



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0161653
(43) 공개일자 2024년11월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01) C07K 16/24 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2866 (2013.01)
A61P 37/08 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2024-7031303
(22) 출원일자(국제) 2023년02월23일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년09월20일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2023/077870
(87) 국제공개번호 WO 2023/160610
국제공개일자 2023년08월31일
(30) 우선권주장
63/313,483 2022년02월24일 미국(US)

(71) 출원인
시노탑 바이오사이언스 리미티드
중국, 홍콩 999077, 뉴 테리토리스, 팍 셸 콕, 홍콩 사이언스 파크, 넘버15 사이언스 파크 웨스트 애비뉴, 유나이츠 303 앤드 305-307
(72) 발명자
송, 난
중국 홍콩 홍콩 에스에이알 피알씨 뉴 테리토리스 팍 셸 콕 홍콩 사이언스 파크 넘버15 사이언스 파크 웨스트 애비뉴 유나이츠 303 앤드 305-307
람, 릭 함
중국 홍콩 홍콩 에스에이알 피알씨 뉴 테리토리스 팍 셸 콕 홍콩 사이언스 파크 넘버15 사이언스 파크 웨스트 애비뉴 유나이츠 303 앤드 305-307
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김정훈

전체 청구항 수 : 총 22 항

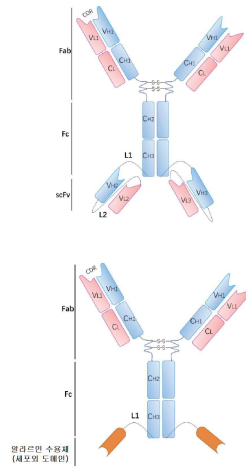
(54) 발명의 명칭 알라르민에 대한 이중 특이적 결합 단백질 및 이의 용도

(57) 요약

본원에는 중증도에서 중증 천식 및 아토피성 피부염과 같은 알레르기 질환을 치료하는 방법, 경구-코르티코스테로이드 사용의 1일 투여량을 감소시키는 방법, 선천성 림프 세포의 증식을 억제하는 방법, 2개의 상이한 알라르민을 중화할 수 있는 특정 이중 특이적 결합 단백질(bsBp)로 1형 및 2형 면역 반응을 손상시키는 방법이 제공된다. 예시적인 bsBp, 이의 특성, 및 추가적인 치료적 bsBp를 스크리닝하는 방법 또한 본원에 설명되어 있다.

대표도 - 도10a

이중 특이적 결합 단백질(이중 특이적 항체 및 항체-수용체 융합 단백질)의 설계



(52) CPC특허분류

C07K 16/244 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)

(72) 발명자

후이, 쉰 와이

중국 홍콩 홍콩 에스에이알 피알씨 뉴 테리토리스
팍 쉼 콕 홍콩 사이언스 파크 넘버15 사이언스 파
크 웨스트 애비뉴 유나이츠 303 앤드 305-307

리, 웨이민

중국 홍콩 홍콩 에스에이알 피알씨 뉴 테리토리스
팍 쉼 콕 홍콩 사이언스 파크 넘버15 사이언스 파
크 웨스트 애비뉴 유나이츠 303 앤드 305-307

룽, 슈이 온

중국 홍콩 홍콩 에스에이알 피알씨 뉴 테리토리스
팍 쉼 콕 홍콩 사이언스 파크 넘버15 사이언스 파
크 웨스트 애비뉴 유나이츠 303 앤드 305-307

명세서

청구범위

청구항 1

알레르기와 관련된 질환 또는 장애를 알레르기와 관련된 질환 또는 장애 치료를 필요로 하는 대상체에서 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 2개의 상이한 알라르민 X 및 Y에 대한 이중 특이적 결합 단백질의 치료학적 유효량을 대상체의 세포 또는 조직에 전달하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 이중 특이적 결합 단백질은 (a) 항알라르민 X 수용체 IgG 및 (b) 항알라르민 Y scFv 및 (c) 폴리펩타이드 링커로 이루어진, 방법.

청구항 2

알레르기와 관련된 질환 또는 장애를 알레르기와 관련된 질환 또는 장애 치료를 필요로 하는 대상체에서 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 2개의 상이한 알라르민 X 및 Y에 대한 이중 특이적 결합 단백질의 치료학적 유효량을 대상체의 세포 또는 조직에 전달하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 이중 특이적 결합 단백질은 (a) 항알라르민 X 수용체 IgG 및 (b) 알라르민 Y 수용체 및 (c) 폴리펩타이드 링커로 이루어진, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 알라르민 X 수용체는 IL-17RB인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 알라르민 Y는 TSLP인, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 알라르민 Y는 IL-33인, 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 알라르민 Y 수용체는 ST2인, 방법.

청구항 7

제2항에 있어서, 상기 알라르민 Y 수용체는 TSLPR인, 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항알라르민 X 수용체 IgG는 IgG1 항체, IgG2 항체, IgG3 항체, 및 IgG4 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 항체인, 방법.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 대상체는 임상 또는 전임상 천식, 아토피성 피부염, 섬유화 질환, 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease: IBD), 크론병(Crohn's disease), 궤양성 대장염, 만성 폐쇄성 폐질환, 만성 부비동염, 비용종을 동반한 만성 비부비동염(chronic rhinosinusitis with nasal polyps)을 앓고 있는, 방법.

청구항 10

알레르기와 관련된 질환 또는 장애를 알레르기와 관련된 질환 또는 장애 치료를 필요로 하는 대상체에서 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 (a) IL-25 및 IL-33 신호전달 및/또는 (b) IL-25 및 TSLP 신호전달을 차단하는 이중 특이적 결합 단백질의 치료학적 유효량을 대상체의 세포 또는 조직에게 전달하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 대상체는 임상 또는 전임상 천식, 아토피성 피부염, 섬유화 질환, 염증성 장 질환(IBD), 크론병, 궤양성 대장염, 만성 폐쇄성 폐질환, 만성 부비동염, 비용종을 동반한 만성 비부비동염을 앓고

있는, 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 이중 특이성 결합 단백질은 항-IL-17RB/항-인간 TSLP 이중 특이적 항체인, 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 이중 특이적 결합 단백질은 항-IL-17RB/항-인간 IL-33 이중 특이적 항체인, 방법.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 이중 특이적 결합 단백질은 항-IL-17RB/인간 ST2 항체-수용체 융합 단백질인, 방법.

청구항 15

제10항에 있어서, 상기 이중 특이적 결합 단백질은 항-IL-17RB/인간 TSLPR 항체-수용체 융합 단백질인, 방법.

청구항 16

제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중 특이적 결합 단백질은 각각 서열 번호: 3, 서열 번호: 4, 및 서열 번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL); 및 각각 서열 번호: 1, 서열 번호: 2, 및 서열 번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 항-IL-17RB 항체의 VL 및 VH는 각각 서열 번호: 33 및 서열 번호: 32의 아미노산 서열을 갖는, 방법.

청구항 18

제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중 특이적 결합 단백질은 서열 번호: 33의 경쇄 서열 및 서열 번호: 60 내지 75로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중 특이적 결합 단백질은 상기 세포 또는 조직에 정맥내, 근육내, 피하, 두개내, 척수강내, 뇌실내, 복강내, 비강내, 비경구, 국소, 또는 피내로 전달되는, 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중 특이적 결합 단백질은 제2 치료제와 조합하여 전달되는, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 제2 치료제는 코르티코스테로이드, DNA 메틸트랜스퍼라제(DNMT) 억제제, 항-IL17A 항체, 항-IL12/IL23 항체, 항-IL23 항체, 항-IL17RA 항체, 및 티로신 키나제 억제제로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 인간 대상체이고, 상기 대상체의 세포 또는 조직은 상기 대상체로부터 얻어 분리된 면역 세포인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

1. 발명의 분야:

[0001]

[0002] 본 발명은 분자 생물학 및 알레르기 질환, 특히 중등도에서 중증의 천식 및 아토피성 피부염과 같은 다양한 알레르기 질환의 치료를 위한 알라르민 수용체 결합 면역글로불린 G 항체(IgG) 및 알라르민 결합 단백질을 포함하는 이중 특이적 항체의 식별 및 용도에 관한 것이다.

[0003] **2. 우선권:**

[0004] 본 출원은 2022년 2월 24일에 출원된 미국 가출원 제63/313,483호에 대한 우선권을 주장하며, 그 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0005] **3. 서열 목록:**

[0006] 본 출원은 2023년 2월 14일에 작성된 "SBL009PCTSL.xml"이라는 제목의 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 93,089 바이트 크기의 서열 목록을 포함하며, 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

배 경 기 술

[0007] **4. 발명의 배경:**

[0008] 알라르민은 탈과립화, 세포 손상 또는 사멸의 결과로서 방출되거나 면역 유도에 대한 반응으로서 방출되는 내인성의 항상적으로 발현되는, 화학주성(chemotactic) 및 면역 활성화 단백질/펩타이드이다.

[0009] 특히, "알라르민" 흉선 기질 림프포이에틴(thymic stromal lymphopoietin: TSLP), 인터루킨-33(IL-33) 및 인터루킨-25(IL-25)는 알레르겐에 반응하여 장벽 조직(예를 들어: 기도 상피)으로부터 방출된다. 이러한 알라르민은 2형 선천성 림프 세포(ILC2) 및 Th2 세포의 활성화를 통해 Th2 면역 반응을 시작하여 L-4, IL-5, IL-13 및 IgE의 방출과 같은 일련의 사건을 일으키고 다양한 알레르기 반응이 나타나는 업스트림 요소 역할을 한다. 이러한 알라르민과 사이토카인 중 임의의 하나를 표적으로 하는 생물학적 제제는 천식 및 아토피성 피부염과 같은 알레르기 반응의 증상 점수를 다양하게 개선한다. 항-TSLP 또는 항-IL-33 항체의 단일 사용은 천식 치료에 임상적으로 검증되었지만, 완전한 효능이 없는 것은 각 요법이 2형 염증을 조절하는 경로의 일부 요소만을 표적으로 하여 질환 병리생리학의 다른 요소를 방치한다는 사실 때문일 수 있다. 이러한 알라르민은 잠재적으로 서로 상호 작용하여 각각의 염증 반응에 기여해야 한다. 기생충 감염 및 2형 사이토카인 유발 폐 염증의 만성 모델을 사용하면, 세 가지 알라르민(TSLP, IL-25 및 IL-33)을 모두 표적으로 하는 것이 임의의 하나의 단일 알라르민만을 차단하는 것보다 더 효과적으로 나타났음이 입증되었다[Vannella, Kevin M *et al.* *Science Translational Medicine* vol. 8,337 (2016): 337ra65.]. 또한, 만성 집먼지 진드기로 유발된 알레르기성 폐 염증 모델에서 세 가지 매개체를 모두 중단시키면 염증, 점액 생성 및 폐 리모델링이 감소했으며 이는 이러한 알라르민이 서로 상호 작용하여 2형 병리 유지에 개별적인 효과를 강화한다는 것을 시사한다. 따라서, 이러한 질환을 유발하는 알라르민 중 2개 이상을 억제하여 스테로이드 사용 감소 및 장기적인 질환 관해의 유지와 같은 알레르기 질환에 대한 임상 결과를 개선하는 새로운 임상 방법이 절실히 필요하다. 본 개시내용에 제공되는 방법은 이러한 필요성을 충족하고 질환 진행의 완화에 관련된 이점을 제공한다.

발명의 내용

[0010] **5. 발명의 요지:**

[0011] 알레르기 질환 및 장애를 치료하는 새로운 방법에 대한 당해 기술분야의 명백한 필요성을 염두에 두고, 본 발명의 목적은 하기 활성 중 하나 이상을 특징으로 하는 2개의 상이한 알라르민에 대한 이중 특이적 항체(bsBp) 또는 항체-수용체 융합 단백질을 제공하는 것이다: i) 정제된 인간 IL-17RB 및 IL-33 단백질에 10^{-8} M 미만의 K_D 로 결합하고; ii) 정제된 인간 IL-17RB 및 TSLP 단백질에 10^{-8} M 미만의 K_D 로 결합하고; iii) 항-IL17RB 단일클론 항체에 비해 Th2 관련 사이토카인의 방출을 더 크게 억제하고; iv) 항-IL17RB 단일클론 항체에 비해 ILC2의 증식 및 활성화를 더 크게 억제한다.

[0012] 본원에서 입증된 바와 같이, 이러한 이중 특이적 항체(bsBp) 또는 항체-수용체 융합 단백질은 천식 및 아토피성 피부염(AD)과 같은 알레르기 질환을 예방, 억제 또는/및 그 진행을 지연시킬 수 있는 잠재력을 가지고 있다. 따라서, 본 발명의 목적은 2개의 상이한 알라르민 X 및 Y에 대한 이중 특이적 결합 단백질의 치료학적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 알레르기와 관련된 질환 또는 장애를 알레르기와 관련된 질환 또는 장애 치료를 필요로 하는 대상체에서 치료하는 방법을 제공하는 것이며, 여기서 이중 특이적 결합 단백질은 (a) 항알

라르민 X 수용체 IgG 및 (b) 항알라르민 Y scFv 및 (c) 폴리펩타이드 링커로 구성된다.

- [0013] 바람직한 실시양태에서, 대상체는 임상 또는 전임상 천식, 아토피성 피부염, 섬유화 질환, 염증성 장 질환 (inflammatory bowel disease: IBD), 크론병(Crohn's disease), 궤양성 대장염, 만성 폐쇄성 폐질환, 만성 비부비동염, 비용종을 동반한 만성 비부비동염(chronic rhinosinusitis with nasal polyps)을 앓고 있는 인간이다.
- [0014] 특히 바람직한 실시양태에서, 알라르민 X 수용체는 IL-17RB, 알라르민 Y 수용체 TSLP 또는 IL-33이고, 알라르민 수용체는 ST2 또는 TSLPR이다.
- [0015] 다른 바람직한 실시양태에서, 항알라르민 X IgG는 IgG1 항체, IgG2 항체, IgG3 항체, 및 IgG4 항체 중에서 선택된다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) IL-25 및 IL-33 신호전달을 차단하고/하거나 (b) IL-25 및 TSLP 신호전달을 차단할 수 있는 이중 특이적 결합 단백질의 치료학적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 알레르기 및 관련된 질환 또는 장애 치료를 필요로 하는 환자에서 알레르기 및 관련된 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0017] 바람직한 실시양태에서, 대상체, 바람직하게는 인간은 임상 또는 전임상 천식, 아토피성 피부염, 섬유화 질환, 염증성 장 질환(IBD), 크론병, 궤양성 대장염, 만성 폐쇄성 폐질환, 만성 비부비동염, 비용종을 동반한 만성 비부비동염을 앓고 있다.
- [0018] 특히 바람직한 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 항-IL-17RB/항-인간 TSLP 이중 특이적 항체, 항-IL-17RB/항-인간 IL-33 이중 특이적 항체, 항-IL-17RB/인간 ST2 항체-수용체 융합 단백질, 및 항-IL-17RB/인간 TSLPR 항체-수용체 융합 단백질 중에서 선택된다.
- [0019] 다른 바람직한 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 각각 서열 번호: 3, 서열 번호: 4, 및 서열 번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3으로 구성된 경쇄 가변 영역(VL), 및 각각 서열 번호: 1, 서열 번호: 2, 및 서열 번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3으로 구성된 중쇄 가변 영역(VH)을 포함한다.
- [0020] 특히 바람직한 실시양태에서, 항-IL-17RB 항체의 VL 및 VH는 각각 서열 번호: 33 및 서열 번호: 32의 아미노산 서열을 및/또는 서열 번호: 33의 경쇄 서열 및 서열 번호: 60 내지 75로부터 선택된 어느 하나의 중쇄 서열을 갖는다.
- [0021] 바람직한 실시양태에서, 이중 특이적 항체(bsBp) 및/또는 항체-수용체 융합 단백질은 정맥내, 근육내, 피하, 두개내, 척수강내, 뇌실내, 복강내, 비강내, 비경구, 국소, 또는 피내로 투여되며, 선택적으로 제2 치료제와 함께 투여되며, 그 예로는 코르티코스테로이드, DNA 메틸트랜스퍼라제(DNMT) 억제제, 항-IL17A 항체, 항-IL12/IL23 항체, 항-IL23 항체, 항-IL17RA 항체, 및 티로신 키나제 억제제가 포함되지만 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 본 발명의 이러한 및 다른 목적 및 특징은 다음의 상세한 설명을 첨부된 도면 및 예시와 함께 읽을 때 더욱 명백해질 것이다. 그러나, 전술한 본 발명의 요약과 다음의 상세한 설명은 둘 모두 바람직한 실시양태에 대한 것이며, 본 발명 또는 본 발명의 다른 대체 실시양태를 제한하는 것이 아님을 이해해야 한다. 특히, 본 발명은 다수의 구체적인 실시양태를 참조하여 본원에 설명되지만, 이 설명은 본 발명을 예시하는 것이며 본 발명을 제한하는 것으로 구성되지 않음을 이해할 것이다. 첨부된 청구범위에 기재된 바와 같이, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 당업자에게 다양한 수정 및 적용이 이루어질 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 6. 도면의 간략한 설명:

- 도 1은 다양한 종으로부터 IL-17RB에 결합하는 SM17의 용량 의존적 곡선을 나타낸다.
- 도 2는 IL-17 수용체 계열의 구성원에 대한 SM17의 결합 특이성을 나타낸다.
- 도 3은 고유 인간 IL-17RB에 결합하는 SM17을 나타낸다.
- 도 4는 인간 PBMC 배양에서 SM17에 의한 IL-5의 용량 의존적 억제를 나타낸다.
- 도 5는 TK-10 세포로부터의 IL-8 생성이 SM17에 의해 억제되었음을 나타낸다.
- 도 6은 OVA로 유발된 류린 실험 천식의 기도 과민성을 억제하는 SM-17의 효과를 나타낸다.

도 7은 OVA로 유발된 류린 실험 천식에서 BALF IL-5 및 IL-13 수준을 억제하는 SM-17의 효과를 나타낸다.

도 8은 OVA로 유발된 류린 실험 천식에서 BALF 호산구 세포 수를 억제하는 SM-17의 효과를 나타낸다.

도 9는 IL25/SM17 상호작용 모드와 가능한 질환 적응증을 나타낸다.

도 10a는 이중 특이적 결합 단백질(이중 특이적 항체 및 항체-수용체 융합 단백질)의 설계를 나타낸다.

도 10b는 ExpiCHO 일시적 형질감염 시스템으로부터 정제된 SM17, SM17-항-TSLP, 및 SM17-항-IL-33 bsBp의 SDS-PAGE를 나타낸다.

도 11은 항알라르민 이중 특이적 결합 단백질의 항원 결합을 나타낸다.

도 12는 알라르민에 의한 인간 PBMC로부터의 IFN γ , CCL8, CCL17, IL-5 및 IL-13의 유도 및 사이토카인 방출에 대한 SM17의 억제 효과를 나타낸다.

도 13은 유도된 인간 PBMC로부터의 사이토카인 및 화학주성 인자에 대한 다양한 이중 특이적 결합 단백질의 효능을 나타낸다.

도 14는 ILC2에 대한 알라르민의 증식 촉진 효과의 결과를 나타낸다.

도 15는 스테로이드 호르몬 및 bsBp에 대한 ILC2 및 Th2 세포의 반응 결과를 나타낸다.

도 16은 수지상 세포 효능 검정의 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

7. 바람직한 실시양태에 대한 상세한 설명:

2형 염증성 질환은 알레르겐에 대한 도전 시 과도한 자극성 알라르민과 사이토카인을 수반한다. 아토피성 피부염(AD) 및 천식이 이러한 부류의 대표적인 질환이다.

AD는 심한 가려움증을 특징으로 하는 만성 염증성 피부 질환이다. 이는 어린이의 15 내지 30%와 성인의 2 내지 10%에게 영향을 미치며 삶의 질을 심각하게 저하시킨다. AD 발병기전의 면역학적 인자에는 Th2 림프구의 수많은 장애와 IL-4, IL-5 및 IL-13과 같은 관련 사이토카인의 방출이 포함된다. 이러한 인자는 IgE의 생성을 증가시켜 피부의 염증을 증가시키고 AD를 가진 환자의 피부 장벽 결함을 악화시킨다.

특히 흥미로운 것은 인터루킨-4(IL-4) 및 인터루킨-13(IL-13)인데: 이들은 침입하는 기생충 또는 알레르겐에 의해 촉발되는 AD에 대한 2형 염증 반응의 시그니처 사이토카인이다. IL-4 및 IL-13 수용체는 공통 수용체 사슬, 즉 IL-4R α 를 공유하며; IL-4R α /IL-2R γ c(γ c) 이종이량체는 IL-4의 수용체를 구성하는 반면, IL-4R α /IL-13R α 1 이종이량체는 IL-13의 수용체를 구성한다. IL-4 또는 IL-13이 IL-4R α 수용체 사슬에 결합하면 IL-4/IL-4R α 복합체가 각각 γ c 수용체 사슬에, 또는 IL-13/ IL-4R α 복합체가 IL-13R α 1 수용체 사슬에 추가로 회합할 것이다. 수용체 사슬 IL-4R α 는 일부 세포 유형에서는 낮은 수준이기는 하지만 널리 발현되는 반면, γ c 또는 IL-13R α 1 수용체 사슬의 발현은 세포 유형에 따라 제한적이다. 예를 들어, 비조혈 세포에서, IL-13R α 1은 다소 높은 발현을 보이는 반면, γ c 발현은 낮거나 존재하지 않는다[Junttila, Ilkka S *et al.* *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 205,11 (2008): 2595-608.]. 최근 연구에서는 림프절 내 T2 반응에 대한 IL-4의 역할은 IgE와 관련된 체액성 면역을 생성하고 조절하는 데 있어 중심적인 역할을 하는 반면; IL-13은 말초 조직에서 보다 두드러진 역할을 하는 것으로 나타났다. IL-4와 IL-13은 둘 모두 필라그린, 필라그린 2, 로리크린, 인볼루크린, 케라틴 1, 케라틴 10, 호르네린, 데스모글레인, 및 데스모콜린 1과 같은 주요 구조 단백질뿐만 아니라 정상적인 피부 장벽 기능에 중요한 지질 구성의 발현을 유의미하게 감소시켜 전형적으로 중증도를 반영하도록 측정되고 심지어 AD 발생을 예측하는 데 사용되는 경피 수분 손실(transepidermal water loss: TEWL)을 증가시킨다. 또한, 각질 세포에서 AMP 생성을 억제함으로써, IL-4와 IL-13은 둘 모두 전형적으로 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)의 강력한 집락화를 특징으로 하는 피부의 장내세균불균형(dysbiosis) 발병에 책임이 있는 것으로 보고되었으며; 이러한 발생은 최근 AD 병변의 출현 전에 발생하는 것으로 나타났다. 이러한 목적을 위해, 이러한 경로를 다루는 두 가지 생물학적 제제가 개발되어 중등도에서 중증의 AD 치료제로 승인되었다. 이들은 즉, 두필루맵(IL-4 및 IL-13 반응 둘 모두를 억제하는 항-IL-4Ra 항체) 및 트랄로키누맵(항-IL-13 항체)이다. 그러나, AD 환자의 약 50%는 치료 후 1년이 지나면 이러한 항체에 반응하지 않게 된다. [Bangert, Christine *et al.* *Science Immunology*, vol. 6,55 (2021): eabe2749; Wollenberg, A *et al.*, *The British Journal of Dermatology* vol. 184,3 (2021): 437-449.]

- [0028] 천식은 기관지 과민성 및 가변적 기류 제한을 특징으로 하는 기도의 만성 염증성 장애이다. 천식은 전 세계 3억 명을 초과하는 사람들에게 영향을 미친다[Braman, Sidney S. *Chest*, vol. 130,1 Suppl (2006): 4S-12S.]. 천식을 가진 대부분의 환자는 표준 조절 요법으로 질환 조절을 달성할 수 있지만, 대략 5 내지 10%는 표준 치료(고용량 흡입 코르티코스테로이드(ICS) 및 지속성 베타-작용제(long-acting beta-agonist: LABA))를 준수했음에도 불구하고 적절하게 조절되지 않는 중증 천식을 앓고 있다. 표준 치료에 의해 조절되지 않는 중증 천식의 경우, GINA(Global Initiative for Asthma) 가이드라인에서는 유지 요법을 위해 경구용 코르티코스테로이드(OCS)의 사용을 권장한다. 그러나, 감염뿐만 아니라 심혈관, 위장관, 및 근골격계에 영향을 미치는 것들과 같은 OCS 관련 부작용은 흔하며 때때로 치명적일 수 있다. 따라서, 중증 천식 환자는 충족되지 않은 의학적 요구가 가장 시급한 것으로 특징지어지며 추가 생물학적 요법을 받을 수 있다.
- [0029] 천식에는 Th2 고 천식 및 Th2 저 천식의 두 가지 주요 범주가 있다. Th2 고 천식에서, IL-4, IL-5 및 IL-13과 같은 2형 면역 사이토카인의 과도한 생산은 폐 호산구증가증(pulmonary eosinophilia), 면역글로불린(Ig) E 수준 상승, 점액 생성 증가, 및 생명을 위협하는 호흡 문제를 초래할 수 있다[Kuruvilla, Merin E *et al.*, *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, vol. 56,2 (2019): 219-233]. 따라서, 최근 Th2 고 표현형을 가진 조절되지 않는 중증 천식에 대한 유망한 추가 요법으로서 IgE, IL-4, IL-5 및 IL-13을 표적으로 하는 생물학적 제제가 부상하였다.
- [0030] IL-4 및 IL-13은 또한 알레르기 및 천식에서 일부 중복되지 않는 기능을 하는 것으로 생각된다. 특히, IL-4는 T 세포 증식과 생존, 및 IgE 합성을 조절하는 역할을 통해 천식 발병의 초기 단계에서 주로 작용하는 것으로 간주된다. 대조적으로, 표면 IL13Ra1 발현이 없기 때문에, 인간 T 세포는 IL-13에 반응할 수 없었다. IL-4와 달리, IL-13은 기도 리모델링과 잔(goblet) 세포에 의한 점액 과다 분비, 섬유화, 평활근 변화, 및 기도 과민반응 증가와 같은 알레르기 반응의 후기 단계에 더 현저하게 관여한다[Gour, N., & Wills-Karp, M. (2015). *Cytokine*, 75(1), 68-78].
- [0031] 그러나, 천식 치료를 위해 IL-4(알트라킨셉트, 파스콜리주맵) 또는 IL-13(트랄로키누맵)만을 표적으로 하는 항체에 대한 임상 결과는 실망스러웠다[Panettieri, Reynold A Jr *et al.* *The Lancet. Respiratory Medicine* vol. 6,7 (2018): 511-525; Bagnasco, Diego *et al.* *International Archives of Allergy and Immunology*, vol. 170,2 (2016): 122-31.]. 그러나, 두펄리주맵의 경우에서와 같이 IL-4와 IL-13을 둘 모두 표적화했을 때, Th2 매개 천식의 효과적인 치료가 임상적으로 입증되었다[Maspero, Jorge F *et al.* *The Journal Of Allergy And Clinical Immunology. In practice*, vol. 8,2 (2020): 527-539.e9.]. 이러한 결과는 Th2 매개 천식의 치료에 IL-4와 IL-13의 이중 차단이 필요하다는 것을 시사한다.
- [0032] IL-5는 호산구의 분화, 동원, 생존, 및 탈과립화에서 중심 병인적 역할을 한다[Pelaia, Corrado *et al.* *Frontiers in Physiology*, vol. 10 1514. 17 Dec. 2019]. 호산구성 염증을 특징으로 하는 Th2-고 표현형을 발현하는 중증 천식을 가진 환자가 상당수 있다. 기도 호산구증가증은 천식 대상체의 절반 이상에서 발생할 수 있으며, 높은 호산구 수준은 재발성 천식 악화 및 중증 기관지 폐색과 관련이 있다. 호산구증가증을 동반한 Th2-고 천식은 종종 코르티코스테로이드에 치료적으로 반응하는데, 이는 아마도 코르티코스테로이드로 유발된 아폽토시스에 의한 호산구 제거를 통해 그럴 것이다. 그러나, 중증 호산구성 천식은 기관지에 과도한 양의 IL-5로 인해 흡입 코르티코스테로이드와 전신 코르티코스테로이드 둘 모두에 내성이 있을 수 있다. 기관지에 과도한 양의 IL-5는 호산구에 대한 코르티코스테로이드의 아폽토시스 촉진 효과를 극복할 수 있다. 따라서, 항-IL-5 항체에 의한 IL-5 활성을 차단하면 코르티코스테로이드 치료의 치료적 반응성을 유지하는 데 도움이 될 수 있으며, 실제로 IL-5 경로를 차단하는 레슬리주맵(항-IL-5 항체), 메폴리주맵(항-IL-5 항체) 및 벤랄리주맵(항-IL-5Ra 항체)을 포함한 세 가지 항체가 Th2 고 천식 치료를 위해 코르티코스테로이드와 함께 사용되고 있다.
- [0033] Th2-고 천식의 하위 유형인 알레르기 천식은 집먼지 진드기와 같은 하나 이상의 일반적인 환경 알레르겐에 대한 IgE 항체의 존재를 특징으로 한다. 알레르기 천식을 가진 환자에서, 항알레르겐 IgE는 비만 세포 표면 상의 IgE 수용체(FcεRI)에 결합한다. 알레르겐 항원에 노출되면 비만 세포 표면 FcεRI의 가교가 발생할 수 있으며; 이러한 FcεRI 가교가 충분한 강도와 지속력을 가질 때 비만 세포가 활성화되어 오타코이드 매개체(autacoid mediator)인 히스타민, 프로스타글란딘(PG) D2, 및 류코트리엔(LT) C4가 방출되어 최종적으로 기관지 수축, 점액 분비, 및 점막 부종이 발생한다. 활성화된 비만 세포는 또한 많은 수의 염증 촉진성 사이토카인(IL-4, IL-5 및 IL-13 포함)을 합성하고 분비할 수 있으며, 이는 차례로 IgE 합성과 호산구성 염증의 발병 둘 모두를 조절할 수 있다. 항-IgE 항체인 오말리주맵은 중증 알레르기 천식의 추가 치료를 위한 최초이자 오랫동안 유일하게 사용 가능한 단일클론 항체였다. 오말리주맵은 인간 IgE가 그 수용체에 결합하는 것을 선택적으로 방지하여 비만

세포 활성화를 억제하는 기능을 한다.

- [0034] Th2-고 염증 경로를 밝히고 Th2-고 천식 치료를 위한 관련 생물학적 제제를 개발하는 데 많은 진전이 있었지만, Th2-저 천식을 해결하는 효과적인 접근법은 여전히 부족하다. Th2-저 천식 환자가 코르티코스테로이드에 불량하게 반응한다는 사실에 의해 문제는 더욱 악화된다. 따라서, Th2-저 천식의 효과적인 치료를 위한 치료 방식에 대한 충족되지 않은 의학적 요구가 존재한다.
- [0035] 천식 표준 치료에 있어 또 다른 문제는 OCS에 대한 과도한 의존이다. 중증 천식을 가진 성인 환자의 약 30%가 허용 가능한 수준의 천식 조절을 유지하기 위해 ICS 이외에 OCS 요법에 의존하고 있다[Chung, Kian Fan *et al.* *The European Respiratory Journal*, vol. 43,2 (2014): 343-73.]. GINA(Global Initiative for Asthma) 그룹은 유지 요법을 위한 "허용 가능한" OCS 용량을 설정하는 데 전념했으며, 생리적 스테로이드 생성 수준에 상응하는 1일 7.5 mg을 허용 가능한 수준으로 제안하였다. 그러나, 최근 연구에 따르면 부작용의 위험이 누적되고 치료할 때마다 증가하기 때문에 양성 OCS 처방은 없는 것으로 밝혀졌다. 단 4회의 짧은 OCS 과정 후에만 이환율이 증가하는 것으로 나타났다[Sullivan, Patrick W *et al.* *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 141,1 (2018): 110-116.e7.]. 평생 누적 용량 측면에서, 대부분의 부작용은 환자가 1 내지 2.5 g의 코르티코스테로이드로 치료받은 후에 나타났으며, 0.5 g의 코르티코스테로이드만 투여받은 환자에서 당뇨병 발병률이 증가하기 시작하였다[Price, David B *et al.* *Journal of Asthma and Allergy*, vol. 11 193-204. 29 Aug. 2018,].
- [0036] 두필루맵, 메폴리주맵, 레슬리주맵, 오말리주맵, 및 벤랄리주맵의 OCS-보존 효과를 임상적으로 평가하였다. 이러한 생물학적 제제로 치료하면 1일 OCS 용량을 50% 감소시킬 수 있지만, 중증 천식 환자의 5% 내지 20%만이 OCS 사용을 중단할 수 있었다. OCS에 대한 의존도를 없애거나 더욱 완화할 수 있는 천식 치료를 위한 새로운 치료 방식 또는 생물학적 제제를 개발해야 하는 충족되지 않은 의학적 요구가 여전히 크게 남아 있다[Cataldo, Didier *et al.* *The Journal of Asthma: Official Journal Of The Association For The Care Of Asthma*, vol. 58,4 (2021): 448-458.].
- [0037] 현재 천식 및 AD 치료를 위해 FDA 승인을 받은 생물학적 제제는 모두 Th2 염증의 다운스트림 경로를 표적으로 한다. 그러나, 이러한 생물학적 제제로 치료받은 환자에게는 재발률이 높고 비-Th2 염증에 대한 효능이 제한적이며 감소된 수준이기는 하지만 지속적인 OCS 사용에 대한 의존성과 같은 해결해야 할 임상적 부적절성이 있다. 최근, IL-25, TSLP, 및 IL-33을 포함한 알라르민을 표적으로 하는 새로운 생물학적 제제가 개발되고 있다. 이들은 Th2 염증 경로에 영향을 미치는 업스트림 요소이며 잠재적으로 Th2 및 비-Th2 염증 반응 둘 모두에 기여할 수 있었다. 따라서, 항알라르민 생물학적 제제는 현재 AD 및 Th2-고/저 중증 천식을 가진 환자에 대한 임상적 부적절성을 해결할 수 있는 추가적인 옵션을 제공할 수 있다.
- [0038] IL-25(IL-17E로도 알려져 있음)는 IL-17A에서 IL-17F를 포함하는 IL-17 사이토카인 계열의 구성원이다. IL-25는 신호 전달을 위해 IL-17 수용체 A(IL-17RA)와 IL-17 수용체 B(IL-17RB)로 구성된 그 수용체에 결합한다[Borowczyk, Julia *et al.* *The Journal Of Allergy And Clinical Immunology*, vol. 148,1 (2021): 40-52.]. IL-25는 Th2 세포에서 생성되는 2형 사이토카인이며, IL-4, IL-5, 및 IL-13 유전자 발현을 유도하고 폐와 소화관에서 알레르기 염증 반응을 더욱 증폭시킬 수 있다. IL-25는 상피 세포, Th2 세포 및 ILC2를 포함한 다양한 세포 유형에서 IL-17RA/IL-17RB 복합체를 활성화하기 때문에 2형 면역 반응에서 중요하다. IL-25는 CD4⁺ T-세포 활성화 및 Th17 세포로의 분화를 억제하고 Th1 및 Th17 세포 반응의 하향 조절을 통해 자가면역 및 염증성 질환에서 항염증 역할을 하는 것으로 보고되었다.
- [0039] 흉선 기질 림프포이에틴(TSLP)은 IL-2 사이토카인 계열의 구성원이며 IL-7의 먼 동종상동체(paralog)이다. TSLP는 TSLP 특이적 TSLPR 서브유닛과 IL-7R 신호전달 사슬에 의해 형성된 이종이량체 수용체에 결합하여 수지상 세포, ILC2, 비만 세포, 호염기구, 및 T 세포를 포함한 여러 면역 세포 유형에 작용한다. 알레르기 염증 동안, TSLP의 주요 생산자는 상피 세포, 각질 세포 및 기질 세포이다. TSLP는 항원 제시 세포(예를 들어, 수지상 세포)를 조절하여 T 세포 및 선천성 림프 세포에 의해 2형 사이토카인을 증폭시킴으로써 Th2 매개 염증을 유발하는 데 중요한 역할을 한다[Ito, Tomoki *et al.* *The Journal Of Experimental Medicine*, vol. 202,9 (2005): 1213-23].
- [0040] IL-33은 IL-1 계열의 구성원이며 최근 IL-1 수용체 계열의 구성원인 T1/ST2(ST2)의 리간드로서 확인되었다. IL-33은 염증 촉진성 사이토카인과 전사 조절 특성을 갖는 세포내 핵 인자(intracellular nuclear factor) 둘 모두로서 작용하는 이중 기능 단백질이다. 세포 스트레스 또는 괴사 후, IL-33은 세포외(extracellular) 공간으로 방출되어 외상 또는 감염 동안 면역 체계에 조직 손상을 알리는 내인성 위험 신호로서 기능한다. IL-33은 인간

호염기구, 알레르겐 반응성 Th2 세포, iNKT 및 NK 세포에 대한 활성을 통해 Th1 유형 반응과 Th2 유형 반응을 둘 모두 증폭시킨다. IL-33은 표준적으로 2형 사이토카인 반응을 유발하지만, 이 사이토카인은 IL-12와 같은 1형 사이토카인과 상승 효과를 일으켜 인터페론-감마(IFN γ)를 유발할 수도 있다[Komai-Koma, Mousa *et al. Immunobiology*, vol. 221,3 (2016): 412-7]. 따라서, IL-33은 알레르기, 섬유증, 감염, 및 만성 염증성 질환에서 중요한 역할을 하는 중요한 면역 조절제로서 부상하고 있다.

[0041]

IL-25, TSLP, 및 IL-33(총칭하여 알라르민으로 알려져 있음)이 Th2 면역 반응을 넘어 광범위한 기능을 나타내기 때문에, 이러한 알라르민에 대한 생물학적 제제는 Th2 경로의 다운스트림에 있는 표적과 상호작용하는 생물학적 제제에 대해 승인된 적응증 외에 추가적인 알레르기 질환 하위 유형에서 효과적인 것으로 여겨진다. 항-TSLP와 항-IL33 항체는 둘 모두 천식과 AD에서 임상적으로 평가되었다[Simpson, Eric L *et al. Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 80,4 (2019): 1013-1021; Chen, Yi-Ling *et al. Science Translational Medicine*, vol. 11,515 (2019): eaax2945]. 테제펠루맵(AMG 157/MEDI9929)은 TSLP에 특이적으로 결합하여 TSLP가 수용체 복합체와 상호작용하는 것을 방지하는 완전 인간 면역글로불린 G2-람다 단일클론 항체이다. 2상, 무작위, 이중맹검, 위약 대조 연구(ALLEVIAD; NCT02525094)에서, 중등도에서 중증의 AD를 가진 환자는 테제펠루맵과 코르티코스테로이드 국소 사용(TCS)으로 치료 시 위약과 TCS보다 모든 평가변수(endpoint)에서 개선되는 경향을 보였지만, 12주차에 EASI50으로 평가할 때 이러한 개선은 통계적 유의성을 달성하지 못했다. 2개의 별도의 3상 시험(SOURCE 및 NAVIGATOR)이 중등도에서 중증의 천식 치료에 대한 테제펠루맵의 임상 효능을 평가하기 위해 수행되었다. NAVIGATOR 연구에서, 중등도에서 중증의 천식 환자는 테제펠루맵과 OCS로 치료를 받거나, 위약과 OCS로 치료를 받았다. 통계적으로 유의미하게 위약 그룹의 1차 평가변수에 비해 치료 그룹에서 1차 평가변수를 충족했으며, 이는 AAER(Annual Asthma Exacerbation Rate)이 임상적으로 유의미하게 감소했음을 입증하였다[Menzies-Gow, Andrew *et al. The New England Journal of Medicine*, vol. 384,19 (2021): 1800-1809]. NAVIGATOR 연구에서, 테제펠루맵(OCS와 동시에 사용됨)은 Th2-고 및 Th2-저 중증 천식을 억제하는 데 동등하게 효과적이다. 그러나, SOURCE 연구에서, 테제펠루맵은 통계적으로 유의미하게 위약에 비해 1차 평가변수, 즉 천식 조절을 상실하지 않으면서 1일 OCS 감소를 충족하지 못했다. 이 결과는 단일요법으로 사용되는 테제펠루맵이 중등도에서 중증의 천식을 치료하기에 충분하지 않을 수 있음을 시사하였다.

[0042]

항-IL-33 인간화 IgG1 단일클론 항체인 에토키맵(ABN020)은 AD 치료에 대해 임상적으로 평가되었다. 1상 시험에서, ABN020을 투여한 결과 혈중 호산구 수가 크게 감소하였다. ABN020은 2a상 연구에서 집먼지 진드기로 유발된 피부염 증상을 유의미하게 완화하고 호중구 피부 침윤(비-Th2 염증의 특징)을 감소시키는 것으로 밝혀졌다[Chen, Yi-Ling *et al. Science Translational Medicine*, vol. 11,515 (2019): eaax2945]. 이러한 결과는 ABN020이 Th2 염증과 비-Th2 염증을 둘 모두 억제할 수 있음을 시사하였다. 그러나, ABN020은 후속 2b상 연구에서 중등도에서 중증의 AD 치료에 대한 1차 평가변수를 충족하지 못했다. 또 다른 항-IL-33 항체인 이테페키맵(REGN3500)은 천식 치료에 대해 임상적으로 평가되었다. 2상 개념 증명(proof-of-concept: POC) 연구에서, ICS 및 지속성 기관지 확장제 흡입기(long-acting bronchodilator inhaler: LABA)의 사용을 중단한 환자는 12주 동안 두필루맵 또는 이테페키맵으로 치료를 받았다[Wechsler, Michael E *et al. The New England Journal Of Medicine*, vol. 385,18 (2021): 1656-1668.]. 이테페키맵으로 치료받은 환자의 천식 조절 상실률(22%)은 위약을 투여받은 환자(41%)보다 유의미하게 낮다. 이 데이터는 이테페키맵이 ICS 및 LABA 없이 단일요법으로 효과적일 수 있음을 시사하였다. 그러나, 이테페키맵의 효능은 항-IL4Ra 항체인 두필루맵(19%)의 효능에 비해 약간 떨어졌다. 따라서, 천식에 대한 이테페키맵의 추가 임상 개발은 과학적 고려보다는 전략적 고려로 인해 중단되었다. 그럼에도 불구하고, 이테페키맵은 호중구성 염증을 특징으로 하는 질환인 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease: COPD)을 가진 과거 흡연자(former smoker)의 악화율(exacerbation rate)을 낮추고 폐 기능을 개선하는 것으로 이후에 밝혀졌다[Rabe, Klaus F *et al. The Lancet. Respiratory Medicine*, vol. 9,11 (2021): 1288-1298]. 과거 흡연자의 COPD 치료를 위해 이테페키맵을 사용한 두 가지 3상 임상 연구가 진행 중이다.

[0043]

지금까지 천식 및 AD와 같은 면역 질환에 대한 IL-25/IL-17RB 경로를 차단하는 효능은 임상적으로 검증되지 않았다. 가장 진보된 항-IL25 항체는 Kanovabiopharma가 개발한 XKH001로, 현재 1상 시험에서 평가 중이다. LNR 125.38은 Lanier Biotherapeutics가 개발한 또 다른 항-IL-25 항체로, 현재 전임상 단계에 있으며; LNR 125.38은 알레르기 마우스와 리노바이러스로 유발된 천식 악화 마우스에서 2형 사이토카인과 염증 세포 증가를 유의미하게 감소시킨다. SinoMab BioScience Limited가 개발한 SM17은 1상 임상 시험에 진입하는 동급 최초의 인간화 항-IL17RB 단일클론 항체이다. SM17은 IL-25의 IL-17RB로의 결합을 차단하지 않고 오히려 IL-25/IL-17RB 경로를 통한 신호 전달을 억제한다. SM17은 모(parent) 무린 항체 D9.2로부터 인간화되었으며, 이는 염증성 장 질환, 특발성 폐 섬유증, 천식 및 리노바이러스로 유발된 천식 악화 치료를 위한 전임상 무린 연구에서 치료적

잠재력을 입증하였다.

- [0044] 이러한 항알라르민 항체(특히 항-TSLP 및 항-IL33 항체)가 Th2 염증과 비-Th2 염증을 둘 모두 감소시키는 데 있어 전임상 및 임상 효능이 입증되었음에도 불구하고, 천식 및/또는 AD 치료를 위한 추가 요법 또는 단일요법으로 사용될 때 이들의 치료 반응은 다소 차선이다. 가능한 설명은 TSLP, IL-33 그리고 아마도 IL-25가 천식 및 AD의 발병기전에서 중복되고 중첩되는 기능/역할을 한다는 것이다. 따라서, 이들 중 임의의 하나를 차단하는 것 만으로는 최적의 임상 반응을 달성하기에는 불충분하다.
- [0045] 분자 수준에서, 이 세 가지 알라르민은 모두 선천성 림프 세포(ILC) 계열의 구성원인 ILC2를 직접 활성화한다. ILC2는 가용성 염증 매개체, 신경 영양 인자(neurotrophic factor) 및 세포 간 상호작용(cell-to-cell interaction)을 통해 환경에 빠르게 반응하는 조직-상주 감시자(tissue-resident sentinel)이다. ILC2는 IL-25, IL-33 및 TSLP에 대한 수용체를 발현하고 이러한 신호에 반응하는 IL-5 및 IL-13을 분비하여 이후 알레르기 반응을 강화하는 것으로 나타났다. ILC2가 조절되지 않으면, 이들은 Th2 염증성 사이토카인의 과잉 생산에 기여하여 알레르기 천식, AD, 알레르기 비염, 궤양성 대장염, 및 많은 만성 섬유증성 질환의 발병을 유발할 수 있다. ILC2는 또한 AD의 빠른 질환 재발 및 중증 천식에서 OCS 의존성과 밀접하게 연관되어 있다.
- [0046] 중증 호산구성 천식을 가진 환자에서, OCS 투여는 순환 호산구, Th2 세포, Tc2 세포의 감소를 초래했지만 ILC2는 감소하지 않았다. 이는 ILC2가 Th2 세포에 비해 OCS에 더 저항성이 있음을 시사한다(Hynes, G., et al. 2018). 임상적으로, IL-13⁺ILC2는 Th2 세포와 비교했을 때 환자의 천식 조절 상태와 더 강한 양의 상관관계를 보였으며 글루코코르티코이드로 유발된 세포 사멸 및 2형 사이토카인 방출 억제에 더 저항적이었다[Jia, Yi et al. *American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology*, vol. 55,5 (2016): 675-683]. 최근 연구에서는 세 가지 알라르민이 모두 ILC2의 코르티코스테로이드 저항에서 중요한 역할을 했다는 것을 추가로 보여주었다. IL-33은 류마티스 관절염에서 기관지 주위/혈관 주위 영역에서 ILC2의 수를 빠르게 증가시키는 것으로 입증되었지만, ILC2의 폐 축적은 CCL8-CCR8 신호전달 경로에 좌우되었다. 이는 IL-33 처리가 주로 폐 기도 대식세포로부터 CCL8을 생성하는 것으로 알려져 있다. CCL8-CCR8 경로를 통한 신호전달은 차례로 ILC2 사이토카인(IL-13 및 IL-5) 생성 뿐만 아니라 IL-13⁺ 활성화 ILC2 운동성에 중요한 역할을 했다[Puttur, Franz et al. *Science Immunology*, vol. 4,36 (2019): eaav7638]. "염증성" ILC2(iILC2)로서 알려진 ILC2의 하위 집단은 나중에 코르티코스테로이드 내성 발달에 관여하는 것으로 밝혀졌다. 만성 비부비동염 또는 천식을 가진 환자에서 질환의 중증도와 코르티코스테로이드 요법에 대한 내성의 상관관계가 확립되었으며, 특히 염증이 있는 점막 조직에서 순환하는 iILC2와 상주하는 iILC2의 수가 증가할 때 확립되었다. 흥미롭게도, iILC2의 발달 및 이동은 IL-25에 의존한다[Miller, Mindy M et al. *Science Immunology*, vol. 5,43 (2020): eaay3994; van der Ploeg, Esmee K et al. *Science Immunology*, vol. 6,55 (2021): eabd3489]. TSLP 치료는 또한 ILC2의 스테로이드 저항성을 증가시키는 것으로 보고되었다. TSLP 수준이 높은 천식 환자로부터 채취한 기관지 폐포 세척액(bronchial alveolar lavage fluid: BALF) ILC2는 스테로이드 저항성이 있었다. IL-7 및 TSLP는 혈액 ILC2로부터 2형 사이토카인 생성에 대한 텍사메타손의 억제를 무력화하였다[Liu, Sucal et al. *The Journal Of Allergy And Clinical Immunology*, vol. 141,1 (2018): 257-268.e6].
- [0047] 알라르민은 또한 Th2 기억 세포에 의해 매개되는 AD 재발에서 중요한 역할을 한다. AD에서 지속되는 피부-상주, 치료 저항성이 있는 면역 Th2 기억은 1년 동안 두피루맘으로 치료받은 환자에서 확인되었다. 이러한 기억 Th2 세포는 IL-13⁺, IL-17RB⁺, ST2⁺, TSLPR⁺이며, 이는 알라르민에 반응할 수 있음을 시사한다. 이전 연구에서는 IL-33이 Th2 기억 세포가 AD에서 심각한 소양증을 유발하는 사이토카인인 IL-31을 생성하도록 유도할 수 있었다고 보고하였다[Maier, Elisabeth et al. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) vol. 193,2 (2014): 645-54; Stott, Bryony et al. *The Journal Of Allergy And Clinical Immunology*, vol. 132,2 (2013): 446-54.e5]. 또 다른 보고에서는 AD 피부 병변으로의 CRTH2⁺CD4⁺ Th2 기억 세포의 침윤이 TSLP(TSLP-DCs)에 의해 활성화된 DC와 관련이 있었다[Wang, Yui-I et al. *Immunity*, vol. 24,6 (2006): 827-838]. 또한, IL-25는 TSLP-DC에 의해 자극된 Th2 기억 세포의 증식을 향상시켰다[Wang, YIHsi et al. *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 204,8 (2007): 1837-47]. 이러한 연구는 두피루맘에 의한 IL-4 및 IL-13의 증가가 Th2 기억 세포의 활성을 억제하기에 불충분할 수 있음을 나타냈다. 이는 상당한 비율의 AD 환자가 두피루맘으로 치료했을 때 부분적이고 비지속적인 반응을 경험하는 이유를 설명하는 데 도움이 될 수 있다[Bangert, Christine et al. *Science Immunology*, vol. 6,55 (2021): eabe2749] [Wollenberg, A et al. *The British Journal Of Dermatology*, vol. 184,3 (2021): 437-449]. IL-4 및 IL-13과 달리, 알라르민은 AD에서 단기 Th2 이펙터 기능과 오래 지속되는 Th2 기억을 둘 모두 조절한다. 따라서, 알라르민의 증가는 AD 치료를 위한 새로운 접근법으로

작용한다.

- [0048] 세 가지 알라르민이 2형 면역에서 중복되고 중첩되는 역할을 하기 때문에, 이 세 가지 알라르민 중 어느 하나를 차단하는 것은 Th2와 ILC2 활성을 둘 모두 완전히 억제하는 데 충분하지 않을 가능성이 크다. 이는 테페켈루마프와 이테페키마프가 Th2 염증 반응과 비-Th2 염증 반응이 둘 모두 억제됨에도 불구하고 천식 및 AD에 대한 임상 효능이 제한적인 이유를 설명할 수 있다.
- [0049] 중복되기는 하지만, Th2뿐만 아니라 비-Th2 반응에서 이러한 알라르민 중에는 중첩되지 않는 기능이 있다. IL-33은 IL-12와 협력하여 염증성 장 질환(IBD)의 발병기전에서 잘 알려진 질환 유발 인자인 인간 NK 세포로부터 인터페론 감마(IFN γ)의 생성을 직접 유도한다. 환자의 생검에 대한 연구에서는 활성 IBD, 특히 궤양성 대장염(UC)을 가진 환자에서 IL-33 수준이 증가하는 것으로 나타났다[Kobori, Ayako et al. *Journal of Gastroenterology*, vol. 45,10 (2010): 999-1007]. 또한, UC 관련 IL-33은 근섬유모세포(myofibroblast)에서 발견되는데, 이는 UC를 가진 환자에서 염증성 궤양의 기저부에 국한되는 경향이 있다[Sponheim, Jon et al. *The American Journal Of Pathology*, vol. 177,6 (2010): 2804-15]. IL-33/ST2 경로의 차단은 마우스의 점막 치유를 향상시켜 실험적 대장염을 개선하고, 인간의 활성 질환을 완화하는 것으로 나타났으며, 이는 IBD에서 IL-33의 병인적 역할을 시사한다[Sedhom, Mamdouh A K et al. *Gut*, vol. 62,12 (2013): 1714-23]. 대조적으로, TSLP는 인간 DC가 OX40 리간드(OX40L)를 발현하도록 유도하지만 IL-12는 발현하지 못하도록 유도하는데, 이는 tregI 나이브 CD4⁺ T 세포가 IL-4, IL-5 및 IL-13을 생산하는 데 필요한 선행 요건이다. 또한, TSLP로 활성화된 DC는 CCL17/TARC 및 CCL22/MDC와 같은 케모카인을 생성하여 나이브 T 세포를 유인한다. TSLPR를 통해 직접적으로 또는 (DC의 TSLP에 의해 유도된) OX40 리간드와 T 세포의 OX40의 결합을 통해 간접적으로 나이브 CD4⁺ T 세포를 TSLP로 자극하면 특수화된 Th2 분극을 유도한다.
- [0050] 흥미롭게도, DC 활성화를 통해, 인간 TSLP 및 TLR3 리간드는 중심 기억 T 세포 표현형(central memory T cell phenotype)을 가진 Th17 세포의 분화를 촉진한다. 마찬가지로, 피부 국소 비만 세포로부터의 IL-25는 피부 DC를 자극하여 IL-1 β 를 생성하고 이로 인해 접촉성 피부염의 유발 단계에서 Th17 세포의 활성화에 기여하지만 Th2 세포의 활성화에는 기여하지 않는다. 건선 피부에서 IL-25는 각질 세포의 증식을 자극하고 STAT3 전사 인자의 활성화를 통해 염증성 사이토카인 및 케모카인의 생성을 유도한다. 각질 세포에서의 IL-25 발현은 또한 건선형 염증을 증폭시키는데도 기여한다. 또한, IL-25는 인간 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cell: PBMC)로부터 IL-5 및 IL-13 분비를 유도하는 데 IL-33보다 더 강력하였다[Bartemes, Kathleen R et al. *The Journal Of Allergy And Clinical Immunology*, vol. 134,3 (2014): 671-678.e4].
- [0051] 중복되는 것처럼 보이지만 세 가지 알라르민은 ILC2, Th1, Th2, 및 Th17 활성 및 반응을 조절하는 데 상이한 역할을 할 수 있다. 실제로, 이들은 호염기구, 대식세포, 호산구, 비만 세포, 섬유아세포 및 각질 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는 중추 및 말초 시스템의 다양한 세포 유형을 표적으로 하는 것으로 보고되었다. 알레르기 질환(예를 들어, 접촉성 피부염, AD, Th2-고/저 천식) 및 자가면역 질환(예를 들어, 염증성 장 질환, 건선)의 이질성으로 인해 단일 알라르민의 차단은 특정 환자 그룹에게만 효과적일 수 있다. 예를 들어, Th1과 Th2 혼합 표현형은 유럽계 미국인 AD에서 가장 흔한 반면, Th17과 Th2 혼합 표현형은 아시아계 및 소아 AD에서 가장 흔하다[Renert-Yuval, Yael, and Emma Guttman-Yassky. *Annals Of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication Of The American College Of Allergy, Asthma, & Immunology*, vol. 124,1 (2020): 28-35]. 이는 이러한 면역학적 질환을 해결하는 데 있어 개선의 여지를 열어두고 다양한 면역학적 질환의 하위 유형에 맞는 새로운 접근법과 요법에 대한 충족되지 않은 의학적 요구를 제시한다.
- [0052] 이러한 대체 요법에 대한 한 가지 접근법은 알레르기 질환(예를 들어, 소아 및 성인 AD)의 상이한 양태를 치료하는 두 가지 이상의 알라르민(예를 들어, 항체)에 대한 생물학적 제제의 공동 투여를 포함할 수 있다. 공동 투여에는 두 가지 개별 제제의 주사 또는 두 가지 상이한 생물학적 제제의 공동 제형의 단일 주사가 필요하다. 2회의 주사는 용량(dose amount)과 타이밍의 유연성을 허용하지만 환자가 준수하기는 불편하다. 또한, 공동 제형은 용량의 유연성을 어느 정도 제공할 수 있지만, 두 가지 이상의 항알라르민 생물학적 제제의 분자 특성이 상이하기 때문에 (비교적 높은 농도에서) 허용 가능한 점도를 갖고 화학적 및 물리적 안정성을 촉진시키는 제형 조건을 찾는 것은 종종 매우 어렵거나 불가능하다. 또한, 공동 투여 및 공동 제형은 두 가지 이상의 상이한 약물 요법의 첨가 비용을 수반하여 환자 및/또는 지불자 비용을 증가시킬 수 있다. 따라서, 질환 변형이 있는 알레르기 질환 치료를 위한 대체 요법에 대한 필요성이 남아 있으며, 이러한 대체 요법은 바람직하게는 다양한 알라르민에 대한 이중 특이적 또는 다중 특이적 결합 단백질을 포함한다.
- [0053] 예시 목적으로, 본 발명은 두 가지 상이한 알라르민에 대한 이중 특이적 결합 단백질을 제공하며; 이는 한쪽 끝

에는 IL-17RB에 대한 특이성을 갖고 다른 쪽 끝에는 가용성 알라르민에 대해 특이성을 갖는 이중 특이적 단백질의 형태일 수 있다. 구체적으로, 이중 특이적 단백질은 항-IL17RB(IL-25 수용체) 항체일 수 있으며, 그 C-말단에서 (a) IL-33 또는 TSLP 알라르민을 표적으로 하는 단일 사슬 Fv(scFv); 또는 (b) IL-33 수용체(ST2) 또는 TSLP 수용체(TSLPR)의 세포외 도메인과 융합된다. 본 발명은 알라르민 수용체와 상이한 알라르민에 대한 이중 특이적 결합 단백질의 사용을 개시하지만, 이 접근법은 상이한 알라르민 수용체, 알라르민 및 기타 다운스트림 사이토카인을 표적으로 하는 다중 특이적 결합 단백질로 확장될 수 있다.

[0054] 본 개시내용을 더 설명하기 전에, 본 개시내용이 본원에 명시된 특정 실시양태에 제한되지 않는다는 것을 이해해야 하며, 또한 본원에 사용된 용어는 특정 실시양태를 설명하기 위한 목적이며 제한하려는 의도가 아님을 이해해야 한다.

[0055] 본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본 개시내용에서 사용되는 과학 및 기술 용어는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 가져야 한다. 또한, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어는 복수를 포함하고, 복수 용어는 단수를 포함한다. 일반적으로, 본원에 기재된 세포 및 조직 배양, 분자생물학, 면역학, 유전학 및 단백질 및 핵산 화학 및 혼성화와 관련하여 사용되는 명명법 및 이들의 기술은 당해 기술분야에 잘 알려져 있고 일반적으로 사용되는 것들이다.

[0056] "a" 또는 "an" 개체라는 용어는 하나의 개체를 지칭하며; 예를 들어, "벡터"는 하나의 벡터를 나타내는 것으로 이해된다.

[0057] 본원에서 사용되는 "및/또는"이라는 용어는 서로를 포함하거나 포함하지 않는 지정된 두 가지 특징 또는 구성요소 각각에 대한 구체적인 개시로서 간주되어야 한다. 따라서, 본원에서 "A 및/또는 B"와 같은 문구에서 사용되는 "및/또는"이라는 용어는 "A 및 B", "A 또는 B", "A"(단독) 및 "B"(단독)를 포함하도록 의도된다. 마찬가지로, "A, B, 및/또는 C"와 같은 문구에서 사용되는 "및/또는"이라는 용어는 다음의 각 측면을 포함하는 것으로 의도된다: A, B, 및 C; A, B 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A와 B; B 및 C; A(단독); B(단독); 및 C(단독).

[0058] 범위: 본 개시내용 전반에 걸쳐, 본 발명의 다양한 양태는 범위 형식으로 제시될 수 있다. 범위 형식의 설명은 단지 편의상 간결함을 위한 것이며, 본 발명의 범위에 대한 융통성 없는 제한으로 해석되어서는 안 된다는 것을 이해해야 한다. 따라서, 범위에 대한 설명은 그 범위 내의 개별적인 수치 값뿐만 아니라 모든 가능한 하위 범위를 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 1 내지 6과 같은 범위에 대한 설명은 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등과 같은 하위 범위와 그 범위 내의 개별 숫자, 예를 들어, 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3 및 6을 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 이는 범위의 크기에 관계없이 적용된다.

[0059] 예시적인 유전자 및 폴리펩타이드는 GenBank 번호, GI 번호 및/또는 서열 번호를 참조하여 본원에 설명되어 있다. 당업자는 GenBank(ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) 및 EMBL(embl.org/)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 서열 소스를 참조하여 상동 서열을 용이하게 식별할 수 있는 것으로 이해된다.

[0060] 7.1 IL17RB 단백질

[0061] 인간 IL17RB는 IL-17 수용체 계열에 속하는 47.9 kDa 막관통 단백질(462 aa)이다. IL-17RB는 다양한 내분비 조직과 신장, 간 및 점막 조직과 같은 다양한 장기의 상피 세포에서 발현된다. 천식 환자의 폐 조직과 AD를 가진 환자의 피부 병변에서도 IL-17RB 발현 증가가 또한 발견된다. 인간 ILC2, 자연 살해 T(NKT) 세포 및 Th2 세포에서의 IL-17RB 발현은 면역 세포에서 잠재적인 역할을 시사한다. IL-17RB는 IL-17B 및 IL-25(IL-17E로도 알려져 있음)의 두 가지 리간드에 의해 공유된다. IL-25는 이종이량체 IL-17A/IL-17RB 복합체에 결합하는 반면, IL-17B는 이종이량체 수용체와 IL-17RB 동종이량체 수용체 둘 모두에 결합하는 것으로 보고되었다[Wu, Heng-Hsiung et al. *Science Translational Medicine*, vol. 13, 583 (2021): eabc2823]. IL-17RB에 대한 IL-17B의 결합 친화도(K_D)는 IL-25(IL-17E)의 결합 친화도보다 약 30배 낮으며, 회합 속도(K_{on})는 비슷하지만 해리 속도(K_{off})는 상당히 빠르다. 인간 IL-17RB에 대한 추가 정보는 그 예시적인 아미노산 서열을 포함하여, GENE BANK(NCBI Ref. NP_061195.2)와 같은 공개 데이터베이스에서 찾을 수 있다. 예시적인 서열은 또한 아래에 제공된다.

[0062] 1 MSLVLLSLAA LCRSAVPREP TVQCGSETGP SPEWMLQHDL IPGDLRLRV EPVTTSVATG

[0063] 61 DYSILMNVSF VLRADASIRL LKATKICVTG KSNFQSYSCV RCNYTEAFQT QTRPSGGKWT

[0064] 121 FSYIGFPVEL NTVYFIGAHN IPNANMNEDG PSMSVNTFSP GCLDHIMKYK KCKVKAGSLW

[0065] 181 DPNITACKKN EETVEVNFTT TPLGNRYMAL IQHSTIIGFS QVFEPHQKKQ TRASVVIPVT
 [0066] 241 GDSEGATVQL TPYFPTCGSD CIRHKGTVVL CPQTGVPFPL DNNKSKPGGW LPLLLLSLLV
 [0067] 301 ATWVLVAGIY LMWRHERIKK TSFSTTTLLP PIKVLVVYPS EICFHHTICY FTEFLQNHCR
 [0068] 361 SEVILEKWQK KKAEMGPVQ WLATQKKAAD KVVFLLSNDV NSVCDGTCGK SEGSPSENSQ
 [0069] 421 DLFPLAFNLF CSDLRSQIHL HKYVVVYFRE IDTKDDYNAL SVCCKYHLMK DATAFCAELL
 [0070] 481 HVKQVSAGK RSQACHDGCC SL (서열 번호: 88)

[0071] 7.2 이중 특이적 결합 단백질

[0072] 본 개시내용은 2개의 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 이중 특이적 결합 단백질을 제공한다. 결합 단백질은 일반적으로 면역글로불린의 가변 경쇄 및 가변 중쇄 영역 또는 도메인에 상응하는 가변 경쇄 및 가변 중쇄 영역 또는 도메인을 포함한다. 결합 단백질의 적어도 하나의 항원 결합 모이어티는 당해 기술분야에서 scFv로 알려진 단일 사슬 형태이다. 일부 실시양태에서, 다른 항원 결합 모이어티는 IgG를 포함한다. 다른 실시양태에서, 다른 항원 결합 모이어티는 scFv를 포함한다.

[0073] 일부 실시양태에서, 본원에는 알라르민, 알라르민 또는 둘 모두에 대한 수용체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 방법 및 용도가 제공된다. 본원에 사용된 "항체"라는 용어 및 이의 문법적 동등어는 항원 결합 부위가 일반적으로 면역글로불린 분자의 가변 영역 내에 있는 적어도 하나의 항원 결합 부위를 통해 단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드, 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, 지질, 또는 전술한 것들 중 임의의 것의 조합과 같은 표적을 인식하고 이에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 이 용어는 항체가 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 온전한 다클론 항체, 온전한 단일클론 항체, 단일 도메인 항체(sdAbs; 예를 들어, 낙타과 항체, 알파카 항체), 단일 사슬 Fv(scFv) 항체, 중쇄 항체(HCAb), 경쇄 항체(LCAb), 다중 특이적 항체, 이중 특이적 항체, 단일 특이적 항체, 1가 항체, 및 항원 결합 부위를 포함하는 임의의 다른 변형된 면역글로불린 분자(예를 들어, 이중 가변 도메인 면역글로불린 분자)를 포함한다. 항체에는 또한 마우스 항체, 토끼 항체, 낙타 항체, 영장류 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 및 인간 항체가 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 항체는 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 지칭되는 중쇄 불변 도메인의 동일성에 기반하여, 면역글로불린의 5가지 주요 부류인 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM 또는 이의 하위 부류(이소형)(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 중 임의의 하나일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 이항화물 결합으로 상호연결된 4개의 폴리펩타이드 사슬, 2개의 중쇄(H) 사슬 및 2개의 경쇄(L) 사슬을 포함할 수 있다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서 HCVR 또는 VH로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 LCVR 또는 VL로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 달리 명시적으로 표시되지 않는 한, 본원에 사용된 "항체"라는 용어는 온전한 항체의 "항원 결합 단편"을 포함한다. 본원에 사용된 "항원 결합 단편"이라는 용어는 온전한 항체의 항원 결정 가변 영역인 온전한 항체의 일부 또는 단편을 지칭한다. 항원 결합 단편의 예로는 Fab(힌지 영역이 없는 VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편), Fab'(힌지 영역이 부착된 VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편), F(ab')₂(힌지 영역에서 이항화물 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편), Fd(VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 단편), Fv(항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 단편), 선형 항체, 단일 사슬 항체 분자(예를 들어, 재조합 수단에 의해 연결된 VL 및 VH 영역을 갖는 단일 폴리펩타이드 사슬인 scFv), 중쇄 항체(HCAb), 경쇄 항체(LCAb), 이항화물 결합된 scFv(dsscFv), 디아바디(2가, 이중 특이적 항체), 트리바디, 테트라바디, 미니바디, 이중 가변 도메인 항체(DVD), 단일 가변 도메인 항체(sdAb 또는 dAb; 예를 들어, 낙타과 항체, 알파카 항체), 및 중쇄 항체의 단일 가변 도메인(VHH), 및 항체 단편으로부터 형성된 이중 특이성 또는 다중 특이성 항체가 포함되지만 이에 제한되지 않는다. "이중 특이적" 항체 또는 결합 단백질은 2개의 상이한 항원 결합 부위를 갖는 인공 하이브리드 항체로, 2개의 상이한 표적을 인식하고 이에 특이적으로 결합한다. 이중 특이적 결합 항체 및 단백질은 하이브리도마의 융합 또는 Fab' 단편의 연결을 포함한 다양한 방법으로 생산할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Kostelny, S A et al. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) vol. 148,5 (1992): 1547-53; Songsivilai, S, and P J Lachmann. *Clinical And Experimental Immunology*, vol. 79,3 (1990): 315-21]을 참조한다.

[0074] 항체와 관련하여 사용될 때 "중쇄"라는 용어는 약 50 내지 70 kDa의 폴리펩타이드 사슬을 지칭하며, 여기서 아미노 말단 부분은 약 120 내지 130개 이상의 아미노산의 가변 영역(VH), 및 불변 영역을 포함하는 카르복시 말단 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 CH1, CH2 및 CH3의 3개의 도메인으로 구성되며, CH1

및 CH2 도메인을 연결하는 짧고 유연한 힌지 영역이 존재한다. 불변 영역은 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열을 기반으로 알파(α), 델타(δ), 엡실론(ϵ), 감마(γ) 및 뮤(μ)로 지칭되는 5가지 뚜렷한 유형 중 하나일 수 있다. 뚜렷한 중쇄는 크기가 상이하다: α , δ 및 γ 는 대략 450개의 아미노산을 포함하는 반면, μ 및 ϵ 은 대략 550개의 아미노산을 포함한다. 경쇄와 조합되면, 이러한 뚜렷한 유형의 중쇄는 IgG의 4가지 하위 분류, 즉 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하여 각각 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM의 잘 알려진 5가지 항체 부류를 생성한다. 중쇄는 인간의 중쇄일 수 있다.

[0075] 항체와 관련하여 사용될 때 "경쇄"라는 용어는 약 25 kDa의 폴리펩타이드 사슬을 지칭하며, 여기서 아미노 말단 부분은 약 100 내지 약 110개 이상의 아미노산의 가변 영역 및, 불변 영역을 포함하는 카르복시 말단 부분을 포함한다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인인 CL로 구성된다. 경쇄의 대략적인 길이는 211 내지 217개의 아미노산이다. 불변 영역의 아미노산 서열을 기반으로 카파(κ) 또는 람다(λ)로 지칭되는 두 가지 뚜렷한 유형이 있다. 경쇄 아미노산 서열은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다. 경쇄는 인간의 경쇄일 수 있다.

[0076] "가변 도메인" 또는 "가변 영역"이라는 용어는 일반적으로 경쇄 또는 중쇄의 아미노 말단에 위치하며 중쇄에서 약 120 내지 130개의 아미노산 그리고 경쇄에서 약 100 내지 110개의 아미노산의 길이를 갖는 항체의 경쇄 또는 중쇄의 일부를 지칭하며, 특정 항원에 대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에 사용된다. 가변 도메인은 상이한 항체 간에 서열이 크게 상이하다. 서열의 가변성은 CDR에 집중되는 반면, 가변 도메인에서 덜 가변적인 부분은 프레임워크 영역(FR)으로 지칭된다. 경쇄와 중쇄의 CDR은 주로 항체와 항원의 상호작용을 담당한다. 일부 실시양태에서, 각각의 VH 및 VL은 아미노 말단에서 카르복시 말단까지 다음 순서로 배열된 3개의 CDR과 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 본원에 사용된 아미노산 위치의 넘버링은 문헌[Kabat et al. (1991) Sequences of proteins of immunological interest. (U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C.) 5th ed]에서와 같이 EU 색인에 따른다.

[0077] CDR은 면역글로불린(Ig 또는 항체) VH β -시트 프레임워크의 비-프레임워크 영역 내의 3개의 초가변 영역(H1, H2 또는 H3) 중 하나, 또는 항체 VL β -시트 프레임워크의 비-프레임워크 영역 내의 3개의 초가변 영역(L1, L2 또는 L3) 중 하나를 지칭한다. 따라서, CDR은 프레임워크 영역 서열 내에 산재된 가변 영역 서열이다. CDR 영역은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 다양한 방법/시스템에 의해 정의되었다. 이러한 시스템 및/또는 정의는 수년에 걸쳐 개발되고 개선되었으며 Kabat, Chothia, IMGT, AbM 및 Contact가 포함된다. 예를 들어, Kabat는 항체 가변(V) 도메인 내에서 가장 과가변성(hypervariability)인 영역을 정의한다(Kabat, E A et al. *The Journal Of Biological Chemistry*, vol. 252,19 (1977): 6609-16.; Kabat, E A. *Advances in protein chemistry* vol. 32 (1978): 1-75.). Chothia 정의는 구조적 루프 영역의 위치를 기반으로 하며, 이는 CDR 영역 서열을 보존된 β -시트 프레임워크의 일부가 아닌 잔기로 정의하고 따라서 다양한 형태를 적응시킬 수 있다[Chothia, C, and A M Lesk. *Journal of Molecular Biology*, vol. 196,4 (1987): 901-17]. 두 용어 모두 당해 기술분야에서 잘 알려져 있다. 또한, IMGT 시스템은 서열 가변성과 가변 영역의 구조 내의 위치를 기반으로 한다. AbM 정의는 Kabat와 Chothia 사이의 절충안이다. Contact 정의는 이용 가능한 항체 결정 구조의 분석을 기반으로 한다. 항체 서열 분석 및 CDR 결정을 위해 소프트웨어 프로그램(예를 들어, abYsis)을 이용 가능하며 당업자에게 알려져 있다. 표준 항체 변수 도메인 내에서 CDR의 위치는 수많은 구조를 비교하여 결정되었다[Al-Lazikani, B et al. *Journal Of Molecular Biology*, vol. 273,4 (1997): 927-48][Morea, V et al. *Methods* (San Diego, Calif.) vol. 20,3 (2000): 267-79]. 초가변 영역 내의 잔기의 수는 항체마다 다르기 때문에, 표준 위치에 대한 추가 잔기는 통상적으로 표준 가변 도메인 넘버링 체계에서 잔기 번호 옆에 a, b, c 등으로 번호가 매겨진다. 이러한 명명법은 당업자에게 마찬가지로 잘 알려져 있다.

[0078] 예를 들어, Kabat(초가변) 또는 Chothia(구조적) 지정에 따라 정의된 CDR은 아래 표에 명시되어 있다.

	Kabat ¹	Chothia ²	루프 위치
VHCDRI	31-35	26-32	B 가닥과 C 가닥 연결
VHCDR2	50-65	53-55	C' 가닥과 C'' 가닥 연결
VHCDR3	95-102	96-101	F 가닥과 G 가닥 연결
VLCDRI	24-34	26-32	B 가닥과 C 가닥 연결
VLCDR2	50-56	50-52	C' 가닥과 C'' 가닥 연결
VLCDR3	89-97	91-96	F 가닥과 G 가닥 연결

[0079]

[0080] ¹ 잔기 번호는 상기 Kabat 등의 명명법을 따른다.

[0081] ² 잔기 번호는 상기 Chothia 등의 명명법을 따른다.

[0082] 하나 이상의 CDR을 공유 또는 비공유로 분자에 혼입하여 면역접합체(immunoadhesin)로 만들 수도 있다. 면역접합체는 CDR(들)을 더 큰 폴리펩타이드 사슬의 일부로 혼입하거나, CDR(들)을 다른 폴리펩타이드 사슬에 공유 결합하거나, CDR(들)을 비공유로 혼입할 수 있다. CDR은 면역접합체가 관심 있는 특정 항원에 결합할 수 있도록 한다.

[0083] 용어 "에피토프" 및 "항원 결정인자(antigenic determinant)"는 본원에서 상호 교환적으로 사용되며, 항체 또는 항원 결합 단편이 결합하는 표적 분자의 표면 상의 부위, 예컨대 항원 표면 상의 국소 영역을 지칭한다. 표적 분자는 단백질, 펩타이드, 핵산, 탄수화물 또는 지질을 포함할 수 있다. 면역원성 활성을 갖는 에피토프는 동물에서 면역 반응을 유도하는 표적 분자의 일부이다. 항원 활성을 갖는 표적 분자의 에피토프는 항체가 결합하는 표적 분자의 일부이며, 예를 들어, 면역검정(immunoassay)을 포함하여 당해 기술분야에 잘 알려진 임의의 방법에 의해 결정된다. 항원 에피토프가 반드시 면역원성일 필요는 없다. 에피토프는 종종 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적으로 활성화된 표면 그룹으로 이루어지며, 특정 3차원 구조적 특성뿐만 아니라 특정 전하 특성을 갖는다. "에피토프"라는 용어에는 선형 에피토프 및 구조적 에피토프가 포함된다. 에피토프에 기여하는 표적 분자(예를 들어, 폴리펩타이드)의 영역은 폴리펩타이드의 연속 아미노산일 수 있거나, 에피토프는 표적 분자의 2개 이상의 비연속 영역으로부터 함께 나올 수 있다. 에피토프는 표적 분자의 3차원 표면 특징일 수도 있고 아닐 수도 있다. 연속 아미노산으로부터 형성된 에피토프(선형 에피토프로서 지칭됨)는 전형적으로 단백질 변형 시 유지되는 반면, 3차 접합에 의해 형성된 에피토프(구조적 에피토프로서 지칭됨)는 전형적으로 단백질 변형 시 손실된다. 에피토프는 전형적으로 적어도 3개, 보다 일반적으로 적어도 5, 6, 7, 또는 8 내지 10개의 아미노산을 공유한 공간 형태로 포함한다.

[0084] 본원에 사용된 "특이적으로 결합한다"라는 용어는 폴리펩타이드 또는 분자가 관련 및 비관련 단백질을 포함한 대체 물질보다 에피토프, 단백질 또는 표적 분자에 대해 더 빈번하게, 더 빠르게, 더 긴 지속 시간으로, 더 큰 친화력으로, 또는 상기의 일부 조합으로 상호작용한다는 것을 의미한다. 표적 분자(예를 들어, 항원)에 특이적으로 결합하는 결합 모이어티(예를 들어, 항체)는, 예를 들어, 면역검정, ELISA, 생물층 간섭계(Bio-Layer Interferometry)("BLI"), SPR(예를 들어, Biacore) 또는 당업자에게 알려진 다른 기술에 의해 식별될 수 있다. 전형적으로, 특정 반응은 배경 신호 또는 노이즈의 적어도 2배가 될 것이며 배경의 10배를 초과할 수 있다. 예를 들어, 항체 특이성에 대한 논의에 대해서는 문헌[Paul, ed., 1989, Fundamental Immunology Second Edition, Raven Press, New York at pages 332-336]을 참조한다. 표적 분자에 특이적으로 결합하는 결합 모이어티는 상이한 분자에 대한 친화도보다 더 높은 친화도로 표적 분자와 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 분자에 특이적으로 결합하는 결합 모이어티는 상이한 분자에 대한 친화도보다 적어도 20배 초과, 적어도 30배 초과, 적어도 40배 초과, 적어도 50배 초과, 적어도 60배 초과, 적어도 70배 초과, 적어도 80배 초과, 적어도 90배 초과, 또는 적어도 100배 초과인 친화도로 표적 분자에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 특정 표적 분자에 특이적으로 결합하는 결합 모이어티는 본원에 기재된 임의의 검정 또는 달리 당해 기술분야에 알려진 검정을 사용하여 결합을 검출할 수 없을 정도로 낮은 친화도로 상이한 분자에 결합한다. 일부 실시양태에서, "특이적으로 결합한다"는 것은, 예를 들어, 결합 모이어티가 약 0.1 mM 이하의 K_D 로 분자 표적에 결합한다는 것을 의미한다.

[0085] 일부 실시양태에서, "특이적으로 결합한다"는 것은 폴리펩타이드 또는 분자가 약 10 μ M 이하 또는 약 1 μ M 이하의 K_D 로 표적에 결합한다는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, "특이적으로 결합한다"는 것은 폴리펩타이드 또는 분자가 약 0.1 μ M 이하, 약 0.01 μ M 이하, 또는 약 1 nM 이하의 K_D 로 표적에 결합한다는 것을 의미한다. 상이한 종의 상동 단백질 간의 서열 동일성 때문에, 특이적 결합은 하나 초과인 종에서 단백질 또는 표적을 인식하는 폴리펩타이드 또는 분자를 포함할 수 있다. 마찬가지로, 상이한 단백질의 폴리펩타이드 서열의 특정 영역 내의 상동성 때문에, 특이적 결합은 하나 초과인 단백질 또는 표적을 인식하는 폴리펩타이드 또는 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 표적에 특이적으로 결합하는 결합 모이어티(예를 들어, 항체)는 제2 표적에 특이적으로 결합할 수도 있고 그렇지 않을 수도 있는 것으로 이해된다. 따라서, "특이적으로 결합하는"은 반드시 (비록 포함할 수 있지만) 배타적 결합, 즉, 단일 표적에 결합하는 것을 필요로 하지 않는다. 따라서, 결합 모이어티(예를 들어, 항체)는, 일부 실시양태에서, 하나 초과인 표적에 특이적으로 결합할 수 있다. 예를 들어, 항체는, 특정 경우에, 2개의 동일한 항원 결합 부위를 포함할 수 있으며, 각각의 부위는 2개 이상의 단백질

에서 동일한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 특정 대체 실시양태에서, 항체는 이중 특이적일 수 있으며, 상이한 특이성을 갖는 적어도 2개의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다.

[0086] 본원에 사용된 "결합 친화도"라는 용어는 일반적으로 결합 모이어티와 표적 분자(예를 들어, 항원) 간의 비공유 상호작용의 총합의 강도를 지칭한다. 결합 모이어티와 표적 분자의 결합은 가역적 과정이며, 결합의 친화도는 전형적으로 평형 해리 상수(K_D)로서 보고된다. K_D 는 해리 속도(k_{on} 또는 k_a)에 대한 회합 속도(k_{off} 또는 k_d)의 비율이다. 결합 쌍의 K_D 가 낮을수록 친화도가 높아진다. K_A 는 평형 해리 상수의 역수이기도 한 평형 회합 상수, 즉 $= 1/K_D$ 이다. 항체-항원 상호작용의 경우, K_D 는 유리 항체와 유리 항원의 농도의 곱을 항체-항원 복합체의 농도로 나눈 비율, 즉 $[항원] \times [항체] / [항원-항체]$ 로서 계산할 수 있다.

[0087] 결합 친화도를 측정하는 다양한 방법이 당해 기술분야에 알려져 있으며, 이들 중 어떤 방법으로도 본 개시내용의 목적을 위해 사용될 수 있다. 구체적인 예시적 실시양태는 다음을 포함한다. 일부 실시양태에서, " K_D " 또는 " K_D 값"은, 예를 들어, 당해 기술분야에 알려진 검정, 예를 들어, 결합 검정으로 측정할 수 있다. K_D 는 방사선 표지된 항원 결합 검정(radiolabeled antigen binding assay: RIA)에서 측정할 수 있다(Chen, Y *et al.* *Journal of Molecular Biology*, vol. 293,4 (1999): 865-81). K_D 또는 K_D 값은 또한, 예를 들어, Gator 시스템(Probe Life) 또는 Octet-96 시스템(Sartorius, Gottingen, Germany)을 사용하여 생물층 간섭계(biolayer interferometry: BLI)를 사용하여 측정할 수도 있다. K_D 또는 K_D 값은 또한 BIAcore 시스템(예를 들어, Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ)을 사용하여 표면 플라즈몬 공명 검정을 사용하여 측정할 수도 있다.

[0088] 특정 서열 특징을 갖는 단백질 또는 폴리펩타이드("참조 단백질" 또는 "참조 폴리펩타이드")와 관련하여 본원에 사용된 "변이체"라는 용어는 참조 단백질 또는 참조 폴리펩타이드와 비교하여 (예를 들어, 약 1 내지 약 25개, 약 1 내지 약 20개, 약 1 내지 약 20개, 약 1 내지 약 15개, 약 1 내지 약 10개, 또는 약 1 내지 약 5개와 같이) 하나 이상의 아미노산 치환, 결실, 및/또는 추가를 갖는 상이한 단백질 또는 폴리펩타이드를 지칭한다. 아미노산 서열의 변화는 아미노산 치환일 수 있다. 아미노산 서열의 변화는 보존적(conservative) 아미노산 치환일 수 있다. 단백질 또는 폴리펩타이드의 기능적 단편 또는 기능적 변이체는 참조 단백질 또는 폴리펩타이드의 기본 구조적 및 기능적 특성을 유지한다.

[0089] 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드", "단백질" 및 본원에 상호 교환적으로 사용되는 이들의 문법적 동등어는 선형 또는 분지형일 수 있는 임의의 길이의 아미노산 중합체를 지칭한다. 여기에는 비자연적 또는 변형된 아미노산이 포함되거나 비아미노산에 의해 중단될 수 있다. 폴리펩타이드, 펩타이드, 또는 단백질은 또한, 예를 들어, 이황화물 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 임의의 다른 조작 또는 변형으로 변형될 수 있다.

[0090] 용어 "폴리뉴클레오티드", "핵산" 및 본원에 상호 교환적으로 사용되는 이들의 문법적 동등어는 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체를 의미하며, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드 또는 염기, 및/또는 이들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 폴리머라제에 의해 중합체에 혼입될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 핵산 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다.

[0091] 본원에 사용된 바와 같이, "암호화"라는 용어 및 이의 문법적 동등어는 폴리뉴클레오티드 또는 핵산, 예컨대 유전자, cDNA, 또는 mRNA에서 특정 뉴클레오티드 서열의 고유 특성을 지칭하며, 정의된 뉴클레오티드 서열(즉, rRNA, tRNA 및 mRNA) 또는 정의된 아미노산 서열과 그로부터 발생하는 생물학적 특성을 갖는 생물학적 과정에서 다른 중합체 및 거대분자의 합성을 위한 템플릿 역할을 한다. 따라서, 유전자는 해당 유전자에 상응하는 mRNA의 전사 및 번역이 단백질을 생성하는 경우 단백질을 암호화한다. 달리 명시되지 않는 한, "아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열"에는 서로의 퇴화 버전이고 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 모든 뉴클레오티드 서열이 포함된다. 단백질 및 RNA를 암호화하는 뉴클레오티드 서열에는 인트론이 포함될 수 있다.

[0092] "단리된" 폴리펩타이드, 펩타이드, 단백질, 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포, 또는 조성물은 자연에서 발견되지 않는 형태로 존재하는 폴리펩타이드, 펩타이드, 단백질, 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포, 또는 조성물이다. 단리된 폴리펩타이드, 펩타이드, 단백질, 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포, 또는 조성물에는 더 이상 자연에서 발견되는 형태가 아닌 정도로 정제된 것들이 포함된다. 일부 실시양태에서, 단리된 폴리펩타이드, 펩타이드, 단백질, 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포, 또는 조성물은 실질적으로 순수하다. 일부 실시양태에서, 단리된 폴리펩타이드, 펩타이드, 단백질, 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포, 또는 조성물은 다른 세포

물질 및/또는 화합물이 실질적으로 없다.

[0093] 2개 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드의 맥락에서 본원에서 사용되는 용어 "동일한", "동일성" 퍼센트 및 이들의 문법적 동등어는 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존적 아미노산 치환을 고려하지 않고 최대 대응성을 위해 비교 및 정렬될 때(필요한 경우, 갭을 도입할 때) 동일하거나, 지정된 백분율의 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기를 갖는 2개 이상의 서열 또는 하위 서열을 지칭한다. 동일성 퍼센트는 서열 비교 소프트웨어 또는 알고리즘을 사용하거나 시각적 검사에 의해 측정할 수 있다. 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열의 정렬을 얻기 위해 사용될 수 있는 다양한 알고리즘 및 소프트웨어가 당해 기술분야에 잘 알려져 있다. 여기에는 BLAST, ALIGN, Megalign, BestFit, GCG Wisconsin Package 및 그 변형이 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 2개의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 실질적으로 동일하며, 이는 서열 비교 알고리즘을 사용하거나 시각적 검사에 의해 측정될 때 최대 대응성을 위해 비교 및 정렬될 때 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 일부 실시양태에서는 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기 동일성을 갖는다는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 동일성은 적어도 약 10개의 잔기, 적어도 약 20개의 잔기, 적어도 약 40 내지 60개의 잔기, 적어도 약 60 내지 80개의 잔기 길이 또는 그 사이의 임의의 적분 값인 아미노산 서열의 영역에 걸쳐 존재한다. 일부 실시양태에서, 동일성은 적어도 약 80 내지 100개의 잔기와 같은 60 내지 80개의 잔기보다 더 긴 영역에 걸쳐 존재하며, 일부 실시양태에서, 서열은 표적 단백질 또는 항체의 암호화 영역과 같이, 비교되는 서열의 전장에 걸쳐 실질적으로 동일하다. 일부 실시양태에서, 동일성은 적어도 약 10개의 염기, 적어도 약 20개의 염기, 적어도 약 40 내지 60개의 염기, 적어도 약 60 내지 80개의 염기 길이 또는 그 사이의 임의의 적분 값인 뉴클레오타이드 서열의 영역에 걸쳐 존재한다. 일부 실시양태에서, 동일성은 적어도 약 80 내지 1000개 이상의 염기와 같은 60 내지 80개의 염기보다 더 긴 영역에 걸쳐 존재하며, 일부 실시양태에서 서열은 관심 있는 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열과 같이 비교되는 서열의 전장에 걸쳐 실질적으로 동일하다.

[0094] 본원에 사용된 "보존적 아미노산 치환"은 하나의 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 또 다른 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 본원에 사용된 "보존적으로 유사한" 아미노산 또는 잔기는 유사한 측쇄를 갖는 동일하지 않은 아미노산 잔기를 지칭한다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 계열은 당해 기술분야에서 정의되어 있으며, 여기에는 염기성 측쇄(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 하전되지 않은 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)가 포함된다.

[0095] 본원에 사용된 "벡터"라는 용어는 및 이의 문법적 동등어는 유전 물질(예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 서열)을 운반하는 데 사용되는 비히클을 지칭하며, 이는 숙주 세포 내로 도입되어 여기서 복제 및/또는 발현될 수 있다. 사용에 적용 가능한 벡터는, 예를 들어, 발현 벡터, 플라스미드, 파지 벡터, 바이러스 벡터, 에피솜 및 인공 염색체를 포함하며, 여기에는 숙주 세포의 염색체로의 안정적인 통합을 위해 작동 가능한 선택 서열 또는 마커를 포함할 수 있다. 또한, 벡터는 하나 이상의 선택 가능한 마커 유전자 및 적절한 발현 제어 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 포함될 수 있는 선택 가능한 마커 유전자는 항생제 또는 독소에 대한 내성을 제공하거나, 영양 요구(auxotrophic) 결핍을 보완하거나, 배양 배지에 없는 중요한 영양소를 공급한다. 발현 제어 서열은 항상성 및 유도성 프로모터, 전사 증진제, 전사 종결자 등을 포함할 수 있으며 이들은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다. 2개 이상의 폴리뉴클레오타이드가 공동 발현될 경우, 두 폴리뉴클레오타이드 모두는, 예를 들어, 단일 발현 벡터 또는 별도의 발현 벡터에 삽입할 수 있다. 단일 벡터 발현의 경우, 암호화 폴리뉴클레오타이드는 하나의 공통 발현 제어 서열에 작동적으로 연결되거나, 하나의 유도성 프로모터 및 하나의 항상성 프로모터와 같은 다른 발현 제어 서열에 연결될 수 있다. 숙주 세포로의 폴리뉴클레오타이드의 도입은 당해 기술분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 확인할 수 있다. 당업자에게는 폴리뉴클레오타이드가 원하는 생성물(예를 들어, 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG)을 생성하기에 충분한 양으로 발현된다는 것이 이해되며, 또한 당해 기술분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 충분한 발현을 얻기 위해 발현 수준을 최적화할 수 있다는 것도 이해된다.

[0096] 본원에 사용된 바와 같이, "숙주 세포"라는 용어는 재조합 발현 벡터와 같은 유전 물질이 도입될 수 있거나 도입된 세포를 지칭한다. 숙주 세포는 외인성 유전 물질로 도입된 대상 세포뿐만 아니라 이러한 세포의 자손도 포함한다. 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 후속 세대에서 특정 변형이 발생할 수 있기 때문에 이러한 자손은 부모 세포와 동일하지 않을 수 있다.

[0097] 본원에 사용되고 당해 기술분야에서 이해되는 바와 같이, "EC"는 제제(예를 들어, 항체)의 유효 농도를 의미하

며, 용량-반응 곡선에서 일반적으로 사용된다. 제제의 "효과"는 긍정적(활성화적) 효과일 수도 있거나 부정적 효과일 수도 있다. "EC50"이라는 용어는 절반 최대 반응(half-maximal response)을 제공하는 활성 제제(예를 들어, 항체)의 농도를 지칭한다. 또한, 본원에 사용되고 당해 기술분야에서 이해되는 바와 같이, "IC"는 억제 효과가 있는 제제의 농도를 의미하며, 또한 용량-반응 곡선에도 일반적으로 사용된다. "IC50"이라는 용어는 억제하는 활성이 절반으로 감소되는 제제(예를 들어, 항체)의 농도를 지칭한다.

[0098] 상기 섹션에서 설명한 바와 같이, 이중 특이적 결합 단백질은 이항화물 결합을 통해 함께 연결된 2개의 폴리펩타이드를 포함할 수 있으며, 각 폴리펩타이드는 각각의 N- 및 C-말단에서 제1 scFv 영역 및 제2 scFv 영역을 포함한다. 두 scFv 영역은 상이한 항원에 특이적으로 결합한다. 각각의 폴리펩타이드의 제1 scFv 영역과 제2 scFv 영역 사이에는 면역글로불린의 힌지, CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 서열이 있다.

[0099] 대안적으로, 이중 특이적 결합 단백질은 각각의 CH3 도메인의 C-말단(terminal end)에 연결된 scFv 영역을 갖는 IgG를 포함할 수 있다. 이 경우, IgG의 Fab 영역에 있는 가변 중쇄 및 경쇄는 하나의 항원에 특이적으로 결합하고, C-말단 scFv 영역은 제2 항원에 특이적으로 결합하는 다양한 가변 중쇄 및 경쇄를 포함한다.

[0100] 상기 언급한 바와 같이, 이중 특이적 결합 단백질은 2개의 도메인을 통해 2개의 상이한 항원에 결합할 수 있는데, 하나는 항원 X에 결합하는 N-말단에, 그리고 다른 하나는 항원 Y에 결합하는 C-말단에 있다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 알라르민 수용체의 제1 도메인과 알라르민의 제2 도메인에 결합한다. 일 특정 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 제1 도메인을 통해 결합함으로써 IL17RB 활성화를 억제하고, 제2 도메인을 통해 TSLP와 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 제1 도메인을 통해 결합함으로써 IL17RB 활성화를 억제하고, 제2 도메인을 통해 IL33에 결합한다.

[0101] 일 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 하기 화학식의 2개의 폴리펩타이드를 포함한다:

[0102] $X-H-Fc-L-scFv^Y$

[0103] 상기 식에서, X는 $scFv^X$ 또는 Fab 영역이고, 여기서 X는 제1 항원에 특이적으로 결합하고, $scFv^Y$ 는 제2 항원에 특이적으로 결합하고, H는 힌지 영역이고, Fc는 면역글로불린의 CH2 및 CH3 영역을 포함하고, $scFv^X$ 및 $scFv^Y$ 는 각각 독립적으로 단일 사슬 가변 단편이고, L은 폴리펩타이드 링커이다. 일부 실시양태에서, 두 항원 중 하나는 면역조절 단백질이고 다른 하나는 알라르민이다. 일부 실시양태에서, X가 Fab 영역인 경우, 제1 항원은 면역조절 단백질이고 다른 항원은 알라르민이다. 일부 실시양태에서, X가 Fab 영역인 경우, 제1 항원은 알라르민이고 다른 항원은 면역조절 단백질이다.

[0104] 일 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 하기 화학식의 2개의 폴리펩타이드를 포함한다:

[0105] $X-H-Fc-L-ECD^Y$

[0106] 상기 식에서, X는 $scFv^X$ 또는 Fab 영역이고, 여기서 X는 제1 항원에 특이적으로 결합하고, ECD^Y 는 알라르민 수용체의 세포외 도메인이고, H는 힌지 영역이고, Fc는 면역글로불린의 CH2 및 CH3 영역을 포함하고, $scFv^X$ 는 단일 사슬 가변 단편이고, L은 폴리펩타이드 링커이다. 일부 실시양태에서, 두 항원 중 하나는 면역조절 단백질이고, 다른 하나는 알라르민 수용체의 세포외 도메인이다. 일부 실시양태에서, X가 Fab 영역인 경우, 제1 항원은 면역조절 단백질이고 다른 항원은 알라르민이다. 일부 실시양태에서, ECD^Y 는 TSLP 수용체 세포외 도메인이다. 일부 실시양태에서, ECD^Y 는 IL-33 수용체 세포외 도메인이다.

[0107] 이중 특이적 결합 단백질에 혼입된 VH 및 VL 사슬은 기존 항체, 새로 생성된 항체, VH 및 VL 사슬 라이브러리를 포함한 여러 소스로부터 유도될 수 있다. 이중 특이적 결합 단백질에 혼입될 수 있는 VH 및 VL 사슬의 구체적인 예시적 실시양태뿐만 아니라, 면역조절 단백질의 결합을 위해 경쟁하는 이중 특이적 결합 단백질, 예컨대 IL17RB 또는 TSLPR의 구체적인 예시적 실시양태가 상세한 설명 섹션에 제공된다.

[0108] 본 개시내용의 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산이 본원에 제공된다. 폴리펩타이드를 생산하고, 숙주 세포를 배양하고, 폴리펩타이드를 회수하는 방법도 또한 제공되며, 아래의 상세한 설명에서 추가로 논의된다.

[0109] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질을 포함하는 조성물을 제공한다. 조성물은 일반적으로 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 이중 특이적 결합 단백질, 및/또는 이의 염, 및 하나 이

상의 부형제, 담체 또는 희석제를 포함한다.

- [0110] 현재의 항알라르민 항체 요법은 AD 및 중등도-중증 천식에 미치는 영향이 제한적이다. 구체적으로, 항-TSLP 항체인 테제펠루맵과 항-IL-33 항체인 에토키맵에 대한 2상 임상 시험은 각각 1차 평가변수를 충족하지 못했다. 그러나, 천식 치료의 경우, 테제펠루맵과 이테페키맵 둘 모두 이들의 제한적인 치료 효과에도 불구하고 2상 시험과 3상 시험에서 둘 모두 1차 평가변수를 충족하였다: 테제펠루맵은 OCS 사용의 1일 용량을 감소시키지 못했고, 이테페키맵은 두필루맵보다 비교적 열등했다. 본원에 기재된 이중 특이적 단백질은 알라르민 수용체 및 알라르민과 같은 2개의 항원에 특이적으로 결합하고, 2개의 상이한 알라르민에 의해 유도된 면역 반응을 차단한다. 알라르민 유도 반응의 이러한 억제는 잠재적으로 알레르기 질환 또는 장애에서 덜 빈번한 투약 및 더 오래 지속되는 질환 관해를 허용한다.
- [0111] 일부 실시양태에서, 본원에는 천식과 같은 Th2-고/또는 Th2-저 면역학적 장애의 치료에서 OCS 1일 용량의 감소를 위한 약제를 제조하기 위한 알라르민 및/또는 알라르민 수용체에 특이적으로 결합하는 이의 이중 특이적 결합 단백질의 용도가 제공된다. 상기 설명한 용도에서, 이중 특이적 결합 단백질은 (a) IL-25 신호전달 및 TSLP 신호전달을 둘 모두 차단하고/하거나, (b) IL-25 신호전달 및 IL-33 신호전달을 둘 모두 차단한다. 일부 실시양태에서, 이의 이중 특이적 결합 단백질은 인간 IL-17RB 및 TSLP에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 이의 이중 특이적 결합 단백질은 인간 IL-17RB 및 IL-33에 특이적으로 결합한다.
- [0112] 또한, 본원에는 IL-17RB 및 TSLP, 또는 IL-17RB 및 IL-33에 특이적으로 결합하는 이중 특이적 결합 단백질의 치료학적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 알레르기 질환 또는 장애를 알레르기 질환 또는 장애 치료를 필요로 하는 대상체에서 치료하는 방법이 제공되며, 여기서 이중 특이적 결합 단백질은 (a) IL-25 신호전달과 TSLP 신호전달을 둘 모두 차단하고/하거나, (b) IL-25 신호전달과 IL-33 신호전달을 둘 모두 차단한다. 일부 실시양태에서, 이의 이중 특이적 결합 단백질은 인간 IL-17RB 및 TSLP, 또는 인간 IL-17RB 및 IL-33에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 알레르기 질환 또는 장애는 AD 및 천식이다. 일부 실시양태에서, 알레르기 질환 또는 장애는 전임상 AD 및 천식이다.
- [0113] 본원에 사용된 바와 같이, 질환 또는 병태, 또는 질환 또는 병태를 가진 대상체와 관련하여 "치료하다"라는 용어 및 그 문법적 동등어는 증상, 증상의 중증도, 및/또는 치료되는 질환 또는 장애와 관련된 증상의 빈도를 억제, 제거, 감소, 및/또는 개선하는 행위를 지칭한다. 예를 들어, AD와 관련하여 사용될 때, "치료"라는 용어 및 그 문법적 동등어는 (a) 질환 관해를 달성하기 위해 투여 빈도를 감소시키거나, 질환 재발의 발생률을 감소시키거나, (b) EASI(Eczema Area and Severity Index)로 정량화된 AD와 관련된 하나 이상의 증상을 지연, 개선 또는 최소화하거나, (c) OCS 사용의 양과 빈도를 감소시키는 것을 포함하지만 이제 제한되지 않는, 질환의 중증도를 감소시키거나, 질환의 진행을 지연 또는 늦추는 행위를 지칭한다.
- [0114] "차단"이라는 용어 및 이의 문법적 동등어는 (a) 알라르민의 이의 상응하는 수용체에 대한 결합 부위에 대해 직접 경쟁하거나, (b) 상응하는 수용체의 이중이량체화(heterodimerization)를 방지하여 알라르민 점유에 의해 유도된 생물학적 효과를 감소시키는 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는 방식으로 알라르민의 생물학적 기능을 감소시키는 행위를 지칭한다.
- [0115] 본원에 사용된 바와 같이, "투여"라는 용어 및 이의 문법적 동등어는 본원에 기재되어 있거나 달리 당해 기술분야에 알려진 방법에 의해 치료제 또는 약제학적 조성물을 대상체의 신체에 전달하거나 전달되도록 하는 행위를 지칭한다. 치료제는 화합물, 폴리펩타이드 또는 세포일 수 있다. 치료제 또는 약제학적 조성물을 투여하는 것은 치료제 또는 약제학적 조성물을 대상체의 신체에 전달되도록 처방하는 것을 포함한다. 예시적 투여 형태에는 정제, 캡슐, 시럽, 현탁액과 같은 경구 투여 형태; 정맥내(IV), 근육내(IM) 또는 복강내(IP)와 같은 주사용 투여 형태; 피하(SC), 크림, 젤리, 분말 또는 패치를 포함한 경피 투여 형태; 흡착 투여 형태; 흡입 분말, 스프레이, 현탁액, 및 직장 좌약이 포함된다.
- [0116] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "유효량", "치료학적 유효량" 및 이들의 문법적 동등어는 대상체에게 투여될 때 질환, 장애 또는 병태의 임의의 증상, 양태 또는 특성에 임의의 검출 가능한 긍정적 영향을 미칠 수 있는 양으로 단독으로 또는 약제학적 조성물의 일부로서, 그리고 단일 용량으로 또는 일련의 용량의 일부로서 대상체에게 제제를 투여하는 것을 지칭한다. 치료학적 유효량은 관련 생리학적 효과를 측정하여 확인할 수 있다, 필요한 정확한 양은 대상체의 연령, 체중 및 일반적인 상태, 치료되는 병태의 중증도, 임상상의 판단 등에 좌우되어 대상체마다 다르다. 치료학적 유효량은 또한 치료제의 임의의 독성 또는 유해한 효과가 치료학적으로 유익한 효과보다 더 큰 양이기도 하다. 임의의 개별 경우에서 적절한 "유효량"은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중과 같은 인자에 따라 달라질 수 있으며, 일상적인 실험을 사용하여 당업자에 의해 결정될 수 있다. "예방적 유효량"

은 원하는 예방적 결과, 예를 들어, 질환 또는 장애의 발병을 지연 또는 예방을 달성하기 위해 필요한 투여량 및 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다. 전형적으로, 예방적 용량이 질환 이전 또는 질환 초기 단계의 대상체에 서 사용되기 때문에, 예방학적 유효량은 일반적으로 치료학적 유효량보다 적다.

[0117] 본원에 사용된 "대상체"라는 용어는 인간, 비인간 영장류, 개, 고양이, 설치류 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 동물(예를 들어, 포유류)을 지칭하며, 이들은 특정 치료의 수혜자가 될 것이다.

[0118] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 이중 특이적 결합 단백질은 (a) 인간 PBMC로부터의 IL5/CCL17/IL13/CCL8/IFN γ 분비를 억제하고/하거나 (b) ILC2 이동 및 증식을 억제한다. 따라서, 본원에 개시된 이중 특이적 결합 단백질은 ILC2 활성을 직접 억제함으로써 오래 지속되는 효능을 입증한다. 또한, 본원에 개시된 방법은 Th2 및 ILC2 세포 이동을 감소시키는 추가적인 치료 이점을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에는 본원에 개시된 항-IL17RB/항-TSLP 또는 항-IL17RB/항-IL33 이중 특이적 결합 단백질을 사용하여 OCS 내성-연관 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 제공된다.

[0119] 본원에 제공되는 방법은 알레르기 질환 또는 장애를 치료할 수 있다. 알레르기 질환 또는 장애는 임상 또는 전 임상 알레르기 천식, 알레르기 비부비동염, 알레르기 결막염 또는 AD일 수 있다.

[0120] 비록 상기 적응증이 바람직하지만, 다른 질환, 장애, 또는 병태는 본원에 개시된 바와 같은 이중 특이적 항원 결합 단백질을 대상체에게 투여하여 치료하거나 예방할 수 있다. 이러한 질환, 장애 및 병태에는 염증, 자가면역 질환, 연골 염증, 섬유 질환 및/또는 뼈 분해, 관절염, 류마티스 관절염, 소아 관절염, 소아 류마티스 관절염, 소수관절형(pauciarticular) 소아 관절염, 다관절 소아 류마티스 관절염, 전신성 발병 소아 류마티스 관절염, 소아 강직성 척추염, 소아 장병성 관절염, 소아 반응성 관절염, 소아 라이터 증후군(juvenile Reiter's Syndrome), SEA 증후군(혈청 음성, 엔테소파티(Entesopathy), 관절병 증후군), 소아 피부근염, 소아 건선성 관절염, 소아 경피증, 소아 전신 홍반성 루푸스, 소아 혈관염, 소수관절형 류마티스 관절염, 다관절 류마티스 관절염, 전신성 발병 류마티스 관절염, 강직성 척추염, 장병성 관절염, 반응성 관절염, 라이터 증후군, SEA 증후군(혈청 음성, 엔테소파티, 관절병 증후군), 피부근염, 건선성 관절염, 경피증, 전신성 홍반성 루푸스, 혈관염, 근염, 다발성 근염, 피부근염, 골관절염, 결절성 다발성 동맥염, 베게너 육아종증(Wegener's granulomatosis), 동맥염, 류마티스성 다발성 근육통, 유육종증, 경피증, 경화증, 원발성 담즙성 경화증, 경화성 담관염, 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 건선, 판상 건선, 물방울 모양 건선(guttate psoriasis), 역위 건선, 농포성 건선, 홍피성 건선(erythrodermic psoriasis), 피부염, AD, 족상동맥경화증, 루푸스, 스틸병(Still's disease), 전신성 홍반 루푸스(Systemic Lupus Erythematosus: SLE), 중증 근무력증, 염증성 장 질환 (inflammatory bowel disease: IBD), 크론병(Crohn's disease), 켈양성 대장염, 셀리악병(celiac disease), 다발성 경화증(multiple sclerosis: MS), 천식, COPD, 길랭-바레병(Guillain-Barre disease), 1형 당뇨병, 그레이브스병(Graves' disease), 애디슨병(Addison's disease), 레이노 현상(Raynaud's phenomenon), 자가면역 간염, GVHD 등이 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 치료학적 유효량의 항-IL17RB/항-TSLP 이중 특이적 결합 단백질을 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 항-IL17RB/항-IL33 이중 특이적 결합 단백질의 치료학적 유효량을 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

[0121] 본원에 제시된 데이터에 기반하여, 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질로 알레르기 질환 또는 장애가 있는 대상체를 치료하는 것은 치료 이점을 제공할 것으로 기대된다.

[0122] 7.2.1 예시적인 항-IL17RB/항알라르민 이중 특이적 결합 단백질

[0123] 본 발명은 면역글로불린 사슬의 C-말단 각각에서 (a) 특정 알라르민에 특이적인 단일 사슬 변수 단편(scFv) 또는 (b) 알라르민 수용체의 세포외 도메인에 융합된 알라르민 수용체에 대한 특이성을 갖는 면역글로불린 G 항체(IgG)를 포함하는 이중 특이적 결합 단백질을 제공한다.

[0124] 일부 실시양태에서, 본 발명은 IgG 및 2개의 scFv를 포함하는 이중 특이적 항체를 제공하며, 여기서 (a) 상기 IgG는 2개의 중쇄(HC) 및 2개의 경쇄(LC)를 포함하고, 각각의 HC는 중쇄 CDR(HCDR)을 1 내지 3개 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR1)을 포함하고 각각의 경쇄는 경쇄 CDR(LCDR)을 1 내지 3개 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR1)을 포함하며, 여기서 HCDR1의 아미노산 서열은 서열 번호: 1이고, HCDR2의 아미노산 서열은 서열 번호: 2이고, HCDR3의 아미노산 서열은 서열 번호: 3이고, LCDR1의 아미노산 서열은 서열 번호: 4이고, LCDR2의 아미노산 서열은 서열 번호: 5이고, LCDR3의 아미노산 서열은 서열 번호: 6이고; (b) 각각의 scFv는 중쇄 가변 영역(HCVR2) 및 경쇄 가변 영역(LCVR2)을 포함하고, HCVR2는 HCDR을 4 내지 6개 포함하고, LCVR2는 LCDR을 4 내지 6개 포함하며, 여기서 HCDR4의 아미노산 서열은 서열 번호: 7이고, HCDR5의 아미노산 서열은 서열 번호: 8이고, HCDR6의

아미노산 서열은 서열 번호: 9이고, LCDR4의 아미노산 서열은 서열 번호: 10이고, LCDR5의 아미노산 서열은 서열 번호: 11이고, LCDR6의 아미노산 서열은 서열 번호: 12이며, 여기서 각각의 scFv는 각각의 scFv의 HCVR2의 N-말단에서 폴리펩타이드 링커(L1)를 통해 각각의 IgG HC의 C-말단에서 상기 IgG 항체에 연결되며, 여기서 각각의 scFv의 HCVR2는 HCVR2의 C-말단에서 동일한 scFv의 LCVR2의 N-말단에서 제2 폴리펩타이드 링커(L2)를 통해 동일한 scFv의 LCVR2에 연결된다. 일부 실시양태에서, 이의 HCDR 변이체는 서열 번호: 1 내지 3에서 최대 약 3개, 약 5개, 약 8개, 약 10개, 약 12개, 또는 약 15개의 아미노산 치환, 추가 및/또는 결실을 갖는다. 일부 실시양태에서, 이의 LCDR 변이체는 서열 번호: 4 내지 6에서 최대 약 3개, 약 5개, 약 8개, 약 10개, 약 12개, 또는 약 15개의 아미노산 치환, 추가 및/또는 결실을 갖는다.

[0125]

일부 실시양태에서, 본 발명은 IgG 및 2개의 scFv를 포함하는 이중 특이적 항체를 제공하며, 여기서 (a) 상기 IgG는 2개의 중쇄(HC) 및 2개의 경쇄(LC)를 포함하고, 각각의 HC는 중쇄 CDR(HCDR)을 1 내지 3개 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR1)을 포함하고 각각의 경쇄는 경쇄 CDR(LCDR)을 1 내지 3개 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR1)을 포함하며, 여기서 HCDR1의 아미노산 서열은 서열 번호: 1이고, HCDR2의 아미노산 서열은 서열 번호: 2이고, HCDR3의 아미노산 서열은 서열 번호: 3이고, LCDR1의 아미노산 서열은 서열 번호: 4이고, LCDR2의 아미노산 서열은 서열 번호: 5이고, LCDR3의 아미노산 서열은 서열 번호: 6이고; (b) 각각의 scFv는 중쇄 가변 영역(HCVR2) 및 경쇄 가변 영역(LCVR2)을 포함하고, HCVR2는 HCDR을 4 내지 6개 포함하고, LCVR2는 LCDR을 4 내지 6개 포함하며, 여기서 HCDR4의 아미노산 서열은 서열 번호: 36이고, HCDR5의 아미노산 서열은 서열 번호: 37이고, HCDR6의 아미노산 서열은 서열 번호: 38이고, LCDR4의 아미노산 서열은 서열 번호: 39이고, LCDR5의 아미노산 서열은 서열 번호: 40이고, LCDR6의 아미노산 서열은 서열 번호: 41이며, 여기서 각각의 scFv는 각각의 scFv의 HCVR2의 N-말단에서 폴리펩타이드 링커(L1)를 통해 각각의 IgG HC의 C-말단에서 상기 IgG 항체에 연결되며, 여기서 각각의 scFv의 HCVR2는 HCVR2의 C-말단에서 동일한 scFv의 LCVR2의 N-말단에서 제2 폴리펩타이드 링커(L2)를 통해 동일한 scFv의 LCVR2에 연결된다. 일부 실시양태에서, 이의 HCDR 변이체는 서열 번호: 1 내지 3에서 최대 약 3개, 약 5개, 약 8개, 약 10개, 약 12개, 또는 약 15개의 아미노산 치환, 추가 및/또는 결실을 갖는다. 일부 실시양태에서, 이의 LCDR 변이체는 서열 번호: 4 내지 6에서 최대 약 3개, 약 5개, 약 8개, 약 10개, 약 12개, 또는 약 15개의 아미노산 치환, 추가 및/또는 결실을 갖는다.

[0126]

일부 실시양태에서, 본 발명은 IgG 및 2개의 scFv를 포함하는 이중 특이적 항체를 제공하며, 여기서 (a) 상기 IgG는 2개의 중쇄(HC) 및 2개의 경쇄(LC)를 포함하고, 각각의 HC는 중쇄 CDR(HCDR)을 1 내지 3개 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR1)을 포함하고 각각의 경쇄는 경쇄 CDR(LCDR)을 1 내지 3개 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR1)을 포함하며, 여기서 HCDR1의 아미노산 서열은 서열 번호: 1이고, HCDR2의 아미노산 서열은 서열 번호: 2이고, HCDR3의 아미노산 서열은 서열 번호: 3이고, LCDR1의 아미노산 서열은 서열 번호: 4이고, LCDR2의 아미노산 서열은 서열 번호: 5이고, LCDR3의 아미노산 서열은 서열 번호: 6이고; (b) 각각의 scFv는 중쇄 가변 영역(HCVR2) 및 경쇄 가변 영역(LCVR2)을 포함하고, HCVR2는 HCDR을 4 내지 6개 포함하고, LCVR2는 LCDR을 4 내지 6개 포함하고, 여기서 HCDR4의 아미노산 서열은 서열 번호: 42이고, HCDR5의 아미노산 서열은 서열 번호: 43이고, HCDR6의 아미노산 서열은 서열 번호: 44이고, LCDR4의 아미노산 서열은 서열 번호: 45이고, LCDR5의 아미노산 서열은 서열 번호: 46이고, LCDR6의 아미노산 서열은 서열 번호: 47이며, 여기서 각각의 scFv는 각각의 scFv의 HCVR2의 N-말단에서 폴리펩타이드 링커(L1)를 통해 각각의 IgG HC의 C-말단에서 상기 IgG 항체에 연결되며, 여기서 각각의 scFv의 HCVR2는 HCVR2의 C-말단에서 동일한 scFv의 LCVR2의 N-말단에서 제2 폴리펩타이드 링커(L2)를 통해 동일한 scFv의 LCVR2에 연결된다. 일부 실시양태에서, 이의 HCDR 변이체는 서열 번호: 1 내지 3에서 최대 약 3개, 약 5개, 약 8개, 약 10개, 약 12개, 또는 약 15개의 아미노산 치환, 추가 및/또는 결실을 갖는다. 일부 실시양태에서, 이의 LCDR 변이체는 서열 번호: 4 내지 6에서 최대 약 3개, 약 5개, 약 8개, 약 10개, 약 12개, 또는 약 15개의 아미노산 치환, 추가 및/또는 결실을 갖는다.

[0127]

일부 실시양태에서, 본 발명은 IgG 및 2개의 scFv를 포함하는 이중 특이적 항체를 제공하며, 여기서 (a) 상기 IgG는 2개의 중쇄(HC) 및 2개의 경쇄(LC)를 포함하고, 각각의 HC는 중쇄 CDR(HCDR)을 1 내지 3개 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR1)을 포함하고 각각의 경쇄는 경쇄 CDR(LCDR)을 1 내지 3개 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR1)을 포함하며, 여기서 HCDR1의 아미노산 서열은 서열 번호: 1이고, HCDR2의 아미노산 서열은 서열 번호: 2이고, HCDR3의 아미노산 서열은 서열 번호: 3이고, LCDR1의 아미노산 서열은 서열 번호: 4이고, LCDR2의 아미노산 서열은 서열 번호: 5이고, LCDR3의 아미노산 서열은 서열 번호: 6이고; (b) 각각의 scFv는 중쇄 가변 영역(HCVR2) 및 경쇄 가변 영역(LCVR2)을 포함하고, HCVR2는 HCDR을 4 내지 6개 포함하고, LCVR2는 LCDR을 4 내지 6개 포함하며, 여기서 HCDR4의 아미노산 서열은 서열 번호: 13이고, HCDR5의 아미노산 서열은 서열 번호: 14이고, HCDR6의 아미노산 서열은 서열 번호: 15이고, LCDR4의 아미노산 서열은 서열 번호: 16이고, LCDR5의 아미노산 서열은 서열 번호: 17이고, LCDR6의 아미노산 서열은 서열 번호: 18이며, 여기서 각각의 scFv는 각각의 scFv의 HCVR2의

N-말단에서 폴리펩타이드 링커(L1)를 통해 각각의 IgG HC의 C-말단에서 상기 IgG 항체에 연결되며, 여기서 각각의 scFv의 HCVR2는 HCVR2의 C-말단에서 동일한 scFv의 LCVR2의 N-말단에서 제2 폴리펩타이드 링커(L2)를 통해 동일한 scFv의 LCVR2에 연결된다. 일부 실시양태에서, 이의 HCDR 변이체는 서열 번호: 1 내지 3에서 최대 약 3개, 약 5개, 약 8개, 약 10개, 약 12개, 또는 약 15개의 아미노산 치환, 추가 및/또는 결실을 갖는다. 일부 실시양태에서, 이의 LCDR 변이체는 서열 번호: 4 내지 6에서 최대 약 3개, 약 5개, 약 8개, 약 10개, 약 12개, 또는 약 15개의 아미노산 치환, 추가 및/또는 결실을 갖는다.

[0128] 일부 실시양태에서, 본 발명은 IgG 및 2개의 scFv를 포함하는 이중 특이적 항체를 제공하며, 여기서 (a) 상기 IgG는 2개의 중쇄(HC) 및 2개의 경쇄(LC)를 포함하고, 각각의 HC는 중쇄 CDR(HCDR)을 1 내지 3개 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR1)을 포함하고 각각의 경쇄는 경쇄 CDR(LCDR)을 1 내지 3개 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR1)을 포함하며, 여기서 HCDR1의 아미노산 서열은 서열 번호: 1이고, HCDR2의 아미노산 서열은 서열 번호: 2이고, HCDR3의 아미노산 서열은 서열 번호: 3이고, LCDR1의 아미노산 서열은 서열 번호: 4이고, LCDR2의 아미노산 서열은 서열 번호: 5이고, LCDR3의 아미노산 서열은 서열 번호: 6이고; (b) 각각의 scFv는 중쇄 가변 영역(HCVR2) 및 경쇄 가변 영역(LCVR2)을 포함하고, HCVR2는 HCDR을 4 내지 6개 포함하고, LCVR2는 LCDR을 4 내지 6개 포함하며, 여기서 HCDR4의 아미노산 서열은 서열 번호: 48이고, HCDR5의 아미노산 서열은 서열 번호: 49이고, HCDR6의 아미노산 서열은 서열 번호: 50이고, LCDR4의 아미노산 서열은 서열 번호: 51이고, LCDR5의 아미노산 서열은 서열 번호: 52이고, LCDR6의 아미노산 서열은 서열 번호: 53이며, 여기서 각각의 scFv는 각각의 scFv의 HCVR2의 N-말단에서 폴리펩타이드 링커(L1)를 통해 각각의 IgG HC의 C-말단에서 상기 IgG 항체에 연결되며, 여기서 각각의 scFv의 HCVR2는 HCVR2의 C-말단에서 동일한 scFv의 LCVR2의 N-말단에서 제2 폴리펩타이드 링커(L2)를 통해 동일한 scFv의 LCVR2에 연결된다. 일부 실시양태에서, 이의 HCDR 변이체는 서열 번호: 1 내지 3에서 최대 약 3개, 약 5개, 약 8개, 약 10개, 약 12개, 또는 약 15개의 아미노산 치환, 추가 및/또는 결실을 갖는다. 일부 실시양태에서, 이의 LCDR 변이체는 서열 번호: 4 내지 6에서 최대 약 3개, 약 5개, 약 8개, 약 10개, 약 12개, 또는 약 15개의 아미노산 치환, 추가 및/또는 결실을 갖는다.

[0129] 일부 실시양태에서, 본 발명은 IgG 및 2개의 scFv를 포함하는 이중 특이적 항체를 제공하며, 여기서 (a) 상기 IgG는 2개의 중쇄(HC) 및 2개의 경쇄(LC)를 포함하고, 각각의 HC는 중쇄 CDR(HCDR)을 1 내지 3개 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR1)을 포함하고 각각의 경쇄는 경쇄 CDR(LCDR)을 1 내지 3개 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR1)을 포함하며, 여기서 HCDR1의 아미노산 서열은 서열 번호: 1이고, HCDR2의 아미노산 서열은 서열 번호: 2이고, HCDR3의 아미노산 서열은 서열 번호: 3이고, LCDR1의 아미노산 서열은 서열 번호: 4이고, LCDR2의 아미노산 서열은 서열 번호: 5이고, LCDR3의 아미노산 서열은 서열 번호: 6이고; (b) 각각의 scFv는 중쇄 가변 영역(HCVR2) 및 경쇄 가변 영역(LCVR2)을 포함하고, HCVR2는 HCDR을 4 내지 6개 포함하고, LCVR2는 LCDR을 4 내지 6개 포함하며, 여기서 HCDR4의 아미노산 서열은 서열 번호: 54이고, HCDR5의 아미노산 서열은 서열 번호: 55이고, HCDR6의 아미노산 서열은 서열 번호: 56이고, LCDR4의 아미노산 서열은 서열 번호: 57이고, LCDR5의 아미노산 서열은 서열 번호: 58이고, LCDR6의 아미노산 서열은 서열 번호: 59이며, 여기서 각각의 scFv는 각각의 scFv의 HCVR2의 N-말단에서 폴리펩타이드 링커(L1)를 통해 각각의 IgG HC의 C-말단에서 상기 IgG 항체에 연결되며, 여기서 각각의 scFv의 HCVR2는 HCVR2의 C-말단에서 동일한 scFv의 LCVR2의 N-말단에서 제2 폴리펩타이드 링커(L2)를 통해 동일한 scFv의 LCVR2에 연결된다. 일부 실시양태에서, 이의 HCDR 변이체는 서열 번호: 1 내지 3에서 최대 약 3개, 약 5개, 약 8개, 약 10개, 약 12개, 또는 약 15개의 아미노산 치환, 추가 및/또는 결실을 갖는다. 일부 실시양태에서, 이의 LCDR 변이체는 서열 번호: 4 내지 6에서 최대 약 3개, 약 5개, 약 8개, 약 10개, 약 12개, 또는 약 15개의 아미노산 치환, 추가 및/또는 결실을 갖는다.

[0130] 일부 실시양태에서, 본 발명은 IgG 및 알라르민 수용체의 세포외 도메인을 포함하는 이중 특이적 항체를 제공하고, (a) 상기 IgG는 2개의 중쇄(HC) 및 2개의 경쇄(LC)를 포함하고, 각각의 HC는 중쇄 CDR(HCDR)을 1 내지 3개 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR1)을 포함하고 각각의 경쇄는 경쇄 CDR(LCDR)을 1 내지 3개 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR1)을 포함하며, 여기서 HCDR1의 아미노산 서열은 서열 번호: 1이고, HCDR2의 아미노산 서열은 서열 번호: 2이고, HCDR3의 아미노산 서열은 서열 번호: 3이고, LCDR1의 아미노산 서열은 서열 번호: 4이고, LCDR2의 아미노산 서열은 서열 번호: 5이고, LCDR3의 아미노산 서열은 서열 번호: 6이고; (b) 알라르민 수용체의 상기 세포외 도메인으로, 여기서 아미노산 서열은 서열 번호: 19 또는 서열 번호: 34이며, 여기서 각각의 알라르민 세포외 도메인은 각각의 도메인의 아미노산 서열의 C-말단에서 폴리펩타이드 링커(L1)를 통해 각각의 IgG HC의 C-말단에서 상기 IgG 항체에 연결된다. 일부 실시양태에서, 이의 HCDR 변이체는 서열 번호: 1 내지 3에서 최대 약 3개, 약 5개, 약 8개, 약 10개, 약 12개, 또는 약 15개의 아미노산 치환, 추가 및/또는 결실을 갖는다.

[0131] 일부 실시양태에서, 본 발명은 IgG 및 알라르민 수용체의 세포외 도메인을 포함하는 이중 특이적 항체를 제공하

고, (a) 상기 IgG는 2개의 중쇄(HC) 및 2개의 경쇄(LC)를 포함하고, 각각의 HC는 중쇄 CDR(HCDR)을 1 내지 3개를 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR1)을 포함하고 각각의 경쇄는 경쇄 CDR(LCDR)을 1 내지 3개 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR1)을 포함하며, 여기서 HCDR1의 아미노산 서열은 서열 번호: 1이고, HCDR2의 아미노산 서열은 서열 번호: 2이고, HCDR3의 아미노산 서열은 서열 번호: 3이고, LCDR1의 아미노산 서열은 서열 번호: 4이고, LCDR2의 아미노산 서열은 서열 번호: 5이고, LCDR3의 아미노산 서열은 서열 번호: 6이고; (b) 상기 알라르민 수용체의 세포외 도메인으로서, 여기서 아미노산 서열은 서열 번호: 20 또는 서열 번호: 35이며, 여기서 각각의 알라르민 세포외 도메인은 각각의 도메인의 아미노산 서열의 C-말단에서 폴리펩타이드 링커(L1)를 통해 각각의 IgG HC의 C-말단에서 상기 IgG 항체에 연결된다. 일부 실시양태에서, 이의 HCDR 변이체는 서열 번호: 1 내지 3에서 최대 약 3개, 약 5개, 약 8개, 약 10개, 약 12개, 또는 약 15개의 아미노산 치환, 추가 및/또는 결실을 갖는다.

[0132] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 이중 특이적 결합 단백질은 폴리펩타이드 링커(L1 및/또는 L2)를 포함하고, 링커는 아래 표의 서열 중 하나로부터 선택된 서열에 상응하는 서열을 갖는다:

서열 (N→C)	식별기호
VDGASSPVNVSSPSVQDI	서열 번호: 21
VDGASSPVNVGSPSVQDI	서열 번호: 22
GASSPVNVSSPSV	서열 번호: 23
GGGGSGGGNGTSGGGGS	서열 번호: 24
LSAGGHGGLDNDTSAFHL	서열 번호: 25
SDKTHTSPSPAPESGG	서열 번호: 26
VTTTDFQIQTEMAATMET	서열 번호: 27
DFLPTTAQPTKKSTLKKR	서열 번호: 28
TESRPPAENEVSTPMQA	서열 번호: 29
GGGGSGGGNGSGSGGGGS	서열 번호: 30
GGGGSGGGSGGGSGGGGS	서열 번호: 31

[0133]

[0134] 본 발명의 이중 특이적 결합 단백질의 추가 실시양태에서, 각각의 HC의 아미노산 서열은 서열 번호: 32이고, 각각의 LC의 아미노산 서열은 서열 번호: 33이다. 본 발명의 이중 특이적 결합 단백질의 더욱 추가적인 실시양태에서, 폴리펩타이드 링커 L1은 서열 번호: 30의 서열을 갖는다.

[0135] 본 발명의 이중 특이적 결합 단백질의 일부 실시양태에서, 각각의 LC의 아미노산 서열은 서열 번호: 33이다. 추가의 실시양태에서, 각각의 HC의 아미노산 서열은 서열 번호: 60 내지 75로부터 선택된 임의의 것일 수 있었다.

[0136] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에 사용될 수 있는 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 항-IL17RB IgG는 IgA, IgD, IgE, IgG, 또는 IgM 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgA 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgD 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgE 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgG 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgM 항체이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 IgG1 항체, IgG2 항체, IgG3 항체, 또는 IgG4 항체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgG1 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgG2 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgG3 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgG4 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변 영역 또는 글리코실화 부위 및/또는 글리코실화 부위에서의 당형태(glycoform)가 변형된 상기 불변 영역 중 임의의 하나와 같은 중쇄 불변 영역을 포함한다.

[0137] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질의 항-IL17RB 결합 부분은 단일 도메인 항체(sdAb), 중쇄 항체(HCAb), Fv, 단일 사슬 가변 단편(scFv), 또는 IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM 항체의 불변 영역에 융합된 (scFv)₂의 형태이다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgA 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgD 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgE 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgG 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgM 항체이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 IgG1 항체, IgG2 항체, IgG3 항체, 또는 IgG4 항체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgG1 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgG2 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgG3 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgG4 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변 영역 또는 글리코실화 부위 및/또는 글리코실화 부위에서의 당형태가 변형된 상기 불변 영역 중 임의의 하나와 같은 중쇄 불변 영역을 포함한다.

- [0138] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용되는 것은 항알라르민 항체의 항원 결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항원 결합 단편은 단일 도메인 항체(sdAb), 중쇄 항체(HCAb), Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 단일 사슬 가변 단편(scFv) 또는 (scFv)₂일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항알라르민 항체의 항원 결합 단편은 단일 도메인 항체(sdAb)이다. 일부 실시양태에서, 항알라르민 항체의 항원 결합 단편은 중쇄 항체(HCAb)이다. 일부 실시양태에서, 항알라르민 항체의 항원 결합 단편은 Fab이다. 일부 실시양태에서, 항알라르민 항체의 항원 결합 단편은 Fab'이다. 일부 실시양태에서, 항알라르민 항체의 항원 결합 단편은 F(ab')₂이다. 일부 실시양태에서, 항알라르민 항체의 항원 결합 단편은 Fv이다. 일부 실시양태에서, 항알라르민 항체의 항원 결합 단편은 scFv이다. 일부 실시양태에서, 항알라르민 항체의 항원 결합 단편은 이항화물 연결된 scFv[(scFv)₂]이다. 일부 실시양태에서, 항알라르민 항체의 항원 결합 단편은 디아바디(dAb)이다. 추가의 실시양태에서, 항알라르민 항원 결합 단편은 IL-25, IL-33 및 TSLP를 포함한 알라르민의 활성을 중화시킨다.
- [0139] "활성"이라는 용어는 표적 단백질을 특이성으로 결합하는 능력, 단백질에 대한 항체 또는 결합 단백질의 친화성, 표적 단백질의 생물학적 활성을 중화시키는 능력, 표적 단백질과 이의 자연 수용체(들) 또는 천연 리간드(들)의 상호작용을 억제하는 능력 등과 같은 특성을 포함한다.
- [0140] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용되는 것은 재조합 항-IL17RB/항-TSLP 이중 특이적 항체이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용되는 것은 재조합 항-IL17RB/항-IL33 이중 특이적 항체이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용되는 것은 재조합 항-IL17RB/TSLP 수용체 이중 특이적 결합 단백질이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용되는 것은 재조합 항-IL17RB/IL33 수용체 이중 특이적 결합 단백질이다.
- [0141] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 키메라 항체이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 인간화 항체이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 인간 항체이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 scFv는 키메라 scFv이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 scFv는 인간화 scFv이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 scFv는 인간 scFv이다. 일부 양태에서, 본원에 제공되는 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질은 단리된다. 일부 양태에서, 본원에 제공되는 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질은 실질적으로 순수하다.
- [0142] 인간화 항체 및 scFv를 생성하는 다양한 방법이 당해 기술분야에 알려져 있다. 인간화 항체와 높은 친화도 결합을 달성하기 위한 방법이 당해 기술분야에 알려져 있다. 이러한 방법의 비제한적인 예는 가변 영역의 과돌연변이 및 이러한 고친화도 항체를 발현하는 세포의 선택(친화도 성숙)이다. 디스플레이 라이브러리의 사용 이외에도, 지정된 항원(예를 들어, 재조합 IL17RB 또는 이의 에피토프)을 사용하여 비인간 동물, 예를 들어, 설치류를 면역화할 수 있다. 특정 실시양태에서, 설치류 항원 결합 단편(예를 들어, 마우스 항원 결합 단편)은 당해 기술분야에 알려져 있고/있거나 본원에 개시된 방법을 사용하여 생성 및 단리될 수 있다. 일부 실시양태에서, 마우스는 항원(예를 들어, 재조합 IL17RB 또는 이의 에피토프)으로 면역화될 수 있다.
- [0143] 인간 항체 및 scFv는 당해 기술분야에 알려진 다양한 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간 항체는 시험관내에서 면역화된 불멸화된 인간 B 림프구로부터 생성된다. 일부 실시양태에서, 인간 항체는 면역화된 개체로부터 단리된 림프구로부터 생성된다. 어떤 경우든, 표적 항원에 대한 항체를 생성하는 세포가 생성되고 단리될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간 항체는 파지 라이브러리로부터 선택되며, 여기서 그 파지 라이브러리는 인간 항체를 발현한다. 대안적으로, 파지 디스플레이 기술을 사용하여 면역화되지 않은 기증자의 면역글로불린 가변 영역 유전자 레퍼토리로부터 인간 항체 및 항체 단편을 시험관내에서 생산할 수 있다. 항체 파지 라이브러리를 생성하고 사용을 위한 기술은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다. 일단 항체가 식별되면, 사슬 셔플링(chain shuffling) 및 부위-지정 돌연변이 유발(site-directed mutagenesis)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 당해 기술분야에 알려진 친화도 성숙 전략을 사용하여 더 높은 친화도의 인간 항체를 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간 항체는 인간 면역글로불린 유전자좌를 함유하는 형질전환 마우스에서 생성된다. 면역화 시, 이러한 마우스는 내인성 면역글로불린 생산이 없는 상태에서 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생산할 수 있다.
- [0144] 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 1가 항원 결합 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 단일 특이적 결합 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 2가 결합 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 scFv는 1가 항원 결합

부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 scFv는 단일 특이적 결합 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 scFv는 2가 결합 부위를 포함한다.

[0145] 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 SM17이다. "SM17"이라는 용어는 인간 IL17RB(hIL17RB)에 대한 인간화 항체를 지칭한다. SM17의 서열 특징은 아래 표에 제공된다. SM17의 구조적 및 기능적 특징에 대한 추가적인 설명은 WO2020115319A1에서 찾을 수 있으며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. SM17의 HC 서열은 서열 번호: 32이다. SM17의 LC 서열은 서열 번호: 32이다. SM17 HCDR1의 아미노산 서열은 서열 번호: 1이고, SM17 HCDR2의 아미노산 서열은 서열 번호: 2이고, SM17 HCDR3의 아미노산 서열은 서열 번호: 3이고, SM17 LCDR1의 아미노산 서열은 서열 번호: 4이고, SM17 LCDR2의 아미노산 서열은 서열 번호: 5이고, SM17 LCDR3의 아미노산 서열은 서열 번호: 6이다.

[0146] 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법에서 사용될 수 있는 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 SM17의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 및/또는 6개의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 SM17의 1개, 2개, 및/또는 3개의 VL CDR을 포함하는 VL을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 SM17의 1개, 2개, 및/또는 3개의 VH CDR을 포함하는 VH를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 SM17의 1개, 2개, 및/또는 3개의 VL CDR 및 1개, 2개, 및/또는 3개의 VH CDR을 포함한다.

[0147] VH CDR3 및 VL CDR3 도메인이 항원에 대한 항체의 결합 특이성/친화도에 중요한 역할을 한다는 것은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용될 수 있는 이의 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 인간 IL17RB와 적절한 회합/해리 동역학을 가질 수 있고, SM17의 VH CDR3 및 VL CDR3과 구조적으로 동일하거나 이와 관련된 VH CDR3 및 VL CDR3을 가질 수 있다. 서열 번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 SM17 VL CDR3에 대한 컨센서스 모티프는 그 결합 특이성을 변경하지 않고 항체 친화도를 조정하기 위해 하나 이상의 아미노산(들)을 대체하여 변형되거나, 본원에 참조로 포함된 중국 특허 제ZL200880024788.2호에 기재된 바와 같은 기준을 사용하여 SM17 VL CDR3과 충분한 유사성을 나타내는 관련 없는 인간 항체의 VL CDR3으로 대체될 수 있다. 마찬가지로, 서열 번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 SM17 VH CDR3에 대한 컨센서스 모티프는 그 결합 특이성을 변경하지 않고 항체 친화도를 조정하기 위해 하나 이상의 아미노산(들)을 대체하여 변형되거나, 본원에 참조로 포함된 중국 특허 제ZL200880024788.2호에 기재된 바와 같은 기준을 사용하여 SM17 VH CDR3과 충분한 유사성을 나타내는 관련 없는 인간 항체의 VH CDR3으로 대체될 수 있다.

[0148] 숙련가는 CDR3 도메인 내의 아미노산의 특정 치환(들)이 항체의 에피토프 특이성, 특히 보존적 아미노산으로의 치환을 변화시키지 않는다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편의 CDR3(예를 들어, SM17 또는)은 결정 구조 및/또는 컴퓨터 데이터베이스 분석에 의해 결정될 때 항-IL17RB 항체의 결합 부위 구조/접촉을 유지하는 데 중요한 것으로 알려진 위치에서 (1) 잔기의 수가 동일하고 SM17 CDR3과 50% 이상의 서열 상동성을 나타내고/내거나, (2) SM17 CDR3에서 상응하는 위치(들)에 있는 잔기(들)와 동일하거나 보존적으로 유사한 적어도 하나, 바람직하게는 그 보다 많은 방향족 잔기(들)를 함유하고/하거나, (3) SM17 CDR3에서 상응하는 위치(들)에 있는 잔기(들)와 동일하거나 보존적으로 유사한 적어도 하나, 바람직하게는 그 보다 많은 하전된 잔기(들)를 함유하고/하거나, (4) SM17 CDR3에서 상응하는 위치(들)에 있는 잔기(들)와 동일하거나 보존적으로 유사한 적어도 하나, 바람직하게는 그 보다 많은 아미노산 잔기(들)를 함유하는, 인간 또는 영장류 항체의 CDR3으로 대체될 수 있다. 일부 실시양태에서, SM17 VL 및/또는 VH CDR3 도메인 내에서 1 내지 5개 이하의 보존적 아미노산 치환이 이루어지거나, 1 내지 5개 이하의 보존적으로 유사한 잔기를 함유하는 관련 없는 영장류 또는 인간 항체로부터의 VL 및/또는 VH CDR3이 SM17의 VL 및/또는 VH CDR3을 대체하는 데 사용된다. 일부 실시양태에서, SM17 VL 및/또는 VH CDR3 도메인 내에서 1 내지 3개 이하의 보존적 아미노산 치환이 이루어지거나, 1 내지 3개 이하의 보존적으로 유사한 잔기를 함유하는 관련 없는 영장류 또는 인간 항체로부터의 VL 및/또는 VH CDR3이 SM17의 VL 및/또는 VH CDR3을 대체하는 데 사용된다.

[0149] 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 서열 번호: 33의 아미노산 서열과 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 VL을 포함하는 IL17RB에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공되는 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 서열 번호: 32의 아미노산 서열과 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 VH를 포함하는 IL17RB에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법에서 사용되는 이중 특이

적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 (a) 서열 번호: 33의 아미노산 서열과 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 VL; 및 서열 번호: 32의 아미노산 서열과 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 VH를 포함하는 IL17RB에 특이적으로 결합한다.

[0150] 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 VL을 포함하는 IL17RB에 특이적으로 결합하며, 여기서 VL은 서열 번호: 33과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 서열 번호: 33과 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 VL을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 서열 번호: 33과 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 VL을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 서열 번호: 33과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 VL을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 갖는 VL을 포함하는 IL17RB에 특이적으로 결합한다.

[0151] 일부 양태에서, 본원에 제공되는 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 VH를 포함하는 IL17RB에 특이적으로 결합하며, 여기서 VH는 서열 번호: 32와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 서열 번호: 32와 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 VH를 갖는다. 일부 양태에서, 본원에 제공되는 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 서열 번호: 32와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 VH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 서열 번호: 32와 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 VH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 서열 번호: 32와 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 VH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 서열 번호: 32의 아미노산 서열을 갖는 VH를 포함하는 IL17RB에 특이적으로 결합한다.

[0152] 일부 실시양태에서, IL17RB에 특이적으로 결합하는 이의 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 VL 및 VH를 포함하며, 여기서 VL 및 VH는 각각 서열 번호: 32 및 33의 아미노산 서열을 갖는다. IL17RB에 특이적으로 결합하는 이의 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 본원에 개시된 임의의 VL과 본원에 개시된 임의의 VH의 조합을 포함할 수 있다.

[0153] 일부 실시양태에서, IL17RB에 특이적으로 결합하는 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 (a) 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 갖는 VL로부터 VL CDR을 1, 2, 및 3개 포함하는 VL; 및/또는 (b) 서열 번호: 32의 아미노산 서열을 갖는 VH로부터의 VH CDR을 1, 2, 및 3개 포함하는 VH를 포함한다.

[0154] 일부 실시양태에서, IL17RB에 특이적으로 결합하는 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 VL을 포함하며, 여기서 VL은 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 갖는 VL로부터의 VL CDR을 1, 2, 및 3개 포함한다.

[0155] 일부 실시양태에서, IL17RB에 특이적으로 결합하는 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 VH를 포함하며, 여기서 VH는 서열 번호: 32의 아미노산 서열을 갖는 VH로부터의 VH CDR을 1, 2, 및 3개 포함한다.

[0156] 일부 실시양태에서, IL17RB에 특이적으로 결합하는 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 VL 및 VH를 포함하며, 여기서 VL은 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 갖는 VL로부터의 VL CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하고, VH는 서열 번호: 32의 아미노산 서열을 갖는 VH로부터의 VH CDR1, CDR2, 및 CDR3를 포함한다.

[0157] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 SM17의 변이체이다. SM17 변이체는 서열 번호: 33에서 최대 약 5개의 아미노산 치환, 추가 및/또는 결실을 갖는 SM17의 VL의 변이체인 VL을 가질 수 있다. SM17 변이체는 서열 번호: 32에서 최대 약 5개의 아미노산 치환, 추가 및/또는 결실을 갖는 SM17의

VH의 변이체인 VH를 가질 수 있다. 아미노산 치환, 추가 및/또는 결실은 VH CDR 또는 VL CDR에 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 아미노산 치환, 추가 및/또는 결실은 CDR에 존재하지 않는다. 일부 실시양태에서, SM17의 변이체는 최대 약 5개의 보존적 아미노산 치환을 갖는다. 일부 양태에서, SM17의 변이체는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 갖는다.

[0158] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용될 수 있는 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG는 적어도 하나의 프레임워크(FR) 영역을 갖는 VH 또는 VL을 포함한다. 일부 실시양태에서, VL에 대한 FR 1(FR1) 영역은 V_κ ID 인간 생식세포 계열로부터 유래할 수 있고, VL에 대한 FR 2(FR2) 영역은 V_κ J1 인간 생식세포 계열로부터 유래할 수 있고, VL에 대한 FR 3(FR3) 영역은 V_κ 1 인간 생식세포 계열로부터 유래할 수 있고, VL에 대한 FR 4(FR4) 영역은 V_κ J1 인간 생식세포 계열로부터 유래할 수 있다. 일부 실시양태에서, VL에 대한 FR1, FR2, FR3, 및 FR4는 각각 서열 번호: 36, 37, 38, 및 39의 아미노산 서열을 가질 수 있다(본원에 참조로 포함된 WO2020115319A1에 나타난 프레임워크 서열). 일부 실시양태에서, VH에 대한 프레임워크 1(FR1) 영역은 V_H3 인간 생식세포 계열로부터 유래할 수 있고; VH에 대한 프레임워크 2(FR2) 영역은 V_H3 인간 생식세포 계열로부터 유래할 수 있고; VH에 대한 프레임워크 3(FR3) 영역은 V_H3 인간 생식세포 계열로부터 유래할 수 있고; VH에 대한 프레임워크 4(FR4) 영역은 V_H5 인간 생식세포 계열로부터 유래할 수 있다. 일부 실시양태에서, VH에 대한 FR1, FR2, FR3, 및 FR4는 각각 서열 번호: 40, 41, 42, 및 43의 아미노산 서열을 가질 수 있다(WO2020115319A1에 나타난 프레임워크 서열).

[0159] 본 개시내용은 본원에 기재된 재조합, 단일클론, 키메라, 인간화, 및 인간 항체, 또는 이의 항체 단편과 실질적으로 상동적인 추가적인 변이체 및 등가물을 추가로 고려한다. 일부 실시양태에서, 항체의 결합 친화도를 개선하는 것이 바람직하다. 일부 실시양태에서, 특이성, 열 안정성, 발현 수준, 이펙터 기능(들), 글리코실화, 면역원성 및/또는 용해도를 포함하지만 이에 제한되지 않는 항체의 생물학적 특성을 조절하는 것이 바람직하다. 당업자는 아미노산 변화가 글리코실화 부의 수 또는 위치를 변경하거나 막 고정 특성을 변경하는 것과 같은 항체의 번역 후 과정을 변경할 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0160] 변이는 항체 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 치환, 결실, 또는 삽입하여 고유 항체 또는 폴리펩타이드 서열과 비교하여 아미노산 서열의 변화를 초래할 수 있다. 일부 실시양태에서, 아미노산 치환은 하나의 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 특성을 갖는 또 다른 아미노산으로 대체한 결과이며, 예를 들어, 류신을 세린으로 대체하는 것과 같은 보존적 아미노산 대체이다. 삽입 또는 결실은 약 1 내지 5개의 아미노산 범위에 있을 수 있다. 일부 실시양태에서, 치환, 결실, 또는 삽입은 모 분자에 대해 25개 미만의 아미노산 치환, 20개 미만의 아미노산 치환, 15개 미만의 아미노산 치환, 10개 미만의 아미노산 치환, 5개 미만의 아미노산 치환, 4개 미만의 아미노산 치환, 3개 미만의 아미노산 치환, 또는 2개 미만의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적으로 유용하고/하거나 관련성이 있는 아미노산 서열의 변이는 서열에서 체계적으로 삽입, 결실, 또는 치환을 수행하고 생성된 변이체 단백질의 활성을 모 단백질과 비교하여 테스트함으로써 결정할 수 있다.

[0161] 항체의 불변 영역(들)이 여러 이펙터 기능을 매개하는 것으로 당해 기술분야에 알려져 있으며, 이러한 이펙터 기능은 항체의 이소형에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 보체의 C1 구성요소가 (항원에 결합된) IgG 또는 IgM 항체의 Fc 영역에 결합하면 보체 시스템이 활성화된다. 보체의 활성화는 세포 병원체의 옵소닌화(opsonization) 및 용해에 중요하다. 보체의 활성화는 또한 염증 반응을 자극하고 자가면역 과민증에 관여할 수 있다. 또한, 항체의 Fc 영역은 Fc 수용체(FcR)를 발현하는 세포에 결합할 수 있다. IgG(감마 수용체), IgE(엡실론 수용체), IgA(알파 수용체) 및 IgM(뮤 수용체)을 포함한 다양한 부류의 항체에 특이적인 여러 Fc 수용체가 있다. 항체가 세포 표면의 Fc 수용체에 결합하면 항체 코팅된 입자의 흡수(engulfment) 및 파괴, 면역 복합체의 제거, 킬러 세포에 의한 항체 코팅된 표적 세포의 용해(항체 의존성 세포 독성 또는 ADCC로 불림), 염증 매개체의 방출, 태반 전이 및 면역글로불린 생성의 제어를 포함한 많은 중요하고 다양한 생물학적 반응을 유발한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질은 인간 IgA 항체의 적어도 하나의 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질은 인간 IgD 항체의 적어도 하나의 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질은 인간 IgE 항체의 적어도 하나의 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질은 인간 IgG 항체의 적어도 하나의 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질은 인간 IgM 항체의 적어도 하나의 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질은 인간 IgG1 항체의 적어도 하나의 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질은 인간

IgG2 항체의 적어도 하나의 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질은 인간 IgG3 항체의 적어도 하나의 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질은 인간 IgG4 항체의 적어도 하나의 불변 영역을 포함한다.

[0162] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질에서 불변 영역 중 적어도 하나 이상이 변형 또는 결실되었다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 3개의 중쇄 불변 영역(CH1, CH2 또는 CH3) 중 하나 이상 및/또는 경쇄 불변 영역(CL)에 대한 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 이중 특이적 결합 단백질의 중쇄 불변 영역은 적어도 하나의 인간 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 이중 특이적 결합 단백질의 중쇄 불변 영역은 하나 초과인 인간 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 불변 영역에 대한 변형은 하나 이상의 영역에서 하나 이상의 아미노산의 추가, 결실, 또는 치환을 포함한다.

[0163] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 영역은 변형된 이중 특이적 결합 단백질의 불변 영역으로부터 부분적으로 또는 전체적으로 결실된다. 일부 실시양태에서, 전체 CH2 도메인이 이중 특이적 결합 단백질(Δ CH2 작제물)로부터 제거되었다. 일부 실시양태에서, 결실된 불변 영역은 전형적으로 결여된 불변 영역에 의해 부여되는 분자 유연성의 일부를 제공하는 짧은 아미노산 스페이서로 대체된다. 일부 실시양태에서, 변형된 이중 특이적 결합 단백질은 이중 특이적 결합 단백질의 힌지 영역에 직접 융합된 CH3 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 이중 특이적 결합 단백질은 힌지 영역과 변형된 CH2 및/또는 CH3 도메인 사이에 삽입된 펩타이드 스페이서를 포함한다.

[0164] 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 힌지를 통해 융합된다. 힌지는 IgG1 힌지, IgG2 힌지 또는 IgG3 힌지일 수 있다. 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 Fc 영역의 아미노산 서열은 당업자에게 알려져 있다. 일부 경우에, 아미노산 변이가 있는 Fc 영역이 고유 항체에서 확인되었다. 일부 실시양태에서, 변형된 이중 특이적 결합 단백질(예를 들어, 변형된 Fc 영역)은 변경된 이펙터 기능을 제공하며, 이는 차례로 이중 특이적 결합 단백질의 생물학적 프로파일에 영향을 미친다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 불변 영역의 결실 또는 불활성화(점 돌연변이 또는 다른 수단을 통해)는 변형된 이중 특이적 결합 단백질이 순환할 때 변형된 이중 특이적 결합 단백질의 Fc 수용체 결합을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 불변 영역 변형은 이중 특이적 결합 단백질의 면역원성을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 불변 영역 변형은 이중 특이적 결합 단백질의 혈청 반감기를 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 불변 영역 변형은 이중 특이적 결합 단백질의 혈청 반감기를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 불변 영역 변형은 이중 특이적 결합 단백질의 ADCC 및/또는 보체 의존성 세포독성(complement dependent cytotoxicity: CDC)을 감소 또는 제거한다. 일부 실시양태에서, 인간 IgG1 Fc 영역에서 상응하는 IgG2 또는 IgG4 잔기로의 특정 아미노산 치환은 변형된 이중 특이적 결합 단백질에서 이펙터 기능(예를 들어, ADCC 및 CDC)을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 하나 이상의 이펙터 기능(예를 들어, "이펙터 결여(effectorless)" 항체)을 갖지 않는다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 ADCC 활성 및/또는 CDC 활성이 없다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 Fc 수용체 및/또는 보체 인자에 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 이펙터 기능(들)을 갖지 않는다. 일부 실시양태에서, 불변 영역 변형은 이중 특이적 결합 단백질의 ADCC 및/또는 CDC를 증가시키거나 향상시킨다. 일부 실시양태에서, 불변 영역은 이황화물 결합(linkage) 또는 올리고사카라이드 모이어티를 제거하도록 변형된다. 일부 실시양태에서, 불변 영역은 하나 이상의 세포독소(cytotoxin), 올리고사카라이드, 또는 탄수화물 부착 부위를 제공하기 위해 하나 이상의 아미노산을 추가/치환하도록 변형된다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 고유 Fc 영역과 비교하여 특정 아미노산 위치에서 치환으로 조작된 변이체 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질은 EU 넘버링에 따라 K214R, L234A, L235E, G237A, D356E, 및 L358M으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 IgG1 중쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, IgG1 중쇄 불변 영역은 EU 넘버링에 따라 K214R, L234A, L235E, G237A, A330S, P331S, D356E, 및 L358M으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, IgG1 중쇄 불변 영역은 EU 넘버링에 따라 K214R, C226S, C229S 및 P238S로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, IgG1 중쇄 불변 영역은 EU 넘버링에 따라 K214R, D356E, 및 L358M으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, IgG1 중쇄 불변 영역은 EU 넘버링에 따라 S131C, K133R, G137E, G138S, Q196K, I199T, N203D, K214R, C226S, C229S, 및 P238S로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질은 V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S 및 P331S로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 IgG2 중쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질은 S228P, L234A 및 L235A로 이루

어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 IgG4 중쇄 불변 영역을 포함한다.

- [0165] 일부 실시양태에서, 변이체는 항체 또는 폴리펩타이드의 아미노- 및/또는 카르복실-말단에 아미노산 잔기의 추가를 포함할 수 있다. 추가 아미노산 잔기의 길이는 1개의 잔기에서 100개 이상의 잔기까지 다양할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변이체는 N-말단 메티오닐 잔기를 포함한다. 일부 양태에서, 변이체는 융합 단백질을 생성하기 위해 추가적인 폴리펩타이드/단백질(예를 들어, Fc 영역)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변이체는 검출 가능하도록 조작되고, 검출 가능한 표지 및/또는 단백질(예를 들어, 형광 태그 또는 효소)을 포함할 수 있다.
- [0166] 본원에 기재된 변이체 항체 또는 항원 결합 단편은 부위-지정 돌연변이 유발, 알라닌 주사 돌연변이 유발, 및 PCR 돌연변이를 포함하지만 이에 제한되지 않는 당해 기술분야에 알려진 방법을 사용하여 생성될 수 있다.
- [0167] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG의 변이체는 모 항체 또는 항원 결합 단편과 유사한 정도, 동일한 정도, 또는 더 높은 정도로 IL17RB에 결합하는 능력을 유지할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변이체는 모 항체 또는 항원 결합 단편과 아미노산 서열이 약 80%, 약 85%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 이상 동일할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 IgG의 변이체는 하나 이상의 보존적 아미노산 치환을 갖는 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 모 IgG의 아미노산 서열을 포함한다. 보존적 아미노산 치환은 당해 기술분야에 알려져 있으며, 특정 물리적 및/또는 화학적 성질을 갖는 하나의 아미노산이 동일하거나 유사한 화학적 또는 물리적 특성을 갖는 또 다른 아미노산으로 교환되는 아미노산 치환을 포함한다.
- [0168] 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질의 변이체는 하나 이상의 비보존적 아미노산 치환을 갖는 모 항체 또는 항원 결합 단편의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질의 변이체는 하나 이상의 비보존적 아미노산 치환을 갖는 모 결합 항체 또는 항원 결합 단편의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 하나 이상의 비보존적 아미노산 치환은 변이체의 하나 이상의 생물학적 활성(예를 들어, IL17RB 결합)을 방해하거나 억제하지 않는다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 보존적 아미노산 치환 및/또는 하나 이상의 비보존적 아미노산 치환은 변이체의 생물학적 활성을 향상시킬 수 있으며, 이에 따라 기능적 변이체의 생물학적 활성이 모 결합 모이어티에 비해 증가한다.
- [0169] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질은 자연적으로 또는 개입에 의해 화학적으로 변형된다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 글리코실화, 아세틸화, 폐길화, 인산화, 아미드화, 알려진 보호/차단 기에 의한 유도체화, 단백질 분해 절단(proteolytic cleavage), 및/또는 세포 리간드 또는 다른 단백질에 대한 연결에 의해 화학적으로 변형되었다. 수많은 화학적 변형 중 어느 것이든 알려진 기술에 의해 수행될 수 있다. 이중 특이적 결합 단백질은 아미노산의 하나 이상의 유사체(예를 들어, 비자연적 아미노산을 포함)를 포함할 수 있을 뿐만 아니라 당해 기술분야에 알려진 다른 변형을 포함할 수 있다.
- [0170] 본 개시내용의 이중 특이적 결합 단백질은 당해 기술분야에 알려진 다양한 방법에 의해 이들의 물리적, 화학적 및/또는 생물학적 특성에 대해 분석될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질이 2개의 상이한 알라르민(예를 들어, 인간 IL17RB 및 TSLP)에 결합하는 그 능력에 대해 테스트된다. 결합 검정에는 표면 플라즈몬 공명(예를 들어, BIAcore), ELISA 및 FACS가 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 알라르민에 대한 결합제(예를 들어, 항체)의 해리 상수는 표면 플라즈몬 공명(예를 들어, BIAcore)에 의해 결정되는 해리 상수이다. 또한, 항체는 용해도, 안정성, 열 안정성, 점도, 발현 수준, 발현 품질 및/또는 정제 효율에 대해 평가할 수 있다.
- [0171] SM17은 약 1 pM의 해리 상수(K_D)로 인간 IL17RB에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질은 약 100 nM 이하, 약 40 nM 이하, 약 20 nM 이하, 약 10 nM 이하, 약 1 nM 이하, 약 0.1 nM 이하, 50 pM 이하, 10 pM 이하 또는 1 pM 이하의 해리 상수(K_D)를 갖는 IL17RB(예를 들어, 인간 IL17RB)에 결합한다. 일부 실시양태에서, K_D 는 약 20 nM 이하이다. 일부 실시양태에서, K_D 는 약 10 nM 이하이다. 일부 실시양태에서, K_D 는 약 5 nM 이하이다. 일부 실시양태에서, K_D 는 약 2 nM 이하이다. 일부 실시양태에서, K_D 는 약 1.5 nM 이하이다. 일부 실시양태에서, K_D 는 약 1 nM 이하이다. 일부 실시양태에서, K_D 는 약 0.5 nM 이하이다. 일부 실시양태에서, K_D 는 약 0.1 nM 이하이다. 일부 실시양태에서, K_D 는 약 50 pM 이하이다. 일부 실시양태에서, K_D 는 약 10 pM 이하이다.
- [0172] 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 0.1 내지 1 nM, 0.5 내지 5 nM, 1 내지 10 nM, 1 내지 5 nM, 5

내지 50 nM, 10 내지 100 nM, 또는 50 내지 500 nM의 범위 내의 K_D 로 IL17RB(예를 들어, 인간 IL17RB)에 결합한다. 일부 실시양태에서, K_D 는 0.1 내지 1 nM의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, K_D 는 0.5 내지 5 nM의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, K_D 는 1 내지 10 nM의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, K_D 는 1 내지 5 nM의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, K_D 는 5 내지 50 nM의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, K_D 는 10 내지 100 nM의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, K_D 는 50 내지 500 nM의 범위 내에 있다.

[0173] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질은 약 $0.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 의 회합 상수 (K_A)로 IL17RB(예를 들어, 인간 IL17RB)에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질은 약 $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 이상, 약 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 이상, 약 $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 이상, 약 $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 이상, 약 $8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 이상, 약 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 이상, 약 $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 이상, 약 $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 이상, 약 $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 이상, 약 $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ 이상, 약 $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ 이상, 또는 약 $1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ 이상의 K_A 로 IL17RB(예를 들어, 인간 IL17RB)에 결합한다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 이상이다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 이상이다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 이상이다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 이상이다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 $8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 이상이다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 이상이다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 이상이다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 이상이다.

[0174] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질은 약 1×10^6 내지 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, 5×10^6 내지 $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, 1×10^7 내지 $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, 5×10^7 내지 $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, 1×10^8 내지 $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, 1×10^8 내지 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, 5×10^8 내지 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, 5×10^8 내지 $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, 1×10^9 내지 $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, 5×10^9 내지 $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, 1×10^{10} 내지 $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, 5×10^{10} 내지 $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, 1×10^{11} 내지 $1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$, 또는 5×10^{11} 내지 $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ 범위 내의 K_A 로 IL17RB(예를 들어, 인간 IL17RB)에 결합한다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 1×10^6 내지 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 1×10^7 내지 $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 1×10^8 내지 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 5×10^8 내지 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 5×10^8 내지 $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 1×10^9 내지 $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 의 범위 내에 있다.

[0175] 일부 양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질은 Octet(예를 들어, 생물층 간섭계)에 의해 결정될 때 $1.38 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 이하의 k_d 로 인간 IL17RB로부터 해리된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질은 약 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 이하, 약 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 이하, 약 $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 이하, 약 $4 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 이하, 약 $8 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 이하, 약 $2 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 이하, 약 $4 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ 이하의 k_d 로 인간 IL17RB로부터 해리된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질은 약 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 이하의 k_d 로 인간 IL17RB로부터 해리된다. 일부 실시양태에서, k_d 는 약 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 이하이다. 일부 실시양태에서, k_d 는 약 $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 이하이다. 일부 실시양태에서, k_d 는 약 $4 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 이하이다. 일부 실시양태에서, k_d 는 약 $8 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 이하이다. 일부 실시양태에서, k_d 는 약 $2 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 이하이다. 일부 실시양태에서, k_d 는 약 $4 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ 이하이다.

[0176] 에피토프 매핑은 이중 특이적 결합 단백질이 결합하는 표적 단백질의 결합 부위, 영역 또는 에피토프를 식별하는 방법이다. 표적 단백질에서 에피토프를 매핑하는 다양한 방법이 당해 기술분야에 알려져 있다. 이러한 방법에는 샷건(shotgun) 돌연변이 유발, 부위 지정 돌연변이 유발 및 알려진 스캐닝; 도메인 또는 단편 스캔; 펩타이드 스캐닝(예를 들어, 펩스캔 기술); 디스플레이 방법(예를 들어, 파지 디스플레이, 미생물 디스플레이 및 리

보숨/mRNA 디스플레이); 단백질 분해 및 질량 분석법을 포함하는 방법; 및 구조 측정(예를 들어, X선 결정학 및 NMR)이 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질에는 N-말단 시퀀싱, 아미노산 분석, HPLC, 질량 분석법, 이온 교환 크로마토그래피, 및 파파인(papain) 분해가 포함되지만 이에 제한되지 않는 검정을 특징으로 한다.

[0177] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용될 수 있는 이중 특이적 결합 단백질은 약 $0.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 의 K_A 로 이 구조적 에피토프와 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질은 약 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 이상, 약 $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 이상, 약 $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 이상, 약 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 이상, 약 $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 이상, 약 $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 이상, 약 $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 이상, 약 $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ 이상, 약 $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ 이상, 또는 약 $1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ 이상의 K_A 로 이 구조적 에피토프와 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 이상이다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 이상이다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 이상이다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 이상이다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 $8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 이상이다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 이상이다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 이상이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질은 약 1×10^6 내지 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, 5×10^6 내지 $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, 1×10^7 내지 $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, 5×10^7 내지 $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, 1×10^8 내지 $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, 1×10^8 내지 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, 5×10^8 내지 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, 5×10^8 내지 $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, 1×10^9 내지 $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, 5×10^9 내지 $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, 1×10^{10} 내지 $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, 5×10^{10} 내지 $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, 1×10^{11} 내지 $1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$, 또는 5×10^{11} 내지 $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ 범위 내의 K_A 로 이 구조적 에피토프와 결합한다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 1×10^6 내지 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 1×10^6 내지 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 1×10^7 내지 $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 1×10^8 내지 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 5×10^8 내지 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 5×10^8 내지 $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, K_A 는 약 1×10^9 내지 $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 의 범위 내에 있다.

[0178] 일부 실시양태에서, 본원에는 알라르민에 대한 결합을 위해 또 다른 이중 특이적 결합 단백질(예를 들어, 인간 IL17RB)과 경쟁하는 하나의 이중 특이적 결합 단백질이 제공된다. "표적에 결합하기 위해 또 다른 항체와 경쟁하는" 이중 특이적 결합 단백질은 동일한 표적에 대한 다른 이중 특이적 결합 단백질의 결합을 (부분적으로 또는 완전히) 억제하는 이중 특이적 결합 단백질을 지칭한다. 표적에 대한 결합을 위해 서로 경쟁하는지 여부, 즉 하나의 이중 특이적 결합 단백질이 다른 이중 특이적 결합 단백질의 표적에 대한 결합을 억제하는지 여부와 그 정도는 알려진 경쟁 실험, 예를 들어, 생물층 간섭계 동역학 분석을 사용하여 결정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 구성되는 이중 특이적 결합 단백질은 또 다른 이중 특이적 결합 단백질과 경쟁하고 이 단백질이 알라르민(예를 들어, 인간 IL17RB)에 결합하는 것을 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%까지 억제한다. 경쟁 검정은, 예를 들어, 문헌[Ed Harlow and David Lane, *Cold Spring Harb Protoc*; 2006; doi: 10.101/pdb.prot4277 또는 Chapter 11 of "Using Antibodies" by Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999]에 기재된 바와 같이 수행할 수 있다.

[0179] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질은 신장 암종 세포(예를 들어, TK-10 세포)에서 고유 IL17RB에 결합하는 방사성 표지된 I^{125} -SM17과 경쟁하며 이때 C_{50} 은 약 $0.1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 이하, 약 $0.2 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 이하, 약 $0.5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 이하, 약 $0.8 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 이하, 약 $1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 이하, 약 $2 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 이하, 약 $5.0 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 이하, 약 $8 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 이하, 약 $10 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 이하, 또는 약 $50 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 이하이다. 일부 실시양태에서, EC_{50} 은 약 $0.1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 이하이다. 일부 실시양태에서, EC_{50} 은 약 $0.2 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 이하이다. 일부 실시양태에서, EC_{50} 은 약 $0.5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 이하이다. 일부 실시양태에서, EC_{50} 은 약 $1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 이하이다. 일부 실시양태에서, EC_{50} 은 약 $2 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 이하이다. 일부 실시양태에서, EC_{50} 은 약 $5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 이하이다. 일부 실시양태에서, EC_{50} 은 약 $10 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 이

하이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용되는 이중 특이적 결합 단백질은 신장 암종 세포(예를 들어, TK-10 세포)에서 고유 IL17RB에 결합하는 방사성 표지된 I^{125} -SM17과 경쟁하며 이때 EC_{50} 은 약 0.1 내지 50 μ g/ml, 약 0.1 내지 10 μ g/ml, 약 0.1 내지 5 μ g/ml, 약 0.5 내지 10 μ g/ml, 약 0.5 내지 5 μ g/ml, 약 1 내지 10 μ g/ml 또는 약 1 내지 5 μ g/ml의 범위 내이다. 일부 실시양태에서, EC_{50} 은 약 0.1 내지 50 μ g/ml의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, EC_{50} 은 약 0.1 내지 10 μ g/ml의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, EC_{50} 은 약 0.1 내지 5 μ g/ml의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, EC_{50} 은 약 0.5 내지 10 μ g/ml이다. 일부 실시양태에서, EC_{50} 은 약 0.5 내지 5 μ g/ml의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, EC_{50} 은 약 1 내지 10 μ g/ml의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, EC_{50} 은 약 1 내지 5 μ g/ml의 범위 내에 있다.

[0180] 일부 양태에서, 본원에 제공된 이중 특이적 결합 단백질은 유도체화되거나 또 다른 기능적 분자(예를 들어, 또 다른 펩타이드 또는 단백질)에 연결되어 본원에 개시된 방법에 사용될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용되는 항체 및 항원 결합 단편에는 면역접착 분자를 포함하여 본원에 기재된 인간 항-IL17RB 항체의 유도체화 및 달리 변형된 형태를 포함한다. 예를 들어, 항체 및 항원 결합 단편은 또 다른 항체(예를 들어, 이중 특이적 항체 또는 디아바디), 검출 가능한 제제, 세포독성 제제, 약제학적 제제 및/또는 항체 또는 항원 결합 단편과 또 다른 분자(예를 들어, 스트렙타비딘 코어 영역 또는 폴리히스티딘 태그)의 회합을 매개할 수 있는 단백질 또는 펩타이드와 같은 하나 이상의 다른 분자 개체에 (화학적 결합, 유전자 융합, 비공유 결합 또는 부위 특이적 접합에 적합한 인공 아미노산/작용기의 도입에 의해) 기능적으로 연결될 수 있다.

[0181] 일부 양태에서, 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질은 제제가 진단 및/또는 검출에 사용될 수 있도록 하는 검출 가능한 물질 또는 분자에 접합된다. 검출 가능한 물질에는 또한 효소, 예컨대 호스레이디시 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타제, 글루코스 옥시다제, 베타-갈락토시다제, 및 아세틸콜린에스테라제; 보철 그룹, 예컨대 바이오틴 및 플라빈(들); 형광 물질, 예컨대, 엄벨리페론(umbelliferone), 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 로다민, 테트라메틸로다민 이소티오시아네이트(TRITC), 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단일 클로라이드, 시아닌(Cy3), 5-디메틸아민-1-나프탈렌설포닐 클로라이드, 및 피코에리트린; 생물발광 물질, 예컨대 루시페라아제; 방사성 물질, 예컨대 ^{212}Bi , ^{14}C , ^{57}Co , ^{51}Cr , ^{67}Cu , ^{18}F , ^{68}Ga , ^{67}Ga , ^{153}Gd , ^{159}Gd , ^{68}Ge , ^3H , ^{166}Ho , ^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I , ^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In , ^{140}La , ^{177}Lu , ^{54}Mn , ^{99}Mo , ^{32}P , ^{103}Pd , ^{149}Pm , ^{142}Pr , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{35}S , ^{47}Sc , ^{75}Se , ^{153}Sm , ^{113}Sn , ^{117}Sn , ^{85}Sr , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{201}Ti , ^{133}Xe , ^{90}Y , ^{69}Yb , ^{175}Yb , ^{65}Zn ; 양전자 방출 금속; 및 자성 금속 이온 양전자 방출 금속; 및 자성 금속 이온이 포함되지만 이에 제한되지 않는다.

[0182] 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질은 고체 지지체에 부착될 수 있다. 이러한 고체 지지체에는 유리, 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 나일론, 폴리스티렌, 폴리염화비닐, 또는 폴리프로필렌이 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 고정화된 이중 특이적 결합 단백질이 면역검정에 사용된다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질로 이루어진 고정화된 IgG는 표적 항원(예를 들어, 인간 IL17RB)의 정제에 사용된다.

[0183] 7.3 생성 방법

[0184] 이중 특이적 항체, 항체-알라르민 수용체 융합 단백질, 단일클론 항체, 키메라 항체, 인간 항체, 및 인간화 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않는 본원에 개시된 방법에서 사용될 수 있는 이중 특이적 결합 단백질 및 이의 항체는 본원에 개시되거나 달리 당해 기술분야에 알려진 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 항체 생산 방법은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 포함된 문헌[Harlow *et al.*, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling *et al.*, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563, 681 (Elsevier, N.Y., 1981)]을 참조한다.

[0185] 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법에서 사용될 수 있는 이중 특이적 결합 단백질은 재조합, 즉 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 이중 특이적 결합 단백질은, 예를 들어, 재조합 발현 벡터를 숙주 세포, 재조합, 조합적 인간 항체 라이브러리, 인간 면역글로불린 유전자에 대해 형질전환된 동물(예를 들어, 마우스)로부터 단리된 항체[Taylor, L D *et al.* *Nucleic Acids Research*, vol. 20,23 (1992): 6287-95] 또는 인간 면역글로불린 유전자 서열을 다른 DNA 서열에 스플라이싱하는 것을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생산 또는 단리된 항체에 재조합 발현 벡터를 도입함으로써 제조할 수 있다.

- [0186] 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 숙주 세포에서 면역글로불린 경쇄 및 중쇄 유전자의 재조합 발현에 의해 제조될 수 있다. 이중 특이적 결합 단백질을 발현하기 위해, 숙주 세포에 이중 특이적 결합 단백질의 면역글로불린 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 DNA 단편을 운반하는 하나 이상의 재조합 발현 벡터를 도입하여, 경쇄 및 중쇄가 숙주 세포에서 발현되고, 바람직하게는 숙주 세포가 배양되는 배지로 분비되도록 하며, 이 배지로부터 이중 특이적 결합 단백질을 회수할 수 있다. 표준 재조합 DNA 방법론은 문헌[Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel *et al.* (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates, (1989)] 및 미국 특허 제4,816,397호에 기재된 것과 같이 이중 특이적 결합 단백질 중쇄 및 경쇄 유전자를 얻고, 이러한 유전자를 재조합 발현 벡터에 혼입하고, 벡터를 숙주 세포에 도입하는 데 사용된다.
- [0187] SM17 관련 이중 특이적 결합 단백질과 같은 재조합 이중 특이적 결합 단백질을 발현하기 위해, 먼저 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 암호화하는 DNA 단편을 얻는다. 이러한 DNA는 폴리머라제 연쇄 반응(polymerase chain reaction: PCR)을 사용하여 마우스 항체 경쇄 및 중쇄 가변 서열에 대한 하이브리도마의 증폭 및 변형에 의해, 또는 당업자에게 알려진 표준 방법을 사용하여 설계된 경쇄 및 중쇄 가변 서열의 암호화된 아미노산 서열을 기반으로 하는 올리고합성에 의해 얻을 수 있다. 생성된 항체의 포유류 발현을 용이하게 하기 위해 암호화된 DNA 서열은 더욱 최적화될 수 있다.
- [0188] 무린 항체에 대한 VH 및 VL 단편이 얻어지면, 이러한 서열을 돌연변이시켜 프레임워크-패치된 버전을 암호화할 수 있으며, 이 방법은 그 전체가 본원에 참조로 포함된 W02020115319A1에 기재되어 있다.
- [0189] 이중 특이적 결합 단백질 VH 및 VL 세그먼트를 암호화하는 DNA 단편이 얻어지면(예를 들어, 상기 기재된 바와 같이 원래의 무린 VH 및 VL 유전자의 증폭 및 돌연변이 유발에 의해), 이러한 DNA 단편은 표준 재조합 DNA 기술에 의해 추가로 조작될 수 있으며, 예를 들어, 가변 영역 유전자를 전장 항체 사슬 유전자, Fab 단편 유전자 또는 scFv 유전자로 전환시킬 수 있다. 이러한 조작에서, VL- 또는 VH-암호화 DNA 단편은 항체 불변 영역 또는 유연한 링커와 같은 또 다른 단백질을 암호화하는 또 다른 DNA 단편에 작동적으로 연결된다. 이러한 맥락에서 사용된 "작동적으로 연결된"이라는 용어는 두 DNA 단편이 연결되어 두 DNA 단편에 의해 암호화된 아미노산 서열이 프레임 내에 남아 있음을 의미한다.
- [0190] VH 영역을 암호화하는 단리된 DNA는 VH-암호화 DNA를 중쇄 불변 영역(CH1, CH2 및 CH3)을 암호화하는 또 다른 DNA 분자에 작동적으로 연결함으로써 전장 중쇄 유전자로 전환될 수 있다. 인간 중쇄 불변 영역 유전자의 서열은 당해 기술분야에 알려져 있으며(예를 들어, 문헌[Kabat, E.A., et al (1991) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242] 참조), 이러한 영역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭에 의해 얻을 수 있다. 중쇄 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, Ig4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변 영역일 수 있지만, 가장 바람직하게는 IgG1 또는 IgG4 불변 영역이다. Fab 단편 중쇄 유전자의 경우, VH-암호화 DNA는 중쇄 CH1 불변 영역만을 암호화하는 또 다른 DNA 분자에 작동적으로 연결될 수 있다.
- [0191] VL 영역을 암호화하는 단리된 DNA는 VL-암호화 DNA를 경쇄 불변 영역인 CL을 암호화하는 또 다른 DNA 분자에 작동적으로 연결함으로써 (Fab 경쇄 유전자 뿐만 아니라) 전장 경쇄 유전자로 전환될 수 있다. 인간 경쇄 불변 영역 유전자의 서열은 당해 기술분야에 알려져 있으며(예를 들어, 문헌[Kabat, E.A., et al (1991) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242] 참조), 이러한 영역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭에 의해 얻을 수 있다. 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 불변 영역일 수 있지만, 가장 바람직하게는 카파 불변 영역이다.
- [0192] scFv 유전자를 제조하기 위해, VH- 및 VL-암호화 DNA 단편은 유연한 링커를 암호화하는, 예를 들어, 아미노산 서열(Gly4-Ser)3을 암호화하는 또 다른 단편에 작동적으로 연결되어, VH 및 VL 서열이 VL 및 VH 영역이 유연한 링커에 의해 연결된 연속적인 단일 사슬 단백질로 발현될 수 있다[Bird, R E *et al.* *Science*, (New York, N.Y.) vol. 242,4877 (1988): 423-6; Huston, J S *et al.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 85,16 (1988): 5879-83; McCafferty, J *et al.* *Nature*, vol. 348,6301 (1990): 552-4].
- [0193] 본원에 개시된 방법에서 사용될 수 있는 이중 특이적 결합 단백질을 발현시키기 위해, 상기 기재된 바와 같이 얻은 부분 또는 전장 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 DNA를 발현 벡터에 삽입하여 유전자가 전사 및 번역 제어 서열에 작동적으로 연결되도록 한다. 이러한 맥락에서, "작동적으로 연결된"이라는 용어는 항체 유전자가 벡터로 연결되어 벡터 내의 전사 및 번역 제어 서열이 항체 유전자의 전사 및 번역을 조절하는 의도된 기능을 수행하도록

하는 것을 의미하는 것으로 의도된다. 발현 벡터 및 발현 제어 서열은 사용된 발현 숙주 세포와 호환되도록 선택된다. 항체 경쇄 유전자 및 이중 특이적 결합 단백질 중쇄 유전자는 별도의 벡터에 삽입될 수 있거나, 보다 전형적으로 두 유전자 모두를 동일한 발현 벡터에 삽입한다. 항체 유전자는 표준 방법(예를 들어, 항체 유전자 단편 및 벡터에 대한 상보적 제한 부위의 연결, 또는 제한 부위가 존재하지 않는 경우 블런트 말단 연결(blunt end ligation))에 의해 발현 벡터에 삽입된다. 일부 실시양태에서, SM17 관련 이중 특이적 결합 단백질 경쇄 또는 중쇄 서열을 삽입하기 전에, 발현 벡터는 이미 이중 특이적 결합 단백질 불변 영역 서열을 보유한다. 예를 들어, SM17 관련 이중 특이적 결합 단백질 VH 및 VL 서열을 전장 이중 특이적 결합 단백질 유전자로 전환하는 한 가지 접근법은 이미 중쇄 불변 및 경쇄 불변 영역을 각각 암호화하는 발현 벡터에 삽입하여 VH 세그먼트가 벡터 내의 CH 세그먼트(들)에 작동적으로 연결되고 VL 세그먼트가 벡터 내의 CL 세그먼트에 작동적으로 연결되도록 하는 것이다. 추가적으로 또는 대안적으로, 재조합 발현 벡터는 숙주 세포로부터 항체 사슬의 분비를 용이하게 하는 신호 펩타이드를 암호화할 수 있다. 항체 사슬 유전자는 신호 펩타이드가 항체 사슬 유전자의 아미노 말단에 프레임 내에서 연결되도록 벡터에 클로닝될 수 있다. 신호 펩타이드는 면역글로불린 신호 펩타이드 또는 이중 신호 펩타이드(즉, 비면역글로불린 단백질로부터의 신호 펩타이드)일 수 있다.

[0194] 이중 특이적 결합 단백질 사슬 유전자 외에도, 본원에 제공된 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 이중 특이적 결합 단백질 사슬 유전자의 발현을 제어하는 조절 서열을 보유할 수 있다. "조절 서열"이라는 용어는 이중 특이적 결합 단백질 사슬 유전자의 전사 또는 번역을 제어하는 프로모터, 인핸서 및 기타 발현 제어 요소(예를 들어, 폴리아데닐화 신호)를 포함하는 것으로 의도된다. 이러한 조절 서열은, 예를 들어, 문헌[Goeddel; GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)]에 기재되어 있다. 당업자라면 이해할 수 있겠지만, 조절 서열의 선택을 포함한 발현 벡터의 설계는 형질전환된 숙주 세포의 선택, 원하는 단백질의 발현 수준 등과 같은 인자에 따라 좌우된다. 포유류 숙주 세포 발현을 위한 바람직한 조절 서열에는 포유류 세포에서 단백질 발현의 높은 수준을 지시하는 바이러스 요소, 예컨대 면역글로불린 중쇄(IgH) 인핸서(Gillies, S D *et al. Cell*, vol. 33,3 (1983): 717-28. doi:10.1016/0092-8674(83)90014-4) 메탈로티오네인(MT), 거대세포바이러스(CMV)(예컨대 CMV 프로모터/인핸서), 유인원 바이러스 40(SV40)(예컨대 SV40 프로모터/인핸서), 아데노바이러스(예를 들어, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터(adenovirus major late promoter: AdMLP)) 및 폴리오마로부터 유래된 프로모터 및/또는 인핸서가 포함된다. 바이러스 조절 요소 및 그 서열에 대한 추가 설명은, 예를 들어, 미국 특허 제5,665,578호; 제5,168,062호; 제4,510,245호; 및 제4,968,615호를 참조한다.

[0195] 이중 특이적 결합 단백질 사슬 유전자 및 조절 서열 외에도, 본원에 제공된 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 벡터의 복제를 조절하는 서열(예를 들어, 복제의 기원) 및 선택 가능한 마커 유전자와 같은 추가 서열을 보유할 수 있다. 선택 가능한 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포의 선택을 용이하게 한다(예를 들어, 미국 특허 제4,399,216호, 제4,634,665호 및 제5,179,017호 참조). 예를 들어, 전형적으로 선택 가능한 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포에서 G418, 하이그로마이신 또는 메토타렉세이트와 같은 약물에 대한 내성을 부여한다. 바람직한 선택 가능한 마커 유전자에는 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR) 유전자(메토타렉세이트 선택/중복을 사용한 *dhfr*- 숙주 세포에서 사용하기 위한), 글루타메이트 신타제(GS) 유전자 및 네오 유전자(G418 선택을 위한)가 포함된다.

[0196] 경쇄 및 중쇄의 발현을 위해, 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 발현 벡터는 표준 기술에 의해 숙주 세포로 형질감염된다. "형질감염"의 다양한 형태는 일반적으로 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포가 외인성 DNA를 도입하는 데 사용되는 광범위한 기술, 예를 들어, 전기천공, 인산칼슘 침전, DEAE-덱스트란 형질감염, 리포펙션(lipofection), 원형질체 융합(protoplast fusion) 등을 포괄하도록 의도된다. 이중 특이적 결합 단백질은 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포에서 생성될 수 있지만, 진핵생물 세포, 특히 포유류 숙주 세포에서 이중 특이적 결합 단백질을 발현하는 것이 바람직한데, 이는 이러한 숙주 세포가 원핵생물 세포보다 적절하게 접히고 면역학적으로 활성인 이중 특이적 결합 단백질을 조립하고 분비할 가능성이 더 높기 때문이다.

[0197] 본원에 기재된 방법에서 사용되는 재조합 이중 특이적 결합 단백질을 발현하기 위한 바람직한 포유류 숙주 세포에는 SP2/0 골수종 세포, NSO 골수종 세포, COS 세포, 및 차이니스 햄스터 난소(CHO 세포)(예를 들어, 문헌[R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621]에 기재된 바와 같은 DHFR 선택 가능한 마커와 함께 사용되는 문헌[Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4200]에 기재된 *dhfr*-CHO 세포 포함)가 포함된다. 재조합 단백질 암호화 발현 벡터가 포유류 숙주 세포에 도입될 때, 이중 특이적 결합 단백질은 숙주 세포에서 이중 특이적 결합 단백질의 발현을 허용하기에, 또는 보다 바람직하게는 숙주 세포가 성장한 배양 배지로 이중 특이적 결합 단백질을 분비하기에 충분한 기간 동안 숙주 세포를 배양함으로써 생성된

다. 이중 특이적 결합 단백질은 표준 단백질 정제 방법을 사용하여 배양 배지로부터 회수할 수 있다.

[0198] 숙주 세포는 또한 Fab 단편 또는 scFv 분자와 같은 온전한 항체의 일부를 생성하는 데에도 사용될 수 있다. 본원에는 상기 절차의 변형이 명확하게 고려된다. 예를 들어, 본원에 개시된 방법에서 사용되는 항체의 경쇄 또는 중쇄(그러나 둘 모두는 아님)를 암호화하는 DNA로 숙주 세포를 형질감염시키는 것이 바람직할 수 있다. 재조합 DNA 기술은 또한 알라르민에 결합하는 데 필요하지 않은 경쇄와 중쇄의 중 하나 또는 둘 모두를 암호화하는 DNA의 일부 또는 전부를 제거하는 데 사용될 수 있다. 이러한 절단된 DNA 분자로부터 발현된 분자는 또한 본원에 제공된 항체에 의해 둘러싸인다. 또한, 이중 특이적 결합 단백질을 생산할 수 있는데, 이때 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄는 인간 IL17RB에 특이적으로 결합하는 항체이고 다른 중쇄 및 경쇄는 표준 화학적 가교 방법에 의해 본 발명의 항체를 제2 항체에 가교시켜 IL17RB 이외의 항원에 대해 특이적이다.

[0199] 본원에 개시된 방법에 사용될 수 있는 이의 이중 특이적 결합 단백질의 재조합 발현 시스템의 일부 실시양태에서, 중쇄와 항체 경쇄 둘 모두를 암호화하는 재조합 발현 벡터가 전기천공법에 의해 SP2/0 세포 내로 도입된다. 발현 시스템의 일부 실시양태에서, 중쇄와 항체 경쇄를 둘 모두 암호화하는 재조합 발현 벡터는 리포펙션과 같은 표준 기술에 의해 CHO 세포 내로 도입된다.

[0200] 재조합 발현 벡터 내에서, 중쇄 및 경쇄 유전자는 각각 뮤린 또는 인간 면역글로불린 중쇄(IgH), CMV 인핸서, 메탈로티오네인 또는 AdMLP 프로모터 조절 요소에 작동적으로 연결되어 유전자의 높은 수준의 전사를 유도한다. 재조합 발현 벡터는 또한 DHFR 유전자를 보유하는데, 이를 통해 메토타렉세이트 선택/증폭을 사용하여 벡터로 형질감염된 SP2/0 세포를 선택할 수 있다. 대안적으로, 뮤린 또는 인간 IgH, CMV 인핸서/AdMLP/메탈로티오네인 프로모터 조절 요소 및 DHFR 유전자에 작동적으로 연결된 중쇄 및 경쇄 유전자를 함유하는 재조합 발현 벡터를 사용하여 *dhfr*-인 SP2/0 또는 CHO 세포를 형질감염시킬 수 있다. 벡터로 형질감염된 SP2/0 또는 CHO 세포를 선택하고 배양물에서 메토타렉세이트 수준을 증가시켜 벡터의 유전자 발현 수준을 증폭시킬 수 있다. 선택된 형질 전환체(transformant) 숙주 세포는 중쇄 및 경쇄의 발현을 허용하도록 배양하고, 배양 배지로부터 온전한 이중 특이적 결합 단백질을 회수한다. 표준 분자생물학 기술은 재조합 발현 벡터를 제조하고, 숙주 세포를 형질감염시키고, 형질전환체를 선택하고, 숙주 세포를 배양하고, 배양 배지로부터 이중 특이적 결합 단백질을 회수하는 데 사용된다.

[0201] 7.4 약제학적 조성물

[0202] 본원에는 또한 본원에 개시된 방법에 사용될 수 있는 이중 특이적 결합 단백질을 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 약제학적 조성물은 치료학적 유효량의 본원에 개시된 이중 특이적 결합 단백질 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 약제학적 조성물은 AD 및 천식을 치료하는 데 유용하다. 일부 실시양태에서, 약제학적 조성물은 대상체(예를 들어, 인간 환자)에서 AD 및 천식 진행을 억제하는 데 유용하다.

[0203] 본원에 개시된 약제학적 조성물에서 담체 물질과 조합할 수 있는 치료용 이중 특이적 결합 단백질의 양은 다양할 수 있다. 일부 실시양태에서, 약제학적 조성물에 존재하는 이중 특이적 결합 단백질의 양은 치료 효과를 생성하는 양이다. 일반적으로, 100% 중에서, 이 양은 약제학적으로 허용되는 담체와 조합하여 활성 성분의 약 0.01% 내지 약 99%, 약 0.1% 내지 약 70%, 또는 활성 성분의 약 1% 내지 약 30%의 범위일 것이다.

[0204] 본원에 제공되는 약제학적 조성물은 본원에 제공되는 이중 특이적 결합 단백질, 예를 들어, SM17 관련 이중 특이적 결합 단백질을 포함한다. 이중 특이적 결합 단백질은 다양한 농도로 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 약제학적 조성물은 본원에 제공된 가용성 이중 특이적 결합 단백질을 1 내지 1000 mg/ml로 포함한다. 일부 양태에서, 약제학적 조성물은 본원에 제공되는 가용성 이중 특이적 결합 단백질을 10 내지 500 mg/ml, 10 내지 400 mg/ml, 10 내지 300 mg/ml, 10 내지 200 mg/ml, 10 내지 100 mg/ml, 20 내지 100 mg/ml, 또는 50 내지 100 mg/ml로 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 약제학적 조성물은 본원에 제공되는 이중 특이적 결합 단백질을 약 10 mg/ml, 약 20 mg/ml, 약 30 mg/ml, 약 40 mg/ml, 약 50 mg/ml, 약 60 mg/ml, 약 70 mg/ml, 약 80 mg/ml, 약 90 mg/ml, 약 100 mg/ml, 약 120 mg/ml, 약 150 mg/ml, 약 180 mg/ml, 약 200 mg/ml, 약 300 mg/ml, 약 500 mg/ml, 약 800 mg/ml 또는 약 1000 mg/ml로 포함한다. 투여량은 당업자에 의해 용이하게 조정될 수 있으며; 예를 들어, 순도가 감소하면 투여량을 증가시킬 필요가 있다.

[0205] 본원에 제공되는 약제학적 조성물은 다양한 형태일 수 있다. 여기에는, 예를 들어, 액체, 반고체 및 고체 투여 형태, 예컨대 액체 용액(예를 들어, 주사용 및 불용성 용액), 분산액 또는 현탁액, 정제, 알약, 분말, 리포솜 및 좌약이 포함된다. 바람직한 형태는 의도된 투여 모드 및 치료적 적용에 따라 좌우된다. 본원에 기재된 약제

학적 조성물 또는 제형에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예로는 물, 에탄올, 폴리올(예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예컨대 올리브 오일, 및 주사용 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트가 포함된다.

[0206] 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅 재료를 사용하고, 분산액의 경우 필요한 입자 크기를 유지하고, 계면활성제를 사용하여 유지할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 약제학적 조성물은 주사용 또는 불용성 용액의 형태이다. 일부 실시양태에서, 약제학적 조성물은 수성 제형이다. 이러한 제형은 전형적으로 용액 또는 현탁액이지만, 콜로이드, 분산액, 에멀전, 및 다상(multi-phase) 물질을 포함할 수도 있다. "수성 제형"이라는 용어는 적어도 50% w/w의 물을 포함하는 제형으로 정의된다. 마찬가지로, "수용액"이라는 용어는 적어도 50% w/w 물을 포함하는 용액으로 정의되고, "수성 현탁액"이라는 용어는 적어도 50% w/w 물을 포함하는 현탁액으로 정의된다. 조성물은 용액, 마이크로에멀전, 리포솜, 또는 높은 약물 농도에 적합한 기타 정렬된 구조로서 제형화할 수 있다.

[0207] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 약제학적 조성물은 동결-건조되며, 의사 또는 환자가 사용 전에 용매 및/또는 희석제를 첨가한다.

[0208] 본원에 제공되는 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체에는 생리학적으로 호환되는 임의의 모든 용매, 분산 매체, 코팅, 향균 및 향진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등이 포함된다. 예로는 물, 식염수, 인산염 완충 식염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등 중 하나 이상 뿐만 아니라 이들의 조합이 포함된다. 일부 실시양태에서, 약제학적 허용되는 담체에는 등장화제, 예를 들어, 당, 폴리알코올, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨이 조성물 내에 포함된다.

[0209] 일부 실시양태에서, 약제학적 허용되는 담체는 항체 또는 항원 결합 단편의 저장 수명 또는 효과를 향상시키는 습윤제 또는 유화제, 보존제 또는 완충제와 같은 보조 물질을 소량 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척추 또는 표피 투여(예를 들어, 주사 또는 주입에 의해)에 적합하다. 투여 경로에 따라, 활성 성분(즉, 이중 특이적 결합 단백질)을 물질에 코팅하여 활성 성분을 불활성화시킬 수 있는 산 및 기타 자연 조건의 작용으로부터 활성 성분을 보호할 수 있다.

[0210] 본원에는 또한 본원에 개시된 이중 특이적 결합 단백질, 예를 들어, SM17 관련 이중 특이적 결합 단백질을 갖는 약제학적 조성물의 제조를 위한 키트가 제공된다. 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 개시된 이중 특이적 결합 단백질 및 약제학적으로 허용되는 담체를 하나 이상의 용기에 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 키트는 대상체에게 투여하기 위한 본원에 개시된 결합 단백질을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 키트는 이중 특이적 결합 단백질의 제조 및/또는 투여에 관한 지침을 포함한다.

[0211] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 약제학적 조성물 또는 제형은 다음을 포함한다: (a) 본원에 개시된 이중 특이적 결합 단백질; (b) 완충제; (c) 안정화제; (d) 염; (e) 증량제; 및/또는 (f) 계면활성제. 일부 실시양태에서, 약제학적 조성물 또는 제형은 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 6개월, 적어도 1년, 적어도 2년, 적어도 3년, 적어도 5년 이상 동안 안정하다. 일부 실시양태에서, 약제학적 조성물 또는 제형은 4°C, 25°C, 또는 40°C에서 보관할 때 안정하다. 일부 실시양태에서, 본원에는 또한 장기 보관을 허용하기 위해 이중 특이적 결합 단백질의 안정성을 개선하는 약제학적 조성물 또는 제형이 제공된다. 본원에 개시된 약제학적 조성물은 보존제, 장성제(tonicity agent), 킬레이트제, 안정화제 및/또는 계면활성제 중 하나 이상 뿐만 아니라 이들의 다양한 조합을 추가로 포함할 수 있다. 약제학적 조성물에서 보존제, 등장화제, 킬레이트제, 안정화제 및 계면활성제의 사용은 당업자에게 잘 알려져 있다. 문헌[Remington: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, 19th edition, 1995]을 참조할 수 있다.

[0212] 본원에 개시된 약제학적 조성물 또는 제형에 유용한 완충제는 다른 산 또는 염기를 첨가한 후 용액의 산성도(pH)를 선택한 값에 가깝게 유지하는 데 사용되는 약산 또는 염기일 수 있다. 적합한 완충제는 제형의 pH 제어를 유지함으로써 약제학적 제형의 안정성을 극대화할 수 있다. 적합한 완충제는 또한 생리학적 적합성을 보장하거나 용해도를 최적화할 수 있다. 유변학, 점도 및 기타 특성 또한 제형의 pH에 따라 좌우될 수 있다. 일반적인 완충제에는 히스티딘, 시트레이트, 석시네이트, 아세테이트 및 포스페이트가 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 완충제는 등장화제와 함께 히스티딘(예를 들어, L-히스티딘)을 포함하고, 당해 기술분야에 알려진 산 또는 염기로 잠재적으로 pH를 조정한다. 특정 실시양태에서, 완충제는 L-히스티딘이다. 특정 실시양태에서, 제형의 pH는 약 2 내지 약 10, 또는 약 4 내지 약 8에서 유지된다.

[0213] 안정화제는 의약품에 첨가되어 해당 제품을 안정화한다. 이러한 제제는 다양한 방식으로 단백질을 안정화시킬

수 있다. 일반적인 안정화제에는 아미노산, 예컨대 글리신, 알라닌, 라이신, 아르기닌, 또는 트레오닌, 탄수화물, 예컨대 글루코스, 수크로스, 트레할로스, 라피노스, 또는 말토스, 폴리올, 예컨대 글리세롤, 만니톨, 소르비톨, 임의의 종류 및 분자량의 사이클로덱스트린 또는 텍스트란, 또는 PEG가 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 안정화제는 동결건조된 제제에서 FIX 폴리펩타이드의 안정성을 최대화하기 위해 선택된다. 특정 실시양태에서, 안정화제는 수크로스 및/또는 아르기닌이다.

[0214] 증량제는 약제학적 조성물 또는 제형에 첨가하여 제품에 부피 및 질량을 추가할 수 있으며, 이에 따라 정확한 계량 및 취급을 용이하게 할 수 있다. 일반적인 증량제에는 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨, 소르비톨, 탄산칼슘, 또는 스테아르산마그네슘이 포함되지만 이에 제한되지 않는다.

[0215] 계면활성제는 친액성(lyophilic)과 소액성(lyophobic) 기를 가진 양친매성 물질이다. 계면활성제는 음이온성, 양이온성, 썬비터이온성 또는 비이온성일 수 있다. 비이온성 계면활성제의 예로는 알킬 에톡실레이트, 노닐페놀 에톡실레이트, 아민 에톡실레이트, 폴리에틸렌 옥사이드, 폴리프로필렌 옥사이드, 지방 알코올, 예컨대 세틸 알코올 또는 올레일 알코올, 코카미드 MEA, 코카미드 DEA, 폴리소르베이트, 또는 도데실 디메틸아민 옥사이드가 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 계면활성제는 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80이다.

[0216] 본원에 개시된 약제학적 조성물은 또한 약제학적으로 허용되는 향산화제를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 향산화제의 예는 다음을 포함한다: (1) 수용성 향산화제, 예컨대 아스코르브산, 시스테인 하이드로클로라이드, 중황산나트륨, 메타중황산나트륨, 아황산나트륨 등; (2) 유용성(oil-soluble) 향산화제, 예컨대 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 하이드록시아니솔(BHA), 부틸화 하이드록시톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등; (3) 금속 킬레이트제, 예컨대 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등.

[0217] 이러한 조성물은 또한 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 애쥬번트를 함유할 수 있다. 미생물의 존재의 예방은 상기의 멸균 절차에 의해 그리고 다양한 항균 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등을 포함시킴으로써 보장될 수 있다. 또한, 등장화제, 예컨대 당, 염화나트륨 등을 조성물에 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 제제를 포함함으로써 주사용 약제학적 형태의 장기간 흡수가 초래될 수 있다.

[0218] 약제학적 조성물 또는 제형은 전형적으로 제조 및 보관 조건 하에서 멸균되고 안정적이어야 한다. 약제학적으로 허용되는 담체는 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 멸균 주사용 용액은 치료용 항체 또는 항원 결합 단편을 필요에 따라 상기 열거한 성분 중 하나 또는 이의 조합과 함께 적절한 용매에 필요한 양으로 혼입한 다음, 여과 멸균하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 활성인 물질에 대한 이러한 매질 및 제제의 사용은 당해 기술분야에 알려져 있다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산 매질 및 상기 열거된 것들로부터 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클에 활성 화합물을 혼입함으로써 제조된다. 멸균 주사용 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 일부 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조(동결 건조)이며, 이는 활성 성분과 이의 이전에 멸균 여과된 용액으로부터 임의의 원하는 추가 성분의 분말을 생성한다.

[0219] 본원에 개시된 약제학적 조성물은 임플란트, 경피 패치 및 미세캡슐화된 전달 시스템을 포함한 제어 방출 제형과 같이 활성 성분을 빠른 방출로부터 보호하는 담체와 함께 제조될 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안하이드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산과 같은 생분해성 생체적합성 중합체가 사용될 수 있다. 이러한 제형을 제조하기 위한 많은 방법은 특허를 받았거나 일반적으로 당업자에게 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[SUSTAINED AND CONTROLLED RELEASE DRUG DELIVERY SYSTEMS, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978]을 참조한다.

[0220] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질은 생체내에서 적절한 분포를 보장하도록 제형화될 수 있다. 예를 들어, 혈액-뇌 장벽(blood-brain barrier: BBB)은 많은 고도의 친수성 화합물을 배제한다. 본원에 기재된 치료용 항체가 BBB를 통과하도록 용이하게 하기 위해, 이들은, 예를 들어, 리포솜에서 제형화될 수 있다. 리포솜 제조 방법의 경우, 예를 들어, 미국 특허 제4,522,811호; 제5,374,548호; 및 제5,399,331호를 참조한다. 리포솜은 특정 세포 또는 장기로 선택적으로 수송되는 하나 이상의 모이어티를 포함하여 표적 약물 전달을 향상시킬 수 있다(예를 들어, 문헌[V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685] 참조). 예시적인 표적 모이어티는 엽산 또는 비오틴(예를 들어, Low 등의 미국 특허 제5,416,016호 참조), 만노사이드[Umezawa, F, and Y Eto. *Biochemical And Biophysical Research Communications* vol. 153,3 (1988): 1038-44.]; 항체

[Bloemen, P G et al. FEBS letters vol. 357,2 (1995): 140-4.] [Owais, M et al. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* vol. 39,1 (1995): 180-4.]; 계면활성제 단백질 A 수용체[Briscoe, P et al. *The American Journal Of Physiology* vol. 268,3 Pt 1 (1995): L374-80]; p120[Schreier, H et al. *The Journal Of Biological Chemistry* vol. 269,12 (1994): 9090-8][Keinänen, K, and M L Laukkanen. *FEBS letters* vol. 346,1 (1994): 123-6][Killion, J J, and I J Fidler. *ImmunoMethods* vol. 4,3 (1994): 273-9]을 포함한다.

[0221] **7.5 치료 방법**

[0222] 상기 섹션에서 설명된 바와 같이, 본원에는 알레르기 질환 또는 장애를 치료하는 데 있어서 이중 특이적 결합 단백질(예를 들어, SM17 관련 이중 특이적 결합 단백질)의 의학적 용도가 제공된다. 본원에 개시된 임의의 이중 특이적 결합 단백질은 본원에 개시된 방법에서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용되는 것은 재조합 항-IL17RB/항-TSLP 이중 특이적 항체이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용되는 것은 재조합 항-IL17RB/항-IL33 이중 특이적 항체이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용되는 것은 재조합 항-IL17RB/TSLP 수용체 이중 특이적 결합 단백질이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용되는 것은 재조합 항-IL17RB/IL33 수용체 이중 특이적 결합 단백질이다.

[0223] 일부 실시양태에서, 본원에는 폐 ILC2 증식 감소를 필요로 하는 대상체에서 폐 ILC2 증식을 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 본원에는 또한 알레르기와 관련된 질환 또는 장애 치료를 필요로 하는 대상체에서 알레르기와 관련된 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 본원에는 또한 호산구성 염증 감소를 필요로 하는 대상체에서 호산구성 염증을 감소시키는 방법이다. 일부 실시양태에서, 본원에는 또한 호중구성 염증과 관련된 질환 또는 장애 치료를 필요로 하는 대상체에서 호중구성 염증과 관련된 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 본원에는 질환 또는 장애 치료를 필요로 하는 대상체에서 OCS 1일 용량을 적어도 20%, 적어도 50%, 또는 적어도 75% 초과 감소시킴으로써 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0224] 폐 ILC2 증식을 감소시키고 호중구성 염증과 관련된 질환 또는 장애를 치료하고 호산구성 염증과 관련된 질환 또는 장애를 치료하고 OCS 1일 용량을 감소시켜 질환 또는 장애를 치료하는 방법은 (a) IL17RB 및 TSLP 및/또는 (b) IL17RB 및 IL-33에 특이적으로 결합하는 이중 특이적 결합 단백질의 치료학적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0225] 본 방법에 적합한 대상체는 알라르민의 활성을 차단하는 것이 바람직한 인간 환자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법으로 치료하고자 하는 대상체는 알레르기와 관련된 질환 또는 장애로 진단되며, 이는 임상 또는 전임상 천식, AD, 섬유화 질환, 염증성 장 질환(IBD), 크론병, 궤양성 대장염, 만성 폐쇄성 폐질환, 만성 부비동염, 비용종을 동반한 만성 비부비동염일 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 포유류일 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법으로 치료하고자 하는 대상체는 OCS를 투여받았다. 일부 실시양태에서, 대상체는 이전에 치료받지 않았다.

[0226] 본원에 제공된 이중 특이적 결합 단백질(예를 들어, SM17 관련 이중 특이적 결합 단백질) 또는 약제학적 조성물은 정맥 투여, 피하 투여, 근육 투여, 두개내 투여, 척수강내 투여, 뇌실내 투여, 복강내 투여, 척추 투여, 비강내 투여, 흉막내 투여, 국소 투여, 또는 피내 투여를 포함하지만 이에 제한되지 않는 당해 기술분야에 알려진 임의의 방법으로 대상체에게 투여할 수 있다.

[0227] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 이중 특이적 결합 단백질(예를 들어, SM17 관련 이중 특이적 결합 단백질) 또는 약제학적 조성물은 비경구 투여를 사용하여 대상체에게 투여될 수 있다. 본원에 사용된 "비경구 투여"라는 문구는 일반적으로 주사에 의한 장관 및 국소 투여 이외의 투여 모드를 의미하며, 제한 없이, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척수강내, 낭내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 낭하, 지주막하, 척추내, 경막하 및 줄기세포내 주사 및 주입을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 정맥내 주입 또는 주사로 투여된다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 근육내 주사로 투여된다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 피하 주사로 투여된다.

[0228] 본원에 제공된 이중 특이적 결합 단백질(예를 들어, SM17 관련 이중 특이적 결합 단백질) 또는 약제학적 조성물은 당해 기술분야에 알려진 의료 기기를 사용하여 투여할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 미국 특허 제5,399,163호; 제5,383,851호; 제5,312,335호; 제5,064,413호; 제4,941,880호; 제4,790,824호; 또는 제4,596,556호에 개시된 기기와 같은 바늘 없는 피하 주사 기기가 사용될 수 있다. 본원에 기재된 잘 알려진 임플란트 및 사용 모듈의 예는 다음을 포함한다: 제어된 속도로 약물을 분배하기 위한 이식형 미세 주입 펌프를 개

시한 미국 특허 제4,487,603호; 피부를 통해 약물을 투여하기 위한 치료 기기를 개시하는 미국 특허 제 4,486,194호; 정확한 주입 속도로 약물을 전달하기 위한 약물 주입 펌프를 개시하는 미국 특허 제4,447,233호; 연속적인 약물 전달을 위한 가변 유량 이식형 주입 장치를 개시하는 미국 특허 제4,447,224호; 다중 챔버 구획을 갖는 삼투성 약물 전달 시스템을 개시하는 미국 특허 제4,439,196호; 및 삼투성 약물 전달 시스템을 개시하는 미국 특허 제4,475,196호. 이러한 특허는 본원에 참조로 포함된다. 이러한 다른 많은 임플란트, 전달 시스템, 및 모듈은 당업자에게 알려져 있다.

[0229] 일부 양태에서, 본원에 개시된 이중 특이적 결합 단백질은, 예를 들어, 불활성 희석제 또는 동화 가능한 식용 담체(assimilable edible carrier)와 함께 경구 투여될 수 있다. 치료용 이중 특이적 결합 단백질은 경질 또는 연질 젤 젤라틴 캡슐에 싸이거나, 정제로 압축되거나, 대상체의 식단에 직접 혼입될 수도 있다. 경구 치료제 투여의 경우, 이중 특이적 결합 단백질은 부형제와 함께 혼입되어 섭취 가능한 정제, 협측 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 현탁액, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다.

[0230] 본원에 제공되는 방법은 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질(예를 들어, SM17 관련 이중 특이적 결합 단백질)의 치료학적 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 치료용 항체의 실제 투여량 수준은 환자에게 독성이 없으면서 특정 환자에 대해 원하는 치료적 반응을 달성하는 데 효과적인 양을 얻도록 다양할 수 있다. 선택된 투여량 수준은 본원에 기재된 특정 조성물의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 배설 속도, 치료 기간, 사용된 특정 조성물과 조합하여 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료를 받는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강 및 이전 병력, 및 의학 분야에서 잘 알려진 유사한 인자를 포함한 다양한 약동학적 인자에 따라 좌우될 것이다.

[0231] 일반적으로, 투여량은, 예를 들어, 단일 용량의 경우 숙주 체중 kg당 약 0.1 내지 100 mg의 범위일 수 있다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질(예를 들어, SM17 관련 이중 특이적 결합 단백질)은 약 1 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 3 mg/kg, 약 4 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 6 mg/kg, 약 7 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 9 mg/kg, 약 10 mg/kg, 약 20 mg/kg, 약 30 mg/kg, 약 40 mg/kg, 약 50 mg/kg, 약 60 mg/kg, 약 70 mg/kg, 약 80 mg/kg, 약 90 mg/kg으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 약 1 mg/kg으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 약 5 mg/kg으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 약 10 mg/kg으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 약 20 mg/kg으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 약 40 mg/kg으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 약 60 mg/kg으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 약 100 mg/kg으로 투여된다.

[0232] 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질(예를 들어, SM17 관련 이중 특이적 결합 단백질)은 약 1 내지 5 mg/kg, 약 1 내지 10 mg/kg, 약 1 내지 20 mg/kg, 약 1 내지 50 mg/kg, 약 1 내지 100 mg/kg, 약 5 내지 10 mg/kg, 약 5 내지 20 mg/kg, 약 5 내지 50 mg/kg, 약 5 내지 100 mg/kg, 약 10 내지 50 mg/kg, 또는 약 10 내지 100 mg/kg의 범위 내의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 약 1 내지 5 mg/kg의 범위 내의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 약 1 내지 10 mg/kg의 범위 내의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 약 1 내지 50 mg/kg의 범위 내의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 약 10 내지 50 mg/kg의 범위 내의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 약 10 내지 100 mg/kg의 범위 내의 용량으로 투여된다.

[0233] 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법은 이중 특이적 결합 단백질(예를 들어, SM17 관련 이중 특이적 결합 단백질)을 약 10 내지 2000 mg의 용량으로 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 용량은 약 10 mg, 약 50 mg, 약 100 mg, 약 200 mg, 약 300 mg, 약 400 mg, 약 500 mg, 약 600 mg, 약 700 mg, 약 800 mg, 약 900 mg, 약 1000 mg, 약 1100 mg, 약 1200 mg, 약 1300 mg, 약 1400 mg, 약 1500 mg, 약 1600 mg, 약 1700 mg, 약 1800 mg, 약 1900 mg, 또는 약 2000 mg이다. 일부 실시양태에서, 항체는 100 mg의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 항체는 300 mg의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 항체는 600 mg의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 항체는 900 mg의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 항체는 1200 mg의 용량으로 투여된다.

[0234] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공되는 방법은 이중 특이적 결합 단백질(예를 들어, SM17 관련 이중 특이적 결합 단백질)로 이루어진 IgG를 약 10 내지 50 mg, 10 내지 100 mg, 10 내지 200 mg, 100 내지 300 mg, 100 내지 500 mg, 300 내지 600 mg, 300 내지 900 mg, 300 내지 1200 mg, 600 내지 1200 mg, 600 내지 1800 mg, 또는 1000 내지 2000 mg의 범위 내의 용량으로 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 100 내지 500

mg의 범위 내의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 항체는 300 내지 600 mg의 범위 내의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 항체는 300 내지 900 mg의 범위 내의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 항체는 600 내지 1200 mg의 범위 내의 용량으로 투여된다.

- [0235] 치료 동안, 더 낮은 용량으로 시작하여 나중에 표적 용량까지 증가시키는 것이 일반적이다. 예시 목적으로, 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법은 이종 특이적 결합 단백질을 약 100 mg의 용량으로 투여하는 단계를 포함하며, 이는 약 600 mg의 표적 용량까지 점진적으로 증가된다.
- [0236] 대상체는 매일, 격일, 매주, 격주, 매월 또는 경험적 분석에 의해 결정된 임의의 다른 일정에 따라 이러한 용량으로 투여될 수 있다. 예시적인 치료법은 장기간, 예를 들어, 적어도 6개월에 걸쳐 여러 투여량으로 투여하는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법은 이종 특이적 결합 단백질을 매주 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 격주 투여를 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 매월 투여를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이종 특이적 결합 단백질(예를 들어, SM17 관련 이종 특이적 결합 단백질)은 매주, 격주, 또는 매월 피하 투여된다. 일부 실시양태에서, 이종 특이적 결합 단백질(예를 들어, SM17 관련 이종 특이적 결합 단백질)로 이루어진 IgG는 매주, 격주, 또는 매월 정맥내 투여된다.
- [0237] 이종 특이적 결합 단백질(예를 들어, SM17 관련 이종 특이적 결합 단백질)은, 필요하고 적절한 경우, 최대 3개월, 6개월, 9개월, 12개월, 18개월, 24개월, 30개월, 또는 36개월까지 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료는 적어도 3개월 동안 지속된다. 일부 실시양태에서, 치료는 적어도 6개월 동안 지속된다. 일부 실시양태에서, 치료는 적어도 12개월 동안 지속된다. 일부 실시양태에서, 치료는 적어도 24개월 동안 지속된다.
- [0238] 예를 들어, 투여 라운드, 투여량, 치료 빈도, 및 치료 기간의 다양한 실시양태의 모든 순열 및 조합은 본원에 명시적으로 고려되며 본원에 개시된 치료 방법에 채택될 수 있다.
- [0239] 예시 목적으로, 다음의 치료 용법은 본원에 개시된 항-IL17RB 항체 또는 항원 결합 단편(예를 들어, SM17 관련 이종 특이적 결합 단백질) 또는 본원에 개시된 방법에서 확인된 항-IL17RB 항체 또는 항원 결합 단편을 투여하는 단계를 포함하는 본원에 개시된 방법에 채택될 수 있다.
- [0240] 일부 실시양태에서, 치료용 항체는 약 10 mg/kg의 용량으로 4주마다 그리고 적어도 21일 간격으로 정맥내 또는 피하로 투여된다. 일부 실시양태에서, 다음의 적정 스케줄이 포함된다: 주입 1-2: 1 mg/kg IV; 주입 3-4: 3 mg/kg IV; 주입 5-6: 6 mg/kg IV; 주입 7 이상: 10 mg/kg IV.
- [0241] 일부 실시양태에서, 치료용 항체는 10, 20, 또는 40 mg/kg의 단일 용량으로, 두 번째는 24주 동안 격주로 10 mg/kg으로, 그리고 세 번째는 16개월 동안 매월 10 또는 20 mg/kg으로 정맥내 또는 피하로 투여된다.
- [0242] 일부 실시양태에서, 치료용 항체는 최대 2년 동안 매주 약 250 mg, 또는 격주 500 mg의 용량으로 정맥내 또는 피하로 투여된다. 일부 실시양태에서, 치료는 약 120 mg의 주사(shot)로 매월 시작된다.
- [0243] 최적의 원하는 반응(예를 들어, 치료적 또는 예방적 반응)을 제공하도록 투여 용법을 조정할 수 있다. 예를 들어, 단일 볼루스를 투여할 수 있거나, 시간이 경과함에 따라 여러 분할된 용량을 투여할 수 있거나, 치료 상황의 긴급성에 의해 지시된 바와 같이 용량을 비례적으로 감소시키거나 증가시킬 수 있다. 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 비경구 조성물을 투여 단위 형태로 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본원에서 사용되는 투여 단위 형태는 치료하고자 하는 포유류 대상체에 대한 단일 투여량으로서 적합한 물리적으로 분리된 단위를 지칭하며; 각 단위에는 필요한 약제학적 담체와 관련하여 원하는 치료 효과를 생성하도록 계산된 미리 결정된 양의 치료용 항체가 함유되어 있다. 적절한 투여량은 완화하고자 하는 병태의 유형 및 중증도에 따라 다르다는 점에 유의해야 한다. 임의의 특정 대상체의 경우, 특정 투여량 용법은 개별적인 필요와 조성물의 투여를 관리하거나 감독하는 사람의 전문적인 판단에 따라 시간이 경과함에 따라 조정되어야 하며, 본원에 명시된 투여량 범위는 단지 예시적일 뿐, 청구된 조성물의 범위 또는 실시를 제한하려는 의도가 아님을 추가로 이해해야 한다.
- [0244] 알레르기 및 관련된 질환 또는 장애의 치료에 있어서, 때때로 본원에 제공되는 방법으로 질환 또는 장애를 치료할 수 있지만, 임의의 임상적 개선은 이점을 구성한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법은 1일 OCS 사용량을 평균 약 2.5mg/일, 약 5 mg/일, 약 10 mg/일, 약 20 mg/일, 약 40 mg/일, 약 95 CL만큼 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법은 OCS 용량의 1일 사용량을 평균 25% 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법은 OCS 용량의 1일 사용량을 평균 50% 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법은 OCS 용량의 1일 사용량을 평균 75% 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법은 OCS 용량의 1일 사용량을 평균 100% 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법은 OCS 용량의 1일 사용량을 평균 25 내지 50% 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법은 OCS 용량의 1일 사용량을 평균 50 내

지 75% 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법은 OCS 용량의 1일 사용량을 평균 75 내지 100% 감소시킨다.

[0245] 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법은 폐에서 ILC2 증식을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법은 폐로의 ILC2 이동을 감소시킨다. 일부 양태에서, 본원에 제공되는 방법은 기관지 폐포액에서 IL-5 수준을 감소시킨다. 일부 양태에서, 본원에 제공되는 방법은 기관지 폐포액에서 IL-13 수준을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법은 폐 호산구성 염증을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법은 연간 천식 악화율을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법은 호기된 일산화질소의 분율을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법은 혈액 호산구 수를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법은 경피 수분 손실을 감소시킨다.

[0246] 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법은 AD의 발병을 예방하거나, 진행성 AD를 지연시키거나 중단시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법은 AD의 증상을 개선한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법은 천식의 발병을 예방하거나, 천식의 진행을 지연시키거나 중단시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공되는 방법은 천식의 증상을 개선한다.

[0247] 본원에 개시된 이중 특이적 결합 단백질은 당해 기술분야에 알려진 다양한 방법으로 투여될 수 있다. 당업자가 알고 있는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 모드는 원하는 결과에 따라 달라진다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 결합 단백질은 임플란트, 경피 패치, 및 미세캡슐화된 전달 시스템을 포함한 제어된 방출 제형과 같이 빠른 방출에 대해 이를 보호하는 담체와 함께 제조될 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리안하이드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산과 같은 생분해성 생체 적합성 중합체가 사용될 수 있다. 이러한 제형을 제조하기 위한 많은 방법은 특허를 받았거나 일반적으로 당업자에게 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[SUSTAINED AND CONTROLLED RELEASE DRUG DELIVERY SYSTEMS, J. R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978]을 참조한다. 치료 응용 분야에서, 질환의 진행이 감소하거나 종료될 때까지, 그리고 환자가 질환 증상의 부분적 또는 완전한 개선을 보일 때까지 비교적 짧은 간격으로 비교적 높은 투여량이 때때로 필요하다.

[0248] 작용 기전이 상이한 제제를 사용하는 조합 요법은 상가 또는 상승 효과를 초래할 수 있다. 조합 요법은 단일 요법에서 사용되는 것보다 각 제제의 더 낮은 용량을 허용할 수 있으며, 이에 따라 독성 부작용을 감소시키고/시키거나 본원에 개시된 제제의 치료 지수를 증가시킬 수 있다. 조합 요법은 약물 내성이 발생할 가능성을 감소시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 추가 요법은 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질 또는 약제학적 조성물의 치료 지수를 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 추가 요법은 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질 또는 약제학적 조성물의 독성 및/또는 부작용의 감소를 초래한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질 또는 약제학적 조성물은 추가적인 용법과 조합하여 투여될 수 있다.

[0249] 일부 실시양태에서, 제2 치료제는 코르티코스테로이드, DNA 메틸트랜스퍼라제(DNMT) 억제제, 항-IL4 항체, 항-IL5 항체, 항-IL4Ra 항체, 항-IL13 항체, 및 항-IgE 항체, 항-IL17A 항체, 항-IL12/IL23 항체, 항-IL23 항체, 항-IL17RA 항체, 티로신 키나제 억제제이다. 일부 실시양태에서, 제2 치료제는 염증 촉진성 사이토카인의 방출을 억제하는 제2 항체일 수 있다.

[0250] 제2 치료제는 본원에 기재된 이중 특이적 결합 단백질 또는 약제학적 조성물의 투여 전, 동시에 또는 투여 이후에 투여될 수 있다. 조합 투여에는 단일 약제학적 제형으로 또는 별도의 제형을 사용하여 공동 투여하거나, 어느 순서로든 연속 투여하는 것이 포함될 수 있지만, 일반적으로 모든 활성 제제가 동시에 이들의 생물학적 활성을 발휘할 수 있는 기간 내에 투여할 수 있다. 당업자는 치료받는 대상체의 필요에 기반하여 조합 요법에 사용될 추가 제제의 시기 및 투여를 포함하여, 본원에 기재된 약제학적 조성물 및 추가적인 요법을 조합하여 투여하기 위한 적절한 용법을 용이하게 결정할 수 있다.

[0251] 본 명세서에 인용된 모든 논문, 출판물 및 특허는 각 개별 논문, 출판물 또는 특허가 구체적으로 개별적으로 참조로 포함되도록 지정된 것처럼 본원에 참조로 포함되고 출판물이 인용되는 것과 관련된 방법 및/또는 자료를 개시하고 설명하기 위해 본원에 참조로 포함된다. 그러나, 본원에 인용된 임의의 참조문헌, 논문, 출판물, 특허, 특허 공개 및 특허 출원에 대한 언급은 그것이 유효한 선행 기술을 구성하거나 전 세계 어느 나라에서나 공통된 일반적인 지식의 일부를 형성한다는 것을 인정하거나 임의의 형태로 시사하는 것이 아니며 그렇게 간주되어서도 안 된다.

[0252] 문맥상 달리 나타내지 않는 한, 본원에 기재된 다양한 특징을 임의의 조합으로 사용할 수 있도록 특별히 의도된다.

[0253] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 개시내용이 속하는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.

[0254] 7.6 실험예

[0255] 실시예 1: SM17은 외인성 뮤린, 원숭이, 및 인간 IL-17RB 단백질에 결합한다

[0256] 표준 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA) 방법을 사용하여 IL-17RB 단백질에 대한 SM17의 중 특이성을 결정하였다. 간략히 말하면, 인간, 마우스, 시노몰구스 또는 붉은털 원숭이(R&D systems, Minneapolis, MN)로부터의 IL-17RB 단백질을 PBS에서 2.5 µg/ml로 희석하고 50 µl의 IL-17RB 단백질을 ELISA 스트립의 각 웰에 첨가하였다. 스트립을 파라필름으로 밀봉하고 코팅을 위해 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다.

[0257] 다음날, 스트립을 세척 완충액(PBS에서 0.05% Tween 20)으로 3회 세척하고 차단 완충액(PBS에서 3% BSA)으로 웰당 100 µl로 실온에서 2시간 동안 차단한 후 연속 희석된 SM17(각각 10, 2, 0.4, 0.08, 0.016, 0.0032 및 0.00064 µg/ml의 최종 농도에서)을 첨가하였다. 실온에서 2시간의 인큐베이션 기간 후, 당업자에게 알려진 표준 ELISA 프로토콜에 따라 OD 450 nm에서 옥시다제 접합된 염소 항-인간 F(ab')₂ 특이 항체(Jackson ImmunoResearch) 및 TMB 기질(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 첨가하여 결합된 SM17의 양을 밝혀냈다.

[0258] 결과는 SM17이 뮤린, 인간, 시노몰구스 원숭이 및 붉은털 원숭이로부터의 IL-17RB 단백질에 용량-반응 방식으로 유사한 친화력으로 결합함을 나타낸다(표 1 및 도 1 참조).

[0259] [표 1] 다양한 종으로부터의 IL-17RB에 대한 450 nm에서의 항원 결합의 광학 밀도

SM17 (µg/mL)	OD 450nm 흡수							
	뮤린 IL17RB		인간 IL17RB		붉은털 원숭이 IL17RB		시노몰구스 IL17RB	
10	2.67	2.61	1.82	1.88	1.57	1.59	1.33	1.37
2	2.46	2.44	1.74	1.61	1.40	1.45	1.13	1.12
0.4	1.68	1.61	1.10	1.14	1.12	1.17	0.89	0.97
0.08	0.78	0.64	0.58	0.44	0.51	0.58	0.72	0.74
0.016	0.25	0.31	0.17	0.13	0.27	0.17	0.34	0.35
0.0032	0.12	0.19	-0.07	-0.06	-0.09	0.01	0.04	0.13
0.00064	0.04	0.11	-0.16	-0.21	-0.10	-0.09	-0.06	0.11

[0260] 실시예 2: SM17은 다른 IL17 수용체 서브유닛과 교차 반응하지 않는다

[0262] 표준 ELISA 방법을 사용하여 다른 인간 IL17 수용체 서브유닛에 대한 SM17의 특이성을 결정하였다. 유사하게, 다양한 농도(각각 0.4, 0.08, 0.016, 0.0032 및 0.00064 µg/ml의 최종 농도)로 연속적으로 희석된 SM17을 인간 IL-17 수용체 서브유닛 A, C, D 및 E(IL17RA, IL17RC, IL17RD 및 IL17RE)(R&D systems)로 코팅된 ELISA 플레이트의 웰에 첨가하였다. 다른 알려진 인간 IL-17 수용체 서브유닛(IL17RA, IL17RC, IL17RD 및 IL17RE)에 대한 SM17의 명백한 결합은 검출되지 않았다(표 2 및 도 2 참조).

[표 2] IL-17 수용체 계열 구성원에 대한 450 nM에서의 항원 결합의 광학 밀도

SM17 ($\mu\text{g/mL}$)	OD 450nm 흡수									
	hIL17RA		hIL17RB		hIL17RC		hIL17RD		hIL17RE	
	웰 1	웰 2	웰 1	웰 2	웰 1	웰 2	웰 1	웰 2	웰 1	웰 2
0.4	0.21	0.22	1.26	1.31	0.25	0.18	0.22	0.08	0.08	0.05
0.08	0.00	0.06	0.79	0.64	0.02	-0.02	0.03	0.01	-0.04	0.00
0.016	0.01	-0.04	0.35	0.30	0.09	0.02	0.07	0.02	0.00	-0.04
0.0032	0.20	-0.03	0.16	0.07	0.03	-0.04	0.04	-0.04	-0.01	-0.02
0.00064	0.00	0.05	0.13	0.07	0.13	0.08	0.08	0.02	0.09	-0.16

실시예 3: SM17은 HEK293 세포 표면에 발현되는 인간 및 붉은털 원숭이로부터의 고유 IL-17RB에 결합한다

전장 인간 또는 붉은털 원숭이 IL-17RB(SinoBiological, Beijing, China)로 형질감염된 HEK293 세포(ATCC, Manassas, VA)를 유세포 분석을 위한 표준 프로토콜에 따라 SM17에 대한 결합을 검사하였다. IgG4 이소형 대조군(Sino Biological)으로 염색된 야생형 HEK293을 음성 대조군 및 게이팅 목적으로 사용하였다. 간략히 말하면, 3×10^5 개 세포 밀도의 HEK293 세포를 6웰 플레이트의 각 웰에 시딩하였다. 다음 날, 인간 또는 붉은털 원숭이 IL-17RB 전장 cDNA를 표준 분자 클로닝 기술을 통해 pCMV3-태그가 없는 발현 플라스미드에 클로닝한 다음, 인간 또는 붉은털 원숭이 IL-17RB에 대한 발현 플라스미드를 리포펙션(Lipofectamine 3000 시약; Thermo Fisher Scientific)에 의해 HEK293 세포에 형질감염시켰다. 형질감염된 세포를 트립신 처리하고, 수거하고, 4% 파라포름알데히드로 고정시켰다(5분). 세척 완충액(PBS에서 3% BSA)에서 $1 \mu\text{g/mL}$ 의 SM17 또는 인간 IgG4 대조군을 현탁 세포에 첨가하여 실온에서 30분 동안 인큐베이션한 다음, Alexa Fluor® 647-접합된 염소 항-인간 IgG 특이 항체(세척 완충액에서 1:2000 희석)(Jackson ImmunoResearch)를 BD FACSVerse 세포 분석기(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)를 사용하여 유세포 분석을 위해 첨가하였다.

인간 IL17RB(hIL17RB-HEK293: 46%) 및 붉은털 원숭이 IL17RB(RhIL17RB-HEK293: 39%)로 형질감염된 HEK293에 대한 SM17의 결합은 야생형 HEK293(~7%)에 비해 향상되었는데, 이는 SM17이 HEK293 세포에서 발현된 고유 인간 또는 붉은털 원숭이 IL17RB에 결합한다는 것을 나타냈다(도 3).

실시예 4: SM17은 IL-2 및 IL-25와 공동 배양된 인간 PBMC로부터 IL-5 방출을 억제한다

IL-2 및 IL-25(PeproTech, Cranbury, NJ)와 공동 배양된 PBMC(Ixcells, San Diego, CA)는 천식 상태를 악화시키는 것으로 알려진 사이토카인인 IL-5의 방출을 유발할 수 있다. 따라서, IL-2/IL-25 처리한 인간 PBMC로부터의 IL-5 방출에 대한 SM17의 억제 효과를 평가하였다. 간략히 말하면, 동결보존된 인간 PBMC를 해동하고 10% 소태아 혈청(Thermo Fisher Scientific)이 보충된 RPMI-1640 배지에서 배양하였다. 0.16 ng/mL 에서 5 mg/mL 까지 범위의 농도로 연속적으로 희석된 SM17을 10 단위/mL 의 IL-2 및 $10 \mu\text{g/mL}$ 의 IL-25의 존재 하에서 4×10^5 개의 인간 PBMC에 첨가하였다. 비특이적 인간 IgG4(SinoBiological)를 대조군 항체로서 사용하였다. 처리된 세포를 37°C 에서 72시간 동안 인큐베이션하고, 배양 상층액에서 IL-5 방출 수준을 표준 ELISA 검정(R&D 시스템)으로 측정하였다. 결과는 SM17이 용량 의존적 방식으로 IL-2 및 IL-25로 유도된 인간 PBMC로부터의 IL-5 방출을 억제했음을 나타냈다(도 4). 결과는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다. 일원 분산 분석(One Way ANOVA), Dunnett의 다중 비교 검정, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

실시예 5: 신장 암종 세포주 TK-10에서 SM17에 의한 IL-8 방출 억제

인간 IL-25(PeproTech) 및 TNF α (R&D 시스템)로 처리한 인간 신장 암종 세포주 TK-10(NCI-60, NIH, Bethesda, MD)은 선천성 면역 체계 반응에서 면역 반응의 중요한 매개체인 호중구 화학주성 인자로도 알려진 IL-8의 방출을 유발할 수 있다. 따라서, SM17과 그 묶인 대응물(D9.2)이 IL-25/TNF α 처리된 TK-10 세포로부터 IL-8 방출에 미치는 억제 효과를 평가하였다. 간략히 말하면, SM17(인간 IgG4 이소형, SinoMab BioScience Limited, Hong Kong, China), SM17-IgG1(인간 IgG1 이소형, SinoMab BioScience Limited) 및 그 묶인 대응물(D9.2, SinoMab BioScience Limited)을 1 mg/mL 농도로 100 ng/mL 의 IL-25 및 10 ng/mL 의 TNF α 의 존재 하에서 2×10^4 의 TK-10 세포에 첨가하였다. 비특이적 인간 IgG1(SM03, 항-CD22 키메라 항체, SinoMab BioScience Limited)을 대조군 항체로서 사용하였다. 처리된 세포를 OptiMEM(Thermo Fisher Scientific)에서 37°C 에서 24시간 또는 48시간

동안 배양하고, 배양 상층액에서 IL-8 방출 수준을 상용 키트(R&D 시스템)를 사용하여 표준 ELISA 검정으로 측정하였다. 결과는 1 mg/mL에서 SM17, SM17-IgG1 또는 D9.2가 두 시점 모두에서 IL-25/TNFα 유도 TK-10 세포에 의한 IL-8 방출을 효율적으로 억제할 수 있음을 나타냈다(도 5).

[0272] 실시예 6: SM17의 항원(IL17RB) 결합 동역학의 결정

[0273] 인간 및 시노물구스 원숭이 IL17RB 단백질(R&D 시스템)에 대한 SM17의 결합 친화도를 결정하기 위해 생물층 간섭계 분석(Octet ReD96 system, Sartorius)을 사용하였다. 간략히 말하면, SM17(20 μg/mL)은 항-인간 Fab CH1과의 상호작용을 통해 바이오센서에 고정화되었고; 연속적으로 희석된 Cyno-IL17RB 및 인간-IL17RB(각각 158.7 nM, 79.4 nM 및 39.7 nM의 농도로)는 그 후 Octet ReD96 시스템의 표준 작동 프로토콜에 따라 첨가하여 결합 및 해리 곡선을 플롯팅하였다. 관련 없는 항체(SM03, 항-인간 CD22 키메라 IgG1 항체, SinoMab BioScience Limited)를 참조 대조군으로서 사용하였다. 각각의 항체의 K_a , K_{dis} 및 K_D 값을 아래 표 3에 요약되어 있다. 주목할 점은 K_D 가 피코몰-단일 자릿수 나노몰 범위 내에 있다는 것이다.

[0274] [표 3] 인간 및 시노물구스 IL-17RB에 대한 SM17의 결합 동역학

IL17RB	Trial	K_a (1/Ms)	K_{dis} (1/s)	K_D (nM)	범위 (nM)
인간	1	2.22×10^5	4.30×10^{-5}	0.194	0.194-0.546
	2	1.83×10^5	9.98×10^{-5}	0.546	
시노물구스	1	3.21×10^4	2.73×10^{-5}	0.852	0.852-5.11
	2	4.21×10^4	2.15×10^{-4}	5.11	

[0276] 실시예 7: 마우스에서 오발부민으로 유발된 천식에 대한 SM17의 치료 효과

[0277] 암컷 BALB/c 마우스에게 오브알부민을 유발하여 마우스에서 천식과 유사한 증상을 유발하였다. 간략히 말하면, 마우스를 각각 0일차와 12일차에 복강내(IP) 주사를 통해 총 200 mL의 부피로 1 mg의 수산화알루미늄에 유화된 10 mg의 오발부민(OVA)을 감작시켰다. 마우스는 그룹당 8마리의 마우스 6개 그룹으로 나누었다. 감작된 마우스를 멸균수에서 에어로졸화된 5% OVA에 연속 6일(19일차, 20일차, 21일차, 22일차, 23일차 및 24일차) 동안 하루 20분 동안 노출시켰다. 나이브 마우스는 6일 연속으로 하루 20분씩 분무된 물을 흡입하였다. 이어서, 마우스에게 에어로졸 챌린지 4시간 전에 다양한 농도의 SM17, PBS(대조군) 또는 덱사메타손(Dex)을 1일 1회(19일차에서 24일차) i.v. 주사하였다.

[0278] 25일차(마지막 OVA 챌린지 24시간 후)에, 마우스를 Telazol®(20 내지 40 mg/kg i.p.)로 마취시키고, 기관 캐눌라를 통해 컴퓨터 제어 인공호흡기에 연결하였다. 호기/흡기 시간과 호흡수(respiratory rate)는 각각 1.5:1 및 90/분으로 사전 설정되었다. 안정적인 기준선이 확립된 후, 폐의 저항(RL)을 기록하여 메타콜린 클로라이드 구배(체중 kg당 0.025 및 0.05 mg)에 대한 마우스의 반응을 평가하였고; 메타콜린 클로라이드는 미세한 바늘을 통해 5분 간격으로 경정맥(vena jugular)에 주입하였다. 5 mg/kg SM17 또는 1 mg/kg Dex로 처리한 마우스는 기도 과민성을 예방하였다. 각 OVA 에어로졸화 전에 1 mg/kg 또는 3 mg/kg SM17을 투여한 결과, 메타콜린으로 챌린지한 후 AHR이 경미하지만 유의미하게 감소하지 않았다. 도 6에 나타난 결과에서 알 수 있는 바와 같이, SM17의 치료 효과는 용량에 따라 좌우된다. 25일차에 희생된 마우스에서 BALF를 회수하고, BALF로부터 염증 세포 수와 염증성 사이토카인 농도를 결정하였다.

[0279] 또한, SM17을 1, 3 및 5 mg/kg으로 투여하면 BALF에서 IL-5 수준이 유의미하게 감소하였다. SM17을 5 mg/kg으로 투여하면 BALF에서 IL-13 수준과 호산구 수가 유의미하게 감소하였다(도 7). SM17을 5 mg/kg으로 투여하고 Dex를 투여하면 폐 침윤 호산구의 수가 유의미하게 감소하는 것으로 밝혀졌다. 결과는 평균 ± SEM으로 표시된다. 일원 분산 분석, Dunnett의 다중 비교 검정, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$. Dex = 덱사메타손. 도 9는 다양한 적응증을 치료하기 위한 SM17의 제안된 작용 기전을 나타낸다.

[0280] 실시예 8: 항알라르민 이중 특이적 결합 단백질(bsBp)의 작제 및 발현

[0281] SM17의 경쇄(서열 번호: 33)는 TA 클로닝(Thermo Fisher Scientific)을 통해 pcDNA3.3 발현 벡터에 클로닝된다. 특정 알라르민 결합 단백질(예를 들어, 알라르민 결합 수용체 또는 알라르민 특이적 항체의 scFv)의 서열에 작동적으로 연결된 SM17 중쇄를 암호화하는 cDNA는 유전자 합성되고(Genscript Biotech Corp., Piscataway, NJ) pEGFP-N1 발현 벡터(Clontech Laboratories, Mountain View, CA)의 NheI/NotI 클로닝 부위로 클로닝된다(도 10a). 특정 SM17-알라르민 결합 단백질 중쇄를 함유하는 발현 벡터와 SM17 경쇄용 발현 벡터를

제조업체의 사양(Thermo Fisher Scientific)에 따라 expiCHO-S 세포에 공동 형질감염시킨다. 특정 알라르민 결합 모이어티에 연결된 SM17 항체를 함유하는 특정 이중 특이적 결합 단백질(bsBp)을 형질감염 12일 후에 수거하여 단백질 A 친화성 크로마토그래피로 정제한다. 정제된 bsBp의 SDS-PAGE 감소를 도 10b에 나타내는데, 이는 대부분의 이중 특이적 항체가 자연 상태로 온전하게 유지됨을 보여준다. bsBp의 중쇄 및 경쇄 서열은 아래 표 4에 요약되어 있다.

[표 4] bsBp 및 단일클론 항체의 아미노산 서열

작제물	HC 서열 ID	LC 서열 ID
SM17-항 TSLP 1# bsBp	60	33
SM17-항 TSLP 2# bsBp	61	33
SM17-항 TSLP 3# bsBp	62	33
SM17-항 IL-33 1# bsBp	63	33
SM17-항 IL-33 2# bsBp	64	33
SM17-항 IL-33 3# bsBp	65	33
항-TSLP 항체 1#	75	76
항-TSLP 항체 2#	77	78
항-TSLP 항체 3#	79	80
항-IL-33 항체 1#	81	82
항-IL-33 항체 2#	83	84
항-IL-33 항체 3#	85	86
SM17-hTSLPR	75	33
SM17-hST2	74	33

실시예 9: 항알라르민 bsBp의 특이성

bsBp의 결합 특이성은 표준 ELISA 검정으로 평가하였다. 간략히 말하면, ELISA 스트립은 IL17RB, IL-33 또는 TSLP(R&D systems)를 포함한 각각의 표적 항원으로 최종 농도 2 µg/mL로 코팅하였다. 이중 특이적 항체를 원하는 항원으로 코팅된 ELISA 스트립에 33.5 nM으로 첨가하였다. 실온에서 2시간 동안 인큐베이션한 후, ELISA 스트립을 PBS로 5회 세척하였다. 표준 절차에 따라 염소 항-인간 F(ab')₂ 특이적 호스래디시 퍼옥시다제(HRP) 접합된 2차 항체(1:5000 희석, Jackson ImmunoResearch)를 첨가한 후 TMB 기질 용액(Sigma-Aldrich)을 첨가하여 결합을 밝혀냈다(도 11). bsBp의 항원 결합 특이성은 아래 도 11 및 표 5에 요약되어 있다. 결과는 IL17RB 및 원래 설계된 알라르민에 대한 특이성을 나타낸다. SM17-인간 TSLPR의 경우 수율이 너무 낮아 검출되지 않았기 때문에 결과가 제공되지 않았다.

[표 5] ELISA에서 bsBp의 항원 결합 특이성

ELISA 스트립에 코팅된 항원	SM17-항-TSLP 1#	SM17-항-TSLP 2#	SM17-항-TSLP 3#	SM17-항-IL-33 1#	SM17-항-IL-33 2#	SM17-항-IL-33 3#		SM-17-인간 ST2	SM17
TSLP	+++	++	+++	N/A	N/A	N/A		-	+
IL-17RB	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++	+++
IL-33	N/A	N/A	N/A	+++	+++	+++		+++	-

bsBp에 대한 +/+++의 반정량적 척도에서 특정 항원 결합 친화도의 강도(- = 결합 없음, +, ++, +++ = 약함, 보통, 강한 결합), N/A는 결합 친화도가 없음을 지칭한다.

실시예 10: 이중 특이적 결합 단백질의 알라르민 결합 동역학

표적 알라르민에 대한 bsBp의 결합 친화도는 생물층 간섭계 분석(Octet Red96 system, Sartorius)을 사용하여

측정하였다. bsBp 또는 SM17(20 μ g/mL)은 항-인간 Fab CH1 영역에 대한 결합을 통해 바이오센서에 고정화되었고; 연속적으로 희석된 인간 IL33 및 TSLP(158.7 nM, 79.4 nM, 39.7 nM)(R&D 시스템)를 첨가하여 제조업체의 사양에 따라 회합 및 해리 곡선을 플롯팅하였다. 관련 없는 항체(SM03, 항-인간 CD22 키메라 IgG1 항체, SinoMab BioScience Limited, 20 μ g/mL)로 고정화된 바이오센서를 참조 대조군으로서 사용하였다. 각각의 이중 특이적 결합 단백질의 예상 K_a , K_{dis} 및 K_D 값은 아래 표 6에 요약되어 있다.

[표 6] 인간 TSLP 및 IL-33에 대한 bsBp의 결합 동역학

TSLP	K_a (1/Ms)	K_{dis} (1/s)	K_D (nM)
SM17-항-TSLP 1# bsBp	4.72×10^5	2.41×10^{-4}	0.511
SM17-항-TSLP 2# bsBp	3.74×10^5	$<1 \times 10^{-7}$	<0.001
SM17-항-TSLP 3# bsBp	4.81×10^5	3.17×10^{-5}	0.0658
SM17-TSLPR	N/A	N/A	N/A
SM17	1×10^4	1×10^{-3}	100
IL33	K_a (1/Ms)	K_{dis} (1/s)	K_D (nM)
SM17-항-IL-33 1# bsBp	9.81×10^3	2.83×10^{-4}	28.9
SM17-항-IL-33 2# bsBp	3.73×10^4	$<1 \times 10^{-7}$	0.0259
SM17-항-IL-33 3# bsBp	2.27×10^4	$<1 \times 10^{-7}$	0.0425
SM17-ST2	5.56×10^5	2.26×10^{-4}	0.407
SM17	2.72×10^4	1.79×10^1	659000

수율이 너무 낮기 때문에 SM17-인간 TSLPR에 대한 결합 친화도는 제공되지 않는다.

실시예 11: 알라르민에 의한 인간 PBMC로부터의 IFN γ , CCL8, CCL17, IL-5 및 IL-13 방출 유도 및 사이토카인 방출에 대한 SM17의 억제 효과

인간 PBMC(그룹당 4×10^5 , Ixcells)를 IL-2(10 단위/mL, PeproTech) 및 다양한 알라르민/알라르민 조합과 함께 인큐베이션하여 알레르기 질환 동안 염증 촉진성 사이토카인 방출을 모방하였다. IL-5 및 IL-13 방출의 경우, PBMC를 IL-2 및 3개의 알라르민(모두 10 ng/ml)과 함께 3일 동안 인큐베이션하였다. CCL17 방출의 경우, PBMC를 TSLP(10 ng/ml)와 함께 1일 동안 인큐베이션하였다. CCL8 및 IFN γ 방출의 경우, PBMC를 IL-12(10 ng/ml, Sino Biological) 및 IL-33(10 ng/ml)과 함께 1일 동안 인큐베이션하였다. 세포는 사이토카인을 첨가하기 전 1시간 동안 SM17(5 μ g/ml) 또는 IgG4 이소형 대조군(5 μ g/ml)으로 전처리하였다.

상층액을 수집하고 사이토카인 농도를 ELISA 키트(R&D 시스템)로 측정하였다. 이러한 확립된 검정을 사용하여 SM17 및 bsBp의 효능을 테스트하였다. SM17은 총 알라르민 자극된 PBMC 배양에서 IL-5 및 IL-13의 분비를 효과적으로 억제할 수 있었다. 그러나, IgG4 이소형 대조군과 비교하여 CCL17, CCL8 및 IFN γ 방출 검정에서 SM17 치료의 억제 효과가 나타나지 않았다(도 12 참조). 결과는 pg/ml 단위의 절대량으로 표시되었다.

실시예 12: 유도된 인간 PBMC로부터 사이토카인 및 화학주성 인자 방출을 억제하는 다양한 이중 특이적 결합 단백질의 효능

SM17, 3개의 상이한 SM17-항-IL33 bsBp 및 3개의 상이한 SM17-항-TSLP bsBp(모두 5 μ g/ml에서)를 상기 실시예 11에서 설명한 바와 같이 IFN γ , CCL8, CCL17 및 IL-5의 방출을 유도하는 조건 하에서 인간 PBMC 배양액에 첨가하였다. 유도된 PBMC에서 얻은 상층액에서 다양한 사이토카인 및 화학주성 인자의 수준은 표준 ELISA 방법을 사용하여 평가하였다. 결과는 SM17/항-TSLP 및 SM17/항-IL33 bsBp의 상이한 쌍이 SM17 단독으로 관찰된 것과 비교했을 때 IFN γ , CCL8, CCL17, IL-5 및 IL-13의 방출을 억제하는 데 있어 향상된 및/또는 상승 효과를 나타낸다는 것을 나타낸다(도 13 참조). 구체적으로, IL-5 방출 검정에서, SM17-항-IL-33 3#은 SM17 처리에 비해 가장 강력한 억제 효과를 나타냈다. CCL8 방출 검정에서, SM17-항-IL-33 1#과 SM17-항-IL-33 3#은 모두 SM17에 비해 더 강력한 억제 효과를 보였다. IFN γ 방출 검정에서, 세 가지 SM17-항-IL-33 bsBp 모두 SM17에 비해 더 강력한 억제 효과를 보였다. CCL17 방출 검정에서, SM17-항-TSLP 1#과 SM17-항-TSLP 3# bsBp는 둘 모두 SM17 처리에 비해 더 강력한 억제 효과를 보였다. 다양한 사이토카인 방출 검정에서 bsBp의 효능은 도 13 및 표 7에 요약되

어 있다.

[표 7] 사이토카인 방출 검정에서 bsBp의 효능

사이토카인	SM17- 항 TSLP 1# bsBp	SM17- 항 TSLP 2# bsBp	SM17- 항 TSLP 3# bsBp	SM17- 항 IL-33 1# bsBp	SM17- 항 IL-33 2# bsBp	SM17- 항 IL-33 3# bsBp	SM17
IL-5	++	++	+	++	++	+++	++
IL-13	+++	++	+++	++	++	++	++
CCL-8	Nil	Nil	Nil	+	+	++	-
CCL-17	+	+	+	Nil	Nil	Nil	-
IFN γ	Nil	Nil	Nil	++	++	+	-

bsBp에 대한 +/+++의 반정량적 척도에서 특정 사이토카인 억제제의 강도(- = 억제 없음, +, ++, +++ = 약함, 보통, 강한 억제), Nil: 조사되지 않음.

실시예 13: ILC2에 대한 알라르민의 증식 촉진 효과

단리된 인간 ILC2 세포는 알라르민에 반응하여 증식할 수 있다. 인간 ILC2는 EasySep™ 인간 ILC2 단리 키트 (STEMCELL Technologies Inc. Cambridge, MA)에 의해 신선한 인간 PBMC에서 농축되었다. 이어서, 농축된 ILC2는 RPMI1640 배지(Thermo Fisher Scientific)에서 10% 인간 AB 혈청(Sigma)과 함께 배양하였다. IL-2(10 단위/mL)와 함께 IL-25(10 ng/mL) 또는 TSLP(10 ng/mL) 또는 IL-33(10 ng/mL) 또는 이러한 세 가지 알라르민의 조합을 ILC2 배양액에 7일 동안 첨가한 후 ILC2에 대한 계통 특이적 항체(CRTH2+, IL-7Ra+; BioLegend, San Diego, CA) 패널을 사용하여 유세포 분석(BD FACSVerse)으로 ILC2 세포 집단의 변화를 측정하였다. 결과는 ILC2 증식(proliferation)의 주요 원인이 IL-33이며 모든 알라르민의 조합이 ILC2 증식(expansion)을 더욱 강화한다는 것을 나타낸다(도 14 참조).

실시예 14: 텍사메타손 및 bsBp에 의한 인간 PBMC의 ILC2 및 Th2 세포 집단의 억제

알라르민은 세포 집단 증가와 같은 ILC2 및 Th2 세포 기능을 향상시키기 위해 함께 작용하는 것으로 알려져 있지만, 텍사메타손(Dex)과 같은 스테로이드는 이러한 효과를 무효화하여 2형 면역 반응을 완화할 수 있다[Jia, Yi *et al. American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology*, vol. 55,5 (2016): 675-683]. ILC2 및 Th2 세포 집단은 당업자에게 알려진 표준 절차에 따라 유세포 분석(BD FACSVerse)으로 결정할 수 있다. 여기에서, ILC2 및 Th2 세포의 세포 집단은 IL-2(10 단위/mL) 및 3개의 알라르민(10 ng/ml)의 조합으로 5일 동안 실험적으로 향상되었다. 결과는 Dex가 인간 PBMC 배양에서 Th2 세포 집단(CD4+GATA3+ 집단, 항-CD4 PE 항체 (BioLegend) 및 항-GATA3 APC 항체(Abcam, Cambridge, UK)에 의해 게이팅됨)을 유의미하게 감소시킬 수 있지만 ILC2 집단(IL-7Ra+CRTH2+, 항-IL-7Ra percp/시아닌5.5 항체 및 항-CRTH2 FITC 항체, BioLegend에 의해 게이팅됨)은 감소시키지 못한다는 것을 보여준다(도 15 참조). 또한, Bsbp를 첨가하면 ILC2 세포 집단이 유의미하게 감소하고 bsBp의 효능은 아래 도 15 및 표 8에 요약되어 있다.

[표 8] ILC2 및 Th2 증식 검정에서 bsBp의 효능

세포 유형	SM17- 항 TSLP 1# bsBp	SM17- 항 TSLP 2# bsBp	SM17- 항 TSLP 3# bsBp	SM17- 항 IL-33 1# bsBp	SM17- 항 IL- 33 2# bsBp	SM17- 항 IL- 33 3# bsBp	SM17	Dex
ILC2	+	+++	++	+++	+++	+++	++	+
Th2	++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++

bsBp에 대한 +/+++의 반정량적 척도에서 세포 증식 억제(- = 억제 없음, +, ++, +++ = 약함, 보통, 강한 억제)

실시예 15: 수지상 세포 효능 검증

염증이 있는 상피로부터의 TSLP는 수지상 세포(DC)의 성숙을 촉진하여 CCL17을 통해 Th2 반응을 프라임하고, 이는 CD4+ T 세포의 화학주성을 유도하여 염증을 매개한다(Kitajima and Ziegler, 2013. "Cutting Edge:

Identification Of The Thymic Stromal Lymphopoietin-Responsive Dendritic Cell Subset Critical For Initiation Of Type 2 Contact Hypersensitivity". *J Immunol* 191: 4903-4907; Bleck *et al.* 2015. "Co-Expression Of Type 2 Immune Targets In Sputum-Derived Epithelial And Dendritic Cells From Asthmatic Subjects". *J Allergy Clin Immunol* 136: 619-627.e5). 정상적인 인간 DC는 Lonza(Bend, OR)에서 얻었다. DC는 LGM-3 배지(Lonza)에서 배양하였다. TSLP(10 ng/mL)를 5 µg/mL의 SM17, IgG4 이소형 대조군(Sino Biological), SM17-TSLPR bsBp(TSLP 수용체 세포의 도메인과 융합된 SM17) 또는 SM17-항-TSLP bsBp 2#의 존재 하에서 5일 동안 DC 배양물에 첨가한다. 상층액을 수거하고 제조업체의 사양(R&D systems)에 따라 ELISA에 의해 CCL17 수준을 측정한다. 결과는 이중 특이적 SM17-TSLPR 및 SM17-항-TSLP bsBp 2#가 DC에서 TSLP 유도 CCL17 생성을 억제하는 데 효율적임을 나타낸다(도 16). SM17, IgG4 및 bsBp의 효능은 아래 표 9에 요약되어 있다.

[표 9] 수지상 세포에서 CCL17 방출 검정에서 bsBp의 효능

작제물	SM17- 항 TSLP 1# bsBp	SM17- 항 TSLP 2# bsBp	SM17- 항 TSLP 3# bsBp	SM17	IgG4
효능	-	+	-	-	-

bsBp, SM17, 및 IgG4 이소형에 대한 +/+++의 반정량적 척도에서 CCL17 방출 억제(- = 억제 없음, +, ++, +++ = 약함, 보통, 강한 억제))

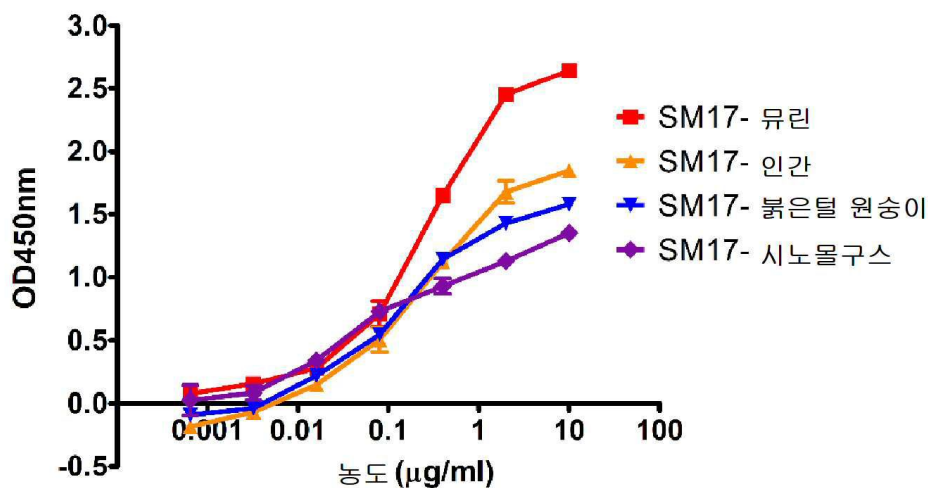
본 발명은 그 구체적인 실시양태를 참조하여 상세히 설명되었지만 본 발명의 사상 및 범위로부터 벗어나지 않고 다양한 변경 및 수정이 이루어질 수 있다는 것이 당업자에게는 명백할 것이다.

도면

도면1

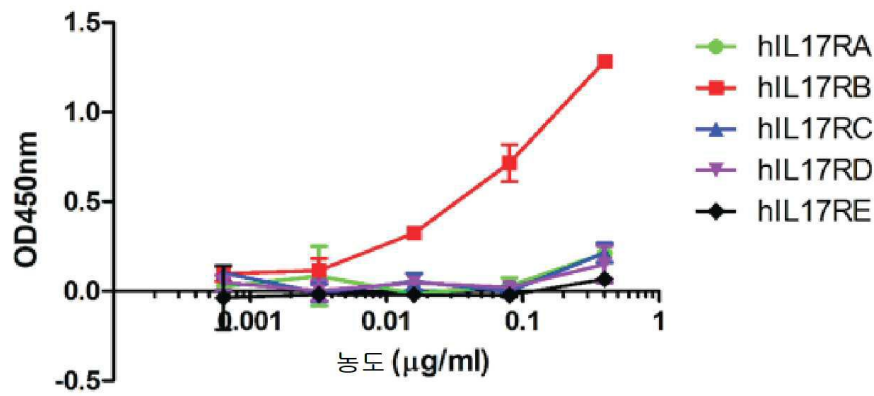
다양한 종으로부터 IL-17RB에 결합하는 SM17의 용량 의존적 곡선

항체 결합



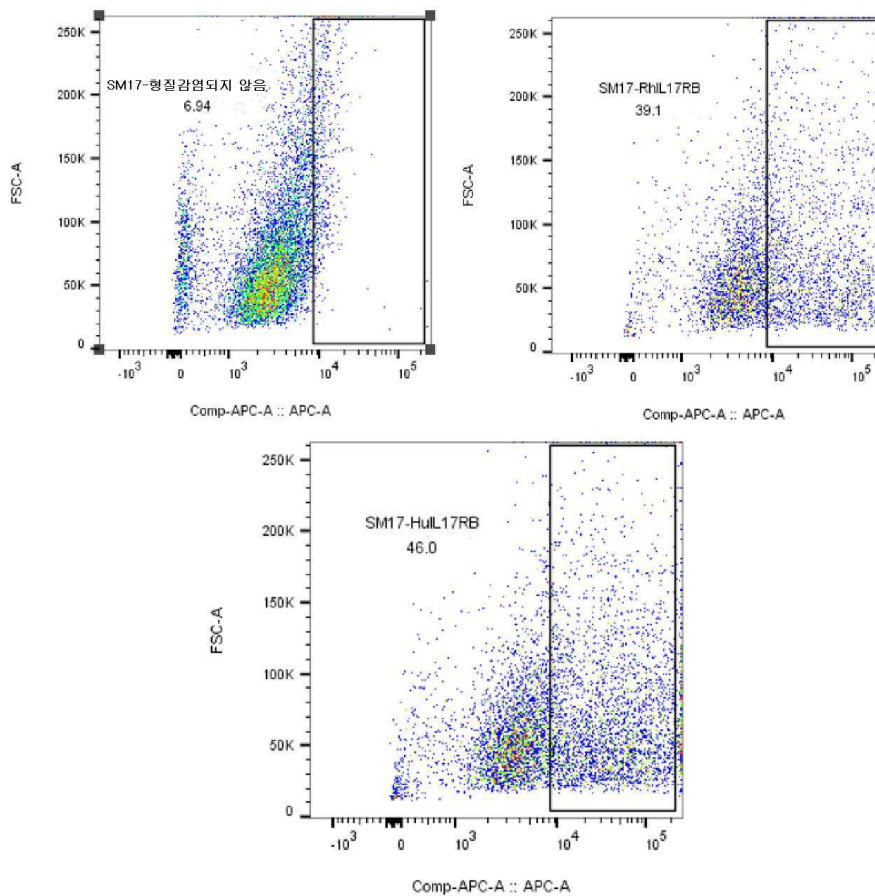
도면2

IL-17 수용체 계열의 구성원에 대한 SM17의 결합 특이성



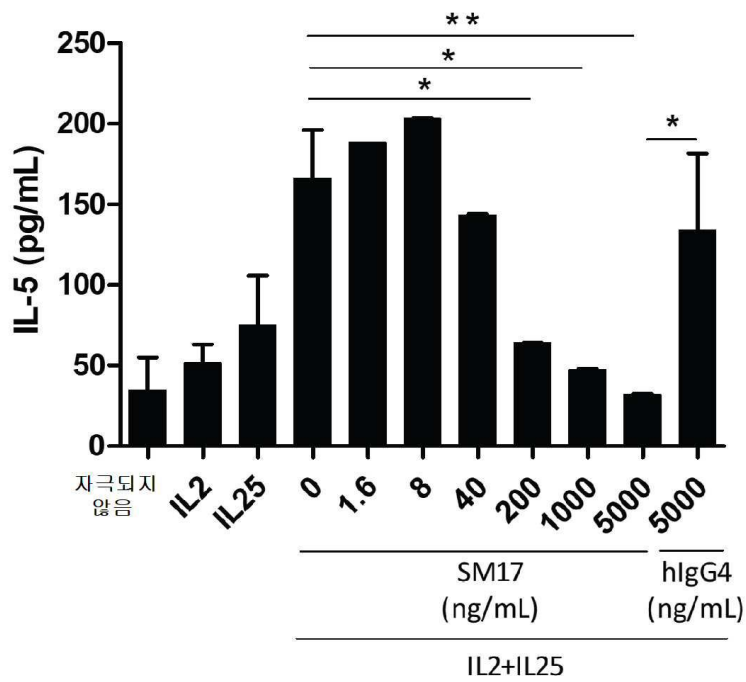
도면3

고유 인간 IL-17RB에 결합하는 SM17



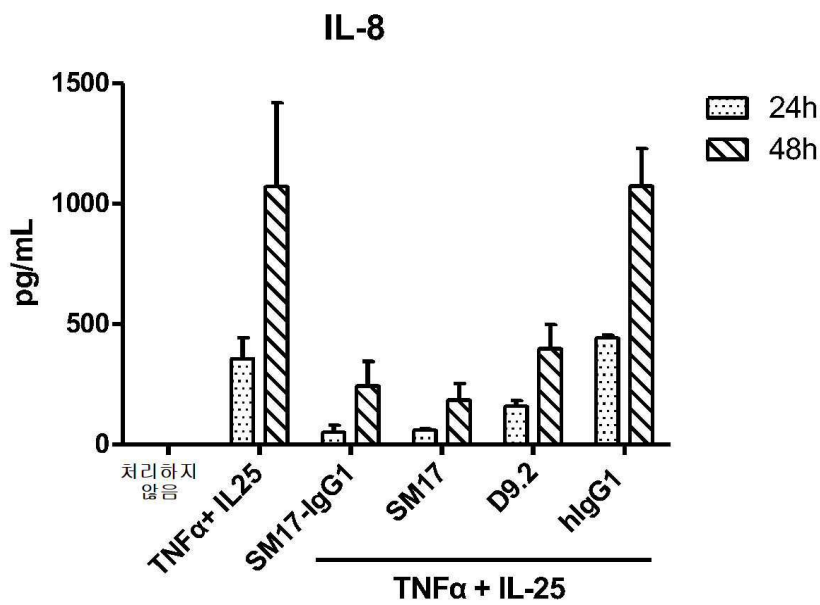
도면4

인간 PBMC 배양에서 SM17에 의한 IL-5의 용량 의존적 억제



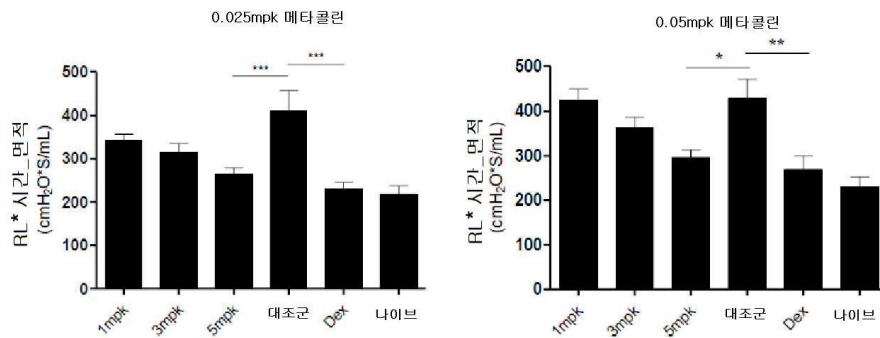
도면5

TK-10 세포로부터의 IL-8 생성이 SM17에 의해 억제되었다



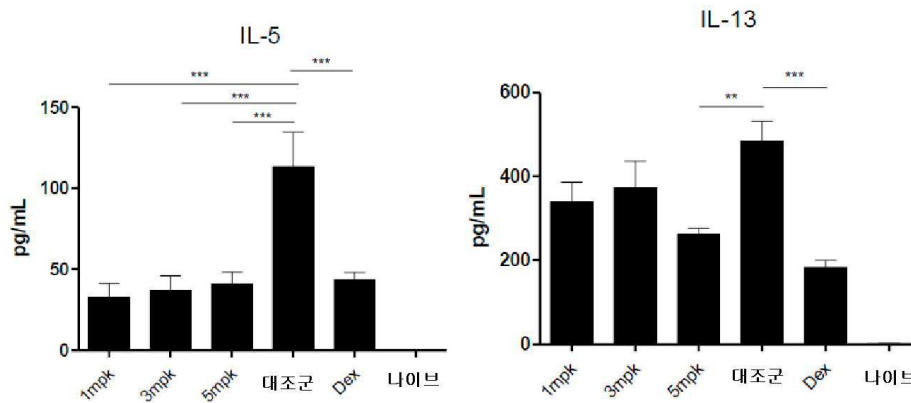
도면6

OVA로 유발된 류린 실험 천식의 기도 과민성을 억제하는 SM-17의 효과



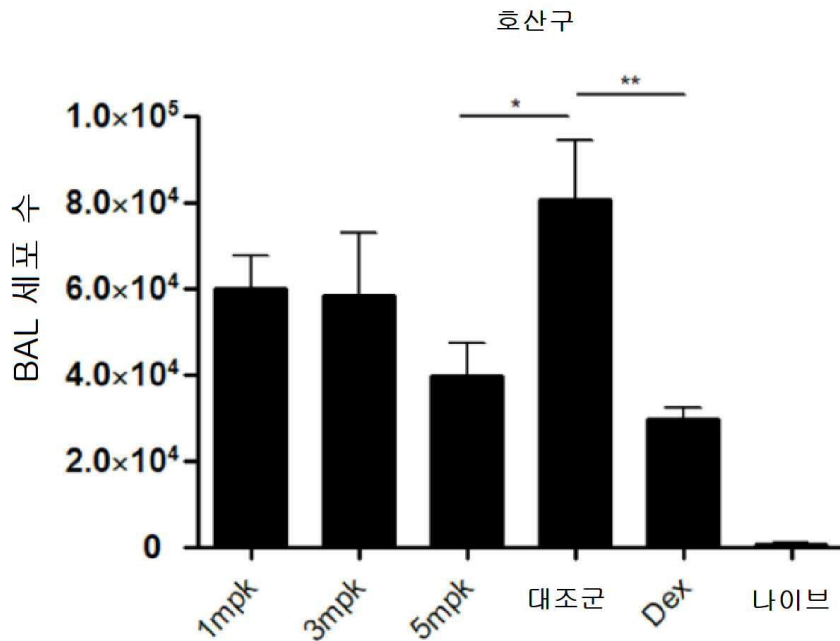
도면7

OVA로 유발된 류린 실험 천식에서 BALF IL-5 및 IL-13 수준을 억제하는 SM-17의 효과



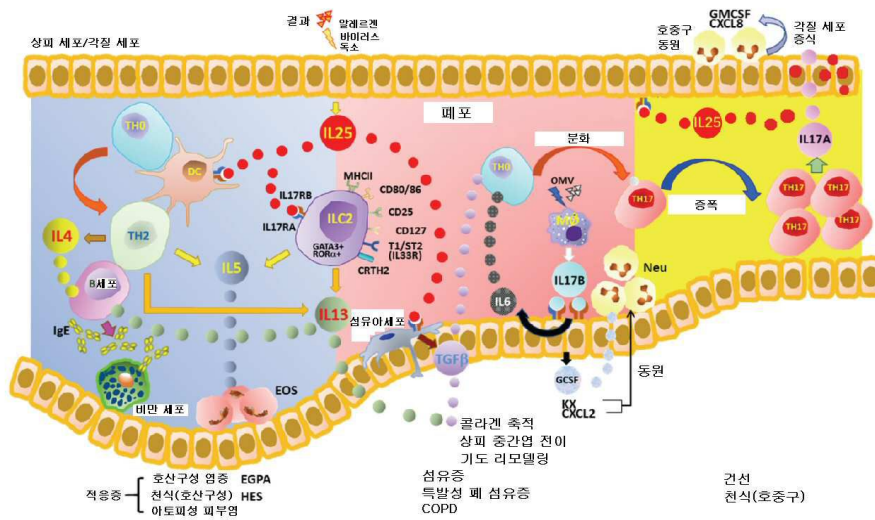
도면8

OVA로 유발된 유린 실험 전식에서 BALF 호산구 세포 수를 억제하는 SM-17의 효과



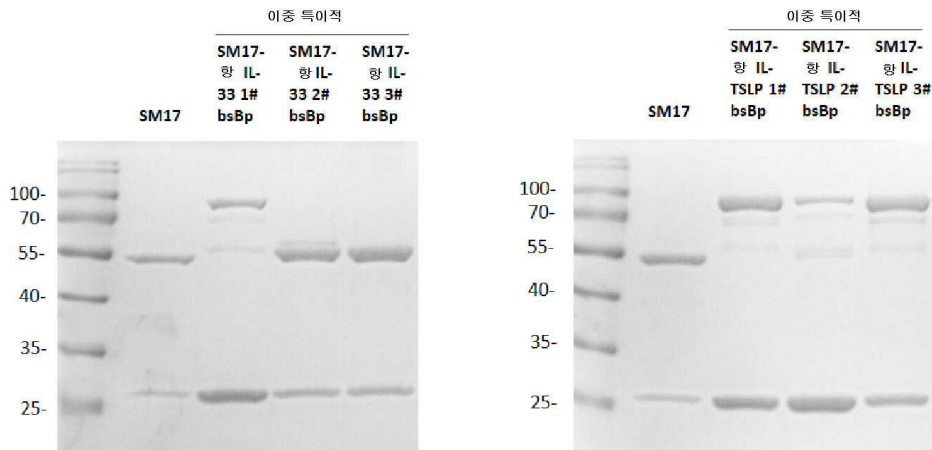
도면9

IL25/SM17 상호작용 모드와 가능한 질환 적응증



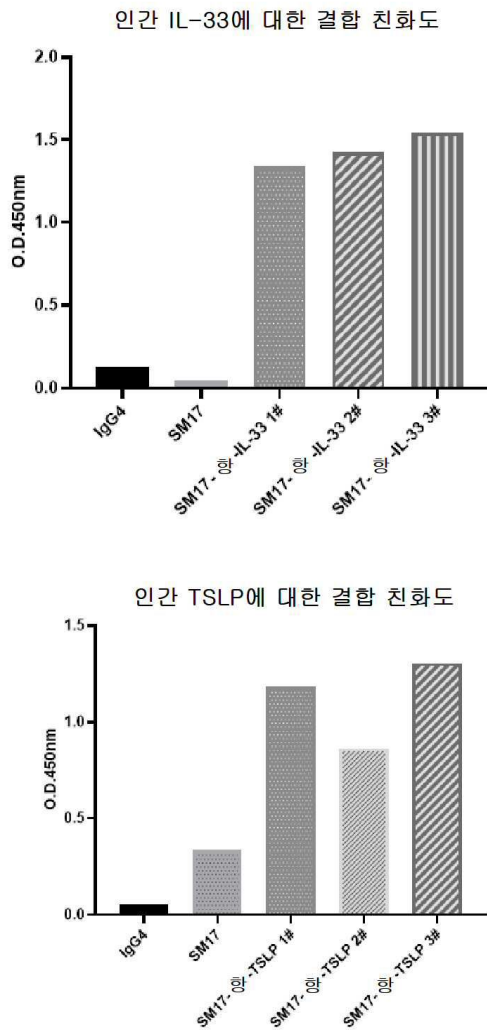
도면10b

ExpiCHO 일시적 형질감염 시스템으로부터 정제된 SM17, SM17-항-TSLP, 및 SM17-항-IL-33 bsBp의 SDS-PAGE 감소



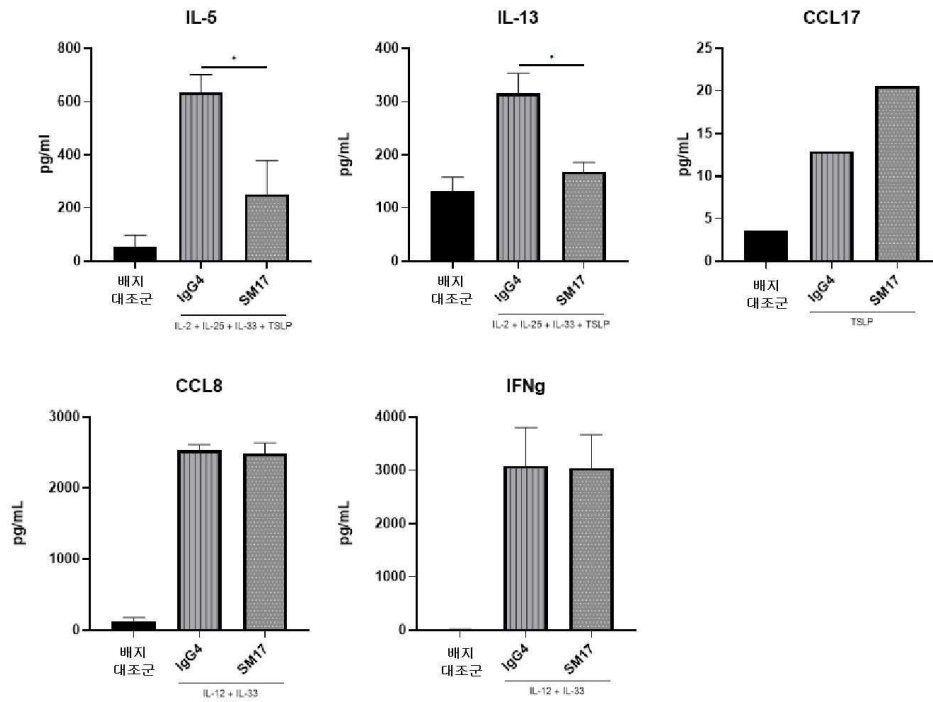
도면11

항알라르민 이중 특이적 결합 단백질의 항원 결합



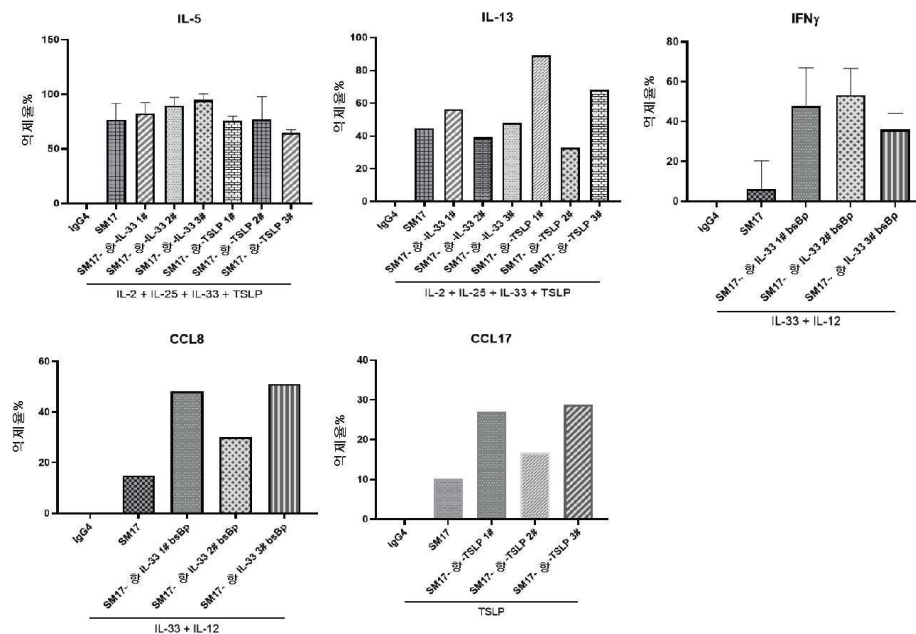
도면12

알라르민에 의한 인간 PBMC로부터의 IFN γ , CCL8, CCL17, IL-5 및 IL-13의 유도 및 사이토카인 방출에 대한 SM17의 억제 효과



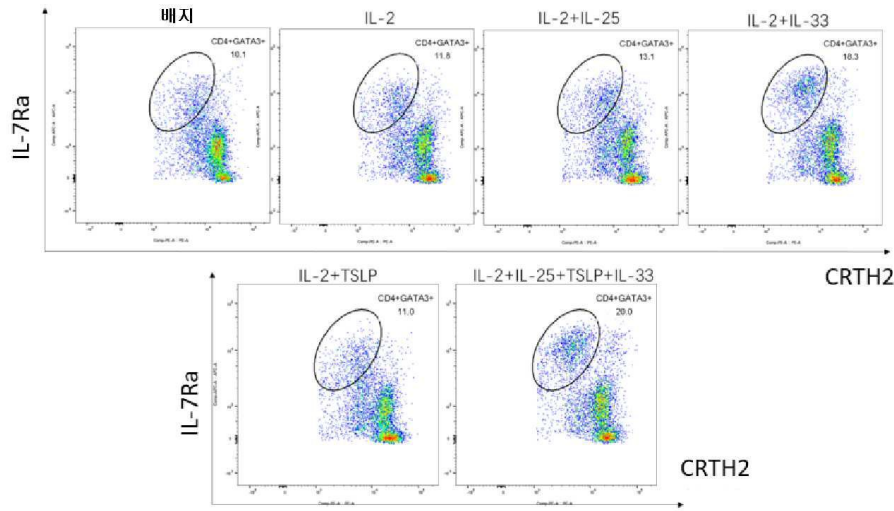
도면13

유도된 인간 PBMC로부터의 사이토카인 및 화학주성 인자에 대한 다양한 이중 특이적 결합 단백질의 효능



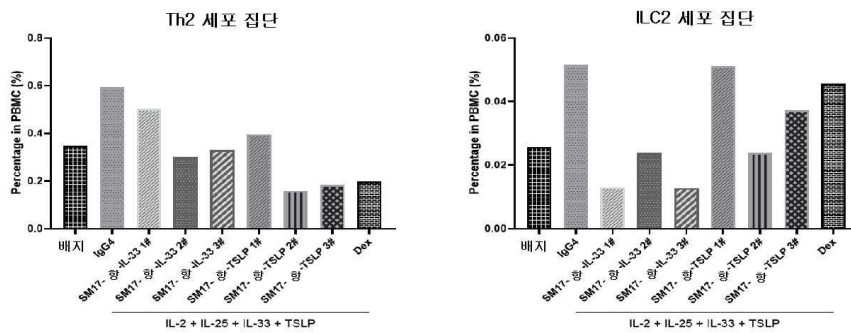
도면14

ILC2 에 대한 알라르민의 증식 촉진 효과



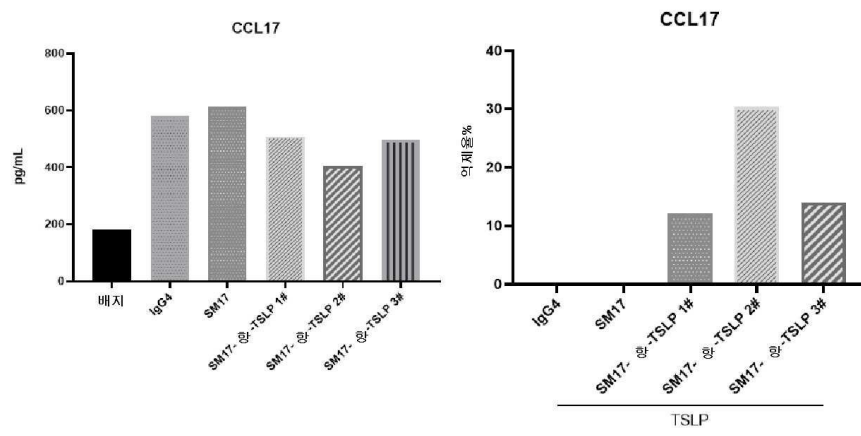
도면15

스테로이드 호르몬에 대한 ILC2 및 Th2 세포의 반응 결과



도면16

수지상 세포 효능 검정의 결과



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.