

【명세서】**【발명의 명칭】**

항 OX40L 항체, 항 OX40L 및 항 TNF α 이중 특이성 항체 및 이들의 용도

【기술분야】

본 발명은 OX40L에 특이적으로 결합하는 신규한 항체 및 OX40L와 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체에 관한 것으로, 구체적으로는 인간 OX40L에 특이적으로 결합하여 OX40와 OX40 수용체와의 결합을 효과적으로 저해하는 항체 또는 이중 특이성 항체, 상기 항체를 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 발현벡터, 상기 발현 벡터를 포함하는 형질전환체, 상기 항체의 제조방법, 상기 항체를 포함하는 자가면역질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 상기 항체를 포함하는 자가면역질환 또는 염증성 질환의 진단용 조성물, 상기 항체를 이용한 자가면역질환 또는 염증성 질환의 진단 방법, 상기 항체를 이용한 자가면역질환 또는 염증성질환의 진단을 위한 정보를 제공하기 위한 방법 및 이를 위한 키트에 관한 것이다.

【배경기술】

자가면역질환 또는 염증성질환은 사람의 면역이 비정상적으로 활성화되어 발생한다. 자가면역질환 중 대표 병증인 류마티스 관절염의 경우 TNF α 억제제가 치료제시장의 68%를 차지하고 있다.

종양 괴사 인자 α (TNF α)는 단핵구 및 대식세포를 포함한 다수의 세포 유형에 의해 생성되는 사이토카인이며, 이는 본래 특정 마우스 종양의 괴사를 유도하는 능력에 의해 동정되었다[참조 문헌: Old, L. (1985) Science230: 630-632]. 이 후, 악액질과 연관된, 카섹틴(cachectin)이라 명명된 인자가 TNF α 와 동일한 분자라는 것이 밝혀졌다. TNF α 는 쇼크를 매개하는데 관여한다[참조 문헌: Beutler, B. and Cerami, A. (1988) Annu. Rev.Biochem. 57: 505-518; Beutler, B. and Cerami, A. (1989) Annu. Rev. Immunol. 7: 625-655]. 게다가, TNF α 는 패혈증, 감염증, 자가면역 질환, 이식 거부증 및 이식-대-숙주 질환을 포함한 각종 사람 질환 및 장애의 병리생리학과 연관이 있다[참조 문헌: Vasilli, P. (1992) Annu. Rev. Immunol. 10: 411-452; Tracey, K. J.and Cerami, A. (1994) Annu. Rev. Med. 45: 491- 503].

각종 질환에서의 인간 TNF α (hTNF α)의 유해한 역할 때문에, 치료 전략이 hTNF α 활성을 억제하거나 상쇄시키도록 계획되었다. 특히, hTNF α 에 결합하여 이를

중화시키는 항체는 hTNF α 활성을 억제하는 수단으로서 이용되었다. hTNF α 중화항체는 hTNF α 로 면역화된 마우스의 림프구로부터 수득된 하이브리도마에 의해 분비된 마우스 모노클로날 항체(mAb)[참조 문헌: Hahn T; et al., (1985) Proc Natl Acad Sci USA 82: 3814-3818; Liang, C-M., et al. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 137:847-854; Hirai, M., et al. (1987) J. Immunol. Methods 96: 57-62; Fendly, B. M., et al. (1987) Hybridoma 6: 359-370; Muller, A., et al. (1990) Cytokine 2: 162-169; 미국 특허 제5,231,024호(Moeller et al.); 유럽 특허 공보 제186833 B1호(Wallach, D.); 유럽 특허원 공보 제218 868 A1호(Old et al.); 유럽 특허 공보 제260 610 B 1호(Moeller, A., et al.)] 또는 키메라 항체[참조 문헌: Knight, D. M, et al. (1993) Mol. Immunol.30: 1443-1453; PCT 공개공보 WO 92/16553(Daddona, P. E., et al.)] 또는 인간화된 모노클로날 항체[참고문헌: PCT 공개공보 WO 92/11383(Adair, J. R., et al.)] 또는 인간 모노클로날 항체[참고문헌: 미국 10-1142825] 등이 존재한다. 이들 항-hTNF α 항체는 hTNF α 에 대해 고친화성(예: $K_d \leq 10^{-9}M$)을 나타내고, hTNF α 활성을 중화시킬 수 있다. 이런 항-hTNF α 항체는 다양한 자가면역질환, 감염증, 이식 거부증 및 이식-대-숙주 질환 등에서 치료제로

사용되고 있다.

하지만 이런 항 hTNF α 항체와 같은 TNF α 억제제에 불응하는 환자군이 약 50%에 달한다(Nature Reviews Rheumatology vol. 11, 276-289(2015)). 또한, 근래 개발되는 자가 면역 질환 타겟은 CTLA-4, IL-6, JAK1, JAK2 및 CD20 등으로 여기서 파생된 의약품들로는 TNF α 억제제만큼 효능을 내지 못하고 있다(Nature Reviews Rheumatology vol. 11, 276-289(2015)).

특히 류마티스 관절염 등의 자가 면역 질환은 단순히 한 종류의 면역세포의 이상으로 발생하는 것이 아닌 면역체계 전반의 문제로 발생하기에, 하나의 표적만을 억제하는 기존의 치료제 개발 방법으로는 치료제의 유효성을 향상시키는데 한계가 존재한다. 따라서 이런 유효성의 한계를 극복하고자 다른 작용기전을 가지는 두 가지 이상의 표적을 한 번에 제어하는 이중 또는 다중 특이성 항체가 개발되고 있다. 하지만 기존 이중 특이성 항체는 선천성(innate) 면역체계 또는 후천성(adaptive) 면역체계 중 특정 세포에 한정적으로 작용하고 있기에, 면역체계 전반의 항상성 개선을 이루어 내지 못한다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 OX40L(OX40 리간드)에 특이적으로 결합하는 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는 것이다.

본 발명의 목적은 서열번호 1(SEQ ID NO: 1)로 표시되는 OX40L 단백질의 아미노산 서열에서 서열번호 3(SEQ ID NO: 3)으로 표시되는 93번 내지 100번 및 서열번호 4(SEQ ID NO: 4)로 표시되는 141번 내지 151번 아미노산 서열을 포함하는 OX40L의 입체형태적 에피토프(conformational epitope)를 인지하는, OX40L에 특이적으로 결합하는 항 OX40L 항체를 제공하는 것이다.

본 발명의 목적은 OX40L(OX40 리간드)에 특이적으로 결합하는 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 및 종양 괴사 인자 α (TNF α)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편;을 포함하는, 이중 특이성 항체(bispecific antibody)를 제공하는 것이다.

본 발명의 목적은 상기 항-OX40L 항체, 이의 결합단편 또는 상기 이중 특이성 항체를 코팅하는 핵산, 상기 핵산이 도입된 발현벡터 또는 상기 발현벡터가 도입된 숙주세포를 제공하는 것이다.

본 발명의 목적은 상기 숙주세포를 이용한 항-OX40L 항체, 이의 항원 결합 단편 또는 이중 특이성 항체를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 목적은 상기 항-OX40L 항체, 이의 항원 결합 단편 또는 상기 이중 특이성 항체를 포함하는 자가면역질환 또는 염증성질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 목적은 상기 항-OX40L 항체, 이의 항원 결합 단편 또는 상기 이중 특이성 항체를 포함하는 자가면역질환 또는 염증성질환의 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 목적은 상기 항-OX40L 항체, 이의 항원 결합 단편 또는 이중 특이성 항체를 포함하며, 상기 OX40L 및 TNF α 중 적어도 하나를 검출하기 위한 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 목적은 상기 항-OX40L 항체, 이의 항원 결합 단편 또는 이중 특이성 항체를 이용하는 자가면역질환 또는 염증성질환의 진단을 위한 정보의 제공방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 목적은 상기 항-OX40L 항체, 이의 항원 결합 단편 또는 이중

특이성 항체를 포함하는 자가면역질환 또는 염증성질환의 진단을 위한 정보를 제공하기 위한 키트를 제공하는 것이다.

본 발명의 목적은 상기 항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이중 특이성 항체의 약학적으로 유효한 양을 투여함을 포함하는, 자가면역질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 목적은 자가면역질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약제의 제조에서 상기 항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이중 특이성 항체의 용도를 제공하는 것이다.

본 발명의 목적은 자가면역질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료를 위한 상기 항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이중 특이성 항체의 용도를 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다.

또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

본 발명은, OX40L에 특이적으로 결합하면서 OX40L와 OX40 수용체 간의 상호작용을 저해하는 항 OX40L 항체 또는 결합 단편을 제공한다.

본 명세서에서 용어, "항체"는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하는, 항원을 특이적으로 인식하는 수용체 역할을 하는 단백질 분자를 의미하며, 다클론항체, 단일클론항체, 전체(whole) 항체 및 결합 단편을 모두 포함한다. 또한, 상기 용어는 키메라성 항체(예를 들면, 인간화 무린 항체), 인간화 항체, 인간 항체 및 이가(bivalent) 또는 양특이성 분자(예를 들어, 양특이성 항체), 디아바디, 트리아바디 및 테트라바디를 포함할 수 있다.

전형적으로, 면역글로불린은 중쇄 및 경쇄를 가지며 각각의 중쇄 및 경쇄는 불변 영역 및 가변 영역(상기 부위는 도메인으로 또한 알려져 있음)을 포함할 수 있다. 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은, 상보성 결정 영역(complementarity-determining region, 이하 "CDR"이라 함)이라 불리는 3개의 다변가능한 영역 및 4개의 구조 영역(framework region)을 포함할 수 있다. 상기 CDR은 주로 항원의

에피토프(epitope)에 결합하는 역할을 한다. 각각의 사슬의 CDR은 전형적으로 N-말단으로부터 시작하여 순차적으로 CDR1, CDR2, CDR3로 지칭되며, 또한 특정 CDR이 위치하고 있는 사슬에 의해서 식별될 수 있다.

전체 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며, 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 상기 전체 항체는 IgA, IgD, IgE, IgM 및 IgG를 포함할 수 있으며, IgG는 아형(subtype)으로, IgG₁, IgG₂, IgG₃ 및 IgG₄를 포함할 수 있다. 중쇄 불변영역은 감마 (γ), 뮤 (μ), 알파 (α), 델타 (δ) 및 엡실론 (ϵ) 타입을 가질 수 있고 서브클래스로 감마1 (γ 1), 감마2 (γ 2), 감마3 (γ 3), 감마4 (γ 4), 알파1 (α 1) 및 알파2 (α 2)를 가질 수 있다. 경쇄의 불변영역은 카파 (κ) 및 람다 (λ) 타입을 가질 수 있다.

본 명세서에서 용어, “단편”, “항체 단편”, “항원 결합 단편” 및 “결합 단편”은 항원 결합 기능을 보유하고 있는 본 발명의 항체의 임의의 단편을 의미하는 것으로 호환적으로 사용될 수 있으며, Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함할 수 있다.

상기 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 “경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫

번째 불변 영역(CH1 도메인)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C 말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성될 수 있다. Fv(variable fragment)는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각을 의미한다. 이중쇄Fv(dsFv)는 디설파이드 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(scFv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되어 있다. 이러한 결합 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고, 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 예를 들면, 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.

본 명세서에서 용어, "단일클론항체"는 실질적으로 동일한 항체 집단에서 수득한 단일 분자 조성의 항체 분자를 지칭하고, 이러한 단일클론항체는 특정 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다. 본 발명의 일

실시예들에서, 본 발명의 OX40L에 특이적으로 결합하는 항 OX40L 항체 또는 OX40L와 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체는 단일 분자 항체일 수 있다. 구체적으로, 상기 항 OX40L 항체는 OX40L의 특정 에피토프에 특이적으로 결합하는 단일 분자 조성의 항체를 의미할 수 있고, 상기 이중 특이성 항체는 OX40L 및 TNF α 의 특정 에피토프에 동시에 특이적으로 결합하는 단일 분자 조성의 이중 특이성 항체를 의미할 수 있다.

본 발명의 실시예들에서, 본 발명의 항 OX40L 항체 및 OX40L 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체는 키메라 항체, 인간화 항체, 또는 인간 항체일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

본 발명에서 용어, "키메라 항체"는 생쥐 항체의 가변영역 및 인간 항체의 불변영역을 재조합 시킨 항체로서, 생쥐 항체에 비하여 면역 반응이 크게 개선된 항체이다.

본 발명에서 용어, "인간화 항체"는 인간이 아닌 종에서 유래한 항체의 단백질 서열을 인간에서 자연적으로 생산된 항체 변이체와 유사하도록 변형시킨 항체를 의미한다. 그 예로 상기 인간화 항체는 생쥐 유래의 CDR을 인간 항체

유래의 FR과 재조합시켜 인간화 가변영역을 제조하고 이를 바람직한 인간 항체의 불변 영역과 재조합시켜 인간화 항체를 제조할 수 있다. 다만, 단순히 CDR 그래프팅만을 할 경우, 인간화 항체의 친화도가 떨어지게 되므로, CDR의 3 차원 구조에 영향을 줄 것으로 생각되는 몇 개의 중요한 FR 아미노산 잔기를 생쥐 항체의 것으로 친화시킴으로써 원래 생쥐 항체의 친화도와 같은 수준으로 올릴 수 있다.

본 명세서에서 용어, "인간 항체"는 인간 면역글로불린으로부터 유래하는 분자로서, 상보성 결정영역, 구조 영역을 포함한 항체를 구성하는 모든 아미노산 서열 전체가 인간 면역글로불린의 아미노산 서열로 구성되어 있는 것을 의미한다. 인간 항체는 통상적으로 인간의 질병의 치료에 사용되는데, 이는 3가지 이상의 잠재적인 장점을 가질 수 있다. 먼저, 이는 인간 면역 체계와 보다 양호하게 상호작용하여, 예를 들어 보체-의존성 세포독성(complement-dependent cytotoxicity, CDC) 또는 항체-의존성 세포성 세포독성(antibody-dependent cell mediated cytotoxicity, ADCC)에 의하여 목적 세포를 보다 효율적으로 파괴시킬 수 있다. 둘째로, 인간 면역 체계가 상기 항체를 외래의 것으로 인식하지 않는 이점이 있다.

셋째로, 더 적은 양, 보다 적은 빈도의 약물을 투여하였을 때에도 인간 순환계 내 반감기가 천연 발생 항체와 유사하다는 이점이 있다. 본 발명의 실시예들에서, 본 발명의 OX40L에 특이적으로 결합하는 항 OX40L 항체 및 OX40L 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체는 인간 항체일 수 있다. 따라서 본 발명의 인간 항 OX40L 항체 및 본 발명의 인간 이중 특이성 항체는 OX40L에 대해서 강한 친화력을 나타내며, OX40L를 발현하고 있는 세포(예-단핵구)가 OX40수용체에 결합하는 것을 효과적으로 저해할 뿐 아니라, 중쇄 및 경쇄 도메인 모두가 인간 유래이기 때문에 낮은 면역원성을 나타내므로, 자가면역질환이나 염증성 질환과 같은 질병의 치료에 있어 유용하게 사용될 수 있다.

본 명세서에서 용어, "OX40L"는 OX40 단백질을 수용체로 하는 리간드로서, 구체적으로는 OX40 수용체에 결합하는 단백질을 의미한다. OX40L에 대한 정보는 미국국립보건원의 GenBank 등 공지의 데이터베이스로부터 얻을 수 있으며, 그 예로 Accession Number가 Gene ID:54567, NCBI Reference Sequence: NM_003326.5(TNFSF4 ver1), NM_001297562.2(TNFSF4 ver2)인 서열번호 1(SEQ ID NO: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 OX40L의 정보일 수 있다.

OX40L는 항원제시세포(Antigen Presenting Cell, APC)에 과발현 되어 있으며, 여러 면역세포를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 구체적으로, OX40L는 TNF α 와 INF γ 와 마찬가지로 자가 면역 질환 환자에게서 과량 생성되는 것으로 관찰되었다(Eur. J. Immunol. 2000. 30: 2815-2823). 전신에 분포하는 TNF α 와 달리 OX40L는 활성화된 면역세포에서만 생성되어 주로 병변 위치에 분포한다. OX40L는 선천성 면역체계의 항원제시세포(Antigen Presenting Cell, APC)와 후천성 면역체계의 보조 T 세포(T helper cell)에 동시에 관여하여 면역체계의 항상성을 되찾도록 관여할 수 있는 다중 면역 조절 단백질이다(Nature Reviews Rheumatology vol. 12, 74-76(2016), (Clinic Rev Allerg Immunol, 2016).

본 발명에서 용어, "OX40" 는 OX40/OX40L 신호 전달을 매개하는 단백질을 의미한다. 상기 OX40는 OX40/OX40L 신호 전달을 매개하는 단백질이라면 제한없이 포함될 수 있다.

본 발명에서 용어, "OX40L와 OX40간의 상호작용을 저해" 또는 "OX40L와 OX40 수용체 사이의 상호작용을 저해" 는 본 발명의 OX40L에 특이적으로 결합하는 항 OX40L 항체 또는 이의 결합단편이 OX40L에 결합하여 OX40L와 OX40 간의

상호작용을 억제 또는 저해시키는 것을 의미한다. 항 OX40L 항체 또는 이의 결합단편이 OX40L에 결합하면 OX40L의 생물학적 기능을 억제 또는 저해함으로써, OX40L와 OX40 결합이 억제 또는 저해되어 OX40의 신호전달을 가져올 수 없게 한다. 즉, 항 OX40L 항체 또는 이의 결합단편의 OX40L에의 결합에 의해 OX40L와 OX40간의 상호작용이 억제 또는 저해되며, 결과적으로 OX40의 신호전달이 억제되거나 저해된다.

본 발명에서 "OX40L에 특이적으로 결합하는 항 OX40L 항체"는 OX40L에 특이적으로 결합하여 OX40L의 생물학적 활성을 억제하거나 저해시키는 항체를 의미한다. 상기 항체는 OX40L의 생물학적 활성을 억제 또는 저해하여 OX40L 및 OX40 수용체 사이의 상호작용을 억제 또는 저해할 수 있다. 본 명세서에서 "OX40L에 특이적으로 결합하는 항 OX40L 항체"는 "OX40L에 특이적으로 결합하는 항체" 또는 "항 OX40L 항체"와 서로 호환되어 사용될 수 있다.

상기 항 OX40L 항체의 형태는 상기에서 설명한 바와 같이 전체 항체 및 결합 단편을 모두 포함할 수 있다. 본 발명의 항 OX40L 항체는 인간 OX40L에 특이적으로 결합하면서 OX40L와 OX40 수용체간의 상호작용을 저해시켜,

자가면역질환 또는 염증질환과 같은 질병의 치료에 유용하게 사용할 수 있으며, 자가면역질환 또는 염증질환에서 과발현되는 인간 OX40L에 특이적으로 결합함으로써 부작용을 최소화하면서 치료효과를 최대화할 수 있다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 OX40L에 특이적으로 결합하고 OX40L와 OX40 수용체 사이의 상호작용을 저해하는, 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 OX40L에 3×10^{-9} M 이하로 결합할 수 있다. 구체적으로, 상기 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 1.5×10^{-9} M, 1.3×10^{-9} M 특히, 1×10^{-9} M 이하의 K_D 로 결합할 수 있다.

본 발명에서 사용된 용어 "결합상수 (K_{on})"는 특정 항체-항원 상호작용의 결합 비율을 의미하고, 용어 "해리상수 (K_{off})"는 특정 항체-항원 상호 작용의 해리 비율을 의미하는 것이다. 또한, 본 발명에서 용어 "항원에 대한 친화도(K_D)"는 $K_{off} : K_{on}$ 의 비율 (즉, K_{off} / K_{on})을 몰 농도 (M)로 나타낸 것이다. 항체에 대한 K_D 값은 당업계에서 널리 확립된 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 예를 들어, 항체의 K_D 값을 측정하기 위한 방법으로 바이오코어™ 시스템을 사용한 표면 플라즈몬 공명 분석을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명의 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 OX40L에 대해 높은 결합력을 나타내어 낮은 농도에서도 OX40L에 대한 활성을 억제 또는 저해할 수 있어 자가면역질환 또는 염증질환에 대해 우수한 치료 효과를 나타낼 수 있다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 OX40L의 입체형태적 에피토프(conformational epitope)를 인지할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 상기 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 1로 표시되는 인간 OX40L 단백질의 아미노산 서열에서 93번 내지 100번 및 141번 내지 151번 아미노산 서열에 3×10^{-9} M 이하로 결합할 수 있다. 구체적으로, 상기 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 1로 표시되는 인간 OX40L 단백질의 아미노산 서열에서 93번 내지 100번 및 141번 내지 151번 아미노산 서열에 1.5×10^{-9} M, 1.3×10^{-9} M, 특히, 1×10^{-9} M 이하의 K_D 로 결합할 수 있다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 인간 OX40L 단백질의 아미노산 서열에 높은 결합력으로 결합할 수 있으며, 구체적으로 3×10^{-9} M 이하로 결합할 수

있다. 구체적으로, 상기 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 1.5×10^{-9} M, 1.3×10^{-9} M, 특히, 1×10^{-9} M 이하의 K_D 로 결합할 수 있다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 인간 OX40L에 대한 K_D 는 표면 플라스몬 공명 (surface plasmon resonance; Biacore) 분석으로 측정된 것일 수 있다.

상기 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 구체적으로는, 하기에 언급하는 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

서열번호 12, 13 및 14으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 15, 16, 17 및 18로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 19, 20, 21 및 22로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 중쇄 CDR3;을 포함하는 중쇄 가변영역, 및

서열번호 23 및 24로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로

기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 25 및 26으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 27, 28, 29 및 30으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 경쇄 CDR3;을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

본 발명에서 용어, "중쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VH 및 3 개의 불변영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3를 포함하는 전체길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 포함할 수 있다.

또한, 본 발명에서 용어, "경쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VL 및 불변영역 도메인 CL을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 포함할 수 있다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

서열번호 12로 표시되는 중쇄 CDR1; 서열번호 15으로 표시되는 중쇄 CDR2; 및 서열번호 19로 표시되는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

서열번호 23로 표시되는 경쇄 CDR1; 서열번호 25로 표시되는 경쇄 CDR2; 및 서열번호 27로 표시되는 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 실시예들에서는 상기 항체를 02C09로 명명하였다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은

서열번호 13으로 표시되는 중쇄 CDR1; 서열번호 16으로 표시되는 중쇄 CDR2; 및 서열번호 20로 표시되는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

서열번호 24로 표시되는 경쇄 CDR1; 서열번호 26로 표시되는 경쇄 CDR2; 및 서열번호 28로 표시되는 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 실시예에서는 상기 항체를 hu3F07, I3F07로 명명하였다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은

서열번호 13으로 표시되는 중쇄 CDR1; 서열번호 17으로 표시되는 중쇄

CDR2; 및 서열번호 21로 표시되는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

서열번호 24로 표시되는 경쇄 CDR1; 서열번호 26으로 표시되는 경쇄 CDR2;

및 서열번호 29로 표시되는 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는

항체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 실시예에서는 상기 항체를

10H07로 명명하였다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합

단편은

서열번호 14로 표시되는 중쇄 CDR1; 서열번호 18으로 표시되는 중쇄 CDR2;

및 서열번호 22로 표시되는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

서열번호 24로 표시되는 경쇄 CDR1; 서열번호 26으로 표시되는 경쇄 CDR2;

및 서열번호 30으로 표시되는 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는

항체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 실시예에서는 상기 항체를

21G07로 명명하였다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합

단편은

서열번호 37, 41, 45, 49 및 53으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의
아미노산 서열로 기재된 중쇄 가변영역; 및

서열번호 38, 42, 46, 50 및 54로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의
아미노산 서열로 기재된 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 항-0X40L 항체 또는 이의 항원 결합
단편은,

(a) 서열번호 37로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 38로 기재된 경쇄
가변영역;

(b) 서열번호 41로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 42로 기재된 경쇄
가변영역;

(c) 서열번호 45로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 46으로 기재된 경쇄
가변영역;

(d) 서열번호 49로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 50으로 기재된 경쇄
가변영역; 또는

(e) 서열번호 53으로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 54로 기재된 경쇄

가변영역을 포함할 수 있다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은

서열번호 5, 6, 7, 및 8로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열을 기재된 중쇄 불변영역; 및

서열번호 10의 아미노산 서열로 기재된 경쇄 불변영역을 포함할 수 있다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 항OX40L 항체 또는 이의 결합 단편은,

상기 (a) 서열번호 37로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 38로 기재된 경쇄 가변영역; (b) 서열번호 41로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 42로 기재된 경쇄 가변영역; (c) 서열번호 45로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 46으로 기재된 경쇄 가변영역; (d) 서열번호 49로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 50으로 기재된 경쇄 가변영역; 또는 (e) 서열번호 53으로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 54로 기재된 경쇄 가변영역, 및

상기 서열번호 5, 6, 7, 및 8로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열을 기재된 중쇄 불변영역 및 서열번호 10의 아미노산 서열로 기재된 경쇄

불변영역

을 포함하는 항체 또는 이의 결합 단편일 수 있다.

이때, 상기 (a) 및 (b)의 가변영역을 포함하는 항체는 인간화 항체이고, 상기 (c) 내지 (d)의 가변영역을 포함하는 항체는 키메라 항체이다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인체에서 충분한 효과를 나타낼 수 있을 정도의 물리 화학적 성질을 가지며, 우수한 열안정성을 가진다. 예를 들면, 상기 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 50℃ 초과, 구체적으로는 59℃ 이상의 온도에서 용융되며, 인체 내에서 약 2주 이상의 반감기를 가질 수 있다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 항 OX40L 항체가 불변 영역을 포함하는 경우, IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 불변 영역을 포함할 수 있다.

본 명세서에서 용어, "조합(combination)"이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단백질 면역글로불린 불변 영역을 암호화하는 폴리펩타이드가 상이한 기원의 단백질 폴리펩타이드와 결합을 형성하는 것을 의미한다. 그 예로, IgG,

IgA, IgD, IgE 및 IgM의 불변 영역으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 불변 영역으로부터 이량체 또는 다량체를 형성할 수 있다.

본 명세서에서 용어, "하이브리드(hybrid)"란 단쇄 면역 글로불린 중쇄 불변 영역 내에 2개 이상의 상이한 기원의 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 해당하는 서열이 존재함을 의미하며, 그 예로 IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM의 CH1, CH2, CH3 및 CH4로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 도메인의 하이브리드가 가능하다.

한편, IgG의 아형인 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 중쇄 불변영역의 조합 또는 혼성화도 가능하다. 상기 조합 및 혼성화에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 IgG1 중쇄 불변영역은 서열번호 5로 기재된 IgG1 중쇄 불변 영역, IgG1 N297A 중쇄 불변영역은 서열번호 6으로 기재된 중쇄 불변영역, IgG4 중쇄 불변영역은 서열번호 7로 기재된 IgG4 중쇄 불변영역, IgG4 S228P 중쇄 불변영역은 서열번호 8로 기재된 IgG4 중쇄 불변영역일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

또한, 본 발명의 상기 OX40L에 특이적인 항OX40L 항체가 경쇄 불변영역을

포함하는 경우, 상기 경쇄 불변영역은 람다(λ) 또는 카파(κ) 경쇄 유래일 수 있다. 상기 항체의 경쇄 불변영역이 카파 경쇄 유래인 경우 서열번호 10으로 기재된 카파 경쇄 불변영역일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

본 발명에서 상기 항체는 마우스로부터 생산된 마우스 항체 및 이로부터 항체의 친화도, 면역성 등을 개선시키기 위해 모항체의 아미노산 서열에 일부를 치환, 부가 및/또는 결실시킨 변이체를 모두 포함할 수 있다. 상기 변이체는 이에 제한되지 않으나, 그 예로 키메라 항체, 인간화 항체, 친화도 최적화 항체 등을 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "친화도 최적화 항체"는 특정 항체의 CDR 서열의 일부가 치환, 부가, 결실된 변이체로서, 상기 특정 항체와 동일한 항원에 에피토프에 결합하면서도 항원에 대한 결합 친화도가 향상된 항체를 말한다.

본 발명에서 상기 변이체는 모항체와 동일한 CDR을 포함하거나, 혹은 동일한 에피토프를 표적으로 하는 조건으로 모항체 CDR 아미노산 서열의 일부가 변이 (치환, 부가 또는 결실)된 항체를 포괄적으로 지칭한다. 이러한 변이체는 동일한 에피토프에 대한 결합능이 유지되는 범위 내에서 항체의 친화도 및 면역성 등을 개선시키기 위하여 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.

본 발명의 항 OX40L 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 OX40L을 특이적으로 인식할 수 있는 범위 내에서, 본 명세서에 기재된 항 OX40L 항체의 서열뿐만 아니라, 이의 생물학적 균등물도 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체의 결합친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 보다 더 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에 추가적인 변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어, 항체의 아미노산서열 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 가지며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 본 명세서에서 서열번호로 기재된 아미노산 서열의 하나 이상의 잔기에

보존적 아미노산 변화를 포함할 수 있으며, 보존적 아미노산의 변화는 하기 표 1의 치환을 포함할 수 있다.

[표 1] 보존적 아미노산 치환

염기성:	아르기닌
	리신
	히스티딘
산성:	글루탐산
	아스파르트산
극성:	글루타민
	아스파라긴
소수성:	류신
	이소류신
	발린
방향족:	페닐알라닌
	트립토판
	티로신
소형:	글리신
	알라닌
	세린
	트레오닌
	메티오닌

본 발명의 실시예에 따르면, OX40L를 표적으로 하는 신규한 항체를 제작하였다. 인간 OX40L(hOX40L)로 번역한 마우스에서 제작한 라이브러리, 그리고 사람 라이브러리로부터 OX40L에 특이적인 항체 02C09, hu3F07, 10H07, 21G07를 제작하였다. 상기 항체들은 OX40L에 친화력이 0.2 ~ 0.7 nM 수준으로, 높은 친화력으로 OX40L에 특이적으로 결합하고(표 32, 도 4), in vitro OX40L 저해능이

0.2 ~ 0.9 nM로 대조 항체보다 현저히 우수한 것을 확인하였다(도 5). 또한, T 세포에서 OX40L에 의한 면역활성을 차단하는 결과를 나타내었다(도 6). 이러한 결과는 본 발명의 OX40L에 특이적인 항OX40L 항체가 OX40 수용체와의 결합을 효율적으로 차단하고, OX40/OX40L 신호전달을 억제하여, 자가면역질환 및 염증성 질환 치료에 현저히 우수한 효과를 나타낼 수 있고, 부작용을 최소화할 수 있으며, 면역체계의 항상성을 유지하면서 자가면역질환 및 염증성질환을 선택적으로 치료할 수 있음을 의미한다.

본 발명의 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 상기 OX40L의 기능을 억제하여 자가면역질환 또는 염증성질환의 치료에 효과적으로 이용될 수 있다.

인간의 면역체계는 선천성(innate) 면역체계와 후천성(adaptive) 면역체계 두가지로 이루어져 있고, 자가면역질환은 선천성(innate) 면역체계와 후천성(adaptive) 면역체계가 비정상적으로 활성화되었을 때 발생할 수 있다.

OX40L와 OX40 수용체가 결합하게 되면, 선천성 면역체계 및 후천성

면역체계에 관계되는 면역세포들이 과활성화가 되어 다양한 질환을 일으키는 것으로 알려져 있다.

상기 OX40L는 선천성 면역체계의 항원제시세포(Antigen Presenting Cell, APC)와 후천성 면역체계의 보조 T 세포(T helper cell)에 동시에 관여하여 면역체계의 항상성에 관여 할 수 있다(Nature Reviews Rheumatology vol. 12, 74-76(2016), (Clinic Rev Allerg Immunol, 2016). 또한, 상기 OX40L는 전신적으로 분포하는 사이토카인과는 달리 병변 위치에 집중적으로 분포하므로, 본 발명의 항 OX40L 항체 또는 이의 결합 단편은 병변 주변의 OX40L에 결합할 가능성이 높다.

따라서 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 병변 주변에 집중적으로 분포하는 OX40L에 결합하여 자가면역질환 및 염증성질환에 대한 치료효과를 극대화할 수 있고 부작용을 감소시켜 안전성을 향상시킬 수 있다.

또한, 후천성 면역체계는 선천성 면역체계보다 반응 속도는 느리나 지속성이 높아 면역체계의 과활성으로 일어나는 자가 면역 질환 치료에 주요한 요인이 될 수 있으며, 본 발명의 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 OX40L의 억제 또는 저해는 선천성 면역세포 뿐만 아니라, 기존의 자가 면역 치료제들이 영향을 미

치지 못한 후천성 면역세포를 조절할 수 있다는 점에서 큰 이점이 있다.

즉, OX40L와 OX40간의 상호작용을 효과적으로 억제 및 저해하는 본 발명은 OX40L에 특이적으로 결합하는 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 자가면역질환 및 염증성질환의 치료에 있어 효과적으로 사용할 수 있다.

본 발명은 상기 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산(폴리뉴클레오티드), 상기 핵산을 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체를 제공한다.

본 명세서에서 사용되는 용어, "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 DNA 및 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 상기 핵산 분자에서 기본 구성단위인 뉴클레오티드는 자연의 뉴클레오티드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다 (Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, NewYork(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, (1990) 90:543-584).

본 발명의 중쇄 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자의 서열은 변형될

수 있으며, 상기 변형은 뉴클레오타이드의 추가, 결실, 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.

본 발명의 핵산은 상기한 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 본 발명에서 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80 %의 상동성, 구체적으로 최소 90 %의 상동성, 보다 구체적으로는 최소 95 %의 상동성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 의미할 수 있다.

본 명세서에서 사용되는 용어, "벡터" 또는 "발현 벡터"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단으로 플라스미드 벡터; 코즈미드 벡터; 그리고 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터 같은 바이러스 벡터 등을 포함하며, 구체적으로 플라스미드 벡터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

본 발명의 벡터에서 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자 및 중쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자는 프로모터와 작동가능하게 연결 (operativelylinked)된 것일 수 있다.

본 발명에서 용어, "작동 가능하게 연결된"은 핵산 발현조절서열 (예컨대, 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.

본 발명의 재조합 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다. 예컨대, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 포함된다.

본 발명에서 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산(폴리뉴클레오티드)를 포함하는 발현 벡터는 특별히 제한되지 않으나, 포유류 세포(예를 들어, 사람, 원숭이, 토끼, 래트, 햄스터, 마우스 세포 등), 식물 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 박테리아 세포(예를 들어, 대장균 등)를 포함하는 진핵

또는 원핵세포에서 상기 핵산 복제 및/또는 발현할 수 있는 벡터가 될 수 있다. 구체적으로는 숙주세포에서 상기 핵산이 발현될 수 있도록 적절한 프로모터에 작동 가능 하도록 연결되며, 적어도 하나의 선별 마커를 포함하는 벡터가 될 수 있으며, 더욱 구체적으로는 파지, 플라스미드, 코스미드, 미니-염색체, 바이러스, 레트로바이러스 벡터 등에 상기 핵산이 도입된 형태가 될 수 있다.

상기 항 OX40L 항체를 코딩하는 핵산(폴리뉴클레오티드)를 포함하는 발현 벡터는 상기 항 OX40L 항체의 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 핵산을 각각 포함하는 발현 벡터 또는 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 핵산을 모두 포함하는 발현 벡터일 수 있다.

본 발명에서 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 발현 벡터가 도입되어 형질 전환된 대장균, 스트렙토미세스, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 효모 세포; 피치아 파스토리스 등의 균류세포; 드로조필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO(중국 햄스터 난소 세포, chinese hamster ovary cells), SP2/0(마우스 골수종), 인간 림프아구(human lymphoblastoid), COS, NS0(마우스 골수종), 293T, 보우 멜라노마

세포, HT-1080, BHK(베이비 햄스터 신장 세포, baby hamster kidney cells), HEK(인간 배아 신장 세포, human embryonic kidney cells), PERC.6(인간망막세포) 등의 동물 세포; 또는 식물 세포가 될 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, HEK 세포 등을 숙주세포로 이용하였다.

본 명세서에서 용어, "도입"은 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산(폴리뉴클레오티드)를 포함하는 벡터를 숙주세포에 전달하는 방법을 의미한다. 이와 같은 도입은 칼슘 포스페이트-DNA 공침전법, DEAE-덱스트란-매개 트랜스펙션법, 폴리브렌-매개 형질감염법, 전기충격법, 미세주사법, 리포솜 융합법, 리포펙타민 및 원형질체 융합법 등의 당 분야에 공지된 여러 방법에 의해 수행될 수 있다. 또한, 형질 도입은 감염(infection)을 수단으로 하여 바이러스입자를 사용하여 목적물을 세포 내로 전달시키는 것을 의미한다. 아울러, 유전자 맵바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주 세포 내로 도입할 수 있다. 본 발명에서 도입은 형질전환과 혼용되어 사용될 수 있다.

본 발명은 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하는 방법을

제공한다.

본 발명의 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 공지의 단일클론항체 제조기술로 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 단일클론항체를 제조하는 방법은 면역된 동물로부터 얻은 B 림프구를 사용하여 하이브리도마를 제조함으로써 수행될 수 있거나(Koeher and Milstein, 1976, Nature, 256:495), 파지 디스플레이(phage display) 기술을 이용함으로써 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

파지 디스플레이 기술을 이용한 항체 라이브러리는 하이브리도마를 제작하지 않고 바로 B 림프구로부터 항체유전자를 얻어 파지(phage) 표면에 항체를 발현시키는 방법이다. 파지 디스플레이 기술을 이용하면 B-세포불멸화(immortalization)에 의해 단일클론항체를 생성하는데 관련된 기존의 많은 어려움이 극복될 수 있다. 일반적으로 파지 디스플레이 기술은 1) 파지의 외피 단백질(coat protein) pIII (또는 pIV) N-말단에 해당하는 유전자 부위에 무작위 서열의 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)를 삽입하는 단계; 2) 천연형의 외피 단백질 일부와 상기 무작위 서열의 올리고뉴클레오타드에 의해 코딩되는

폴리펩티드의 융합 단백질을 발현시키는 단계; 3) 상기 올리고뉴클레오타이드에 의해 코딩된 폴리펩티드와 결합할 수 있는 수용체 물질을 처리하는 단계; 4) 수용체에 결합된 펩티드-파지 입자들을 낮은 pH나 결합 경쟁력 있는 분자를 이용하여 용출시키는 단계; 5) 패닝(panning)에 의하여 용출된 파지를 숙주 세포 내에서 증폭시키는 단계; 6) 원하는 양을 얻기 위해 상기 방법을 반복하는 단계; 및 7) 패닝에 의해 선별된 파지 클론들의 DNA 서열로부터 활성이 있는 펩티드의 서열을 결정하는 단계로 구성된다.

본 발명의 실시예들에서, 본 발명의 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조방법은 파지 디스플레이 기술을 이용하여 수행될 수 있다. 당업자는 공지된 파지 디스플레이 기술, 예를 들어 Barbas 등(METHODS: A Companion to Methods in Enzymology 2:119, 1991 및 J. Virol. 2001 Jul;75(14):6692-9) 및 Winter 등(Ann. Rev.Immunol. 12:433, 1994)의 논문 등에 공지된 방법을 참고하여 상기 본 발명의 제조방법의 각 단계를 용이하게 수행할 수 있다. 항체 라이브러리를 구축하기 위해 사용될 수 있는 파지는, 예를 들어 필라멘트성 파지(filamentous phage)로 fd, M13, f1, If1, Ike, Zj/Z, Ff, Xf, Pf1 또는 Pf3

과지가 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 필라멘트성 과지의 표면상에 이중 유전자의 발현을 위해 사용될 수 있는 벡터에는 예를 들어, fUSE5, fAFF1, fd-CAT1 또는 fdtetDOG 등의 과지 벡터 또는 pHEN1, pComb3, pComb8 또는 pSEX 등의 과지미드 벡터가 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 증폭을 위한 재조합 과지의 성공적인 재감염을 위해 요구되는 야생형 외피 단백질을 제공하기 위해 사용될 수 있는 헬퍼 과지에는, 예를 들어 M13K07 또는 VSCM13 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명의 과지 디스플레이 클론을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 통상적인 절차를 사용하여 쉽게 단리되고 서열분석될 수 있다. 그 예로, 하이브리도마 또는 과지 주형 DNA로부터 당해 중쇄 및 경쇄 코딩 영역을 특이적으로 증폭시키도록 디자인된 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용할 수 있다. 일단 상기 폴리뉴클레오티드가 단리되면, 이를 발현 벡터 내로 넣을 수 있고, 그 후 상기 발현 벡터를 적당한 숙주세포에 도입하여, 형질전환된 숙주세포(즉, 형질전환체)로부터 원하는 단일클론항체를 생산할 수 있다. 따라서 본 발명의 상기 인간 단일클론항체의 제조 방법은 인간 단일클론항체를 코딩하는

폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현백터를 증폭시키는 단계를 포함하는, 인간 단일클론항체의 제조방법일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

본 발명의 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 상기의 공지의 제조합 수단 또는 생화학적 방법에 의해 제조될 수 있으며, 항체는 적절한 숙주 세포에 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 백터를 도입한 형질전환체의 배양액으로부터 회수할 수 있다.

본 발명의 실시예들에 있어서, OX40L에 특이적으로 결합하는 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조(생산) 방법은,

(a) 상기 형질전환체를 배양하여 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 생산된 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 회수하는 단계를 포함하는, OX40L에 특이적으로 결합하는 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조방법일 수 있다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 공지의 분리 방법에 의해 분리할 수 있으며, 그 예로 단백질 A-세파로오스,

겔 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 통상적 면역 글로불린 정제 절차에 의해 배양 배지로부터 적절히 분리될 수 있으며, 이에 제한되지는 않는다.

본 발명은 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합단편; 및 종양 괴사 인자 α (TNF α)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 이중 특이성(bispecific) 항체를 제공한다.

본 명세서에서 용어, "이중 특이성 항체"란 서로 다른 두 종류의 항원(표적 단백질)에 결합할 수 있는 항체를 의미한다. 구체적으로는 자연적으로는 존재하지 않으며, 유전공학 또는 임의의 방법에 의해 제조된 형태일 수 있다.

본 발명의 상기 이중 특이성 항체는 서로 다른 두 개의 표적에 결합할 수 있는 항체로 상기 이중 특이성 항체는 OX40L 및 TNF α 에 결합할 수 있다.

본 발명의 "이중 특이성 항체"는 "이중 표적 단백질", "이중 항체" 또는 "이중 항체 단백질"과 혼용될 수 있다.

본 발명의 이중 특이성 항체의 구성요소인 OX40L에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 결합 단편은 OX40L에 특이적으로 결합하여 OX40L/OX40L 신호경로를

차단할 수 있는 항체 또는 이의 결합 단편을 포함한다. 본 발명의 실시예들에서, 본 발명의 이중 특이성 항체의 구성요소인 OX40L에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 결합 단편은 상기에서 OX40L에 특이적으로 결합하는 항 OX40L 항체 또는 이의 결합 단편에서 설명한 것과, 서로 모순되지 않는 한, 실질적으로 동일한 본 발명의 항 OX40L 항체 또는 이의 결합 단편일 수 있다. 또한, 본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 이중 특이성 항체의 구성요소인 OX40L에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 결합 단편은 OX40L에 특이적으로 결합하여 OX40L/OX40L 신호경로를 차단할 수 있는 항체로서, WO 2018083248, WO 2009141239, US 2017260279, WO 2006029879, 또는 WO 2011073180에 기재된 항체 또는 이의 결합 단편일 수 있다.

본 발명의 이중 특이성 항체의 구성요소인 OX40L에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 결합 단편은 면역세포에서 과발현되는 OX40L에 특이적으로 결합하여, 본 발명의 이중 특이성 항체를 TNF α 를 발현하는 면역세포로 집중시킬 수 있을 뿐만 아니라, TNF α 와 결합하여 그 자체로도 면역세포 활성을 줄일 수 있는 능력을 가질 수 있다.

또한, OX40L는 APC에서 과발현되고, T 세포에 발현되는 OX40 수용체와

상호작용하여 면역세포의 증식/분화/활성화를 유도하여 다양한 염증성 사이토카인을 분비하도록 유도하는, 선천성 면역과 후천성 면역을 동시에 활성화시키는 상위 신호 중 하나이다. 항-OX40 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 OX40/OX40L 신호를 저해하여, 자가면역질환 및 염증성질환 환자에서 과도하게 활성화되어 있는 면역반응을 감소시킬 수 있다.

또한, 항-TNF α 항체 또는 이의 결합 단편은 염증반응의 하위 신호인 TNF α 에 대한 치료에 저항성을 보이는 자가면역질환 및 염증성 질환 환자에게도 효과를 나타낼 수 있다.

본 명세서에서 용어, “OX40에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 이중 특이성 항체”는 OX40L 및 TNF α 에 의한 두 가지 신호 전달 경로를 동시에 억제할 수 있는 이중 특이성 단백질이라면 제한없이 포함할 수 있다. 상기 이중 특이성 항체를 구성하는 TNF α 에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 OX40L에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 상기 항 OX40L 항체 또는 이의 결합 단편에서 설명한 전장 항체 및 항체 단편의 형태를

모두 포함할 수 있다.

본 발명에서 용어, "OX40L와 OX40간의 상호작용을 저해"는 본 발명의 OX40L에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체가 OX40L에 결합하여 OX40L와 OX40간의 상호작용을 저해시키는 것을 의미하며, 이중 특이성 항체의 결합에 의해 OX40L와 OX40간의 상호작용이 저해되며, OX40L의 OX40결합에 의한 OX40의 구조적 변화를 가져오지 못하여 가수분해 될 수 없어 OX40의 신호전달을 가져올 수 없게 한다.

본 명세서의 용어 "TNF α 에 특이적으로 결합하는 항체"는 체내에서 광범위하게 TNF α 를 항원으로 하여 이에 특이적으로 결합하는 항체이면 모두 포함한다. 본 발명의 일 실시예들에서, 상기 TNF α 에 특이적으로 결합하는 항체는 TNF α 를 표적으로 하는 치료용 항체로서 WO 1997029131, WO 2003045400, WO 2004050683, WO 1998011917, EP 1097945, WO 2001037874, US 2006024310, WO 2006125229, WO 2007056540, WO 1994006476, WO 2000059530 또는 WO 2001000229에 기재된 항체 또는 이의 결합 단편일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 일 실시예들에서, 상기 TNF α 에 특이적으로 결합하는 항체는 미국 FDA및 유럽

EMA등에 승인을 받은 것으로 안정적으로 사용할 수 있는 치료용 항체인 adalimumab(상품명 Humira, abbvie)일 수 있으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다. 이와 같은 TNF α 에 특이적으로 결합하는 항체는 상기 기술한 전장 항체 또는 항체 단편의 형태를 모두 포함하며, IgG 항체 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

TNF α 는 면역세포를 조절하는 사이토카인으로써, 체내 발열원으로 작용하여 열이 나게 하여 세포 사멸을 유도하고, 염증성 사이토카인을 생성해 자가 면역질환 및 염증성 질환을 일으킨다. TNF α 는 주로 활성화된 대식세포에서 분비되는데 이 외의 다양한 면역세포인 신경세포에서도 분비된다. TNF α 의 가장 중요한 역할은 면역세포 조절이다. 과도하게 발현된 TNF α 를 억제하면 자가 면역 질환 및 염증성 질환을 억제할 수 있다.

상기 이중 특이성 항체는 TNF α 와 결합하여 인간 TNF α 와 TNF α 수용체(TNF α Receptor, TNF α Rc) 간의 상호작용을 억제 또는 저해시키며, 구체적으로는 상기 이중 특이성 항체의 구성요소인 TNF α 에 특이적인 이중 특이성 항체가 TNF α 에 결합하여 TNF α 와 TNF α 수용체와의 상호 작용을 억제 또는

저해시키는 것을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

본 발명의 목적상 상기 TNF α 수용체는 포유류의 TNF α 에 결합하는 단백질이라면 제한없이 포함될 수 있으나, 구체적으로는 인간 TNF α 에 결합하는 단백질을 의미할 수 있다.

본 발명의 TNF α 에 특이적인 이중 특이성 항체 또는 이의 결합 단편에 의한 TNF α 와 TNF α 수용체 간의 상호작용 저해를 통하여 TNF α 의 TNF α 수용체 결합에 의한 TNF α /TNF α 수용체 신호전달을 억제하게 된다. 면역체계에서 TNF α 와 TNF α 수용체가 결합하게 되면, 면역세포에서 TNF α /TNF α 수용체 신호전달이 활성화되고, 이는 OX40L/OX40 신호 전달 경로의 작용 기전과 다른 기전으로 면역세포 분화 등을 조절하며, 각종 자가 면역 질환의 치료제로 사용되고 있다.

따라서, 본 발명의 상기 OX40L와 TNF α 에 특이적인 이중 특이성 항체는 서로 다른 기전으로 과활성화된 면역세포를 억제하는 능력을 보여주어 보다 뛰어난 자가 면역 질환 및 염증성 질환의 치료 능력을 가진 치료제로서 사용될 수 있다.

따라서, OX40L/OX40 신호전달과 TNF α /TNF α 수용체 신호전달을 효과적으로 억제하는 본 발명의 상기 OX40 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체

또는 이의 항원 결합 단편은 자가면역질환 및 염증성질환을 효과적으로 치료할 수 있으며, 부작용을 최소화하면서 치료 효과를 최대화할 수 있다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 TNF α 에 특이적으로 결합하는 항 TNF α 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

서열번호 89로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 90으로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 91로 기재된 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및

서열번호 92로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 93으로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 94로 기재된 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 TNF α 에 특이적으로 결합하는 항 TNF α 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 서열번호 35의 아미노산 서열로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 36의 아미노산 서열로 기재된 경쇄 가변영역을 포함할 수 있으며, 구체적으로 상기 Humira의 가변영역을 포함할 수 있다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 이중 특이성 항체의 형태는 특별히 이에 제한되지 않으나, IgG 형태의 항체에 결합 단편이 링커로 연결된 이중 특이성

항체를 제공한다. 구체적으로 본 발명의 상기 이중 특이성 항체는 OX40L에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 링커로 연결될 수 있다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 링커는 서열번호 31 또는 서열번호 32의 서열로 기재된 펩타이드 또는 비펩타이드일 수 있다.

본 명세서의 용어, "링커(linker)"란 기본적으로는 두개의 서로 다른 융합 파트너 (예를 들어, 생물학적 고분자 등)를 수소 결합, 정전기적 상호작용, 반데르발스력, 이황화 결합, 염 브릿지, 소수성 상호작용, 공유결합 등을 이용하여 연결할 수 있는 연결체를 의미하는데, 구체적으로는 생리학적 조건 또는 다른 표준 펩타이드 조건(예를 들면, 펩타이드 정제 조건, 펩타이드 저장 조건)하에서 적어도 하나의 이황화 결합에 참여할 수 있는 적어도 하나의 시스테인을 가질 수 있으며, 단순히 각각의 융합 파트너를 연결하는 역할 이외에도, 융합파트너 사이에 일정한 크기의 간격을 부여하는 역할을 수행하거나 또는 융합체에 유연성 또는 강직성을 제공하는 힌지(hinge)의 역할을 수행할 수 있다. 상기 링커는 비펩타이드 링커 또는 펩타이드 링커일 수 있으며, 펩티드 결합, 이황화 결합 등에 의해서 직접

연결되는 것도 모두 포함될 수 있다.

본 발명에서 상기 링커는 특별히 이에 제한되지는 않으나, 구체적으로는 OX40L에 특이적으로 결합하는 항체 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 항체를 연결할 수 있는 폴리펩티드가 될 수 있고, 더욱 구체적으로는 상기 OX40L에 특이적으로 결합하는 항체의 Fc 영역의 C-말단 혹은 경쇄 영역의 C-말단과 TNF α 에 특이적으로 결합하는 항체를 연결할 수 있는 펩타이드 링커가 될 수 있으며, 더욱 더 구체적으로는 GGGGS 모티프가 반복된 형태의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드 링커가 될 수 있다. 상기 GGGGS 모티프는 1~10번 반복될 수 있으며, 가장 구체적으로는 상기 GGGGS 모티프가 3번 반복된 서열번호 31의 아미노산 서열 또는 상기 GGGGS 모티프가 4번 반복된 서열번호 32의 아미노산 서열로 구성될 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니며, 당해 업계에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 도출할 수 있는 범위 내에서 다양한 링커가 사용될 수 있다.

본 발명에서 용어, "비펩타이드 링커"는 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체 적합성 링커를 의미하며, 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합이 아닌 임의의 공유 결합을 통해 서로 연결될 수 있다.

본 발명의 비펩타이드 링커는 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol; PEG) 단독 중합체, 폴리프로필렌 글리콜 단독 중합체, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐 에틸 에테르과 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 또는 이들의 조합일 수 있다. 구체적으로는 폴리에틸렌 글리콜 단독 중합체일 수 있으며, 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함될 수 있다.

더욱 구체적으로는 분자량 1 내지 5kDa의 분자량인 폴리에틸렌 글리콜 단독 중합체일 수 있으며, 가장 구체적으로는 3.4kDa 정도의 양 말단에 양기능성 알데히드(bifunctional aldehyde) 형태로 0X40L에 특이적으로 결합하는 항체 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 항체를 연결시킬 수 있는 링커일 수 있다. 특히, 양 말단에 반응 알데히드 그룹의 반응기를 갖는 경우, 비특이적 반응을 최소화하는 데 효과적이다.

상기 링커를 통하여 직접 또는 간접적으로 연결되는 부위는 특별히 이에 제한되지 않으나, Fc 부분, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv 등이 될 수 있다. 상기 이중

특이성 항체는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 OX40L에 특이적으로 결합하는 항체 전체 또는 일부(단편) 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 항체 전체 또는 일부(단편)가 연결된 형태일 수 있다.

또한, OX40L에 특이적으로 결합하는 단백질 전체 또는 일부 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 전체 또는 일부가 펩타이드 링커로 연결된 형태; OX40L에 특이적으로 결합하는 단백질 전체 또는 일부 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 전체 또는 일부가 펩타이드 링커로 연결된 형태; 또는 이들의 조합이 될 수 있다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 이중 특이성 항체는 면역글로불린(Immunoglobulin G, IgG) 형태의 OX40L에 특이적으로 결합하는 항체 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 전장 항체, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG 또는 scFv 형태의 항체가 링커로 연결된 형태일 수 있다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 면역글로불린(Immunoglobulin G, IgG) 형태의 TNF α 에 특이적으로 결합하는 항체 및 OX40L에 특이적으로 결합하는 전장 항체, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG 또는 scFv 형태의 항체가 링커로 연결된 형태일

수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

본 발명에서 용어, "결합 단편"은 항원 결합능력을 가지는 단편, 예를 들면, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG 및 scFv를 포함하는, 항체의 항원 결합 형태를 포함한다. 특히, 상기 용어는 scFv(single-chain variable fragment)를 포함하고, 이가(bivalent) 또는 디아바디(Diabody), 트리아바디(Triabody) 및 테트라바디(Tetrabody)를 포함한다.

본 발명에서 용어, "scFv(single-chain variable fragment)"는 완전한 항원-인식 및 항원-결합 부위를 갖는 최소 항체 단편을 의미하며, 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하고, 여기서 상기 도메인들은 단일 폴리펩티드 사슬에 존재할 수 있다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 이중 특이성 항체는 항 OX40L 항체의 경쇄 및 중쇄 중 적어도 하나의 말단에 TNF α 에 특이적으로 결합하는 항 TNF α 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 연결된 것일 수 있다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 이중 특이성 항체는 상기 항 OX40L 항체의 경쇄 및 중쇄 중 적어도 하나의 C 말단에 상기 항 TNF α 항체 또는 이의

항원 결합 단편이 연결된 것일 수 있다. 구체적으로 상기 이중 특이성 항체는 상기 항 OX40L 항체의 경쇄 및 중쇄 중 적어도 하나의 C 말단에 상기 항 TNF α 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 링커를 통해 연결될 수 있다. 예를 들면, 상기 이중 특이성 항체는 상기 항 OX40L 항체의 경쇄 및 중쇄 중 적어도 하나의 C 말단에 상기 항 TNF α 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 서열번호 31 또는 서열번호 32로 기재된 아미노산 서열을 갖는 링커를 통해 연결될 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 이중성 특이성 항체는 항 TNF α 항체의 경쇄 및 중쇄 중 적어도 하나의 말단에 OX40L에 특이적으로 결합하는 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 연결된 것일 수 있다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 이중성 특이성 항체는 상기 항 TNF α 항체의 경쇄 및 중쇄 중 적어도 하나의 C 말단에 상기 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 연결된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 이중 특이성 항체는 상기 항 TNF α 항체의 경쇄 및 중쇄 중 적어도 하나의 C 말단에 상기 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 링커로 연결된 것일 수 있다. 예를 들면, 상기

항 TNF α 항체의 경쇄 및 중쇄 중 적어도 하나의 C 말단에 상기 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 서열번호 31로 기재된 아미노산 서열을 갖는 링커를 통해 연결될 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 이중성 특이성 항체는 OX40L에 특이적으로 결합하는 항 OX40L 항체의 결합 단편과 항 TNF α 항체의 결합 단편이 링커를 통해 연결된 것일 수 있다. 상기 링커는 서열번호 31 또는 서열번호 32로 기재된 아미노산 서열을 갖는 링커일 수 있다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 이중 특이성 항체는:

a) 서열번호 12, 13 및 14으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 15, 16, 17 및 18로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 19, 20, 21 및 22 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 중쇄 CDR3;을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 23 및 24로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 25 및 26으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 경쇄 CDR2; 및

서열번호 27, 28, 29 및 30으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 경쇄 CDR3;을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는, OX40L에 특이적으로 결합하는 항 OX40L 항체 또는 이의 결합 단편과

b) 서열번호 89로 기재된 아미노산 서열의 중쇄 CDR1; 서열번호 90으로 기재된 아미노산 서열의 중쇄 CDR2; 및 서열번호 91로 기재된 아미노산 서열의 중쇄 CDR3;을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 92로 기재된 아미노산 서열의 경쇄 CDR1; 서열번호 93으로 기재된 아미노산 서열의 경쇄 CDR2; 및 서열번호 94로 기재된 아미노산 서열의 경쇄 CDR3;을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는, TNF α 에 특이적으로 결합하는 항TNF α 항체 또는 이의 결합 단편이,

링커를 통해 연결된 것일 수 있다.

상기 링커는 서열번호 31 또는 서열번호 32 로 기재된 아미노산 서열을 갖는 링커일 수 있다.

본 발명의 실시예들에서, 상기 이중 특이성 항체는:

a) (i) 서열번호 12로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 15로 기재된 중쇄 CDR2 및 서열번호 19로 기재된 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호

23으로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 25로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 27로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항 OX40L 항체 또는 이의 결합 단편;

(ii) 서열번호 13으로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 16으로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 20으로 기재된 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 24로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 26으로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 28로 기재된 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편;

(iii) 서열번호 13으로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 17로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 21로 기재된 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 24로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 26으로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 29로 기재된 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 또는

(iv) 서열번호 14로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 18로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 22로 기재된 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및

서열번호 24로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 26으로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 30으로 기재된 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편과,

b) 서열번호 89로 기재된 아미노산 서열의 중쇄 CDR1; 서열번호 90으로 기재된 아미노산 서열의 중쇄 CDR2; 및 서열번호 91로 기재된 아미노산 서열의 중쇄 CDR3;을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 92로 기재된 아미노산 서열의 경쇄 CDR1; 서열번호 93으로 기재된 아미노산 서열의 경쇄 CDR2; 및 서열번호 94로 기재된 아미노산 서열의 경쇄 CDR3;을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는, TNF α 에 특이적으로 결합하는 항TNF α 항체 또는 이의 결합 단편이,

링커를 통해 연결된 것일 수 있다.

상기 링커는 서열번호 31 또는 서열번호 32 로 기재된 아미노산 서열을 갖는 링커일 수 있다.

본 발명의 실시예들에서, 상기 이중 특이성 항체는:

a) 서열번호 33, 37, 41, 45, 49 및 53으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 중쇄 가변영역; 및 서열번호 34, 38, 42, 46, 50 및

54로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 경쇄 가변영역;을 항OX40L 항체 또는 이의 결합 단편과,

b) 서열번호 35로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 36으로 기재된 경쇄 가변영역을 포함하는 항TNF α 항체 또는 이의 항원 결합 단편이,

링커를 통해 연결된 것일 수 있다.

상기 링커는 서열번호 31 또는 서열번호 32 로 기재된 아미노산 서열을 갖는 링커일 수 있다.

본 발명의 실시예들에서, 상기 이중 특이성 항체는:

a) (a) 서열번호 37로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 38로 기재된 경쇄 가변영역; (b) 서열번호 41로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 42로 기재된 경쇄 가변영역; (c) 서열번호 45로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 46으로 기재된 경쇄 가변영역; (d) 서열번호 49로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 50으로 기재된 경쇄 가변영역; (e) 서열번호 53으로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 54로 기재된 경쇄 가변영역; 또는 (f) 서열번호 33으로 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 서열번호 34로 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄

가변영역;을 포함하는 항OX40L 항체 또는 이의 결합 단편과,

b) 서열번호 35로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 36으로 기재된 경쇄

가변영역을 포함하는 항TNF α 항체 또는 이의 항원 결합 단편이,

링커를 통해 연결된 것일 수 있다.

상기 링커는 서열번호 31 또는 서열번호 32 로 기재된 아미노산 서열을 갖는 링커일 수 있다.

예를 들면, 상기 이중 특이성 항체의 구조는 도 1에 도시된 것과 같은 형태의 구조를 가질 수 있다.

다른 예로, 상기 이중 특이성 항체는 항 OX40L 항체의 항원 결합 단편과 항 TNF α 항체의 항원 결합 단편이 연결된 구조를 가질 수 있다.

본 발명의 이중 특이성 항체가 불변영역을 포함하는 경우, 상기 이중 특이성 항체는 구체적으로 서열번호 5, 6, 7 및 8로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 중쇄 불변영역; 및 서열번호 10의 아미노산 서열로 기재된 경쇄 불변영역의 전부 또는 이의 일부를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 이중 특이성 항체가 불변영역을 포함하는 경우는 상기 이중

특이성 항체를 구성하는 OX40L에 특이적으로 결합하는 항 OX40L 항체 또는 이의 결합단편 또는 TNF α 에 특이적으로 결합하는 항TNF α 항체 또는 이의 결합 단편이 불변영역의 전부 또는 일부를 포함하는 경우를 의미한다.

본 발명의 이중 특이성 항체는 인체에서 충분한 효과를 나타낼 수 있을 정도의 물리 화학적 성질을 가지며, 우수한 열안정성을 가진다. 예를 들면, 상기 이중 특이성 항체는 50℃ 초과, 구체적으로는 59℃ 이상의 온도에서 용융되며, 그 결합을 장기간 유지할 수 있으며, 인체 내에서 약 2주 이상의 반감기를 가질 수 있다.

즉, 본 발명에 따른 TNF α 에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 OX40L에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 이중 특이성 항체는 인간 유래 TNF α 와 OX40L에 대해서 강한 친화력을 나타내며, OX40L를 발현하고 있는 세포(예-면역세포)가 OX40에 결합하는 것을 효과적으로 저해할 뿐 아니라, TNF α 가 TNF수용체에 결합하여 염증성 반응을 억제하여, 자가 면역 질환과 같은 질병의 치료에 있어 보다 현저한 치료 효과를

나타낼 수 있다.

본 발명의 이중 특이성 항체에서 TNF α 에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 OX40L에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 각각의 특이적인 결합을 유지하며, 특히 각각의 표적에 대한 친화도 저하 없이 두 개의 표적(항원)을 동시에 억제시킬 수 있기 때문에, 동시에 두 개의 신호를 억제하여 하나의 표적과 결합하여 억제하는 것보다 더욱 효과적일 수 있다.

본 발명의 실시예들에서, 본 발명의 이중 특이성 항체를 코딩하는 핵산(폴리뉴클레오티드)을 벡터에 삽입하고, 이를 동물세포에 도입하여 OX40L-TNF α 결합 이중 특이성 항체를 발현 및 분리하여, OX40L와 TNF α 에 특이적으로 결합하는 OX40L-TNF α 이중 특이성 항체를 제작하였다.

상기 이중 특이성 항체 분자는 OX40L IgG 항체 분자와 TNF α 결합 scFv를 링커로 연결한 구조 또는 TNF α IgG 항체 분자와 OX40L 결합 scFv를 링커로 연결한 구조를 가지고 있다(도 1). 상기 동물 세포에 도입·발현한 OX40L-TNF α 결합 이중 특이성 항체를 분리하여 SDS-PAGE 법으로 발현 및 순도를 확인하였다(도 2).

또한, OX40L와 TNF α 에 대한 이중 특이성 항체의 OX40L와 TNF α 에 대한

결합능 어세이(Binding assay)를 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 통하여 분석한 결과, OX40L-TNF α 결합 이중 특이성 항체가 이중 특이성 항체의 표적인 OX40L 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다(표 32).

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 이중 특이성 항체는 인간 OX40L에 3×10^{-9} M 이하로 결합할 수 있다. 구체적으로, 상기 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 1.5×10^{-9} M, 1.3×10^{-9} M, 또는 1×10^{-9} M 이하의 K_D 로 결합하며, 인간 TNF α 에 대해서는 1×10^{-9} M 이하의 K_D 로 결합할 수 있다. 구체적으로, 이중 특이성 항체의 항원인 OX40L와 TNF α 에 대한 평형해리상수(equilibrium dissociation constant, K_D) 값을 비아코어(Biacore) 분석 방법을 통해 측정한 결과 상기 이중 특이성 항체는 인간 OX40L에 대해서는 0.4 ~ 0.5 nM의 K_D 값을 인간 TNF α 에 대해서는 0.2 ~ 0.5 nM의 K_D 값을 나타내는 것을 확인하였다(표 32, 도 4). 또한, in vitro OX40L 저해능이 0.2 ~ 1.3 nM로 대조 항체보다 현저히 우수하고, in vitro TNF α 저해능도 0.05 ~ 0.07 nM로 우수한 것을 확인하였다(표 35, 도 5). 또한, T 세포에서 면역활성을 차단하는 결과를 나타내었다(도 6).

따라서 본 발명의 이중 특이성 항체는 각 항원에 대한 결합력을

유지하면서 OX40L와 TNF α 에 동시에 결합하여 상기 표적과 관련된 질환을 효과적으로 치료할 수 있다.

또한, 본 발명의 이중 특이성 항체는 OX40L와 TNF α 를 동시에 결합할 수 있는 in vitro blockade assay 실험을 통해 면역세포의 OX40L와 인간 OX40와의 결합 및 TNF α 와 TNF α 수용체와의 결합에 의한 각각의 신호 전달 경로가 이중 특이성 항체 처리에 의해 효과적으로 억제됨을 확인하였다(표 35 및 도 5). 이러한 결과는 본 발명의 OX40L와 TNF α 에 특이적인 이중 특이성 항체가 각각의 수용체인 OX40 및 TNF α 수용체와의 결합을 효율적으로 차단하여 과활성된 면역체계를 진정시키는 효과를 나타낼 수 있으며, OX40L와 TNF α 를 동시에 결합하여 상기 표적과 관련된 질환을 효과적으로 치료할 수 있다.

본 발명은 상기 OX40L 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체를 코딩하는 핵산(폴리뉴클레오티드), 상기 핵산(폴리뉴클레오티드)을 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체를 제공한다.

본 발명에서 상기 OX40L 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성

항체와 관련된 핵산(폴리뉴클레오티드), 발현 벡터, 형질전환체, 도입에 대해서는 모순되지 않는 한 앞서 설명한 바와 같다.

본 발명은 OX40L 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체를 제조하는 방법을 제공한다.

구체적으로는 상기 제조 방법은 (a) 상기 OX40L 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체를 코딩하는 핵산(폴리뉴클레오티드)을 포함하는 발현 벡터가 도입된 형질전환체를 배양하여 이중 특이성 항체를 생산하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 생산된 이중 특이성 항체를 회수하는 단계를 포함하는, OX40L과 TNF α 에 이중 특이적으로 결합하는 항체를 포함할 수 있다.

본 발명의 상기 OX40L 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체를 제조 방법은 모순되지 않은 한 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 기재된 제조방법이 실질적으로 동일하게 적용될 수 있다.

본 발명은 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 상기 OX40L 및

TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체를 포함하는 자가 면역 질환 또는 염증성질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.

본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 향산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

상기 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 상기 OX40L 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체는 OX40L에 결합하여 OX40

수용체와의 결합을 저해함으로써 과활성화된 면역세포 억제에 관여할 수 있다.

상기 OX40L/OX40 수용체에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

나아가 상기 이중 특이성 항체는 OX40L에 더하여 TNF α 에 결합하여, TNF α 와 TNF α 수용체 간의 상호작용 저해를 통하여 이는 OX40L/OX40 신호 전달 경로의 작용 기전과 다른 기전으로 면역세포 분화 등을 조절하며, 각종 자가 면역 질환의 억제에 관여할 수 있다.

따라서 본 발명의 상기 약학적 조성물은 자가면역질환 또는 염증성질환을 현저히 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있으며, 부작용을 최소화할 수 있고 안전성을 높일 수 있다.

본 발명에서 자가면역질환 또는 염증성질환은 류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis)을 포함할 수 있다. 류마티스 관절염은 염증성질환이자 자가면역질환으로 분류될 수 있는 질병으로서, 본 발명에서 용어 “자가면역질환”, “염증성 질환” 또는 “자가면역질환 및 염증성질환”은 류마티스 관절염을 포함한다.

본 명세서에서 용어, “예방”은 질병의 발병을 억제하거나 발병을

지연시키는 것을 의미하며, 질병이 치료된 대상체에서 상기 질병이 다시 발병하는 것을 억제 또는 지연시키는 것을 의미한다.

본 발명에서 용어, "치료"란 조성물의 투여에 의해 자가 면역 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미할 수 있다.

본 발명은 상기 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 상기 OX40L 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체를 이용하여 자가 면역 질환 또는 염증성 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

본 발명은 상기 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 상기 OX40L 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체를 포함하는 약학적 조성물을 이용하여 자가 면역 질환 또는 염증성 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

상기 자가 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법은 상기 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 상기 OX40L 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체를 개체에 투여하는 단계를 포함한다.

상기 자가 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법은 상기 항-

OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 상기 OX40L 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체를 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함한다.

상기 개체는 자가면역질환 또는 염증성질환이 발병되거나 발병 의심이 있는 개체일 수 있고, 구체적으로, 소, 돼지, 양, 닭, 개, 인간 등을 포함하는 포유 동물, 조류 등을 포함할 수 있으며, 특별히 이에 제한되지 않을 수 있다.

상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에

여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

상기 본 발명의 상기 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 상기 OX40L 및 $\text{TNF } \alpha$ 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체 또는 상기 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 용어, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령,

성별, 암의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 결정될 수 있다.

이때, 상기 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 이때, 조성물은 액제, 산제, 에어로졸, 캡슐제, 장용피 정제 또는 캡슐제 또는 좌제의 형태로 투여할 수 있다. 투여 경로는 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 내 투여, 내피 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 그러나 경구 투여시, 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다. 또한, 제약 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

또한, 본 발명은 자가면역질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약제의 제조에서 상기 항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이중 특이성 항체의 용도를 제공한다.

본 발명은 자가면역질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약제의 제조에서 상기 항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이중 특이성 항체를 포함하는 약학적 조성물의 용도를 제공한다.

본 발명은 자가면역질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료를 위한 상기 항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이중 특이성 항체의 용도를 제공한다.

본 발명은 자가면역질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료를 위한 상기 항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이중 특이성 항체를 포함하는 약학적 조성물의 용도를 제공한다.

상기 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 상기 OX40L 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체, 약학적 조성물, 자가 면역 질환, 염증성질환, 예방, 또는 치료에 대해서는 모순되지 않는 한 앞서 설명한 바와 같다.

본 발명은 상기 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 상기 OX40L 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체를 포함하고, 자가면역질환 또는 염증성질환이 의심되는 개체의 분리된 생물학적 시료의 OX40L 단백질을 항원-항체 반응을 통하여 검출하는, 진단용 조성물을 제공한다.

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 진단용 조성물은 자가면역질환 또는 염증성질환의 발병 여부를 진단할 수 있다.

상기 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 상기 OX40L 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체, 자가면역질환 및 염증성질환은 모순되지 않는 한 앞서 설명한 바와 같다.

본 발명에서 용어, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 자가면역질환 또는 염증성질환의 발병 여부를 확인하는 것이다.

본 발명의 상기 자가 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법은 상기 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 상기 진단용 조성물은

본 발명의 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 상기 OX40L 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체를 이용하여 자가면역질환 또는 염증성질환이 의심되는 개체의 분리된 시료의 OX40L 단백질의 수준을 측정하여, 측정된 OX40L 단백질의 수준을 정상 및/또는 환자 대조군 시료와 비교하여 자가면역질환 또는 염증성질환을 판단하는데 사용될 수 있다.

이를 위한 단백질의 수준을 측정하는 방법으로는 웨스턴 블롯(Western blot), ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay), 방사선면역분석(α : badioimmunoassay), 방사 면역 산법(badioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony)면역 확산법, 로켓(rocket)면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩(protein Chip) 등이 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다. 상기와 같은 분석 방법들을 통하여 정상 대조군과 자가면역질환 의심 개체에서의 OX40L 단백질 수준을 비교할 수 있으며, 이를 통해 의심 환자에서의 자가면역질환 발병 여부에 대해 진단할 수 있게 된다.

본 발명의 자가면역질환 또는 염증성 질환의 진단용 조성물은 본 발명의

항체 외에 상기 단백질의 수준을 측정하는 방법을 수행하기 위해 필요한 것으로 당업계에 알려진 것을 제한없이 추가로 포함할 수 있다.

본 발명의 진단용 조성물이 상기 OX40L 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체를 포함하는 경우, 상기 진단용 조성물은 자가면역질환 또는 염증성질환이 의심되는 개체의 분리된 생물학적 시료의 TNF α 단백질을 항원-항체 반응을 통해 검출하는 조성물일 수 있다. 구체적으로, 상기 OX40L 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체를 포함하는 경우, 상기 진단용 조성물은 자가면역질환 또는 염증성질환이 의심되는 개체의 분리된 생물학적 시료의 OX40L 단백질 및 TNF α 단백질 중 적어도 하나를 항원-항체 반응을 통해 검출하는 조성물일 수 있다.

상기 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 상기 OX40L 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체 또는 상기 진단용 조성물은 자가면역질환 또는 염증성질환이 의심되는 개체의 분리된 시료의 OX40L 단백질 및 TNF α 단백질 중 적어도 하나의 수준을 측정하여 자가면역질환 또는 염증성질환으로 판단하는데 사용될 수 있다.

상기 단백질의 수준을 측정하는 방법은 모순되지 않는 한 앞서 설명한 바와 같다.

본 발명은 항-OX40 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 상기 OX40 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체 또는 이를 진단용 조성물을 이용한 자가면역질환 또는 염증성질환의 진단 방법 또는 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다. 구체적으로 본 발명은 (a) 상기 항-OX40 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 상기 OX40 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체를 이용하여 자가면역질환 또는 염증성질환이 의심되는 개체의 분리된 시료의 OX40 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 측정된 OX40 단백질의 수준을 이용하여 자가면역질환 또는 염증성질환을 판단하는 단계를 포함하는, 자가면역질환 또는 염증성질환의 진단 방법 또는 자가면역질환 또는 염증성질환의 진단을 위한 정보의 제공방법을 제공한다.

예를 들어, 측정된 OX40 단백질의 수준을 이용하여 자가면역질환 또는 염증성질환을 판단하는 단계는 상기 측정된 OX40의 단백질 수준을 일반적인 정상

및/또는 환자 단백질 수준과 비교하여 수행할 수 있다.

본 발명은 (a) 상기 OX40L 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체를 이용하여 자가면역질환이 의심되는 개체의 분리된 시료의 OX40L 단백질 및 TNF α 단백질 중 적어도 하나의 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 측정된 OX40L 단백질 및 TNF α 단백질 중 적어도 하나의 단백질 수준을 이용하여 자가면역질환 또는 염증성질환을 판단하는 단계를 포함하는, 자가면역질환 또는 염증성질환의 진단 방법 또는 자가면역질환 또는 염증성질환의 진단을 위한 정보의 제공방법을 제공한다.

예를 들어, 측정된 OX40L 단백질 및 TNF α 단백질 중 적어도 하나의 단백질 수준을 이용하여 자가면역질환 또는 염증성질환을 판단하는 단계는 상기 측정된 OX40L 단백질 및 TNF α 단백질 중 적어도 하나의 단백질 수준을 일반적인 정상 및/또는 환자의 OX40L 단백질 및 TNF α 단백질 중 적어도 하나의 단백질 수준과 비교하여 수행할 수 있다.

본 발명은 상기 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 상기 OX40L 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체를 포함하는,

자가면역질환 또는 염증성질환의 진단을 위한 정보를 제공하기 위한 키트를 제공한다.

상기 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 상기 OX40L 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체, 자가 면역 질환, 염증성질환, 개체, 진단 및 단백질의 수준을 측정하는 단계(방법)에 대해서는 모순되지 않는 한 앞서 설명한 바와 같다.

본 발명에서 용어, “시료”란 자가면역질환 환자에서 OX40L의 발현 수준이 차이 나는 전혈, 혈청, 혈액, 혈장, 타액, 뇨, 객담, 림프액, 뇌척수액 및 세포간액과 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

【발명의 효과】

본 발명의 항-OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 OX40L에 특이적으로 결합하여 수용체간의 결합을 효과적으로 저해할 뿐만 아니라, 면역억제능이 뛰어나, 자가면역질환, 염증성질환의 치료 및 진단 분야에 현저히 우수한 효과를 나타낼 수 있다.

나아가 상기 OX40L 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 이중 특이성 항체는 OX40L 뿐만 아니라 TNF α 에 강한 친화력을 나타내며, 인체에서 장기간 통한 결합을 유지하여 면역억제능이 뛰어나, 자가면역질환, 염증성질환의 치료 및 진단 분야에 현저히 우수한 효과를 나타낼 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 항-OX40L 항체 및 OX40L와 TNF α 에 동시에 결합할 수 있는 이중 특이성 항체의 구조를 예시적으로 도시한 것이다. 도 1에서 CH1, CH2, CH3는 중쇄의 불변영역, CL은 경쇄의 불변영역을 의미하며, 줄무늬(또는 빗금)로 표시된 부분은 각 사슬의 가변영역(CDR 영역(흰색) 및 구조영역(유색))을 나타낸다.

도 2는 항-OX40L 항체 및 OX40L와 TNF α 에 동시에 결합할 수 있는 이중 특이성 항체 생산 후, SDS-PAGE로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 항-OX40L 항체에 대한 OX40L 항원의 epitope mapping 결과를 HDX-MS를 통해 분석하여 나타낸 것이다.

도 4는 이중 특이성 항체가 항원인 OX40L와 TNF α 에 동시에 결합할 수

있는지를 비아코어(Biacore) 분석 방법을 통해 측정한 결과를 나타낸 것이다. 도 4 그래프의 가로축은 Time (0=capture_level)이고, 세로축은 Response (0=capture_level)이다.

도 5는 항-OX40L 항체 및 OX40L와 TNF α 에 동시에 결합할 수 있는 이중 특이성 항체의 in vitro blockade assay 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 항-OX40L 항체 및 OX40L와 TNF α 에 동시에 결합할 수 있는 이중 특이성 항체의 T cell의 IL-2 분비에 대한 영향을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

【발명의 실시를 위한 형태】

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: OX40L 특이적 항체 클론의 선별

실시예 1-1: OX40L 항원의 준비

인간 OX40L의 항원은, 세포 외부로 드러난 도메인을 활용하여 Accession No. NP_003317의 인간 OX40L 아미노산 서열(서열번호 1)의 51번째 내지 183번째

아미노산의 서열(Q51~L183)의 N-말단에 히스티딘 태그를 융합시켜 제작된, 아크로바이오시스템즈사에서 제공된 인간 OX40L 단백질(Cat# OXL-H52Q8)을 입수하여 사용하였다.

상기 아크로바이오시스템즈사의 인간 OX40L 단백질(항원)의 아미노산 서열은 서열번호 2에 명시하였다. 상기 제공된 항원은 HEK293 세포에서 생산되었으며, 16.9 kDa의 크기를 가진다.

[표 2] OX40L 항원 단백질

종류	서열번호	서열
OX40L 항원 단백질 (OX40L)	1	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYS QEVNISLHYQ KDEEPLFQLK KRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF CVL
OX40L 항원 단백질 (OX40L-his)	2	HHHHHH QVSHRYPRIQ SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYS QEVNISLHYQ KDEEPLFQLK KRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF CVL

실시예 1-2: 인간 라이브러리 파지의 제조

다양성을 가진 인간 유래 scFv 라이브러리 세포 7.5×10^{10} 개를 2X YT-glucose-Mgcl2-chloramphenicol (CM) 배지에 37°C에서 배양액의 흡광도가

OD₆₀₀=0.5~0.7가 될 때까지 배하였다.

상기 세포에 헬퍼 파이지(helper phage)를 감염시켜 37℃에서 약 1시간 배양하였다. 배양한 세포를 원심분리(5000rpm, 4℃, 10분)한 후, 2xYT- IPTG -Mgcl₂-kanamycine (KM)-CM 배지를 넣고 세포를 재 혼합한 뒤 30℃ 진탕 배양기에서 16시간 배양하였다. 배양한 세포를 원심분리(5000rpm, 4℃, 10분)한 후, 상등액에 4% PEG(Sigma, 81253), 3% NaCl(Junsei, 1905-0350)을 첨가하여 잘 녹인 후 얼음에서 약 1시간 동안 반응시켰다. 다시 원심분리(7500rpm, 4℃, 30분)한 후, 펠렛에 DPBS(Wellgene, LB001-02)를 첨가하여 녹인 다음 원심분리(10000rpm, 4℃, 10분)하여 라이브러리 파지를 포함하는 상등액을 수득하고 새 튜브에 넣어 5±3℃ 보관하였다.

실시예 1-3: 면역라이브러리 파지 제조

실시예 1-1의 인간 OX40L 항원(서열번호 2)으로 Balb/C mouse와 SD RAT을 이용하여 면역라이브러리 파지를 제조하였다.

7주령 Balb/C 마우스 10마리와 8주령 수컷 SD RAT 4마리를 순화 후 0일차,

21일차, 42일차, 63일차에 인간 OX40L 항원으로 면역을 진행하고, 84일차에 비장을 적출하여 RNA를 용출하였다. 용출한 RNA를 이용하여 cDNA를 합성하고 중쇄 가변부와 경쇄 가변부를 증폭하였다. 중쇄 가변부와 경쇄 가변부를 섞어서 scFv 형태로 증폭된 DNA를 파지 벡터(pYG100)에 삽입하여 RAT 유래 면역 scFv 라이브러리 세포를 제작하였다. 제작된 세포를 2X YT-glucose-Mgcl₂-chloramphenicol (CM) 배지에 37℃에서 배양액의 흡광도가 OD₆₀₀=0.5~0.7가 될 때까지 배양하였다.

상기 배양된 세포로 헬퍼 파지(helper phage)를 감염시켜 37℃에서 약 1시간 배양하였다. 배양한 세포를 원심분리(5000rpm, 4℃, 10분)한 후, 2xYT- IPTG - Mgcl₂-kanamycine (KM)-CM 배지를 넣고 세포를 재 혼합한 뒤 30℃ 진탕 배양기에서 16시간 배양하였다. 배양한 세포를 원심분리(5000rpm, 4℃, 10분)한 후, 상등액에 4% PEG(Sigma, 81253), 3% NaCl(Junsei, 1905-0350)을 첨가하여 잘 녹인 후 얼음에서 약 1시간 동안 반응시켰다. 다시 원심분리(7500rpm, 4℃, 30분)한 후, 펠렛에 DPBS(Wellgene, LB001-02)를 첨가하여 녹인 다음 원심분리(10000rpm, 4℃, 10분)하여 라이브러리 파지를 포함하는 상등액을 수득하고 새 튜브에 넣어 5±3℃ 보관하였다.

실시예 1-4: 파지 디스플레이(phage display)를 통한 패닝(panning)

인간 OX40L에 결합하는 OX40L 항체를 선별하기 위해, 면역시험관 (immunotube)에 1~10 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 실시예 1-1의 인간 OX40L 단백질을 포함하는 용액을 첨가하여 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 면역시험관 표면에 OX40L 단백질을 흡착시킨 후 우혈청 알부민 1% 용액을 시험관에 첨가하여 OX40L가 흡착되지 않은 표면을 보호하였다. 시험관을 비운 후 1% 우혈청 알부민 용액에 분산된 10^{12} CFU의 인간 항체 파지 라이브러리(실시예 1-2) 혹은 면역 파지 라이브러리(실시예 1-3)를 시험관에 넣어 항원과 결합시켰다. 비특이적으로 결합한 파지를 PBS-T(Phosphate buffered saline - 0.05% Tween 20)용액으로 5~20회 세척하고 DPBS로 1~5회 추가 세척 후 남아 있는 항원 특이적 파지 항체를 0.1M TAE 용액을 이용하여 회수하였다.

상기 회수된 파지를 1M 트리스 버퍼(pH 7.5)로 중화시킨 후 XL1Blue 대장균에 37°C 에서 1시간 감염시키고 감염된 대장균을 SOB-plate에 유리 구슬을 사용하여 도말하고 37°C 배양기에서 약 16시간 동안 배양하였다. 다음날 배양된 대장균을 4mL의 SB(superbroth)-카메니실린 배양액에 현탁하고 15% 글리세롤을 첨가하

여 일부는 -80°C 에 보관하고 나머지 중 $50\mu\text{l}$ 를 20ml 의 SB-카베니실린 배양액에 2% 포도당용액(glucose)를 첨가하여 37°C 에서 배양하였다. 배양액의 흡광도가 600nm 에서 0.6이 되면 원심분리하여 배양액을 제거하고 이를 다시 20ml 의 SB-카베니실린 배양액에 현탁한 후 10^{12} PFU의 M13 헬퍼파지를 넣고 천천히 교반하며 37°C 에서 배양하였다. 다음날 배양액을 원심분리한 후 배양액만 취하여 폴리에틸렌글라이콜과 염화나트륨(NaCl)을 첨가하여 4°C 에서 30분간 침전시킨 후 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 침전된 파지를 PBS 1ml 에 현탁시켜 이를 라이브러리로 사용하여 위의 패닝 과정을 3~5회 반복함으로써 항원 특이적 클론을 증폭/농축시켰다.

실시에 1-5: 파지 패닝 후 특이 클론 선별

인간 OX40L 단백질과 결합하는 항체(scFv)를 선별하기 위해 하기 두가지 방법 중 하나를 이용하여 항원 특이 클론을 선별하였다.

첫번째로, 패닝 진행 후 한천배지에 도말 배양하여 단일 콜로니들을 얻고 이를 $1\sim 1.5\text{ml}$ 의 배양액에 접종, 배양한 후 IPTG로 유도하여 scFv형태의 단백질을 대장균에서 발현하였다. 대장균 배양액을 원심분리하여 상층액을 수득하고, 이를

ELISA 기법을 사용하여 재조합 인간 OX40L 항원과 scFv와의 결합을 확인하는데 사용하였다(Steinberger, Rader and Barbas III, 2000. Phage display vectors. In: Phage Display Laboratory Manual, 1st ed. ColdSpringHarborLaboratoryPress, NY, USA, pp.11.9-11.12). 결합한 scFv는 HRP(Horseradish peroxidase)-anti-His 항체와 테트라메틸벤지딘(TMB) 기질을 이용하여 검출하였다.

두번째로, 패닝 진행 후 SOBCG 플레이트에서 단일 파지들을 얻고 이를 1mL씩 배지를 분주해 둔 Deep well plate에 접종하고 16시간 동안 37°C에서 진탕배양하였다. 증폭된 세포를 10배 희석하여 deep well plate에 다시 접종하고, OD₆₀₀에서 0.5가 될 때까지 37°C 진탕배양기에서 배양하였다. OD₆₀₀에서 0.5에 도달하면 M13 helper phage를 10⁹ CFU 수준으로 넣고 37°C 정체배양기에서 30분, 37°C 진탕배양기에서 30분동안 감염시켜주었다. 감염이 끝나고 원심분리하여 세포를 침전시키고 상층액을 수득하여, ELISA 기법을 사용하여 인간 OX40L 항원과 결합하는 scFv를 확인하였다. 결합한 scFv는 HRP(Horseradish peroxidase)-anti-M13 항체와 테트라메틸벤지딘(TMB) 기질을 이용하여 검출하였다.

이들로부터 확인된 항원 특이적 항체(scFv) 클론은 염기서열 분석법을

통해 분석하였다.

실시예 2: 항 0X40L 항체의 제조

상기 실시예 1-5에서 얻어진 항체 가변영역(scFv)에 대한 서열을 바탕으로 중쇄 가변영역을 중쇄 불변영역(서열번호 8)과 연결하고 경쇄 가변영역은 경쇄 불변영역(서열번호 10)과 연결하여 제작하였다. 상기 항체를 02C09, Hu3F07, 10H07, 21G07, I3F07로 명명하였다.

[표 3] 중쇄 및 경쇄 불변영역

불변영역		
아미노산서열	중쇄 (서열번호 8)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVEISKYGPCCP PC CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK
	경쇄 (서열번호 10)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
핵산 (DNA)	중쇄 (서열번호 9)	GCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAA

서열		GGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCATGCCCAGCAC CTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAAACCAAGGACACT CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGA AGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCC AACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC CCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAA CCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTACCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACAAGACACGCCTCCCGTGCT GGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA
	경쇄 (서열번호 11)	CGTACGGTGGCGGCGCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA TCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA GTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTAC AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAG CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

(1) 항 OX40L 항체 02C09

02C09 항체는 서열번호 12로 표시한 중쇄 CDR1; 서열번호 15로 표시한 중쇄 CDR2; 서열번호 19로 표시한 중쇄 CDR3; 서열번호 23로 표시한 경쇄 CDR1; 서열번호 25로 표시한 경쇄 CDR2; 서열번호 27로 표시한 경쇄 CDR3을 포함하였다.

항 OX40L 항체 02C09 는 pcDNA3.1 발현 벡터(Invitrogen)와 FreeStyle™ 293-F(Invitrogen) 동물세포주를 이용하여 제작하였다.

세포 내 유전자 전달 효율을 높이는 폴리머인 PEI를 이용하여 항 OX40L 항체 02C09를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 형질 주입한 부유 FreeStyle™ 293-F 동물 세포를 500 mL 배양용 삼각 플라스크(Corning)에서 병 1개당 200 mL로 배양하고 필요 시 다량 배양하였다.

형질 주입된 FreeStyle™ 293-F 세포는 37°C, 8% CO₂ 조건 하에 부유 배양하였고, 배지는 FreeStyle™ 293 Expression Medium AGT™(Invitrogen, AG1000D9P1)를 이용하여 배양하였다. 과발현 시에는 배양 배지 5 mL안에 PEI(Polysciences, 23966-2) 500 µg과 과발현시키고자 하는 DNA를 125 µg를 섞어서 진행하였다. DNA-PEI를 넣고 약 24시간 후에 10% soytone(BD, 212488)을 10 mL 넣어주고 약 5일을 더 배양한 후 상층액만 수득하여 항체 정제에 사용하였다.

항체 정제를 위해서, 1차적으로 제조함 프로틴-A 세파로즈 컬럼을 사용하여, 항체를 배양액으로부터 정제하였다. 순도 향상이 필요할 때는 1차 정제 산물을

이용하여 2차 정제를 진행하였다. 이때 Superdex200 gel filtration chromatography

또는 하이드록시아파타이트 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.

[표 4] 02C09 항체의 CDR 서열

종류		번호	서열	종류		번호	서열
중쇄	CDR1	12	YAWMS	경쇄	CDR1	23	RASQSIGRWLA
	CDR2	15	RIKGEPDGGTTEYADSVKG		CDR2	25	KATILES
	CDR3	19	RRGLDV		CDR3	27	QQYNSYPYT

[표 5] 02C09 항체의 가변영역 서열

02C09		
아미노산 서열	중쇄 (서열번호 37)	QMLVQSGGGLVKPGGSLRVSCAASGFTFN YAWMS WVRQAPGKGLEWVGRI KGEPDGGTTEYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVS RRGLD VWGQGT TVTVSS
	경쇄 (서열번호 38)	DIQMTQSPSSLSASLGDRVITIT RASQSIGRWLA WYQQKPGNAPKLLIY KATILE SGVPSRFSGSGSGTEFALTISLQPDDFSAYYC QQYNSYPYT FGQGTKLEIK
핵산 (DNA) 서열	중쇄 (서열번호 39)	CAAATGCAGCTTGTTCAATCCGGCGGAGGCCTGGTTAAGCCTGGCGGATCTCTG AGAGTGTCTTGTCGCCGACGCGGCTTACCTTCAATTACGCCTGGATGAGCTGG GTCCGACAGGCCCTGGAAAAGGACTGGAATGGGTCGGAAGAATCAAGGGCG AGCCTGATGGCGGAACACAGAGTACGCCGATAGCGTGAAGGGCAGATTCACC ATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAG AGCCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGTGTGTCTAGAAGAGGCCTGGATGTGTG

		GGGCCAGGGAACAACAGTGACAGTTTCTTCT
	경쇄 (서열번호 40)	GATATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGTCTGCCTCTCTGGGCGATAGA GTGACCATCACATGTCGGGCCAGCCAGTCTATTGGACGGTGGCTGGCCTGGTAT CAGCAAAAGCCTGGAAACGCCCCTAAGCTGCTGATCTACAAGGCCACCATCCT GGAAAGCGGAGTGCCTTCTAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGAGTTTG CCCTGACAATTAGCTCCCTGCAGCCTGACGACTTCAGCGCCTACTACTGCCAGC AGTACAACAGCTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACAAAGCTGGAAATCAAG

(2) 항 OX40L 항체 Hu3F07

Hu3F07 항체는 서열번호 13으로 표시한 중쇄 CDR1; 서열번호 16로 표시한 중쇄 CDR2; 서열번호 20로 표시한 중쇄 CDR3; 서열번호 24로 표시한 경쇄 CDR1; 서열번호 26으로 표시한 경쇄 CDR2; 서열번호 28로 표시한 경쇄 CDR3을 포함하였다.

항 OX40L 항체 Hu3F07는 발현벡터 pcDNA3.1(Invitrogen)와 FreeStyle™ 293-F(Invitrogen)의 동물세포주를 이용하여 제작하였다. 구체적인 배양 조건, 배양 방법 및 정제 방법은 상기 (1) 항 OX40L 항체 02C09에서 설명한 것과 실질적으로 동일하게 수행하였다.

[표 6] Hu3F07 항체의 CDR 서열

Hu3F07		번호	서열	Hu3F07		번호	서열
중쇄	CDR1	13	DYWMH	경쇄	CDR1	24	RSSQSLVHSNGNTYLH
	CDR2	16	EIDPPNGRTNYNEKFS		CDR2	26	KVSNRFS
	CDR3	20	GIYYVDY		CDR3	28	SQSTHVPPT

[표 7] Hu3F07 항체의 가변 영역 서열

Hu3F07		
아미노산 서열	중쇄 (서열번호 41)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFP DYWMH WVRQAPGQGLEWMG EIDP PNGRTNYNEKFS RVMTMRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARG GIYYVDY WGQ GTTVTVSS
	경쇄 (서열번호 42)	DIVMTQSPLSLPVTLGEPASIS CRSSQSLVHSNGNTYLH WYLQKPGQSPQLLIY KVS NRFS GVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC SQSTHVPPT FGGGTKLEIK
핵산 (DNA) 서열	중쇄 (서열번호 43)	CAAGTTCAACTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGA AGGTGTCCTGCAAGGCCTCTGGCTTCACATTCCCCGACTACTGGATGCACTGGGTTC GACAGGCTCCAGGACAGGGACTCGAATGGATGGGCGAGATCGATCCTCCTAACGG CCGGACCAACTACAACGAGAAGTTCAAGAGCAGAGTGACCATGACCAGAGACACC AGCATCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGACTGAGAAGCGACGACACCGCCG TGTAAGTGTGCGGAGGCGATCTACTACGTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACA GTGACAGTTAGCTCT
	경쇄 (서열번호 44)	GATATCGTGATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACACTGGGAGAACCTGC CAGCATCAGCTGTAGAAGCAGCCAGAGCCTGGTGACAGCAACGGCAATACCTAC CTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGACAGTCTCCCCAGCTGCTGATCTACAAGGT GTCCAACAGATTCAGCGGCGTGCCGATAGATTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCG ACTTACCCTGAAGATTAGCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGT AGCCAGTCTACCCACGTGCCACCTACCTTTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAAATCAA

		G
--	--	---

(3) 항 OX40L 항체 10H07

10H07 항체는 서열번호 13으로 표시한 중쇄 CDR1; 서열번호 17로 표시한 중쇄 CDR2; 서열번호 21로 표시한 중쇄 CDR3; 서열번호 24로 표시한 경쇄 CDR1; 서열번호 26으로 표시한 경쇄 CDR2; 서열번호 29로 표시한 경쇄 CDR3을 포함하였다.

항 OX40L 항체 10H07는 발현벡터 pcDNA3.1(Invitrogen)와 FreeStyle™ 293-F(Invitrogen)의 동물세포주를 이용하여 제작하였다. 구체적인 배양 조건, 배양 방법 및 정제 방법은 상기 (1) 항 OX40L 항체 02C09에서 설명한 것과 실질적으로 동일하게 수행하였다.

[표 8] 10H07 항체의 CDR 서열

10H07		번호	서열	10H07		번호	서열
중쇄	CDR1	13	DYWMH	경쇄	CDR1	24	RSSQSLVHSNGNTYLH
	CDR2	17	EIDPGNGRTNYNEKFKN		CDR2	26	KVSNRFS
	CDR3	21	EGAGRGFPY		CDR3	29	SQSTHVPWT

[표 9] 10H07 항체의 가변 영역 서열

10H07		
아미노산 서열	중쇄 (서열번호 45)	QVYLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT DYWMHWVK QRPQGQLEWIG EIDPG NGRTNYNEKFKN KATLSVDKSSNTAYMQFSSLTSEDSAVFYCASE EGAGRGFPYWG QGTLTVSA
	경쇄 (서열번호 46)	DVVLTTQPLSLPVSLGDQASISCR SSQSLVHS NGNTY LHWY LQKPGQSPKLLIY KVS NRFSGVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCS QSTHVPWT FGGGTKLEIK
핵산 (DNA) 서열	중쇄 (서열번호 47)	CAGGTTTATCTACAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAA GCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCGACTACTGGATGCACTGGGTGA AGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTGATCCTGGCAACGG TCGTACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGAACAAGGCCACACTGAGTGTAGACAAAT CCTCCAATACAGCCTACATGCAATTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCT TTTACTGTGCAAGCGAGGGAGCTGGACGTGGATTTCCTTACTGGGGCCAAGGGACT CTGGTCACTGTCTCCGCA
	경쇄 (서열번호 48)	GATGTTGTGCTGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCC TCCATCTCTTGCAATCTAGTCAGAGCCTGTACACAGTAATGGAAACACCTATTTAC ATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCA ACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTT CACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTCTGCTCTCA AAGTACACATGTTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

(4) 항 OX40L 항체 21G07

21G07 항체는 서열번호 14로 표시한 중쇄 CDR1; 서열번호 18로 표시한

중쇄 CDR2; 서열번호 22로 표시한 중쇄 CDR3; 서열번호 24로 표시한 경쇄 CDR1;
서열번호 26로 표시한 경쇄 CDR2; 서열번호 30로 표시한 경쇄 CDR3을 포함하였다.

항 0X40L 항체 21G07는 발현벡터 pcDNA3.1(Invitrogen)와 FreeStyle™
293-F(Invitrogen)의 동물세포주를 이용하여 제작하였다. 구체적인 배양 조건,
배양 방법 및 정제 방법은 상기 (1) 항 0X40L 항체 02C09에서 한 것과 실질적으로
동일하게 수행하였다.

[표 10] 21G07 항체의 CDR 서열

21G07		번호	서열	21G07		번호	서열
중쇄	CDR1	14	NYWMQ	경쇄	CDR1	24	RSSQSLVHSNGNTYLH
	CDR2	18	EIDPSDGRTNYNEKFN		CDR2	26	KVSNRFS
	CDR3	22	EVSLRSM DY		CDR3	30	SQSTHVPFT

[표 11] 21G07 항체의 가변 영역 서열

21G07		
아미노 산 서열	중쇄 (서열번호 49)	QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT NYWMQ WVKQRPQGLEWIG EID PSDGRTNYNEKFN KATLTVDSSSTAYIKLSSLTSEDSAVYYCARE EVSLRSM DY WGQGTSVTVSS
	경쇄	DIVLTQSPLSLPVSLGDQASIS CRSSQSLVHSNGNTYLH WYWLQKPGQSPKLLI YK

	(서열번호 50)	VSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCS QSTHVPFT FGSGTKLEIK
핵산 (DNA) 서열	중쇄 (서열번호 51)	CAGGTCCAAGTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGT GAAGCTGCTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATGCAATG GGTGAAACAGAGGCCCCGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTGATCCTA GCGACGGTCGTACTAATAACAATGAGAAGTTCAAGAACAAGGCCACACTGACT GTAGACAGATCCTCCAGCACAGCCTACATAAACTCAGCAGCCTGACATCTGAG GACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGAGGTTTCACTACGGTCAATGGACTACT GGGGCCAAGGGACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
	경쇄 (서열번호 52)	GACATTGTTCTACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAG CCTCCATCTCTTGAGATCTAGTCAGAGCCTTGACACAGTAATGGAAACACCTA TTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAA AGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGG GACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTT ATTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCATTACGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTT GGAAATAAAA

(5) 항 OX40L 항체 I3F07

I3F07 항체는 서열번호 13으로 표시한 중쇄 CDR1; 서열번호 16로 표시한 중쇄 CDR2; 서열번호 20로 표시한 중쇄 CDR3; 서열번호 24로 표시한 경쇄 CDR1; 서열번호 26로 표시한 경쇄 CDR2; 서열번호 28로 표시한 경쇄 CDR3을 포함하였다.

항 OX40L 항체 I3F07는 발현벡터 pcDNA3.1(Invitrogen)와 FreeStyle™ 293-F(Invitrogen)의 동물세포주를 이용하여 제작하였다. 구체적인 배양 조건, 배양

방법 및 정제 방법은 상기 (1) 항 OX40L 항체 02C09에서 설명한 것과 실질적으로 동일하게 수행하였다.

[표 12] I3F07 항체의 CDR 서열

I3F07		번호	서열	I3F07		번호	서열
중쇄	CDR1	13	DYWMH	경쇄	CDR1	24	RSSQSLVHSNGNTYLH
	CDR2	16	EIDPPNGRTNYNEKFS		CDR2	26	KVSNRFS
	CDR3	20	GIYYVDY		CDR3	28	SQSTHVPPT

[표 13] I3F07 항체의 가변 영역 서열

I3F07		
아미노산 서열	중쇄 (서열번호 53)	QIQLAQSGAELVKPGASVKLSCKASGFTFP DYWMH WVKQRPQGQLEWIG EIDP PNGRTNYNEKFS KATLTVDSSNTAYMQLSRLTSEDSAVYYCARG GIYYVDY WG QGTTLTVSS
	경쇄 (서열번호 54)	DIVLTQSPLSLPVSLGDAQISCR RSSQSLVHSNGNTYLH WYLQKPGQSPKLLIY KV SNRFS GVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC SQSTHVPPT FGGGSKLEIK
핵산 (DNA) 서열	중쇄 (서열번호 55)	CAGATTCAGCTGGCTCAGTCTGGCGCCGAACCTGTGAAACCTGGCGCCTCTGT GAAGCTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTTACCTTTCCTGACTACTGGATGCAC TGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTCGAATGGATCGGCGAGATCGAT CCTCCTAACGGCCGGACCAACTACAACGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACA CTGACCGTGGACAGCAGCAGCAATACCGCCTACATGCAGCTGAGCAGACTGA CCTCTGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGGCATCTACTACGTGGA CTACTGGGGCCAGGGCACAACCTGACAGTTTCTTCT
	경쇄	GATATCGTGCTGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTTTCTCTGGGAGATCA

	(서열번호 56)	GGCCAGCATCAGCTGCAGATCCTCTCAGAGCCTGGTGCACAGCAACGGCAAT ACCTACCTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCTCCTAAGCTGCTGAT CTACAAGGTGTCCAACAGGTTACAGCGGCGTGCCCGATAGATTTCTGGCTCTG GCAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATTCTAGAGTGGAAGCCGAGGACCT GGGCGTGACTTCTGTTCTCAGTCTACCCACGTGCCACCTACCTTTGGCGGCG GAAGCAAGCTGGAAATCAAG
--	-----------	---

실시예 3: OX40L와 TNF α 를 타겟으로 하는 이중 특이적 항체의 제조

상기 실시예 2에서 만들어진 인간 OX40L와 결합하는 항체(02C09, Hu3F07, I3F07) 또는 이의 단편(scFv)을 링커를 이용하여 항 TNF α 항체(TNF α i 항체(Humira)) 또는 이의 단편(scFv)과 연결해 인간 TNF α 에도 결합할 수 있는 이중 특이성 항체를 제조하였다(도 1 참조).

구체적으로, 상기 이중 특이성 항체는 (i) 항 OX40L 항체의 중쇄 불변영역 C-말단에 항-TNF α 항체 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역을 링커로 연결한 형태와; (ii) 항 OX40L 항체의 경쇄 불변영역 C-말단에 항 TNF α 항체 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역을 링커로 연결한 형태와; (iii) 항 TNF α 항체의 중쇄 불변영역 C-말단에 항-OX40L 항체 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역을 링커로 연결한 형태와; (iv) 항 TNF α 항체의 경쇄 불변영역 C-말단에 항 OX40L 항체 중쇄 가변영역과 경쇄

가변영역을 링커로 연결한 형태로 제조하여, 각각 IgG-scFv-결합위치의 순으로 02C09-TNF α i HC, 02C09-TNF α i LC, hu3F07-TNF α i HC, hu3F07-TNF α i LC, TNF α i-02C09 HC, TNF α i-02C09 LC, TNF α i-hu3F07 HC, TNF α i-hu3F07 LC, I3F07-TNF α i HC, I3F07-TNF α i LC, TNF α i-I3F07 HC, TNF α i-I3F07 LC로 명명하였다.

상기 링커는 서열번호 31로 표시한 GGGGSGGGSGGGGS를 사용하였다.

[표 14] 항 TNF α 항체의 CDR

항 TNF α 항체		번호	서열	항 TNF α 항체		번호	서열
중쇄	CDR1	89	DYAMH	경쇄	CDR1	92	RASQGIRNYLA
	CDR2	90	AITWNSGHIDYADSVEG		CDR2	93	AASTLQS
	CDR3	91	VSYLSTASSLDY		CDR3	94	QRYNRAPYT

[표 15] 항 TNF α 항체의 가변영역 서열

항 TNF α 항체	
중쇄 (서열번호 35)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDD DYAMH WVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHI DYADSVEG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK VSYLSTASSLDY WGQGTLV TVSS
경쇄 (서열번호 36)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQGIRNYL AWYQQKPGKAPKLLIYA AASTLQ SGVPS RFGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC QRYNRAPYT FGQGTKVEIK

상기 TNF α i 항체는 상기 실시예 2의 항 OX40L 항체 생산(제조) 방법과 실질적으로 동일한 방법으로, 상기 TNF α 항체의 중쇄 가변영역을 중쇄 불변영역(서열번호 8)과 연결하고 경쇄 가변영역은 경쇄 불변영역(서열번호 10)과 연결하 제조하였다.

(1) 이중 특이성 항체 02C09-TNF α i HC

상기 이중 특이성 항체 02C09-TNF α i HC는 항-OX40L 항체 02C09의 중쇄 불변영역 C말단에, TNF α i 항체(Humira) 중쇄 가변영역 (서열번호 35) 및 TNF α 로 변경해주세요 i 항체 (Humira) 경쇄 가변영역(서열번호 36)이 링커(서열번호 32)로 연결된 TNF α i 항체의 결합단편(ScFv)이 링커(서열번호 31)로 연결되었다.

이중 특이성 항체 02C09-TNF α i HC는 발현벡터 pcDNA3.1(Invitrogen)와 FreeStyle™ 293-F(Invitrogen)의 동물세포주를 이용하여 제작하였다. 구체적인 배양 조건, 배양 방법 및 정제 방법은 상기 (1) 항 OX40L 항체 02C09에서 설명한 것과 실질적으로 동일하게 수행하였다.

[표 16] 02C09-TNF α i HC의 중쇄

02C09 중쇄-링커- TNF α i 가변영역	
아미노산 서열 (서열번호 57)	Q MLV Q SGGGLV K PGGSLRV S CAASGFTFNYAWMSWVRQAPG K GLEWVGR I KGE P DGGTTEYADSV K GRFTISRDN S KNTLYLQ M NSLRAEDTAVYYCVSRRGLDVWG Q G T TVTV S ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF P AVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGKTYTCNV D HKPSNTKVDKRVESKYGP P CP P CAPEFLG GPSVFLFP P KPKDTLMISRTPEVTCVVVDV S QEDPEVQFNWYVDGVEVHNA K TPREEQ F NSTYRVVSVLT V LHQDWLNGKEY K CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP S QEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS D GSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSV M HEALHNHYTQKSLSL S L G KGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV Q P GRSLRLS C AASGFTDDYAMHWVRQAPG K GLEWVS A ITWNSGHIDYAD S VEGRFTIS RDNAKNSLYLQ M NSLRAEDTAVYYCAKVS Y LSTASSLDYWGGTLTV S SGGGGSGGGG G SGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV G DRVITCRASQGIRNYLAWYQQK P GKAPKL LIYAAS T LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT I SS L QPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGT K VEIK
핵산 (DNA) 서열 (서열번호 58)	C AAATGCAGCTTGT T CAATCCGGCGGAGGCCTGGTTAAGCCTGGCGGATCTCT G AG A GTGTCTTG T GCCGCCAGCGCTTCACCTTCAATTACGCCTGGATGAGCTGGGTCC G ACAGGCCCTGGAAAAGGACTGGAATGGGTCGGAAGAATCAAGGGCGAGCCT G A TGGCGGAAC C ACAGAGTACGCCGATAGCGTGAAGGGCAGATT C ACCATCAGCCG G GACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGA A CTCCCTGAGAGCCGAGGAC A CAGCCGTGTACTACTGTGTGTCTAGAAGAGGCCTGGATGTGTGGGGCCAGGG A A C AACAGTGACAGTTTCTTCTGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTCCCCCTGGCGCC CTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA CTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGA A CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG C AC ACCTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT GCCCTCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCATGC CCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTCCCCCAAAACCAAGG ACACTCTATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACAGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAG GAAGACCCCGAGGTCCAGTTC A ACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA

	AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACA AAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGG CTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAAT GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCT CTCCCTGTCTCTGGGTAAAG GGTGGTGGCGGATCTGGCGGCGGAGGAAGCGGAGGC GGAGGCTCC GAAGTGCAACTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGAAG AAGCCTGAGACTGTCTGTGCCGCCAGCGGCTTACCTTCGATGATTATGCCATGCACT GGGTCCGACAGGCCCTGGAAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCACCTGGAACA GCGGCCACATCGATTACGCCGATAGCGTGGAAGGCCGGTTCACCATCAGCAGAGACAA CGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGT GTACTACTGTGCCAAAGTGTCTTACCTGAGCACCGCCTCCAGCCTGGATTATTGGGGAC AGGGCACACTGGTCACAGTGTCTCT GGTGGCGGAGGTTCTGGCGGAGGTGGTAGT GGTGGCGGTGGAAGTGGTGGCGGCGGATCT GATATCCAGATGACACAGAGCCCTAG CAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGCGATAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGC ATCAGAAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGAAAGGCCCTAAGCTGCTGA TCTATGCCGCCTTACACTGCAGAGCGGCGTGCCATCTAGATTTTCTGGCAGCGGCTCT GGCACCGACTTCACCCTGACAATTTCTAGCCTGCAGCCTGAGGACGTGGCCACCTACTA CTGCCAGAGATACAACAGAGCCCCTTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAAT CAAG
--	--

(2) 이중 특이성 항체 02C09-TNF α i LC

02C09-TNF α i LC는 항-0X40L 항체 02C09의 경쇄 불변영역 C말단에, Humira

중쇄 가변영역 (서열번호 35)과 Humira 경쇄 가변영역(서열번호 36)이

링커(서열번호 32)로 연결된 TNF α i 항체의 결합단편(ScFv)이, 링커(서열번호 31)로 연결되었다.

이중 특이성 항체 02C09-TNF α i LC는 발현벡터 pcDNA3.1(Invitrogen)와 FreeStyle™ 293-F(Invitrogen)의 동물세포주를 이용하여 제작하였다. 구체적인 배양 조건, 배양 방법 및 정제 방법은 상기 (1) 항 0X40L 항체 02C09에서 설명한 것과 실질적으로 동일하게 수행하였다.

[표 17] 02C09-TNF α i LC의 경쇄

02C09 경쇄-링커- TNF α i 가변영역	
아미노산 서열 (서열번호 59)	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCRASQSIGRWLAWYQQKPGNAPKLLIYKATILESGV PSRFSGSGSGTEFALTISLQPDDFSAYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC GGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGVLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKLEWWSAITWNSGHIDYADSV GRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLVTVSS GGGG SGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIIRNYLAWYQQKPG KAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTK VEIK
핵산 (DNA) 서열 (서열번호 60)	GATATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGTCTGCCTCTCTGGGCGATAGAGT GACCATCACATGTCGGGCCAGCCAGTCTATTGGACGGTGGCTGGCCTGGTATCAGC AAAAGCCTGGAAACGCCCTAAGCTGCTGATCTACAAGGCCACCATCCTGGAAAG CGGAGTGCCTTCTAGATTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGAGTTTGCCCTGACAA TTAGCTCCCTGCAGCCTGACGACTTCAGCGCCTACTACTGCCAGCAGTACAACAGC

	TACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACAAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCGGC GCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTT GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAA CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG CACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC AACAGGGGAGAGTGTGGTGGTGGCGGATCTGGCGGCGGAGGAAGCGGAGGCGGA GGCTCCGAAGTGCAACTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGAAGAAGC CTGAGACTGTCTGTGCCGCCAGCGGCTTACCTTCGATGATTATGCCATGCACTGGGTC CGACAGGCCCTGGAAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCACCTGGAACAGCGGC CACATCGATTACGCCGATAGCGTGAAGGCCGGTTCACCATCAGCAGAGACAACGCCA AGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTA CTGTGCCAAAGTGTCTTACCTGAGCACCGCCTCCAGCCTGGATTATTGGGGACAGGGC AACTGGTCACAGTGTCTCTGGTGGCGGAGGTTCTGGCGGAGGTGGTAGTGGTGGCG GTGGAAGTGGTGGCGGCGGATCTGATATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGTC TGCCTCTGTGGGCGATAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGCATCAGAAAC TACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGAAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTATGCCGC CTTACACTGCAGAGCGGCGTGCCATCTAGATTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACT TCACCCTGACAATTTCTAGCCTGCAGCCTGAGGACGTGGCCACCTACTACTGCCAGAGA TACAACAGAGCCCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG
--	--

(3) 이중 특이성 항체 Hu3F07-TNF α i HC

Hu3F07-TNF α i HC는 항-0X40L 항체 hu3F07의 중쇄 불변영역 C말단에, TNF α i 항체 중쇄 가변영역 (서열번호 35)과 TNF α i 항체 경쇄 가변영역(서열번호 36)이 링커(서열번호 32)로 연결된 TNF α i 항체의 결합단편(ScFv)이,

링커(서열번호 31)로 연결되었다.

이중 특이성 항체 Hu3F07-TNF α i HC는 발현벡터 pcDNA3.1(Invitrogen)와 FreeStyle™ 293-F(Invitrogen)의 동물세포주를 이용하여 제작하였다. 구체적인 배양 조건, 배양 방법 및 정제 방법은 상기 (1) 항 OX40L 항체 02C09에서 설명한 것과 실질적으로 동일하게 수행하였다.

[표 18] Hu3F07-TNF α i HC의 중쇄

Hu3F07 중쇄-링커- TNF α i 가변영역	
아미노산 서열 (서열번호 61)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFPDYWMHWVRQAPGQGLEWMGEIDP PNGRTNYNEKFSRVTMTTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGIYVVDYWGGG TTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVSVLTVHLQDNLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK GGGGSGGGSGGGGSE VQLVESGGGLV QPGRSLRLSCAASGFTDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVETRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGGQTLTVSS GGGGSGGG GSGGGSGGGGSD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKL LIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQRYNRPYTFGGQTKVEIK
핵산 (DNA) 서열 (서열번호 62)	CAAGTTCAACTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGA AGGTGTCCTGCAAGGCCTCTGGCTTCACATTCCTCCGACTACTGGATGCACTGGGTT CGACAGGCTCCAGGACAGGGACTCGAATGGATGGGCGAGATCGATCCTCCTAACG GCCGGACCAACTACAACGAGAAGTTCAAGAGCAGAGTGACCATGACCAGAGACA

	CCAGCATCAGCACCGCCTACATGGAAGTCTGAGCAGACTGAGAAGCGACGACACCGC CGTGTACTACTGTGCCAGAGGCATCTACTACGTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCA CAGTGACAGTTAGTCTCTGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTG CTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC CCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCC TTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC CTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAGCAA CACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCATGCCACCATGCCCA GCACCTGAGTTCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTCCCCCAAACCAAGGACA CTCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGA AGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAA GGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAG CCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCC TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA TGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTC CTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCTGGGTAAAGGGTGGTGGCGGATCTGGCGGGGAGGAAGCGGAGGCGG AGGCTCCGAAGTGCAACTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGAAGAAG CCTGAGACTGTCTTGCGCCAGCGGCTTACCTTCGATGATTATGCCATGCACTGGGT CCGACAGGCCCTGGAAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCACCTGGAACAGCGG CCACATCGATTACCGGATAGCGTGAAGGCCGTTACCATCAGCAGAGACAACGCC AAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACT ACTGTGCCAAAGTGTCTTACCTGAGCACCGCCTCCAGCCTGGATTATTGGGGACAGGG CACACTGGTCACAGTGTCTCTGGTGGCGGAGGTTCTGGCGGAGGTGGTAGTGGTGGC GGTGAAGTGGTGGCGGCGGATCTGATATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGT CTGCCTCTGTGGGCGATAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGCATCAGAAA CTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGAAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTATGCCG CCTCTACACTGCAGAGCGGCGTGCCATCTAGATTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGA
--	---

	CTTCACCCTGACAATTTCTAGCCTGCAGCCTGAGGACGTGGCCACCTACTACTGCCAGA GATACAACAGAGCCCCTTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG
--	--

(4) 이중 특이성 항체 Hu3F07-TNF α i LC

Hu3F07-TNF α i LC는 항-OX40L 항체 hu3F07의 경쇄 불변영역 C말단에, TNF α i 항체 중쇄 가변영역 (서열번호 35)과 TNF α i 항체 경쇄 가변영역(서열번호 36)이 링커(서열번호 32)로 연결된 TNF α i 항체의 결합단편(ScFv)이, 링커(서열번호 31)로 연결되었다.

이중 특이성 항체 Hu3F07-TNF α i LC는 발현벡터 pcDNA3.1(Invitrogen)와 FreeStyle™ 293-F의 동물세포주를 이용하여 제작하였다. 구체적인 배양 조건, 배양 방법 및 정제 방법은 상기 (1) 항 OX40L 항체 02C09에서 설명한 것과 실질적으로 동일하게 수행하였다.

[표 19] Hu3F07-TNF α i LC의 경쇄

Hu3F07 경쇄-링커- TNF α i 가변영역	
아미노산 서열 (서열번호 63)	DIVMTQSPLSLPVTLGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSN RFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCSQSTHVPPTFGGGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS

	TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKLEWVSATWNSGHID YADSVGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVT SSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNYLAW YQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYT FGQGTKVEIK
핵산 (DNA) 서열 (서열번호 64)	GATATCGTGATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACACTGGGAGAACCTGC CAGCATCAGCTGTAGAAGCAGCCAGAGCCTGGTGACAGCAACGGCAATACCTAC CTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGACAGTCTCCCCAGCTGCTGATCTACAAGGT GTCCAACAGATTCAGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCG ACTTCACCTGAAGATTAGCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTG TAGCCAGTCTACCCACGTGCCACCTACCTTTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAAATCA AGCGTACGGTGGCGGCGCCATCTGTCTTCATCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA TCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA CAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGC AGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGTGGTGGCGGATCTGGCGGCGGA GGAAGCGGAGGCGGAGGCTCCGAAAGTGCAACTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGT GCAGCCTGGAAGAAGCCTGAGACTGTCTTGCCGCCAGCGGCTTACCTTCGATGAT TATGCCATGCACTGGGTCCGACAGGCCCTGGAAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCA TCACCTGGAACAGCGGCCACATCGATTACGCCGATAGCGTGGAAGGCCGGTTCACCAT CAGCAGAGACAACGCCAAGAAGCAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAAGTGTCTTACCTGAGCACCCTCCAGCCTGG ATTATTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTCTGGTGGCGGAGGTTCTGGCG GAGGTGGTAGTGGTGGCGGTGGAAGTGGTGGCGGCGGATCTGATATCCAGATGACA CAGAGCCCTAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGCGATAGAGTGACCATCACCTGTAGAGC CAGCCAGGGCATCAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGAAAGGCCCC TAAGCTGCTGATCTATGCCGCTCTACACTGCAGAGCGGCGTGCCATCTAGATTTTCTGG CAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAATTTCTAGCCTGCAGCCTGAGGACGTG

	GCCACCTACTACTGCCAGAGATACAACAGAGCCCCTTACACCTTCGGCCAGGGCACCA AGGTGGAAATCAAG
--	--

(5) 이중 특이성 항체 TNF α i-02C09 HC

TNF α i-02C09 HC는 TNF α i 항체(Humira)의 중쇄 불변영역 C말단에, 항-OX40L 항체 02C09의 중쇄 가변영역(서열번호 37)과 항-OX40L 항체 02C09의 경쇄 가변영역(서열번호 38)이 링커(서열번호 32)로 연결된 항-OX40L 항체 02C09의 항체의 결합단편(ScFv)이, 링커(서열번호 31)로 연결되었다.

이중 특이성 항체 TNF α i-02C09 HC는 발현벡터 pcDNA3.1(Invitrogen)와 FreeStyle™ 293-F의 동물세포주를 이용하여 제작하였다. 구체적인 배양 조건, 배양 방법 및 정제 방법은 상기 (1) 항 OX40L 항체 02C09에서 설명한 것과 실질적으로 동일하게 수행하였다.

[표 20] TNF α i-02C09 HC의 중쇄

TNF α i 중쇄-링커- 항-OX40L 항체 02C09 가변영역	
아미노산 서열 (서열번호 65)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNS GHIDYADSVETRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWG QGTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT

	FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEF LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKGGGSGGGSGGGSGGGSGMQLVQSGG GLVKPGGSLRVSCAASGFTFNIAWMSWVRQAPGKLEWVGRIKGEPDGGTTEYADSVK GRFTISRDNSKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCVSRRGLDWGQGTTVTVSSGGGSGGGG GSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCRASQSIGRWLAWYQQKPGNAPKL LIYKATILESGVPSRFSGSGSGTEFALTISLQPDDFSAYYQYNSYPYTFGQGTKEIK
핵산 (DNA) 서열 (서열번호 66)	GAAGTGCAACTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGAAGAAGCCTG AGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCGATGATTATGCCATGCACTGGGTC CGACAGGCCCCGAAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCACCTGGAACAGCG GCCACATCGATTACGCCGATAGCGTGGAAGGCCGTTACCATCAGCAGAGACAA CGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCC GTGTACTACTGTGCCAAAGTGTCTTACCTGAGCACCGCCTCCAGCCTGGATTATTGG GGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTCTGCTTCCACCAAGGGCCCCATCCGTCTTC CCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTG GTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTCTGGAAGTACAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGCTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATG CCCACCATGCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAA AACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGA CGTGAGCCAGGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTACCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGG

	ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACAC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAAG GGTGGTGGCGGATCTGGCGGCGGAGGA AGCGGAGGCGGAGGCTCC CAAATGCAGCTTGTTCAATCCGGCGGAGGCCTGGTTAAG CCTGGCGGATCTCTGAGAGTGTCTTGTCGCCAGCGGCTTCACCTCAATTACGCCTG GATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCCTGAAAAAGGACTGGAATGGGTGCGGAAGAATCAA GGGCGAGCCTGATGGCGGAACCACAGAGTACGCCGATAGCGTGAAGGGCAGATTCAC CATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCC GAGGACACAGCCGTGTACTACTGTGTGTCTAGAAGAGGCCTGGATGTGTGGGGCCAGG GAACAACAGTGACAGTTTCTTCT GGTGGCGGAGGTTCTGGCGGAGGTGGTAGTGGT GGCGGTGGAAGTGGTGGCGGCGGATCT GATATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAG CCTGTCTGCCTCTCTGGGCGATAGAGTGACCATCACATGTCGGGCCAGCCAGTCTATTG GACGGTGGCTGGCCTGGTATCAGCAAAAGCCTGGAAACGCCCTAAGCTGCTGATCTA CAAGGCCACCATCCTGGAAAGCGGAGTGCCTTCTAGATTTCTGGCAGCGGCTCTGGC ACCGAGTTTGCCCTGACAATTAGCTCCCTGCAGCCTGACGACTTCAGCGCCTACTACTG CCAGCAGTACAACAGCTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACAAAGCTGGAAATCAA G
--	---

(6) 이중 특이성 항체 TNF α i-02C09 LC

TNF α i-02C09 LC는 TNF α i 항체의 경쇄 불변영역 C말단에, 항-OX40L 항체 02C09의 중쇄 가변영역(서열번호 37)과 항-OX40L 항체 02C09의 경쇄 가변영역(서열번호 38)이 링커(서열번호 32)로 연결된 항-OX40L 항체 02C09의 항체의 결합단편(ScFv)이, 링커(서열번호 31)로 연결되었다.

이중 특이성 항체 TNF α i-02C09 LC는 발현벡터 pcDNA3.1(Invitrogen)와

FreeStyle™ 293-F의 동물세포주를 이용하여 제작하였다. 구체적인 배양 조건, 배양 방법 및 정제 방법은 상기 (1) 항 OX40L 항체 02C09에서 설명한 것과 실질적으로 동일하게 수행하였다.

[표 21] TNF α i-02C09 LC의 경쇄

TNF α i 경쇄-링커- 항-OX40L 항체 02C09 가변영역	
아미노산 서열 (서열번호 67)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC GGGGSGGGGSGGGG SGMQMLVQSGG GLVKPGGSLRVCAASGFTFNIAWMSWVRQAPGKLEWVGRIKGEPDGGTTEYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCVSRRLDVWGQGTTVTVSS GGGGSGGGG SG GGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCRASQSIGRWLAWYQQKPGNAPKLLIYK ATILESGVPSRFSGSGSGTEFALT ISSLPDDFSAYYCQYNSYPYTFGQGT KLEIK
핵산 (DNA) 서열 (서열번호 68)	GATATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGCGATAGAGTG ACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGCATCAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAG AAGCCCGGAAAGGCCCCCTAAGCTGCTGATCTATGCCGCCTCTACACTGCAGAGCGGC GTGCCATCTAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCTGACAATTTCTA GCCTGCAGCCTGAGGACGTGGCCACCTACTACTGCCAGAGATACAACAGAGCCCCCTT ACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAG CGTACGGTGGCGGGCGCCATCTG TCTTCATCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTG CTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAA TCGGGTAAGTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCC TCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGT GGTGGTGGCGGATCTGGCGGCGGAGGAAGCGGAGGCGGAGGCTCCCAATGCA

	GCTTGTTCAATCCGGCGGAGGCCTGGTTAAGCCTGGCGGATCTCTGAGAGTGTCTTGTGC CGCCAGCGGCTTACCTTCAATTACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCTGGAA AAGGACTGGAATGGGTCGGAAGAATCAAGGGCGAGCCTGATGGCGGAACACAGAGTA CGCCGATAGCGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTG TACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGTGTGTCTAGA AGAGGCCTGGATGTGTGGGGCCAGGGAACAACAGTGACAGTTTCTTCT GGTGGCGGAG GTTCTGGCGGAGGTGGTAGTGGTGGCGGTGGAAGTGGTGGCGGCGGATCT GATATCC AGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGTCTGCCTCTCTGGGCGATAGAGTGACCATCACAT GTCGGGCCAGCCAGTCTATTGGACGGTGGCTGGCCTGGTATCAGCAAAAGCCTGGAAAC GCCCCTAAGCTGCTGATCTACAAGGCCACCATCCTGGAAAGCGGAGTGCCTTCTAGATTT TCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGAGTTTGCCCTGACAATTAGCTCCCTGCAGCCTGACGAC TTCAGCGCCTACTACTGCCAGCAGTACAACAGCTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACA AAGCTGGAAATCAAG
--	--

(7) 이중 특이성 항체 TNF α i-hu3F07 HC

TNF α i-hu3F07 HC는 TNF α i 항체의 중쇄 불변영역 C말단에, 항-OX40L 항체 hu3F07의 중쇄 가변영역(서열번호 41)과 항-OX40L 항체 hu3F07의 경쇄 가변영역(서열번호 42)이 링커(서열번호 32)로 연결된 항-OX40L 항체 hu3F07의 항체의 결합단편(ScFv)이, 링커(서열번호 31)로 연결되었다.

이중 특이성 항체 TNF α i-hu3F07 HC는 발현벡터 pcDNA3.1(Invitrogen)와 FreeStyle™ 293-F의 동물세포주를 이용하여 제작하였다. 구체적인 배양 조건,

배양 방법 및 정제 방법은 상기 (1) 항 OX40L 항체 02C09에서 설명한 것과 실질적으로 동일하게 수행하였다.

[표 22] TNF α i-hu3F07 HC의 중쇄

TNF α i 중쇄-링커- 항-OX40L 항체 hu3F07 가변영역	
아미노산 서열 (서열번호 69)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNS GHIDYADSVETRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWG QGTLLTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPPAPEF LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK GGGGSGGGSGGGGS QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGFTFPDYWMHWVRQAPGQGLEWMGEIDPPNGRTNYNEFKSR VTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGIYYVDYWGQGTITVTVSS GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS DIVMTQSPLSLPVTLGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSP QLLIYKVSINRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHPPTFGGGTKLEI K
핵산 (DNA) 서열 (서열번호 70)	GAAGTGCAACTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGAAGAAGCCTG AGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCGATGATTATGCCATGCACTGGGTC CGACAGGCCCCTGAAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCACCTGGAACAGCG GCCACATCGATTACGCCGATAGCGTGGAAGGCCGTTACCATCAGCAGAGACAA CGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCC GTGTACTACTGTGCCAAAGTGTCTTACCTGAGCACCGCCTCCAGCCTGGATTATTGG GGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTCTGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTC CCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTG GTC AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCA

	GCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATG CCCACCATGCCCAGCACCTGAGTTCTCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAA AACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGA CGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACAC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAAGGGTGGTGGCGGATCTGGCGGCGGAGGA AGCGGAGGCGGAGGCTCCCAAGTTCAACTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAA ACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCCTCTGGCTTCACATTCCCCGACTAC TGGATGCACTGGGTTGACAGGCTCCAGGACAGGGACTCGAATGGATGGGCGAGATC GATCCTCCTAACGGCCGGACCAACTACAACGAGAAGTTCAAGAGCAGAGTGACCATGA CCAGAGACACCAGCATCAGCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGACTGAGAAGCGACG ACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGGCATCTACTACGTGGACTACTGGGGCCAGGG CACCACAGTGACAGTTAGCTCTGGTGGCGGAGGTTCTGGCGGAGGTGGTAGTGGTG GCGGTGGAAGTGGTGGCGGCGGATCTGATATCGTGATGACACAGAGCCCTCTGAGCC TGCCTGTGACACTGGGAGAACCTGCCAGCATCAGCTGTAGAAGCAGCCAGAGCCTGGT GCACAGCAACGGCAATACCTACCTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGACAGTCTCCC CAGCTGCTGATCTACAAGGTGTCCAACAGATTACGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGG CAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGAAGATTAGCAGAGTGGAAGCCGAGGACGT GGGCGTGTACTACTGTAGCCAGTCTACCCACGTGCCACCTACCTTTGGCGGCGGAACAA AGCTGGAAATCAAG
--	---

(8) 이중 특이성 항체 TNF α i-hu3F07 LC

TNF α i-hu3F07 LC는 TNF α i 항체의 경쇄 불변영역 C말단에, 항-OX40L 항체 hu3F07의 중쇄 가변영역(서열번호 41)과 항-OX40L 항체 hu3F07의 경쇄 가변영역(서열번호 42)이 링커(서열번호 32)로 연결된 항-OX40L 항체 hu3F07 항체의 결합단편(ScFv)이, 링커(서열번호 31)로 연결되었다.

이중 특이성 항체 TNF α i-02C09 LC는 발현벡터 pcDNA3.1(Invitrogen)와 FreeStyle™ 293-F의 동물세포주를 이용하여 제작하였다. 구체적인 배양 조건, 배양 방법 및 정제 방법은 상기 (1) 항 OX40L 항체 02C09에서 설명한 것과 실질적으로 동일하게 수행하였다.

[표 23] TNF α i-hu3F07 LC의 경쇄

TNF α i 경쇄-링커- 항-OX40L 항체 hu3F07 가변영역	
아미노산 서열 (서열번호 71)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTIS SLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASV CLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC GGGGSGGGSGGGGSQVQLV QSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFPDYWMHWVRQAPGQGLEWMGEIDPPNGRTN YN EKF KSRVTMT RDTSISTAYMEL SRLRSDDTAVYYCARGIYYVDYWQGTTVT VSSGGGGS GGGGSGGGSGGGGS DIVMTQSPLSLPVTLGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQ KPGQSPQLLIYKVS NRFGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCSQSTHVPPTFG

	GGTKLEIK
핵산 (DNA) 서열 (서열번호 72)	GATATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGCGATAGAGT GACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGCATCAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGC AGAAGCCCGGAAAGGCCCCCTAAGCTGCTGATCTATGCCGCTCTACACTGCAGAGC GGCGTGCCATCTAGATTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCTGACAAT TTCTAGCCTGCAGCCTGAGGACGTGGCCACCTACTACTGCCAGAGATAACAAGAG CCCCTTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCGGCG CCATCTGTCTTCATCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTG TGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAAC GCCCTCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCA ACAGGGGAGAGTGTGGTGGTGGCGGATCTGGCGGCGGAGGAAGCGGAGGCGGAG GCTCCCAAGTTCAACTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCG TGAAGGTGTCCTGCAAGGCCTCTGGCTTACATTCCCCGACTACTGGATGCACTGGGTT CGACAGGCTCCAGGACAGGGACTCGAATGGATGGGCGAGATCGATCCTCTAACGGC CGGACCAACTACAACGAGAAGTTCAAGAGCAGAGTGACCATGACCAGAGACACCAGC ATCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGACTGAGAAGCGACGACACCGCCGTGACT ACTGTGCCAGAGGCATCTACTACGTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAAGTACAGT TAGCTCTGGTGGCGGAGGTTCTGGCGGAGGTGGTAGTGGTGGCGGTGGAAGTGGT GGCGGCGGATCTGATATCGTGATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACACTGG GAGAACCTGCCAGCATCAGCTGTAGAAGCAGCCAGAGCCTGGTGCACAGCAACGGCA ATACCTACCTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCCGACAGTCTCCCCAGCTGCTGATCTAC AAGGTGTCCAACAGATTAGCGGGCGTGCCCGATAGATTTCTGGCAGCGGCTCTGGCA CCGACTTACCCCTGAAGATTAGCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTG TAGCCAGTCTACCCACGTGCCACCTACCTTTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAAATCAAG

(9) 이중 특이성 항체 I3F07-TNF α i HC

상기 이중 특이성 항체 I3F07-TNF α i HC 는 항-OX40L 항체 I3F07의 중쇄 불변영역 C 말단에, TNF α i 항체(Humira) 중쇄 가변영역 (서열번호 35)과 TNF α i 항체 (Humira) 경쇄 가변영역(서열번호 36)이 링커(서열번호 32)로 연결된 TNF α i 항체의 결합단편(ScFv)이, 링커(서열번호 31)로 연결되었다.

이중 특이성 항체 I3F07-TNF α i HC는 발현벡터 pcDNA3.1(Invitrogen)와 FreeStyle™ 293-F(Invitrogen)의 동물세포주를 이용하여 제작하였다. 구체적인 배양 조건, 배양 방법 및 정제 방법은 상기 (1) 항 OX40L 항체 02C09에서 설명한 것과 실질적으로 동일하게 수행하였다.

[표 24] I3F07-TNF α i HC의 중쇄

I3F07 중쇄-링커- TNF α i 가변영역	
아미노산 서열 (서열번호 73)	QIQLAQSGAELVKPGASVKLSCKASGFTFPDYWMHWWKQRPQGGLWIGEIDPPN GRTNYNEKFKSKATLTVDSSNTAYMQLSRLTSEDSAVYYCARGIYYVDYWGGQTTL TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSWTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCPPCPAPEFLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK GGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVETRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGGGTLTVSS GGGGSGGGG

	SGGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLI YAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIK
핵산 (DNA) 서열 (서열번호 74)	CAGATT CAGCTGGCTCAGTCTGGCGCCGAAC TTGTGAAACCTGGCGCCTCTGTGA AGCTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTT CACCTT CTGACTACTGGATGCACTGGGT CAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTCGAATGGATCGGCGAGATCGATCCTCCTAA CGGCCGGACCAACTACAACGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACCGTGG ACAGCAGCAGCAATACCGCCTACATGCAGCTGAGCAGACTGACCTCTGAGGACA GCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGGCATCTACTACGTGGACTACTGGGGCCAGG GCACAACCCTGACAGTTTCTTCT GCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGC GCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG CACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCAT GCCCAGCACCTGAGTTCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCTTCCCCCAAAACCCAA GGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGC CAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA ACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG AGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGCCTCCCGTCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGG AATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACAGAAAGAG CCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAAGGTGGTGGCGGATCTGGCGGCGGAGGAAGCGGAG GCGGAGGCTCCGAAGTGCAACTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGAA GAAGCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTT CACCTTCGATGATTATGCCATGCAC TGGGTCCGACAGGCCCTGGAAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCACTGGAACA GCGGCCACATCGATTACGCCGATAGCGTGGAAGGCCGGTTCACCATCAGCAGAGACAA

	CGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGT GTACTACTGTGCCAAAGTGTCTTACCTGAGCACCGCCTCCAGCCTGGATTATTGGGGAC AGGGCACACTGGTCACAGTGTCTCT GGTGGCGGAGGTTCTGGCGGAGGTGGTAGT GGTGGCGGTGGAAGTGGTGGCGGCGGATCT GATATCCAGATGACACAGAGCCCTAG CAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGCGATAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGC ATCAGAAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGAAAGGCCCTAAGCTGCTGA TCTATGCCGCCTCTACACTGCAGAGCGGCGTGCCATCTAGATTTTCTGGCAGCGGCTCT GGCACCGACTTCACCCTGACAATTTCTAGCCTGCAGCCTGAGGACGTGGCCACCTACTA CTGCCAGAGATACAACAGAGCCCCTTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAAT CAAG
--	---

(10) 이중 특이성 항체 I3F07-TNF α i LC

I3F07-TNF α i LC는 항-OX40L 항체 I3F07의 경쇄 불변영역 C말단에, Humira 중쇄 가변영역 (서열번호 35)과 Humira 경쇄 가변영역(서열번호 36)이 링커(서열번호 32)로 연결된 TNF α i 항체의 결합단편(ScFv)이, 링커(서열번호 31)로 연결되었다.

이중 특이성 항체 I3F07-TNF α i LC는 발현벡터 pcDNA3.1(Invitrogen)와 FreeStyle™ 293-F(Invitrogen)의 동물세포주를 이용하여 제작하였다. 구체적인 배양 조건, 배양 방법 및 정제 방법은 상기 (1) 항 OX40L 항체 02C09에서 설명한 것과 실질적으로 동일하게 수행하였다.

[표 25] I3F07-TNF α i LC의 경쇄

I3F07 경쇄-링커- TNF α i 가변영역	
아미노산 서열 (서열번호 75)	DIVLTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSN RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPTFGGGGSKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKLEWVSATWNSGHID YADSVETRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLVTV SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIRNYLAW YQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQRYNRPYT FGQGTKVEIK
핵산 (DNA) 서열 (서열번호 76)	GATATCGTGCTGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTTTCTCTGGGAGATCAGG CCAGCATCAGCTGCAGATCCTCTCAGAGCCTGGTGACAGCAACGGCAATACCT ACCTGCACTGGTATCTGCAGAAAGCCCGCCAGTCTCCTAAGCTGCTGATCTACAA GGTGTCCAACAGGTTAGCGGGCGTGCCGATAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGG CACCGACTTCACCCTGAAGATTTCTAGAGTGGAAGCCGAGGACCTGGGCGTGTA CTTCTGTTCTCAGTCTACCCACGTGCCACCTACCTTTGGCGGCGGAAGCAAGCTG GAAATCAAGCGTACGGTGGCGGCGCCATCTGTCTTCATCTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGC CAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTC ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAG CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGTGGTGGCGGATCTG GCGGCGGAGGAAGCGGAGGCGGAGGCTCCGAAAGTGCAACTGGTTGAATCTGGCGG AGGACTGGTGCAGCCTGGAAGAAGCCTGAGACTGTCTGTGCCGCCAGCGGCTTACC TTCGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGACAGGCCCTGGAAAAGGACTTGAATGGGT GTCCGCCATCACCTGGAACAGCGGCCACATCGATTACGCCGATAGCGTGGAAGGCCGG TTCACCATCAGCAGAGACAACGCCAAGAAGCAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGA GAGCCGAGGACACCGCCGTGTAATACTGTGCCAAAGTGTCTTACCTGAGCACCGCCTCC

	AGCCTGGATTATTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGCCTCT GGTGGCGGAGGT TCTGGCGGAGGTGGTAGTGGTGGCGGTGGAAGTGGTGGCGGCGGATCT GATATCCA GATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGCGATAGAGTGACCATCACCT GTAGAGCCAGCCAGGGCATCAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGAA AGGCCCCTAAGCTGCTGATCTATGCCGCCTCTACACTGCAGAGCGGCGTGCCATCTAGA TTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAATTTCTAGCCTGCAGCCTGA GGACGTGGCCACCTACTACTGCCAGAGATACAACAGAGCCCCTTACACCTTCGGCCAG GGCACCAAGGTGGAAATCAAG
--	--

(11) 이중 특이성 항체 TNF α i-I3F07 HC

TNF α i-I3F07 HC는 TNF α i 항체의 중쇄 불변영역 C말단에, 항-OX40L 항체 I3F07의 중쇄 가변영역(서열번호 53)과 항-OX40L 항체 I3F07의 경쇄 가변영역(서열번호 54)이 링커(서열번호 32)로 연결된 항-OX40L 항체 I3F07의 항체의 결합단편(ScFv)이, 링커(서열번호 31)로 연결되었다.

이중 특이성 항체 TNF α i-I3F07 HC는 발현벡터 pcDNA3.1(Invitrogen)와 FreeStyle™ 293-F의 동물세포주를 이용하여 제작하였다. 구체적인 배양 조건, 배양 방법 및 정제 방법은 상기 (1) 항 OX40L 항체 02C09에서 설명한 것과 실질적으로 동일하게 수행하였다.

[표 26] TNF α i-I3F07 HC의 중쇄

TNF α 중쇄-링커- 항-OX40L 항체 I3F07 가변영역	
아미노산 서열 (서열번호 77)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNS GHIDYADSVEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWG QGTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVWTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPAPAF LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKGGGGSGGGSGGGGSQIQLAQSGAE LVKPGASVKLSCKASGFTFPDYWMHWVKQRPGQGLEWIGEDPPNGRTNYNEKFKSKAT LTVDSSTAYMQLSRLTSEDSAVYYCARGIYVDYWGQGTLTVSSGGGGSGGGSGGG GGSGGGGSDIVLTQSPSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLL IKVSNRFGSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHPPTFGGGSKLEIK
핵산 (DNA) 서열 (서열번호 78)	GAAGTGCAACTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGAAGAAGCCTG AGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCGATGATTATGCCATGCACTGGGTC CGACAGGCCCCTGAAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCACCTGGAACAGCG GCCACATCGATTACGCCGATAGCGTGGAAGGCCGTTACCATCAGCAGAGACAA CGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCC GTGTACTACTGTGCCAAAGTGTCTTACCTGAGCACCGCCTCCAGCCTGGATTATTGG GGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTCTGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTC CCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTG GTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATG CCCACCATGCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAA AACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGA CGTGAGCCAGGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAA

	GGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACAC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAAG GGTGGTGGCGGATCTGGCGGCGGAGGA AGCGGAGGCGGAGGCTCC CAGATTCAGCTGGCTCAGTCTGGCGCCGAACCTTGTA ACCTGGCGCCTCTGTGAAGCTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTTACCTTTCCTGACTA CTGGATGCACTGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTCGAATGGATCGGCGAG ATCGATCCTCCTAACGGCCGGACCAACTACAACGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCAC ACTGACCGTGGACAGCAGCAGCAATACCGCCTACATGCAGCTGAGCAGACTGACCT CTGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGGCATCTACTACGTGGACTACTGGG GCCAGGGCACAACCCTGACAGTTTCTTCT GGTGGCGGAGGTTCTGGCGGAGGTGGT AGTGGTGGCGGTGGAAGTGGTGGCGGCGGATCT GATATCGTGCTGACACAGAGCC CTCTGAGCCTGCCTGTTTCTCTGGGAGATCAGGCCAGCATCAGCTGCAGATCCTCTC AGAGCCTGGTGCACAGCAACGGCAATACCTACCTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCC GGCCAGTCTCCTAAGCTGCTGATCTACAAGGTGTCCAACAGGTTAGCGGCGTGCCC GATAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTACCCTGAAGATTCTAGAGTG GAAGCCGAGGACCTGGGCGTGTACTTCTGTTCTCAGTCTACCCACGTGCCACCTACC TTTGGCGGCGGAAGCAAGCTGGAAATCAAG
--	--

(12) 이중 특이성 항체 TNF α i-I3F07 LC

TNF α i-I3F07 LC는 TNF α i 항체의 경쇄 불변영역 C말단에, 항-OX40L 항체 I3F07의 중쇄 가변영역(서열번호 53)과 항-OX40L 항체 I3F07의 경쇄 가변영역(서열번호 54)이 링커(서열번호 32)로 연결된, 항-OX40L 항체 I3F07의

항체의 결합단편(ScFv)이 링커(서열번호 31)로 연결되었다.

이중 특이성 항체 TNF α i-13F07 LC는 발현벡터 pcDNA3.1(Invitrogen)와 FreeStyle™ 293-F의 동물세포주를 이용하여 제작하였다. 구체적인 배양 조건, 배양 방법 및 정제 방법은 상기 (1) 항 OX40L 항체 02C09에서 설명한 것과 실질적으로 동일하게 수행하였다.

[표 27] TNF α i-13F07 LC의 경쇄

TNF α i 경쇄-링커- 항-OX40L 항체 13F07 가변영역	
아미노산 서열 (서열번호 79)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC GGGGSGGGGSGGGG SQIQLA QSGAELVKPGASVKLSCKASGFTFPDYWMHWVKRPGQGLEWIGIDPPNGRTNYNEK FKSKATLTVDSSNTAYMQLSRLTSESAVYYCARGIYYVDYWGQGTTLTVSS GGGGSGG GGSGGGGSGGGG S DIVLTQSPLSLPVSLGDAQISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPG QSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHPPTFGGGSK LEIK
핵산 (DNA) 서열 (서열번호 80)	GATATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGCGATAGAGT GACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGCATCAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGC AGAAGCCCGGAAAGGCCCCCTAAGCTGCTGATCTATGCCGCTCTACACTGCAGAGC GGCGTGCCATCTAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAAT TTCTAGCCTGCAGCCTGAGGACGTGGCCACCTACTACTGCCAGAGATAACAACAGAG CCCCTTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCGGCG CCATCTGTCTTCATCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTG

	TGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAAC GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA ACAGGGGAGAGTGTGGTGGTGGCGGATCTGGCGGCGGAGGAAGCGGAGGCGGAG GCTCCCAGATTCAGCTGGCTCAGTCTGGCGCCGAACCTGTGAAACCTGGCGCCTCTG TGAAGCTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTTCACCTTTCCTGACTACTGGATGCACTGGG TCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTCGAATGGATCGGCGAGATCGATCCTCCTAAC GGCCGGACCAACTACAACGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACCGTGGACA GCAGCAGCAATACCGCCTACATGCAGCTGAGCAGACTGACCTCTGAGGACAGCGCC GTGTACTACTGTCCAGAGGCATCTACTACGTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAAC CCTGACAGTTTCTTCTGGTGGCGGAGGTTCTGGCGGAGGTGGTAGTGGTGGCGGTG GAAGTGGTGGCGGCGGATCTGATATCGTGCTGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCT GTTCTCTGGGAGATCAGGCCAGCATCAGCTGCAGATCCTCTCAGAGCCTGGTGCAC AGCAACGGCAATACCTACCTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCTCCTAAG CTGCTGATCTACAAGGTGTCCAACAGGTTAGCGGGCGTGCCCGATAGATTTCTGGC TCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCTGAAGATTTCTAGAGTGGAAGCCGAGGACCT GGGCGTGACTTCTGTTCTCAGTCTACCCACGTGCCACCTACCTTTGGCGGCGGAAG CAAGCTGGAAATCAAG
--	--

또한, 상기 실시예 2의 항 OX40L 항체 생산(제조) 방법과 실질적으로 동일한 방법으로, 항-OX40L 항체인 oxelumab의 VH와 VL의 sequence(서열번호 33 및 34)를 이용하여 reference 항체인 항-OX40L 항체 (이하, Ref. Ab 또는 04L)를 제조하고, 항 TNF α 항체인 Humira의 VH와 VL sequence(서열번호 35 및 36)를 이용하여 reference 항체인 항 TNF α 항체(이하, Ref. TNF α i 또는 Humira)를

제조하였다.

[표 28] O4L의 중쇄 및 경쇄 서열

O4L	
중쇄 (서열번호 81)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVSIISGSGGFTYYAD SVKGRFTISRDNSTTLTYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRLVAPGTFDYWGQAGALVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWT VPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVWDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVHLQDWL NGKEYCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGK
경쇄 (서열번호 82)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISWLAIFYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSTYPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCCLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

[표 29] Ref. TNF α i의 중쇄 및 경쇄 서열

Ref. TNF α i	
중쇄 (서열번호 83)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDY ADSVVEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VTVPSDDLTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVWDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVHLQD WLNKEYCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY

	TQKSLSLSLGK
경쇄 (서열번호 84)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

상기 제조한 항체 04L 및 상기 Ref. TNF α i를 이용하여, 상기 실시예 3의
이중 특이성 항체 생산(제조) 방법과 실질적으로 동일한 방법으로, 항-0X40L-
TNF α i HC 및 LC 항체(이하, 각각 04L-TNF α i HC 및 04L-TNF α i LC)를 제조하였다.

[표 30] 04L-TNF α i HC의 중쇄 서열

04L 중쇄-링커-TNF α i 가변영역	
아미노산 서열 (서열번호 85)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVSIISGSGGFTYY ADSVKGRFTISRDNSTLTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRLVAPGTFDYWGQALVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRWV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK GGGGSGGGSGGGGSE QLVESGGGLVQPGRSLRL SCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVAITWNSGHIDYADSVETRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSS GGGGSGGGSGGGGS GGGGS DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQ

	SGVPSRFSGSGSGDFTLTISLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIK
핵산 (DNA) 서열 (서열번호 86)	GAGGTGCAGCTGCTGGAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTG AGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAACAGCTACGCCATGAGCTGGGT CCGACAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCATCATCAGCGGCAGCGGC GGCTTTACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACA ACAGCCGGACCACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGC CGTGTACTACTGCGCCAAGGACAGACTGGTGGCCCCAGGCACCTTCGACTATTGGG GACAGGGCGCCCTCGTGACCGTGTCTCTGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGCTTCCC CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGT CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGC GGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCC CACCATGCCCAGCACCTGAGTTCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTCCCCCAAAA CCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG CGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGC CCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACC AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGAGACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTC CGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGA GGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGA AGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAAGGGTGGTGGCGGATCTGGCGGCGGAGGAAGC GGAGGCGGAGGCTCCGAAGTGCAACTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCC TGGAAGAAGCCTGAGACTGTCTTGCCGCCAGCGGCTTACCTTCGATGATTATGCCA TGCACTGGGTCCGACAGGCCCTGGAAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCACCTG GAACAGCGGCCACATCGATTACGCCGATAGCGTGGAAGGCCGGTTCACCATCAGCAGA

	GACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACC GCCGTGTACTACTGTGCCAAAGTGTCTTACCTGAGCACCGCCTCCAGCCTGGATTATTGG GGACAGGGGCACACTGGTCACAGTGTCTCT GGTGGCGGAGGTTCTGGCGGAGGTGG TAGTGGTGGCGGTGGAAGTGGTGGCGGCGGATCT GATATCCAGATGACACAGAGCC CTAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGCGATAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAG GGCATCAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGAAAGGCCCTAAGCTGC TGATCTATGCCGCCTCTACACTGCAGAGCGGCGTGCCATCTAGATTTTCTGGCAGCGGC TCTGGCACCGACTTCACCTGACAATTTCTAGCCTGCAGCCTGAGGACGTGGCCACCTA CTACTGCCAGAGATACAACAGAGCCCCTTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGA AATCAAG
--	--

[표 31] O4L-TNF α i LC의 경쇄

O4L 경쇄-링커-TNF α i 가변영역	
아미노산 서열 (서열번호 87)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK RTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFPAKQVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC GGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKLEWWSAITWNSGHIDYADSV GRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLVTVSS GGGG SGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPG KAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQRYNRPYTFGQGTK VEIK
핵산 (DNA) 서열 (서열번호 88)	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGA GTGACCATCACCTGTGGGCCAGCCAGGGCATCAGCAGCTGGCTGGCCTGGTATCA GCAGAAGCCCGAGAAGGCCCCCAAGAGCCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAG AGCGGCGTGCCAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCTGA CCATCAGCAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAAC

	AGCTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGC GGCGCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTC TGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCAAAGTACAGTGGAAGGTGG ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGG ACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAC ACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG CTTCAACAGGGGAGAGTGTGGTGGTGGCGGATCTGGCGGCGGAGGAAGCGGAGG CGGAGGCTCCGAAGTGCAACTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGAAG AAGCCTGAGACTGTCTGTGCCGCCAGCGGCTTACCTTCGATGATTATGCCATGCACT GGGTCCGACAGGCCCTGGAAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCACCTGGAACA GCGGCCACATCGATTACGCCGATAGCGTGGAAGGCCGTTACCATCAGCAGAGACAA CGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGT GTACTACTGTGCCAAAGTGTCTTACCTGAGCACCGCCTCCAGCCTGGATTATTGGGGAC AGGGCACACTGGTCACAGTGTCTCTGGTGGCGGAGGTTCTGGCGGAGGTGGTAGT GGTGGCGGTGGAAGTGGTGGCGGCGGATCTGATATCCAGATGACACAGAGCCCTAG CAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGCGATAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGC ATCAGAAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGAAAGGCCCTAAGCTGCTGA TCTATGCCGCCTCTACACTGCAGAGCGGCGTGCCATCTAGATTTTCTGGCAGCGGCTCT GGCACCGACTTCACCCTGACAATTTCTAGCCTGCAGCCTGAGGACGTGGCCACCTACTA CTGCCAGAGATACAACAGAGCCCCTTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAAT CAAG
--	---

실험예 1: 항체 분석

실시예 2에서 수득된 항-OX40L 항체 및 실시예 3에서 수득된 이중 특이성 항체를 SDS-PAGE 분석하여 그 결과를 도 2에 나타내었다.

실험예 2: 항 OX40L 항체에 대한 OX40L 항원의 epitope

항 OX40L 항체에 대한 OX40L 항원의 epitope을 HDX-MS 기술을 사용하여 분석을 수행하였다. 0.12 ~2.00 M Urea, 0.12~1.00 M TCEP(pH 2.6) quench buffer와 pepsin column을 이용하였고, 5개의 time points에 대해 D₂O 기반 완충 용액으로 labeling하여 분석하였다. 데이터는 PLGS와 DynamX를 이용하여 프로세싱하여 도 3과 같은 결과를 얻었다.

실험예 3: 항체 특성

실험예 3-1. 항 OX40L 항체 및 이중 특이성 항체의 항원에 대한 평형 해리

상수(K_D) 분석

상기 실시예 2 및 3에서 분리 정제된 항 OX40L 항체 및 OX40L와 TNF α 를 동시에 제어하는 이중 특이성 항체의 항원에 대한 친화도를 다음과 같이 분석하였다.

상기 항체 중 항 OX40L 항체는 인간 OX40L(서열번호 2)와 결합력을 확인하였고, OX40L, TNF α 이중 특이성 항체는 인간 OX40L(서열번호 2)와 인간

TNF α (아크로바이오시스템즈사의 TNF-H5228)에 대하여 각각 결합력을 확인하였다(표 32).

SPR(Surface Plasmon Resonance) 분석은 Bcore T200을 이용하였고 running buffer는 HBS-EP(10 mM HEPES, pH7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.15% surfactant P20)를 사용하였다. Human antibody capture kit(anti-hFc antibody)을 이용하여 amine coupling 방법으로 CM5 칩 표면에 고정하였다. 인간 OX40L 또는 인간 TNF α 를 running buffer로 10nM로 희석한 뒤, 1/2 연속 희석하여 5 농도 구간에서 분석하였다. 항체의 농도는 항체를 0.2 μ m 필터로 멸균 여과하고, 흡광도(A280)를 측정하여 확인하였다. 분석 시료는 최소 희석 배수 100 이상이 되도록 고순도/고농도로 준비하여 완충액 변화에 의한 영향(Buffer effect)을 최소화하였다. 모든 분석 간에는 재활성화 단계(regeneration step)를 두어 실험의 기준선이 일정하게 유지될 수 있도록 하였고, Biacore 분석 결과는 표 32 및 도 4와 같다.

도 4에서 Ag1은 인간 OX40L를 나타내고, Ag2는 인간 TNF α 를 나타낸다.

[표 32]

Antigen	Antibody	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD(M)	Rmax(RU)	Chi²(RU²)	U-value	SE(ka)	SE(kd)
OX40L	Hu3F07	1.27E+06	3.57E-04	2.82E-10	40.4	0.2	3.1	8.00E+02	1.70E-06
	10H07	1.69E+06	4.98E-04	2.95E-10	38	0.8	4.1	1.90E+03	3.00E-06
	21G07	1.08E+06	6.50E-04	6.03E-10	36.7	0.4	2.4	1.10E+03	2.70E-06
	02C09	1.16E+06	4.08E-04	3.52E-10	38	0.7	5.3	1.40E+03	3.10E-06
	O4L-TNF α HC	1.23E+06	5.76E-04	4.67E-10	25.8	0.1	2.4	3.80E+03	2.10E-06
	02C09-TNF α HC	1.07E+06	5.03E-04	4.72E-10	32.4	0.4	3.1	1.20E+03	3.00E-06
	Hu3F07-TNF α HC	1.38E+06	6.19E-04	4.50E-10	26.8	0.1	1.9	1.00E+03	2.00E-06
TNF α	O4L-TNF α HC	4.38E+05	2.03E-04	4.64E-10	49.1	0.8	6.9	3.40E+02	2.20E-06
	02C09-TNF α HC	4.16E+05	9.55E-05	2.30E-10	85.7	1.9	11.6	1.10E+03	1.90E-06
	Hu3F07-TNF α HC	4.55E+05	2.03E-04	4.46E-10	48	0.7	6.9	3.50E+02	2.20E-06

(상기 표에서, aE+b는 $a \times 10^b$ 을 나타내고, aE-b는 $a \times 10^{-b}$ 를 나타낸다.)

상기 표 32에서 확인되는 바와 같이, 실시예 2의 항-OX40L 항체는 OX40L, 실시예 3의 이중 특이성 항체는 OX40L 및 TNF α 모두에 강하게 결합하는 것을 확인할 수 있었다. 구체적으로, 항OX40L 항체 및 이중 특이성 항체 모두 OX40L와 결합력은 nM 수준이고, 특히, 이중 특이성 항체는 TNF α 와 결합력도 nM수준인 것을 확인하였다. 상기의 결과는 이중 특이성 항체가 각각의 항원에 대하여 결합능이 방해받지 않고 높은 수준을 유지한다는 것을 시사한다.

실험예 3-2. 항 OX40L 항체 및 이중 특이성 항체의 열 안정성 테스트

실시예 3의 이중 특이성 항체 및 실시예 2의 항OX40L 항체의 열 안정성에 대한 특성 확인을 위한 테스트를 진행하였다(표 33).

항체를 DPBS에 희석하여 3 μ M/ 45 μ L를 만든 후, 200x sypro orange dye(#S6650, Thermo) 5 μ L와 혼합해 qPCR Tube(#B77009, B57651, bioplastics)에 50 μ L씩 분주한다. Biorad CFX96 real time PCR 기기를 사용하여 qPCR을 실시하였다. qPCR 조건은 25°C에서 30초 반응 후, 99도까지 1°C씩 증가시키되 각 온도에 1분간 반응시키고 마지막 25°C 10초 반응을 시켜 마무리하였다. 항체 구조가 풀리는 속도 상수로는 T_m (Melting temperature, 용융 온도)을 사용하였고 그 결과는 하기 표 33과 같다.

[표 33]

Sample	Melt T _m (°C)	Sample	Melt T _m (°C)
Hu3F07	63	Hu3F07-TNF α i HC	64.5
02C09	64	Hu3F07-TNF α i LC	59.5
10H07	59	02C09-TNF α i HC	61.5

21G07	59	02C09-TNF α LC	60.5
-------	----	-----------------------	------

위 표에서 확인되는 바와 같이, 항 OX40L 항체와 이중 특이성 항체의 용융온도는 59 ~ 65°C 사이였으며, 상기 결과는 이중 특이성 항체도 항 OX40L 항체와 유사한 열안정성을 가진다는 것을 나타낸다.

실험예 3-3. 항 OX40L 항체 및 이중 특이성 항체의 PK(Pharmacokinetics analysis)

실시에 3의 이중 특이성 항체 및 실시에 2의 항OX40L 항체를 투약 시 약물 동태학을 확인하기 위해 분석을 진행하였다(표 34).

약물 반응이 일정하고 안정적인 공급 체계를 갖추고 있어 약물 동태 시험에 널리 사용되는 Sprague-Dawley 계통의 Rat 수컷을 사용하였다. 비절식으로 진행하며 Sprague-Dawley (SD) rat 7주령 수컷을 각 3마리 사용하였고 5 mpk (2.5 ~ 2.4 mg/ml)로 단회 정맥 투여 (IV bolus) 했다. 투여 후 3min, 3, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168-hr으로 총 10차례 경정맥 통해 약 150 ul/time point 채혈하였고

항응고제는 Sodium heparin을 사용하여 분리하였으며 시료는 원심분리 (12,000rpm, 3 min)를 통해 약 70 u의 혈장을 얻은 직 후 초저온 냉동고에 보관되었다. 실험 진행 시 1일 1회이상 일반증상을 관찰하였다. 마지막 채혈 후 실험동물은 CO₂ 흡입으로 안락사 시켰다.

PK시험을 통해 얻은 Plasma은 기기인 Gyrolab xPlore®(Cat. #P0020300, GYROS PROTEIN)와 Gyrolab PK kit(Cat. # P0020499, GYROS PROTEIN)를 통해 분석을 진행하였다. Gyrolab에서 나온 결과 값을 BA Calc 2007 1.0.0 또는 PK Solver 2.0 프로그램을 이용하여 AUC(last), AUC(inf), Cmax, Tmax, Half life 등의 parameter 값을 얻었고 그 결과는 표 34와 같다.

[표 34]

Sample	Half life (Day)	AUC(Last) (µg hr/mL)	AUC(Inf) (µg hr/mL)	Cmax (µg/mL)
Hu3F07	3.6	5273	7863	107
Hu3F07-TNF α i HC	5.1	5299	8453	101
Hu3F07-TNF α i LC	3.7	4848	6918	91
02C09	4.0	3958	5680	83
02C09-TNF α i HC	6.0	1348	2144	41
02C09-TNF α i LC	3.6	3425	4406	89

실시예 2의 항 OX40L 항체의 반감기는 각각 3.6 day, 4.0 day이고, 실시예 3의 이중 특이성 항체는 3.6 ~6.0 day로 관찰되었다.

따라서 인간에서도 약 2주 이상 반감기를 나타낼 수 있을 것임을 알 수 있었다.

실험예 4: 항체의 효능

실험예 4-1. 항체의 신호 억제능 평가 (1)

실시예 2의 항 OX40L 항체와 실시예 3의 이중 특이성 항체(Hu3F07-TNF α i HC, 02C09-TNF α i HC, 04L-TNF α i HC)의 활성 평가 실험은 OX40L/OX40 차단 바이오 어세이 키트(blockade bioassay kit: Promega CS197706)와 TNF α /TNF α Rc 차단 바이오 어세이 키트(blockade bioassay kit: Promega CS177503)를 이용하여 평가하였다(표 35, 도 5).

(1) OX40L/OX40 차단 바이오 어세이 키트를 이용하여 실시예 2의 항 OX40L 항체 및 실시예 3의 이중 특이성 항체 활성을 평가하였다.

NF κ B-luc2/OX40 Jurkat cell을 RPMI1640(10%FBS) 배양액에 풀어 37°C, 5%

CO₂ incubator에서 하룻밤 정치 배양하였다. 다음날, 세포에 반응시킬 항원과 항체를 준비하였다. RPMI1640(10%FBS) 배양액에 OX40L 항원을 세포에 넣었을 때 최종농도를 15 ng/mL가 되도록 준비하였다. 항 OX40L 항체와 이중 특이성 항체 및 대조 항체는 세포에 넣었을 때 시작 농도의 최종농도가 33 µg/mL이 되도록 희석한 후 1/3씩 계단 희석하여 9단계로 준비하였다. 10번째 농도는 0으로 배양액으로 대체하여 총 10단계의 농도 구배가 되도록 준비하였다. 준비된 항원 희석액과 항체 희석액을 각각 25 µL씩 세포에 분주하였다. 각 시료가 3반복이 되도록 분주하였다. 분주 후 세포와 항원 희석액, 항체 희석액 총 100 µL가 되도록 하였다. CO₂ incubator에 약 5시간 반응시켰다.

Bio-Glo를 75 µL씩 분주해 넣었고 약 10분간 반응시킨 후 microplatereader에 luminescence로 시료를 분석 후 4-parameter(X축 log(concentration))로 분석하였다.

항체의 농도단위인 µg/mL로 IC₅₀ 분석결과를 nM로 환산하여 최종 IC₅₀을 구하였다. 이는 항 OX40L 항체는 150 kDa이고 이중 특이성 항체는 200 kDa으로 동일하게 보기 위함이었다.

(2) TNF α /TNF α Rc 차단 바이오 어세이 키트를 이용하여 이중 특이성 항체 활성을 평가하였다.

NF κ B-RE HEK293 cell DMEM(10%FBS) 배양액에 풀어 37°C, 5% CO₂ incubator에서 정치 배양하였다. 세포에 반응시킬 항원과 항체를 준비하였다. DMEM(10%FBS) 배양액에 TNF α 항원을 희석하여 세포에 반응시킬 때 최종 농도는 3 ng/mL이 되게 하였다. 이중 특이성 항체와 대조 항체인 Humira(Ref. TNF α i)의 시작 농도를 10 nM의 농도로 DMEM(10%FBS) 배양액에 희석한 후 1/2씩 계단 희석하여 8단계로 준비하였다. 세포에 반응시킬 때 최종 농도는 시작 농도가 0.8 nM이 되도록 하였다.

준비된 항원 희석액과 항체 희석액을 3:2로 섞어 20 μ L씩 세포에 분주하였다. 각 시료가 2반복이 되도록 분주하였다. 분주 후 CO₂ incubator에 약 4시간 반응시켰다.

Bio-Glo를 100 μ L씩 분주해 넣어 반응시키고 microplatereader에 luminescence로 시료를 분석 후 4-parameter(X축 log(concentration))로 분석하여 IC₅₀을 구하였다.

위 IC₅₀ 값은 하기 표 35 및 도 5와 같다.

[표 35]

Analysis	Sample	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (μg/mL)
OX40L blockade assay	Hu3F07	0.20	0.030
	02C09	0.78	0.117
	21G07	0.85	0.128
	10H07	0.41	0.061
	Hu3F07-TNFαi HC	0.21	0.041
	02C09-TNFαi HC	0.59	0.117
	O4L-TNFαi HC	1.23	0.246
	Ref. Ab	1.95	0.293
TNFα blockade assay	Hu3F07-TNFαi HC	0.057	-
	02C09-TNFαi HC	0.067	-
	O4L-TNFαi HC	0.056	-
	Humira (Ref, TNFαi)	0.063	-

상기 표 35 및 도 5에서 알 수 있는 바와 같이 실시예 2 및 3에 따른 이중 특이성 항체 및 항 OX40L 항체의 OX40L blocking 능력은 1.3×10^{-9} M(nM) 이하의 수준이고, 특히, 항 OX40L 항체의 OX40L blocking 능력은 0.9×10^{-9} M(nM) 이하의 수준이며, 이중 특이성 항체는 TNFα의 blocking 능력도 1×10^{-9} M(nM) 이하의 수준으로 현저히 우수한 blocking 능력을 나타내는 것을 알 수 있었다. 즉, 본

발명의 항OX40L 항체는 우수한 OX40L blocking 능력을 나타내며, 상기 항체를 이용하여 제조한 이중 특이성 항체 또한 OX40L에 대한 우수한 blocking 능력을 나타낼 뿐만 아니라, TNF α 에도 우수한 blocking 능력을 나타내는 것을 알 수 있다.

실험예 4-2. 항체의 신호 억제능 평가 (2)

실시예 3의 이중 특이성 항체(02C09-TNF α i LC, TNF α i-02C09 HC, TNF α i 02C09 LC)의 활성을 TNF α /TNF α Rc 차단 바이오 어세이 키트(blockade bioassay kit: Promega CS177503)를 이용하여 평가하였다(표 36). 구체적인 평가 조건 및 방법은 상기 실험예 4-1. 항체의 신호 억제능 평가(1)에서 설명한 것과 실질적으로 동일하다.

[표 36]

Analysis	Sample	IC50 (nM)
TNF α blockade assay	02C09-TNF α i LC	0.058
	TNF α i-02C09 HC	0.057
	TNF α i 02C09 LC	0.055

상기 표 36에서 알 수 있는 바와 같이, 실시예 3의 이중 특이성 항체

02C09-TNF α i LC, TNF α i-02C09 HC, TNF α i 02C09 LC의 TNF α blocking 능력은 1×10^{-9} M(nM) 이하의 수준으로, 우수한 blocking 능력을 나타내는 것을 알 수 있었다.

실험예 4-3. 항체의 신호 억제능 평가 (3)

실시예 3의 이중 특이성 항체(I3F07-TNF α i HC, I3F07-TNF α i LC, TNF α i-I3F07 HC, TNF α i-I3F07 LC)의 활성을 OX40L/OX40 차단 바이오 어세이 키트(blockade bioassay kit: Promega CS197706)와 TNF α /TNF α Rc 차단 바이오 어세이 키트(blockade bioassay kit: Promega CS177503)를 이용하여 평가하였다(표 37). 구체적인 평가 조건 및 방법은 상기 실험예 4-1. 항체의 신호 억제능 평가(1)에서 설명한 것과 실질적으로 동일하다.

[표 37]

Analysis	Sample	IC50 (nM)
OX40L blockade assay	I3F07-TNF α i HC	0.91
	I3F07-TNF α i LC	0.94
	TNF α i-I3F07 HC	0.80
	TNF α i-I3F07 LC	0.71
TNF α blockade assay	I3F07-TNF α i HC	0.055
	I3F07-TNF α i LC	0.077
	TNF α i-I3F07 HC	0.054

	TNF α -I3F07 LC	0.065
--	------------------------	-------

상기 표 37에서 알 수 있는 바와 같이, 실시예 3의 이중 특이성 항체의 OX40L blocking 능력은 1×10^{-9} M(nM) 이하의 수준이고, TNF α 의 blocking 능력도 1×10^{-9} M(nM) 이하의 수준으로 우수한 blocking 능력을 나타내는 것을 알 수 있었다.

실험예 4-4. 항체의 면역세포 활성화 저해능 평가

실시예 2의 항 OX40L 항체 및 실시예 3의 이중 특이성 항체의 효능을 평가하기 위하여 정상인 PBMC(peripheral blood mononuclear cell) 및 류마티스 관절염(RA) 환자의 PBMC를 이용해 면역세포의 활성화 저해능을 확인하였다(도 6).

상기 방법으로 정상인 PBMC 및 RA 환자의 PBMC에서 각각 T 세포를 분리하여 T 세포가 활성화되었을 때 분비되는 사이토카인인 IL-2의 분비 감소 수준을 분석하였다.

정상 및 환자 PBMC에서 각각 T 세포를 분획하기 위하여 anti CD3(R&D

systems, MAB100)를 100 ng/well로 희석하여 96 well에 약 16시간 5 ± 3 에서 부착시킨다. 부착액 제거 후 PBS로 세척해준다. LGM-3(10% FBS, 1%P/S)에 DNase I 을 20 U/mL 되도록 희석한 후 정상인 PBMC를 넣고 혼합액을 제조하고 원심분리(200g, 15분)하여 상층액 제거 후 LGM-3(10% FBS, 1%P/S)를 이용하여 정상인 PBMC가 1×10^6 cell/mL이 되도록 희석한 후 분주하였다. 인간 OX40L(ACROBIOSYSTEMS사, OXL-H52Q8)와 인간 TNF α (SINO BIOLOGICAL, 10602-HNA)를 LGM-3(10% FBS, 1%P/S)에 희석하여 분주 된 정상인 PBMC에 50 μ L씩 첨가하였다. 항 OX40L 항체 및 이중 특이성 항체를 LGM-3(10% FBS, 1%P/S)에 800 ng/mL로 제작한 후 1 nM이 되도록 희석하였다. PBMC에서 분리한 T 세포와 인간 OX40L, 인간 TNF α 를 넣은 plate에 50 μ L씩 분주하여 섞어 주었다. 약 24~72시간 후 상층액만 수거하여 IL-2를 측정하였고 그 결과를 도 6에 나타내었다.

도 6에서 A는 정상 PBMC 유래 T cell assay 결과, B는 환자 PBMC 유래 T cell assay 결과를 나타낸다.

도 6에서 확인되는 바와 같이, 본 발명의 이중 특이성 항체 투여 시 IL-2가 감소하는 경향을 보이는 것을 확인하였다. 특히, RA 환자 PBMC 유래 T cell

결과를 보면, 본 발명의 이중 특이성 항체는 Humira(Ref. TNF α i) 대비 RA 환자 PBMC 유래 T cell에서 IL-2 발현을 현저히 감소시켰음을 확인할 수 있다. 이것은 본 발명의 이중 특이성 항체가 RA에 효과적인 치료용 항체로서 작용할 수 있고, 특히, Humira에 불응성인 RA 환자에서도 효과적으로 작용할 수 있음을 의미한다.

따라서, 본 발명의 항 OX40L 항체와 이중 특이성 항체는 과활성화된 면역 체계를 진정시킬 수 있으며, 자가면역질환에 우수한 치료 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

OX40L(OX40 리간드)에 특이적으로 결합하고 OX40L와 OX40 수용체 사이의 상호작용을 저해하는, 항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

【청구항 2】

제1항에 있어서,

상기 항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 3 및 4로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 기재된 하나 이상의 에피토프에 결합하는 것인, 항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

【청구항 3】

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 OX40L에 1×10^{-9} M 이하의 K_D 로 결합하며, 여기서 상기 K_D 는 표면 플라스몬 공명 (surface plasmon resonance; Biacore) 분석으로 측정된 것인, 항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

【청구항 4】

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:

서열번호 12, 13 및 14로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 15, 16, 17 및 18로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 19, 20, 21 및 22로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 중쇄 CDR3;을 포함하는 중쇄 가변영역, 및

서열번호 23 및 24로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 25 및 26으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 27, 28, 29 및 30으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 경쇄 CDR3; 을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 것인, 항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

【청구항 5】

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:

(i) 서열번호 12로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 15로 기재된 중쇄 CDR2 및 서열번호 19로 기재된 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 23로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 25로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 27로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편;

(ii) 서열번호 13으로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 16으로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 20으로 기재된 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 24로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 26으로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 28로 기재된 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편;

(iii) 서열번호 13으로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 17로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 21로 기재된 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 24로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 26으로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 29로 기재된 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 또는

(iv) 서열번호 14 로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 18 로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 22 로 기재된 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 24로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 26으로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 30으로 기재된 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인,

항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

【청구항 6】

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:

서열번호 37, 41, 45, 49 및 53로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 중쇄 가변영역; 및

서열번호 38, 42, 46, 50 및 54로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 경쇄 가변영역을 포함하는 것인,

항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

【청구항 7】

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:

(a) 서열번호 37로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 38로 기재된 경쇄

가변영역;

(b) 서열번호 41로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 42으로 기재된 경쇄

가변영역;

(c) 서열번호 45로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 46으로 기재된 경쇄

가변영역;

(d) 서열번호 49로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 50으로 기재된 경쇄

가변영역; 또는

(e) 서열번호 53으로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 54로 기재된 경쇄

가변영역;

을 포함하는 것인, 항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

【청구항 8】

제7항에 있어서,

상기 항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:

서열번호 5, 6, 7, 및 8 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열을 기재된 중쇄 불변영역; 및

서열번호 10의 아미노산 서열로 기재된 경쇄 불변영역을 포함하는 것인,

항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

【청구항 9】

OX40L에 특이적으로 결합하는 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합단편; 및 TNF α 에 특이적으로 결합하는 항 TNF α 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 이중 특이성(bispecific) 항체.

【청구항 10】

제9항에 있어서,

상기 이중 특이성 항체는 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 항 TNF α 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 연결된 것인, 이중 특이성 항체.

【청구항 11】

제10항에 있어서,

상기 항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 3 및 4로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 기재된 하나 이상의 에피토프에 결합하는 것인, 이중 특이성 항체.

【청구항 12】

제10항에 있어서,

상기 항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:

서열번호 12, 13 및 14로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 15, 16, 17 및 18로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 19, 20, 21 및 22로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 중쇄 CDR3;을 포함하는 중쇄 가변영역, 및

서열번호 23 및 24로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 25 및 26으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 27, 28, 29 및 30으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 경쇄 CDR3;을 포함하는 경쇄

가변영역을 포함하는 것인, 이중 특이성 항체.

【청구항 13】

제10항에 있어서,

상기 항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:

(i) 서열번호 12로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 15로 기재된 중쇄 CDR2 및 서열번호 19로 기재된 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 23로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 25로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 27로 기재된 중쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편;

(ii) 서열번호 13으로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 16으로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 20으로 기재된 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 24로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 26으로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 28로 기재된 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편;

(iii) 서열번호 13으로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 17로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 21로 기재된 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및

서열번호 24로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 26으로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 29로 기재된 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 또는

(iv) 서열번호 14 로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 18 로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 22 로 기재된 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 24로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 26으로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 30으로 기재된 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인, 이중 특이성 항체.

【청구항 14】

제10항에 있어서,

상기 항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:

서열번호 33, 37, 41, 45, 49 및 53로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 중쇄 가변영역; 및

서열번호 34, 38, 42, 46, 50 및 54로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열로 기재된 경쇄 가변영역;을 포함하는 것인, 이중 특이성 항체.

【청구항 15】

제10항에 있어서,

상기 항OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:

(a) 서열번호 37로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 38로 기재된 경쇄

가변영역;

(b) 서열번호 41로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 42로 기재된 경쇄

가변영역;

(c) 서열번호 45로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 46으로 기재된 경쇄

가변영역;

(d) 서열번호 49로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 50으로 기재된 경쇄

가변영역;

(e) 서열번호 53으로 기재된 중쇄 가변영역 및 서열번호 54로 기재된 경쇄

가변영역; 또는

(f) 서열번호 33으로 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및

서열번호 34로 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변영역;

을 포함하는 것인, 이중 특이성 항체.

【청구항 16】

제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항TNF α 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:

서열번호 89로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 90으로 기재된 중쇄 CDR2; 및
서열번호 91로 기재된 중쇄 CDR3;을 포함하는 중쇄 가변영역, 및

서열번호 92로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 93으로 기재된 경쇄 CDR2; 및
서열번호 94로 기재된 경쇄 CDR3;을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 것인,
이중 특이성 항체.

【청구항 17】

제16항에 있어서,

상기 항 TNF α 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 서열번호 35로 기재된
중쇄 가변영역 및 서열번호 36으로 기재된 경쇄 가변영역을 포함하는 것인, 이중
특이성 항체.

【청구항 18】

제16항에 있어서,

상기 이중 특이성 항체는 인간 OX40L에 1.5×10^{-9} M 이하의 K_D 로 결합하고, 인간 TNF α 에 대해서는 1×10^{-9} M 이하의 K_D 로 결합하며, 여기서 상기 K_D 는 표면 플라스몬 공명 (surface plasmon resonance; Biacore) 분석으로 측정된 것인, 이중 특이성 항체.

【청구항 19】

제16항에 있어서,

상기 이중 특이성 항체는 항 OX40L 항체의 경쇄 및 중쇄 중 적어도 하나의 말단에 TNF α 에 특이적으로 결합하는 항 TNF α 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 연결된 것인, 이중 특이성 항체.

【청구항 20】

제19항에 있어서,

상기 이중 특이성 항체는 상기 항 OX40L 항체의 경쇄 및 중쇄 중 적어도 하나의 C 말단에 상기 항 TNF α 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 연결된 것인, 이중 특이성 항체.

【청구항 21】

제16항에 있어서,

상기 이중 특이성 항체는 항 TNF α 항체의 경쇄 및 중쇄 중 적어도 하나의 말단에 OX40L에 특이적으로 결합하는 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 연결된 것인, 이중 특이성 항체.

【청구항 22】

제21항에 있어서,

상기 항 TNF α 항체의 경쇄 및 중쇄 중 적어도 하나의 C 말단에 상기 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 연결된 것인, 이중 특이성 항체.

【청구항 23】

제16항에 있어서,

상기 항 OX40L 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 상기 항 TNF α 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 링커로 연결된 것인, 이중 특이성 항체.

【청구항 24】

제23항에 있어서,

상기 링커는 서열번호 31 또는 서열번호 32의 서열로 기재된 것인, 이중 특이성 항체.

【청구항 25】

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제9항 내지 제24항 중 어느 한 항에 따른 이중 특이성 항체를 코딩하는 핵산.

【청구항 26】

제25항에 따른 핵산을 포함하는 발현벡터.

【청구항 27】

제26항에 따른 발현벡터가 도입된 형질전환체.

【청구항 28】

제27항의 형질전환체를 이용한 항체 또는 이의 항원 단편, 또는 이중 특이성 항체를 생산하는 방법.

【청구항 29】

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제9항 내지 제24항 중 어느 한 항에 따른 이중 특이성 항체를 포함하는

자가면역질환 또는 염증성 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물.

【청구항 30】

제29항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis)을 예방 또는 치료하는 것인 약학적 조성물.

【청구항 31】

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제9항 내지 제24항 중 어느 한 항에 따른 이중 특이성 항체를 이용한 자가면역질환 또는 염증성질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

【청구항 32】

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제9항 내지 제24항 중 어느 한 항에 따른 이중 특이성 항체를 포함하는, 자가면역질환 또는 염증성질환의 진단을 위한 정보를 제공하기 위한 키트.

【청구항 33】

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편

또는 제9항 내지 제24항 중 어느 한 항에 따른 이중 특이성 항체의 약학적으로 유효한 양을 투여함을 포함하는, 자가면역질환 또는 염증성질환의 예방 또는 치료방법.

【청구항 34】

자가면역질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약제의 제조에서 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제9항 내지 제24항 중 어느 한 항에 따른 이중 특이성 항체의 용도.

【청구항 35】

자가면역질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료를 위한 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제9항 내지 제24항 중 어느 한 항에 따른 이중 특이성 항체의 용도.