



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년11월07일
(11) 등록번호 10-1673735
(24) 등록일자 2016년11월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/46 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01) C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7028867
(22) 출원일자(국제) 2013년04월16일
심사청구일자 2014년10월15일
(85) 번역문제출일자 2014년10월15일
(65) 공개번호 10-2014-0135830
(43) 공개일자 2014년11월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/036677
(87) 국제공개번호 WO 2013/158577
국제공개일자 2013년10월24일
(30) 우선권주장
61/636,302 2012년04월20일 미국(US)
61/768,747 2013년02월25일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W01995009917 A1
KR1020040030088 A
KR1020080068122 A

(73) 특허권자
일라이 릴리 앤드 캄파니
미국 46285 인디애나주 인디애나폴리스 릴리 코포
레이트 센터
(72) 발명자
알란, 바렛
미국 46206-6288 인디애나 인디애나폴리스 피.오.
박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내
벤쇼프, 로베르트 안
미국 46206-6288 인디애나 인디애나폴리스 피.오.
박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내
루, 지롱
미국 46206-6288 인디애나 인디애나폴리스 피.오.
박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내
(74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 김은영

(54) 발명의 명칭 항-BAFF-항-IL-17 이중특이적 항체

(57) 요약

TNF 계열의 B-세포 활성화 인자 (BAFF) 및 인터류킨-17A (IL-17)와 특이적으로 결합하고, BAFF 및 IL-17 둘 다에 대한 고 친화도 및 강력한 중화 특성을 갖는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체가 제공된다. 본 발명의 이중특이적 항체는 루푸스 신염 (LN), 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 류마티스 관절염 (RA), 건선 (Ps), 강직성 척추염 (AS), 건선성 관절염 (PA), 원발성 쇼그렌 증후군 (pSS) 또는 다발성 골수종 (MM)을 치료하는 데 유용할 것으로 예상된다.

명세서

청구범위

청구항 1

2개의 제1 폴리펩티드 및 2개의 제2 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 제1 폴리펩티드의 아미노산 서열은 서열 1 이고, 제2 폴리펩티드의 아미노산 서열은 서열 2인 이중특이적 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열 1의 시스테인 잔기 507과 서열 1의 시스테인 잔기 707 사이에 쇠나 디설피드 결합이 존재하는 것인 이중특이적 항체.

청구항 3

서열 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고, 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA 분자.

청구항 4

서열 1의 아미노산 서열을 갖는 제1 폴리펩티드 및 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 제2 폴리펩티드를 포함하는 이중특이적 항체를 발현할 수 있는, 서열 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA 분자 및 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA 분자를 포함하는 포유동물 세포.

청구항 5

아미노산 서열이 서열 1인 제1 폴리펩티드 및 아미노산 서열이 서열 2인 제2 폴리펩티드를 포함하는 이중특이적 항체를 발현할 수 있는, 제3항의 DNA 분자로 형질전환된 포유동물 세포.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, CHO인 포유동물 세포.

청구항 7

아미노산 서열이 서열 1인 제1 폴리펩티드 및 아미노산 서열이 서열 2인 제2 폴리펩티드를 포함하는 이중특이적 항체가 발현되도록 하는 조건 하에 제4항의 포유동물 세포 또는 제5항의 포유동물 세포를 배양하는 단계; 및 발현된 이중특이적 항체를 회수하는 단계를 포함하는, 상기 이중특이적 항체의 생산 방법.

청구항 8

제7항의 방법에 의해 생산된 이중특이적 항체.

청구항 9

유효량의 제1항의 이중특이적 항체를 포함하는, 전신 홍반성 루푸스, 루푸스 신염, 류마티스 관절염, 건선, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 원발성 쇼그렌 증후군 또는 다발성 골수종을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 의학 분야, 특히 TNF 계열의 B-세포 활성화 인자 (BAFF) 및 인터류킨-17A (IL-17)에 대하여 유도된 이중특이적 항체의 신규 분야에 관한 것이다. 본 발명의 이중특이적 항체는 루푸스 신염 (LN), 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 류마티스 관절염 (RA), 건선 (Ps), 강직성 척추염 (AS), 건선성 관절염 (PA), 원발성 쇼그렌 증후군 (pSS) 또는 다발성 골수종 (MM)을 치료하는 데 유용할 것으로 예상된다.

배경 기술

[0002] 증가된 수준의 IL-17은 기도 염증, 류마티스 관절염, 골관절염, 골 침식, 복강내 농양 및 유착, 염증성 장 장애, 동종이식편 거부, 건선, 특정 유형의 암, 혈관신생, 아테롬성동맥경화증 및 다발성 경화증을 포함한 몇 가지 병태, 질환 또는 장애와 연관이 있어 왔다. IL-17 및 IL-17 수용체는 류마티스 관절염 환자의 활막 조직에서 상향 조절된다. IL-17 생물활성을 차단시키면 각종 동물 관절염 모델에서 염증과 골 침식이 저하된다. 더욱이, IL-17은 콜라겐 매트릭스 파괴 및 염증 및 관절 손상에 대한 IL-1 β 비의존적 효과를 나타내긴 하지만, IL-17은 TNF- α 와 함께 상승작용하여 염증을 증폭시킨다. 따라서, IL-17이 염증 부위에 국한된 분포를 보인다는 점을 고려해볼 때, 이러한 IL-17은 염증유발 시토카인, 예컨대 TNF- α 의 체순환을 표적으로 하는 약물 보다 잠재적으로 더 큰 안전성 프로파일을 수반하면서 류마티스 관절염 및 기타 염증성 또는 자가면역 질환을 치료하는 데 가능한 표적인 것으로 여겨진다.

[0003] B-세포 활성화 인자 (BAFF)가 자가면역 질환의 발병기전에 관여한다는 사실은 마우스 모델에서의 BAFF 과다발현에 의해 예시되는데, 이러한 과다발현으로 인해 류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스 및 원발성 쇼그렌 증후군을 모방하는 자가면역 질환이 유발될 뿐만 아니라 B 세포 림프종의 발생이 2배 증가된다. 인간에서는, SLE, RA, pSS 및 전신 경화증 환자에서 혈청 BAFF 수준이 상승되었다는 수많은 보고가 제시되어 왔었다. BAFF가 Th17 세포의 증대를 촉진하고, IL-17이 콜라겐-유발 관절염 발병 동안 BAFF-매개 염증유발 효과에 결정적인 이펙터 시토카인이라는 것이 입증되었다. IL-17은 또한, BAFF와 상승작용부피으로 작용하여 B 세포 생물학과 SLE의 병리생리상태에 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다. 또한, BAFF와 IL-17 둘 다 LN과 연관된 병리상태에서 일정 역할을 한다는 명백한 증거가 있는데, 사실상 LN 환자는 상승된 수준의 IL-17 및 BAFF를 갖고 있는 것으로 보고된 바 있다.

[0004] SLE는 자가-항체의 발생 및 면역 복합체의 형성을 특징으로 하는, 고도로 이질적인 다장기 자가면역 질환이다. SLE 환자의 30 내지 60% 정도가 질환 과정 동안의 일부 단계에서 신장에 영향을 미치는 것으로 추정된다. LN은 복잡하면서도 다원적인 자가면역 질환이다. LN 환자를 치료하지 않은 채로 둔다면, 그의 5년 생존율은 0 내지 20%이다. 면역억제 요법을 도입한 것이 이러한 상황을 상당히 개선시켰으며, 현재 10년 생존율은 88%이다. 그러나, 이러한 개선은 환자에게 대가를 치루게 했는데, 이는 특히 이들 치료가 만성적으로 수행되어야 하기 때문에 이러한 치료의 상당 수가 심각한 유해 사례를 유발시킨다. 또한, 그에 대한 반응은 느리고 종종 불완전한데, 환자의 25 내지 50% 만이 차도를 보인다.

[0005] BAFF 항체와 IL-17 항체를 공-투여하기 위해서는 2개의 별도의 제품을 따로 주사하거나 또는 2개의 상이한 항체의 공동-제제를 단일 주사해야 한다. 2개의 주사로 투여하면 투여량과 투여 시기를 유연성 있게 조절할 수 있긴 하지만, 치료 순응도와 통증 측면 둘 다에서 보면 이는 환자에게 불편함을 준다. 공동-제제 역시 투여량 측면에서 일부 유연성을 제공할 수도 있으나, 상기 2개의 상이한 항체의 분자 특징이 서로 상이하게 때문에 이들 두 항체의 화학적 및 물리적 안정성을 가져다주는 제제화 조건을 찾기가 종종 불가능하거나 상당한 문제를 초래한다.

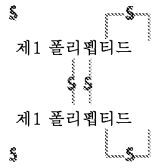
[0006] WO199509917에는 상이한 특이성을 지닌 완전한 항체와 융합된 단일쇄 단편 가변 항체를 생산함으로써 재조합 DNA 기술을 이용하여 이중특이적 4가 항체 (MAb-scFv)를 생산하는 방법이 개시되어 있다. 이러한 유전자 융합

은 이중 특이성을 갖는 4가 항체를 생성하는 형질감염으로써 표현된다. W02003016468에는 인간 BAFF의 가용성 형태와 막 결합된 형태 둘 다와 결합하여 이를 중화시키는 항-BAFF 항체가 개시되어 있다. W02007070750에는 인간 IL-17과 결합하여 이를 중화시키는 항-IL-17 항체가 개시되어 있다. 그러나, W0199509917의 교시에 따라서 W02003016468의 항-BAFF 항체 및 W02007070750의 항-IL-17 항체를 포함하는 출발 이중특이적 항체를 생성하는 경우에, 본 발명자들은 화학적 및 물리적 안정성과 연관된 상당한 문제점을 발견하게 되었다. 이들 문제점을 충분히 극복하기 위해서는 상기 출발 이중특이적 항체 내에서의 많은 아미노산 변화가 필요하였다. 당업계에서는 이러한 실제적인 변화뿐만 아니라 그에 대한 필요성에 대해서 전혀 제안된 바가 없다. 추가로, 그 몇 가지 변화들은 통상적인 것이 아니거나 통상의 일반적 지식으로부터 유래되지 않는다. 마찬가지로, 각각의 단일 항체 자체는 이들 문제점을 지니고 있지 않았는데, 이는 이들 구역을 둘러싸고 있는 국부 환경이 이중특이적 항체의 상황과는 상이하었다는 사실을 제안하고 있다. 따라서, BAFF와 IL-17 둘 다를 중화시키는 이중특이적 항체를 수반한 약리학적 개입이 필요하다.

발명의 내용

- [0007] 본 발명은 2개의 제1 폴리펩티드 및 2개의 제2 폴리펩티드를 포함하는 이중특이적 항체를 제공한다.
- [0008] 본 발명은 또한, 제1 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA 분자를 제공한다.
- [0009] 본 발명은 또한, 제2 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA 분자를 제공한다.
- [0010] 본 발명은 또한, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA 분자를 제공한다.
- [0011] 본 발명은 또한, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 이중특이적 항체를 발현할 수 있는, DNA 분자(들)로 형질전환된 포유동물 세포를 제공한다.
- [0012] 본 발명은 또한, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 이중특이적 항체가 발현되도록 하는 조건 하에 상기 포유동물 세포를 배양하는 것을 포함하는, 상기 이중특이적 항체의 생산 방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 생산된 이중특이적 항체를 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한, 전신 홍반성 루푸스, 루푸스 신염, 류마티스 관절염, 건선, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 원발성 쇼그렌 증후군 또는 다발성 골수종의 치료를 필요로 하는 환자에게 유효량의 이중특이적 항체를 투여하는 것을 포함하는, 상기 질환의 치료 방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한, 요법에 사용하기 위한 이중특이적 항체를 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한, 전신 홍반성 루푸스, 루푸스 신염, 류마티스 관절염, 건선, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 원발성 쇼그렌 증후군 또는 다발성 골수종의 치료에 사용하기 위한 이중특이적 항체를 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한, 상기 이중특이적 항체 및 하나 이상의 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.
- [0018] 인간 IL-17은 2개의 인간 IL-17A 단백질을 포함하는 동종이량체 단백질을 의미하는 것으로 이해된다. 인간 IL-17A/F 이중이량체는 인간 IL-17A 단백질 및 인간 IL-17F 단백질이다.
- [0019] 이중특이적 항체는 MAb-scFV 포맷으로 각 항원에 대한 특이성을 지니면서 2개의 상이한 항원과 결합하는, 4개의 항원 결합 부위를 포함하는 이뮤노글로불린 분자를 의미하는 것으로 이해된다. 이러한 이중특이적 항체는 각 항원과 단독으로 결합할 수 있거나 각 항원과 동시에 결합할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 이중특이적 항체는 2개의 제1 폴리펩티드 및 2개의 제2 폴리펩티드를 포함한다. 각각의 제1 폴리펩티드는 각각의 제2 폴리펩티드와 쇠간 디설피드 결합을 형성하고, 제1 폴리펩티드는 다른 제1 폴리펩티드와 2개의 쇠간 디설피드 결합을 형성하며, 각각의 제1 폴리펩티드는 여러 개의 쇠내 디설피드 결합을 형성한다. 이들 폴리펩티드와 디설피드 결합의 관계는 다음 도식으로 제시된다:

제2 폴리펩티드



제2 폴리펩티드

[0021]

[0022]

제1 폴리펩티드의 아미노산 서열은 다음과 같다:

```
QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF S GYYWSWIRQP PGKGLEWIGE 50
INHSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARGYY 100
DILTGYYYYF DYWGQGT LVT VSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC 150
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG 200
TKTYTCNV D H KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP 250
KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN 300
STYRVVSVLT V L H QDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ 350
VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV 400
LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGG 450
GGSGGGGTGG GGSQVQLVQS GAEVKKPGSS VKVSCASGY KFTDYHIHWV 500
RQAPGQC LEW MGVINPTYGT TDYNQRFKGR VTITADESTS TAYMELSSLR 550
SED TAVYYCA RYDYFTGTGV YWGQGT LVTV SSGGGGSGGG GSGGGGSGGG 600
GSDIVMTQTP LSLSVTPGQP ASISCRSSRS LVHSRGETYL HWYLQKPGQS 650
PQLLIYKVS N RFIGVPDRFS GSGSGTDFTL KISRVEADV GVYYCSQSTH 700
LPFTFGCGTK LEIK 714 (서열 1).
```

[0023]

[0024]

제2 폴리펩티드의 아미노산 서열은 다음과 같다:

```
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLAWYQQKP GQAPRLLIYD 50
ASN RATGIPA RFGSGSGSTD STLTISSELP EDFAVYYCQQ RSNWPRTFGQ 100
GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSENTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200
LSSPVTKSFN R GEC 214 (서열 2).
```

[0025]

[0026]

각각의 제1 폴리펩티드와 각각의 제2 폴리펩티드의 쇠간 디설피드 결합은 서열 1의 시스테인 잔기 137과 서열 2의 시스테인 잔기 214 사이에 형성된다. 제1 폴리펩티드는 다른 제1 폴리펩티드와 2개의 쇠간 디설피드 결합을 형성한다. 제1 쇠간 디설피드 결합은 서열 1의 제1 폴리펩티드의 시스테인 잔기 229와 서열 1의 다른 제1 폴리펩티드의 시스테인 잔기 229 사이에 형성된다. 제2 쇠간 디설피드 결합은 서열 1의 제1 폴리펩티드의 시스테인 잔기 232와 서열 1의 다른 제1 폴리펩티드의 시스테인 잔기 232 사이에 형성된다.

[0027]

scFv 내에서는, 조작된 쇠내 디설피드 결합이 서열 1의 시스테인 잔기 507과 서열 1의 시스테인 잔기 707 사이에 형성된다. 또한, 쇠내 디설피드 결합은 서열 1의 시스테인 잔기 625와 서열 1의 시스테인 잔기 695 사이에 형성된다. MA b 내에서는, IgG4 항체 내에서 통상적으로 발생하는 쇠내 디설피드 결합이 서열 1의 시스테인 잔기 22와 서열 1의 시스테인 잔기 95 사이, 서열 1의 시스테인 잔기 150과 서열 1의 시스테인 잔기 206 사이, 서열 1의 시스테인 잔기 264와 서열 1의 시스테인 잔기 324 사이, 서열 1의 시스테인 잔기 370과 서열 1의 시스테인 잔기 428 사이, 서열 1의 시스테인 잔기 485와 서열 1의 시스테인 잔기 559 사이, 서열 2의 시스테인 잔기 23과 서열 2의 시스테인 잔기 88 사이, 및 서열 2의 시스테인 잔기 134와 서열 2의 시스테인 잔기 194 사이에 형성된다.

[0028]

제1 폴리펩티드는 제1 중쇄 가변 영역 (HCVR1), 중쇄 불변 영역 (CH), 제2 중쇄 가변 영역 (HCVR2) 및 제2 경쇄 가변 영역 (LCVR2)을 포함한다. 제2 폴리펩티드는 제1 경쇄 가변 영역 (LCVR1) 및 경쇄 불변 영역 (CL)을 포함한다. HCVR 및 LCVR 영역은 프레임워크 영역 (FR)이 산재된, 상보성 결정 영역 (CDR)으로 불리우는 추가변 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각 HCVR 및 LCVR은 3개의 CDR과 4개의 FR로 구성되는데, 이들은 아미노 말단에 서부터 카르복실 말단까지 다음 순서로 배열되어 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[0029]

HCVR1의 3개 CDR은 CDRH1-1, CDRH1-2 및 CDRH1-3으로서 지칭되고, HCVR2의 3개 CDR은 CDRH2-1, CDRH2-2 및 CDRH2-3으로서 지칭되며, LCVR1의 3개 CDR은 CDRL1-1, CDRL1-2 및 CDRL1-3으로서 지칭되고, LCVR2의 3개 CDR은

CDRL2-1, CDRL2-2 및 CDRL2-3으로서 지칭된다.

[0030] CH는 아미노산 링커 (L1)에 의해 HCVR2에 융합된다. HCVR2는 아미노산 링커 (L2)에 의해 LCVR2에 융합된다.

[0031] 각종 영역 및 링커의 관계는 다음과 같다:

폴리펩티드 1 - 서열 1			폴리펩티드 2 - 서열 2		
HCVR1 BAFF	영역	위치	LCVR1 BAFF	영역	위치
	FRH1-1	1-26		FRL1-1	1-23
	CDRH1-1	27-35		CDRL1-1	24-34
	FRH1-2	36-49		FRL1-2	35-49
	CDRH1-2	50-65		CDRL1-2	50-56
	FRH1-3	66-97		FRL1-3	57-88
	CDRH1-3	98-112		CDRL1-3	89-97
	FRH1-4	113-123		FRL1-4	98-107
불변	CH	124-447	불변	CL	108-214
링커	L1	448-463			
HCVR2 IL-17	FRH2-1	464-487			
	CDRH2-1	488-498			
	FRH2-2	499-512			
	CDRH2-2	513-528			
	FRH2-3	529-561			
	CDRH2-3	562-571			
	FRH2-4	572-582			
링커	L2	583-602			
LCVR2 IL-17	FRL2-1	603-625			
	CDRL2-1	626-641			
	FRL2-2	642-656			
	CDRL2-2	657-663			
	FRL2-3	664-695			
	CDRL2-3	696-704			
	FRL2-4	705-714			

[0032]

[0033] 이중특이적 항체 조작

[0034] scFv 배위에 항-IL-17 결합 부분을 수반한 MAb-scFv 포맷으로 이중특이적 항체를 구축하는 경우에, 화학적 및 물리적 안정성과 연관된 상당한 문제점에 부딪히게 되었다. 물리적 안정성을 개선시키고 농도-의존적 응집을 저하시키는 화학적 변형이 이중특이적 항체의 CDRL2-1 및 CDRH2-2 부분에서 이루어졌다. 광범위한 단백질 안정성 및 용해도 연구 결과, CDRL2-1 및 CDRH2-2에서 화학적으로 불안정한 잔기를 확인하였다. 이들 불안정한 잔기는 코돈 고갈시킴으로써 구축된 표적화 라이브러리를 이용하여 전하를 띤 중성 아미노산으로 대체시켰다. 부가적으로, 상기 이중특이적 항체의 정전기 표면을 계산하고, 전하를 띤 패치(patch)를 확인하였다. scFv 내의 상기 전하를 띤 패치를 봉괴시키면, 단백질 자가 결합이 감소되었다. 그러나, 표면 정전기 분포를 재조정시키고 고 농도에서의 물리적 안정성 및 용해도를 개선시킨 돌연변이를 상기 이중특이적 항체의 CDRH2-1 부분에서 확인하였다. 상기 쟁점들 중 어느 것도 모 단일 항체의 경우에는 전혀 부딪힌 적이 없었다. 이들 문제점은 MAb-scFv 포맷으로 이중특이적 항체를 구축하는 상황 하에서만 직면한 것이었는데, 이는 단일 항체의 돌연변이된 구역을 둘러싸고 있는 국부 환경이 이중특이적 항체의 상황과는 상이하였다는 사실을 제안하고 있다.

[0035] 이중특이적 항체의 IL-17 부분 내의 HCVR2/LCVR2 계면을 안정화시키고 이중특이적 항체 응집을 저하시키기 위한 추가의 화학적 변형이 이루어졌다. 응집을 결정하기 위해 수행된 연구 결과, 관찰된 단백질 자가 결합이 개별적 HCVR2 또는 LCVR2 도메인의 입체형태적 불안정성에 의해 구동된 것이 아니라, 오히려 HCVR2/LCVR2 계면의 개방 또는 호흡에 의해 구동되어 분자간 단백질 상호작용을 유발시킨 것으로 나타났다. 따라서, 각종쇄내 디설피드 결합이 이중특이적 항체의 IL-17 부분의 HCVR2/LCVR2 계면 내로 도입되었다. 이러한 하나의쇄내 디설피드 결합이 각각의 제1 폴리펩티드 내에서 서열 1의 시스테인 잔기 507과 서열 1의 시스테인 잔기 707 사이에 존재한다. 이러한 디설피드 결합은 이중특이적 항체의 IL-17 부분 내의 HCVR2/LCVR2 계면과 공유적으로 연결되는데, 이는 HCVR2/LCVR2 계면을 안정화시켜 주고, 물리적 불안정성과 바람직하지 못한 제제화 한계를 초래할 수 있는 분자간 단백질 상호작용을 저하시켜 준다. 시험된 9개의 상이한 디설피드 결합 중에서, 8개가 기능적 단백질을 발현하였는데, 친화도 상실 규모는 약 2 내지 약 35배의 범위였다. 각각의 제1 폴리펩티드 내에서 서열 1의 시스테인 잔기 507과 서열 1의 시스테인 잔기 707 사이의쇄내 디설피드 결합이, IL-17에 대한 최적의 결합

친화도를 유지하면서도 HCVR2/LCVR2 계면을 가장 잘 안정화시켰다.

[0036] 또한, 연구 결과, L1에 대한 링커 길이가 결합 동역학에 영향을 미친 것으로 나타났다. 동역학적 분석 (표면 플라즈몬 공명에 의해 수행됨)은 10개 아미노산 링커가 15개 아미노산 및 20개 아미노산 링커와 비교해서 2배 더 느린 K_{on} 속도를 유발시켰다고 제시하였다. 따라서, 15개 아미노산 길이의 링커를 본 발명의 이중특이적 항체 내로 도입하였다.

[0037] **이중특이적 항체 결합**

[0038] 본 발명의 이중특이적 항체는 인간 BAFF와 인간 IL-17 둘 다와 결합하고, 시험관내 또는 생체내에서 한 가지 이상의 인간 BAFF 생물활성 및 한 가지 이상의 인간 IL-17 생물활성을 중화시킨다. 본 발명의 이중특이적 항체는 시험관내에서 BAFF의 존재 및 부재 하에 IL-17의 강력한 억제제이다. 본 발명의 이중특이적 항체는 시험관내에서 IL-17의 존재 또는 부재 하에 가용성 BAFF 및 막 결합된 BAFF 둘 다의 강력한 억제제이다. 본 발명의 이중특이적 항체는 추가로, 인간 BAFF에 대한 결합 친화도 (K_D)가 150 pM 내지 1 pM의 범위이고, 인간 IL-17에 대해서는 50 pM 내지 1 pM의 범위인 것을 특징으로 한다. 이러한 이중특이적 항체는 인간 IL-17A/F 이중이량체에 대한 결합 친화도가 약 90 pM이다.

[0039] 상기 이중특이적 항체는 가용성 BAFF 뿐만 아니라 막 결합된 BAFF를 효과적으로 중화시키고, 이러한 중화는 포화량의 인간 IL-17의 존재에 의해 영향을 받지 않는다. 이중특이적 항체는 인간 IL-17을 효과적으로 중화시키고, 이러한 중화는 포화량의 인간 BAFF의 존재에 의해 영향을 받지 않는다.

[0040] **이중특이적 항체 발현**

[0041] 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있는 발현 벡터는 당업계에 널리 공지되어 있다. 발현 벡터는 숙주 세포로부터 폴리펩티드(들)의 분비를 촉진시켜 주는 신호 펩티드를 코딩할 수 있다. 이러한 신호 펩티드는 이뮤노글로불린 신호 펩티드 또는 이중 신호 펩티드일 수 있다. 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 하나의 벡터에서 그와 작동가능하게 연결되는 상이한 프로모터로부터 독립적으로 발현될 수 있거나, 또는 다르게는, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 2개의 벡터에서 그와 작동가능하게 연결되는 상이한 프로모터로부터 독립적으로 발현될 수 있다 (1개 벡터는 제1 폴리펩티드를 발현하고, 다른 1개는 제2 폴리펩티드를 발현함).

[0042] 숙주 세포는 본 발명의 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드, 또는 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드 둘 다를 발현하는 하나 이상의 발현 벡터로 안정적 또는 일시적으로 형질감염시키거나, 형질전환시키거나, 형질도입시키거나 또는 감염시킨 세포를 포함한다. 본 발명의 이중특이적 항체를 생산하는 숙주 세포주의 생성 및 단리는 당업계에 공지된 표준 기술을 이용하여 달성할 수 있다. 포유동물 세포가 이중특이적 항체를 발현하는 데 바람직한 숙주 세포이다. 특별한 포유동물 세포는 HEK 293, NS0, DG-44, 및 CHO이다. 바람직하게, 이중특이적 항체는 숙주 세포를 배양하고 있는 배지 내로 분비되며, 이로부터 이중특이적 항체를 회수하거나 정제할 수 있다.

[0043] 항체의 포유동물 발현으로 인해 글리코실화가 발생한다는 것은 당업계에 널리 공지되어 있다. 전형적으로, 글리코실화는 고도로 보존된 N-글리코실화 부위에서 항체의 Fc 영역 내에서 발생한다. N-글리칸은 전형적으로 아스파라긴에 부착된다. 각각의 제1 폴리펩티드는 서열 1의 아스파라긴 잔기 300에서 글리코실화된다.

[0044] 서열 1의 아미노산 서열을 갖는 제1 폴리펩티드를 코딩하는 특정 DNA 폴리뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

```
cAGGTGCAACTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCTGTCCCTC
ACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCTTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATTGCCAGCCC
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAATCAATCATAGTGAAGCACCACACTACAAC
CCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAGAACCAGTTCTCCCTG
AAACTGAGCTCTGTGACCGCCGCGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGTATTAC
GATATTTTGAAGTGTATTATTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACC
GTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCTGTCCAGGAGC
ACCTCCGAGAGCACAGCCGCTGGGTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTG
ACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTTA
CAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACGTGCGCTCCAGCAGCTTGGGC
ACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA
GTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCCTGCCAGCACCTGAGTTCTGGGGGA
CCATCAGTCTTCCGTGTTCCCCCAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGAACCCCT
GAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGG
TACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTTCAAC
AGCACGTACCGTGTGGTGCAGCTCCTCACCCTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGCAAG
GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCTCCCGTCTCTCATCGAGAAAACCATCTCC
AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCAGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTGAGCTGACCTGCCTGGTCAAGGCTTCTACCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAAAGCAATGGGCAGCCGAGAGCAACTACAAGACCAGCCTCCCGTG
CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACA
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCTGGAGGCGGAGGATCCGGGGGAGGGGGTACCGGAGGA
GGGGGCTCGCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCA
GTGAAGGTTTCTGCAAGGCATCTGGTTACAAGTTCACTGACTACCATATTCATTGGGTG
CGACAGGCCCTGGACAATGCCTTGAGTGGATGGGAGTAATTAATCTACTTATGGTACT
ACTGACTACAATCAGCGGTTCAAAGGCCGTGTACCATTTACCGCGGACGAATCCAGAGC
ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCG
AGATATGATTACTTTACTGCGGACGGGTGTGTACTGGGGCCAAAGGAACCTGGTCAACGTC
TCTCAGGTGGCGGAGGATCTGGTGGAGGTGGCTCAGGAGGTGGCGGAAGCGGCGAGGT
GGAAAGTGATATTGTGATGACTCAGACTCCACTCTCCCTGTCCGTCACCCCTGGACAGCCG
GCCTCCATCTCCTGCAGATCTAGTAGAGCCTTGACACAGTCGTGGAGAAACCTATTTA
CATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAATCTCCACAGCTCCTAATTTATAAAGTTTCCAAC
CGGTTTATTGGGGTCCAGACAGATTACGCGGCAGTGGGTGAGGCACAGATTTCACTG
AAAATCAGCAGGGTGGAGGCCGAAGATGTTGGGGTTTATTACTGCTCTCAAAGTACACAT
CTTCCATTACGTTTGGCTGCGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (서열 3).
```

[0045]

[0046] 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 제2 폴리펩티드를 코딩하는 특정 DNA 폴리뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

```
GAAATTGTGTGACGAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
CTCTCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCCGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCT
GGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCAGCC
AGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTCCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCT
GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGACAGCGTAGCAACTGGCCTCGGACGTTCCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACGTGGCGGCGCATCTGTCTTCTCTCCCGCCA
TCTGATGAGCAGTTGAAATCCGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT
CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCCCAATCGGGTAACCTCCAG
GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAACACCTGACG
CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGC
CTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC
```

[0047]

(서열 4).

[0048]

이중특이적 항체가 분비되는 배지는 통상적인 기술에 의해 정제할 수 있다. 예를 들어, 상기 배지를 통상적인 방법을 이용하여 단백질 A 또는 G 칼럼에 적용하고 이로부터 용출시킬 수 있다. 가용성 응집체 및 다량체는 크기 배제, 소수성 상호작용, 이온 교환, 또는 히드록시아파타이트 크로마토그래피를 포함한 통상의 기술에 의해 효과적으로 제거할 수 있다. 생성물은, 예를 들어 -70℃에서 즉시 냉동시키거나 또는 동결건조시킬 수 있다.

[0049]

배지에 존재하는 미스폴딩된(misfolded) 이중특이적 항체의 수준을 감소시킬 필요가 있을 수 있다. 미스폴딩된 이중특이적 항체는 디아바디(diabody)로서 공지되기도 한다. 하나 이상의쇄간 또는쇄내 디설피드 결합이 부 정확하게 형성되는 경우에 미스폴딩이 발생한다. 이러한 미스폴딩된 이중특이적 항체는 통상적인 기술에 의해

정제할 수 있다. 예를 들어, 미스폴딩된 이중특이적 항체를 함유하는 배지를 강 양이온 교환 수지에 적용하고 이로부터 용출시킬 수 있다. 예를 들어, SP-세파로스 HP 강 양이온 교환 수지를 사용하여, 정확하게 폴딩된 이중특이적 항체를 디아바디로부터 정제한다. 1 M 트리스(Tris) 염기를 사용하여, 디아바디를 함유하는 배지의 pH를 pH 8로 조정한다. 배지를 SP-세파로스 HP 칼럼 상에 로딩하고, 2 칼럼 부피의 20 mM 트리스 (pH 8)로 세척하며, 30 칼럼 부피 (0 내지 70 mM NaCl)에 걸쳐 20 mM 트리스, 100 mM NaCl (pH 8)로 용출시킨다. 수집된 풀을 대상으로 하여, 고 분자량 대 주요 피크에 관하여 평가할 수 있다. 전형적인 결과는 71% 회수율을 수반하면서 10% 디아바디에서 1% 디아바디로 개선된 것이다.

[0050] 또 다른 예에서는, 포로스(Poros) HS 50 강 양이온 교환 수지를 사용하여, 정확하게 폴딩된 이중특이적 항체를 디아바디로부터 정제한다. 1 M 트리스 염기를 사용하여, 디아바디를 함유하는 배지의 pH를 pH 8로 조정한다. 배지를 SP-세파로스 HP 칼럼 상에 로딩하고, 15 칼럼 부피 (15 내지 50 mM NaCl)에 걸쳐 20 mM 트리스, 100 mM NaCl (pH 8)로 용출시킨다. 수집된 풀을 대상으로 하여, 고 분자량 대 주요 피크에 관하여 평가할 수 있다. 전형적인 결과는 57% 회수율을 수반하면서 10% 디아바디에서 1% 디아바디로 개선된 것이다.

[0051] 치료 용도

[0052] 환자는 BAFF 및/또는 IL-17의 감소된 수준 또는 BAFF 및/또는 IL-17의 감소된 생물활성으로부터 이득을 얻을 수 있는 질환, 장애 또는 병태가 있는 포유동물, 바람직하게 인간을 지칭한다.

[0053] 치료 및/또는 치료하는 이란 본원에 기재된 장애의 진행을 느리게 하거나, 차단하거나, 저지하거나, 제어하거나 또는 중지시킬 수 있는 모든 과정을 지칭하는 것으로 의도되지만, 반드시 모든 장애 증상을 완전히 제거하는 것으로 표시하지는 않는다. 본 발명의 이중특이적 항체는 전신 홍반성 루푸스, 루푸스 신염, 류마티스 관절염, 건선, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 원발성 쇼그렌 증후군 또는 다발성 골수종을 치료하는 것으로 예상된다.

[0054] 제약 조성물

[0055] 본 발명의 이중특이적 항체는 환자에게 투여하기 적합한 제약 조성물 내로 혼입시킬 수 있다. 이러한 제약 조성물은 선택된 투여 방식에 적당하도록 설계되고, 제약상 허용되는 희석제, 담체 및/또는 부형제, 예컨대 분산제, 완충제, 계면활성제, 보존제, 가용화제, 등장성 작용제, 안정화제 등이 적절하게 사용된다. 상기 조성물은, 예를 들어 실행자에게 일반적으로 공지되어 있는 바와 같은 제제화 기술의 개론을 제공하는 문헌 [Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995]에 개시된 통상적인 기술에 따라서 설계할 수 있다. 제약 조성물에 적합한 담체는 본 발명의 이중특이적 항체와 조합되는 경우에, 분자의 활성을 보존시켜 주고 환자의 면역계와 비-반응성인 어떠한 물질도 포함한다. 본 발명의 제약 조성물은 이중특이적 항체 및 하나 이상의 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함한다.

[0056] 본 발명의 이중특이적 항체를 포함하는 제약 조성물은 표준 투여 기술을 이용하여, 본원에 기재된 바와 같은 질환 또는 장애를 나타내거나 그럴 위험이 있는 환자에게 투여할 수 있다.

[0057] 본 발명의 제약 조성물은 유효량의 본 발명의 이중특이적 항체를 함유한다. 유효량은 목적하는 치료적 결과를 달성하는 데 (투여량에서 및 투여 기간 동안 및 투여 수단)에 필요한 양을 지칭한다. 이중특이적 항체의 유효량은 질환 상태, 개체의 연령, 성별 및 체중, 및 개체에게서 목적하는 반응을 유발시킬 수 있는 항체 또는 항체 부분의 능력과 같은 요인들에 따라서 다양할 수 있다. 유효량은 또한, 이중특이적 항체의 치료상 이로운 효과가 이러한 항체의 어떠한 독성 또는 해로운 효과도 능가하는 양이다.

[0058] 발현 및 특성 증명의 다음 예의 이중특이적 항체는 서열 1의 아미노산 서열을 갖는 2개의 제1 폴리펩티드 및 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 2개의 제2 폴리펩티드를 포함하는데, 서열 1의 시스테인 잔기 137과 서열 2의 시스테인 잔기 214 사이에서 각각의 제1 폴리펩티드는 각각의 제2 폴리펩티드와 쇠간 디설피드 결합을 형성하고; 서열 1의 제1 폴리펩티드의 시스테인 잔기 229와 서열 1의 다른 제1 폴리펩티드의 시스테인 잔기 229 사이 및 서열 1의 제1 폴리펩티드의 시스테인 잔기 232와 서열 1의 다른 제1 폴리펩티드의 시스테인 잔기 232 사이에서 제1 폴리펩티드는 다른 제1 폴리펩티드와 2개의 쇠간 디설피드 결합을 형성하며; 서열 1의 시스테인 잔기 22와 서열 1의 시스테인 잔기 95 사이, 서열 1의 시스테인 잔기 150과 서열 1의 시스테인 잔기 206 사이, 서열 1의 시스테인 잔기 264와 서열 1의 시스테인 잔기 324 사이, 서열 1의 시스테인 잔기 370과 서열 1의 시스테인 잔기 428 사이, 서열 1의 시스테인 잔기 485와 서열 1의 시스테인 잔기 559 사이, 서열 1의 시스테인 잔기 507과 서열 1의 시스테인 잔기 707 사이, 및 서열 1의 시스테인 잔기 625와 서열 1의 시스테인 잔기 695 사이에서 각각의 제1 폴리펩티드는 쇠내 디설피드 결합을 형성하고; 서열 2의 시스테인 잔기 23과 서열 2의 시스테인 잔기 88

사이, 및 서열 2의 시스테인 잔기 134와 서열 2의 시스테인 잔기 194 사이에서 각각의 제2 폴리펩티드는 쇠내 디설피드 결합을 형성하며; 각각의 제1 폴리펩티드는 서열 1의 아스파라긴 잔기 300에서 글리코실화된다. 정확하게 폴딩된 이중특이적 항체 대 미스폴딩된 디아바디의 비율은 대략 90:10이다.

[0059] 이중특이적 항체의 발현

[0060] 이중특이적 항체는 본질적으로 다음과 같이 발현 및 정제할 수 있다. 서열 3의 DNA (서열 1의 아미노산 서열을 갖는 제1 폴리펩티드를 코딩함) 및 서열 4의 DNA (서열 2의 경쇄 아미노산 서열을 코딩함)를 함유하는 글루타민 신테타제 (GS) 발현 벡터를 사용하여, 차이나이즈 햄스터 세포주인 CHOK1SV [론자 바이올로지스 PLC(Lonza Biologics PLC; 영국 슬라우)]를 전기천공시킴으로써 형질감염시킨다. 이러한 발현 벡터는 SV 초기 (원숭이 바이러스 40E) 프로모터, 및 GS에 대한 유전자를 코딩한다. GS의 발현은 CHOK1SV 세포에 의해 요구되는 아미노산인 글루타민의 생화학적 합성을 고려한 것이다. 형질감염 후, 50 μ M L-메티오닌 섀록시민 (MSX)을 이용하여 세포를 대량 선별하게 된다. MSX에 의한 GS의 억제를 활용하여 선별 엄격도를 증가시킨다. 내인성 수준의 GS를 발현하는 CHOK1SV 야생형 세포에 대하여, 발현 벡터 cDNA를 숙주 세포 계능의 전사적 활성 영역 내로 통합시킨 세포를 선별할 수 있다. 형질감염된 풀을 저 밀도로 도말하여, 안정한 발현성 세포의 클로날 증식을 거의 가능케 하였다. 마스터웰을 대상으로 하여, 이중특이적 항체 발현에 관하여 스크리닝한 다음, 혈청-무함유 현탁 배양물에서 규모 확대하여, 생산 과정에 사용되도록 한다. 이중특이적 항체가 분비된 정화된 배지를, 상용성 완충제, 예컨대 포스페이트 완충 염수 (pH 7.4)로 평형시킨 단백질 A 친화도 칼럼에 적용한다. 이 칼럼을 세척하여 비-특이적 결합 성분을 제거한다. 결합된 이중특이적 항체는, 예를 들어 pH 구배 (예컨대, 0.1 M 인산나트륨 완충제 (pH 6.8) 내지 0.1 M 시트르산나트륨 완충제 (pH 2.5))에 의해 용출시킨다. 이중특이적 항체 분획을, 예컨대 SDS-PAGE 또는 분석적 크기 배제에 의해 검출한 다음, 모은다. 가용성 응집체 및 다량체는 크기 배제, 소수성 상호작용, 이온 교환, 또는 히드록시아파타이트 크로마토그래피를 포함한 통상의 기술에 의해 효과적으로 제거할 수 있다. 이중특이적 항체는 통상의 기술을 이용하여 농축시키고/시킴거나 멸균 여과시킬 수 있다. 이들 크로마토그래피 단계 후 이중특이적 항체의 순도는 98% 초과이다. 이중특이적 항체는 -70°C에서 즉시 냉동시키거나 또는 4°C에서 수 개월 동안 저장할 수 있다.

[0061] IL-17 및 BAFF에 대한 결합 친화도

[0062] 인간 IL-17 및 인간 BAFF에 대한 이중특이적 항체의 결합 친화도 및 결합 화학량론은 HBS-EP+ [GE 헬스케어(GE Healthcare), 10 mM Hepes (pH 7.4) + 150 mM NaCl + 3 mM EDTA + 0.05% 계면활성제 P20] 수행 완충제 및 25°C로 설정된 분석 온도를 이용하여 프라이밍된 비아코어(Biacore) 2000 기기 상에서 표면 플라즈몬 공명 분석을 이용하여 결정한다. 4개의 모든 유동 세포 (Fc) 상에 고정화 단백질 A (표준 NHS-EDC 아민 커플링을 이용하여 생성시킴)를 함유하는 CM5 칩을 사용하여 포획 방법론을 이용한다. 수행 완충제 내로 희석시킴으로써 항체 샘플을 10 mcg/ml로 제조한다. 수행 완충제 내로 희석시킴으로써 인간 IL-17 또는 인간 BAFF를 20.0, 10.0, 5.0, 2.5, 1.25 및 0 (블랭크) nM의 최종 농도로 제조한다. 각 분석 주기는 (1) 별개의 유동 세포 (Fc2, Fc3, 및 Fc4) 상에 항체 샘플을 포획하고, (2) 모든 Fc 전반에 걸쳐 250 mcl (300-sec)의 인간 IL-17 또는 인간 BAFF를 50 mcl/분으로 주사하며, (3) 20분 동안 완충제 유동으로 돌려보내 해리 상을 모니터링하고, (4) 칩 표면을 글리신, pH 1.5의 5 mcl (30-sec) 주사제로 재생시키며, (5) 칩 표면을 HBS-EP+의 10 mcl (60-sec) 주사제로 평형시키는 것으로 이루어진다. 표준 이중-참조를 이용하여 데이터를 처리하고, 비아코어 2000 평가 소프트웨어, 버전 4.1을 이용하여 1:1 결합 모델에 피팅하여 회합 속도 (k_{on} , $M^{-1}s^{-1}$ 단위), 해리 속도 (k_{off} , s^{-1} 단위), 및 R_{max} (RU 단위)를 결정한다. 평형 해리 상수 (K_D)는 관계 $K_D = k_{off}/k_{on}$ 으로부터 계산하는데, 이는 몰 단위이다.

표 1

이중특이적 항체에 의한 인간 IL-17 및 인간 BAFF에 대한 결합 친화도

항원	k_{on} Avg \pm SD $M^{-1}s^{-1}$ (10^6)	k_{off} Avg \pm SD s^{-1}	K_D Avg \pm SD pM	n
인간 IL-17	2.5 \pm 0.4	3.7 (\pm 1.8) $\times 10^{-5}$	14 \pm 5	3
인간 BAFF	2.3 \pm 0.9	1.2 (\pm 0.5) $\times 10^{-4}$	60 \pm 50	3

[0064] 이들 결과는 본 발명의 이중특이적 항체가 인간 IL-17 및 인간 BAFF와 결합한다는 것을 입증해준다.

[0065] **IL-17 및 BAFF의 동시 결합**

[0066] 비아코어 2000 기기를 사용하여 인간 IL-17 및 인간 BAFF가 이중특이적 항체와 동시에 결합할 수 있는지를 결정한다. 언급된 경우를 제외하고, 모든 시약 및 재료는 비아코어 AB (스웨덴 옘살라)로부터 구입한다. 모든 측정은 25℃에서 수행한다. HBS-EP+ 완충제 (150 mM 염화나트륨, 3 mM EDTA, 0.05% (w/v) 계면활성제 P-20, 및 10 mM HEPES (pH 7.4))을 수행 완충제 및 샘플 완충제로서 사용한다. 아민 커플링 키트를 이용하여 단백질 A를 CM4 센서 칩의 유동 세포 1 및 2 상에 고정화시킨다. 이중특이적 항체를 먼저, 유동 세포 2 상에 포획한 다음, 인간 IL-17을 20 nM으로 5분 동안 주사하여 IL-17 결합 부위를 포화시킨다. IL-17의 결합 후, 인간 BAFF 20 nM을 5분 동안 주사하고, 추가의 결합 신호를 관찰한다. 이어서, 10 mM 글리신 (pH 1.5)을 사용하여 칩 표면을 재생시킨다. 인간 IL-17 및 인간 BAFF를 상이한 순서로 이용하는 것을 제외하고는 동일한 과정을 반복한다. 인간 IL-17 또는 인간 BAFF를 이중특이적 항체로 완전히 포화시키게 해주는 화학량론을 계산한다. 이중특이적 항체에 대한 인간 IL-17의 화학량론은 전형적으로, 동역학적 결합 실험을 근거로 하여 약 1.3이다. 유사하게, 이중특이적 항체에 대한 인간 BAFF의 화학량론은 전형적으로, 동역학적 결합 실험을 근거로 하여 약 1.0이다. 대조군 BAFF Ab는 US7,317,089의 4A5-3.1.1-B4이다. 대조군 IL-17 Ab는 US7,838,638의 Fab 126이다.

표 2

이중특이적 항체에 대한 인간 IL-17 및 인간 BAFF의 동시 결합

항체	제1 분석물	Δ RU	제2 분석물	Δ RU
이중특이적	BAFF	22	IL-17	11
이중특이적	IL-17	15	BAFF	23
IL-17 Ab	BAFF	0	IL-17	32
IL-17 Ab	IL-17	16	BAFF	0
BAFF Ab	BAFF	33	IL-17	0
BAFF Ab	IL-17	0	BAFF	32

[0067]

[0068] 이들 결과는 본 발명의 이중특이적 항체가, 이중특이적 항체에 대한 상기 2개 리간드 결합으로부터 반응 단위 (Δ RU) 상의 증가로써 나타난 바와 같이 인간 IL-17 및 인간 BAFF와 동시에 결합할 수 있다는 것을 입증해준다.

[0069] **시험관내에서 HT-29 세포로부터 IL-17-유발 CXCL1 생산의 억제**

[0070] HT-29 세포는 IL-17 수용체를 자연적으로 발현하는 인간 결장직장 선암종 상피 세포이다. HT-29 세포를 인간 IL-17과 함께 인큐베이션하면 CXCL1이 생산되는데, 이는 시판용 ELISA를 이용하여 측정할 수 있다.

[0071] 41200 내지 2.64 pM 용량 범위 (이중특이적 항체의 단량체성 MW (=100 kDa)를 기준으로 한 최종 농도)의 이중특이적 항체를 평가한다. 이어서, 이중특이적 항체의 각 시험 농도 (50 mcI)를, 재조합 IL-17을 함유하는 웰 (이러한 웰 중의 최종 IL-17 농도는 3.75 nM (IL-17의 단량체성 MW (=16 kDa)를 기준으로 함)에 첨가한다. 각 처리당 3회씩 웰에서 시험을 수행한다. 검정 배지는 "배지 단독" 및 "IL-17 단독" 대조군용으로 사용한다. IL-17 중화 항체 (US7,838,638의 Fab 126)를 상기 검정에서 양성 대조군으로서 사용한다. IL-17 및 항체 혼합물을 함유하는 플레이트를 조직-배양물 처리된 96 웰 플레이트의 내부 웰에서 37℃, 95% 상대 습도, 5% CO₂ 하에 60 내지 90분 동안 인큐베이션한다. 이러한 검정의 변형에서는, 이중특이적 항체가 BAFF와 동시에 결합된 경우에도 IL-17을 여전히 중화시킬 수 있을 것인지를 결정할 목적으로, 포화 농도의 인간 BAFF를 첨가한다 (BAFF의 단량체성 MW (=20 kDa)를 기준으로 한 1.25 nM 최종 농도). HT-29 세포를 검정 배지 (10% FBS, 페니실린G (0.2 U/ml) 및 스트렙토마이신 (0.2 mcg/ml)을 함유하는 맥코이(McCoy) 5A)에서 통상적으로 배양한다. 검정 당일, 상기 세포를 HBSS로 세정하고, 트립신 + EDTA를 이용하여 배양 플라스크로부터 분리시킨다. 검정 배지를 이용하여 트립신을 불활성화시킨다. 이어서, HT-29 세포를 RT에서 5분 동안 500 Xg로 원심분리시킨다. 세포 펠렛을 검정 배지에 재현탁시킨다. 혈구계를 이용하여 세포 밀도를 측정하고, 20,000개의 HT-29 세포 (100 mcI 중)를, 상기 항체/IL-17 혼합물을 함유하는 96-웰 플레이트에 첨가한다. 200 mcI의 PBS를, 사용하지 않은 각각의 주변 웰 (세포를 수반하지 않음)에 첨가하여 증발로부터 비롯되는 주변 효과를 감소시킨다. 상기 96-웰 플레이트를 조직 배양 인큐베이터 (37℃, 95% 상대 습도, 5% CO₂) 내에 대략 48시간 동안 놓아둔다.

- [0072] 검정이 끝날 무렵, 상기 플레이트를 원심분리시키고 (RT에서 5분 동안 500 Xg으로 수행함), 세포 배양 배지를 폴리프로필렌 96-웰 플레이트에 옮긴 다음, 이를 밀봉시키고 -80℃에서 냉동시킨다. ELISA에 의해 CXCL1을 측정하는 날에, 상기 플레이트를 RT에서 해동시킨다. 배지 중의 CXCL1 수준 (회석되지 않거나 1:3으로 회석됨)은 제조업자의 지침에 따라서, 다음 완충제 및 변형을 사용하여 CXCL1 샌드위치 ELISA (R&D 시스템즈 듀오세트 (Systems DuoSet) #DY275)로 측정한다: 바이오FX 랩스(BioFX Labs)로부터의 1X ELISA 세척 완충제 (10X로부터, #WSHW-1000-01); 웰당 50 µl의 샘플 및 표준 부피; 바이오FX 랩스로부터의 기질 (1 성분 HRP 기질, #TMBW-1000-01); 바이오FX 랩스로부터의 정지 용액 (#LSTP-1000-01; 웰당 100 µl). ELISA 반응이 끝날 무렵, 플레이트를 마이크로플레이트 판독기 [몰레큘라 디바이시스 스펙트라맥스(Molecular Devices SpectraMax) 190] 상 450 nm에서 판독하였다. 데이터를 생산된 CXCL1의 최대량의 %로서 수집하였다 (IL-17 단독의 경우가 100%임). 이중특이적 항체 또는 양성 대조군에 의해 IL-17-유발 반응의 50%가 억제되는 농도 (IC50)를, 상기 데이터의 4 파라미터 S자형 피트를 이용하여 계산한다 [그래프패드 프리즘(GraphPad Prism)].
- [0073] 그 결과는 본 발명의 이중특이적 항체가 HT-29 세포에 의한 CXCL1의 IL-17-유발 분비를 농도-의존적 방식으로 억제하였다는 것을 입증해준다. 이러한 억제는 양성 대조군 항체를 이용하여 관찰된 결과와 거의 등등한 수준인 반면 (양성 대조군 항체에 대한 IC50 1.86 ± 0.22 nM과 비교하여 이중특이적 항체에 대한 IC50은 2.00 ± 0.21 nM이다 (평균 3회 독립적 실험 \pm SEM)), 음성 대조군 항체는 증식을 억제하지 않았다. 더욱이, 포화량의 BAFF의 존재하에서도 유사한 억제가 관찰되었다 (양성 대조군 항체에 대한 IC50 1.41 ± 0.50 nM과 비교하여 이중특이적 항체에 대한 IC50은 1.57 ± 0.45 nM이다 (평균 3회 독립적 실험 \pm SEM)). 본 발명의 이중특이적 항체는 IL-17을 효과적으로 중화시키고, 이러한 중화는 포화량의 BAFF의 존재에 의해 영향을 받지 않는다.
- [0074] **시험관내에서 T1165 세포의 BAFF-유발 증식의 억제**
- [0075] T1165.17은 생존 및 성장을 위해 외부 인자 (IL-1베타 또는 BAFF)에 의존적인 무린 형질세포종 세포주이다. 이들 세포는 BAFF에 대한 수용체를 자연적으로 발현하고, 인간 BAFF에 대한 그들의 반응은 증식을 모니터링함으로써 측정한다.
- [0076] 1 nM 내지 4.1 pM 용량 범위 (이중특이적 항체의 단량체성 MW (=100 kDa)를 기준으로 한 최종 농도)의 이중특이적 항체를 대상으로 하여, 가용성 BAFF를 중화시킬 수 있는 능력에 관하여 평가한다 (검정 중의 최종 가용성 BAFF 농도는 150 pM (BAFF의 단량체성 MW (=20 kDa)를 기준으로 함)임). 각종 농도의 이중특이적 항체를 총 부피 50 µl로 편평 바닥 96 웰 조직 배양 플레이트의 내부 웰 중 37℃에서 30 내지 60분 동안 가용성 BAFF와 함께 인큐베이션한다. BAFF 중화 항체 (US7,317,089의 4A5-3.1.1-B4)를 상기 검정에서 양성 대조군으로서 사용한다. 각 조건을 3회씩 시험한다. 이러한 검정의 변형에서는, 막 BAFF를 중화시킬 수 있는 이중특이적 항체의 능력을 시험한다. 각종 농도의 이중특이적 항체를, 비-절단가능한 형태의 BAFF를 발현하는 HEK293 세포의 막 분획 (BAFF 중의 푸린 절단 부위를 돌연변이시켜 BAFF를 세포막 상에 영구적으로 발현시킴으로써 달성됨)과 함께 인큐베이션한다. 상기 검정의 또 다른 변형에서는, 이중특이적 항체가 IL-17과 동시에 결합된 경우에도 가용성 또는 막 BAFF를 여전히 중화시킬 수 있을 것인지를 결정할 목적으로, 포화 농도의 인간 IL-17을 첨가한다 (IL-17의 단량체성 MW (=16 kDa)를 기준으로 한 15.6 nM 최종 농도).
- [0077] T1165 세포를, 2 ng/ml 재조합 인간 IL-1베타를 보충시킨 검정 배지 (10% FBS, HEPES, L-글루타민, 1 mM 피루브산나트륨, 5×10^{-5} M 2-메르캅토에탄올, 1X 항생제-항진균제를 함유하는 RPMI1640)에서 통상적으로 배양한다. 검정 당일, 세포를 검정 배지로 3회 세척하고, 검정 배지에 재현탁시켜 1×10^5 개 세포/ml가 되도록 한다. 50 µl의 상기 세포 현탁액을, 항체와 BAFF의 혼합물을 함유하는 96 웰 플레이트에 첨가한다. 100 µl의 검정 배지를, 사용하지 않은 각각의 주변 웰 (세포를 수반하지 않음)에 첨가하여 증발로부터 비롯되는 주변 효과를 감소시킨다. 플레이트를 조직 배양 인큐베이터 (37℃, 95% 상대 습도, 5% CO₂) 내에 대략 44시간 동안 놓아둔다. 검정이 끝날 무렵, 20 µl의 프로메가 셀 타이터 96 아쿠에스 원 솔루션(Promega Cell Titer 96 Aqueous One Solution)을 각 웰에 첨가하고, 37℃에서 1 내지 4시간 동안 인큐베이션한다. 플레이트를 마이크로플레이트 판독기 (몰레큘라 디바이시스 스펙트라맥스 190) 상 490 nm에서 판독한다. 최소 반응으로서 BAFF를 수반하지 않은 웰 및 최대 반응으로서 150 pM BAFF를 수반하는 웰을 사용하여, 데이터를 % 억제로서 수집한다. 이중특이적 항체 또는 양성 대조군에 의해 BAFF-유발 반응의 50%가 억제되는 농도 (IC50)를, 상기 데이터의 4 파라미터 S자형 피트를 이용하여 계산한다 [시그마플롯(SigmaPlot)].
- [0078] 그 결과는 본 발명의 이중특이적 항체가 T1165 세포의 가용성 BAFF-유발 증식을 농도-의존적 방식으로 억제한다는 것을 입증해준다. 이러한 억제는 양성 대조군 항체를 이용하여 관찰된 결과와 거의 등등한 수준인 반면 (양

성 대조군 항체에 대한 IC50 0.071 ± 0.002 pM과 비교하여 이중특이적 항체에 대한 IC50은 0.064 ± 0.021 pM이다 (평균 2회 독립적 실험 \pm SEM), 음성 대조군 항체는 증식을 억제하지 않았다. 더욱이, 포화량의 IL-17의 존재하에서도 유사한 억제가 관찰되었다 (양성 대조군 항체에 대한 IC50 0.073 ± 0.012 pM과 비교하여 이중특이적 항체에 대한 IC50은 0.060 ± 0.014 pM이다 (평균 2회 독립적 실험 \pm SEM)). 본 발명의 이중특이적 항체는 BAFF를 효과적으로 중화시키고, 이러한 중화는 포화량의 IL-17의 존재에 의해 영향을 받지 않는다.

[0079] 막-결합된 BAFF에 의해 유도된 T1165 세포의 증식을 억제할 수 있는 이중특이적 항체의 능력이 또한 입증되었다. 본 발명의 이중특이적 항체는 양성 대조군 BAFF 항체 (US7,317,089의 4A5-3.1.1-B4)와 유사하게 막-결합된 BAFF에 의해 유도된 증식을 효과적으로 억제한다. 더욱이, 유사한 억제는 포화량의 IL-17의 존재 하에서도 관찰된다.

[0080] **생체내에서 CXCL1의 인간 IL-17-유발 생산의 억제**

[0081] 인간 IL-17을 주사하면, 순환시 마우스 CXCL1이 신속하고도 일시적으로 증가하게 된다. 표준 암컷 C57B16 마우스 (군당 8마리)에게 이중특이적 항체 (마우스당 66 mcg), 또는 양성 대조군 항-IL-17 항체 (US7,838,638의 Fab 126, 마우스당 50 mcg) 또는 음성 대조군 항체 (huIgG4, 마우스당 50 mcg)를 SC 주사한다. 2일 후, 마우스에게 인간 IL-17 (마우스당 3 mcg)을 단일 IP 주사하고, 2시간이 지난 후에는 혈청을 수집하고, 이를 분석할 때까지 -80°C 에서 저장한다. CXCL1의 농도를 ELISA에 의해 결정한다. 마이크로타이터 플레이트를, 항체 포획 인간 Fc [잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch) 109-005-098, 1 mcg/ml]로 코팅하고, 4°C 에서 밤새 인큐베이션한다. 플레이트를 세척하고, 카세인으로 차단시키며, 100 μl 의 혈청 (1:1000 희석)을 첨가한다. 플레이트를 RT에서 2시간 동안 인큐베이션하고, 세척하며, HRP-표지된 검출 항체 (항-인간 IgG, 잭슨 이뮤노리서치 709-035-149)를 첨가한다. 플레이트를 RT에서 1시간 동안 인큐베이션하고, 세척하며, TMB 기질을 이용하여 현상한 다음, 플레이트 판독기를 이용하여 판독한다. 적당한 표준 곡선을 근거로 하여 농도를 계산한다.

표 3

이중특이적 항체에 대한 노출 후 CXCL1의 IL-17-유발 수준

투여된 Ab	음성 대조군	음성 대조군	양성 대조군	이중특이적 항체
리간드	PBS	IL-17	IL-17	IL-17
평균				
pg CXCL1/mL	45.06	1071.17	482.73	387
SEM	45.06	141.67	263.7	175.11
p 값			<0.01	<0.01

[0082] 이들 테이터는 인간 IL-17로 인해 혈청 CXCL1 수준이 증가한다는 사실을 확인시켜 준다. 그러나, 이중특이적 항체의 존재 하에서 이들 결과는 CXCL1의 IL-17-유발 증가가 음성 대조군 항체를 투여한 동물과 비교해서 저하된다는 ($P < 0.01$, ANOVA)것을 입증해준다. 이중특이적 항체를 이용한 경우의 CXCL1의 저하는 양성 대조군 항-IL-17 항체를 이용한 경우에 관찰된 것과 거의 동등한 수준이다. 각 군 내에서 이중특이적 항체, 양성 및 음성 대조군 항체 중 어느 것에 대한 증가의 노출은 정량적 ELISA에 의해 확인된다. 따라서, 본 발명의 이중특이적 항체는 마우스에서 인간 IL-17에 의해 유도된 생물학적 효과를 효과적으로 중화시킨다. P 값 결정은 음성 대조군/IL-17 군과 비교된다.

[0084] **생체내에서 인간 BAFF의 억제**

[0085] 가용성 인간 BAFF를 코딩하는 트랜스젠(transgene)을 수반하는 마우스는 비장 내에 비정상적으로 많은 수의 B 림프구를 갖고 있다.

[0086] 인간 BAFF에 대해 트랜스제닉인 마우스 (군당 5마리)에게 단일 용량의 이중특이적 항체 (마우스당 660 mcg), 또는 양성 대조군 항-BAFF 항체 (US7,317,089의 4A5-3.1.1-B4, 마우스당 500 mcg) 또는 음성 대조군 항체 (huIgG4, 마우스당 500 mcg)를 IP 주사한다. 8일 후, 혈청 및 비장을 수집한다. 비장 세포의 단일 세포 현탁액을 제조하고, 적혈구를 용해시킨 후에 백혈구의 총 수를 결정한다. 세포 표면 마커 B220을 이용하여 유동 세포 측정법에 의해 B 림프구의 상대적 비율(%)을 결정한다. B220 양성 세포의 비율(%)에 비장 내의 림프구 총 수를 곱함으로써 비장당 B 세포의 총 수를 계산한다. 마이크로타이터 플레이트를, 항체 포획 인간 Fc (잭슨 이뮤노리서치 109-005-098, 1 mcg/ml)로 코팅하고, 4°C 에서 밤새 인큐베이션한다. 플레이트를 세척하고, 카세인으로

로 차단시키며, 100 mcI의 혈청 (1:5000 희석)을 첨가한다. 플레이트를 RT에서 2시간 동안 인큐베이션하고, 세척하며, HRP-표지된 검출 항체 (항-인간 IgG, 잭슨 이뮤노리서치 709-035-149)를 첨가한다. 플레이트를 RT에서 1시간 동안 인큐베이션하고, 세척하며, TMB 기질을 이용하여 현상한 다음, 플레이트 판독기를 이용하여 판독한다. 적당한 표준 곡선을 근거로 하여 농도를 계산한다.

표 4

이중특이적 항체의 노출 후 인간 BAFF에 대해 트랜스제닉인 마우스의 비장 내의 B 세포 수

투여된 Ab	음성 대조군	양성 대조군	이중특이적 항체
평균 수 X 10E6 B 세포/비장	234.84	78.87	94.77
SEM	18.93	3.49	2.34
p 값		<0.0001	<0.0001

[0087]

이들 데이터는 인간 BAFF에 대해 트랜스제닉인 마우스의 비장 내의 B 세포 수가 이중특이적 항체를 단일 투여함으로써 감소된다는 (p<0.0001, ANOVA)것을 입증해준다. 이러한 B 세포 수의 정규화는 양성 대조군 BAFF 항체를 이용한 경우에 관찰된 것과 동등한 수준이다. 각 군 내에서 이중특이적 항체, 양성 및 음성 대조군 항체 중 어느 것에 대한 등가의 노출은 정량적 ELISA에 의해 확인된다. 따라서, 본 발명의 이중특이적 항체는 마우스에서 인간 BAFF에 의해 유도된 생물학적 효과를 효과적으로 중화시킨다. P 값 결정은 음성 대조군과 비교된다.

[0088]

용해도 및 안정성 분석

[0089]

이중특이적 항체는 pH 7.4의 PBS에서 제제화한다. 이중특이적 항체는 아미콘(Amicon) 농축기를 이용하여 1 내지 2 mg/ml에서 52 mg/ml 내지 58 mg/ml 범위의 농도로 농축시킨다. 농축된 샘플을 25℃에서 4주간에 걸쳐 저장한다. 샘플을 대상으로 하여, 초기 농도에서, 1일, 1주 및 4주 인큐베이션시 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)를 이용하여 % 고분자량 (% HMW)에 관하여 분석한다. SEC는 TSK G3000SW-XL [토소 바이오사이언스(Tosoh Bioscience)] 칼럼을 이용하여 애질런트(Agilent) 1100 시스템 상에서 수행한다. PBS + 0.35 M NaCl (pH 7.4)를 0.5 ml/분 하에 35분 동안 수행되는 이동 상으로서 사용한다. 1 μl 부피의 상기 농축된 항체를 칼럼 내로 주사하고, 280 nm에서 검출을 측정한다. 켐스테이션(ChemStation)을 사용하여 크로마토그램을 분석하고, 단량체 피크 전에 용출된 피크의 AUC 대 총 AUC의 비를 이용하여 % 고분자량 (HMW)을 계산한다. 상이한 시점에 25℃에서 저장된 샘플을 대상으로 하여 % HMW에 관하여 분석하고, 그 결과를 표 5에 요약한다.

[0090]

표 5

SE-HPLC에 의해 측정된 % 고분자량 중의 요약

	SE-HPLC에 의한 % HMW
초기, 농축되지 않음	0.95
초기, 농축됨	1.63
25℃ 하에 1일	1.81
25℃ 하에 1주	2.61
25℃ 하에 4주	5.35

[0091]

W02003016468의 BAFF 항체 및 W02007070750의 IL-17 항체를 포함하는 출발 이중특이적 항체를 이용한 예비 연구는, 6 mg/ml로만 농축시킨 후에는, PBS 중 4℃에서 3주 저장한 후 SE-HPLC함으로써 % HMW 중에 있어서 25% 증가를 검출하였고, 30 mg/ml에서는 PBS 중 4℃에서 단지 2일만 저장한 후에도 % HMW 중에 있어서의 증가가 15%였다는 것을 입증해주었다. 이들 결과는 본 발명의 이중특이적 항체가 출발 이중특이적 항체에 비해 훨씬 더 개선된 특성, 예컨대 응집 감소 및 물리적 안정성 증가를 나타내었다는 것을 입증해준다.

[0092]

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Eli Lilly and Company

<120> ANTI-BAFF-ANTI-IL-17 BISPECIFIC ANTIBODIES

<130> X19474

<150> 61/768747

<151> 2013-02-25

<150> 61/636302

<151> 2012-04-20

<150> PCT/US2013/036677

<151> 2013-04-16

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 714

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 1

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Gly Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr

100	105	110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly		
115	120	125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser		
130	135	140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val		
145	150	155
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe		
165	170	175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val		
180	185	190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val		
195	200	205
Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys		
210	215	220
Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly		
225	230	235
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu		
260	265	270
Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg		
290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
305	310	315
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu		
325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
340	345	350

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

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

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gln
450 455 460

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser
465 470 475 480

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Asp Tyr His
485 490 495

Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met Gly
500 505 510

Val Ile Asn Pro Thr Tyr Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe Lys
515 520 525

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
530 535 540

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
545 550 555 560

Arg Tyr Asp Tyr Phe Thr Gly Thr Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
565 570 575

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
580 585 590

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

595 600 605
 Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser
 610 615 620
 Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Val His Ser Arg Gly Glu Thr Tyr Leu
 625 630 635 640
 His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
 645 650 655

 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 660 665 670
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 675 680 685
 Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Leu Pro Phe Thr
 690 695 700
 Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 705 710
 <210> 2
 <211> 214
 <212>
 PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 2
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg

85	90	95	
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
100	105	110	
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
115	120	125	
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
130	135	140	
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
165	170	175	
Asn Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
180	185	190	
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser			
195	200	205	
Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210			
<210> 3			
<211> 2142			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> synthetic construct			
<400> 3			
caggtgcaac tacagcagtg gggcgagga ctgttgaagc cttcgagac cctgtccctc	60		
acctgcgtg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat tcgccagccc	120		
ccaggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac	180		
ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg	240		
aaactgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agggatttac	300		
gatattttga ctggttatta ttactacttt gactactggg gccaggaac cctggtcacc	360		
gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccgc tagcgccctg ctccaggagc	420		
acctccgaga gcacagccgc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg	480		

acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 540

cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc 600

acgaagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga 660

gttgagtcca aatatgggcc cccatgccca cctgcccag cacctgagtt cctgggggga 720

ccatcagtct tctgtttccc cccaaaaccc aaggacactc tcatgatctc ccggaccctt 780

gaggtcacgt gcgtgggtgt ggacgtgagc caggaagacc ccgaggtcca gttcaactgg 840

tacgtggatg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagttcaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcttcacc gtctgcacc aggactggct gaacggcaag 960

gagtacaagt gcaaggcttc caacaaaggc ctcccgtcct ccatcgagaa aacctatctc 1020

aaagccaaag ggcagccccc agagccacag gtgtacacc tgcccccac ccaggaggag 1080

atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gctttctacc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggaaagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaggctaa ccgtggacaa gagcagggtg 1260

caggagggga atgtcttctc atgtctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 1320

cagaagagcc tctccctgtc tcttgaggc ggaggatccg ggggaggggg taccggagga 1380

gggggtctgc aggtgcagct ggtgcagtct ggggtgagg tgaagaagcc tgggtcctca 1440

gtgaaggttt cctgcaagcc atctggttac aagttcactg actaccatat tcattgggtg 1500

cgacaggccc ctggacaatg ccttgagtgg atgggagtaa ttaatctac ttatgtact 1560

actgactaca atcagcggtt caaaggccgt gtcaccatta ccgcggacga atccacgagc 1620

acagcctaca tggagctgag cagcctgaga tctgaggaca cggccgtgta ttactgtgcg 1680

agatatgatt actttactgg gacgggtgtg tactggggcc aaggaaccct ggtcacctgc 1740

tctcaggtg gcggaggatc tgggtggaggt ggtcaggag gtggcggaag cggcggaggt 1800

ggaagtgata ttgtgatgac tcagactcca ctctccctgt ccgtcacccc tggacagccg 1860

gcctccatct cctgcagatc tagtaggagc ctgttacaca gtcgtggaga aacctattta 1920

cattggtatc tgcagaagcc aggccaatct ccacagctcc taatttataa agtttccaac 1980

cggtttattg ggggtccaga cagattcagc ggcagtgggt caggcacaga ttacacactg 2040

aaaatcagca ggggtggagc cgaagatgtt ggggtttatt actgtctca aagtacacat 2100

cttccattca cgtttggctg cgggaccaag ctggagatca aa 2142

<210> 4

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 4

gaaattgtgt tgacgcagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc cgctacttag cctggtacca gcagaaacct	120
ggccaggctc ccaggtcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc	180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac tccactctca ccatcagcag cctagagcct	240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctcggac gttcggccaa	300
gggaccaagg tggaaatcaa acgaactgtg gcggcgccat ctgtcttcat ctcccccca	360
tctgatgagc agttgaaatc cggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat	420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag	480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcaa caccctgacg	540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc	600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gc	642