
(43) 공개일자 2025년01월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/22 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01) *C07K 16/24* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/22 (2013.01)
A61P 27/02 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2024-7040614
(22) 출원일자(국제) 2023년05월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년12월06일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2023/062545
(87) 국제공개번호 WO 2023/217933
국제공개일자 2023년11월16일
(30) 우선권주장
22172759.7 2022년05월11일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
에프. 호프만-라 로슈 아게
스위스 체하-4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124
(72) 발명자
베크만, 롤란트
독일 82377 펜츠베르크 노넨발트 2 로슈 디아그노스틱스 게엠베하
벤츠 외르그
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

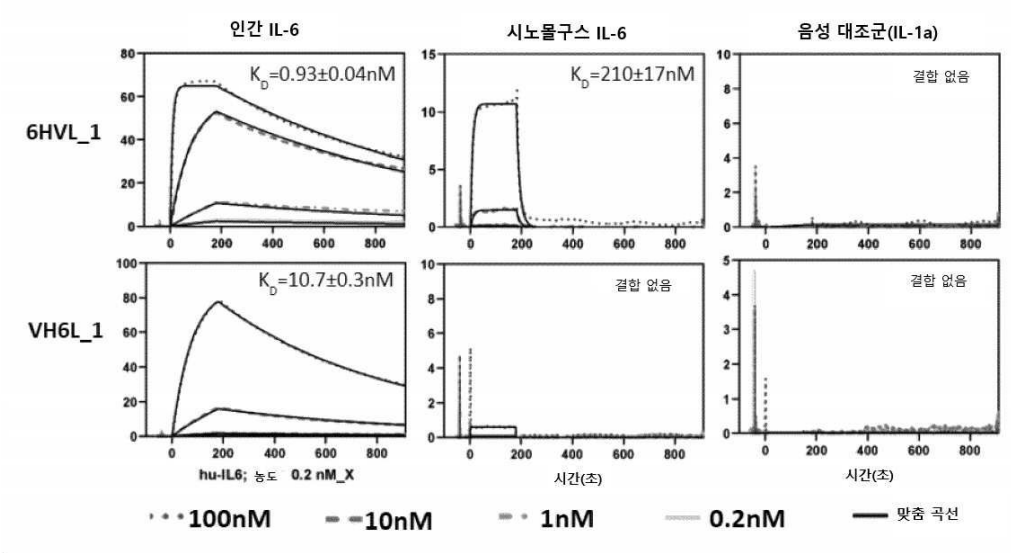
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **VEGF-A 및 IL6에 결합하는 항체 및 사용 방법**

(57) 요 약

본 발명은, 예를 들어 이중특이적 Fab 단편 형태의 항-VEGF-A/항-IL6 항체 및 이를 사용하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C07K 16/248 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자
베르톨도 다비데
독일 82377 펜츠베르크 노넨발트 2 로슈 디아그노스틱스 게엠베하
드로우넬 페이 마리
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
핀스트라, 데릭
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
펜 세바스찬
독일 82377 펜츠베르크 노넨발트 2 로슈 디아그노스틱스 게엠베하
프로스트 스테판
독일 82377 펜츠베르크 노넨발트 2 로슈 디아그노스틱스 게엠베하
힌네르 마를론
독일 82377 펜츠베르크 노넨발트 2 로슈 디아그노스틱스 게엠베하
옌센 크리스티안 호볼트
독일 82377 펜츠베르크 노넨발트 2 로슈 디아그노스틱스 게엠베하
마체코 다니엘라
독일 82377 펜츠베르크 노넨발트 2 로슈 디아그노스틱스 게엠베하
마이어 아나스타샤
독일 82377 펜츠베르크 노넨발트 2 로슈 디아그노스틱스 게엠베하
플뢰트너 올리버
독일 82377 펜츠베르크 노넨발트 2 로슈 디아그노스틱스 게엠베하
스펙 야니나
독일 82377 펜츠베르크 노넨발트 2 로슈 디아그노스틱스 게엠베하
스트라스버거 파멜라
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
와이저 바바라 마리-루이스
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
위드머 가브리엘라
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체로서,

(a) 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (b) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (c) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 가변 중쇄(VH) 도메인, 및 (d) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (e) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (f) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 가변 중쇄(VL) 도메인을 포함하고,

최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 도메인; 및

최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 도메인

을 포함하는 항체.

청구항 2

제1항에 있어서,

최대 5개의 아미노산 치환이 각각의 가변 도메인의 FR 영역 내에서 발생하는, 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

서열번호 22의 VH 서열 및 서열번호 21의 VL 서열을 포함하는 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

서열번호 24의 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 23의 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체.

청구항 5

인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체로서, 서열번호 22의 VH 서열 및 서열번호 21의 VL 서열을 포함하는 항체.

청구항 6

IL6 상의 동일한 에피토프에 결합하는 인간 IL6에 결합하는 항체로서, 서열번호 35의 VL 도메인 및 서열번호 36의 VH 도메인을 갖는 항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

항체가 Fab 단편인, 항체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

항체가 이중특이적 항체 단편인, 항체.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 항체를 인코딩하는 단리된 핵산.

청구항 10

제9항에 따른 핵산을 포함하는 숙주 세포.

청구항 11

인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체를 생성하는 방법으로서, 항체가 생성되도록 제10항에 따른 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

숙주 세포가 CHO 세포인, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 항체; 및

약학적으로 허용가능한 담체

를 포함하는 약학적 제형.

청구항 14

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 항체를 포함하는 포트 전달 장치(port delivery device).

청구항 15

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

약제로서 사용하기 위한 항체.

청구항 16

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 항체; 또는

제13항에 따른 약학적 제형

을 포함하는 포트 전달 장치.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항-VEGF-A/항-IL6 항체 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] VEGF에 결합하는 항체, 예를 들어 라니비주맙은 연령 관련 황반 변성과 같은 안구 혈관 질환의 치료를 위한 치료제로서 사용된다. 예를 들어, WO2014/074905에 개시된 바와 같이, IL6에 결합하는 항체가 안질환의 치료를 위해 제안되었다.

[0003] WO2012/163520에는 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL) 도메인의 하나의 쌍에 2개의 파라토프를 포함하는 이중특이성 항체("DutaFabs")가 개시되어 있다. WO2012/163520의 이중 특이적 항체의 각 파라토프는 중쇄 및 경쇄 CDR로부터의 아미노산을 포함하며, 여기서 중쇄 CDR-H1 및 CDR-H3 뿐만 아니라 경쇄 CDR-L2는 제1 파라토프에 기여하고, 경쇄 CDR-L1 및 CDR-L3 뿐만 아니라 중쇄 CDR-H2는 제2 파라토프에 기여한다. 개별 파라토프를 포함하는 단일 특이적 항체는 제1 또는 제2 파라토프에서 다양화되는 상이한 Fab-라이브러리로부터 독립적으로 분리된다. 상기 단일특이적 항체의 아미노산 서열이 확인되고 이중 파라토프 VH 및 VL 쌍으로 병합된다. VEGF 및 IL-6에 특이적으로 결합하는, 서열번호 01의 VL 서열 및 서열번호 02의 VH 서열을 갖는 "VH6L"로 명명된 하나의 예시적인 Fab 단편은 개념 예의 증거로서 WO2012/163520에 개시되어 있다.

[0004] 하지만, 예를 들어, 표준 치료에 비해 효능을 개선하고 작용 기간을 개선하여 결과적으로 유리체강내 주사 빈도

를 감소시켜 환자에 대한 투여 부담을 줄여주는 VEGF 및 IL6에 결합하는 개선된 치료 항체가 안질환 치료 적용을 위해 필요하다.

발명의 내용

[0005] 본 발명은 이중특이적 항-VEGF-A/항-IL6 항체 및 이를 사용하는 방법에 관한 것이다.

[0006] 일 양태에서, 본 발명은 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체로서,

[0007] (a) 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (b) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (c) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및 (d) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (e) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (f) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하고, 최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 도메인; 및 최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 도메인을 포함하는 항체에 관한 것이다.

[0008] 본 발명의 일 구현예는 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체로서,

[0009] 서열번호 22의 VH 서열 및 서열번호 21의 VL 서열을 포함하는 항체에 관한 것이다.

[0010] 본 발명의 일 구현예는 서열번호 24의 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 23의 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체에 관한 것이다.

[0011] 본 발명의 일 구현예는 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체 Fab 단편에 관한 것이다.

[0012] 본 발명의 일 구현예는 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 이중특이적 항체 Fab 단편에 관한 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 양태는 본 발명에 따른 항체로서 IL6 상의 동일한 에피토프에 결합하는 IL6에 결합하는 항체를 제공한다.

[0014] 다른 양태에서, 본 발명은 인간 IL6에 결합하는 항체로서:

[0015] a) IL6 파라토프가 아미노산 잔기 Y1, I2, Q3, Y26, E27, F28, T29, H30, Q31, D32, P52a, R94, I96, D97, F98, D101, T102를 포함하는 인간 VH3 프레임워크에 기초한 VH 도메인, 및 IL6 파라토프가 아미노산 잔기 Y49, D50, S53, N54, Y55, P56, S57, Y91, Y96을 포함하는 인간 Vkappa1 프레임워크에 기초한 VL 도메인; 또는

[0016] b) IL6 파라토프가 아미노산 잔기 Y1, P2, Q3, V26, L27, F28, K29, H30, Q31, D32, P52a, R94, L96, D97, F98, D101, E102를 포함하는 인간 VH3 프레임워크에 기초한 VH 도메인, 및 IL6 파라토프가 아미노산 잔기 Y49, D50, D53, R54, Y55, P56, E57, Y91, Y96(카바트에 따른 넘버링)을 포함하는 인간 Vkappa1 프레임워크에 기초한 VL 도메인을 포함하는, 항체를 제공한다.

[0017] 다른 양태에서, 본 발명은 서열번호 35의 VL 도메인 및 서열번호 36의 VH 도메인을 갖는 항체로서 IL6 상의 동일한 에피토프에 결합하는 IL6에 결합하는 항체를 제공한다. 일 구현예에서, 항체는 IL6 파라토프가 아미노산 잔기 1, 2, 3, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 52a, 94, 96, 97, 98, 101, 102를 포함하는 인간 VH3 프레임워크를 갖는 VH 도메인, 및 IL6 파라토프가 아미노산 잔기 49, 50, 53, 54, 55, 56, 57, 91, 96을 포함하는 인간 Vkappa1 프레임워크를 갖는 VL 도메인을 포함한다.

[0018] 일 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 인코딩하는 단리된 핵산을 제공한다.

[0019] 일 양태에서, 본 발명은 본 발명의 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 일 구현예에서, 숙주 세포는 CHO 세포이다. 일 구현예에서 숙주 세포는 대장균 세포이다.

[0020] 일 양태에서, 본 발명은 본 발명의 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

[0021] 일 양태에서, 본 발명은 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체의 생성 방법으로서, 항체가 생서외도록 본 발명의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 방법을 제공한다.

[0022] 일 양태에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 생성된 항체를 제공한다.

[0023] 일 양태에서 본 발명은 본 발명의 항체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 제형을 제공한다.

[0024] 일 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 사전 충전형 주사기를 제공

한다.

[0025] 일 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 안구 이식물을 제공한다. 일 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 포함하는 포트 전달 장치(port delivery device)를 포함한다.

[0026] 본 발명의 일 양태에서, 포트 전달 장치는 항체 또는 약학적 제형을 투여한다.

[0027] 일 양태에서, 본 발명은 약제로 사용하기 위한, 일 구현에에서는 혈관 질환의 치료에 사용하기 위한 본 발명의 항체를 제공한다.

[0028] 일 양태에서, 본 발명은 약제, 일 구현예에서 혈관 질환 치료용 약제의 제조에 있어서 본 발명의 항체 또는 본 발명의 약학적 조성물의 용도를 제공한다.

[0029] 일 양태에서, 본 발명은 유효량의 본 발명의 항체 또는 본 발명의 약학적 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 혈관 질환을 갖는 개체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0030] 일 양태에서, 본 발명은 유효량의 본 발명의 항체 또는 본 발명의 약학적 조성물을 개체에게 투여하여 혈관신생을 억제하는 단계를 포함하는, 개체에서 혈관신생을 억제하는 방법을 제공한다.

[0031] 본 발명에 따르면 항체 Fab 단편의 형태로 제공되는 경우에도 이의 표적 항원에 독립적으로 결합할 수 있는 치료용 항-VEGF-A/항-IL6 항체가 제공된다. 약리학적으로 관련된 범위 내에서 시노몰구스 표적과 우수한 KD 및 종 교차 반응성을 나타낸다. 본 발명의 항체는 안구 혈관 질환의 치료에 적합하다. 본 발명의 항체는 이의 치료적 적용을 허용하는 우수한 발현성 및 현상성(예를 들어, 높은 결합 효능, 높은 생물물리학적 및 생화학적 안정성, 고농도 제형), 특히 낮은 효능의 용량을 지지하는 두 표적에 대한 높은 친화도, 및 장기간 동안 유리한 높은 안정성을 포함하는 몇몇 가치있는 특성을 제공한다. 비-항체 접근법과 비교하여 본 발명의 항체는 높은 인간성과 인공 도메인 및 링커의 결여로 인해 더 수용 가능한 경향이 있다. 또한, 본 발명의 항체는 안구 적용에 적합한 점도를 갖는 고농도 액체 제형으로 제공되는 것이 유리하다. 고농도로 제공될 수 있기 때문에, 본 발명의 항체를 사용한 치료는 한 번의 치료에 더 높은 용량의 치료제가 적용될 수 있어 더 긴 치료 주기에 사용 가능하기 때문에 환자에게 더 수용 가능하다. 본 발명에 기재된 것과 같은 이중특이적 Fab 단편은 훨씬 더 낮은 분자량으로 인해 이중특이적 전장 IgG 항체에 비해 추가적인 이점을 갖는다. Fab가 약 50 kDa의 분자량을 갖는 반면, 전장 항체의 중량은 동일한 수의 결합 부위를 제공하면서 3배 높다(약 150 kDa). 따라서, 주어진 양의 약물에 대해, 이중특이적 Fab 단편은 전장 IgG 항체에 비해 3배 더 많은 결합 부위를 함유할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0032] **도 1:** 표면 플라스몬 공명에 의해 결정된 바와 같은 인간 및 시노몰구스 IL6에 대한 모 이중특이적 항체 6HVL_1 및 V6HL_1의 결합.

도 2: 인간 VEGF-165를 이용한 모 이중특이적 항체 6HVL_1 및 V6HL_1의 VEGF IC50.

도 3: 표면 플라스몬 공명에 의해 결정된 바와 같은 인간 및 시노몰구스 IL6에 대한 개선된 이중특이적 항체의 결합.

도 4: 인간 VEGF-121 및 VEGF-165를 사용하는 개선된 이중특이적 항체의 VEGF IC50.

도 5: Fab0182 - IL-6 복합체의 결정구조. Fab 0182에 결합된 IL-6의 구조에 대한 전체적인 관점. IL-6은 연어색으로 착색되고, Fab 0182의 경쇄 및 중쇄는 각각 청록색 및 청색으로 착색된다.

도 6: Fab 6HVL4.1 - IL-6 복합체의 결정구조. Fab 6HVL4.1에 결합된 IL-6의 구조에 대한 전체적인 관점. IL-6은 연어색으로 착색되고, Fab 6HVL4.1의 경쇄 및 중쇄는 각각 백색 및 청색으로 착색된다.

도 7: 고정된 항-Fab 항체를 사용한 SPR에 의해 평가된 바와 같은 이의 표적에 대한 항-VEGF/항-IL-6 Fab의 동시 결합.

도 8: 고정된 VEGF-A를 갖는 SPR에 의해 평가된 바와 같은 IL-6의 존재 하에 항-VEGF/항-IL-6 Fab에 의한 VEGF-R2 결합의 차단.

도 9: IL6 활성에 대한 VEGF-결합의 영향은 하기와 같이 세포-기반 IL-6 특이적 리포터 유전자 검정(사전인큐베이션 없이)에 의해 평가하였다.

도 10: IL6 활성에 대한 VEGF-결합의 영향은 하기와 같이 세포-기반 IL-6 특이적 리포터 유전자 검정(사전인큐

베이션 사용)에 의해 평가하였다.

도 11: 6HVL_4에 의한 HRMEC에서의 IL-6 신호전달의 억제.

도 12: 6HVL_4에 의한 VEGF-A 유도된 HUVEC 증식의 % 억제에서의 용량-의존적 변화.

도 13: 6HVL_4에 의해 HRMVEC에 대한 IL6/IL6R/VEGF 유도된 장벽 파괴의 회수.

도 14: 아플리버셉트에 의해 HRMVEC에 대한 IL6/IL6R/VEGF 유도된 장벽 파괴의 회수.

도 15: 지시된 항체의 VH 및 VL 도메인의 아미노산 서열. 아미노산 위치의 카바트 넘버링이 표시된다. 실시예 13에서 확인된 바와 같은 IL6 파라토프에 기여하는 아미노산 위치는 검정색 박스 모양에 의해 강조된다.

도 16: IL6에 결합된 Fab 0182 및 pdb-acc. 1p9m(하단)로부터의 IL6/IL6R 복합체의 구조의 오버레이와 비교한 IL6/IL6R/gp130 복합체(상단; pdb-acc.# 1p9m)의 이미지.

도 17: IL6에 결합된 Fab 6HVL4.1 및 pdb-acc. 1p9m(하단)로부터의 IL6/IL6R 복합체의 구조의 오버레이와 비교한 IL6/IL6R/gp130 복합체(상단; pdb-acc.# 1p9m)의 이미지.

도 18: Fab P1AE2421과 예비형성된 복합체에 관여할 때 IL6R이 IL6에 결합하는 능력을 조사하는 SPR 가교 실험.

도 19: 인간 "하이퍼-IL6"(인간 IL6 및 IL6R의 키메라)에 결합하는 Fab P1AE2421의 능력을 조사하는 SPR 가교 실험.

도 20: IL6R에 대한 IL6의 결합을 차단하는 방식으로 IL6에 결합하는 Fab P1AE2421의 능력을 결정하는 ELISA 경쟁 실험.

도 21: 표면 플라스몬 공명에 의해 결정된 바와 같은 인간 및 시노몰구스 IL6에 IL6 결합 항체 6HdL2.05의 결합.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] **1. 정의**

[0034] 본원에 달리 정의되지 않는 한, 본 발명과 관련하여 사용되는 과학 및 기술 용어들은 해당 분야의 숙련된 기술자들이 통상적으로 이해하는 의미를 가져야 한다. 추가로, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수형 용어는 복수형을 포함하고, 복수형 용어는 단수형을 포함해야 한다. 본 개시의 방법 및 기술은 일반적으로 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 실시된다. 일반적으로, 본원에 기재된 생화학, 효소학, 분자 및 세포 생물학, 미생물학, 유전학 및 단백질 및 핵산 화학 및 혼성화와 관련하여 사용되는 명명법 및 기술은 당업계에 일반적으로 공지되어 있고 일반적으로 사용되는 것들이다.

[0035] 본원에서 달리 정의되지 않는 한, "~를 포함하는"이라는 용어는 "~로 이루어진"이라는 용어를 포함해야 한다.

[0036] 특정 값(예를 들어, 온도, 농도, 시간 및 기타)과 관련하여 본원에 사용된 용어 "약"은 용어 "약"이 나타내는 특정 값의 +/- 1%의 변동을 지칭할 것이다.

[0037] 본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 이들이 원하는 항원-결합 활성을 나타내는 한, 단클론 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체), 및 항체 단편을 포함하지만 이에 제한되지는 다양한 항체 구조를 포괄한다.

[0038] "단리된" 항체는 이의 자연 환경의 구성성분에서 분리된 항체이다. 일부 구현예들에서, 항체는 예를 들어, 전기영동의(예를 들어, SDS-PAGE, 등전위 초점조절(IEF), 모세관 전기이동) 또는 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환 또는 역상 HPLC) 방법에 의해 측정되었을 때 95% 또는 99% 순도를 초과하여 정제된다. 항체 순도 평가 방법의 검토는, 예를 들어, Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)를 참조한다.

[0039] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "단일클론 항체"는 실질적으로 동질성 항체의 모집단으로부터 수득된 항체를 지칭한다, 다시 말하면, 상기 모집단을 구성하는 개별 항체는 예를 들어, 자연 발생 돌연변이를 포함하거나 단일클론 항체 제조물의 생성 동안 발생하는 가능한 변이체 항체(이런 변이체는 일반적으로 미량으로 존재함)를 제외하고, 동일하고 및/또는 동일한 에피토프에 결합한다. 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 지향된 상이한 항체를 전형적으로 포함하는 다중클론 항체 제조물과 대조적으로, 단일클론 항체 제조물의 각 단일클론 항체는 항원 상에서 단일 결정인자에 대해 지향된다. 따라서, 수식어 "단일클론"은 항체의 실질적으로 동질성 모집단으로

부터 수득되는 것으로서 항체의 특징을 표시하고, 그리고 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생성을 필요로 하는 것으로 해석되지 않는다.

[0040] 용어 "전장 항체", "원형 항체", 및 "전체 항체"는 본원에서 호환적으로 사용되며, 천연 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖는 또는 본원에서 정의된 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 지칭한다.

[0041] 항체의 "부류"는 이의 중쇄에 의해 소유된 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 지칭한다. 항체에는 5가지 주요 분류가 있다: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 그리고 이들 중 몇몇은 하위분류(이소형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2로 더욱 세분될 수 있다. 특정 구현예들에서, 항체는 IgG1 이소형이다. 특정 구현예들에서, 항체는 Fc-영역 효과기 기능을 감소시키는 P329G, L234A 및 L235A 돌연변이를 갖는 IgG1 이소형이다. 다른 구현예들에서, 항체는 IgG2 이소형의 항체이다. 특정 구현예들에서, 항체는 IgG4 항체의 안정성을 개선하기 위해 힌지 영역에 S228P 돌연변이를 갖는 IgG4 이소형이다. 상이한 면역글로불린 분류에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 차례로 α, δ, ε, γ 및 μ로 불린다. 항체의 경쇄는 이의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라 카파(κ) 및 람다(λ)라고 하는 두 가지 유형 중 하나로 지정될 수 있다.

[0042] 본원에서 용어 "Fc 영역"은 불변 영역의 적어도 일부를 함유하는 면역글로불린 중쇄의 C 말단 영역을 정의하는 데 사용된다. 상기 용어는 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. 일 구현예에서, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 중쇄의 Cys226으로부터 또는 Pro230으로부터 카르복실 말단까지 걸쳐 있다. 본원에서 달리 명시되지 않는 한, Fc 영역 또는 불변 영역에서 아미노산 잔기의 넘버링은 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991에 설명된 바와 같이, EU 인덱스로도 불리는 EU 넘버링 시스템에 따른다.

[0043] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체를 항원에 결합시키는 데 관련되는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 고유 항체의 중쇄와 경쇄(각각 VH 및 VL)의 가변 도메인은 일반적으로 유사한 구조를 가지며, 각 도메인은 4개의 보존된 프레임워크 영역(FR)과 3개의 초가변 영역(HVR)을 포함한다(예를 들어, Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., 91페이지(2007)를 참조). 본 발명의 항체에서, VH 도메인 및 VL 도메인의 단일 쌍, 즉 동족 VH/VL 쌍은 이의 2개의 표적인 VEGF-A 및 IL6에 특이적으로 결합한다.

[0044] "DutaFab"은 WO2012/163520에 개시된 바와 같은 이중 특이적 항체이다. DutaFab에서 VH 도메인 및 VL 도메인의 단일 쌍은 2개의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합하며, 여기서 하나의 파라토프는 CDR-H2, CDR-L1 및 CDR-L3으로부터의 아미노산 잔기들을 포함하고 다른 파라토프는 CDR-H1, CDR-H3 및 CDR-L2로부터의 아미노산 잔기들을 포함한다. DutaFab은 동족 VH/VL 쌍 내부에 2개의 중첩되지 않는 파라토프를 포함하고 2개의 상이한 에피토프에 동시에 결합할 수 있다. DutaFab 그리고 단일특이적 Fab 단편을 포함하는 라이브러리를 선별 검사함으로써 이들을 생성하는 방법은 WO2012/163520에 개시되어 있다.

[0045] "인간 항체"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생성되거나, 또는 인간 항체 레퍼토리 또는 다른 인간 항체-인코딩 서열을 활용하는 비인간 공급원으로부터 유래된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 소유하는 것이다. 인간 항체에 대한 이러한 정의는 비인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 특정적으로 배제한다. 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 또는 항체 단편은 본원에서 인간 항체 또는 인간 항체 단편인 것으로 간주된다.

[0046] "인간 공통 프레임워크"는 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선별에 있어서 가장 일반적으로 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 서열은 가변 도메인 서열의 하위군에서 선택된다. 일반적으로, 서열의 하위군은 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), Vols. 1-3의 경우에서와 같은 하위군이다. 일 구현예에서, VL의 경우, 하위군은 위와 같은 Kabat et al.의 문헌에서와 같은 하위군 카파 I이다. 일 구현예에서, VH의 경우, 하위군은 위와 같은 Kabat et al.의 문헌에서와 같은 하위군 III이다.

[0047] "항체 단편"은 원형 항체가 결합하는 항원에 결합하는 원형 항체의 일부를 포함하는, 원형 항체 이외의 분자를 의미한다. 항체 단편의 예는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2; 디아바디; 선형 항체; 단일쇄 항체 분자(예를 들어, scFv); 및 항체 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본원에서 상호교환적으로 사용되는 "파라토프" 또는 "항원 결합 부위"는 항원을 인식하고 이에 결합하는 항체의 일부를 의미한다. 파라토프는 Fv 영역의 3차 구조에서 공간적으로 근접하게 배열된 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인으로부터의 여러 개별 아미노산 잔기에 의해 형성된다. 본 발명의 항체는 하나의 동족 VH/VL 쌍에 2개의 파라토프를 포함한다.

[0049] 본원에서 사용되는 "VEGF-A 파라토프"는 VEGF-A에 결합하는 파라토프 또는 항원 결합 부위이다. 본 발명의 항체의 VEGF-A 파라토프는 항체의 CDR-H2, CDR-L1 및 CDR-L3의 아미노산 잔기를 포함한다.

[0050] 본원에 사용된 "IL6 파라토프"는 IL6에 결합하는 파라토프 또는 항원 결합 부위이다. 본 발명의 항체의 IL6 파라토프는 항체의 CDR-H1, CDR-H3 및 CDR-L2 유래 아미노산 잔기를 포함한다.

[0051] 본원에서 사용되는 "혈관 내피 성장 인자"(약어로 "VEGF")라는 용어는 달리 명시되지 않는 한, 영장류(예를 들어, 인간) 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)와 같은 포유동물을 포함하는 임의의 척추동물 공급원 유래의 임의의 천연 VEGF를 지칭한다. 이 용어는 "전장"의, 비처리 VEGF, 뿐만 아니라 세포에서 처리된 임의의 형태의 VEGF을 포함한다. 상기 용어는 또한, VEGF의 자연 발생 변이체, 예를 들어, 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포괄한다. 예시적인 인간 VEGF의 아미노산 서열은 서열번호 27에 제시되어 있다.

[0052] 용어 "항-VEGF-A 항체" 및 "VEGF-A에 결합하는 항체"는 항체가 VEGF-A를 표적화하는데 있어서 진단제 및/또는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도로 VEGF-A에 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 일 구현예에서, 관련 없는 비-VEGF-A 단백질에 대한 항-VEGF-A 항체의 결합의 정도는, 예를 들어 표면 플라스몬 공명(SPR)에 의해 측정된 바와 같이 VEGF-A에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 구현예들에서, VEGF-A에 결합하는 항체는 ≤ 1 nM, ≤ 0.1 nM 또는 ≤ 0.01 nM의 해리 상수(KD)를 갖는다. 항체의 K_D가 1 μM 이하일 때 항체는 VEGF-A에 "특이적으로 결합"한다고 한다.

[0053] 본원에서 사용되는 용어 "인터류킨-6"(약어 "IL6")은, 달리 명시되지 않는 한, 영장류(예를 들어, 인간) 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)와 같은 포유동물을 포함한 임의의 척추동물 공급원으로부터 임의의 천연 IL6를 나타낸다. 이 용어는 "전장"의, 가공되지 않은 IL6 뿐만 아니라 세포에서 가공된 임의의 형태의 IL6을 포함한다. 이 용어는 또한 IL6의 자연 발생 변이체, 예를 들어, 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포함한다. 예시적인 인간 IL6의 아미노산 서열은 서열번호 28에 제시되어 있다.

[0054] 본 발명의 항체는 "인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 동시에 결합"하는데, 이는 (a) 인간 IL6에 결합된 본 발명의 항체 Fab 단편이 (또한) 인간 VEGF-A에 특이적으로 결합하고, (b) 인간 VEGF-A에 결합된 본 발명의 항체 Fab 단편이 (또한) 인간 IL6에 특이적으로 결합함을 의미한다. 동시 결합은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 표면 플라즈몬 공명에 의해 평가될 수 있다.

[0055] 본원에서 사용된 용어 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 서열에서 초가변성이고 항원 접촉 잔기를 함유하는 항체 가변 도메인의 각 영역을 지칭한다. 일반적으로, 항체들은 6개의 CDR: VH 도메인에 3개(CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3), 및 VL 도메인에 3개(CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3)를 포함한다. 달리 지시되지 않는 한, 가변 도메인(예컨대, FR 잔기)의 CDR 잔기 및 기타 잔기들은 카바트 넘버링 시스템에 따라 본원에서 넘버링된다(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

[0056] 본원에서 사용된 "프레임워크" 또는 "FR"은 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 아미노산 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 프레임워크는 일반적으로 4개의 프레임워크 도메인들로 구성된다: FR1, FR2, FR3, 및 FR4. 이에 따라, CDR 및 FR 아미노산 서열들은 일반적으로 하기의 서열로 나타낸다: (a) VH 도메인에서: FR1－CDR-H1－FR2－CDR-H2－FR3－CDR-H3－FR4; 및 (b) VL 도메인에서 FR1－CDR-L1－FR2－CDR-L2－FR3－CDR-L3－FR4.

[0057] "친화도"는 분자(예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 이의 결합 짝(예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총합 강도를 지칭한다. 달리 표시되지 않은 한, 본원에 설명된 "결합 친화도"는 결합쌍(예를 들어, 항체 및 항원)의 구성원 간의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화도를 의미한다. 분자 X의 이의 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수(K_D)로 나타낼 수 있다. 친화성은 본원에 기재된 것들을 포함한, 당해 분야에 공지된 통상적인 방법에 의해 측정될 수 있다. 결합 친화도를 측정하기 위한 구체적인 설명적 및 예시적 구현예들은 본원에 기재되어 있다.

[0058] 용어 "에피토프"는 항체가 결합하는 단백질성 또는 비단백질성 항원 상의 부위를 나타낸다. 에피토프는 인접한 아미노산 스트레치(선형 에피토프)로부터 형성될 수 있거나, 예를 들어, 항원의 접힘으로 인해, 즉, 단백질성 항원의 3차 접힘에 의해 공간적으로 근접하게 되는 비연속 아미노산(입체형 에피토프)을 포함할 수 있다. 선형 에피토프는 전형적으로 단백질성 항원이 변성제에 노출된 후에도 여전히 항체에 의해 결합되는 반면, 입체형 에피토프는 전형적으로 변성제로 처리시 파괴된다. 에피토프는 고유한 공간 형태에 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상 또는 8-10개 아미노산을 포함한다.

[0059] 특정 에피토프에 결합하는 항체(즉, 동일한 에피토프에 결합하는 항체)에 대한 스크리닝은, 예를 들어, 제한 없이, 알라닌 스캐닝, 펩티드 블롯(Meth. Mol. Biol. 248 (2004) 443-463을 참조), 펩티드 절단 분석, 에피토프 절제, 에피토프 추출, 항원의 화학적 변형(Prot. Sci. 9 (2000) 487-496을 참조) 및 교차 차단("Antibodies", Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY)를 참조)과 같은 당업계의 일상적인 방법을 사용하여 실시할 수 있다.

[0060] 변형-보조 프로파일링(Modification-Assisted Profiling, MAP)로도 공지된 항원 구조-기반 항체 프로파일링(ASAP)은 다수 내지 화학적으로 또는 효소적으로 변형된 항원 표면의 항체 각각의 결합 프로파일을 기반으로 VEGF-A 또는 IL6에 특이적으로 결합하는 다수의 단클론 항체를 비닝할 수 있다(예를 들어, US 2004/0101920 참조). 각 빈의 항체는 동일한 에피토프에 결합하는데, 이는 또 다른 빈으로 나타내어지는 에피토프와 뚜렷하게 상이하거나 부분적으로 중첩되는 독특한 에피토프일 수 있다.

[0061] 또한, 경쟁적 결합은 항체가 본 발명의 참조 항체와 동일한 VEGF-A 또는 IL6의 에피토프에 결합하는지 또는 이러한 결합에 대해 경쟁하는지를 용이하게 결정하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 참조 항체와 "VEGF-A 및 IL6의 동일한 에피토프에 결합하는 항체"는 각각의 경쟁 분석에서 참조 항체의 그 항원에 대한 결합을 50% 이상 차단하는 항체를 의미하고, 반대로, 참조 항체는 각각의 경쟁 검정에서 상기 항체의 그 항원에 대한 결합을 50% 이상 차단한다. 또한 예를 들어, 한 항체가 참조 항체와 동일한 에피토프에 결합하는지 결정하기 위해, 참조 항체를 포화 조건에서 VEGF-A 또는 IL6에 결합하게 한다. 과량의 참조 항체를 제거한 후, 해당 항체가 VEGF-A 또는 IL6에 결합하는 능력을 평가한다. 해당 항체가 참조 항체의 포화 결합 후 VEGF-A 또는 IL6에 결합할 수 있는 경우, 해당 항체가 참조 항체와 상이한 에피토프에 결합한다고 결론내릴 수 있다. 하지만, 참조 항체의 포화 결합 후 해당 항체가 VEGF-A 또는 IL6에 결합할 수 없는 경우, 해당 항체는 참조 항체가 결합한 에피토프와 동일한 에피토프에 결합할 수 있다. 문제의 항체가 동일한 에피토프에 결합하는지 또는 입체적인 이유로 인해 결합이 방해를 받는지 확인하기 위해 관례적인 실험을 사용할 수 있다(예를 들어, ELISA, RIA, 표면 플라즈몬 공명, 유세포 분석 또는 당업계에서 입수가능한 기타 정량적 또는 정성적 항체-결합 검정). 상기 검정은 두 가지 설정, 즉, 두 항체가 모두 포화 항체인 상태에서 실시되어야 한다. 만약, 두 설정 모두에서 제1(포화) 항체만 VEGF-A 또는 IL6에 결합할 수 있는 경우, 해당 항체와 참조 항체가 VEGF-A 또는 IL6에 결합하기 위해 경쟁한다고 결론을 내릴 수 있다.

[0062] 일부 구현예들에서, 경쟁적 결합 검정에서 측정했을 때 1배, 5배, 10배, 20배 또는 100배 과량의 한 항체가 다른 항체의 결합을 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 90% 또는 심지어 99% 이상 억제하는 경우, 2개의 항체는 동일 또는 중첩 에피토프에 결합하는 것으로 보인다(예를 들어, Junghans et al., Cancer Res. 50 (1990) 1495-1502를 참조).

[0063] 일부 구현예들에서, 하나의 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 항원 내의 본질적으로 모든 아미노산 돌연변이가 또한 다른 하나의 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 경우, 2개의 항체는 동일한 에피토프에 결합하는 것으로 간주된다. 한 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 아미노산 돌연변이의 하위집합만이 다른 하나의 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 경우, 2개 항체는 "중복되는 에피토프"를 갖는 것으로 간주된다.

[0064] 참조 폴리펩티드 서열에 대하여 "퍼센트(%) 아미노산 서열 동일성"은 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 서열을 정렬하고 필요하면, 갭을 도입한 후에, 그리고 정렬의 목적으로 임의의 보존성 치환을 서열 동일성의 일부로서 고려하지 않고, 참조 폴리펩티드 서열 내에 아미노산 잔기와 동일한, 후보 서열 내에 아미노산 잔기의 백분율로서 규정된다. 아미노산 서열 동일성 퍼센트를 결정하기 위한 정렬은 해당 분야의 기술 범위에 속하는 다양한 방식으로, 예를 들어, BLAST, BLAST-2, Clustal W, Megalign(DNASTAR) 소프트웨어 또는 FASTA 프로그램 패키지와 같은 공개적으로 입수가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 이루어질 수 있다. 숙련된 기술자는 비교되는 서열들의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 구현하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 서열들을 정렬하기 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 대안적으로, 동일성 퍼센트 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 생성될 수 있다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 Genentech, Inc.에서 제작되었으며 소스 코드는 미국 워싱턴 D.C., 20559에 소재한 미국 저작권청에 사용자 문서와 함께 제출되었으며, 미국 저작권 등록 번호 TXU510087로 등록되었으며, WO 2000/005319에 기재되어 있다.

[0065] 달리 언급이 없는 한, 본원의 목적을 위해 아미노산 서열 동일성% 값은 FASTA 패키지 버전 36.3.8c 이상의 ggsearch 프로그램을 사용하여 또한 이후 BLOSUM50 비교 매트릭스를 사용하여 생성된다. 상기 FASTA 프로그램 패키지는 W. R. Pearson and D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448; W. R. Pearson (1996) "Effective protein sequence comparison" Meth. Enzymol.

266:227- 258; and Pearson et. al. (1997) Genomics 46:24-36에 의해 작성되었으며, www.fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtml or www. ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta로부터 공개적으로 입수 가능하다. 대안적으로, fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi에서 액세스할 수 있는 공용 서버를 사용하여 ggsearch (global protein : protein) 프로그램 및 기본 옵션(BLOSUM50; open: -10; ext: -2; Ktup = 2)을 사용하여 서열을 비교함으로써 로컬이 아닌 글로벌 정렬이 실시되도록 할 수 있다. 아미노산 동일성 퍼센트는 정렬 결과의 헤더에 제공된다.

[0066] 용어 "핵산 분자" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드의 중합체를 포함하는 임의의 화합물 및/또는 물질을 포함한다. 각 뉴클레오티드는 염기, 구체적으로 퓨린- 또는 피리미딘 염기(즉, 시토신(C), 구아닌(G), 아데닌(A), 티민(T) 또는 우라실(U)), 당(즉, 데옥시리보스 또는 리보스). 및 인산기로 구성된다. 종종, 핵산 분자는 염기 서열로 기재되며, 이 염기는 핵산 분자의 1차 구조(선형 구조)를 나타낸다. 염기들의 서열은 전형적으로 5'으로부터 3'으로 제시된다. 본원에서, 용어 핵산 분자는, 예를 들어 상보적 DNA(cDNA) 및 게놈 DNA를 포함한 데옥시리보핵산(DNA), 리보핵산(RNA), 특히, 전령 RNA(mRNA), DNA 또는 RNA의 합성 형태들, 그리고 둘 이상의 이러한 분자들을 포함하는 혼합 중합체를 포함한다. 핵산 분자는 선형 또는 원형일 수 있다. 또한, 핵산 분자라는 용어는 센스 및 안티센스 가닥 둘 모두, 뿐만 아니라 단일 가닥 및 이중 가닥 형태를 포함한다. 게다가, 본원에 설명된 핵산 분자는 자연 발생 또는 비-자연 발생 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 비-자연 발생 뉴클레오티드의 예에는 유도체화된 당 또는 인산염 백본 연쇄 또는 화학적으로 변형된 잔기를 갖는 변형된 뉴클레오티드 염기가 포함된다. 핵산 분자는 또한, 시험관내에서 및/또는 생체내에서, 예를 들어, 숙주 또는 환자에서 본 발명의 항체의 직접적인 발현을 위한 벡터로서 적합한 DNA와 RNA 분자를 포괄한다. 이러한 DNA(예를 들어, cDNA) 또는 RNA(예를 들어, mRNA) 벡터는 비변형 또는 변형될 수 있다. 예를 들어, mRNA는 RNA 벡터의 안정성 및/또는 인코딩된 분자의 발현을 개선하기 위하여 화학적으로 변형될 수 있으며, 이러한 mRNA는 대상체에 주사되어 생체내에서 항체를 생성할 수 있다(예를 들어, 2017년 6월 12일에 온라인으로 공개된 Stadler et al, Nature Medicine 2017, doi:10.1038/nm.4356 또는 EP 2 101 823 B1을 참조).

[0067] "단리된" 핵산은 이의 자연 환경의 구성요소로부터 분리된 핵산 분자를 지칭한다. 단리된 핵산에는 핵산 분자를 통상적으로 함유하는 세포에 함유된 핵산 분자가 포함되지만, 상기 핵산 분자는 염색체외에 또는 이의 자연 염색체 위치와 상이한 염색체 위치에 존재한다.

[0068] 항체를 "인코딩하는 단리된 핵산"은, 단일 벡터 또는 별도의 벡터에 있는 이러한 핵산 분자(들)를 포함하는, 항체 중쇄 및 경쇄(또는 이의 단편)를 인코딩하는 하나 이상의 핵산 분자, 및 숙주 세포의 하나 이상의 위치에 존재하는 이러한 핵산 분자(들)을 지칭한다.

[0069] 본원에 사용된 용어 "벡터"는 이것이 연결되는 다른 핵산을 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 이 용어에는 자가-복제 핵산 구조체로서의 벡터 및 그것이 도입되는 숙주 세포의 게놈에 통합된 벡터가 포함된다. 특정 벡터는 이들이 작동가능하게 연결되는 핵산들의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로 지칭된다.

[0070] 용어 "숙주 세포(host cell)", "숙주 세포주(cell line)", 및 "숙주 세포 배양물(culture)"은 호환적으로 이용되며, 외인성 핵산이 도입되어 있는 세포를 지칭하고 이러한 세포들의 자손을 포함한다. 숙주 세포는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"를 포함하며, 이는 계대 수에 관계없이 일차 형질전환된 세포 및 이로부터 유래된 자손을 포함한다. 자손은 핵산 함량이 모체 세포와 완전히 동일하지 않을 수 있지만 돌연변이를 포함할 수 있다. 최초로 형질전환된 세포에서 스크리닝되거나 선택된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이 자손이 본원에 포함된다.

[0071] 용어 "약학적 조성물" 또는 "약학적 제형"이란 이 조성물 안에 포함된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과가 있도록 하기 위한 형태의 제재를 지칭하며, 약학 조성물이 투여되는 대상체에게 수용불가능한 독성을 주는 추가 성분들은 포함하지 않는다.

[0072] "약학적으로 허용가능한 담체"는 활성 성분 이외에 약학적 조성물 또는 제형 안에 있는 성분을 말하며, 대상체에게 비독성이다. 약학적으로 허용가능한 담체에는 완충액, 부형제, 안정화제 또는 보존제가 포함되지만 이들에 제한되지 않는다.

[0073] 작용제, 예를 들어 약학적 조성물의 "유효량"은 원하는 치료적 또는 예방적 결과를 달성하는 데 필요한 용량에서 및 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다.

[0074] "개체" 또는 "대상체"는 포유동물이다. 포유동물에는 가축(예를 들어, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류(예를

들어, 인간 및 비인간 영장류, 예를 들어, 원숭이), 토끼 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)가 포함되나 이에 제한되지 않는다. 특정 구현예들에서, 개체 또는 대상체는 인간이다.

[0075] 본원에서 사용되는 "치료"(및 "치료하다" 또는 "치료하는"과 같은 이의 문법적 변형)는 치료를 받는 개체에서 질환의 자연적 과정을 변경하려는 시도에 있어서의 임상적 개입을 의미하며, 예방을 위해 또는 임상 병리학 과정 중에 실시될 수 있다. 치료의 바람직한 효과에는 질환의 발생 또는 재발 방지, 증상의 완화, 상기 질환의 임의의 직접 또는 간접적인 병리학적 결과의 감소, 전이 방지, 질환 진행 속도 감소, 상기 질환 상태의 개선 또는 경감, 그리고 차도 또는 개선된 예후가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예들에서, 본 발명의 항체는 질환의 발달을 지연 또는 질환의 진행을 지연시키는데 이용된다.

[0076] 본원에서 사용되는 용어 "안구 질환"은 병리학적 혈관신생 및/또는 위축과 관련된 임의의 안구 질환을 포함한다. 안구 질환은 망막 또는 각막과 같은 안구 조직의 구조 내부로의 변경되거나 조절되지 않는 새로운 혈관의 증식 및/또는 침범을 특징으로 할 수 있다. 안구 질환은 망막 조직(광 수용체 및 기저 망막 색소 상피(RPE) 및 맥락막모세혈관층)의 위축을 특징으로 할 수 있다. 비-제한적 안구 질환은, 예를 들어 AMD(예를 들어, 습성 AMD, 건성 AMD, 중간 AMD, 진행성 AMD 및 지도모양 위축(GA)), 황반 변성, 황반 부종, DME(예를 들어, 초점, 비-중심 DME 및 미만성, 중심 관련 DME), 망막 병증, 당뇨병성 망막증(DR)(예를 들어, 증식성 DR(PDR), 비증식성 DR(NPDR) 및 고산성 DR), 기타 허혈 관련 망막 병증, ROP, 망막 정맥 폐색(RVO)(예를 들어, 중앙(CRVO) 및 분지(BRVO) 형태), CNV(예를 들어, 근시 CNV), 각막 혈관 신생, 각막 혈관 신생과 관련된 질환, 망막 혈관 신생, 망막/맥락막 혈관 신생과 관련된 질환, 중심 장액성 망막 병증(CSR), 병리적 근시, 폰 히펠-린다우병, 눈의 히스토플라스마증, FEVR, 코우츠병, 노리 병, 골다공증-가성 신경교종 증후군(OPPG)과 관련된 망막 이상, 결막하 출혈, 피부홍조, 안구 신생혈관 질환, 신혈관 녹내장, 색소성 망막염(RP), 고혈압성 망막 병증, 망막 혈관종 증식, 황반 모세혈관 확장증, 홍채 혈관 신생, 안구 내 혈관 신생, 망막 변성, 낭포성 황반 부종(CME), 혈관염, 유두 부종, 망막염(CMV 망막염을 포함하지만, 이에 제한되지는 않음), 안구 흑색종, 망막 모세포종, 결막염(예를 들어, 감염성 결막염 및 비감염성(예를 들어, 알레르기성 결막염), 레버 선천성 흑암시(레버 선천성 흑암시 또는 LCA라고도 공지됨), 포도막염(감염성 및 비감염성 포도막염을 포함), 맥락 막염(예를 들어, 다초점 맥락 막염), 안구 히스토플라스마증, 안검염, 안구 건조증, 외상성 안구 손상, 쇼그렌 병 및 기타 안과 장애들을 포함하고, 여기서 상기 질환은 안구 혈관 신생, 혈관 누출 및/또는 망막 부종 또는 망막 위축과 관련이 있다. 추가의 예시적인 안구 질환은 망막 층간분리증(망막 감각신경층의 비정상적 분할), 피부홍조와 관련된 질환(각의 신생 혈관) 및 모든 형태의 증식성 유리체 망막 병증을 포함한 섬유 혈관 또는 섬유 조직의 비정상적인 증식으로 인한 질환을 포함한다. 각막 신생혈관신생과 관련된 예시적인 질환은 유행병 각결막염, 비타민 A 결핍, 콘택트 렌즈 과도착용, 아토피성 각막염, 상윤부 각막염, 익상편 건성 각막염, 쇼그렌 증후군, 여드름 장미증, 필렉테눌로시스, 매독, 마이코박테리아 감염, 지질 변성, 화학적 화상, 박테리아 궤양, 진균 궤양, 단순 포진 감염, 대상포진 감염, 원생동물 감염, 카포시 육종, 잠식성 각막궤양, 테리엔 변연 변성, 변연 표피박리, 류마티스성 관절염, 전신 낭창, 다발동맥염, 외상, 베게너 유육종증, 공막염, 스티븐 존슨 증후군, 방사상 각막절개, 및 각막 이식 거부를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 혈관 누출 증가, 동맥류 및 모세 혈관 탈락을 포함한 맥락막 신생 혈관신생 및 망막 혈관계의 결함과 관련된 예시적인 질환은 당뇨병성 망막 병증, 황반 변성, 겸상 적혈구 빈혈, 유육종, 매독, 탄성섬유 가성 황색종, 페제트병, 정맥 폐색, 동맥 폐쇄, 경동맥 폐색 질환, 만성 포도막염/유리체염, 마이코박테리아 감염, 라임 병, 전신성 홍반성 루푸스, 미숙아 망막 병증, 망막 부종(황반 부종을 포함), 일스병, 베체트 병, 망막염 또는 맥락막염을 유발하는 감염(예를 들어, 다초점 맥락막), 추정된 안구 히스토플라스마증, 베스트 병(유리 체형 황반 변성), 근시, 시신경 유두 소와, 평면부염, 망막 박리(예를 들어, 만성 망막 박리), 과다점성 증후군, 톡소플라스마증, 외상 및 레이저 치료후 합병증을 포함하지만, 이제 제한되는 것은 아니다. 망막 조직의 위축(광수용체 및 기저 RPE)과 관련된 예시적인 질환은 위축성 또는 삼출성 AMD(예를 들어, 지도모양 위축 또는 진행성 건성 AMD), 황반 위축(예를 들어, 혈관 신생과 관련된 위축 및/또는 지도모양 위축), 당뇨병성 망막병증, 스타가르트 병, 소르스비 안저 이영양증, 망막 층간분리증 및 색소성 망막염을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0077] "약품 설명서"라는 용어는 치료 제품의 사용에 관한 적응증, 사용법, 투여량, 투여, 병용 요법, 금기 및/또는 경고에 대한 정보를 포함하는 치료 제품의 상용 패키지에 관례적으로 포함된 지침을 지칭하는 데 사용된다.

[0078] 일 양태에서, 본 발명은 부분적으로 치료 적용을 위한 이중특이적 항체의 제공을 기반으로 한다. 특정 양태에서, 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체가 제공된다. 본 발명의 항체는, 예를 들어, 혈관 질환, 예를 들어, 안구 혈관 질환의 치료에 유용하다.

[0079] **A. 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 예시적인 항체**

[0080] 일 양태에서, 본 발명은 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체를 제공한다. 일 양태에서, 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 단리된 항체가 제공된다. 일 양태에서, 본 발명은 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다.

[0081] 특정 양태들에서, 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체가 제공되며, 여기서 이러한 항체는 VL 도메인과 VH 도메인의 한 동족 쌍 내부에 VEGF-A 파라토프(즉, VEGF-A에 결합하는 항원 결합 부위) 및 IL6 파라토프(즉, IL6에 결합하는 항원 결합 부위)를 포함하고, 여기서

[0082] • VEGF-A 파라토프는 항체의 CDR-H2, CDR-L1 및 CDR-L3 유래 아미노산 잔기를 포함하고, IL6 파라토프는 항체의 CDR-H1, CDR-H3 및 CDR-L2 유래 아미노산 잔기를 포함하고/하거나;

[0083] • IL6 파라토프는 항체의 CDR-H2, CDR-L1 및 CDR-L3 유래 아미노산 잔기를 포함하고, 여기서 VEGF-A 파라토프는 항체의 CDR-H1, CDR-H3 및 CDR-L2 유래 아미노산 잔기를 포함하고;

[0084] • 상기 가변 경쇄 도메인 및 가변 중쇄 도메인의 쌍은 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 동시에 결합하고/하거나;

[0085] • 이 항체는 서열번호 22의 가변 중쇄 도메인 및 서열번호 21의 가변 경쇄 도메인을 가진 항체와 동일한 인간 IL6 상의 에피토프에 그리고 이와 동일한 인간 VEGF-A 상의 에피토프에 결합하고/하거나;

[0086] • 상기 항체의 항체 Fab 단편은 (i) 표면 플라즈몬 공명법으로 측정했을 때 K_D가 50 pM 미만인 인간 VEGF-A121, 및 (ii) 표면 플라즈몬 공명법으로 측정했을 때 K_D가 50 pM 미만인 인간 IL6에 결합하고/하거나;

[0087] • 이 항체의 항체 Fab 단편은 60° C 이상, 일 구현예에서 70℃ 이상의 응집 개시 온도를 나타내고/내거나;

[0088] • 상기 항체의 항체 Fab 단편은 동적 광산란법으로 측정했을 때 80° C 초과의 용융 온도를 나타낸다.

[0089] 다른 양태에서, 본 발명은 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체를 제공하며, 이 항체는 (a) 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (b) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (c) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및 (d) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (e) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (f) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하고, (a) 서열번호 22의 아미노산 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인; 및 (b) 서열번호 21의 아미노산 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0090] 또 다른 양상에서 본 발명은 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하고, (a) 서열 번호 22의 아미노산 서열에 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인; 및 (b) 서열 번호 21의 아미노산 서열에 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항체를 제공한다.

[0091] 다른 양태에서, 본 발명은 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체를 제공하며, 이 항체는 (a) 최대 15, 최대 10, 또는 최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인; 및 (b) 최대 15, 최대 10, 또는 최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 도메인을 포함한다.

[0092] 다른 양태에서, 본 발명은 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체를 제공하며, 이 항체는 (a) 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (b) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (c) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및 (d) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (e) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (f) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하고, (a) 최대 15, 최대 10, 또는 최대 5개 아미노산 치환을 갖는 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인; 및 (b) 최대 15, 최대 10, 또는 최대 5개 아미노산 치환을 갖는 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 도메인을 포함한다.

[0093] 일 양태에서, 본 발명은 서열번호 22의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VH 도메인을 포함하는 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체를 제공한다. 특정 양태들에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열은 참조 서열 대비 치환(예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 포함하지만, 해당 서열을 포함하는 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체는 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 양태들에서, 총 최대 10개의 아미노산이 서열번호 22에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 특정 양태들에서, CDR 외부 영역에서(즉, FR에서) 치환, 삽입 또는 결실이 나타난다. 특정 양태에서, VH는 (a) 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (b) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2: 및 (c) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함한다.

[0094] 일 양태에서, 본 발명은 서열번호 21의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VL 도메인을 포함하는 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체를 제공한다. 특정 양태들에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열은 참조 서열 대비 치환(예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 포함하지만, 해당 서열을 포함하는 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체는 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 양태들에서, 총 최대 10개의 아미노산이 서열번호 21에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 특정 양태들에서, CDR 외부 영역에서(즉, FR에서) 치환, 삽입 또는 결실이 나타난다. 특정 양태에서, VL 도메인은 (d) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1; (e) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2; 및 (f) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함한다.

[0095] 다른 양태에서, 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체가 제공되며, 여기서 이 항체는 상기 제공된 양태들 중 임의의 것에서와 같은 VH 서열 및 상기 제공된 양태들 중 임의의 것에서와 같은 VL 서열을 포함한다. 일 양태에서, 상기 항체는 이들 서열의 번역후 변형을 포함하여 각각 서열번호 22 및 서열번호 21의 VH 및 VL 서열을 포함한다.

[0096] 다른 양태에서, 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체가 제공되며, 여기서 이 항체는 서열번호 24의 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 23의 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0097] 본 발명의 추가 양태에서, 상기 양태들 중 임의의 것에 따라 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체는 단클론 항체이다. 일 양태에서, 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체는 항체 단편, 예를 들어, Fv, Fab, Fab', scFv, 디아바디 또는 $F(ab')_2$ 단편이다. 다른 양태에서, 항체는 전장 항체이다.

[0098] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체로부터 유래된, IL6에 결합하는 항체를 제공한다. 본 발명의 항체에 대해 개시된 IL6 파라토프는 추가의 항체, 예를 들어 IL6 및 다른 항원에 결합하는 단일특이적 항체 또는 이중특이적 항체를 제공하는데 사용될 수 있다. 본원에 개시된 항체 6HVL4.1의 IL6 파라토프는 x-선 결정학(실시예 13)을 통해 확인되었다. 항체 6HVL4.1은 인간 VH3 프레임워크를 갖는 VH 도메인 및 인간 Vkappa1 프레임워크를 갖는 VL 도메인을 기반으로 한다. 항체 6HVL4.1의 IL6 파라토프를 포함하는 항체는 IL6 상의 동일한 에피토프에 결합한다. 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 본 발명의 항체에 대해 본원에 개시된 모든 구현예는 또한 IL6에 결합하는 항체에 적용된다.

[0099] 따라서, 일 구현예에서, 본 발명은 인간 IL6에 결합하는 항체로서:

[0100] a) IL6 파라토프가 아미노산 잔기 Y1, I2, Q3, Y26, E27, F28, T29, H30, Q31, D32, P52a, R94, I96, D97, F98, D101, T102를 포함하는 인간 VH3 프레임워크에 기초한 VH 도메인, 및 IL6 파라토프가 아미노산 잔기 Y49, D50, S53, N54, Y55, P56, S57, Y91, Y96을 포함하는 인간 Vkappa1 프레임워크에 기초한 VL 도메인; 또는

[0101] b) IL6 파라토프가 아미노산 잔기 Y1, P2, Q3, V26, L27, F28, K29, H30, Q31, D32, P52a, R94, L96, D97, F98, D101, E102를 포함하는 인간 VH3 프레임워크에 기초한 VH 도메인, 및 IL6 파라토프가 아미노산 잔기 Y49, D50, D53, R54, Y55, P56, E57, Y91, Y96(카바트에 따른 넘버링)을 포함하는 인간 Vkappa1 프레임워크에 기초한 VL 도메인을 포함하는, 항체를 제공한다.

[0102] 다른 양태에서, 본 발명은 서열번호 35의 VL 도메인 및 서열번호 36의 VH 도메인을 갖는 항체로서 IL6 상의 동일한 에피토프에 결합하는 IL6에 결합하는 항체를 제공한다. 일 구현예에서, 항체는, IL6 파라토프가 본 발명의 인간 VEGF-A 및 IL6에 결합하는 항체의 아미노산 잔기 1, 2, 3, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 52a, 94, 96, 97, 98, 101, 102를 포함하는 인간 VH3 프레임워크를 갖는 VH 도메인, 및 IL6 파라토프가 본 발명의 인간 VEGF-A 및 IL6에 결합하는 항체의 아미노산 잔기 49, 50, 53, 54, 55, 56, 57, 91, 96을 포함하는 인간 Vkappa1 프

레임워크를 갖는 VL 도메인을 포함한다.

[0103] 일 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 IL6에 결합하는 항체는 IL6 및 다른 표적에 결합하는 다중특이적 항체이다.

[0104] 추가의 양태에서, 상기 양태들 중 임의의 것에 따른 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체 또는 상기 양태들 중 임의의 것에 따른 인간 IL6에 결합하는 항체는 하기의 섹션 1-5에 기재된 바와 같이, 상기 특징들의 임의의 것을 단독으로 또는 조합하여 포함할 수 있다:

[0105] **1. 항체 친화성**

[0106] 특정 구현예들에서, 본원에 제공된 항체는 ≤ 1 nM, ≤ 0.1 nM 또는 ≤ 0.01 nM의 해리 상수(KD)로 VEGF-A에 결합한다. 바람직한 구현예에서, 본원에 제공된 항체는 ≤ 10 pM, 바람직한 구현예에서 ≤ 5 pM의 해리 상수(KD)로 인간 VEGF-A에 결합한다. 바람직한 구현예에서 본원에 제공된 항체는 ≤ 10 pM, 바람직한 구현예에서 ≤ 5 pM의 해리 상수(KD)로 인간 VEGFA-121에 결합한다. 바람직한 구현예에서 본원에 제공된 항체는 ≤ 10 pM, 바람직한 구현예에서 ≤ 5 pM의 해리 상수(KD)로 인간 VEGFA-165에 결합한다.

[0107] 특정 구현예들에서, IL6에 결합하는 항체는 ≤ 1 nM, ≤ 0.1 nM 또는 ≤ 0.03 nM의 해리 상수(K_D)를 갖는다. 바람직한 구현예에서, 본원에 제공된 항체는 ≤ 10 pM, 바람직한 구현예에서 ≤ 5 pM의 해리 상수(K_D)로 인간 IL6에 결합한다. 일 양태에서, K_D는 표면 플라스몬 공명 분석법, 일 구현예에서 비아코어(BIACORE)® 표면 플라스몬 공명 분석법을 사용하여 측정한다.

[0108] 다른 양태에서, K_D는 KinExA 검정을 사용하여 측정된다. 일 구현예에서, K_D는 VEGF-A 결합의 K_D 검출 또는 IL6 결합의 K_D 검출을 위해, 재료 및 일반적인 방법 섹션에서 아래 기재된 바와 같은 조건하에 KinExA 검정을 사용하여 측정된다.

[0109] 예를 들어, VEGF-A에 결합하는 항체의 K_D는 Sapidyne Instruments(Boise, ID)의 KinExA 3200 기기를 사용하는 검정에서 측정되고, PMMA 비드는 KinExA 핸드북 프로토콜(Adsorption coating, Sapidyne)에 따라 1 ml PBS(pH7.4) 중 30 μg의 항-VEGF-항체 MAB293(R&D)를 사용하여 항원으로 코팅된다. KinExA 평형 검정은 러닝 완충액으로서 0.01% BSA 및 0.01% 트윈(Tween)20이 포함된 PBS pH 7.4를 사용하여 실온에서 실시되며, 샘플 및 비드는 LowCross 완충액(Candor Bioscience)에서 준비된다. 0.25 ml/분의 유속이 사용된다. 일정한 양의 VEGFA-121-His(50 pM 및 제2 실험에서는 500 pM)를 시험한 항체로 사용하여 적정하고, 평형화된 혼합물을 50 pM의 일정한 VEGF의 경우 750 μl, 500 pM의 일정한 VEGF의 경우 125 μl 부피의 KinExA 시스템에서 항-VEGF 항체(Mab293) 커플링된 비드들의 컬럼을 통과시킨다. 결합된 VEGFA-121의 검출은 농도가 250 ng/ml인 제2 비오티닐화된 항-VEGF 항체(BAF293)를 사용한 후 샘플 완충액에 250 ng/ml 스트렙타비딘 Alexa Fluor™ 647 접합체를 주입하여 실시된다. K_D는 "표준 분석" 방법을 사용하여 KinExA 소프트웨어(버전 4.0.11)에 포함된 단일 부위 균일 결합 모델을 사용하여 데이터를 비선형 회귀 분석하여 수득한다. 이 소프트웨어는 K_D를 계산하고 데이터 포인트들을 이론적 K_D 곡선에 맞춤하여 95% 신뢰 구간을 결정한다. 95% 신뢰 구간은 K_D 낮음과 K_D 높음으로 표시된다.

[0110] 예를 들어, IL6에 결합하는 항체의 K_D는 HBS-EP+ (1x; BR100669; Cytiva)를 러닝 완충액으로 사용하여 25° C에서 비아코어 8K 기기(Cytiva)에서 표면 플라스몬 공명(SPR)을 사용하는 검정에서 측정된다. 인간 Fab 결합제(28958325, Cytiva)를 10 mM 아세트산나트륨 완충액, pH 5.0 중에 10 μg/ml의 최종 농도로 희석하고, 표준 아민 커플링 화학을 사용하여 CM5 센서 칩 상에 고정시켰다. 단백질 측정 전에 조건화 목적으로 5회의 시동 주기가 선택적으로 실시되었으며, 여기서 각각의 주기에서 HBS-EP+ 완충액을 약 120초 동안 흘려보낸 후, 60초 동안 10 mM 글리신 완충액 pH2.0을 적용함으로써 유도체화된 칩 표면을 재생시켰다. 75 nM 농도의 항체 Fab 단편을 HBS-EP+ 완충액 중에서 10 ul/분의 유속으로 60초 동안 상기 표면 상에 포획하였다. Fab 단편은 기준 채널에 적용되지 않는다. 이어서, 인간 또는 시노몰구스 원숭이 IL-6을 30 μl/분의 유속으로 (바람직하게는 180 초의 접촉 시간 및 720 초의 해리 시간을 사용하여) HBS-EP+ 완충액 중에 적절한 희석 시리즈로 적용하였다. 유도체화된 칩 표면의 재생이 상기에 기재된 바와 같이 달성되었다. 데이터는 8 K 평가 소프트웨어(Biacore Insight Evaluation 3.0)를 사용하여 평가한다.

[0111] **2. 항체 단편**

[0112] 특정 양태들에서, 본원에서 제공된 항체는 항체 단편이다.

[0113] 일 양태에서, 항체 단편은 Fab, Fab', Fab'-SH 또는 $F(ab')_2$ 단편, 특히, Fab 단편이다. 원형 항체의 파파인 소화는 중쇄와 경쇄 가변 도메인(각각, VH와 VL), 그리고 또한 경쇄의 불변 도메인(CL) 및 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)을 각각 포함하는, "Fab" 단편으로 불리는 2개의 동일한 항원 결합 단편을 생성한다. 용어 "Fab 단편"은 따라서, VL 도메인 및 CL 도메인을 포함하는 경쇄, 그리고 VH 도메인 및 CH1 도메인을 포함하는 중쇄 단편을 포함하는 항체 단편을 지칭한다. "Fab' 단편"은 항체 힌지 영역으로부터 하나 이상의 시스테인을 포함하는 CH1 도메인의 카르복시 말단에서 잔기의 부가에 의해 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 유리 티올기를 보유하는 Fab' 단편이다. 펩신 처리는 2개의 항원 결합 부위(2개의 Fab 단편) 및 Fc 영역의 일부를 갖는 $F(ab')_2$ 단편을 생성한다. 구제 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하고 증가된 생체내 반감기를 갖는 Fab 및 $F(ab')_2$ 단편에 관한 논의를 위해, 미국 특허 번호 5,869,046을 참조한다.

[0114] 항체 단편은 본원에 기재된 바와 같이, 원형 항체의 단백질분해 소화, 뿐만 아니라 재조합 숙주 세포(예를 들어, 대장균, CHO)에 의한 재조합 제조를 포함한(하지만 이에 제한되지 않음) 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0115] 바람직한 구현예에서, 본원에 제공된 항체는 Fab 단편이다.

[0116] 일 구현예에서, 본원에 제공된 항체의 VH 도메인은 인간 VH3 프레임워크를 포함한다.

[0117] 일 구현예에서, 본원에 제공된 항체의 VL 도메인은 인간 V카파1 프레임워크를 포함한다.

[0118] 일 구현예에서, 본원에 제공된 항체의 CL 도메인은 카파 이소형이다.

[0119] 일 구현예에서, 본원에 제공된 항체의 CH1 도메인은 인간 IgG1 이소형의 것이다.

[0120] 바람직한 구현예에서, 본원에 제공된 항체는 카파 이소형의 CL 도메인 및 인간 IgG1 이소형의 CH1 도메인을 포함하는 Fab 단편이다.

[0121] **3. 열 안정성**

[0122] 본원에 제공된 항체는 우수한 열 안정성을 나타낸다. 특정 구현예들에서, 본원에 제공된 항체의 Fab 단편은 60 °C 이상, 일 구현예에서 70℃ 이상의 응집 개시 온도를 나타낸다. 특정 구현예들에서, 본원에 제공된 항체의 Fab 단편은 동적 광산란에 의해 측정했을 때 80℃ 초과의 융점을 나타낸다.

[0123] **4. 다중특이적 항체**

[0124] 특정 양태들에서, 본원에 제공된 항체는 다중특이적 항체이다. "다중특이적 항체"는 최소 2가지 상이한 부위들, 즉, 상이한 항원들 상의 상이한 에피토프들 또는 동일한 항원 상의 상이한 에피토프들에 대한 결합 특이성을 가지는 단클론 항체들이다. 특정 양태에서, 다중특이적 항체는 3개 이상의 결합 특이성을 갖는다.

[0125] 본원에서 제공된 항체들을 포함하는 3개 이상의 결합 특이성을 갖는 다중특이적 항체는 동일한 항원 특이성의 하나 이상의 결합 아암(arm)들에서 도메인 교차를 갖는 비대칭 형태에서, 즉 VH/VL 도메인들(예컨대, WO 2009/080252 및 WO 2015/150447을 참조), CH1/CL 도메인들(예컨대, WO 2009/080253을 참조) 또는 완전한 Fab 아암들(예컨대, WO 2009/080251, WO 2016/016299를 참조하고, 또한 Schaefer et al, PNAS, 108 (2011) 1187-1191, 및 Klein at al., MAbs 8 (2016) 1010-20을 참조)을 교환함으로써 비대칭 형태로 제공될 수 있다. 다중특이적 항체에 대한 다양한 추가적인 분자 형태들이 당업계에 공지되어 있으며 본원에 포함된다(예를 들어, Spiess et al., Mol. Immunol. 67 (2015) 95-106을 참조).

[0126] **5. 항체 변이체**

[0127] 특정 양태들에서, 본원에 제공된 항체의 아미노산 서열 변이체가 고려된다. 예를 들어, 항체의 상기 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성들을 변화시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 상기 항체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 내로 적절한 변형을 도입함으로써, 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. 이런 변형에는 예를 들어, 항체의 아미노산 서열로부터 결실 및/또는 이들 서열 내로 삽입 및/또는 이들 서열 내에 잔기의 치환이 포함된다. 최종 작제물이 원하는 특징, 예를 들어 항원 결합을 소유한다면, 최종 작제물에 도달하기 위해 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 만들어질 수 있다.

[0128] 특정 양태들에서, 1개 이상의 아미노산 치환을 갖는 항체 변이체들이 제공된다. 치환 돌연변이유발을 위한 관심

부위에는 CDR들 및 FR들이 포함된다. 보존적 치환들은 하기 표에 "바람직한 치환"이라는 제목으로 나타낸다. 더 많은 실질적인 변화가 표 1의 "예시적 치환"이라는 제목하에 제시되며, 이는 아미노산 측쇄 분류를 참조하여 이하에서 추가로 설명된다. 아미노산 치환을 관심 항체에 도입하고 원하는 활성, 예를 들어, 유지/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성, 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대해 생성물을 스크리닝할 수 있다.

표

[0129]

본래 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

[0130]

[0131] 아미노산은 공통 측쇄 특성에 따라 군화될 수 있다:

[0132] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0133] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0134] (3) 산성: Asp, Glu;

[0135] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

[0136] (5) 사슬 방향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro;

[0137] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0138] 비-보존성 치환들은 이들 분류 중 하나의 구성원을 또 다른 분류의 구성원으로 교환하게 할 것이다.

[0139] 치환적 변이체의 한 가지 유형은 모 항체의 하나 또는 그 이상의 CDR 잔기의 치환(예를 들어, 인간화된 또는 인간 항체)과 관련된다. 일반적으로, 추가 연구를 위해 선택되는 결과의 변이체(들)는 모 항체에 비하여 일정한 생물학적 특성에서 변형(예를 들어, 개선) (예를 들어, 증가된 친화성, 감소된 면역원성)을 가질 것이고/거나 모 항체의 실질적으로 유지된 일정한 생물학적 특성을 가질 것이다. 예시적인 치환 변이체는 친화성 성숙된 항체인데, 이는 예를 들면, 파지 디스플레이 기반 친화성 성숙 기술, 예컨대 본원에 기재된 것들을 이용하여 편의하게 생성될 수 있다. 간단히 말하면, 하나 이상의 CDR 잔기가 돌연변이되고, 변이체 항체가 파지에서 전시되고 특정 생물학적 활성(예를 들면, 결합 친화성)에 대해 스크리닝된다.

[0140] 특정 양태들에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 이러한 변경으로 이 항체가 항원에 결합하는 능력이 실질적으로 감소되지 않는 한, 하나 또는 그 이상의 CDR들에서 나타날 수 있다. 예를 들어, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경(예를 들어, 본원에서 제공된 보존적 치환)이 CDR들에 이루어질 수 있다. 이러한 변경은, 예를 들어, CDR들의 항원 접촉 잔기의 외부에 있을 수 있다. 앞서 제공된 특정 변이체 VH와 VL 서열에서, 각 CDR은 변형되지 않거나, 또는 단지 1개, 2개 또는 3개의 아미노산 치환을 포함한다.

[0141] 돌연변이유발을 위해 표적화될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역의 확인을 위한 유용한 방법은 Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085에 의해 설명된 바와 같이 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"로 불린다. 이 방법에서, 표적 잔기 또는 표적 잔기들의 군(예를 들어, 하전된 잔기, 예컨대 arg, asp, his, lys, 및 glu)이 식별되고, 중성 또는 음으로 하전된 아미노산(예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체되어, 항원과 항체의 상호작용이 영향을 받았는지 여부를 판단한다. 초기 치환에 대한 기능적 민감성을 나타내는 아미노산 위치에 추가 치환이 도입될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 항원-항체 복합체의 결정 구조를 이용하여 항체와 항원 간의 접촉점을 식별할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 인접한 잔기는 치환을 위한 후보로서 표적화되거나 제거될 수 있다. 변이체는 그들이 원하는 특성을 포함하는지 여부를 결정하기 위해 스크리닝될 수 있다.

[0142] 아미노산 서열 삽입은 1개의 잔기에서부터 100개 이상의 잔기를 포함하는 폴리펩티드까지의 길이 범위에서 변하는 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합뿐만 아니라 단일 또는 복수 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예에는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체가 포함된다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 효소(예를 들어, ADEPT(항체 지향된 효소 전구약물 요법)의 경우) 또는 폴리펩티드에 대한 항체의 N 또는 C 말단에 융합을 포함한다.

[0143] **a) 글리코실화 변이체**

[0144] 특정 양태들에서, 본원에서 제공된 항체는 상기 항체가 당화되는 정도를 증가 또는 감소시키기 위하여 변형된다. 항체에 대한 당화 부위의 부가 또는 결실은 하나 이상의 당화 부위가 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 이루어질 수 있다.

[0145] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 이에 부착된 올리고당이 변경될 수 있다. 포유동물 세포들에 의해 생성되는 천연 항체는 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에 N-링키지에 의해 일반적으로 부착된 분지화된, 이촉각성(biantennary) 올리고당을 전형적으로 포함한다. 예를 들어, Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997)를 참조한다. 올리고당류는 다양한 탄수화물, 예를 들어, 만노오스, N-아세틸 글루코사민(GlcNAc), 갈락토오스 및 시알산뿐만 아니라 이촉각성 올리고당류 구조의 "줄기"에서 GlcNAc에 부착된 푸코오스를 포함할 수 있다. 일부 양태들에서, 특정 개선된 특성을 갖는 항체 변이체를 생성하기 위해 본 발명의 항체에서 올리고당의 변형이 이루어질 수 있다.

[0146] 일 양태에서, Fc 영역에 부착된 (직접적으로 또는 간접적으로) 푸코오스가 없는 비-푸코실화된 올리고당류, 다시 말하면 올리고당류 구조를 갖는 항체 변이체가 제공된다. 이런 비푸코실화된 올리고당류("비푸코실화된" 올리고당류로서 또한 지칭됨)는 특히 N-연결된 올리고당류인데, 이것은 이촉각성 올리고당류 구조의 줄기에서 제1 GlcNAc에 부착된 푸코오스 잔기를 결여한다. 일 양태에서, 선천적 또는 부모 항체와 비교하여 Fc 영역에서 증가된 비율의 비푸코실화된 올리고당류를 갖는 항체 변이체가 제공된다. 예를 들어, 비-푸코실화된 올리고당의 비

율은 적어도 약 20%, 적어도 약 40%, 적어도 약 60%, 적어도 약 80% 또는 심지어 약 100%(즉, 푸코실화 올리고당이 존재하지 않음)일 수 있다. 비-푸코실화된 올리고당의 백분율은, 예를 들어, WO 2006/082515에 기재되어 있는 바와 같이, MALDI-TOF 질량 분석법에 의해 측정된 Asn 297에 부착된 모든 올리고당(예컨대, 복합체, 하이브리드 및 높은 만노스 구조들)의 합에 대한 푸코스 잔기가 없는 올리고당의 (평균) 양이다. Asn297은 Fc 영역 내에 대략 위치 297(Fc 영역 잔기의 EU 넘버링)에 위치된 아스파라긴 잔기를 의미한다; 하지만, Asn297은 또한, 항체에서 경미한 서열 변이로 인해, 위치 297의 상류 또는 하류에, 다시 말하면, 위치 294 및 300 사이에 대략 ± 3개 아미노산, 에 위치할 수 있다. Fc 영역에서 증가된 비-푸코실화된 올리고당류를 갖는 이러한 항체는 개선된 FcγRIIIa 수용체 결합 및/또는 개선된 효과기 기능, 특히 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 예를 들어, US 2003/0157108; US 2004/0093621을 참조한다.

[0147] 감소된 푸코실화를 갖는 항체를 생성할 수 있는 세포주의 예는 단백질 푸코실화에서 결함되는 Lec13 CHO 세포(Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); US 2003/0157108; 및 WO 2004/056312, 특히 실시예 11), 그리고 녹아웃 세포주, 예컨대 알파-1,6-푸코실전달효소 유전자, *FUT8*, 녹아웃 CHO 세포(예를 들어, Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87:614-622 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); 및 WO 2003/085107을 참조), 또는 GDP-푸코오스 합성 또는 전달체 단백질의 감소된 또는 전폐된 활성을 갖는 세포(예를 들어, US2004259150, US2005031613, US2004132140, Us2004110282를 참조)를 포함한다.

[0148] 추가의 양태에서, 항체 변이체는 이촉각성 올리고당류가 제공되는데, 예를 들어, 여기서 항체의 Fc 영역에 부착된 이촉각성 올리고당류는 GlcNAc에 의해 양분된다. 이러한 항체 변이체는 상기 기재된 바와 같이 감소된 푸코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 이런 항체 변이체의 예는, 예를 들어 Umana et al., Nat Biotechnol 17, 176-180 (1999); Ferrara et al., Biotechn Bioeng 93, 851-861 (2006); WO 99/54342; WO 2004/065540, WO 2003/011878에서 설명된다.

[0149] Fc 영역에 부착된 올리고당에 최소한 한 개의 갈락토오스 잔기를 가진 항체 변이체들이 또한 제공된다. 이러한 항체 변이체들은 개선된 CDC 기능을 보유할 수 있다. 이런 항체 변이체는 예를 들어, WO 1997/30087; WO 1998/58964; 및 WO 1999/22764에서 설명된다.

[0150] b) <u>Fc 영역 변이체</u>

[0151] 특정 양태들에서, 하나 이상의 아미노산 변형이 본원에 제공된 항체의 Fc 영역 내로 도입되어 Fc 영역 변이체를 생성할 수 있다. Fc 영역 변이체는 하나 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형(예를 들어, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열(예를 들어, 인간 IgG_1, IgG_2, IgG_3 또는 IgG_4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0152] 특정 양태들에서, 본 발명은 전부는 아니지만 일부 효과기 기능을 소유하는 항체 변이체를 예기하는데, 이들 기능으로 인해 이는 생체내에서 항체의 반감기가 중요하고, 반면 특정 효과기 기능(예를 들어, 보체 의존성 세포독성(CDC) 및 항체 의존성 세포 매개된 세포독성(ADCC))이 불필요하거나 또는 유해한 적용을 위한 바람직한 후보가 된다. 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정을 실시하여 CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인할 수 있다. 예를 들어, Fc 수용체(FcR) 결합 검정을 실시하여, 상기 항체는 FcγR 결합(이로 인하여 ADCC 활성이 결여될 가능성이 있음)은 없지만, 여전히 FcRn 결합 능력은 유지하고 있다는 것을 확인할 수 있다. ADCC를 매개하는 일차 세포인, NK 세포는 오로지 FcγRIII 만을 발현시키는 반면, 단핵구는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII를 발현시킨다. 조혈 세포 상에서 FcR 발현은 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)의 464 페이지에서 표 3에 요약된다. 관심되는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 검정의 비제한적 예는 U.S. 특허 번호 5,500,362(예를 들어, Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)을 참조) 및 Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)을 참조)에서 설명된다. 대안적으로, 비-방사능활성 검정 방법들이 이용될 수 있다(예를 들어, 유동 세포 검정을 위한 ACTI™ 비-방사능활성 세포독성 검정(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); 및 CytoTox 96® 비-방사능활성 세포독성 검정(Promega, Madison, WI)을 참조). 이런 검정을 위한 유용한 효과기 세포는 말초혈 단핵 세포(PBMC) 및 자연 킬러(NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성은, 예를 들어 Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998)에서 개시된 바와 같은 동물 모델에서 생체내에서 평가될 수 있다. 항체가 C1q에 결합할 수 없고, 따라서 CDC 활성을 결여한다는 것을 확증하기 위해, C1q 결합 검정이 또한 실시될 수 있다. 예를 들어, WO 2006/029879와 WO 2005/100402에서 C1q 및 C3c 결합 ELISA를 참조한다. 보체 활성화를 평가하기 위하여, CDC 검정이 실시될 수 있다(예를 들어, Gazzano-Santoro *et al., J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg,

M.S. *et al.*, *Blood.* 101:1045-1052 (2003); 및 Cragg, M.S. 및 M.J. Glennie *Blood.* 103:2738-2743 (2004)을 참조). FcRn 결합 및 생체내 소실/반감기 결정이 또한 당해 분야에서 공지된 방법을 이용하여 실시될 수 있다(예를 들어, Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006); WO 2013/120929 A1를 참조).

[0153] 감소된 효과기 기능을 갖는 항체는 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중에서 하나 이상의 치환을 갖는 것들을 포함한다(U.S. 특허 번호 6,737,056). 이런 Fc 돌연변이체는 잔기 265 및 297의 알라닌으로의 치환을 갖는 이른바 "DANA" Fc 돌연변이체를 포함하여, 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 두 개 이상에서 치환을 갖는 Fc 돌연변이체를 포함한다(US 특허 번호 7,332,581).

[0154] FcR에 개선된 또는 축소된 결합을 갖는 특정 항체 변이체가 설명된다. (예를 들어, 미국 특허 제6,737,056; WO 2004/056312, 및 Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)를 참조).

[0155] 특정 양태들에서, 항체 변이체는 ADCC를 개선하는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어, Fc 영역의 위치 298, 333, 및/또는 334(잔기의 EU 넘버링)에서 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다.

[0156] 특정 양태들에서, 항체 변이체는 FcγR 결합을 축소하는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어, Fc 영역의 위치 234 및 235(잔기의 EU 넘버링)에서 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 일 양태에서, 치환은 L234A 및 L235A(LALA)이다. 특정 양태들에서, 항체 변이체는 인간 IgG_1 Fc 영역으로부터 유래된 Fc 영역에 D265A 및/또는 P329G를 추가로 포함한다. 일 양태에서, 치환은 인간 IgG_1 Fc 영역으로부터 유래된 Fc 영역의 L234A, L235A 및 P329G(LALA-PG)이다. (예를 들어, WO 2012/130831을 참조). 다른 양태에서, 치환은 인간 IgG_1 Fc 영역으로부터 유래된 Fc 영역의 L234A, L235A 및 D265A(LALA-DA)이다.

[0157] 일부 양태들에서, 예를 들어 미국 특허 제 6,194,551호, WO 99/51642호 및 Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)에서 설명된 바와 같이, 변경된(즉, 개선된 또는 축소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC)을 발생시키는 Fc 영역에서 변경이 만들어진다.

[0158] 태아로 모계 IgGs의 전달을 담당하는, 증가된 반감기 및 신생아의 Fc 수용체(FcRn)에 대한 결합이 개선된 항체들(Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) 및 Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994))은 US2005/0014934 (Hinton et al.)에서 설명된다. 이들 항체는 FcRn에 Fc 영역의 결합을 개선하는, 그 안에 하나 이상의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 이러한 Fc 변이체들에는 다음 중 하나 이상의 Fc 영역 잔기에서 치환을 갖는 것들이 포함된다: 238, 252, 254, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434, 예컨대 Fc 영역 잔기 434의 치환(예를 들어, 미국 특허 제7,371,826호; Dall'Acqua, W.F., et al., J. Biol. Chem. 281 (2006) 23514-23524를 참고).

[0159] 마우스 Fc-마우스 FcRn 상호작용에 중요한 Fc 영역 잔기는 부위 지정 돌연변이유발에 의해 확인되었다(예를 들어, Dall'Acqua, W.F., et al., J. Immunol 169 (2002) 5171-5180을 참고). 잔기 I253, H310, H433, N434, 및 H435(EU 색인 넘버링)는 상호작용에 관여한다(Medesan, C., et al., Eur. J. Immunol. 26 (1996) 2533; Firan, M., et al., Int. Immunol. 13 (2001) 993; Kim, J.K., et al., Eur. J. Immunol. 24 (1994) 542). 잔기 I253, H310 및 H435가 인간 Fc의 뮤린 FcRn과의 상호작용에 결정적인 것으로 밝혀졌다(Kim, J.K., et al., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2819). 인간 Fc-인간 FcRn 복합체에 관한 연구는 잔기 I253, S254, H435 및 Y436이 이러한 상호작용에 결정적이라는 것을 보여주었다(Firan, M., et al., Int. Immunol. 13 (2001) 993; Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604). Yeung, Y.A., et al. (J. Immunol. 182 (2009) 7667-7671)에서 잔기 248 내지 259 및 301 내지 317 및 376 내지 382 및 424 내지 437의 다양한 돌연변이체가 보고되고 조사되었다.

[0160] 특정 양태들에서, 항체 변이체는 FcRn 결합을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환들, 예를 들어, Fc 영역의 위치 253, 및/또는 310, 및/또는 435(잔기의 EU 넘버링)에서 치환을 가진 Fc 영역을 포함한다. 특정 양태들에서, 항체 변이체는 위치 253, 310 및 435에서 아미노산 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 일 양태에서, 치환은 인간 IgG1 Fc 영역으로부터 유래된 Fc 영역에서 I253A, H310A 및 H435A이다. 예를 들어, Grevys, A., et al., J. Immunol. 194 (2015) 5497-5508를 참조한다.

[0161] 특정 양태들에서, 항체 변이체는 FcRn 결합을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환들, 예를 들어, Fc 영역의 위치 310, 및/또는 433, 및/또는 436(잔기의 EU 넘버링)에서 치환을 가진 Fc 영역을 포함한다. 특정 양태들에서, 항체 변이체는 위치 310, 433 및 436에서 아미노산 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 일 양태에서, 치환은 인간 IgG1 Fc 영역으로부터 유래된 Fc 영역에서 H310A, H433A 및 Y436A이다. (예를 들어, WO

2014/177460 A1를 참조).

[0162] 특정 양태들에서, 항체 변이체는 FcRn 결합을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc 영역의 위치 252 및/또는 254 및/또는 256(잔기의 EU 넘버링)에서 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 특정 양태들에서, 항체 변이체는 위치 252, 254 및 256에서 아미노산 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 일 양태에서, 치환은 인간 IgG_1 Fc 영역으로부터 유래된 Fc 영역에서의 M252Y, S254T 및 T256E이다. Fc 영역 변이체들의 다른 예들에 관하여 Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); 미국 특허 제5,648,260; 미국 특허 제5,624,821; 및 WO 94/29351을 참조한다.

[0163] 본원에 보고된 바와 같은 항체의 중쇄의 C 말단은 아미노산 잔기 PGK로 끝나는 완전한 C 말단일 수 있다. 중쇄의 C-말단은 C 말단 아미노산 잔기 중 1개 또는 2개가 제거된 단축된 C-말단일 수 있다. 바람직한 일 양태에서, 상기 중쇄의 C-말단은 짧아진 C-말단 엔딩 PG이다. 본원에 보고된 모든 양태들 중 일 양태에서, 본원에 명시된 바와 같은 C-말단 CH3 도메인을 포함하는 중쇄를 포함하는 항체는 C-말단 글리신-리신 디펩티드(G446 및 K447, 아미노산 위치의 EU 인덱스 넘버링)를 포함한다. 본원에 보고된 바와 같은 모든 양태들 중 일 양태에서, 본원에서 특정된 바와 같은 C-말단 CH3 도메인을 포함하는 중쇄를 포함하는 항체는 C-말단 글리신 잔기(G446, 아미노산 위치의 EU 인덱스 넘버링)를 포함한다.

[0164] **c) 시스테인 가공된 항체 변이체**

[0165] 특정 양태들에서, 항체의 하나 또는 그 이상의 잔기가 시스테인 잔기로 치환된 시스테인 조작된 항체, 예를 들어, THIOMAB™ 항체를 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 특정 양태들에서, 치환된 잔기는 상기 항체의 접근가능 부위에서 발생한다. 이들 잔기를 시스테인으로 치환함으로써, 반응성 티올 기는 따라서, 항체의 접근가능 부위에 위치되고, 상기 항체를 다른 모이어티, 예컨대 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티에 접합하여 본원에 추가로 기술된 바와 같은 면역접합체를 생성하는 데 이용될 수 있다. 시스테인 조작된 항체는 예를 들어, 미국 특허 제 7,521,541, 8,30,930, 7,855,275, 9,000,130, 또는 WO 2016040856에서 설명된 것과 같이 생성될 수 있다.

[0166] **B. 재조합 방법과 조성물**

[0167] 항체는 예를 들어, US 4,816,567호에 설명된 바와 같은 재조합 방법 및 조성물을 사용하여 생성될 수 있다. 이들 방법을 위해 항체를 인코딩하는 하나 이상의 단리된 핵산(들)이 제공된다.

[0168] 일 양태에서, 본 발명의 항체를 인코딩하는 단리된 핵산이 제공된다.

[0169] 일 양태에서, 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체를 제조하는 방법이 제공되는데, 여기서 상기 방법은 상기 제공된, 항체를 인코딩하는 핵산(들)을 포함하는 숙주 세포를 상기 항체의 발현에 적합한 조건하에서 배양하는 단계, 그리고 선택적으로 상기 숙주 세포(또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 상기 항체를 회수하는 단계를 포함한다.

[0170] 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체의 재조합 생성을 위하여, 예를 들어, 상기 기재한 항체를 인코딩하는 핵산이 단리되고, 숙주 세포 안에서 추가 클로닝 및/또는 발현을 위하여 하나 이상의 벡터 안으로 삽입된다. 이런 핵산은 쉽게 단리될 수 있고, 그리고 통상적인 절차를 사용하여(예를 들어, 항체의 중쇄와 경쇄를 인코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용함으로써) 서열분석되거나 또는 재조합 방법에 의해 생성되거나 또는 화학적 합성에 의해 수득될 수 있다.

[0171] 항체-인코딩 벡터의 클로닝 또는 발현을 위한 적합한 숙주 세포에는 본원에 기재된 원핵 또는 진핵 세포가 포함된다. 예를 들어, 항체는 특히 당화 및 Fc 효과기 기능이 필요하지 않은 경우 박테리아에서 생성될 수 있다. 박테리아에서 항체 단편들 및 폴리펩티드 발현과 관련하여 예를 들어, US 5,648,237, US 5,789,199, 및 US 5,840,523호를 참조한다. (또한, 대장균에서 항체 단편의 발현을 설명하는 Charlton, K.A., In: Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254를 참조.) 발현 후, 항체는 가용성 분획 중의 박테리아 세포 페이스트로부터 단리될 수 있으며 추가로 정제될 수 있다. 일 구현예에서, 숙주 세포는 대장균 세포이다.

[0172] 척추동물 세포들 또한 숙주로 이용될 수 있다. 예를 들어, 현탁액에서 성장하도록 개조시킨 포유동물 세포주들이 유용할 수 있다. 유용한 포유류 숙주 세포주의 다른 예들은 SV40(COS-7)에 의해 변형된 원숭이 신장 CV1 세포주; 인간 배아 신장 세포주(예컨대, Graham, F.L. et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74에 기재되어 있는 293 또는 293T 세포); 아기 햄스터 신장세포(BHK); 마우스 세르톨리 세포(예컨대, Mather, J.P., Biol.

Reprod. 23 (1980) 243-252에 기재되어 있는 TM4 세포); 원숭이 신장세포(CV1); 아프리카 사바나원숭이 신장세포(VERO-76); 인간 경추 육종 세포(HELA); 개의 신장세포(MDCK); 버팔로 래트의 간세포(BRL 3A); 인간 폐세포(W138); 인간 간세포(Hep G2); 마우스 유선 종양(MMT 060562); TRI 세포(예컨대, Mather, J.P. et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68에 기재되어 있는); MRC 5 세포; 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 DHFR-CHO 세포를 포함하는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포(Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77(1980) 4216-4220); 및 Y0, NS0 및 Sp2/0과 같은 골수종 세포주를 포함한다. 항체 생성에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주의 검토는 예를 들어, Yazaki, P. 및 Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268을 참조한다.

[0173] 일 양태에서, 상기 숙주 세포는 진핵, 예를 들어 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 림프구양 세포(예를 들어, Y0, NS0, Sp20 세포)이다. 일 바람직한 구현예에서 숙주 세포는 CHO 세포이다. CHO 세포에서 본 발명의 항체의 생성은 항체의 주사 사용 가능성을 개선할 수 있다.

[0174] **C. 약학적 조성물**

[0175] 추가의 양태에서, 예를 들어, 하기의 치료 방법들 중 임의의 것에서 사용하기 위한, 본원에서 제공된 항체들 중 임의의 것을 포함하는 약학적 조성물이 제공된다. 일 양태에서, 약학적 조성물은 본원에 제공된 항체들 중 임의의 것 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 다른 양태에서, 약학적 조성물은 본원에 제공된 항체들 중 임의의 것 및 적어도 하나의 추가 치료제, 예를 들어, 하기 치료제를 포함한다.

[0176] 본원에 기재된 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체의 약학적 조성물은 원하는 정도의 순도를 갖는 이런 항체를 하나 이상의 선택적인 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합함으로써 동결 건조된 조성물 또는 수용액의 형태로 제조된다(*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)). 약학적으로 허용가능한 담체는 이용되는 투여량 및 농도에서 수용자에 비독성이며, 하기를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다: 완충액, 예컨대 히스티딘, 포스페이트, 시트레이트, 아세테이트, 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제(예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토니움 클로라이드; 벤잘코니움 클로라이드; 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부탈 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대, 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르치놀; 시클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 낮은 분자량의(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대, 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로블린; 친수성 중합체, 예컨대, 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 글루코스, 만노스, 또는 덱스트린을 포함하는 기타 탄수화물; 킬레이트 물질, 예컨대, EDTA; 당, 예컨대, 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 카운터-이온, 예컨대, 나트륨; 금속 복합체(예를 들어, Zn-단백질 복합체); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜(PEG). 본원에서 예시적인 약학적으로 허용가능한 담체는 세포간(insterstitial) 약물 분산 물질, 예컨대, 가용성 중성-활성 히알루로니다제 당단백질(sHASEGP), 예를 들어, 인간 가용성 PH-20 히알루로니다제 당단백질, 예컨대, rHuPH20(HYLENEX®, Halozyme, Inc.)을 포함한다. rHuPH20를 포함하는 특정 예시적인 sHASEGP 및 이를 사용하는 방법은 미국 특허 공보 제2005/0260186 및 2006/0104968에 기재되어 있다. 일 양태에서, sHASEGP는 콘드로이티나아제와 같은 하나 이상의 추가의 글리코스아미노글리카나제와 혼합된다.

[0177] 예시적인 동결 건조된 항체 조성물들은 미국 특허 제 6,267,958호에서 기재된다. 수용성 항체 조성물은 미국 특허 제 6,171,586 및 WO 2006/044908에 설명된 것들을 포함하며, 후자의 조성물은 히스티딘-아세테이트 완충액을 포함한다.

[0178] 본원의 약학적 조성물은 또한 치료되는 특정 적응증에 필요한 하나 초과의 활성 성분, 바람직하게는 서로 불리하게 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 갖는 성분을 함유할 수 있다. 이러한 활성 성분들은 의도한 목적에 효과적인 양으로 적절히 조합되어 존재한다.

[0179] 활성 성분들은, 예를 들어, 코아세르베이션(coacervation) 기술에 의해 또는 계면 중합에 의해 제조된 미세캡슐, 예를 들어, 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-미세캡슐 및 폴리(메틸메타크릴레이트) 미세캡슐 각각에, 콜로이드성 약물 전달 시스템(예를 들어, 리포좀, 알부민 미세구, 미세유화액, 나노입자 및 나노캡슐)에, 또는 거대유화액에 봉입될 수 있다. 이런 기술은 *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)에 개시되어 있다.

[0180] 지속 방출을 위한 약학적 조성물이 제조될 수 있다. 지속 방출 제재의 적합한 예들에는 상기 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함되며, 이러한 매트릭스는 성형된 제품 형태, 예를 들어 필름,

또는 마이크로캡슐 형태로 존재한다.

[0181] 생체내 투여에 사용되는 약학적 조성물은 일반적으로 멸균이다. 멸균은 예를 들어, 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 구현될 수 있다.

[0182] **D. 치료 방법 및 투여 경로**

[0183] 본원에 제공된, 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체들 중 임의의 것은 치료 방법에 사용될 수 있다.

[0184] 일 양태에서, 약제로서 사용하기 위한 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체가 제공된다. 추가 양태들에서, 혈관 질환을 치료하는데 사용하기 위한 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체가 제공된다. 특정 양태들에서, 치료 방법에 사용하기 위한 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체가 제공된다. 특정 양태들에서, 본 발명은 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 유효량의 항체를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 혈관 질환을 갖는 개체의 치료 방법에 사용하기 위한 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체를 제공한다. 이러한 일 양태에서, 상기 방법은 예를 들어, 하기와 같은 적어도 하나의 추가 치료제(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가 치료제)의 유효량을 개체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 추가 양태들에서, 본 발명은 혈관 신생 억제에 사용하기 위한 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체를 제공한다. 특정 양태들에서, 본 발명은 혈관신생을 억제하기 위해 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 유효량의 항체를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 혈관신생을 억제하는 방법에서 사용하기 위한 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체를 제공한다. 상기 양태들 중 임의의 것에 따른 "개체"는 바람직하게는 인간이다.

[0185] 추가의 양태에서, 안구 질환을 치료하는데 사용하기 위한 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체가 제공된다. 일 구현예에서, 안구 질환은, AMD(일 구현예에서, 습성 AMD, 건성 AMD, 중간 AMD, 진행성 AMD 및 지리모양 위축(GA)), 황반 변성, 황반 부종, DME(일 구현예에서, 초점, 비-중심 DME 및 미만성 중심 관련 DME), 망막 병증, 당뇨병성 망막증(DR)(일 구현예에서, 증식성 DR(PDR), 비증식성 DR(NPDR) 및 고산성 DR), 기타 허혈 관련 망막 병증, ROP, 망막 정맥 폐색(RVO)(일 구현예에서, 중앙(CRVO) 및 분지(BRVO) 형태), CNV(일 구현예에서, 근시 CNV), 각막 혈관 신생, 각막 혈관 신생과 관련된 질병, 망막 혈관 신생, 망막/맥락막 혈관 신생과 관련된 질병, 중심 장액성 망막 병증(CSR), 병리적 근시, 폰 히펠-린다우병, 눈의 히스토플라스마증, FEVR, 코우츠병, 노리 병, 골다공증-가성 신경교종 증후군(OPPG)과 관련된 망막 이상, 결막하 출혈, 피부홍조, 안구 신생혈관 질환, 신혈관 녹내장, 색소성 망막염(RP), 고혈압성 망막 병증, 망막 혈관종 증식, 황반 모세혈관 확장증, 홍채 혈관 신생, 안구 내 혈관 신생, 망막 변성, 낭포성 황반 부종(CME), 혈관염, 유두 부종, 망막염(CMV 망막염을 포함하지만, 이에 제한되지는 않음), 안구 흑색종, 망막 모세포종, 결막염(일 구현예에서, 감염성 결막염 및 비감염성(일 구현예에서, 알레르기성 결막염), 레베르 선천성 흑암시(레베르 선천성 흑암시 또는 LCA라고도 공지됨), 포도막염(감염성 및 비감염성 포도막염을 포함), 맥락 막염(일 구현예에서, 다초점 맥락 막염), 안구 히스토플라스마증, 안검염, 안구 건조증, 외상성 안구 손상, 쇼그렌 병 및 기타 안과 질환들로부터 선택되고, 여기서 상기 질환 또는 질병은 안구 혈관 신생, 혈관 누출 및/또는 망막 부종 또는 망막 위축과 관련이 있다. 일 구현예에서, 안구 질환은 AMD(일 구현예에서, 습성 AMD, 건성 AMD, 중간 AMD, 진행성 AMD, 및 지리 위축(GA)), 황반 변성, 황반 부종, DME(일 구현예에서, 초점, 비-중심 DME 및 미만성, 중심 관련 DME), 망막증, 당뇨병성 망막증(DR)(일 구현예에서, 증식성 DR(PDR), 비증식성 DR(NPDR) 및 고산성 Dr로부터 선택된다.

[0186] 추가의 양태에서, 본 발명은 약제의 제조 또는 조제에서 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체의 용도를 제공한다. 일 양태에서, 약제는 혈관 질환 치료용이다. 추가의 양태에서, 약제는 혈관 질환을 갖는 개체에게 유효량의 약제를 투여하는 단계를 포함하는, 혈관 질환을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 것이다. 이러한 일 양태에서, 상기 방법은 예를 들어, 하기와 같은 유효량의 적어도 하나의 추가 치료제를 개체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0187] 일 양태에서, 약제는 안구 질환 치료용이다. 추가의 양태에서, 약제는 안구 질환을 갖는 개체에게 유효량의 약제를 투여하는 단계를 포함하는, 안구 질환을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 것이다. 이러한 일 양태에서, 상기 방법은 예를 들어, 하기와 같은 유효량의 적어도 하나의 추가 치료제를 개체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0188] 추가의 양태에서, 본 발명은 혈관 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 일 양태에서, 상기 방법은 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체의 유효량을 이러한 혈관 질환을 갖는 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 이러한 일 양태에서, 상기 방법은 하기와 같은 적어도 하나의 추가 치료제의 유효량을 개체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0189] 추가의 양태에서, 본 발명은 안구 질환의 치료 방법을 제공한다. 일 양태에서, 상기 방법은 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체의 유효량을 이러한 안구 질환을 갖는 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 이러한 일 양태에서, 상기 방법은 하기와 같은 적어도 하나의 추가 치료제의 유효량을 개체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0190] 상기 양태들 중 임의의 것에 따른 "개체"는 인간일 수 있다.

[0191] 추가의 양태에서, 본 발명은, 예를 들어, 상기 치료 방법들 중 임의의 것에 사용하기 위한, 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 본원에 제공된 항체들 중 임의의 것을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 일 양태에서, 약학적 조성물은 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 본원에 제공된 항체들 중 임의의 것 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 다른 양태에서, 약학적 조성물은 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 본원에 제공된 항체들 중 임의의 것 및 적어도 하나의 추가 치료제, 예를 들어 하기에 기재된 바와 같은 치료제를 포함한다.

[0192] 본 발명의 항체는 유리체내 투여(예를 들어, 유리체내 주사) 또는 포트 전달 장치를 사용하여 투여될 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 포트 전달 장치를 사용하여 포트 전달 장치를 재충전하기 전 6개월 이상, 일 구현예에서 8개월 이상, 일 구현예에서 9개월 이상, 일 구현예에서 12개월 이상의 기간에 걸쳐 투여된다. 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 포트 전달 장치를 사용하여 투여되며, 여기서 상기 항체는 150 mg/ml 이상의 농도로 포트 전달 장치 내에 적용되며, 일 구현예에서는 200 mg/ml 이상의 농도로 적용된다 .

[0193] 본 발명의 항체는 단독으로 투여되거나 병용 요법으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 병용 요법은 본 발명의 항체를 투여하는 단계와 적어도 하나의 추가 치료제(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 추가 치료제)를 투여하는 단계를 포함한다.

[0194] 상기 구현예들 중 임의의 것에 따른(또는 이에 적용되는) 특정 구현예들에서, 안구 장애는 증식성 망막병증, 맥락막 혈관신생(CNV), 연령-관련 황반 변성(AMD), 당뇨병 및 기타 허혈 관련 망막병증, 당뇨병성 황반 부종, 병리적 근시, 폰 히펠-린다우 병, 눈의 히스토플라스마증, 망막 정맥 폐색(RVO)(CRVO 및 BRVO를 포함), 각막 신생혈관신생, 망막 신생혈관 혈성 및 미숙아 망막 병증(ROP)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 안구내 신생 혈관 질환이다.

[0195] 일부 경우들에서, 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체는 안구 장애, 예를 들어, 본원에 기재된 안구 장애(예를 들어, AMD(예를 들어, 습식 AMD), DME, DR, RVO 또는 GA)의 치료를 위한 하나 이상의 추가 치료제와 병용하여 투여될 수 있다.

[0196] 임의의 적합한 AMD 치료제는 안구 장애(예를 들어, AMD, DME, DR, RVO 또는 GA)의 치료를 위해 본원에 제공된 바와 같이 하기를 포함하지만 이에 제한되지는 않는 인간 VEGF 및 인간 IL6에 결합하는 항체와 병용으로 추가 치료제로서 투여될 수 있다: VEGF 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체(예를 들어, 루센티스(LUCENTIS)®(라니비주맙), RTH-258(이전의 ESBA-1008, 항-VEGF 단일 사슬 항체 단편; 노바티스), 또는 이중 특이적 항-VEGF 항체(예를 들어, 항-VEGF/항-안지오포에이틴 2 이중특이적 항체, 예컨대 파리시맙; 로슈)), 가용성 VEGF 수용체 융합 단백질(예를 들어, 아일리아(EYLEA)®(애플리버셉트)), 항-VEGF DARPin®(예를 들어, 아비시파르 페골; 모레쿨라 파트너스 AG/알레르간) 또는 항-VEGF 압타머(예를 들어, 마큐젠®(페갑타닙 나트륨)); 혈소판 유래 성장 인자(PDGF) 길항제, 예를 들어, 항-PDGF 항체, 항-PDGFR 항체(예컨대, REGN2176-3), 항-PDGF-BB 페길화된 압타머(예컨대, 포비스타(FOVISTA)®; 옵소텍(Ophthotech)/노바티스), 가용성 PDGFR 수용체 융합 단백질, 또는 이중 PDGF/VEGF 길항제(예컨대, 소분자 억제제(예컨대, DE-120(산텐(Santen)) 또는 X-82 (타이로젠(Tyrogene)X)) 또는 이중 특이적 항-PDGF/항-VEGF 항체)); 광역학 요법과 조합된 비쥬다인(VISUDYNE)®(버테포르핀); 항산화제; 보체 시스템 길항제, 예를 들어 보체 인자 C5 길항제(예컨대, 소분자 개시제(예컨대, ARC-1905; 옵소텍) 또는 항-C5 항체(예컨대, LFG-316; 노바티스), 프로페딘 길항제(예컨대, 항-프로퍼딘 항체, 예컨대 CLG-561; 알콘(Alcon)) 또는 보체 인자 D 길항제(예컨대, 항-보체 인자 D 항체, 예컨대 람팔리주맙; 로슈)); C3 차단 펩티드(예컨대, APL-2, 아펠리스(Appellis)); 시각 회로 조절제(예컨대, 에믹서스타트 염산염); 스쿠알라민(예컨대, OHR-102; 오르 파마슈티컬(Ohr Pharmaceutical)); 비타민 및 미네랄 보충제(예컨대, 연령 관련 안구 질환 연구 1(AREDS1; 아연 및/또는 산화 방지제) 및 연구 2(AREDS2; 아연, 산화 방지제, 루테인, 제아잔틴 및/또는 오메가-3 지방산)에 설명된 것); 세포 기반 요법, 예를 들어 NT-501(레넥서스(Renexus)); PH-05206388(화이자), huCNS-SC 세포 이식(스템셀즈(StemCells)), CNTO-2476(제대 줄기 세포주, 얀센(Janssen)), 옵레겐(OpRegen, RPE 세포 현탁액, 셀 큐어 뉴로사이언스(Cell Cure Neurosciences)) 또는 MA09-hRPE 세포 이식(옥타 테라퓨틱스(Ocata Therapeutics)); 조직 인자 길항제(예컨대, hI-con1; 아이코닉 테라퓨틱스(Iconic Therapeutics)); 알파-아드레날린성 수용체 작용제(예컨대, 브리모니딘 타르트레이트; 알레르간); 펩티드 백신(예컨대, S-

646240; 시오노기(Shionogi)); 아밀로이드 베타 길항제(예컨대, 항-베타 아밀로이드 단클론 항체, 예컨대 GSK-933776); S1P 길항제(예컨대, 항-S1P 항체, 예컨대, 아이소넵(iSONEP)™; 엘패스(주)(Lpath Inc); ROBO4 길항제(예컨대, 항-ROBO4 항체, 예컨대 DS-7080a; 다이이찌산쿄(Daiichi Sankyo)); 엔도스타틴 및 안지오스타틴을 발현하는 렌티바이러스 벡터(예컨대, 레티노스타트(RetinoStat)); 및 이들의 임의의 조합. 일부 경우들에서, AMD 치료제(이전의 AMD 치료제들 중 임의의 것을 포함)는 공동 제형화될 수 있다. 예를 들어, 항-PDGFR 항체 REGN2176-3은 애플리버셉트(EYLEA®)와 공동 제형화될 수 있다. 일부 경우들에서, 이러한 공동 제형은 인간 VEGF 및 인간 IL6에 결합하는 본 발명의 항체와 조합하여 투여될 수 있다. 일부 경우들에서, 안구 장애는 AMD (예를 들어, 습성 AMD)이다.

[0197] VEGF 길항제(예를 들어, 루센티스® 또는 아일리아®), 코르티코 스테로이드(예를 들어, 코르티코스테로이드 임플란트(예를 들어, 오저덱스(OZURDEX)®(덱사메타손 유리체내 임플란트) 또는 일루비엔(ILUVIEN)®(플루오시놀론 아세토나이드 유리체내 임플란트)), 유리 체내 주사(예를 들어, 트리암시놀론 아세토나이드)에 의한 투여를 위해 제형화된 코르티코스테로이드 또는 이들의 조합을 포함하는(하지만 이에 제한되는 것은 아님) 임의의 적합한 DME 및/또는 DR 치료제는 안구 질환(예를 들어, AMD, DME, DR, RVO 또는 GA)의 치료를 위해 인간 VEGF 및 인간 IL6에 결합하는 본 발명의 항체와 병용 투여될 수 있다. 일부 경우들에서, 안구 장애는 DME 및/또는 DR이다.

[0198] 인간 VEGF 및 인간 IL6에 결합하는 본원에 제공된 항체는 안구 장애(예를 들어, AMD, DME, DR, RVO 또는 GA)의 치료를 위한 요법 또는 수술 절차, 예를 들어 레이저 광응고(예를 들어, 범망막 광응고(PRP)), 드루젠 레이저, 황반 구멍 수술, 황반 전좌 수술, 이식형 소형 망원경, PHI-모션 혈관 조영술(마이크로 레이저 요법 및 영양 혈관 치료라고도 공지됨), 양성자 빔 요법, 미세 자극 요법, 망막 박리 및 유리체 수술, 공막 누름 조각, 황반하 수술, 동공 열요법, 광계 I 요법, RNA 간섭 사용(RNAi), 체외 유동술(막 차등 여과 및 유동술 요법이라고도 공지됨), 마이크로 칩 이식, 줄기 세포 요법, 유전자 대체 요법, 리보자임 유전자 요법(저산소 반응 요소에 대한 유전자 요법 포함, 옥스포드 바이오메디카(Oxford Biomedica); 렌티팍(Lentipak), 제네틱스(Genetix); 및 PDEF 유전자 치료, 젠벡(GenVec)), 광 수용체/망막 세포 이식(이식 가능한 망막 상피 세포를 포함, 디아크린(주)(Diacrin, Inc.)); 망막 세포 이식, 예컨대 Astellas Pharma US, Inc., ReNeuron, CHA Biotech), 침술 및 이들의 조합과 병용 투여될 수 있다.

[0199] 상기의 이러한 병용 요법은 병용 투여(두 가지 또는 그 이상의 요법제가 동일한 또는 별도 제형 안에 함유됨), 및 별도 투여를 포함하고, 이 경우, 인간 VEGF 및 인간 IL6에 결합하는 본 발명의 항체의 투여는 추가적인 요법제 및/또는 요법제들의 투여 이전, 동시 및/또는 이후에 발생할 수 있다. 일 구현예에서, 인간 VEGF 및 인간 IL6에 결합하는 본 발명의 항체의 투여 및 추가 치료제의 투여는 서로 간에 약 1, 2, 3, 4 또는 5개월 이내에, 또는 약 1, 2 또는 3주 이내에, 또는 약 1, 2, 3, 4, 5 또는 6일 이내에 발생한다.

[0200] 본 발명의 항체(및 임의의 추가 치료제)는 비경구, 폐내 및 비강내를 포함하는 임의의 적합한 수단에 의해 투여될 수 있고, 국소 치료의 경우 필요에 따라 병변내 투여될 수 있다. 비경구 주입에는 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내, 또는 피하 투여가 포함된다. 투약은 부분적으로 투여가 단기인지 장기인지에 따라 임의의 적합한 경로, 예를 들어, 주사, 예컨대 정맥내 또는 피하 주사에 의해 이루어질 수 있다. 단일 또는 다양한 시점에 걸친 단일 또는 다중 투여, 일시 투여 및 펄스 주입을 포함한(하지만 이에 제한되지 않는) 다양한 투약 일정이 본원에서 고려된다.

[0201] 본 발명의 항체는 모범 의료행위 지침과 일치하는 방식으로 제형화, 투약 및 투여될 것이다. 이와 관련하여 고려해야 할 요소에는 치료 중인 특정 장애, 치료 중인 특정 포유동물, 개별 환자의 임상 상태, 장애의 원인, 제제 전달 부위, 투여 방법, 투여 일정, 및 의료 종사자에게 공지된 기타 요소가 포함된다. 항체는 반드시 그러할 필요는 없지만, 선택적으로 문제되는 장애를 예방하거나 치료하는 데 현재 이용되는 한 가지 이상의 작용제와 함께 제형화된다. 이러한 다른 물질들의 유효량은 약학적 조성물에 존재하는 항체의 양, 질병 또는 치료의 유형, 및 상기에서 논의된 다른 인자들에 따라 달라진다. 이들은 일반적으로, 본원에 기재된 바와 동일한 투여량에서 및 투여 경로로 이용되거나, 또는 본원에 기재된 투여량의 약 1 내지 99%로 이용되거나, 또는 경험적으로/임상적으로 적합한 것으로 결정되는 임의의 투여량에서 및 임의의 경로로 이용된다.

[0202] 질환의 예방 또는 치료를 위한, 본 발명의 항체의 적절한 투여량(단독으로 또는 한 가지 이상의 다른 추가 치료제와 조합하여 사용될 때)은 치료되는 질환의 유형, 항체의 유형, 질환의 중증도 및 과정, 항체가 예방적 또는 치료적 목적으로 투여되는지 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 그리고 주치의의 재량에 따라 달라질 것이다. 상기 항체는 한 번에 또는 일련의 치료일정에 걸쳐 환자에게 적절하게 투여된다. 질환의

유형 및 중증도에 따르면, 약 1 μg/kg 내지 15 mg/kg(예를 들어, 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg)의 항체가, 예를 들어, 1회 이상의 개별 투여에 의해 또는 연속 주입에 의해 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량일 수 있다. 상기 언급된 인자들에 따라, 하나의 전형적인 일일 투여량의 범위는 약 1 μg/kg 내지 100 mg/kg 또는 그 이상이 될 수 있다. 수일 또는 보다 장기에 걸친 반복된 투여를 위하여, 병태에 따라, 일반적으로 질환 증세가 바람직하게 억제될 때까지 치료는 지속될 것이다. 상기 항체의 한 가지 예시적인 투여량은 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 범위일 것이다. 따라서, 약 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg 또는 10 mg/kg(또는 이의 임의의 조합)의 하나 이상의 용량이 환자에게 투여될 수 있다. 이러한 용량은 간헐적으로, 예를 들어 매주 또는 3주마다 투여될 수 있다(예를 들어, 상기 환자는 약 2 내지 약 20회, 또는 예를 들어, 약 6회 용량의 항체를 제공받는다). 초기에는 보다 높은 로딩 용량을, 후속하여 보다 낮은 하나 이상의 용량이 투여될 수 있다. 이 요법의 진행은 통상적인 기술 및 검정에 의해 용이하게 모니터링된다.

[0203] **E. 제조 물품**

[0204] 본 발명의 다른 양태에서, 상기한 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에서 유용한 물질을 함유하는 제조 물품이 제공된다. 상기 제조 물품은 용기 및 용기 위에 또는 용기에 결합된 라벨 또는 약품 설명서를 포함한다. 적합한 용기는, 예를 들어, 바이알, 주사기 등을 포함한다. 상기 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재료로 형성될 수 있다. 용기는 단독으로, 또는 병태를 치료하고, 예방하고/하거나 진단하는 데 효과적인 다른 조성물과 조합으로 조성물을 보유하고, 및 멸균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들어, 용기는 정맥내 용액 백, 또는 피하 주사 바늘에 의해 관통 가능한 마개를 갖는 바이알일 수 있다). 상기 조성물에서 적어도 하나의 활성제는 본 발명의 항체이다. 라벨 또는 약품 설명서에는 이 조성물이 선택된 병태 치료에 사용된다는 것이 명시되어 있다.

[0205] 추가로, 제조 물품은 (a) 내부에 조성물을 함유하는 제1 용기(상기 조성물은 본 발명의 항체를 포함함); 및 (b) 내부에 조성물을 함유하는 제2 용기(상기 조성물은 추가의 세포독성 또는 그 외 치료제를 포함함)를 포함할 수 있다. 본 발명의 이러한 양태에서 제조 물품은, 조성물이 특정 병태를 치료하기 위해 사용될 수 있음을 나타내는 약품 설명서를 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 상기 제조 물품은 약학적으로-허용가능한 완충액, 예컨대 주사용 정균수(BWFI), 인산염-완충된 염수, 링거 용액 및 덱스트로즈 용액이 포함된 제2(또는 제3) 용기를 더 포함할 수 있다. 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기가 포함된 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질들을 더 포함할 수 있다.

[0206] **F. 장치**

[0207] 본 발명의 항체는 안구 이식물을 사용하여, 일 구현예에서는 포트 전달 장치를 사용하여 눈에 투여될 수 있다.

[0208] 포트 전달 장치는 소정 개월(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 그 이상의 개월)의 기간에 걸쳐 치료제(예를 들어, 본 발명의 항체)를 방출할 수 있는 이식가능하고 재충전가능한 장치이다. 사용될 수 있는 예시적인 포트 전달 장치는 예를 들어, 국제 특허 출원 공보 제 WO 2010/088548, WO2015/085234, WO 2013/116061, WO 2012/019176, WO 2013/040247, 및 WO 2012/019047(이들 문헌은 그 전체가 본원에 원용됨)에 기재된 ForSight Labs, LLC 및/또는 ForSight VISION4사의 장치들을 포함한다.

[0209] 예를 들어, 본 발명은 본원에 기재된 항체들 중 임의의 것을 함유하는 저장소를 포함하는 포트 전달 장치를 제공한다. 포트 전달 장치는 근위 영역, 저장소와 유체 연통하는 근위 영역에 커플링된 관형 몸체, 및 저장소와 유체 연통하고 조성물을 눈 내로 방출하도록 구성된 하나 이상의 배출구를 추가로 포함할 수 있다. 관형 몸체는 눈의 절개부 또는 개구부를 통해 삽입되도록 구성된 약 0.5 ㎜ 이하의 외경을 가질 수 있다. 이 장치는 길이가 약 1 ㎜ 내지 약 15 ㎜(예를 들어, 약 1 ㎜, 약 2 ㎜, 약 4 ㎜, 약 5 ㎜, 약 6 ㎜, 약 7 ㎜, 약 9 ㎜, 약 11 ㎜, 약 13 ㎜, 또는 약 15 ㎜ 길이)일 수 있다. 저장소는 임의의 적합한 부피를 가질 수 있다. 일부 경우들에서, 저장소는 약 1 μl 내지 약 100 μl(예를 들어, 약 1 μl, 약 5 μl, 약 10 μl, 약 20 μl, 약 50 μl, 약 75 μl, 또는 약 100 μl)의 부피를 갖는다. 이러한 장치 또는 이의 구성부들은 임의의 적합한 재료, 예를 들어, 폴리이미드로 만들어질 수 있다.

[0210] 일부 경우들에서, 포트 전달 장치는 본원에 기재된 항체들 중 임의의 것 및 하나 이상의 추가 화합물을 함유하는 저장소를 포함한다.

[0211] 일부 경우들에서, 포트 전달 장치는 본원에 기재된 항체들 또는 항체 접합체들 중 임의의 것 및 추가적인 VEGF 길항제를 포함한다.

[0212] **3. 본 발명의 특정 구현예들**

[0213] 본 발명의 구체적인 구현예들을 하기에 나열한다.

[0214] 1. 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체로서,

[0215] (a) 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (b) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (c) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및 (d) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (e) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (f) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하고, (a) 서열번호 22의 아미노산 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인; 및 (b) 서열번호 21의 아미노산 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항체.

[0216] 2. 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체로서,

[0217] (a) 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (b) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (c) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및 (d) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (e) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (f) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하고, 최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 도메인; 및 최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 도메인을 포함하는 항체.

[0218] 3. 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체로서,

[0219] (a) 최대 15, 최대 10, 또는 최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인; 및 (b) 최대 15, 최대 10, 또는 최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 도메인을 포함하는 항체.

[0220] 4. 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체로서,

[0221] 서열번호 22의 VH 서열 및 서열번호 21의 VL 서열을 포함하는 항체.

[0222] 5. 구현예 1 내지 구현예 4 중 어느 한 구현예에 있어서,

[0223] 서열번호 24의 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 23의 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체.

[0224] 6. 구현예 1 내지 구현예 5 중 어느 한 구현예에 있어서,

[0225] VEGF-A 파라토프가 항체의 CDR-H2, CDR-L1 및 CDR-L3으로부터의 아미노산 잔기를 포함하고, IL6 파라토프가 항체의 CDR-H1, CDR-H3 및 CDR-L2로부터의 아미노산 잔기를 포함하거나, IL6 파라토프가 항체의 CDR-H2, CDR-L1 및 CDR-L3으로부터의 아미노산 잔기를 포함하고, 여기서 VEGF-A 파라토프가 항체의 CDR-H1, CDR-H3 및 CDR-L2로부터의 아미노산 잔기를 포함하고/하거나

[0226] • 가변 경쇄 도메인 및 가변 중쇄 도메인의 쌍은 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 동시에 결합하고/하거나;

[0227] • 상기 항체는 서열번호 22의 가변 중쇄 도메인 및 서열번호 21의 가변 경쇄 도메인을 가진 항체와 동일한 인간 IL6 상의 에피토프에 그리고 이와 동일한 인간 VEGF-A 상의 에피토프에 결합하고/하거나;

[0228] • 상기 항체의 항체 Fab 단편은 (i) 표면 플라즈몬 공명법으로 측정했을 때 K_D가 50 pM 미만인 인간 VEGF-A121, 및 (ii) 표면 플라즈몬 공명법으로 측정했을 때 K_D가 50 pM 미만인 인간 IL6에 결합하고/하거나;

[0229] • 상기 항체의 항체 Fab 단편은 60° C 이상, 일 구현예에서 70℃ 이상의 응집 개시 온도를 나타내고/내거나;

[0230] • 상기 항체의 항체 Fab 단편은 동적 광산란법으로 측정했을 때 80° C 초과의 용융 온도를 나타내는 항체

[0231] 7. 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 특이적으로 결합하는 항체로서,

[0232] 서열번호 24의 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 23의 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체.

[0233] 8. 구현예 1 내지 구현예 7 중 어느 한 구현예에 있어서,

[0234] 항체는 Fab 단편인 항체.

[0235] 9. 구현예 1 내지 구현예 8 중 어느 한 구현예에 있어서,

[0236] 항체는 이중특이적 항체 단편인 항체.

[0237] 10. 구현예 1 내지 구현예 9 중 어느 한 구현예에 있어서,

[0238] 단클론 항체인 항체.

[0239] 11. 구현예 1 내지 구현예 10 중 어느 한 구현예에 있어서,

[0240] 항체의 항체 Fab 단편은 70℃ 이상의 응집 개시 온도를 나타내는 항체.

[0241] 12. 구현예 1 내지 구현예 11 중 어느 한 구현예에 있어서,

[0242] 항체의 항체 Fab 단편은 동적 광산란법으로 측정했을 때 80° C 초과의 용융 온도를 나타내는 항체.

[0243] 13. 구현예 1 내지 구현예 12 중 어느 한 구현예에 있어서,

[0244] 단클론 항체인 항체.

[0245] 14. 구현예 1 내지 구현예 13 중 어느 한 구현예에 있어서,

[0246] 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체 단편인 항체.

[0247] 15. 구현예 1 내지 구현예 14 중 어느 한 구현예에 있어서,

[0248] 항체는 이중특이적인 항체.

[0249] 16. 구현예 1 내지 구현예 15 중 어느 한 구현예에 있어서,

[0250] 항체는 Fab 단편인 항체.

[0251] 17. 구현예 1 내지 구현예 16 중 어느 한 구현예에 있어서,

[0252] 항체는 이중특이적 항체 단편인 항체.

[0253] 18. 구현예 1 내지 구현예 17 중 어느 한 구현예에 있어서,

[0254] 항체는 다중특이적 항체인 항체.

[0255] 19. 구현예 1 내지 구현예 18 중 어느 한 구현예에 있어서,

[0256] 항체는 인간 VEGF-A에 특이적으로 결합하는 항체.

[0257] 20. 구현예 1 내지 구현예 19 중 어느 한 구현예에 있어서,

[0258] 항체는 인간 IL6에 특이적으로 결합하는 항체.

[0259] 21. 서열번호 35의 VL 도메인 및 서열번호 36의 VH 도메인을 갖는 항체로서 IL6 상의 동일한 에피토프에 결합하는 IL6에 결합하는 항체.

[0260] 22. 인간 IL6에 결합하는 항체로서,

[0261] 상기 항체는 인간 VH3 프레임워크를 갖는 VH 도메인을 포함하고,

[0262] 여기서 IL6 파라토프는 구현예 1 내지 구현예 20 중 어느 한 구현예에 따른 인간 VEGF-A 및 IL6에 결합하는 항체의 아미노산 잔기 1, 2, 3, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 52a, 94, 96, 97, 98, 101, 102 및 인간 Vkappa1 프레임워크를 갖는 VL 도메인을 포함하고,

[0263] 여기서 IL6 파라토프는 구현예 1 내지 구현예 20 중 어느 한 구현예에 따른 인간 VEGF-A 및 IL6에 결합하는 항체의 아미노산 잔기 49, 50, 53, 54, 55, 56, 57, 91, 96을 포함하는 항체.

[0264] 23. 인간 IL6에 결합하는 항체로서,

[0265] a) IL6 파라토프가 아미노산 잔기 Y1, I2, Q3, Y26, E27, F28, T29, H30, Q31, D32, P52a, R94, I96, D97, F98, D101, T102를 포함하는 인간 VH3 프레임워크에 기초한 VH 도메인, 및 IL6 파라토프가 아미노산 잔기

Y49, D50, S53, N54, Y55, P56, S57, Y91, Y96을 포함하는 인간 Vkappa1 프레임워크에 기초한 VL 도메인; 또는

[0266] b) IL6 파라토프가 아미노산 잔기 Y1, P2, Q3, V26, L27, F28, K29, H30, Q31, D32, P52a, R94, L96, D97, F98, D101, E102를 포함하는 인간 VH3 프레임워크에 기초한 VH 도메인, 및 IL6 파라토프가 아미노산 잔기 Y49, D50, D53, R54, Y55, P56, E57, Y91, Y96(카바트에 따른 넘버링)을 포함하는 인간 Vkappa1 프레임워크에 기초한 VL 도메인을 포함하는 항체.

[0267] 24. 구현예 1 내지 구현예 23 중 어느 한 구현예의 항체를 인코딩하는 단리된 핵산.

[0268] 25. 구현예 24의 핵산을 포함하는 숙주 세포.

[0269] 26. 인간 VEGF-A 및 인간 IL6에 결합하는 항체를 생성하는 방법으로서,

[0270] 항체가 생성되도록 구현예 25의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는 방법.

[0271] 27. 구현예 26에 있어서,

[0272] 숙주 세포는 CHO 세포인 방법.

[0273] 28. 구현예 1 내지 구현예 23 중 어느 한 구현예의 항체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 제형.

[0274] 29. 구현예 1 내지 구현예 23 중 어느 한 구현예의 항체를 포함하는 포트 전달 장치.

[0275] 30. 구현예 1 내지 구현예 23 중 어느 한 구현예에 있어서,

[0276] 약제로서 사용하기 위한 항체.

[0277] 31. 구현예 26에 있어서,

[0278] 숙주 세포로부터 항체를 회수하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0279] 32. 구현예 26 또는 구현예 31의 방법에 의해 생성된 항체.

[0280] 33. 구현예 1 내지 구현예 23 중 어느 한 구현예의 항체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 제형.

[0281] 34. 구현예 1 내지 구현예 23 중 어느 한 구현예에 있어서,

[0282] 약제로서 사용하기 위한 항체.

[0283] 35. 구현예 1 내지 구현예 23 중 어느 한 구현예에 있어서,

[0284] 혈관 질환의 치료에 사용하기 위한 항체.

[0285] 36. 구현예 1 내지 구현예 23 중 어느 한 구현예에 있어서,

[0286] 안구 혈관 질환의 치료에 사용하기 위한 항체.

[0287] 37. 약제의 제조에서, 구현예 1 내지 구현예 23 중 어느 한 구현예 항체 또는 구현예 65의 약학적 조성물의 용도.

[0288] 38. 혈관신생을 억제하기 위한 약제의 제조에서,

[0289] 구현예 1 내지 구현예 23 중 어느 한 구현예의 항체 또는 구현예 65의 약학적 조성물의 용도.

[0290] 39. 혈관 질환을 갖는 개체를 치료하는 방법으로서,

[0291] 구현예 1 내지 구현예 23 중 어느 한 구현예의 항체 또는 구현예 33의 약학적 제형의 유효량을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[0292] 40. 안구 혈관 질환을 갖는 개체를 치료하는 방법으로서,

[0293] 구현예 1 내지 구현예 23 중 어느 한 구현예의 항체 또는 구현예 33의 약학적 제형의 유효량을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[0294] 41. 개체에서 혈관신생을 억제하는 방법으로서,

[0295] 구현예 1 내지 구현예 23 중 어느 한 구현예의 항체 또는 구현예 33의 약학적 제형의 유효량을 개체에게 투여하여 혈관신생을 억제하는 단계를 포함하는 방법.

[0296] 42. 구현예 1 내지 구현예 23 중 어느 한 구현예의 항체 또는 구현예 33의 약학적 제형을 포함하는 포트 전달 장치.

[0297] 43. 구현예 1 내지 구현예 23 중 어느 한 구현예에 있어서,

[0298] 포트 전달 장치에 의해 안구 투여하기 위한 항체, 또는 구현예 33에 있어서,

[0299] 포트 전달 장치에 의해 안구 투여하기 위한 약학적 제형.

[0300] 44. 구현예 1 내지 구현예 23 중 어느 한 구현예에 있어서,

[0301] 구현예 42에 따른 포트 전달 장치에 의해 안구 투여하기 위한 항체 또는 구현예 33에 있어서,

[0302] 구현예 42에 따른 포트 전달 장치에 의해 안구 투여하기 위한 약학적 제형으로서,

[0303] 투여는 포트 전달 장치가 재충전되기 전 6개월 이상, 일 구현예에서 8개월 이상, 일 구현예에서 9개월 이상의 기간에 걸쳐 이루어지는 항체 또는 약학적 제형.

[0304] 45. 구현예 1 내지 구현예 23 중 어느 한 구현예에 있어서,

[0305] 포트 전달 장치를 사용하여 항체 또는 약학적 제형을 투여함으로써 약제로서 사용하기 위한 항체, 또는 구현예 33에 있어서,

[0306] 포트 전달 장치를 사용하여 항체 또는 약학적 제형을 투여함으로써 약제로서 사용하기 위한 약학적 제형으로서,

[0307] 상기 항체는 150 mg 이상의 농도로, 일 구현예에서 200 mg/ml 이상의 농도로 포트 전달 장치 내에 적용되는 항체 또는 약학적 제형.

[0308] 아미노산 서열에 대한 설명

서열번호 1	VL VH6L-BM(WO2012/163520 에 개시됨) NIQKTQSPSSLSASVGDRVTITCRALWHISSYLAWYQQKPGKAPKL LIYAASHLHYGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYS GLPYTFGQGTKVEIK
서열번호 2	VH VH6L-BM(WO2012/163520 에 개시됨) YYQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAADGFLFSGYAMSWIRQAPGKGLE WIGQISGSGGSTVYNYNVLGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDTGYFDHWGQGTLVTVSS
서열번호 3	VL 6HVL_1 DQMTQSPSSLSASVGDRVTITCNAWWNISNYLAWYQQKPGKAPKLL IFDAKYRAPEVPSRFSGSGSGSQFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSG WPFTFGQGTKVEIK
서열번호 4	VH 6HVL_1 GQLVESGGGLVKPGGSLRLSCKASGFYWGPGAMSWVRQAPGKGLEW VGSISPKGGSEWFNPEIKGRFTISRDNNQDTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDIGFFDTWGQGTLVTVSS
서열번호 5	VL 6HVL_2

[0309]

	DQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKALWEVRDYLAWYQQKPGKAPKLL IFDGEYRAPEVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQHYAG WPYTFGQGTKLEIK
서열번호 6	VH 6HVL_2 GQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYWGPGQMSWVRQAPGKGLEW VGSIDTKGDDEWYDPKFDGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDIGFFDTWGQGTLVTVSS
서열번호 7	VL 6HVL_3 IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRALWEIRDYLAWYQQKPGKAPKLL IFDGEYRAPEVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYAG WPYTFGQGTKLEIK

[0310]

서열번호 8	VH 6HVL_3 GQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYWGPGQMSWVRQAPGKGLEW VGSIDTKGRDEWYDPKFDGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDIGFFDTWGRGTLVTVSS
서열번호 9	VL VH6L_1 AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHGSYWLSSEVAWYQQKPGKAPKL LIYDGDDVVPEVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYR YHPYTFGHGTKVEIK
서열번호 10	VH VH6L_1 YIQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAGYEFTHQDMSWVRQAPGKGLEW VGSISPKGDHKYLNTKFIGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDIGFFDTWGQGTLVTVSS
서열번호 11	VL VH6L_2 AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHGSYWLSSEVAWYQQKPGKAPKL LIYDASSNYPSVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYR YHPYTFGHGTKVEIK
서열번호 12	VH VH6L_2 YIQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAGYEFTHQDMSWVRQAPGKGLEW VGSISPKGDHKYLNTKFIGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDIDFFDTWGQGTLVTVSS
서열번호 13	VL VH6L_3 AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHGSYWLNSEVAWYQQKPGKAPKL LIYDGDTVYPEVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYR YHPYTFGQGTKVEIK

[0311]

서열번호 14	VH VH6L_3 YPQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASVLFKHQDMSWVRQAPGKGLEW VGSISPKGDHKYLNTKFIGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDIDFFDEWGQGTLVTVSS
서열번호 15	LCDR-1 6HVL_4 QASYWLNSELA
서열번호 16	LCDR-2 6HVL_4 DGDDRYP
서열번호 17	LCDR-3 6HVL_4 QQYRYTPYT
서열번호 18	HCDR-1 6HVL_4 QDMS
서열번호 19	HCDR-2 6HVL_4 SIDPRGDHKYYNTKFID
서열번호 20	HCDR-3 6HVL_4 DLDFMDE
서열번호 21	VL 6HVL_4 AIYMHQEPSSLSASVGDRVTITCQASYWLNSELAWYQQKPGKAPKL LIYDGDDRYPEVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYR YTPYTFGQGTKLEIK

[0312]

서열번호 22	VH 6HVL_4 YPQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASVLFKHQDMSWVRQAPGKGLEW VGSIDPRGDHKYYNTKFIDRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDLDFMDEWGQGTLVTVSS
서열번호 23	LC 6HVL_4 AIYMHQEPSSLSASVGDRVTITCQASYWLNSELAWYQQKPGKAPKL LIYDGDDRYPEVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYR YTPYTFGQGTKLEIK**RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN** **FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA** **DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**
서열번호 24	HC 6HVL_4 YPQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASVLFKHQDMSWVRQAPGKGLEW VGSIDPRGDHKYYNTKFIDRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDLDFMDEWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA** **ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV** **TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT**
서열번호 25	VL 6HVL_4 YHE AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASYWLNSELAWYQQKPGKAPKL LIYDGDDRYPEVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYR YTPYTFGQGTKLEIK
서열번호 26	VH 6HVL_4 YHE YPQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASVLFKHQDMSWVRQAPGKGLEW VGSIDPRGDHKYYNTKFIDRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDLDFMDEWGQGTLVTVSS

[0313]

서열번호 27	인간 VEGFA-121 MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDV YQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGL ECVPTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRAR QEKCDKPRR
서열번호 28	인간 IL6 MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFPAPVPPGEDSKDVAAPHRQP LTSSERIDKQIRYILDGISALRKETCNKSNMCESSKEALAENNLNL PKMAEKDGCFQSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESSEE QARAVQMSTKVLIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQAQNQ WLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM
서열번호 29	CL RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
서열번호 30	CH1 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHT
서열번호 31	Fab 0182 VL TPVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHGFWDIRDYLAWYQQKPGKAPK LLIFDAKYRAPEVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQY SGWPFTFGQGTKVEIK

[0314]

서열번호 32	Fab 0182 VH GQLVESGGGLVKPGGSLRLSCKASGFYWGPGAMSWVRQAPGKGLEW VGSIDLKGEDAWFDHEFSGRFTISRDNSKDTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDIGFFDTWGQGTLVTVSS
서열번호 33	Fab 0182 LC TPVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHGFWDIRDYLAWYQQKPGKAPK LLIFDAKYRAPEVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQY SGWPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
서열번호 34	Fab 0182 HC GQLVESGGGLVKPGGSLRLSCKASGFYWGPGAMSWVRQAPGKGLEW VGSIDLKGEDAWFDHEFSGRFTISRDNSKDTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDIGFFDTWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
서열번호 35	6HVL4.1 VL AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHGSYWLNSEVAWYQQKPGKAPKL LIYDASSNYPSVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYR YHPYTFGQGTKVEIK
서열번호 36	6HVL4.1 VH YIQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAGYEFTHQDMSWVRQAPGKGLEW VGSISPKGDHKYLNTKFIGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDIDFFDTWGQGTLVTVSS

[0315]

서열번호 37	6HVL4.1 LC MTMITPSFGAFFLEIFNMKQSTIALALLPLLFTPVSKAAIQMTQSP SSLSASVGDRVTITCHGSYWLNSEVAWYQQKPGKAPKLLIYDASSN YPSVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYRYHPYTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
서열번호 38	6HVL4.1 HC YIQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAGYEFTHQDMSWVRQAPGKGLEW VGSISPKGDHKYLNTKFIGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDIDFFDTWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
서열번호 39	VL 6HVL_5 AIYMHQEPSSLSASVGDRVTITCQASYWLNSELAWYQQKPGKAPKL LIYDGDTNYPEVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYR YTPYTFGQGTKLEIK
서열번호 40	VH 6HVL_5 YPQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASVLFKHQDMSWVRQAPGKGLEW VGSIDPRGDHKYYNTKFIDRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDLDFMDEWGQGTLVTVSS
서열번호 41	VL 6HVL_6 AIYMHQEPSSLSASVGDRVTITCQASYWLNSELAWYQQKPGKAPKL LIYDGDDTYPEVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYR YTPYTFGQGTKLEIK

[0316]

서열번호 42	VH 6HVL_6 YPQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASVLFKHQDMSWVRQAPGKGLEW VGSISPRGDHKYYNTKFIDRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDLDFMDEWGQGTLVTVSS
서열번호 43	VL VH6L_4 IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRALWEIRDYLAWYQQKPGKAPKLL IFDGEYRAPEVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQHYAG WPYTFGQGTKLEIK
서열번호 44	VH VH6L_4 GQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYWGPGQMSWVRQAPGKGLEW VGSIDTKGDDEWYDPKFDGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDIGFFDTWGRGTLVTVSS
서열번호 45	VL VH6L_5 AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRALWEIRDYLAWYQQKPGKAPKL LIFDGEYRAPEVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYA GWPYTFGQGTKLEIK
서열번호 46	VH VH6L_5 GQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYWGPGQMSWVRQAPGKGLEW VGSIDTKGRDEWYDPKFDGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDIGFFDTWGRGTLVTVSS

[0317]

서열번호 47	LC 6HDL2.05 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKL LIYDGDDRYPEVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYY STPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
서열번호 48	HC 6HDL2.05 YPQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASVLFKHQDMSWVRQAPGKGLEW VGSISPSGGSTYYNDNVLGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDLDFMDEWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPPGSGM ASMTGGQQMG

[0318]

[0319] **실시예**

[0320] 하기의 실시예들은 본 발명의 이해를 돕기 위해 제공되며, 이의 진정한 범위는 첨부된 청구범위에 제시되어 있다. 본 발명의 사상에서 벗어나지 않고 제시된 절차에서 수정이 이루어질 수 있는 것으로 이해된다.

[0321] **실시예 1:**

[0322] **이중특이적 항-VEGF/항-6 Fab 단편의 생성**

[0323] 이중특이적 항-VEGF/항-IL-6 Fab 단편은, 예를 들어 WO2012/163520에 이전에 기재된 것과 유사한 방법을 사용하여 VEGF 및 IL-6에 결합하는 별도의 비-중첩 파라토프를 갖는 항체를 제공함으로써 생성되었다.

[0324] 여기서, 합성 Fab 단편의 2개의 별개의 파지 디스플레이 라이브러리를 이용하였고, 여기서 제1 파지 디스플레이 라이브러리에서 Fab 단편의 CDR-H1, CDR-H3 및 CDR-L2 영역들 내부의 잔기들이 다양화되었고, 제2 파지 디스플레이 라이브러리에서 Fab 단편의 CDR-L1, CDR-L3 및 CDR-H2 영역들 내부의 잔기들이 다양화되었다. 각각의 라이브러리에서, 각각의 다른 3개의 CDR 영역은 비-다양화되어 유지되었고 - 불변의 비-결합, 생식계열-유사("더미") 서열을 사용한 WO2012/163520의 방법과 대조적으로 - VEGF-A에 결합할 수 있는 파라토프를 나타내었다.

[0325] **제1 라이브러리**의 경우, VEGF-A에 결합할 수 있는 파라토프는 WO 2021/198034에 기재된 VEGF-A 결합 파라토프로부터 유래하였다.

[0326] **제2 라이브러리**의 경우, VEGF-A 결합 파라토프는 하기와 같이 수득되었다:

[0327] 나이브 선택을 위해, WO2012/163520에 설명된 바와 같이 CDR-H1, CDR-H3 및 CDR-L2가 다양화된 라이브러리를 사용하여 파지 라이브러리 패닝을 실시하였다. 나머지 CDR 서열은 비-결합, 생식계열-유사 서열을 사용하여 일정하게 유지되었다. 4 라운드에서, 제 1 라운드를 Dynabeads M-280 스트렙타비딘(써모피셔(Thermofisher) 카탈로그 번호 11206D) 상에 미리 고정된 100 nM의 비오티닐화된 VEGF-121 또는 VEGF-165로 실시하였다. 패닝 라운드 2-4를 용액 중의 75, 15 및 3 nM의 비오티닐화된 표적으로 각각 실시한 후, Dynabeads M-280 스트렙타비딘 상에서 Fab-온-파지/표적 복합체를 포획하였다. 파지/표적/비드 복합체를 PBST 및 PBS 완충액으로 여러 번 세척하였다. 표적-특이적 Fab를 함유하는 포획된 파지 클론을 100 mM DTT를 사용하여 M-280 비드로부터 용출시키고, 대수기 TG1 대장균 세포의 감염에 사용하고, 표준 프로토콜에 따라 M13 KO7 헬퍼 파지를 사용하여 구조하였다.

[0328] 선별 산출물의 스크리닝을 위해, 감염된 TG1 대장균 세포로부터 각각의 선별 라운드의 다중클론 플라스미드 미니프렙(miniprep)을 제조하였다. 플라스미드를 재포맷하여 Fab CH1 도메인의 C 말단에 T7 태그를 갖는 대장균 상청액 내에서 가용성 Fab를 생성하였다. T7-태깅된 Fab를 인코딩하는 결찰된 다중클론 플라스미드를 TG1 대장균 세포(자이모 리서치(Zymo Research) 카탈로그 번호 T3017)로 형질전환시키고, 단일 콜로니를 마이크로타이터 플레이트 내로 골라내었다. 가용성 Fab를 마이크로타이터 플레이트에서 발현시키고, 상청액을 원심분리에 의해

정제하였다. 표적 결합은 VEGF에 대한 ELISA 측정뿐만 아니라 VEGF 수용체 2에 대한 경쟁 ELISA에 의해 평가하였다. VEGF에 대한 높은 결합 신호뿐만 아니라 수용체 결합의 양호한 억제에 기초하여 후보 결합제를 선택하였다.

[0329] 결합제는 후속적으로 더 큰 부피로 발현 및 정제되었고, VEGF에 대한 결합은 SPR 측정을 사용하여 평가되었다. 수득된 클론 중 하나는 반복적인 단백질 조작 및 시험 전략에 의해 추가로 최적화되었고, CDR-H1, CDR-H3 및 CDR-L2에 대한 불변 서열로서 파지 디스플레이 라이브러리에 통합되었다. 요약하면, 단백질 조작 작업 흐름은 관련 유익한 돌연변이를 식별하기 위한 스카우트 돌연변이의 초기 라운드에 이어, 돌연변이 라이브러리의 올리고뉴클레오티드 기반 생성 및 파지 디스플레이 기반 선택에 기초한 친화성 성숙의 2회의 순차적인 라운드에 이어 스크리닝 및 추가 시험으로 구성되었다.

[0330] 두 라이브러리에서, Fab 단편의 CH1 도메인은 절단된 유전자-III 단백질에 링커를 통해 융합되어 파지 디스플레이를 용이하게 한다. 따라서, 하나의 라이브러리는 IL6 파라토프가 CDR-H1, CDR-H3 및 CDR-L2로부터의 아미노산 잔기를 포함하는 이중특이적 Fab 단편(본원에서 "6HVL" 라이브러리로 지칭됨)을 스크리닝하도록 의도되었고, 다른 라이브러리는 IL6 파라토프가 CDR-H2, CDR-L1 및 CDR-L3로부터의 아미노산 잔기(본원에서 "VH6L" 라이브러리로 지칭됨)를 포함하는 이중특이적 Fab 단편을 스크리닝하도록 의도되었다.

[0331] 각 라이브러리는 파지 라이브러리 패닝(panning)에 의해 인간 IL-6에 대한 결합제에 대해 농축되었다. 패닝 후, 농축된 두 파지미드 벡터 풀 모두에 대해 플라스미드 미니프렙을 생성하였다. 미니프렙을 제한 효소로 분해하여 절단된 유전자-III 단백질을 인코딩하는 영역을 절제하고 결찰에 의해 다시 원형화하여, IL-6 결합제에 대해 농축된 가용성 Fab 단편들을 인코딩하는 발현 벡터들의 풀들을 수득하였다. 이들 벡터 풀을 TG1 대장균 세포로 형질전환하고 개별 콜로니들을 선택하여 마이크로타이터 플레이트에서 개별 Fab 클론의 가용성 발현을 위해 배양하였다. 가용성 Fab 단편을 포함하는 상청액을 표준 ELISA 방법을 이용하여 IL-6 및 VEGF-A에 대한 결합에 대해 스크리닝하였다.

[0332] 스크리닝 데이터에 기초하여, 이중특이적 항-VEGF/항-IL-6 Fab 단편을 선택하고, 특이적 결합제를 생성하는 TG1 클론을 DNA 플라스미드 제조 및 서열분석하여, 각각의 라이브러리로부터 각각 IL-6 및 VEGF-A 둘 모두에 특이적으로 결합하는 하나의 이중특이적 Fab 단편을 함께 인코딩하는 VH 및 VL 서열의 쌍을 수득하였다:

[0333] 클론은 6HVL_1(서열번호 03의 중쇄 및 서열번호 04의 경쇄를 특징으로 함), 및 VH6L_1(서열번호 09의 중쇄 및 서열번호 10의 경쇄를 특징으로 함)이었다.

[0334] **실시예 2:**

[0335] **이중특이적 항-VEGF/항-IL-6 Fab 단편 6HVL_1 및 VH6L_1의 발현 및 특성화**

[0336] 결과로서 생성된 이중특이적 항-VEGF/항-IL-6 Fab 단편을 특성화하였다. 실시예 1에 기재된 바와 같이 수득된 벡터를 TG1 대장균 세포 내로 형질전환시키고, 6HVL_1 및 VH6L_1 둘 모두에 대해, 개별 콜로니를 이중특이적 항체 Fab 단편의 가용성 발현을 위해 배양하였다. 이중특이적 항체를 친화성 크로마토그래피에 의해 TG1 배양 상청액으로부터 정제하였다. 이중특이적 항체 6HVL_1 및 VH6L_1의 인간 및 시노몰구스 원숭이 IL6, 인간 VEGF121 및 인간 VEGF165로부터의 IL-6에 대한 결합을 평가하였다.

[0337] **실시예 3:**

[0338] **이중특이적 항-VEGF/항-IL-6 Fab 단편 6HVL_1 및 VH6L_1의 특성화**

[0339] **표면 플라즈몬 공명법(SPR)에 의해 평가된 IL-6 결합 동력학:**

[0340] 표면 플라스몬 공명(SPR)을 사용하여 본원에 개시된 인간 및 시노몰구스 원숭이 IL-6에 대한 대표적인 VEGF-IL-6 Fab 단편의 결합 동역학 및 친화도를 측정하였다.

[0341] 인간 및 시노몰구스 원숭이의 각각의 Fab 단편 IL-6의 결합에 대한 SPR 분석을 실행 완충액으로서 HBS-EP+(1x; BR100669; 사이티바(Cytiva))를 사용하여 비아코어(Biacore) 8K 기기(사이티바)에서 25° C에서 실시하였다. 인간 Fab 결합제(28958325, 사이티바)를 10 mM 아세트산나트륨 완충액, pH 5.0 중에 10 μg/ml의 최종 농도로 희석하고, 표준 아민 커플링 화학을 사용하여 CM5 센서 칩 상에 고정시켰다. 이러한 고정화 절차는 약 5000 공명 단위(RU)의 리간드 밀도를 발생시켰다. 참조 채널은 이에 따라 처리되었다.

[0342] 단백질 측정 전에 조건화 목적으로 5회의 시동 주기를 실시하였다. 각각의 주기에서, HBS-EP+ 완충액을 120초 동안 흘려보낸 후, 60초 동안 10 mM 글리신 완충액 pH2.0을 적용함으로써 유도체화된 칩 표면을 재생시켰다. 75

nM 농도의 Fab 단편을 HBS-EP+ 완충액 중에서 10 ul/분의 유속으로 60초 동안 상기 표면 상에 포획하였다. Fab 단편은 기준 채널에 적용되지 않았다. 이어서, 인간 또는 시노몰구스 원숭이 IL-6을 30 μl/분의 유속으로(180초의 접촉 시간 및 720초의 해리 시간) HBS-EP+ 완충액 중에 적절한 희석 시리즈로 적용하였다. 유도체화된 칩 표면의 재생이 상기에 기재된 바와 같이 달성되었다. 데이터는 8 K 평가 소프트웨어(Biacore Insight Evaluation 3.0)를 사용하여 평가하였다. 이중 참조를 사용하고 원시 데이터에 맞게 1:1 결합 모델을 사용하였다.

[0343] **도 1**은 시험된 Fab 단편에 대해 결정된 대표적인 SPR 추적 및 맞춤 곡선을 나타내며, 상응하는 Fab 명칭이 그래프에 제공된다. 데이터는 음성 대조군으로서 인간 및 시노몰구스 원숭이 IL-6, 및 IL-1알파(IL-1a)에 대한 결합에 대해 묘사된다. 그래프에 제공된 친화도는 3개의 독립적인 실험에 대한 평균 및 표준 편차에 해당한다.

[0344] 본 발명자들은 인간 IL-6에 대한 6HVL_1 및 VH6L_1의 명확한 결합을 관찰하였다. VH6L_1만이 외관상 매우 빠른 오프 속도(off-rate)를 갖지만, cyIL-6에 대한 유의한 친화성을 나타낸다. 음성 대조군 표적 IL-1a에 대한 결합은 관찰되지 않는다. SPR 데이터를 맞춤한 결과를 **표 1**에 나타내었다. 데이터는 세 가지 실험에 대해 평균화되었고, 해리 상수 KD에 대한 표준 편차가 제공되었다. 6HVL_1의 경우, 본 발명가들은 KD = 0.9 nM의 친화도를 관찰한 반면, VH6L_1의 경우, 친화도는 KD = 10.7 nM이다.

[0345] **표 1: 인간 및 시노몰구스 IL6에 대한 지시된 항체의 친화도**

	인간 IL6		시노몰구스 IL6	
	K_D[nM]	SD[nM]	K_D[nM]	SD[nM]
6HVL_1	0.93	0.04	210	17
VH6L_1	10.7	0.3	-	-

[0346]

[0347] **경쟁 ELISA에 의해 평가된 바와 같은 VEGF 결합:** VEGF121 및 VEGF165와 이들의 수용체의 상호작용을 차단하기 위해 어떤 항체 농도가 필요한지를 시험하기 위해, 6HVL_1 및 VH6L_1을 이용한 경쟁 ELISA 실험을 실시하였다. 양성 대조군으로는 VEGF-결합 Fab 단편인 라니비주맙을 사용하였고, 음성 대조군으로는 완충액만을 이용한 실험을 사용하였다. 요약하면, 모든 샘플의 1:3 희석 시리즈를 20 nM으로 시작하여 일정한 농도의 10 pM VEGF121(휴먼자임 HZ-1206) 또는 10 pM VEGF165(휴먼자임 HZ-1153)와 혼합하고 90분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 이 혼합물을 맥시소프(Maxisorp) 플레이트 표면을 2%MPBST로 차단시킨 후 VEGF-수용체 1(VEGF-R1, R&D 시스템, NaHCO3 중 1 μg/ml, pH 9.4)로 코팅된 맥시소프-플레이트로 옮겼다. Fab-항원 혼합물과 수용체-코팅된 플레이트 사이의 접촉 시간은 결합 평형으로의 간섭을 최소화하기 위해 RT에서 10분으로 제한하였다. 인큐베이션 및 2세척 단계 후, VEGFR1이 코팅된 플레이트에서 VEGF121/VEGF165의 검출을 비오틴화된 항-VEGF mAb(BAF203, R&D systems) 및 서양고추냉이-퍼옥시다제-표지된 스트렙타비딘(HRP-스트렙타비딘)을 사용하여 실시하였다. 후자는 HRP 기질 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 TMB의 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 디아민으로의 발색 전환을 이용하여 검출되며, 이는 450 nm에서 흡광도의 변화가 뒤따를 수 있다. TMB를 실온으로 예열하고 플레이트 상에서 5분 동안 인큐베이션한 후, 1 N H_2SO_4를 첨가하여 켄칭하였다.

[0348] 표적 VEGF165에 대한 결과는 **도 2** 및 **표 5** 및 **표 6**에 나타낸다. 분명히, VH6L1과 6HVL1은 둘 모두 임상적으로 잘 확립된 VEGF-A 길항제인 라니비주맙과 비교하여 VEGF165와 VEGF121의 VEGFR1에 대한 결합에 대해 경쟁하는 능력이 훨씬 개선되었음을 나타낸다.

[0349] **실시예 4:**

[0350] **이중특이적 항-VEGF-A/항-IL6 Fab 단편의 개선**

[0351] 상기 도시된 바와 같이, 두 항체는 시노몰구스 IL6과 교차반응성이 없거나 낮았으나, 이는 임상 개발에 요망된다. 또한, 안구 혈관 질환의 치료는 안구 내로 치료제의 주입을 필요로 하므로, 결과적으로 최적의 치료제는 표적 항원에 대한 높은 친화도 및 높은 농도를 나타내야 치료 효과의 내구성 및 환자의 편의성을 극대화할 수 있다. 따라서, 의도된 목적을 위해, 초기에 식별된 분자를 추가로 개선하는 것이 바람직하다.

[0352] VH 및 VL 도메인에 별개의 아미노산 치환들을 도입함으로써 여러 차례의 성숙을 수행하였다. 성숙하는 동안 "모" 항체 6HVL_1 및 VH6L_1 둘 모두로부터 유도된 후보 항체를 스크리닝하고 수율, 친화도, 동시 항원 결합, 친수성, 안정성, 점도 및 기타 매개변수와 관련하여 원하는 특성에 기초하여 선택하였다.

[0353] 개선된 후보 항체 6HVL_2, 6HVL_3 및 6HVL_4 및 VH6L_2 및 VH6L_3을 각각의 성숙의 라운드로부터 복수의 시험된 후보 항체 분자로부터 선택하였다. 후보 선택은 고농도에서 주사 사용 가능성을 보장하고 다른 유리한 특성,

예를 들어 VEGF-A 친화성 및 열 안정성을 유지하면서, 특히 인간 IL6 결합 및 시노몰구스 원숭이 IL6 교차반응성을 개선시키는 원하는 특성에 기초하였다.

[0354] 복수의 시험된 후보 항체 분자들로부터 바람직한 후보로서 개선된 후보 항체 6HVL_4가 선택되었다.

[0355] **표 2: 지시된 이중특이적 Fab 단편의 아미노산 서열(숫자는 본원에서 사용된 서열번호를 나타냄)**

[0356]

	VL	VH	경쇄	중쇄
6HVL_2	5	6		
6HVL_3	7	8		
VH6L_2	11	12		
VH6L_3	13	14		
6HVL_4	21	22	23	24
6HVL_4_YHE	25	26		

[0357] 모든 Fab 단편은 항체 VH6L_4에 대한 전장 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열에 포함된 것과 동일한 불변 영역, 즉 서열번호 29를 갖는 CL 및 서열번호 30을 갖는 CH1을 포함하였다.후보 항체는 실시예 2에 기재된 바와 같이 발현되었다.

[0358] **실시예 5:**

[0359] **개선된 항-VEGF-A/항-IL6 Fab 단편의 항원 결합 동역학**

[0360] 인간 및 시노몰구스 원숭이 IL6에 대한 결합 동역학 및 후보 항체에 대한 VEGF/VEGFR1 경쟁에 대한 경쟁 IC50을 지시된 Fab 단편(**표 2** 및 **실시예 2**에 도시된 바와 같은 아미노산 서열)을 사용하여 상기 기재된 바와 같이 평가하였다. 본 발명의 항체의 종래 기술에 대한 효능을 결정하기 위해, 하기의 대조군을 사용하였다: 이중특이적 항체 VH6L(WO2012/163520에 개시된 VH/VL 서열, 본원에서 "VH6L-BM"으로 지칭됨), 항-VEGF 항체 라니비주맙(INN) 및 WO2014/074905에 개시된 바와 같은 인간과 시노몰구스 IL6 사이의 교차-반응성 항-IL6 항체(양성 대조군). 전술한 종래 기술의 항체는 재조합 발현에 의해 제조되었다.

[0361] **도 3**과 **표 3** 및 **표 4**는 인간 및 시노몰구스 IL6 결합의 평가 결과를 보여준다. 3개의 추가의 프레임워크 아미노산 돌연변이를 갖는 6HVL_4의 변이체인 6HVL_4 및 6HVL_4-YHE는 약리학적으로 관련된 범위에서 초기에 선택된 모 분자에 비해 개선된 인간 IL6 결합뿐만 아니라 시노몰구스 IL6 교차-반응성을 나타낸다.

[0362] **표 3: SPR 인간 IL6**

[0363]

	K_D[nM]	SD[nM]
6HVL_1	0.927	0.042
6HVL_2	0.036	0.003
6HVL_3	0.043	0.013
6HVL_4	**0.069**	**0.002**
6HVL_4_YHE	0.065	0.002
VH6L_1	10.7	0.3
VH6L_2	0.157	0.003
VH6L_3	0.191	0.027
VH6L_BM	3.5	0.6
양성 대조군	0.035	0.007

[0364] **표 4: SPR 시노몰구스 IL6**

	K_D[nM]	SD[nM]
6HVL_1	210	16.57
6HVL_2	23.37	0.84
6HVL_3	0.98	0.07
6HVL_4	**1.48**	**0.09**
6HVL_4_YHE	1.39	0.04
VH6L_1	n.s.*	
VH6L_2	1.3E-03	0.29
VH6L_3	5.3E-03	0.51
VH6L_BM	n.s.*	
양성 대조군	1.8E-04	0

[0365]

[0366] *평가할 수 있는 신호 없음

[0367] **도 4** 및 **표 5** 및 **표 6**은 인간 VEGF121 및 인간 VEGF165를 사용하여 경쟁 ELISA에 의해 평가된 바와 같은 VEGF 결합의 평가 결과를 보여준다. 도 4는 종래 기술 분자인 6HVL_BM이 검정 조건에서 검출하기에는 너무 낮은 친화도를 나타내므로 본 발명의 항체의 친화도보다 분명히 훨씬 낮은 친화도를 나타냄을 도시한다.

[0368] **표 5: IC50 VEGF121**

	IC50[pM]	SEM[nM]
6HVL_1	173	12
6HVL_2	194	13
6HVL_3	171	11
6HVL_4	**458**	**30**
6HVL_4_YHE	528	35
VH6L_1	26	2
VH6L_2	38	3
VH6L_3	20	1
라니비주맙	503	25

[0369]

[0370] **표 6: IC50 VEGF165**

	IC50[pM]	SEM[nM]
6HVL_1	182	17
6HVL_2	143	13
6HVL_3	114	11
6HVL_4	**111**	**10**
6HVL_4_YHE	135	13
VH6L_1	65	6
VH6L_2	62	6
VH6L_3	32	3
라니비주맙	1184	81

[0371]

[0372] **실시예 6:**

[0373] **항-VEGF/항-IL-6 Fab 단편의 동시 결합**

[0374] 본 발명의 항-VEGF/항-IL-6 Fab 단편을 포획하기 위해 고정화된 항-Fab 항체를 사용하여 표면 플라스몬 공명에 의해 이들의 표적에 대한 본 발명의 항체에 대한 동시 결합을 하기와 같이 평가하였다:

[0375] 항-Fab 항체(사이티바 28958325)의 대략 5000개의 공명 단위(RU)를 표준 아민 커플링 화학을 사용하여 Series S 센서 칩 Cm5(사이티바 BR100530)에 고정화하였다. 러닝(running) 및 희석 완충액으로 HBS-P+(10 mM HEPES, 150 mM NaCl pH 7.4, 0.05% 계면활성제 P20)를 사용했으며 유동 세포의 온도는 25° C로 설정하였다.

[0376] 항-VEGF/항-IL-6 Fab 단편은 10 μg/mL 용액을 5 μL/분의 유속으로 30초 동안 주입하여 항-Fab 항체/항-VEGF/항-IL-6 Fab 복합체를 형성시켜 카파(Kappa) 쇄를 통해 포획하였다. 항-Fab 항체, 항-VEGF/항-IL-6 Fab, 인간 VEGFA 및 인간 IL-6을 포함하는 복합체의 형성을 허용하기 위해 항원, 인간 VEGFA121(사내 생산, P1AA1779-010) 및 인간 IL-6(시판용, Peprotech #200-06)을 순차적으로 또는 동시에 첨가하였다. 상응하는 SPR 반응 단위

곡선(비아코어 T200, 사이티바)을 모니터링하였다. 순차적 결합을 위해, 300 nM 농도의 인간 VEGFA를 180초 동안 주입한 후, 300 nM 농도의 인간 IL-6을 180초 동안 추가로 주입하였다. 동일한 농도를 또한 역순으로 주사하였다(제1 인간 IL-6에 이어서 인간 VEGFA로). 유사하게, 두 항원의 혼합물을 각각 300 nM의 농도로 180초 동안 주사하였다. 각각의 실험 후, 10 mM 글리신(pH 2.1)을 5 μl/분의 유속으로 60초 동안 주입하여 표면을 재생하였다. 벌크 굴절률 차이는 블랭크 주입을 빼고 포획된 Fab이 없는 대조군 유동 세포로부터 수득한 반응을 빼서 수정하였다.

[0377] 결과는 **도 7**에서 도시된다. 항-Fab/항-VEGF/항-IL-6 Fab 복합체에 인간 VEGF-A를 첨가하면 결합 및 항-Fab/Fab/VEGF-A 복합체 형성이 발생하였다. 인간 IL-6의 순차적 첨가는 항-Fab/DutaFab/VEGF-A/IL-6 복합체(파선 곡선)의 형성을 유도하였다. 이는 항-VEGF/항-IL-6 Fab에 대한 인간 VEGF-A 및 인간 IL-6의 동시 결합이 가능함을 명확하게 입증하였다.

[0378] 인간 IL-6을 먼저 첨가한 다음 인간 VEGF-A를 순차적으로 첨가하는 역순으로, 감소된 동시 결합이 눈에 띄었다(점선). 이는 인간 IL-6의 결합이 먼저 인간 VEGF-A의 결합을 입체적으로 방해하여 항-VEGF/항-IL-6 Fab와 인간 VEGF-A 사이의 결합 능력을 감소시키지만 여전히 가능함을 나타낸다.

[0379] 두 표적의 존재 하에, 인간 IL-6 결합이 바람직한 것으로 보였고, 인간 VEGF-A에 대한 결합은 감소되었다(실선). 이러한 효과는 인간 VEGF-A에 비해 인간 IL-6에 대한 항-VEGF/항-IL-6 Fab의 고유한 더 높은 친화도로 인해 타당해 보였다.

[0380] 다른 검정에서, IL-6의 존재 하에 항-VEGF/항-IL-6 Fab 단편에 의한 VEGF-R2의 차단을 고정된 VEGF-A를 사용하는 표면 플라스몬 공명을 이용한 **억제 검정**에 의해 평가하였다:

[0381] 항-VEGF/항-IL-6 Fab 단편에 대한 인간 VEGF-A 및 인간 IL-6의 동시 결합을 보여주기 위하여, 인간 VEGF 수용체 2(VEGFR2, 상업용 R&D Systems 357-KD)를 표준 아민 커플링 화학을 사용하여 시리즈 S 센서 칩 CM5(사이티바 BR100530)에 고정시켜 표면 밀도를 약 11000 공명 단위(RU)로 만들었다. 러닝 및 희석 완충액으로 HBS-P+(10 mM HEPES, 150 mM NaCl pH 7.4, 0.05% 계면활성제 P20)를 사용하였다.

[0382] 참고로, 50 nM 인간 VEGFA 용액에서 0-200 nM 항-VEGF/항-IL-6 Fab 단편의 1:2 희석 시리즈를 사용하였고, VEGFA & VEGFR2 억제를 시험하였다. 고정된 VEGFR2 표면에 항-VEGF/항-IL-6 Fab 단편/VEGFA 혼합물을 5 μL/분의 유속으로 30초 동안 주입하였다. 60초 동안의 해리 단계 이후에, 5 mM NaOH를 5 μL/분의 유속으로 30초 동안 주입하여 VEGFR2 표면을 재생하였다. 벌크 굴절률 차이는 맹검액 주입을 빼고 맹검 대조 흐름 세포로부터 수득된 반응을 빼서 수정하였다. 평가를 위해, 주입 종료 5초 후 결합 반응을 취하였다. RU에서 유도된 반응은 이중특이적 Fab가 없는 리간드(들)에 해당하는 초기 신호에 대한 결합 반응으로 변환되었다. IC50 값은 4개 매개변수 로지스틱 모델(XLfit, ID 비즈니스 솔루션즈(주)(Business Solutions Ltd.))을 사용하여 계산하였다.

[0383] 참조에 더하여, 10 nM의 인간 IL-6이 존재하는 용액에서 0-200 nM의 항-VEGF/항-IL-6 Fab 단편을 희석하여 15분 동안 사전-인큐베이션하고 시험하여 IC50 값을 계산하였다(도 3).

[0384] 결과는 **도 8**에서 도시된다. 그래프는 경쟁하는 항-VEGF/항-IL-6 Fab의 농도에 따른 VEGFR2/VEGF-A 상호작용의 억제를 나타낸다. 항-VEGF/항-IL-6 Fab가 존재하지 않을 경우, 100% VEGFR2/VEGF-A 결합(0% 억제)이 달성된 반면, 항-VEGF/항-IL-6 Fab 농도를 증가시키면 억제가 증가하였다(십자선이 있는 실선). 치료학적 관련 조건을 모방하는 인간 IL-6의 첨가는 VEGFR2/VEGF-A의 억제 정도에 영향을 미치지 않았고, 매우 유사한 IC50 값(인간 IL-6이 없는 IC50 = 33 nM(삼각형이 있는 파선), 추가의 인간 IL-6이 있는 IC50 = 37 nM(삼각형이 있는 파선))을 생성하였다.

[0385] 제3 검정에서, IL6 활성에 대한 VEGF-결합의 영향은 하기와 같이 **세포-기반 IL-6 특이적 리포터 유전자 검정**에 의해 평가하였다.

[0386] 항-VEGF/항-IL-6 Fab에 대한 인간 VEGFA 및 인간 IL-6의 동시 결합을 평가하기 위해, 리포터 세포주, HEK-Blue™ IL-6 세포(인비보젠(InvivoGen))를 사용한 IL-6 특이적 세포-기반 리포터 유전자 검정을 사용하였다. 동시에 첨가하거나(**도 9**) 또는 이중특이적 Fab 및 인간 IL-6의 사전인큐베이션 이후(**도 10**), 세포를 인간 VEGF-A 과량의 부재 및 존재 하에 항-VEGF/항-IL-6 Fab 및 인간 IL-6과 함께 20 +/- 1시간 동안 인큐베이션한다. HEK-Blue™ IL-6 세포의 표면 상의 이의 수용체 IL-6R에 대한 인간 IL-6의 결합은 야누스 계열의 티로신 키나아제(JAK1, JAK2 및 Tyk2)를 통한 신호전달 캐스케이드를 촉발시켜 신호 변환기 및 전사 활성화제 3(STAT3)의 활성화 및 후속적인 SEAP(분비된 배아 알칼리성 포스파타아제)의 분비를 발생시킨다. 인간 IL-6에 대한 항-VEGF/항-IL-6 Fab의 결합의 경우, 신호전달이 억제되고 SEAP가 생성되지 않는다. 세포 배양 상청액의 SEAP 수준은 상청액의 부분

표본에 QUANTI-Blue SEAP 기질을 첨가하여 후속적으로 정량화된다. SEAP는 QUANTI-Blue 기질을 650 nm 흡광도에서 플레이트 판독기를 사용하여 측정될 수 있는 생성물로 전환시킨다. 이어서, 평균 흡광도 대 항-VEGF/항-IL-6 Fab의 농도를 그래프화하여 인간 VEGFA 및 인간 IL-6의 동시 결합을 평가하고, 데이터를 제한된 4-매개변수 곡선에 맞춤한다. 샘플의 상대적 효능(억제 농도)은 4-매개변수 로지스틱 곡선 맞춤을 사용하여 계산된다.

[0387] 결과를 **도 9와 도 10**에 나타낸다.

[0388] **도 9**는 사전인큐베이션없이 결과를 도시한다. 증가하는 양의 항-VEGF/항-IL-6 Fab의 적정은 1.134 ng/mL(~22.5 pM)의 계산된 IC50 값을 갖는 명확한 용량-반응 곡선을 나타내었으며, 이는 항-VEGF/항-IL-6 Fab의 양을 증가시킴으로써 인간 IL-6 반응의 명확한 억제를 나타낸다. 이중특이적 Fab에 대한 인간 IL-6 및 VEGFA의 동시 결합을 다루기 위해, 표적 분자 둘 모두를 동시에 인큐베이션하고, 인간 IL-6 효과를 측정하였다. 선택된 비율의 인간 VEGFA : 인간 IL-6(1 : 1 / 2.5 : 1 / 5 : 1)에 관계없이 유효한 IC_{50} 값의 약간의 감소만이 관찰되었다. 값은 인간 VEGF-A가 5배 초과로 존재할 때 인간 VEGFA가 없을 때 IC_{50} = 1.134 ng/mL에서 IC_{50} = 1.724 ng/mL로 약간 변경되었으며, 이는 생체 내 관련 조건을 밀접하게 반영하는 상황이다.

[0389] **도 10**은 IL6의 결합이 IL6 결합에 영향을 미치지 않음을 설명하는 사전인큐베이션 결과를 도시한다.

[0390] **실시예 7:**

[0391] **x-선 결정학 및 제안된 작용 방식에 의해 결정된 바와 같은 항-VEGF/항-IL-6 Fab 단편의 IL-6에 대한 결합**

[0392] IL-6 신호전달은 IL6과 이의 비-신호전달 공수용체 IL6R 및 사이토카인 수용체 gp130과의 육량체 복합체의 형성에 의해 개시된다. 여기서, 3개의 에피토프(부위 1, 2 및 3)는 복합체에서 형성되는 접촉 표면을 확인하기 위해 정의되어 있다(Boulanger MJ et al., Science 2003, 27;300(5628):2101-4.). IL-6은 먼저 "부위 1"로 지칭되는 상호작용 표면을 통해 IL-6R에 결합한다. "부위 2"는 gp130의 도메인 2 및 3과 상호작용하는 IL-6 및 IL-6R의 이원 복합체에 의해 형성된 에피토프이다. IL6의 "부위 3"과 gp130의 도메인 1 사이의 후속 상호작용은 IL6/IL6R/gp130 삼량체의 이량체의 형성 및 따라서 육량체 신호전달 복합체의 형성을 발생시킨다.

[0393] IL6의 어느 에피토프가 본 발명의 2개의 일련의 Fab(6HVL 및 VH6L)에 의해 결합되는지를 이해하기 위해, 본 발명자들은 각각 본 발명의 항-VEGF/항-IL-6 Fab 단편을 나타내는 IL-6과 항체 Fab 사이의 복합체의 구조 분석을 실시하였다. 이용된 Fab 6HVL4.1은 Fab 6HVL_2와 매우 밀접하게 관련되고 단지 2개의 돌연변이가 상이하며, Fab 0182는 Fab VH6L_1과 가장 밀접하게 관련된다. 모든 6HVL 클론이 동일한 Fab(6HVL_1)로부터 유래되고, 마찬가지로 모든 VH6L 클론이 각각 Fab VH6L_1로부터 유래된다는 사실로 인해, 하기에서 수득된 구조적 결과는 각각의 개별 시리즈의 Fab에 걸쳐 적용가능하다고 안전하게 가정할 수 있다. Fab 및 IL-6의 복합체의 형성 및 복합체 구조의 분석은 하기와 같이 x-선 결정학에 의해 실시하였다:

[0394] IL6-Fab 복합체는 동일한 몰량의 Fab 단편 0182(경쇄 아미노산 서열 서열번호 33의 경쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 34의 중쇄 아미노산 서열) 또는 6HVL4.1(서열번호 37의 경쇄 아미노산 서열, 서열번호 38의 중쇄 아미노산 서열)을 IL-6(PeproTech, Lot# 031316-2)과 혼합함으로써 제조하였다

[0395] 얼음 상에서 90분 동안 인큐베이션한 후, 단백질 복합체를 Fab 단편 0182에 대해 23.1 mg/ml로 농축시키고, 6HVL4.1에 대해 21.3 mg/ml로 농축시켰다. 초기 결정화 시험은 21° C에서 시팅 드롭(sitting drop) 증기 확산 설정에서 실시되었다.

[0396] Fab 단편 0182의 경우, 니들 형상의 결정은 0.1 M $MgCl_2$, 0.1 M 구연산나트륨 pH 5, 15%(w/v) PEG 4000 중에서 2일 이내에 나타났다. 결정은 시딩 실험에서 후속적으로 사용되었고, 큰 정방정계 형상의 결정은 0.1 M 아세트산칼슘 12%(w/v) PEG 8000, 0.1 M 카코딜산나트륨, pH 5.5에서 수득될 수 있었다.

[0397] 6HVL4.1의 경우, 0.2 M 황산암모늄, 0.1 M 트리스, pH 7.5 pH 및 20%(w/v) PEG MME 5000 중 하루 이내에 능면체 형상의 결정이 나타났다.

[0398] 데이터 수집을 위해, 수집 결정을 15% 에틸렌 글리콜이 보충된 결정화 용액에서 100 K로 급속 냉각시켰다. 스위스 광원(Swiss Light Source, 빌리겐, 스위스)의 빔라인 X10SA에서 PILATUS 6 M 검출기를 사용하여 Fab 단편 0182에 대한 0.9999 Å 및 6HVL4.1에 대한 0.9982 Å의 파장에서 회절 데이터를 수집하였다. 데이터는 XDS로 처리하고(Kabsch, W., XDS. Acta Cryst . D66, 125-132 (2010)), AIMLESS로 크기 조정되며(P.R. Evans and G.N. Murshudov "How good are my data and what is the resolution?" Acta Cryst. (2013). D69, 1204-1214),

STARANISO로 이방성에 대해 분석하였다(Tickle, I.J., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Sharff, A., Vonrhein, C., Bricogne, G. (2018). STARANISO (http://staraniso.globalphasing.org/cgi-bin/staraniso.cgi). Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd.).

[0399] Fab 0182를 포함하는 복합체의 결정은 β=91.65° 로 a= 65.93 Å, b= 65.46 Å, c= 159.30 Å의 셀 축을 갖는 공간 군 $P2_1$에 속하며 2.18 Å의 분해능으로 회절한다.

[0400] 6HVL4.1을 포함하는 복합체의 결정은 a= 57.56 Å, b= 64.98 Å, c= 203.68 Å의 셀 축을 갖는 공간 군 $P2_12_12_1$에 속하며 1.94 Å의 분해능으로 회절한다.

[0401] 구조는 페이저(McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., & Read, R.J. Phaser crystallographic software. J Appl Cryst. 40, 658-674 (2007))로 분자 대체에 의해 사내 Fab 및 IL-6(pdb 엔트리 1alu)의 좌표를 검색 모델로서 사용하여 결정되었다. 서열 차이에 따라 아미노산을 변화시키기 위해 차이 전자 밀도를 사용하였다. 구조는 CCP4 스위트의 프로그램(Winn, M.D. *et al.* Overview of the CCP4 suite and current developments. Acta. Cryst. D67, 235-242 (2011)) 및 BUSTER(Bricogne, Blanc, G.E., Brandl, M., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Roversi, P., Sharff, A., Smart, O.S., Vonrhein, C., Womack, T.O. Buster version 2.9.5 Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd. (2011))로 정제되었다. 수동 재구축은 COOT를 사용하여 실시되었다(Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., Cowtan, K. Features and Development of Coot. Acta Cryst. D66, 486-501 (2010)).

[0402] 데이터 수집 및 개선 통계는 **표 7**에 요약되어 있다. 모든 그래픽 프리젠테이션은 PYMOL로 준비되었다(The Pymol Molecular Graphics System, 버전 1.7.4. Schrϕdinger, LLC.)

표 7 데이터 수집 및 정제 통계

	Fab0182-IL-6 복합체	Fab 6HVL4.1-IL6 복합체
데이터 수집		
공간군	$P2_1$	$P2_12_12_1$
세포 크기		
a, *b*, *c* (Å)	65.930, 65.46, 159.30	57.56, 64.98, 203.68
α, β, γ (°)	90, 91.65, 90	90, 90, 90
분해능(Å)	2.18	1.94
R_{meas}	0.12	0.10
I / σ I	9.98(1.87)	10.00(0.85)
CC(1/2)	0.996(0.579)	99.2(98.6)
전체 완전성 타원(%)	48.1	
완전성 타원 내부 셸(%)	99.7	
완전성 타원 외부 셸(%)	6.0	
중복성	3.80(3.55)	7.34(7.55)
정제		
분해능(Å)	79.62 - 2.18	38.80 - 1.94
반사 없음	34236	57144
R_{work} / R_{free}	17.70/24.80	19.80/23.10
원자 수		
단백질	8774	4502
물	411	347
B-인자		
단백질	49.37	48.57
물	30.70	56.30
R.m.s. 편차		
결합 길이(Å)	0.010	0.010
결합 각도(°)	1.22	c
PROASIS ID	1txqc	

[0403]

[0404] *괄호 안에 값은 가장 높은 분해능 껍질에 대한 것이다.

[0405] **Fab0182-IL-6 복합체의 구조**

[0406] IL-6과의 복합체에서 Fab 0182(Fab의 VH6L 시리즈의 대표)의 복합체의 결정 구조를 2.18Å의 분해능으로 결정하였다(**도 5**). 상기 구조는 **중쇄의 CDR2 및 경쇄의 CDR1, CDR3**의 기여에 의해 IL-6에 결합된 Fab 0182를 나타낸다. IL-6과의 추가의 상호작용은 Fab 0182의 경쇄의 N-말단 잔기 Val3 및 Gln4에 의해 유지된다. IL-6에 의해 기여되는 계면은 나선 A 및 나선 C의 잔기에 의해 형성된다.

[0407] **도 16**은 IL6에 대한 Fab 0182의 결합 방식을 도시한다. 예시의 목적을 위해, 본 발명자들은 2개의 구조의 오버레이를 생성하였다: 첫째, IL6을 갖는 Fab의 복합체 구조의 오버레이, 둘째, IL6을 갖는 IL6R의 복합체 구조의 오버레이(pdb 수탁 코드 1p9m을 갖는 IL6, IL6R 및 gp130의 공결정 구조로부터 취해짐, 참조: Boulanger MJ et al., Science 2003, 27;300(5628):2101-4). 이를 IL6R 및 gp130을 갖는 IL6의 삼량체 복합체와 비교하여, Fab가 gp130과 매우 유사한 방식으로 IL6에 결합한다는 것, 즉 IL6의 부위 2에 결합한다는 것이 명백하다. 이러한 결합 방식은 IL6에 대한 IL6R 및 Fab 둘 모두의 동시 결합을 허용할 것으로 예상되는데, 즉 IL6과 IL6R의 상호작용은 여전히 가능해야 하고, 이러한 선험적인 IL6 길항제는 IL6의 부위 2에 대한 결합을 통해 IL6/IL6R 복합

체와 gp130의 상호작용을 억제함으로써 작용할 것으로 예상된다.

[0408] **Fab6HVL4.1-IL-6 복합체의 구조**

[0409] 본 발명자들은 1.94Å의 분해능에서 IL-6과의 복합체에서 Fab 6HVL4.1의 복합체의 결정 구조를 결정하였다(**도 6**). 상기 구조는 **중쇄의 CDR1, CDR3 및 경쇄의 CDR2, CDR3**의 주요 기여에 의해 IL-6에 결합된 Fab 6HVL4.1을 나타낸다. IL-6과의 추가 상호작용은 Fab 6HVL4.1의 중쇄의 첫번째 3개의 N-말단 잔기에 의해 유지된다. IL-6에 의해 기여되는 계면은 나선 A 및 나선 C의 잔기에 의해 형성된다.

[0410] Fab 0182에 대해 실시된 것과 유사하게, 본 발명자들은 구조의 오버레이를 사용하여 그리고 상기 기재된 바와 같은 상호작용 잔기를 분석함으로써 IL6에 대한 Fab 6HVL4.1의 결합 모드를 분석하였다. **도 17**은 또한 6HVL4.1이 gp130과 매우 유사한 방식으로 IL6에 결합하며, 따라서 구조적 관점에서 부위 2 결합제로서 간주되어야 한다는 것을 입증한다.

[0411] **IL6에 대한 결합 방식의 실험적 조사**

[0412] 6HVL4.1과 같은 클론 및 이의 유도체가 IL6 부위 2 결합제라는 사실은 표면 플라스몬 공명을 이용하는 검정에 의해 기능적으로 확인될 수 있다.

[0413] 상기 일 검정에서, 6HVL4.1(항체 "P1AE2421")을 포함하는 6HVL 시리즈의 클론을 나타내는 Fab 단편을 항-Fab 항체를 통해 SPR 칩의 표면 상에 포획하고, 3가지 상이한 농도(250, 500, 1000 nM)의 IL6 및 후속적으로 IL6R을 칩 표면 위로 유동시켰다. 여기서, 본 발명자들은 IL6이 Fab 및 IL6R 둘 모두에 결합할 수 있는 경우 2단계의 순차적 신호 증가를 예상한다. 그리고 실제로, 이는 시험된 Fab에 대해 관찰된 것이다(**도 18**): SPR 신호 추적에서, IL6의 첨가는 신호의 강한 증가를 유도하며, 이는 IL6R의 첨가 후에 더욱 향상된다. 이는 IL6에 대한 IL6R 및 Fab의 동시 결합이 가능하다는 것을 명백하게 입증한다. 이러한 발견은 IL6의 부위 1이 완전히 차폐되고 접근할 수 없는 IL6 및 IL6R의 공유 키메라("하이퍼-IL6"로 지칭됨)가 SPR 칩 상에 코팅되고 26 nM의 농도에서 Fab로 검출될 때 각각의 Fab 분자의 결합을 여전히 용이하게 한다는 사실에 의해 추가로 입증된다(**도 19**).

[0414] 하지만, 포획된 Fab 단편이 IL6R에 대한 IL6의 결합과 경쟁하는지를 조사하기 위해 ELISA 실험을 이용할 때, 본 발명자들은 놀라운 결과를 수득하였다. 검정 설정은 하기와 같았다: 먼저, 일정한 농도의 IL6을, SPR 실험에서 또한 사용되었고 6HVL 시리즈의 클론을 나타내는 Fab 단편 P1AE2421의 적정 시리즈와 사전인큐베이션하였다. 이어서, 이를 IL6R로 직접 코팅된 ELISA 플레이트 상에서 인큐베이션하였다. 세척 후, 플레이트-결합된 IL6R에 의해 결합된 IL6은 서양고추냉이-퍼옥시다아제-표지된 스트렙타비딘(Strep-HRP)을 이용하는 비오티닐화된 항-IL6 항체로 검출되었다. 상기 검정(**도 20**)에서, 본 발명자들은 Fab에 의한 IL6/IL6R 상호작용의 거의 완전한 억제를 매우 많이 시사하는 결과를 관찰하였다.

[0415] 본 발명자들이 입수 가능한 결정 구조 및 SPR 실험으로부터 IL6의 부위 1이 결합에 여전히 접근가능하다는 것을 알고 있다는 점을 감안할 때, 본 발명자들은 이러한 결과를 해석하여, 본 특허에 기재된 IL6 항체가 gp130에 대한 IL6/IL6R 복합체의 결합을 입체적으로 차단할 수 있을 뿐만 아니라, 또한 IL6R에 대한 IL6의 결합 친화도를 알로스테릭하게 강하게 감소시킬 수 있도록, 즉, 추가로 IL6 부위 1 길항제로서 기능적으로 작용할 수 있도록 해야 한다.

[0416] 이러한 작용 모드는 하기와 같은 이유로 최적의 특성을 가질 것으로 예상된다.

[0417] 1. IL6 부위 2 결합제이기 때문에, IL6 길항제는 막-결합된 IL6R 및 gp130에 대한 IL6 결합에 의한 신호전달 복합체(시스-신호전달) 또는 IL6 및 IL6R의 예비형성된 복합체(트랜스-신호전달)의 형성을 동등하게 효과적으로 차단할 수 있다. 대조적으로, IL6 부위 1 결합제는 IL6 및 IL6R의 미리 형성된 복합체에 결합할 수 없지만, 복합체가 해리되는 경우에만 길항할 수 있다.

[0418] 2. IL6R에 대한 IL6의 친화도를 알로스테릭하게 감소시키는 것으로 인해, 본원에 기재된 IL6 길항제는 신호전달의 제1 단계의 형성, 즉 IL6/IL6R 복합체의 형성을 불리하게 함으로써, 이러한 효과를 나타내지 않는 부위 2 결합제와 비교하여 증가된 효능을 나타낼 것으로 예상된다. 부위 1 결합을 알로스테릭하게 간섭하지 않는 부위 2 결합제는 시스-신호전달에 특히 불리한 점을 가질 것으로 예상되며, 즉, 세포의 표면 상에서의 IL6/IL6R-gp130 복합체 형성의 제2 단계를 차단해야 할 때, 여기서 IL6/IL6R 및 gp130의 상대적 유효 농도는 매우 높을 것으로 예상된다.

[0419] 3. IL6 부위 1 결합제는, 항체로서 전신적으로 사용되는 경우, IL6 단독에 비해 복합체의 반감기가 강하게 증가

하기 때문에 IL6과 항체의 복합체의 강한 축적을 유도하는 것으로 공지되어 있다. 대조적으로, IL6 부위 2 결합제는 막-결합된 IL6R에 대한 결합 및 후속적인 내재화 및 복합체를 차지하는 세포의 분해에 의해 IL6/항체 복합체의 제거를 여전히 허용할 것으로 예상된다. 이와 관련하여, 본원에 기재된 IL6 길항제는 부위 1 및 부위 2 결합제 둘 모두의 바람직한 특성을 조합할 것으로 예상된다: 기능적으로 IL6/IL6R/gp130 신호전달 복합체의 형성의 제1 단계를 차단할 수 있지만, 이들은 여전히 세포 상에서의 IL6R 결합을 통한 IL6/mAb 복합체의 분해를 허용한다.

[0420] 4. 안과적 적응증에서 그리고 Fab 분자로서 활용되는 경우, 이러한 결합제의 예상 거동은 여전히 더욱 유익할 수 있다: IL6 부위 1 결합제와 유사하게, Fab/IL6 복합체는 IL6R 결합에 의해 비교적 방해받지 않고 안과용 공간을 남길 수 있고 신장 여과에 의해 전신적으로 신속하게 제거될 수 있다.

[0421] **실시예 8:**

[0422] **개선된 항-VEGF/항-IL6 Fab 단편의 열 안정성**

[0423] 표 8에서 확인된 아미노산 서열을 포함하는 개선된 항-VEGF/항-IL-6 항체의 추가 서열 변이체를 생성하였다.

[0424] **표 8: 지시된 이중특이적 Fab 단편의 아미노산 서열(숫자는 본원에서 사용된 서열번호를 나타냄)**

[0425]

	VL	VH
6HVL_5	39	40
6HVL_6	41	42
VH6L_4	43	44
VH6L_5	45	46

[0426] 표시된 이중특이적 항체의 열 안정성은 하기와 같이 평가되었다.

[0427] 열 안정성:

[0428] 이중특이적 항체 Fab 단편의 샘플을 20 mM 히스티딘/히스티딘 클로라이드, 140 mM NaCl, pH 6.0에서 1 mg/mL의 농도로 제조하고 10 µL 마이크로-큐벳 어레이로 옮겼다. UNcle 기기(Unchained Labs)를 사용하여 266 nm 레이저로 여기 시 정적 광산란 데이터 및 형광 데이터를 기록하고 샘플을 30° C에서 90° C까지 0.1° C/분의 속도로 가열한다. 샘플은 3중으로 측정되었다.

[0429] 개시 온도의 평가는 UNcle 분석 소프트웨어에 의해 실시되었다. 응집 개시 온도는 산란광 강도가 증가하기 시작하는 온도로 정의된다. 열에 대한 형광 신호의 무게 중심 평균(BCM)의 이동으로 단백질의 변성을 모니터링하였다. 용융 온도는 BCM(nm) 대 온도 곡선의 변곡점으로 정의된다.

[0430] **표 9: 열 안정성**

[0431]

	Tagg (° C)	Tm
6HVL_4	64.7	70.1
6HVL_5	64.9	71.3
6HVL_6	63.4	66.8
VH6L_3	65.8	77.0
VH6L_4	66.6	76.3
VH6L_5	66.6	77.0

[0432] **실시예 9:**

[0433] **개선된 이중특이적 항-VEGF/항-IL6 Fab 단편의 생물물리학적 특성(동적 광산란(DLS)에 의한 점도 평가)**

[0434] 전술한 바와 같은 항체 Fab 단편을 표준 방법에 의해 CHO 세포에서 발현시켰다.

[0435] 점도는 전술한 바와 같이 라텍스-비드 DLS 방법으로 측정하였다(He F et al.; Anal Biochem. 2010 Apr

1;399(1):141-3). 구체적으로, 명시된 물질들을 사용하여 하기의 프로토콜을 따랐다.

[0436] 점도 평가:

[0437] 기기 및 재료:

[0438] • Greiner Bio-One 마이크로플레이트를 구비한 Wyatt DLS 플레이트 판독기

[0439] • 3000 시리즈 Nanosphere™ 사이즈 스탠다드(써모피셔 카탈로그 번호 3300A)

[0440] • 트윈(Tween) 20(Roche, cat.no. 11332465001) 및 실리콘 오일, 예:(Alfa Aesar cat.no. A12728)

[0441] • 농도 결정용 UV 광도계(예를 들어, Nanodrop 8000).

[0442] 샘플 제조

[0443] 항체 샘플을 재완충시키고 20 mM His/HCl, pH 5.5(완충액) 및 0.02% 트윈 20(최종 농도)으로 희석하였다. 0.03% 비드 농도의 고체를 첨가하였다. 최소 3가지 농도가 준비되었으며, 가능한 최고 농도는 약 200 mg/mL였다. 무항체 대조군으로서 2개의 블랭크 샘플이 필요하였다: 하나는 물에 재현탁된 나노스피어 비드를 포함하고, 다른 하나는 완충액에 재현탁된 나노스피어 비드를 포함한다. 샘플을 마이크로 플레이트로 옮기고 각 웰을 실리콘 오일로 덮었다.

[0444] Wyatt DLS 플레이트 판독기로 측정

[0445] 모든 샘플과 블랭크는 5° C 단계로 15 내지 35° C의 다양한 온도에서 분석되었다. 수득 시간은 30초이고 수득 횟수는 샘플 및 온도당 40회이다.

[0446] 데이터 분석

[0447] nm 단위의 원시 데이터 Dapp(겉보기 반경)을 소프트웨어 템플릿(Microsoft Dynamics 7.10 이상)의 개요에 표시하였다. 점도는 식(ηreal = Dapp * ηH2O / Dreal)로 계산하였다. Dreal은 블랭크 샘플에서 측정된 비드 크기이며 비드 크기(300 nm)와 동일하다. 계산된 점도를 엑셀 곡선으로 나타내었다. Mooney 곡선 맞춤(Excel)을 사용하여, 주어진 농도에서 점도를 외삽할 수 있다. 여기서 점도가 20 cP를 초과하는 최대 단백질 농도를 계산하였다.

[0448] 20° C에서 20 cP의 점도에 도달하는, 명시된 항체의 최대 농도를 아래에 표시한다.

[0449] **표 10: DLS 비드법에 의한 점도. 20° C에서 20 cP에 도달하기 위한 명시된 항체의 최대 실시가능한 농도를 나타냄.**

[0450]

	농도[mg/ml]
6HVL_4	195.4
6HVL_5	192.4
VH6L_3	220.0
VH6L_4	226.8
VH6L_5	240.4

[0451] 결과는 본 발명의 항체가 주사가능성에 대한 허용가능한 점도 한계 미만의 점도를 포함하는 고농도로 제제화될 수 있음을 나타낸다. 결과적으로, 본 발명의 항체는 제한된 주입 부피로 높은 몰 용량을 제공할 수 있기 때문에 안구 적용에 매우 적합하며, 높은 효능과 조합될 때 높은 내구성 및 결과적으로 감소된 투약 빈도를 발생시키고, 이는 환자 편의성 및 치료 순응성을 증가시키기에 바람직하다.

[0452] **실시예 10:**

[0453] **VEGF/IL6-이중특이적 항체 6HVL_4(HRMEC)에 의해 매개되는 IL6 억제를 입증하기 위한 1차 세포 기반 검정**

[0454] HRMEC에서의 IL-6 신호전달 활성을 측정하기 위해, HRMEC에서의 ICAM-1 표면 발현을 정량화하는 검정을 확립하였다. HRMEC를 등몰 농도(2 nM)의 인간 IL-6 및 인간 IL-6R의 조합물로 72시간 동안 자극하였다. ICAM-1 표면 발현은 유세포 분석으로 평가하였다. 6HVL_4의 억제 활성을 측정하기 위해, IL-6/IL-6R 혼합물을 세포에 적용하기 전에 증가하는 농도의 항체와 함께 사전-인큐베이션하였다.

[0455] **세포 배양:** HRMEC(카탈로그 번호 PEL-PB-CH-160-8511; PELOBiotech Gmbh; 바이에른, 독일)를 해동하고, 제조자의 권장 농도에서 내피 기본 배지(EBM)(카탈로그 번호 CC-3156; 론자; 바젤, 스위스) 및 5% 우태아 혈청(FBS), 히드로코르티손, 인간 섬유아세포 성장 인자 B, VEGF, R3-IGF-1(위치 3에서 Glu를 Arg으로 치환한 인슐린-유사 성장 인자-I의 재조합 유사체), 아스코르브산, 인간 표피 성장 인자, 및 GA-1000(모두 EGM-2 MV 미세혈관 내피 SingleQuotsTM 키트에 포함됨; 카탈로그 번호 CC-4147; 론자)를 포함하는 내피 성장 배지(EGM-MV)에서 175 cm2 플라스크 내에서 배양하였다. 플레이팅 24시간 후, 배지를 신선한 EGM-MV로 교체하고, 세포를 검정 전에 3일 더 성장시켰다. 검정 조건은 IL-6/가용성 IL-6R의 상이한 계대 수 및 농도에 걸쳐 최적화되었다. 계대 6에서의 HRMEC 및 2 nM 농도의 IL-6/가용성 IL-6R의 등몰 자극을 사용하여 최종 검정을 실시하였다.

[0456] **유세포 분석 검정:** HRMEC는 Ca2+ 및 Mg2+가 없는 인산염 완충 식염수(PBS)(카탈로그 번호 10010023; 라이프 테크놀로지스(Life Technologies))로 2회 세척하고, 세포 해리 시약 Accutase(카탈로그 번호 A1110501; 써모 피셔 사이언티픽; 월섬, 매사추세츠)로 1회 세척함으로써 플라스크로부터 분리하였다. 세척 후, 세포 해리 시약 5 mL를 세포에 첨가하고 플라스크를 5% CO2 인큐베이터 내 37° C에서 3분 동안 인큐베이션하였다. 분리된 세포를 플라스크로부터 수집하고 50-mL 원뿔형 원심분리 튜브에 넣었다. 상기 튜브를 2% FBS를 함유하는 EBM으로 50 mL까지 채우고, 300 g에서 6분 동안 원심분리하였다. 상청액을 버리고, 펠렛을 5 mL 기아 배지(2% FBS를 함유하는 EBM)에 재현탁시켰다. 세포 수는 TC20 자동화 세포 계수기(Bio-Rad; 허큘리스, 캘리포니아)를 사용하여 정량화하고 기아 배지를 사용하여 300,000 세포/mL로 조정하였다. 이어서, 100 µL의 세포 현탁액을 코스타(Costar) 96-웰 플레이트(카탈로그 번호 3596; Corning; 코닝, 뉴욕)의 각각의 웰에 첨가하여 30,000 세포/웰을 수득하였다. 이후, 플레이트를 37° C, 5% CO2 인큐베이터에서 추가 24시간 동안 인큐베이션하였다.

[0457] 재조합 인간 IL-6(카탈로그 번호 206-IL/CF; R&D Systems; 미니애폴리스, 미네소타) 및 재조합 인간 IL-6R(카탈로그 번호 227-SR-025; R&D Systems)을 동일한 몰 농도의 기아 배지에서 혼합하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하여 IL-6-I/L-6R 복합체를 형성하였다. 다음으로, 6HVL_4의 희석 시리즈(3배, 7점 희석) 50 L를 세포에 첨가하고 37° C, 5% CO2에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 마지막으로, 50 µL의 IL-6-I/L-6R 복합체를 세포에 첨가하여 IL-6 및 IL-6R에 대해 각각 2 nM 및 6HVL_4에 대해 200.009 nM의 최종 농도를 수득하였다. 자극되지 않은 세포 및 6HVL_4가 없는 IL-6-I/L-6R 복합체로 자극된 세포가 또한 각각 배경 ICAM-1 표면 발현 및 100% 반응 수준을 결정하기 위해 포함되었다. 세포를 37℃, 5% CO2 인큐베이터에서 72시간 동안 인큐베이션하였다.

[0458] ICAM-1 표면 발현 분석을 위해, 세포를 PBS(Ca^{2+},Mg^{2+}; 라이프 테크놀로지스)로 2회 세척하고, 세포 해리 시약 Accutase(카탈로그 No. A1110501; 써모 피셔 사이언티픽)로 1회 세척하였다. 세포를 50 µL의 세포 해리 시약(3분, 37° C)을 사용하여 플레이트로부터 분리하고, 유동 세포측정법 팔콘(Falcon) 96-웰 저장 플레이트(카탈로그 번호 353263; 코닝)로 옮겼다. 원래의 웰을 2% FBS 및 2 mM EDTA를 함유하는 100 µL PBS로 한 번 세척하고, 나머지 세포를 함유하는 세척 배지를 유세포 분석 플레이트에 첨가하였다. 세포를 300 g에서 6분 동안 원심분리하여 펠렛화하고, 상청액을 폐기하였다. 펠릿을 10 µg/mL 인간 IgG(카탈로그 No. I2511; MilliporeSigma; 버링턴; 매사추세츠)를 함유하는 100 µL PBS, 2% FBS, 2 mM EDTA에 재현탁하여 비특이적 결합 부위를 차단하고 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 차단 후, 0.5 µg의 플루오레세인 표지된 항-ICAM-1 항체(카탈로그 번호 BBA20; R&D Systems)를 세포에 첨가하고, 반응물을 28° C에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 염색 후, 세포를 300 g에서 6분 동안 원심분리하여 펠렛화하고, 펠렛을 2% FBS 및 2 mM EDTA를 함유하는 PBS 150 µL 중에 재현탁시켰다. 플루오레세인 형광은 Attune NxT 유세포 분석기(써모 피셔 사이언티픽)를 사용하여 측정하였다.

[0459] **데이터 분석:** 3가지 검정 모두에 대해, 모든 독립적인 실험의 각 조건은 4배수로 실시되었다. 각 실험에 대해서, 자극되지 않은 세포들의 배경 신호를 실험 웰의 것에서 빼고 조건 당 평균 신호를 계산하였다. 6HVL_4가 없는 IL-6/IL-6R로 자극한 세포로부터 100% 반응 수준을 계산한 후, 6HVL_4의 억제 가능성을 100% 반응의 억제 백분율로 표현하였다. 6HVL_4의 각 농도에 대한 억제율(%)을 3개의 독립적인 실험에서 측정하고, 평균과 SEM을 계산하였다. 3개의 독립적인 실험의 평균을 엑셀XLfit 소프트웨어 버전 5.5.0(IDBS; 영국 길드포드)를 사용하여 평균 IC50 및 SE를 계산하는데 사용하였다. 농도-응답 곡선은 5-매개변수 로지스틱 모델(A+((B-A)/(1+(((B-E)*((C/x)^D))/(E-A))))을 사용하여 비선형 회귀 분석에 의해 맞춤되었다.

[0460] **표 11: 6HVL_4에 의한 HRMEC의 표면 상에서의 IL-6-유도된 ICAM-1 발현의 % 억제 계산**

[0461]

농축	억제[%]	SEM[%]
20	97.60	1.48
6.667	97.77	1.46
2.222	80.01	17.29
0.741	6.76	5.77
0.247	-0.63	1.79
0.082	-1.25	2.86
0.027	-0.42	3.20

[0462] 6HVL_4는 1.52 +/- 0.04 nM의 50% 억제 농도(IC50)로 HRMEC에서 IL-6 신호전달의 용량 의존적 억제를 발생시켰다(**도 11**).

[0463] **실시예 11:**

[0464] **VEGF/IL6-이중특이적 항체 6HVL_4(HUVEC)에 의해 매개되는 VEGF 억제를 입증하기 위한 1차 세포 기반 검정**

[0465] **검정:**

[0466] HUVEC은 론자(Lonza)(카탈로그 No. 00191027; 스위스 바젤)로부터 입수하였다. 내피 성장 배지(EGM-2) 및 검정 배지(EBM-2, 0.5% 우태아혈청[FBS] 포함)를 함께 구성하는 내피 기본 배지(EBM-2; 카탈로그 번호 CC-3156) 및 EGM-2 내피 싱글쿼트(SingleQuots) 키트(카탈로그 번호 CC4176)를 론자(Lonza)로부터 구입하였다.

[0467] 부착 인자(AF)로 코팅된 T175 세포 배양 플라스크(카탈로그 번호 353112; 코닝(Corning); 코닝, 뉴욕)(카탈로그 번호 S-006-100; 깁코(Gibco), 써모 피셔 사이언티픽; 월섬, 매사추세츠)를 HUVEC를 유지하는데 사용하였다. StemProAccutase(카탈로그 No. A11105-01; 깁코)를 사용하여 세포를 분리하였다.

[0468] 세포 생존율/증식 검정은 알라마 블루(카탈로그 번호 DAL1100; 인비트로젠, 써모 피셔 사이언티픽)를 사용하여 96-웰 피브로넥틴-코팅된 플레이트(카탈로그 번호 354409; 코닝)에서 실시하였다.

[0469] 재조합 인간 VEGF-A를 R&D(카탈로그 번호 293-VE; 미네아폴리스, 미네소타)로부터 수득하고, 100 μg/mL의 스톡 농도에서 Ca^{2+} 및 Mg^{2+}가 없는 인산염-완충 염수(PBS)(카탈로그 번호 14190-094; 깁코)에 용해시켰다.

[0470] 알라마 블루는 세포 투과성 화합물 레자주린(Resazurin)을 함유한다. 상기 화합물은 건강한 세포 내의 환원 환경으로 인해 이의 색상이 변한다. 생성된 분홍색은 생존 세포의 비례 마커이며, 570 nm에서 흡광도를 측정함으로써 증식을 검출하는데 사용될 수 있다. VEGF-A는 세포 기아 조건에서 성장한 HUVEC의 증식을 유도한다. 따라서, VEGF-A 중화 항체 또는 Fab를 이용하여 VEGF-A에 의한 HUVEC 증식을 억제할 수 있다.

[0471] HUVEC는 계대 5까지 AF로 코팅된 T175 플라스크의 EGM-2에서 유지되었다. 생존력 검정을 위해, 아큐타제(Accutase)를 사용하여 HUVEC를 분리하고 검정 배지(EBM-2 0.5% FBS)에 1:1.66으로 희석하였다. 그런 다음, 세포를 원심분리하고 0.5% FBS를 함유하는 EBM-2에 100,000 세포/mL의 세포 밀도로 재현탁시켰다. 이후, 피브로넥틴이 코팅된 96웰 플레이트에 세포 현탁액 100 μL를 접종하여 10,000 세포/웰의 세포 밀도를 수득하였다. 외부 웰에 세포를 접종하지 않은 다음, 검정 배지로만 채웠다. 세포를 5% CO2 인큐베이터 내 37° C에서 밤새 인큐베이션하였다.

[0472] 다음 날, VEGF-A 스톡 용액(PBS 중 100,000 ng/mL(Ca2+, Mg2+))을 사용하여 검정 배지(EBM 0.5% FBS)에서 10배 작업 용액(750 ng/mL)을 제조하였다.

[0473] 6HVL_4 스톡 용액을 또한 검정 배지에 희석하여 10배 작업 용액을 제조하였다. 이를 사용하여 30,000 ng/mL에서 시작하여 14 ng/mL에서 끝나는 3배 8점 희석 시리즈를 제조하였다.

[0474] 이어서, 10개의 미리 희석된 6HVL_4 용액 12.5 μL 및 10개의 VEGF-A 용액(750 ng/mL) 12.5 μL를 각 플레이트에서 4중으로 세포에 순차적으로 첨가하였다. VEGF-A는 일정한 최종 농도(75 ng/mL)로 사용하였고, 6HVL_4는 3000 ng/mL 내지 1.4 ng/mL의 최종 농도 범위의 용량-반응 포맷으로 사용하였다. 세포를 37℃, 5% CO2에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 분석을 위해, 알라마 블루 12 μL를 각 웰에 첨가한 후 3시간 동안 세포 배양 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 흡광도는 Molecular Devices사의 FlexStation 3 플레이트 판독기를 사용하여 600

nm의 기준 파장으로 570 nm에서 측정되었다.

[0475] **데이터 분석:**

[0476] 각 실험에 대해, 각 조건은 4중으로 실시되었다. 총 4개의 독립적인 실험이 실시되었다. 동일한 날에 별도의 두 플레이트를 처리하는 것으로 독립적인 실험을 고려하였다. 따라서, 8개의 개별 플레이트를 분석에 사용하였다. 자극되지 않은 세포들의 배경 신호를 실험 웰의 것에서 빼고 조건 당 평균 신호를 계산하였다. 추가 화합물 노출 없이 VEGF-A(75 ng/mL)로 자극된 세포로부터 100% 반응 수준을 계산하였고, 6HVL_4-노출된 웰로부터 얻은 신호는 100% 반응의 백분율 억제로 표현하였다.

[0477] 엑셀XLfit 소프트웨어 버전 5.5.0(IDBS; 길퍼드, 영국)을 사용하여 각 항체 농도에 대한 평균 데이터로부터 IC50 값을 계산하였다. 농도-반응 곡선은 기본 및 최대 억제 활성에 대해 계산된 4개 매개변수 로지스틱 모델(A+((BA)/(1+((C/x)^D))))을 사용하여 비선형 회귀 분석에 의해 맞춤되었다. 데이터는 평균(SEM)의 표준 오차를 갖는 4개의 독립적인 실험으로부터 평균값으로 표시된다.

[0478] **표 12: 6HVL_4에 의한 VEGF-A 유도된 HUVEC 증식의 % 억제 계산**

농축	억제[%]	SEM[%]
62.4	87.8	5.3
20.8	87.8	6.5
6.9	90.9	5.3
2.3	58.4	8.5
0.77	6.6	6.3
0.26	7.1	3.1
0.09	7.0	2.0

[0479]

[0480] **6HVL_4**는 2.06 +/- 0.30 nM의 50% 억제 농도(IC50)로 VEGF-A 유도 HUVEC 증식을 감소시켰다(**도 12**).

[0481] **실시예 12:**

[0482] **VEGF-A 및 IL6 및 VEGF/IL6 이중특이적 항체 6HVL_4의 존재 하에 장벽 기능의 회복은 분자의 생물학적 활성을 나타낸다**

[0483] 본 발명의 항체의 이중 생물학적 활성, 즉 표적화된 사이토카인 - VEGF-A 및 IL6(IL6R과의 복합체) 둘 모두의 동시 차단을 평가하기 위해, 트랜스-내피 세포 내성(TER) 검정을 실시하였다. 상기 검정에서, 전기적으로 타이트한 내피 세포층은 장벽 기능의 손실에 의해 VEGF-A 및 IL6 첨가 둘 모두에 반응한다. VEGF/IL6 이중특이적 항체 6HVL_4에 의한 사이토카인, VEGF 및 IL6 모두의 존재 하에서의 장벽 기능의 회복을 하기와 같이 평가하였다:

[0484] **검정:**

[0485] HRMVECs(PELOBiotech; Cat# PEL-PB-CH-160-8511)로 추가로 명명된 인간 망막 미세혈관 내피세포를 부착 인자(Ginco, Cat# S-006-100)로 코팅된 T175 플라스크(Falcon Cat# 353112)에서 완전한 Mv-내피 세포 성장 배지(MV-EGM-2 Lonza, Cat# CC-3202)에서 계대 5까지 유지시켰다. 트랜스 내피 세포 내성 검정을 위해, 세포를 StemPro®Accutase®(깁코, Cat#A11105-01)로 분리하였다. 이 후, 세포를 100 µl의 MV-EGM-2 성장 배지에 120.000 세포/웰의 세포 밀도로 피브로넥틴이 코팅된(Cat# 354008, Corning) 트랜스웰 필터(24웰 코닝, Cat# 3470)의 상부 챔버에 접종하였다. 트랜스웰 필터의 하부 챔버를 600 µl의 MV-EGM-2 배지로 충전하였다. 세포를 5% CO2와 함께 37° C에서 3일 동안 인큐베이션하였다. 이 후, 배지를 검정 조건(2% FBS를 함유하는 VEGF가 없는 MV-EGM-2)으로 변화시키고, 트랜스웰 필터를 상부 챔버에 대해 280 µl 배지 및 하부 구획에 대해 810 µl를 사용하여 셀즈코프(cellZcope) 시스템으로 옮겼다. 그런 다음 세포를 5% CO_2와 함께 37° C에서 24시간 동안 인큐베이션하는 동안 TER을 셀즈코프로 측정하였다. 다음 날 세포를 100 ng/ml IL6R(R&D Systems, Cat# 227-SR-025/CF) 및 10 ng/ml VEGF와 조합된 10 ng/ml VEGF(R&D Systems, Cat# 293-VE/CF), 50 ng/ml IL6(R&D Systems, Cat# 206-IL/CF)의 최종 농도로 또는 동일한 양의 검정 배지(조건당 8배)로 처리하고, TER을 다음 날까지 측정하였다. 이 후, 최종 농도가 각각 1 µg/ml, 각각 2.3 µg/ml의 최종 농도로 6HVL_4 또는 아플리버셉

트 또는 분석 배지를 세포에 첨가하고, 이어서 다음 24시간 동안 TER을 측정하였다. 따라서 각 조건은 네 번 존재한다.

[0486] **데이터 분석:**

[0487] 하나의 웰에 대해 생성된 데이터 세트는 사이토카인 혼합물을 첨가하기 직전에 수득한 TER 값으로 정규화되었다. 각각의 조건에 대해, 평균 신호 및 표준 편차는 정규화된 데이터로부터 계산되었다.

[0488] **결과:**

[0489] 결과를 **도 12**(6HVL_4) 및 **도 13**(아플리버셉트)에 나타낸다.

[0490] HRMVEC의 장벽 기능은 사이토카인 VEGF 단독뿐만 아니라 IL6/IL6R과의 조합에 의해 감소된다. 항체 6HVL_4로 파괴된 장벽을 24시간 후에 100%로 회수하였다.

[0491] **실시예 13:**

[0492] **IL6 파라토프 영역의 확인**

[0493] IL6과 접촉하는 아미노산 잔기는 6HVL4.1과 IL6 사이의 복합체의 결정 구조로부터 확인되었다. VH 및 VL 도메인 내의 파라토프 아미노산 잔기의 위치에 대한 예시가 **도 15**에 도시되어 있다. 이를 위해, PyMOL의 "byres" 함수와 5 옹스트롬의 컷-오프 거리를 사용하여 Fab/IL6 복합체에서 IL6와 상호작용할 가능성이 있는 잔기를 확인하였다. 여기서, 본 발명자들은 분석을 IL6의 잔기 48-215(유니프로트 ID P05231에 정의된 바와 같음)로 제한하였으며, 이 잔기는 IL6 단독의 구조(pdb 수탁 번호 1alu 및 1IL6을 참조)에서 일반적으로 분해되는 것으로 밝혀졌다. **도 15**에서는, 또한 6HVL4.1과 본 발명의 항체에 기초한 단일특이적 항-IL6 항체인 6HdL2.05 사이의 정렬이 도시되어 있으며, 여기서 VEGF-파라토프는 비-결합 영역으로 대체된다. 6HdL2.05는 서열번호 48의 VH 서열 및 서열번호 47의 VL 도메인을 갖는다. 실시예 2에 기재된 바와 같이 발현 및 정제하고, 실시예 3과 유사하게 실시한 인간 IL6 또는 시노몰구스 원숭이 IL6을 사용하여 SPR 검정을 실시한 경우, 항체는 **도 20**에 도시된 바와 같은 SPR 센서그램을 나타내었다. 실험 데이터를 맞춤한 후, 6HdL2.05는 인간 IL6과 22 pM의 맞춤된 KD 및 시노몰구스 원숭이 IL6과 1.3 nM의 맞춤된 KD로, VEGF/IL6 이중특이적 항체의 상응하는 6HVL 시리즈에 대해 수득된 가장 높은 친화도에 필적하는 친화도를 나타내었다(**표 3** 및 **표 4**를 참조).

[0494] 항원 결합에 기여하는 것으로 확인된 아미노산 잔기는 **표 13**(가변 중쇄 도메인 아미노산 잔기의 경우) 및 **표 14**(가변 경쇄 도메인 아미노산 잔기의 경우)에서 확인된다. 아미노산 위치는 카바트 넘버링 체계에 따라 넘버링된다(동일한 넘버링이 **도 1+5**에서 사용됨). 항원 결합에 관여하는 아미노산 위치는 VH 또는 VL 도메인에서 카바트 위치에 의해 식별된다.

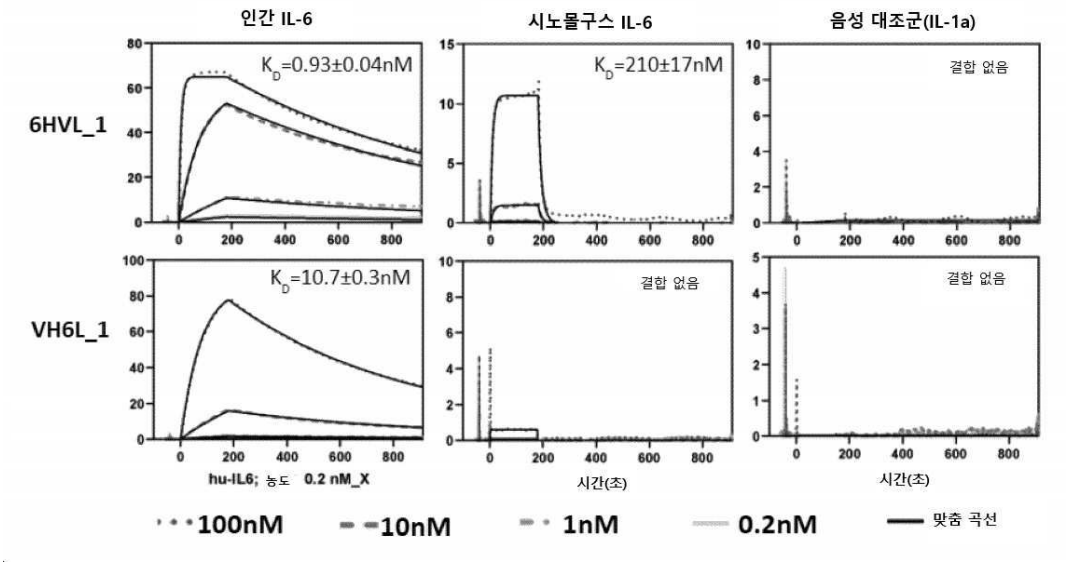
[0495] **표 13:** 결정 구조 분석에 의해 확인된 바와 같이 IL6 결합에 관여하는 가변 도메인 아미노산 잔기, 동일한 카바트 위치의 아미노산 잔기가 6HdL2.05에 대해 제시된다.

[0496]

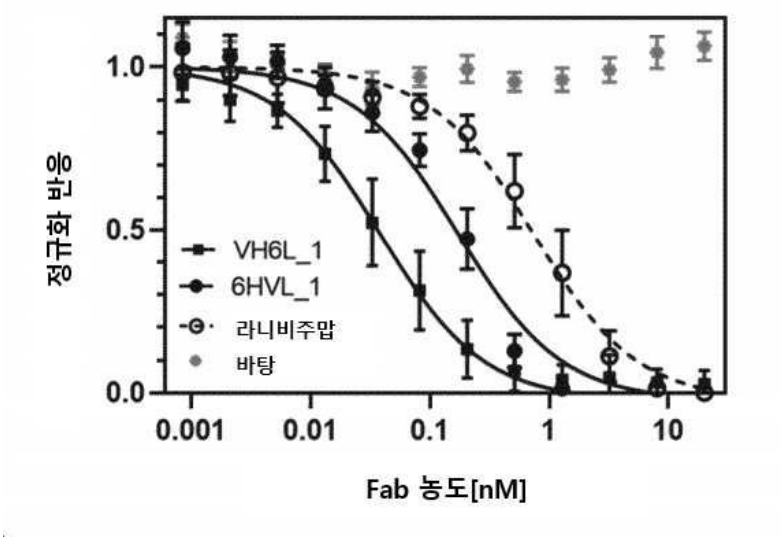
도메인	6HVL4.1	6HdL2.05
VH	Y1, I2, Q3, Y26, E27, F28, T29, H30, Q31, D32, P52a, R94, I96, D97, F98, D101, T102	Y1, P2, Q3, V26, L27, F28, K29, H30, Q31, D32, P52a, R94, L96, D97, F98, D101, E102
VL	Y49, D50, S53, N54, Y55, P56, S57, Y91, Y96	Y49, D50, D53, R54, Y55, P56, E57, Y91, Y96

도면

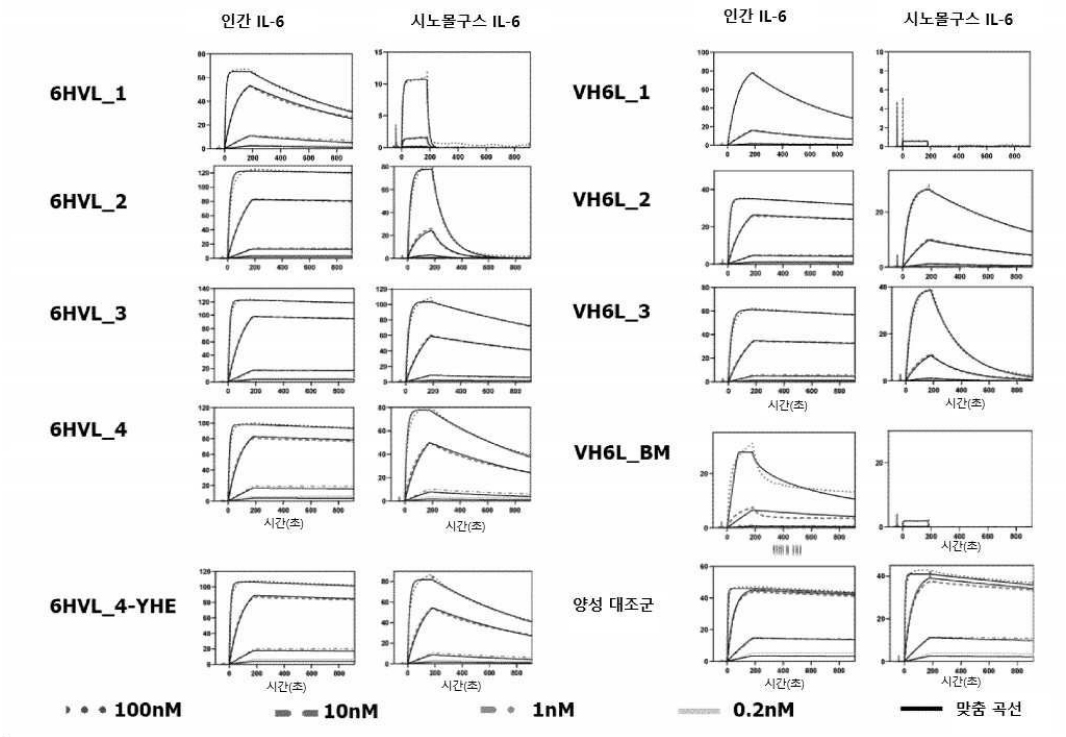
도면1


인간 IL-6
시노몰구스 IL-6
음성 대조군(IL-1a)
6HVL_1
VH6L_1
K_D=0.93±0.04nM
K_D=210±17nM
결합 없음
K_D=10.7±0.3nM
결합 없음
결합 없음
hu-IL6; 농도 0.2 nM_X
시간(초)
시간(초)
100nM
10nM
1nM
0.2nM
맞춤 곡선

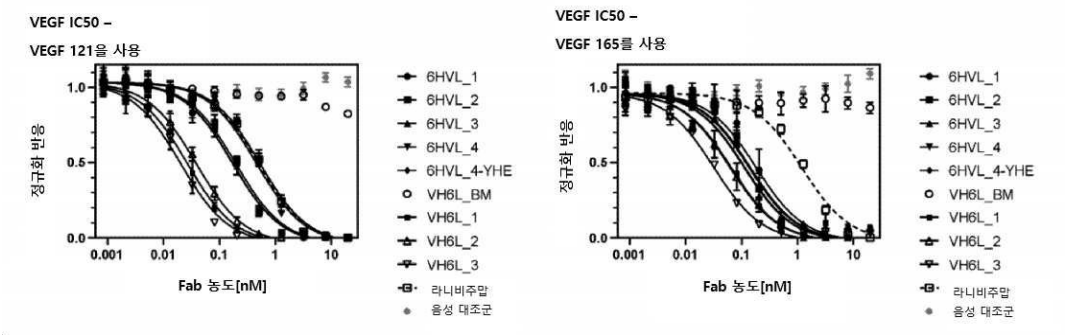
도면2


정규화 반응
1.0
0.5
0.0
VH6L_1
6HVL_1
라니비주맙
바탕
0.001
0.01
0.1
1
10
Fab 농도[nM]

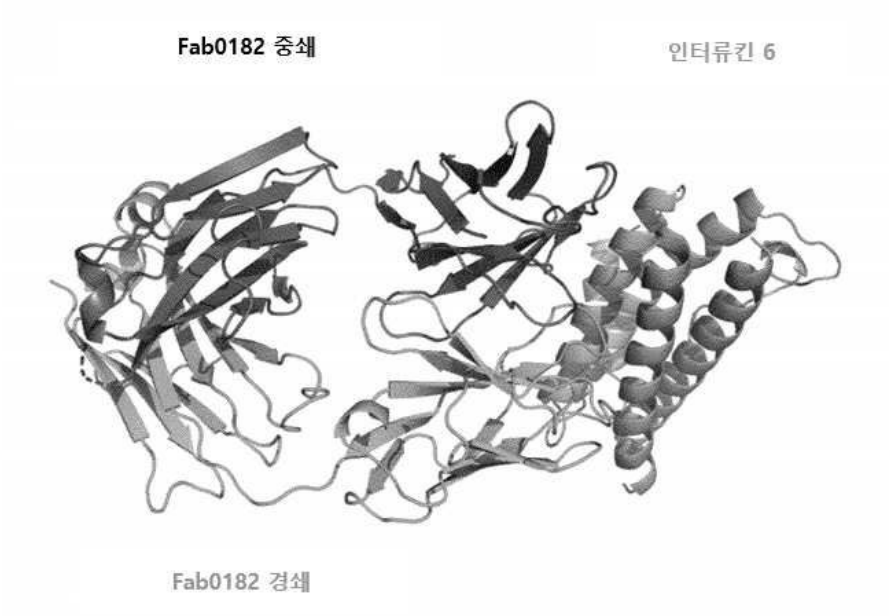
도면3


인간 IL-6
시노몰구스 IL-6
6HVL_1
6HVL_2
6HVL_3
6HVL_4
6HVL_4-YHE
VH6L_1
VH6L_2
VH6L_3
VH6L_BM
양성 대조군
시간(초)
100nM
10nM
1nM
0.2nM
맞춤 곡선

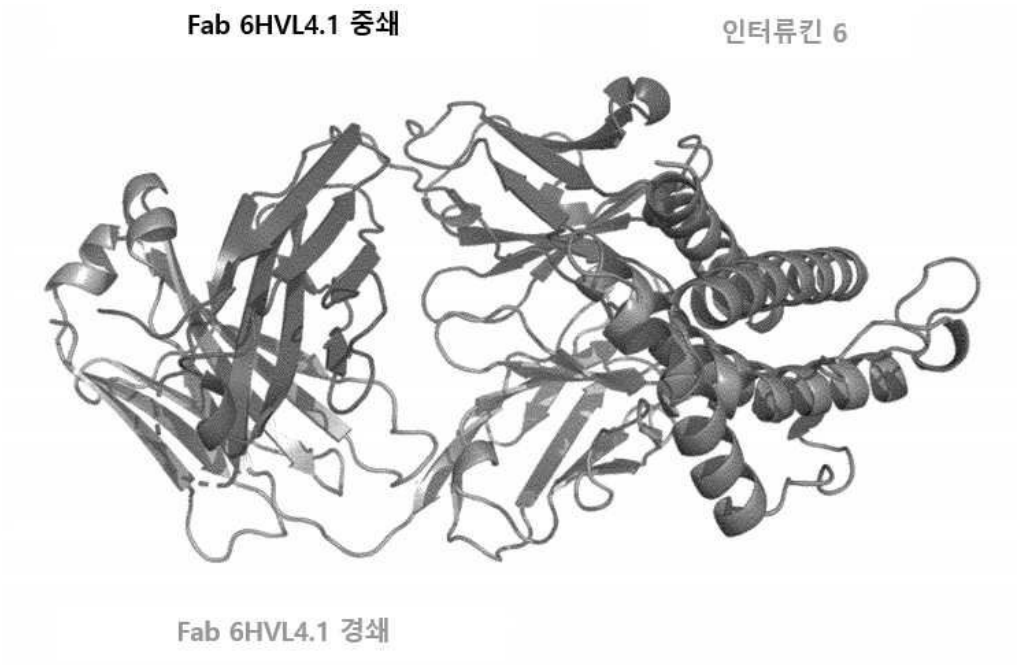
도면4


VEGF IC50 –
VEGF 121을 사용
정규화 반응
Fab 농도[nM]
VEGF IC50 –
VEGF 165를 사용
6HVL_1
6HVL_2
6HVL_3
6HVL_4
6HVL_4-YHE
VH6L_BM
VH6L_1
VH6L_2
VH6L_3
라니비주맙
음성 대조군

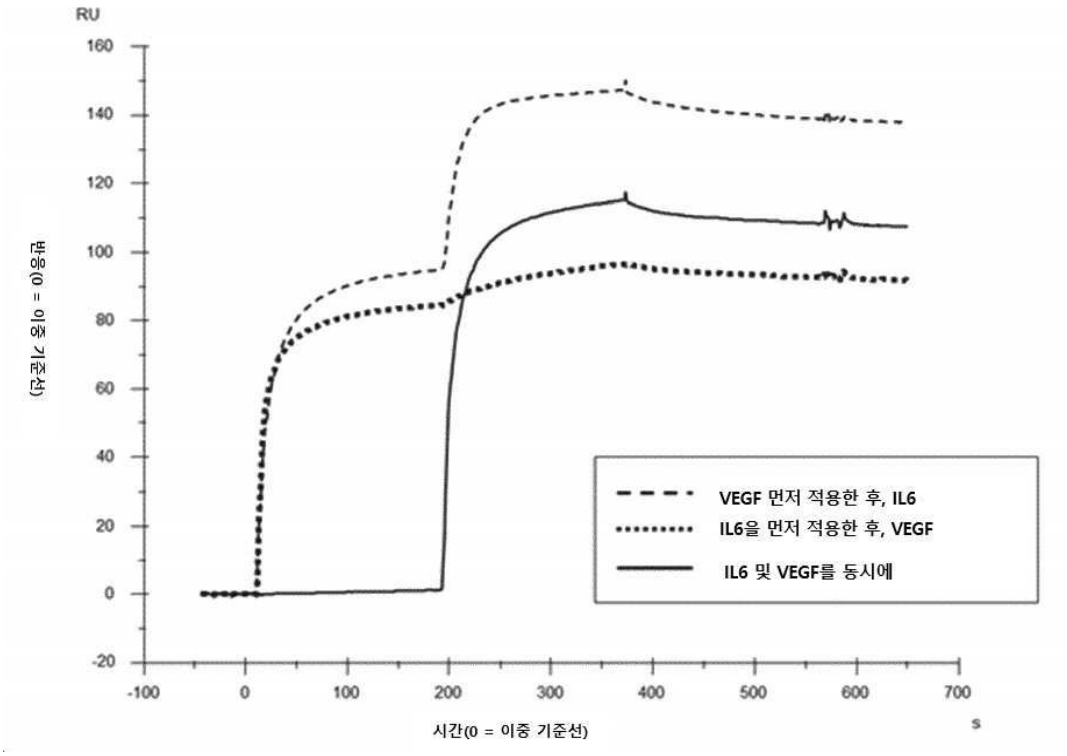
도면5


Fab0182 중쇄
인터류킨 6
Fab0182 경쇄

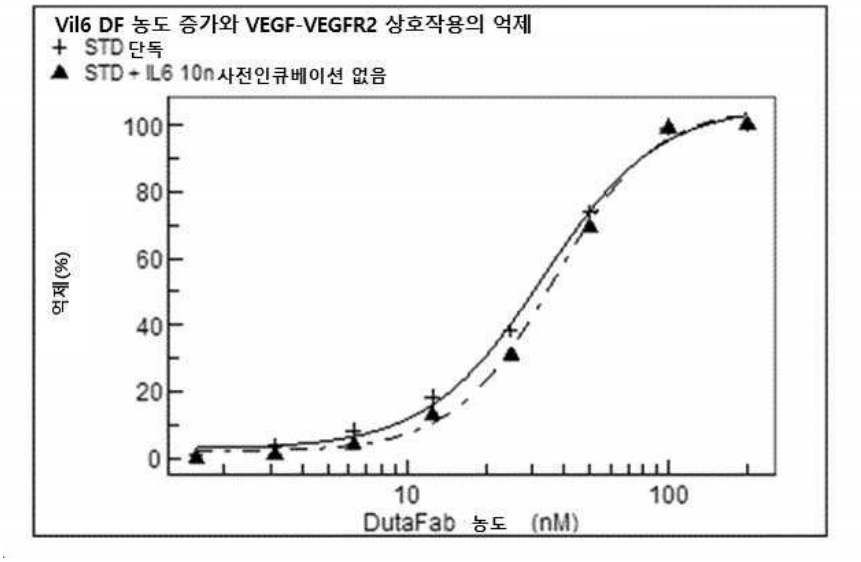
도면6


Fab 6HVL4.1 중쇄
인터류킨 6
Fab 6HVL4.1 경쇄

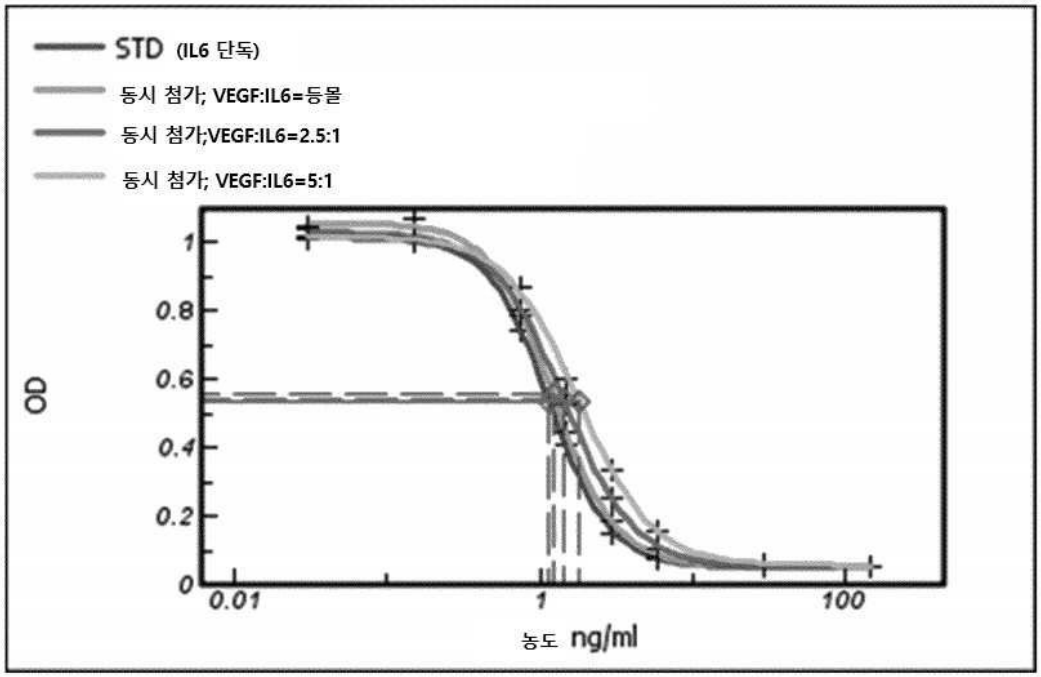
도면7


RU
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
반응(0 = 이중 기준선)
-100
0
100
200
300
400
500
600
700
s
시간(0 = 이중 기준선)
VEGF 먼저 적용한 후, IL6
IL6을 먼저 적용한 후, VEGF
IL6 및 VEGF를 동시에

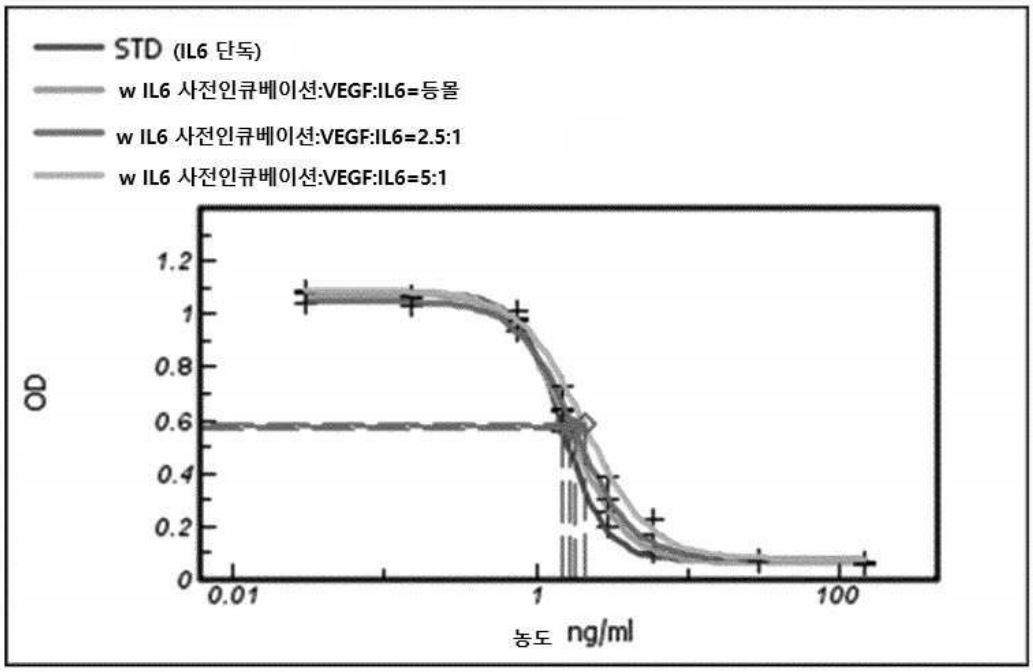
도면8


Vil6 DF 농도 증가와 VEGF-VEGFR2 상호작용의 억제
STD 단독
STD + IL6 10n 사전인큐베이션 없음
100
80
60
40
20
0
억제(%)
10
100
DutaFab 농도 (nM)

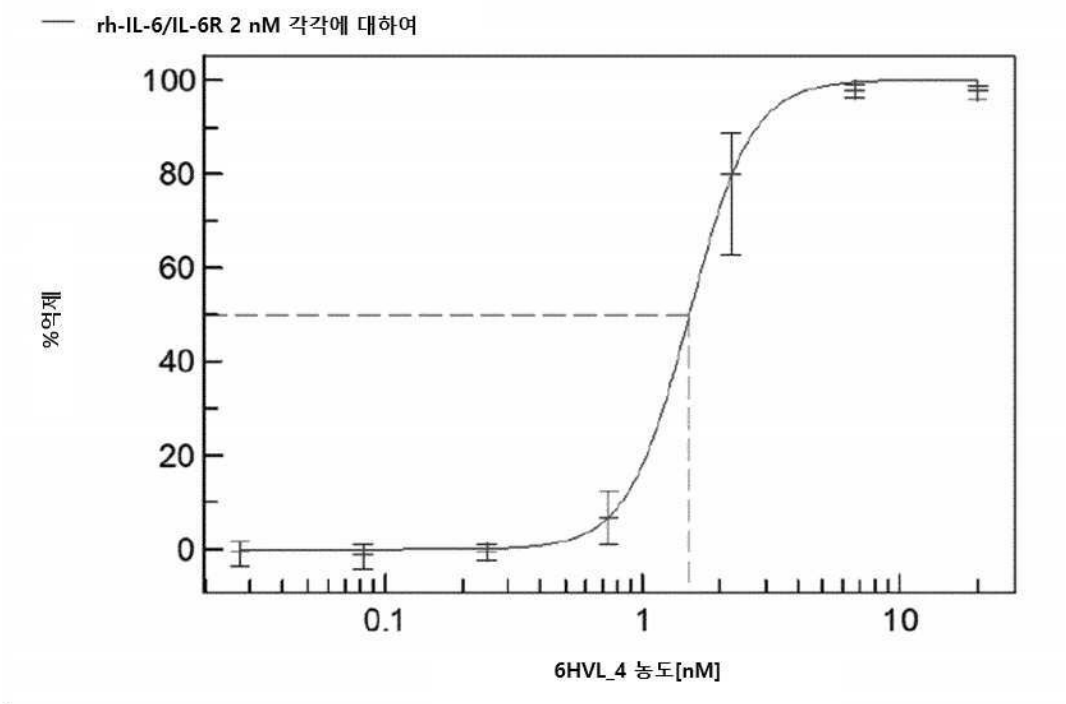
도면9


STD (IL6 단독)
동시 첨가; VEGF:IL6=등몰
동시 첨가;VEGF:IL6=2.5:1
동시 첨가; VEGF:IL6=5:1
OD
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.01
1
100
농도 ng/ml

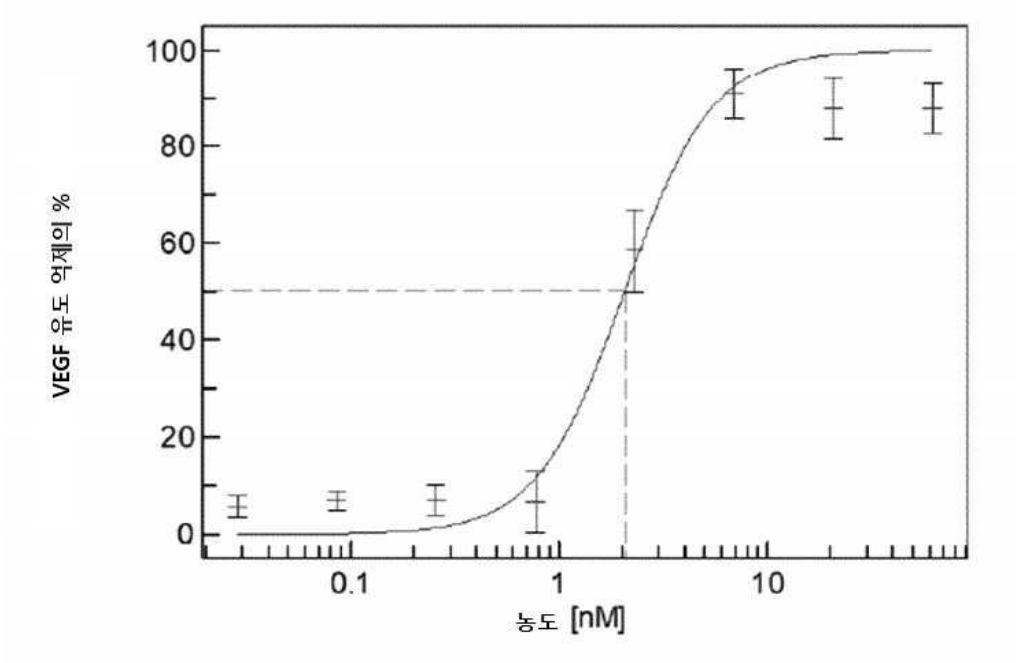
도면10


STD (IL6 단독)
w IL6 사전인큐베이션:VEGF:IL6=등몰
w IL6 사전인큐베이션:VEGF:IL6=2.5:1
w IL6 사전인큐베이션:VEGF:IL6=5:1
OD
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.01
1
100
농도 ng/ml

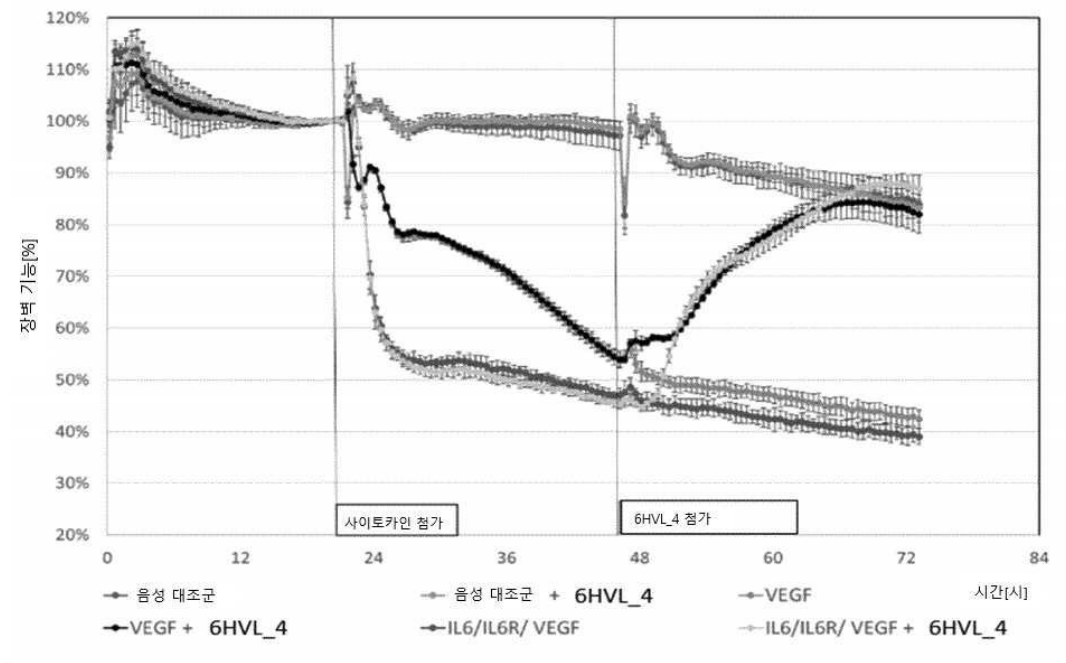
도면11


rh-IL-6/IL-6R 2 nM 각각에 대하여
%억제
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
6HVL_4 농도[nM]

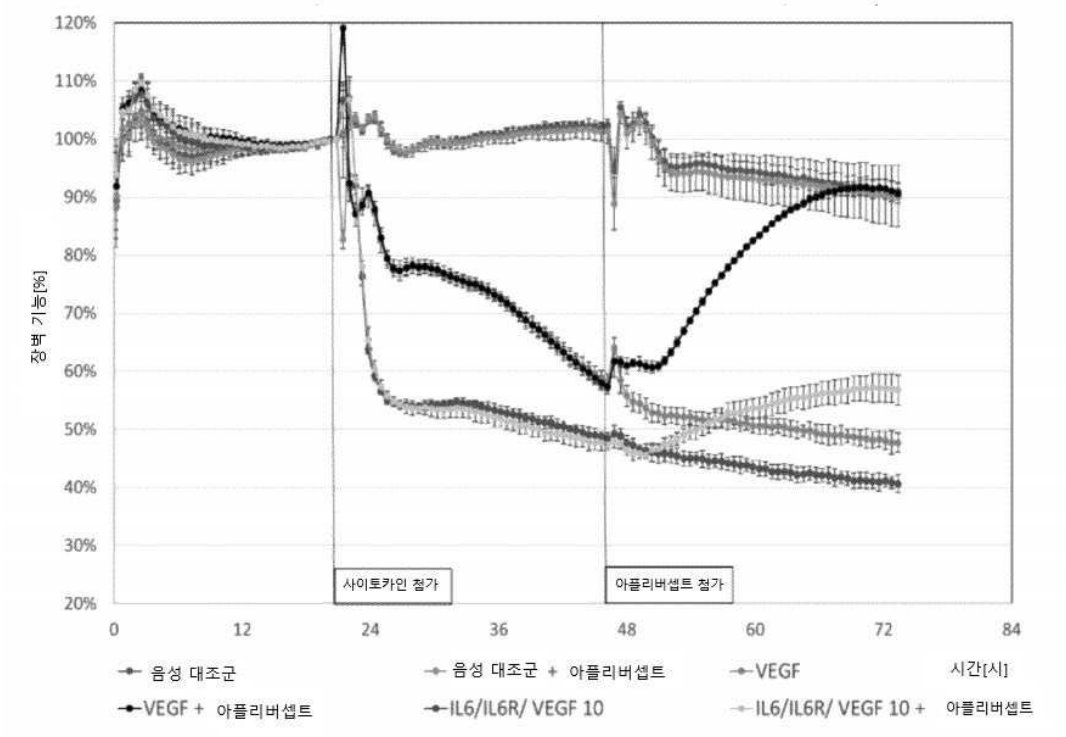
도면12


VEGF 유도 억제의 %
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
농도 [nM]

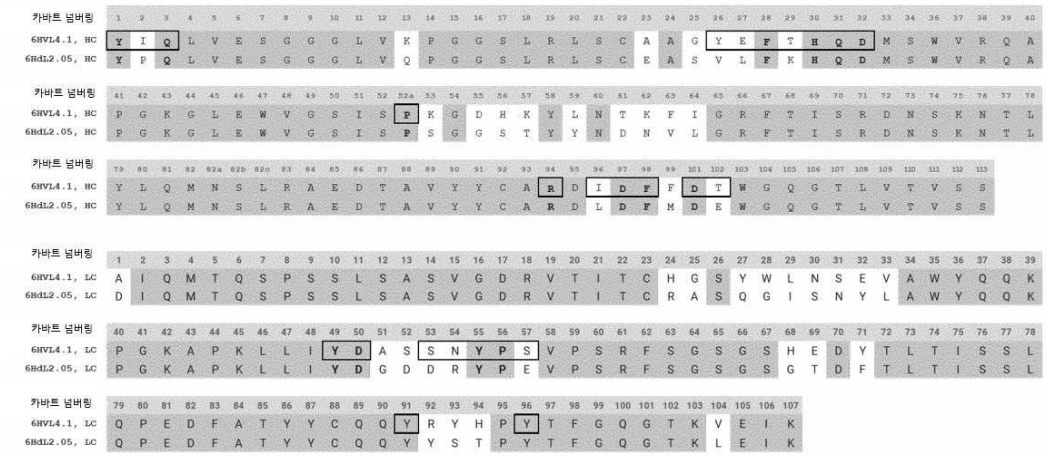
도면13


120%
110%
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
장벽 기능[%]
0
12
24
36
48
60
72
84
사이토카인 첨가
6HVL_4 첨가
음성 대조군
음성 대조군 + 6HVL_4
VEGF
VEGF + 6HVL_4
IL6/IL6R/ VEGF
IL6/IL6R/ VEGF + 6HVL_4
시간[시]

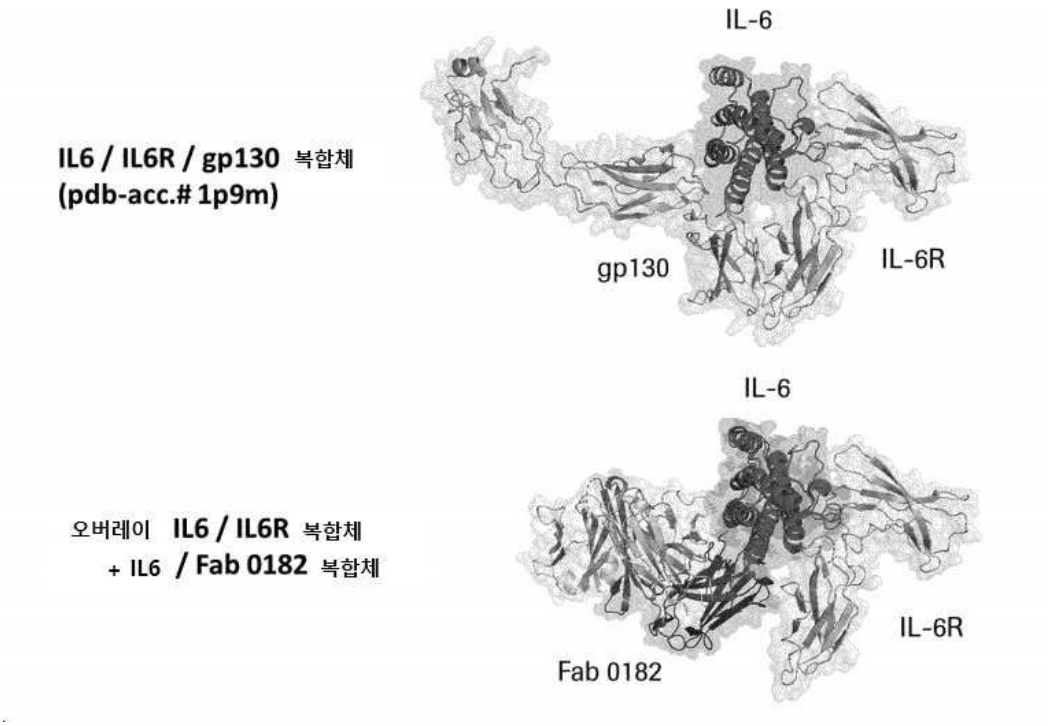
도면14


120%
110%
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
장벽 기능[%]
0
12
24
36
48
60
72
84
사이토카인 첨가
아플리버셉트 첨가
음성 대조군
음성 대조군 + 아플리버셉트
VEGF
VEGF + 아플리버셉트
IL6/IL6R/ VEGF 10
IL6/IL6R/ VEGF 10 + 아플리버셉트
시간[시]

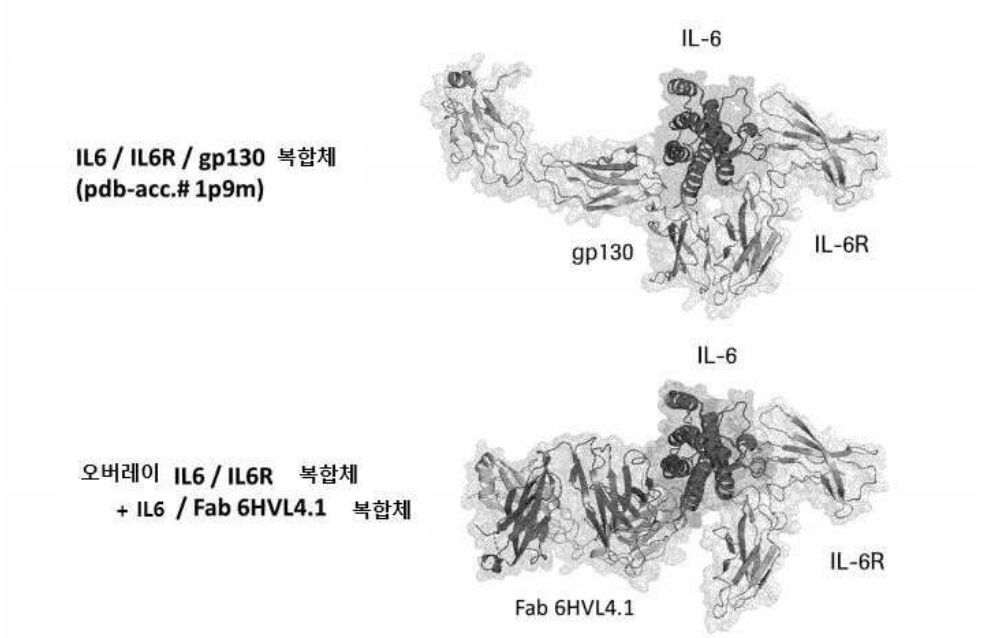
도면15


카바트 넘버링
6HVL4.1, HC
6HdL2.05, HC
카바트 넘버링
6HVL4.1, HC
6HdL2.05, HC
카바트 넘버링
6HVL4.1, HC
6HdL2.05, HC
카바트 넘버링
6HVL4.1, LC
6HdL2.05, LC
카바트 넘버링
6HVL4.1, LC
6HdL2.05, LC
카바트 넘버링
6HVL4.1, LC
6HdL2.05, LC

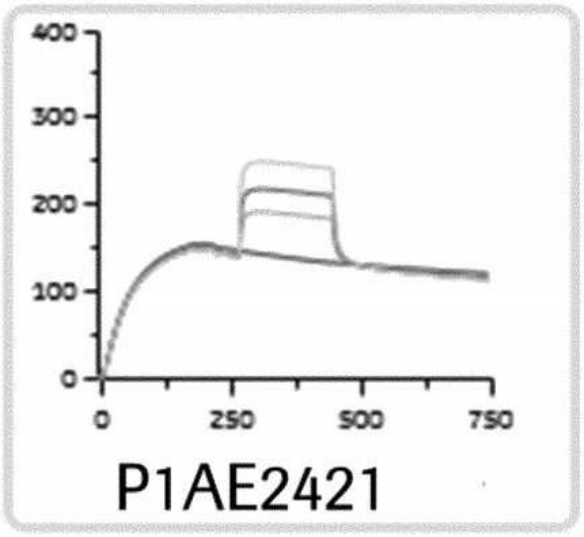
도면16


IL6 / IL6R / gp130 복합체
(pdb-acc.# 1p9m)
IL-6
gp130
IL-6R
오버레이 IL6 / IL6R 복합체
+ IL6 / Fab 0182 복합체
IL-6
IL-6R
Fab 0182

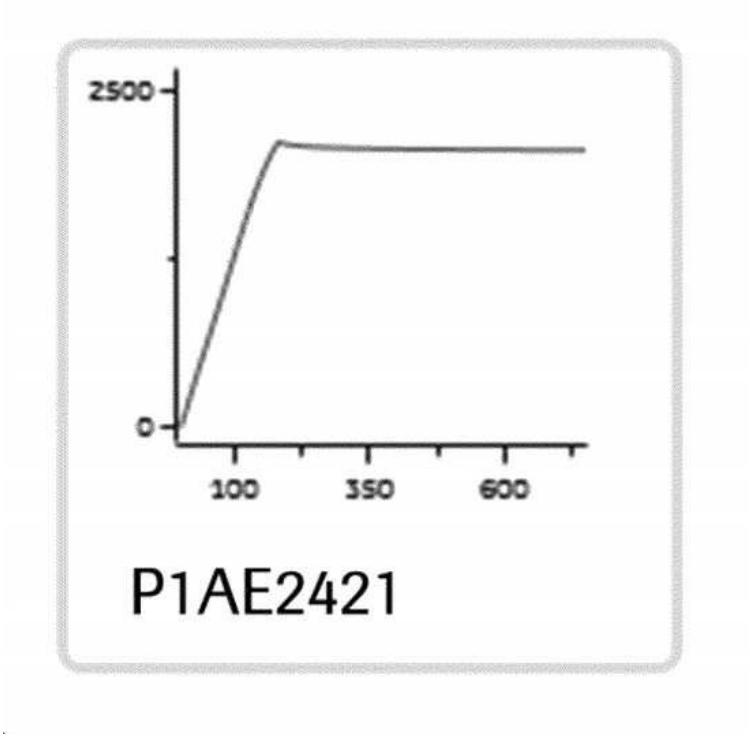
도면17


IL6 / IL6R / gp130 복합체
(pdb-acc.# 1p9m)
IL-6
gp130
IL-6R
오버레이 IL6 / IL6R 복합체
+ IL6 / Fab 6HVL4.1 복합체
IL-6
IL-6R
Fab 6HVL4.1

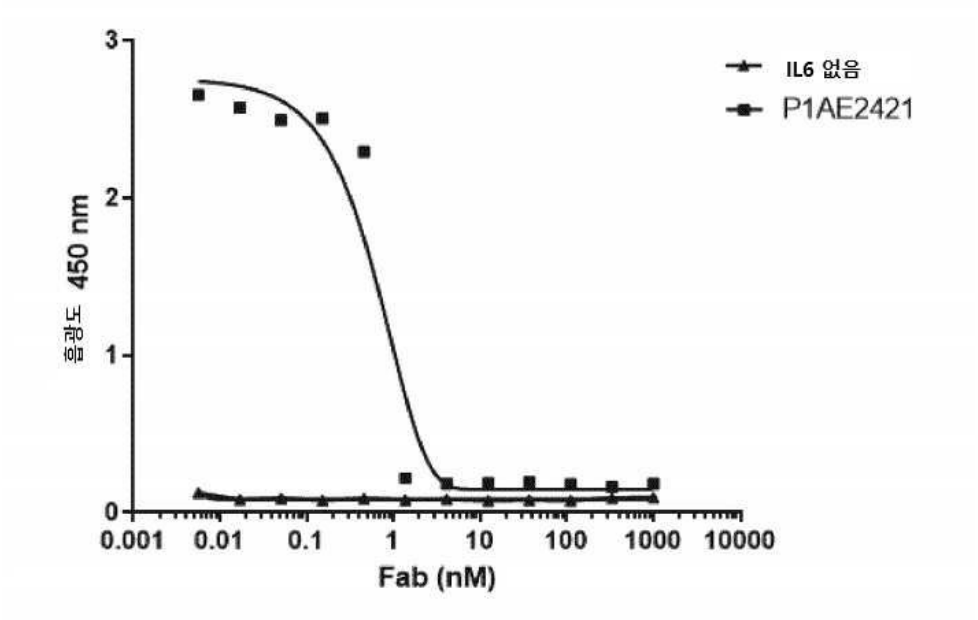
도면18


400
300
200
100
0
0
250
500
750
P1AE2421

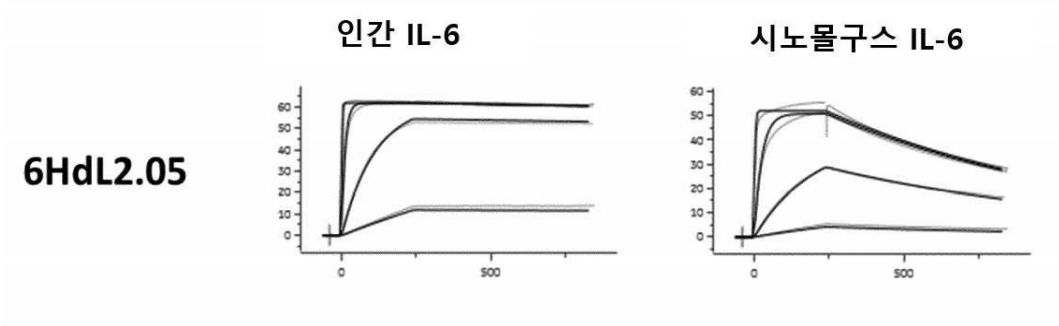
도면19


2500
0
100
350
600
P1AE2421

도면20


IL6 없음
P1AE2421
흡광도 450 nm
3
2
1
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
Fab (nM)

도면21



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.