(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0146053
(43) 공개일자 2023년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61P 27/02 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-7031045
(22) 출원일자(국제) 2022년02월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년09월11일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/053308
(87) 국제공개번호 WO 2022/171771
국제공개일자 2022년08월18일
(30) 우선권주장
PCT/EP2021/053526 2021년02월12일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
베링거 인겔하임 인터내셔날 게엠베하
독일 55216 인겔하임 암 라인 빙거 슈트라쎄 173
씨디알-라이프 아게
스위스, 8952 슐리렌-취리히, 바기슈트라쎄 27
(72) 발명자
보라스 레오나르도
스위스 8903 비르멘스도르프 도어플리슈트라쎄 1 디
에셔 도미니크
스위스 6331 후에넨베르크 소날덴슈트라쎄 73
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장훈

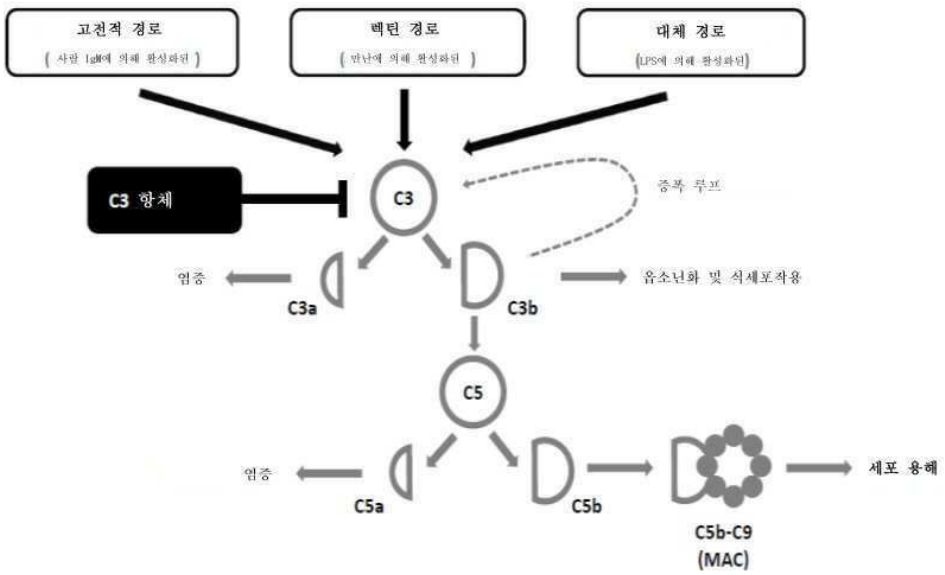
전체 청구항 수 : 총 77 항

(54) 발명의 명칭 **보체 C3 항원 결합 단백질**

(57) 요 약

보체 C3 및 C3b에 특이성을 갖는 항원 결합 단백질이 제공된다. 보체 C3 매개 질환 및 장애를 치료하는 방법, 보체 고전적 경로(CP), 렉틴 경로(LP) 및/또는 대체 경로(AP)의 활성을 억제하는 방법, 맥락막에 위치한 보체 C3의 활성을 억제하는 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/22 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/569 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/70 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
(72) 발명자
정미첼 스테파니
스위스 8057 오어리콘-취리히 빅토리아슈트라쎄 38
리스너 크리스티안
스위스 8800 탈윌 인 데르 루에티 27
리흘 필립 로베르트
스위스 8037 취리히 티에쉐슈트라쎄 61
슈에이펠레 파비앙
스위스 5506 매겐윌-아르가우 바슈벡 12

명 세 서

청구범위

청구항 1

보체 C3 상의 에피토프에 결합하는 항원 결합 단백질 또는 이의 단편으로서, 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 단편이 고전적 경로(CP), 렉틴 경로(LP) 및 대체 경로(AP)를 포함하는 보체 활성화 경로를 억제할 수 있는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 보체 C3 및 C3b에 결합할 수 있는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 보체 C3 상의 에피토프에 결합할 수 있고, 상기 결합이 C3 컨버타제의 형성을 방지하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 브루흐막(Bruch's membrane)을 침투할 수 있는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, MO122, MO123, MO124, MO228, 및 MO251을 포함하는 하나 이상의 항원 결합 단백질과 경쟁할 수 있는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 단일쇄 가변 단편(scFv), Fab 단편, Fab' 단편, Fv 단편, 디아바디, 소형 항체 모방체 또는 단일 도메인 항체, 예를 들어, sdAb, sdFv, 나노바디, V-Nar 또는 VHH를 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 3, 서열번호 6, 서열번호 9, 서열번호 15 및 서열번호 21로 이루어진 그룹의 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 CDR-H3을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 가변 중쇄 (VH) 및 가변 경쇄(VL)을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편으로서,

상기 VH가 서열번호 1, 4, 7, 13, 및 19로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 CDR-H1 서열, 서열번호 2, 5, 8, 14, 및 20으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 CDR-H2 서열, 서열번호 3, 6, 9, 15, 및 21로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 CDR-H3 서열을 포함하고;

상기 VL이 서열번호 10, 16 및 22로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 CDR-L1 서열, 서열번호 11, 17 및 23으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 CDR-L2 서열, 및 서열번호 12, 18 및 24로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 CDR-L3 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 VH가 서열번호 25, 26, 27, 29 및 31로 이루어진 그룹의 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖고/갖거나, 상기 VL이 서열번호 28, 30 및 32로 이루어진 그룹의 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, VH 및 VL을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편으로서,

상기 VH가 서열번호 7의 CDR-H1 서열, 서열번호 8의 CDR-H2 서열 및 서열번호 9의 CDR-H3 서열을 포함하고;

상기 VL이 서열번호 10의 CDR-L1 서열, 서열번호 11의 CDR-L2 서열 및 서열번호 12의 CDR-L3 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 VH가 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VL이 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 12

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, VH 및 VL을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편으로서,

상기 VH가 서열번호 13의 CDR-H1 서열, 서열번호 14의 CDR-H2 서열 및 서열번호 15의 CDR-H3 서열을 포함하고;

상기 VL이 서열번호 16의 CDR-L1 서열, 서열번호 17의 CDR-L2 서열 및 서열번호 18의 CDR-L3 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 VH가 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VL이 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 14

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, VH 및 VL을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편으로서,

상기 VH가 서열번호 19의 CDR-H1 서열, 서열번호 20의 CDR-H2 서열 및 서열번호 21의 CDR-H3 서열을 포함하고;

상기 VL이 서열번호 22의 CDR-L1 서열, 서열번호 23의 CDR-L2 서열 및 서열번호 24의 CDR-L3 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 VH가 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VL이 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 16

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, VHH 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편으로서,

상기 VHH 도메인이 서열번호 1의 CDR-H1 서열, 서열번호 2의 CDR-H2 서열 및 서열번호 3의 CDR-H3 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 VHH 도메인이 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 18

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, VHH 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편으로서,

상기 VHH 도메인이 서열번호 4의 CDR-H1 서열, 서열번호 5의 CDR-H2 서열 및 서열번호 6의 CDR-H3 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 VHH 도메인이 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, C3 및 C3b에 대해 적어도 약 10^{-8} M의 결합 친화성을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 21

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, C3 및 C3b에 대해 약 10^{-9} M 내지 약 10^{-14} M의 결합 친화성을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 22

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, C3 및 C3b에 대해 약 10^{-10} M 내지 약 10^{-12} M의 결합 친화성을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 23

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, C3 및 C3b에 대해 대략 동등한 결합 친화성을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 24

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, C3에 대한 결합 친화성이 C3b에 대한 결합 친화성의 10배 이내인, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 25

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, C3a, iC3b, C4, C4b, C5, 및/또는 C5b에 대해 약 10^{-4} M 이하의 결합 친화성을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 26

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, C3 및 C3b에 대한 결합 친화성에 비해 C3a, iC3b, C4, C4b, C5 및/또는 C5b에 대해 보다 약한 결합 친화성을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 27

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, C3a, iC3b, C4, C4b, C5, 및/또는 C5b에 대해 결합 친화성을 포함하지 않는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, CP, LP 및 AP 보체 경로로 이루어진 그룹 중 어느 하나의 활성을 억제할 수 있는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, CP, LP 및/또는 AP 보체 경로의 활성을 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%까지 억제할 수 있는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, CP, LP 및 AP 보체 경로의 활성을 대략 동등하게 억제할 수 있는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 31

제30항에 있어서, CP, LP 및 AP 보체 경로의 활성을 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%로 억제하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 32

제28항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, CP, LP 및 AP 보체 경로의 활성이 항원 결합 단백질 또는 이의 단편의 존재하의 적혈구 용혈 수준을 항원 결합 단백질 또는 이의 단편의 부재 하의 적혈구 용혈 수준과 비교하여 측정함으로써 결정되는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 33

제28항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, CP, LP 및 AP 보체 경로의 활성이 항원 결합 단백질 또는 이의 단편의 존재하의 막 공격 복합체 (MAC) 형성을 항원 결합 단백질 또는 이의 단편의 부재 하의 MAC 형성과 비교하여 측정함으로써 결정되는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, C3 컨버타제의 활성을 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%까지 억제할 수 있는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, C3 컨버타제 증폭 루프를 억제할 수 있는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 맥락막 C3 활성을 억제할 수 있는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 약 60 kDa 이하의 분자량을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 약 20 kDa 내지 약 30 kDa의 분자량을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 39

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 약 10 kDa 내지 약 20 kDa의 분자량을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 40

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 약 25 kDa의 분자량을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 41

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 약 15 kDa의 분자량을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 단편이 시노몰구스 C3와의 교차 반응성을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 43

대상체에서 보체 C3 매개 질환 또는 장애를 치료하기 위한 약제학적 조성물을 제조하기 위한 제1항 내지 제42항 중 어느 한 항의 항원 결합 단백질 또는 이의 단편의 용도.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항의 항원 결합 단백질 또는 이의 단편, 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 45

제43항 또는 제44항에 있어서, 저점도를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 점도가 약 1 cP 내지 약 50 cP인, 약제학적 조성물.

청구항 47

제45항에 있어서, 상기 점도가 약 20 cP 이하인, 약제학적 조성물.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 단리된 핵산 분자.

청구항 49

제48항의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 50

제49항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 51

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항의 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 제조하기 위한 방법으로서, 하기의 단계를 포함하는 방법:

(i) 제1항 내지 제42항 중 어느 한 항의 단백질의 발현을 허용하는 조건 하에서 제50항의 숙주 세포를 배양하는 단계;

(ii) 단백질을 회수하는 단계; 및 임의로

(iii) 추가로 단백질을 정제하고/하거나 변형시키고/시키거나 제형화하는 단계.

청구항 52

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에서 보체 C3 매개 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 53

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항의 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 보체 C3 매개 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 54

항원 결합 단백질 또는 이의 단편이 국소, 결막하, 유리체내, 안구뒤 및/또는 전안방내 투여를 통해 투여되는, 제53항의 방법 또는 제52항에 따라 사용하기 위한 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 55

보체 C3 매개 질환 또는 장애가 노인성 황반변성, 지도형 위축, 신생혈관 녹내장, 당뇨병성 망막병증, 미숙아 망막병증, 수정체후 섬유증식증, 자가면역 포도막염, 맥락망막염, 망막염, 류마티스 관절염, 건선 및 죽상동맥경화증으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 제53항 또는 제54항의 방법 또는 제52항 또는 제54항에 따라 사용하기 위한 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 56

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 보체 고전적 경로(CP), 렉틴 경로(LP) 및 대체 경로(AP)의 활성을 억제하거나 맥락막에 위치한 보체 C3의 활성을 억제함에 의해, 대상체에서 보체 C3 매개 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 57

보체 고전적 경로(CP), 렉틴 경로(LP) 및 대체 경로(AP)의 활성을 억제하는 방법으로서, 상기 방법이 보체 C3을, 보체 C3 상의 에피토프에 결합하는 항원 결합 단백질 또는 이의 단편과 접촉시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 58

맥락막에 위치한 보체 C3의 활성을 억제하는 방법으로서, 상기 방법이 보체 C3 상의 에피토프에 결합하는 항원 결합 단백질 또는 이의 단편의 안구내 투여를 포함하는, 방법.

청구항 59

제57항 또는 제58항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 단편이 보체 C3 및 C3b에 결합할 수 있는, 방법.

청구항 60

제57항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 단편이 보체 C3 상의 에피토프에 결합할 수 있고, 이러한 결합이 C3 컨버타제의 형성을 방지하는, 방법.

청구항 61

제57항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 단편이 MO122, MO123, MO124, MO228 및 MO251을 포함하는 하나 이상의 항원 결합 단백질과 경쟁할 수 있는, 방법.

청구항 62

제57항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 단편이 단일쇄 가변 단편(scFv), Fab 단편, Fab' 단편, Fv 단편, 디아바디, 소형 항체 모방체 또는 단일 도메인 항체, 예를 들어, sdAb, sdFv, 나노바디, V-Nar 또는 VHH를 포함하는, 방법.

청구항 63

제57항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 단편이 서열번호 3, 서열번호 6, 서열번호 9, 서열번호 15 및 서열번호 21로 이루어진 그룹의 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 CDR-H3을 포함하는, 방법.

청구항 64

제57항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 단편이 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL)를 포함하고,

상기 VH가 서열번호 1, 4, 7, 13, 및 19로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 CDR-H1 서열, 서열번호 2, 5, 8, 14, 및 20으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 CDR-H2 서열, 서열번호 3, 6, 9, 15, 및 21로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 CDR-H3 서열을 포함하고;

상기 VL이 서열번호 10, 16 및 22로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 CDR-L1 서열, 서열번호 11, 17 및 23으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 CDR-L2 서열, 및 서열번호 12, 18 및 24로 이루어진 그룹으로부터 선택되는

CDR-L3 서열을 포함하는, 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 VH가 서열번호 25, 26, 27, 29 및 31로 이루어진 그룹의 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖고/갖거나, 상기 VL이 서열번호 28, 30 및 32로 이루어진 그룹의 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는, 방법.

청구항 66

제57항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 단편이 브루흐막을 침투할 수 있는, 방법.

청구항 67

제57항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 단편이 맥락막 C3 활성을 억제할 수 있는, 방법.

청구항 68

제57항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 단편이 약 60 kDa 이하의 분자량을 포함하는, 방법.

청구항 69

제57항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 단편이 약 20 kDa 내지 약 30 kDa의 분자량을 포함하는, 방법.

청구항 70

제57항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 단편이 약 10 kDa 내지 약 20 kDa의 분자량을 포함하는, 방법.

청구항 71

제57항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 단편이 약 25 kDa의 분자량을 포함하는, 방법.

청구항 72

제57항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 단편이 약 15 kDa의 분자량을 포함하는, 방법.

청구항 73

생물학적 샘플에서 C3 및 C3b 중 하나 또는 둘다를 검출하는 방법으로서, 상기 방법이 하기의 단계를 포함하는, 방법:

(a) 상기 샘플을 제1항 내지 제42항 중 어느 한 항의 항원 결합 단백질 또는 이의 단편과 접촉시키는 단계;

(b) 상기 샘플에서 C3 및 C3b 중 하나 또는 둘다와 항원 결합 단백질 또는 이의 단편 간의 복합체가 형성되도록 하는 단계; 및

(c) 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 검출하는 단계.

청구항 74

제73항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 단편이 보체 C3 및 C3b에 결합할 수 있는, 방법.

청구항 75

제73항 또는 제74항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 단편이 검출가능한 신호에 의해 검출되는, 방법.

청구항 76

제73항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물학적 샘플이 망막 조직과 같은 조직 샘플인, 방법.

청구항 77

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항의 항원 결합 단백질 또는 이의 단편 및 사용 지침서를 포함하는, C3을 검출하기 위한 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] [001] 본원 개시내용은 보체 C3을 표적화하는 항원 결합 단백질 및 보체 C3 매개 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] [002] 특정 안구 질환 및 장애의 치료에 있어서 주요 과제는 치료학적 분자를 망막의 심부층으로 전달하는 것이다. 눈 내의 여러 물리적 경계를 비롯한 여러 요인으로 인해 전달이 방해된다. 이들 경계는 각막 및 결막 상피, 혈액-수성 장벽(BAB) 및 모세혈관 내피 세포(내부 BRB) 및 망막 색소 상피 세포(RPE 세포, 외부 BRB)와 같은 혈액-망막 장벽(BRB)을 포함한다(문헌참조, 예를 들어, Jiang et al. Int J Ophormol. 2018; 11(6): 1038-1044). 망막으로의 전달이 특히 중요한 안구 질환은 지도형 위축(GA)과 같은 보체 매개 질환이다.

[0003] [003] 지도형 위축(GA)은 황반에서 망막 색소 상피와 광수용체의 손실을 특징으로 하는 노인성 황반 변성(AMD)의 진행된 형태이다. GA가 중심와에 영향을 미치면 비가역적 시력 상실이 발생한다. GA 초기 단계의 환자는 일반적으로 시력이 영향을 받기 전에도 시각 기능 결함을 경험한다.

[0004] [004] 지도형 위축의 근본적인 병태생리는 완전히 이해되지 않았지만 보체 활성의 조절 장애가 기여 인자로 사료된다. C3a, C5a, C5b-9 및 보체 인자 H(CFH)를 포함한 여러 보체 활성화 생성물은 대조군과 비교하여 GA 환자의 유리체 샘플, 브루흐막(Bruch's membrane) 및 기타 맥락막 부분에서 상승된 수준을 보여주었다. 또한, 막 공격 복합체(MAC) 형성의 막 결합 억제제인 CD59 및 보체 인자 I(CFI)에 대한 보조 인자 활성을 갖는 막 결합 보체 조절인자인 막 보조 인자 단백질(MCP)과 같은 보체 억제제가 GA에서 감소된 수준으로 보고되었다.

[0005] [005] 현재 GA에 대해 승인된 치료법은 없다. 보체 경로를 표적화 하는 다양한 연구 접근법이 탐구되었지만 아직 승인되거나 효과적인 것으로 입증된 접근법은 없다. 이러한 접근법의 일부 예는 에쿨리주맙/SOLIRIS(Alexion), LFG-316(Novartis/MorphoSys), ARC-1905(Ophthotech), POT-4(AL-78898A; Alcon) 및 람팔리주맙(FCFD45142)을 포함한다.

[0006] [006] 보다 최근에는 APL-2 단계 II 임상 시험(임상 시험 NCT02503332, "지도형 위축 환자의 APL-2 치료요법 연구(FILLY))의 결과는 GA의 병인에 보체 경로가 더 관련되어 있고 보체 억제를 통해 GA 진행을 감소시키는 양성 치료 효과를 보여준다. 이들 결과는 또한 C3(모든 보체 경로의 수렴; **도 1** 참조)에서 중추적으로 보체 캐스케이드의 APL-2 억제가 보체 경로의 부분 억제를 유도하는 억제제로 가능한 것보다 더 효과적으로 GA를 치료할 잠재력을 가질 수 있음을 시사한다. 그럼에도 불구하고, APL-2로 수득된, GA에서의 병변 성장 감소는 여전히 완만하다. APL-2는 이의 효과를 제한할 수 있는 특성을 갖는다. 사이클릭 트리데카펩타이드 콤스타틴(보체 성분 C3의 억제제)의 페길화된 유도체인 APL-2는 350kDa의 큰 분자량과 약 7.8nm의 유체역학적 반경을 갖고 있어 망막 깊숙히 침투하기 어렵다. APL-2는 능히 3.5mM의 낮은 농도로 인해 유효 기간이 1개월에 불과하다. APL-2는 또한 페길화된 분자이고, 이는 점도를 증가시키고 눈에 주사하기 어려울 수 있다. 따라서, GA 진행을 보다 효율적으로 감소시킬 필요가 있다.

[0007] [007] GA 치료에 있어 한 가지 주요 과제는 관찰된 보체 활성 조절 장애가 망막의 더 깊은 층에서 발생한다는 것이다. 본원 발명자들은 GA에서 병변 성장을 더 크게 감소시키기 위해서는 질환 관련 망막 조직(즉, 망막 색소 상피(RPE), 브루흐(Bruch) 막 및 맥락막의 다른 부분)으로 더 잘 침투하는 것이 필요할 수 있음을 추정한다. 이를 위해 작은 항체 단편은 다른 생물학적 제제 및 항체에 비해 몇 가지 이점을 제공한다. 작은 항체 포맷은 다음을 허용할 수 있다: 1) 관련 망막 조직으로의 보다 양호한 안구내 침투; 및 2) 유리체강내 주사를 통해 전달되는 mg 또는 mL당 더 많은 약물 제품.

발명의 내용

[0008] **발명의 개요**

[0009] [008] 본원 개시내용은 보체 C3에 대한 특이성을 갖는 항원 결합 단백질을 제공한다.

[0010] [009] 하나의 양상에서, 본원 개시내용은 보체 C3 상의 에피토프에 결합하는 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 제공하고, 여기서 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 고전적 경로(CP), 렉틴 경로(LP) 및 대체 경로(AP)를 포함하는 보체 활성화 경로를 억제할 수 있다.

[0011] [010] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 보체 C3 및 C3b에 결합할 수 있다.

[0012] [011] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 보체 C3 상의 에피토프에 결합할 수 있고, 이러한 결합은 C3 컨버타제의 형성을 방지한다.

[0013] [012] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 MO122, MO123, MO124, MO228 및 MO251을 포함하는 하나 이상의 항원 결합 단백질과 경쟁할 수 있다.

[0014] [013] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 단일쇄 가변 단편(scFv), Fab 단편, Fab' 단편, Fv 단편, 디아바디, 소형 항체 모방체 또는 단일 도메인 항체, 예를 들어, sdAb, sdFv, 나노바디, V-Nar 또는 VHH를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 scFv 또는 VHH를 포함한다.

[0015] [014] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 서열번호 3, 서열번호 6, 서열번호 9, 서열번호 15 및 서열번호 21로 이루어진 그룹의 서열과 적어도 80% 유사성을 갖는 CDR-H3을 포함한다.

[0016] [015] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 서열번호 3, 서열번호 6, 서열번호 9, 서열번호 15 및 서열번호 21로 이루어진 그룹의 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 CDR-H3을 포함한다.

[0017] [016] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL)를 포함하고, 여기서 VH는 서열번호 1, 4, 7, 13 및 19로 이루어진 그룹으로부터 선택된 CDR-H1 서열, 서열번호 2, 5, 8, 14 및 20으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 CDR-H2 서열, 서열번호 3, 6, 9, 15 및 21로 이루어진 그룹으로부터 선택된 CDR-H3 서열을 포함하고; VL은 서열번호 10, 16 및 22로 이루어진 그룹으로부터 선택된 CDR-L1 서열, 서열번호 11, 17 및 23으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 CDR-L2 서열, 서열번호 12, 18 및 24로 이루어진 그룹으로부터 선택된 CDR-L3 서열을 포함한다.

[0018] [017] 특정 구현예에서, VH는 서열번호 25, 26, 27, 29 및 31로 이루어진 그룹의 서열과 적어도 80%의 유사성을 갖고/갖거나, VL은 서열번호 28, 30 및 32로 이루어진 그룹의 서열과 적어도 80%의 유사성을 갖는다.

[0019] [018] 특정 구현예에서, VH는 서열번호 25, 26, 27, 29 및 31로 이루어진 그룹의 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖고/갖거나, VL은 서열번호 28, 30 및 32로 이루어진 그룹의 서열과 적어도 80%의 유사성을 갖는다.

[0020] [019] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 VH 및 VL을 포함하고, 여기서 VH는 서열번호 7의 CDR-H1 서열, 서열번호 8의 CDR-H2 서열, 및 서열번호 9의 CDR-H3 서열을 포함하고; VL은 서열번호 10의 CDR-L1 서열, 서열번호 11의 CDR-L2 서열, 및 서열번호 12의 CDR-L3 서열을 포함한다.

[0021] [020] 특정 구현예에서, VH는 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하고, VL은 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함한다.

[0022] [021] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 VH 및 VL을 포함하고, 여기서 VH는 서열번호 13의 CDR-H1 서열, 서열번호 14의 CDR-H2 서열, 및 서열번호 15의 CDR-H3 서열을 포함하고; VL은 서열번호 16의 CDR-L1 서열, 서열번호 17의 CDR-L2 서열, 및 서열번호 18의 CDR-L3 서열을 포함한다.

[0023] [022] 특정 구현예에서, VH는 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하고, VL은 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함한다.

[0024] [023] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 VH 및 VL을 포함하고, 여기서 VH는 서열번호 19의 CDR-H1 서열, 서열번호 20의 CDR-H2 서열, 및 서열번호 21의 CDR-H3 서열을 포함하고; VL은 서열번호 22의 CDR-L1 서열, 서열번호 23의 CDR-L2 서열, 및 서열번호 24의 CDR-L3 서열을 포함한다.

[0025] [024] 특정 구현예에서, VH는 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하고, VL은 서열번호 32의 아미노산 서열을

포함한다.

[0026] [025] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 VHH 도메인을 포함하고, 여기서 VHH 도메인은 서열번호 1의 CDR-H1 서열, 서열번호 2의 CDR-H2 서열, 및 서열번호 3의 CDR-H3 서열을 포함한다.

[0027] [026] 특정 구현예에서, VHH 도메인은 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함한다.

[0028] [027] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 VHH 도메인을 포함하고, 여기서 VHH 도메인은 서열번호 4의 CDR-H1 서열, 서열번호 5의 CDR-H2 서열, 및 서열번호 6의 CDR-H3 서열을 포함한다.

[0029] [028] 특정 구현예에서, VHH 도메인은 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함한다.

[0030] [029] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 적어도 약 10^{-8} M의 C3 및 C3b에 대한 결합 친화성을 포함한다. 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 약 10^{-9} M 내지 약 10^{-14} M의 C3 및 C3b에 대한 결합 친화성을 포함한다. 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 약 10^{-10} M 내지 약 10^{-12} M의 C3 및 C3b에 대한 결합 친화성을 포함한다. 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 C3 및 C3b에 대해 대략적으로 균등한 결합 친화성을 포함한다. 특정 구현예에서, C3에 대한 결합 친화성은 C3b에 대한 결합 친화성의 10배 이내이다.

[0031] [030] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 약 10^{-4} M 이하의 C3a, iC3b, C4, C4b, C5 및/또는 C5b에 대한 결합 친화성을 포함한다. 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 C3 및 C3b에 대한 결합 친화성에 비해 C3a, iC3b, C4, C4b, C5 및/또는 C5b에 대해 보다 약한 결합 친화성을 포함한다. 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 C3a, iC3b, C4, C4b, C5 및/또는 C5b에 대한 결합 친화성을 포함하지 않는다.

[0032] [031] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 CP, LP 및 AP 보체 경로의 활성을 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%까지 억제할 수 있다.

[0033] [032] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 CP, LP 및 AP 보체 경로의 활성을 동등하거나 대략적으로 동등하게 억제할 수 있다. 특정 구현예에서, CP, LP 및 AP 보체 경로의 활성 억제는 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%이다.

[0034] [033] 특정 구현예에서, CP, LP 및 AP 보체 경로의 활성은 항원 결합 단백질 또는 이의 단편의 존재하의 적혈구 용혈 수준을 항원 결합 단백질 또는 이의 단편의 부재 하의 적혈구 용혈 수준과 비교하여 측정함으로써 결정된다.

[0035] [034] 특정 구현예에서, CP, LP 및 AP 보체 경로의 활성은 항원 결합 단백질 또는 이의 단편의 존재하의 막 공격 복합체 (MAC) 형성을 항원 결합 단백질 또는 이의 단편의 부재 하의 MAC 형성과 비교하여 측정함으로써 결정된다.

[0036] [035] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 C3 컨버타제의 활성을 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%까지 억제할 수 있다.

[0037] [036] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 C3 컨버타제 증폭 루프를 억제할 수 있다.

[0038] [037] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 브루흐막을 침투할 수 있다.

[0039] [038] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 맥락막 C3 활성을 억제할 수 있다.

[0040] [039] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 약 60 kDa 이하의 분자량을 포함한다. 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 약 20 kDa 내지 약 30 kDa의 분자량을 포함한다. 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 약 10 kDa 내지 약 20 kDa의 분자량을 포함한다. 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 약 25 kDa의 분자량을 포함한다. 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 약 15 kDa의 분자량을 포함한다.

[0041] [040] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 시노몰구스 C3와 교차반응성을 포함한다.

[0042] [041] 하나의 구현예에서, 본원 개시내용은 상기된 바와 같이 항원 결합 단백질 또는 이의 단편 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 따라서, 하나의 양상은 대상체에서 보체 C3 매개 질

환 또는 장애를 치료하기 위한 약제학적 조성물의 제조에 있어서 본 발명의 결합 단백질의 용도이다.

[0043] [042] 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 낮은 점도를 포함한다.

[0044] [043] 특정 구현예에서, 점도는 약 1 cP 내지 약 50 cP이다. 특정 구현예에서, 점도는 약 20 cP 이하이다.

[0045] [044] 하나의 양상에서, 본원 개시내용은 상기된 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 단리된 핵산 분자를 제공한다.

[0046] [045] 또 다른 양상에서, 본원 개시내용은 상기된 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

[0047] [046] 여전히 다른 양상에서, 본원 개시내용은 상기된 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0048] [047] 여전히 다른 양상에서, 상기된 바와 같은 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 제조하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 하기의 단계를 포함한다:

[0049] i) 상기된 바와 같은 숙주 세포를 본원에 기재된 단백질의 발현을 허용하는 조건하에서 배양하는 단계; 및

[0050] ii) 단백질을 회수하는 단계; 및 임의로

[0051] iii) 추가로 단백질을 정제하고/하거나 변형시키고/시키거나 제형화하는 단계.

[0052] [048] 하나의 양상에서, 본원 개시내용은 치료를 필요로 하는 대상체에게 상기된 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 보체 C3-매개 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 따라서, 본원 개시내용은 또한 보체 C3 매개 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한 상기된 바와 같은 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 제공한다. 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 국소, 결막하, 유리체강내, 안구뒤 및/또는 전방내 투여를 통해 투여된다.

[0053] [049] 특정 구현예에서, 보체 C3 매개 질환 또는 장애는 노인성 황반 변성, 지도형 위축, 신생혈관 녹내장, 당뇨병성 망막병증, 미숙아 망막병증, 수정체후 섬유증식증(retrolental fibroplasia), 자가면역 포도막염, 맥락망막염, 망막염, 류마티스 관절염, 건선 및 죽상 동맥 경화증으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0054] [050] 하나의 양상에서, 본원 개시내용은 보체 고전적 경로(CP), 렉틴 경로(LP) 및 대체 경로(AP)의 활성을 억제하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 보체 C3을, 보체 C3 상의 에피토프에 결합하는 항원 결합 단백질 또는 이의 단편과 접촉시키는 것을 포함한다. 따라서, 본원 개시내용은 보체 고전적 경로 (CP), 렉틴 경로 (LP) 및 대체 경로 (AP)의 활성을 억제함에 의해 보체 C3 매개 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 제공한다. 따라서, 본원 개시내용은 또한 맥락막에 위치된 보체 C3의 활성을 억제함에 의해 보체 C3 매개 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한 상기된 바와 같은 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 제공한다.

[0055] [051] 하나의 양상에서, 본원 개시내용은 맥락막에 위치된 보체 C3의 활성을 억제하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 보체 C3 상의 에피토프에 결합하는 항원 결합 단백질 또는 이의 단편의 안구내 투여를 포함한다.

[0056] [052] 본원에 기재된 방법의 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 보체 C3 및 C3b에 결합할 수 있다.

[0057] [053] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 보체 C3 상의 에피토프에 결합할 수 있고, 이러한 결합은 C3 컨버타제의 형성을 방지한다.

[0058] [054] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 MO122, MO123, MO124, MO228 및 MO251을 포함하는 하나 이상의 항원 결합 단백질과 경쟁할 수 있다.

[0059] [055] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 단일쇄 가변 단편(scFv), Fab 단편 또는 VHH를 포함한다.

[0060] [056] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 서열번호 3, 서열번호 6, 서열번호 9, 서열번호 15 및 서열번호 21로 이루어진 그룹의 서열과 적어도 80% 유사성을 갖는 CDR-H3을 포함한다.

[0061] [057] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 서열번호 3, 서열번호 6, 서열번호 9, 서열번호 15 및 서열번호 21로 이루어진 그룹의 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 CDR-H3을 포함한다.

[0062] [058] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL)를 포함하고, 여기

서 VH는 서열번호 1, 4, 7, 13 및 19로 이루어진 그룹으로부터 선택된 CDR-H1 서열, 서열번호 2, 5, 8, 14 및 20으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 CDR-H2 서열, 서열번호 3, 6, 9, 15 및 21로 이루어진 그룹으로부터 선택된 CDR-H3을 포함하고; VL은 서열번호 10, 16 및 22로 이루어진 그룹으로부터 선택된 CDR-L1 서열, 서열번호 11, 17 및 23으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 CDR-L2 서열, 서열번호 12, 18 및 24로 이루어진 그룹으로부터 선택된 CDR-L3 서열을 포함한다.

[0063] [059] 특정 구현예에서, VH는 서열번호 25, 26, 27, 29 및 31로 이루어진 그룹의 서열과 적어도 80%의 유사성을 갖고/갖거나, VL은 서열번호 28, 30 및 32로 이루어진 그룹의 서열과 적어도 80%의 유사성을 갖는다.

[0064] [060] 특정 구현예에서, VH는 서열번호 25, 26, 27, 29 및 31로 이루어진 그룹의 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖고/갖거나, VL은 서열번호 28, 30 및 32로 이루어진 그룹의 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는다.

[0065] [061] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 브루흐막을 침투할 수 있다.

[0066] [062] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 맥락막 C3 활성을 억제할 수 있다.

[0067] [063] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 약 60 kDa 이하, 예를 들어, 약 50 kDa 이하, 약 40 kDa 이하, 약 35 kDa 이하, 약 30 kDa 이하, 약 25 kDa 이하, 약 20 kDa 이하, 약 15 kDa 이하의 분자량을 포함한다. 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 약 20 kDa 내지 약 30 kDa의 분자량을 포함한다. 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 약 10 kDa 내지 약 20 kDa의 분자량을 포함한다. 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 약 25 kDa의 분자량을 포함한다. 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 약 15 kDa의 분자량을 포함한다.

[0068] [064] 하나의 양상에서, 본원 개시내용은 생물학적 샘플에서 C3 및 C3b 중 하나 또는 둘다를 검출하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 하기의 단계를 포함한다:

[0069] (a) 샘플을 상기된 바와 같은 적어도 하나의 항원 결합 단백질 또는 이의 단편과 접촉시키는 단계;

[0070] (b) 샘플에서 C3 및 C3b 중 하나 또는 둘다와 항원 결합 단백질 또는 이의 단편 간의 복합체가 형성되도록 하는 단계; 및

[0071] (c) 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 검출하는 단계. 바람직한 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 보체 C3 및 C3b에 결합할 수 있다.

[0072] [065] 하나의 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 검출가능한 신호에 의해 검출된다.

[0073] [066] 하나의 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 ELISA, 면역세포화학(ICC), 면역조직화학(IHC), 웨스턴 블롯팅 및/또는 유동 세포측정법에 의해 검출된다.

[0074] [067] 생물학적 샘플은 조직 샘플, 예를 들어 고정된 조직 샘플과 같은 사람 대상체의 망막 조직일 수 있다. 고정된 조직 샘플은 포르말린으로 고정되고 파라핀으로 포매된 조직 샘플일 수 있다.

[0075] [068] 하나의 양상에서, 상기된 바와 같은 항원 결합 단백질 또는 이의 단편, 및 사용 지침서를 포함하는 C3 검출용 키트가 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0076] [069] 본 발명의 전술한 특성과 다른 특성 및 이점은 첨부된 도면과 함께 예시적인 구현예에 대한 다음의 상세한 설명으로부터 보다 완전하게 이해될 것이다. 컬러 도면(들)을 갖는 상기 특허 또는 특허 출원 공보의 사본은 필요한 비용의 요구 및 지불에 의해 사무소에 의해 제공된다.

[070] ***도 1***은 3개의 보체 경로: 고전적 (CP), 렉틴 (LP) 및 대체 (AP) 경로를 도시하고, 상기 경로는 C3에서 수렴한다.

[071] ***도 2***는 항-C3 항체 라이브러리를 생성하는 공정을 도시한다.

[072] ***도 3a - 도 3b***는 토끼 및 라마에서 C3에 대해 우수한 면역 반응을 확인시켜 주는 ELISA 검정을 도시한다. 도 3a는 사람 혈장으로부터 단리된 C3 단백질을 시험하는 ELISA 검정을 도시한다. 도 3b는 도 3a에 나타낸 단리된 사람 C3가 주사된 토끼(상부 패널) 및 라마(하부 패널)의 혈청에서 항-C3 항체의 존재를 시험하는 ELISA 검정을 도시한다.

[073] ***도 4a***는 항-C3 항체 라이브러리의 개요를 도시하고, *도 4b*는 CDR-H3 아미노산 길이 다양성을 보여준다.

[074] ***도 5***는 항-C3 항체를 스크리닝하는 공정을 도시한다.

[075] ***도 6***은 사람 혈청에서 3개의 보체 경로 모두를 억제하는 능력에 대해 C3를 표적화 하는 후보 항체의 스크리닝을 도시한다. 각각의 항체는 2 μM의 농도로 사용되었다.

[076] ***도 7a - 도 7d***는 3개의 보체 경로 모두를 억제하는 4개의 항-C3 항체가 C3 상의 3개의 상이한 에피토프를 인지함을 입증한다. 도 7a는 MO122와 다른 3개의 항-C3 항체 각각 사이에 경쟁이 없음을 보여주는 경쟁 검정을 도시한다. 도 7b는 MO124와 다른 3개의 항-C3 항체 각각 사이에 경쟁이 없음을 보여주는 경쟁 검정을 도시한다. 도 7c는 MO228과 MO251 사이에는 경쟁이 있지만 MO124와 MO122에는 경쟁이 없음을 보여주는 경쟁 검정을 도시한다. 도 7d는 MO123과 MO251, MO123과 MO228 사이에 경쟁이 있지만 MO124와 MO122 사이에는 경쟁이 없음을 보여주는 경쟁 검정을 도시한다.

[077] ***도 8a - 도 8b***는 MO122, MO124 및 MO228이 C3와 C3b 둘다에 직접적으로 결합함을 도시한다. 도 8a는 MO122, MO124 및 MO228이 C3에 직접 결합함을 입증하는 ELISA 검정을 도시한다. 도 8b는 MO122, MO124 및 MO228이 C3b에 직접 결합함을 입증하는 ELISA 검정을 도시한다.

[078] ***도 9a - 도 9b***는 MO122, MO124 및 MO228이 고전적 및 대체 경로를 강력하게 억제함을 도시한다. 도 9a는 MO122, MO124 및 MO228이 고전적 경로를 강력하게 억제함을 도시한다. 도 9b는 MO122, MO124 및 MO228이 대체 경로를 강력하게 억제함을 도시한다.

[079] ***도10***은 MO122, MO124 및 MO228의 친화성 파라미터를 도시한다.

[080] ***도 11***은 브루흐막을 포함하는 망막 및 맥락막의 해부학적 구조를 개략적으로 도시한다. 본원 개시내용의 항-C3 scFv 항체는 브루흐막을 침투하여 맥락막 내로 더 깊이 진입할 수 있는 것으로 도시되는 반면, 비교용 C3-결합 치료제인 APL-2는 브루흐막을 침투할 수 없다. 동일한 원리가 본 발명의 다른 항원 결합 단백질 포맷에 적용된다.

[081] ***도 12***는 본원 개시내용의 scFv와 비교하여 나타낸 보체 결합 치료제와 함께 유체역학적 반경과 투과성 간의 음성 관계를 도시한다.

[082] ***도 13a 및 도 14b***는 브루흐막을 침투하는 것에 대한 scFv와 APL-2 대용물의 비교를 도시한다. 도 14a는 요오드화바륨 염색(PEG)을 봉주고, 도 13b는 쿠마시 염색(단백질)을 보여준다. APL2-대용물은 40 kDa 선형 PEG 상에 하나의 APL-1 모이어티를 포함한다. SC - 샘플 챔버, DC - 투석물 챔버, LC - 부하 조절 (SC에서 초기 농도).

[083] ***도 14a - 도 14c***는 MO122, MO124 및 MO251이 cyno 혈성에서 고전적, 대체 및 렉틴 경로를 강력하게 억제함을 도시한다. 도 14a는 MO122, MO124 및 MO251이 3개의 경로 모두를 강력하게 억제함을 도시한다. 각각의 항체는 2 μM의 농도로 사용되었다. 도 14b는 MO122, MO124 및 MO251이 고전적 경로를 강력하게 억제함을 도시한다. 도 14c는 MO122, MO124 및 MO251이 대체 경로를 강력하게 억제함을 도시한다.

[084] ***도 15a - 도 15b***는 MO122, MO124 및 MO251이 cyno C3에 결합함을 도시한다. 도 15a는 MO122, MO124를 도시한다. 도 15b는 MO251을 도시한다.

[085] ***도 16***은 MO122, MO123 및 MO124가 렉틴 경로를 강력하게 억제함을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0077] [086] 보체 C3 및 보체 C3 절단 생성물인 C3b에 대한 결합 특이성을 갖는 항원 결합 단백질이 제공된다. 보체 C3 매개 질환 및 장애를 치료 또는 예방하는 방법도 제공된다.

[0078] [087] 특정 양상에서, 본원에 기재된 항원 결합 단백질은 보체 고전적 경로(CP), 렉틴 경로(LP) 및 대체 경로(AP)를 억제할 수 있다. 본원에 기재된 항원 결합 단백질은 3개의 경로 모두를 동시에 억제할 수 있다. 본원에 기재된 항원 결합 단백질은 눈 맥락막의 3개의 경로 모두를 억제할 수 있다.

[0079] [088] 일반적으로, 본원에 기재된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학, 및 단백질 및 핵산 화학 및 하이브리드화와 관련하여 사용되는 명명법은 널리 공지되어 있고 통상적으로 당업계에 사용된다. 본원에 제공된 방법 및 기술은 일반적으로 당업계에 잘 알려진 통상적인 방법에 따라 수행되고, 달리 지적되지 않는 경우 본 명세서에서 인용 및 논의되는 다양한 일반적이고 보다 구체적인 참조문헌에 기재된 바와 같다. 효

소 반응 및 정제 기술은 당업계에서 통상적으로 달성되거나 본원에 기재된 바와 같이 제조업자의 사양에 따라 수행된다. 본원에 기재된 분석 화학, 합성 유기 화학, 의약 및 약제학적 화학과 관련하여 사용되는 명명법, 연구 절차 및 기술은 당업계에 잘 알려져 있고 통상적으로 사용된다. 표준 기술은 화학 합성, 화학 분석, 약제학적 제제, 제형 및 전달, 환자 치료를 위해 사용된다.

[0080] [089] 본원에서 달리 정의되지 않는 경우, 본원에 사용되는 과학적 및 기술적 용어는 당업자가 통상적으로 이해하는 의미를 갖는다. 임의의 잠재적 모호성이 있는 경우에는 본원에 제공된 정의가 임의의 사전 또는 외부 정의보다 우선한다. 본원에서 문맥에 의해 달리 요구되지 않는 경우, 단수의 용어는 복수를 포함하고, 복수의 용어는 단수를 포함한다. "또는"의 사용은, 달리 언급하지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. "포함하는"이라는 용어뿐만 아니라 "포함한다" 및 "포함되는"과 같은 다른 형태의 사용은 제한적이지 않다.

[0081] [090] 본 발명이 보다 용이하게 이해될 수 있도록 하기 위해, 특정 용어를 먼저 정의한다.

[0082] 항원 결합 단백질

[0083] [091] 본원에 사용된 용어 "항체" 또는 "항원 결합 단백질"은 항원 또는 에피토프에 특이적으로 결합하거나 면역학적으로 반응성이 있는 면역글로불린 분자를 지칭하고, 기능성 항체 단편뿐만 아니라 폴리클로날 항체와 모노클로날 항체 둘다를 포함하고, 상기 단편은 단편 항원 결합(Fab) 단편, $F(ab')_2$ 단편, Fab' 단편, Fv 단편, 재조합 IgG(rIgG) 단편, 단일쇄 가변 단편(scFv) 및 단일 도메인 항체(예를 들어, sdAb, sdFv, 나노바디, VHH) 단편을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. "항체"라는 용어는 인트라바디, 펩티바디, 키메라 항체, 완전 사람 항체, 사람화된 항체, 이종접합 항체(예를 들어, 이중특이적 항체, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 탠덤 디-scFv, 탠덤 트리-scFv) 등과 같은 유전학적으로 가공되거나 다르게 변형된 형태의 면역글로불린을 포함한다. 달리 기재되지 않는 경우, 용어 "항체"는 이의 기능성 항체 단편을 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 본원에 사용된 용어 "항체 단편"은 항원에 선택적으로 결합하도록 디자인된 인공 단백질, 즉 항체 모방체를 포함한다. 전형적으로, 하나 이상의 CDR은 비-Ig 스캐폴드에 접목되어 모 항체로부터의 CDR 형태를 모방한다. 이러한 항체 모방체의 비제한적인 예는 변동 조절 친화성 단백질(FLAP), 모노바디 및 어피머를 포함한다. 항체 모방체는 본원에 기재된 CDR 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개를 포함할 수 있다.

[0084] [092] 본원에 사용된 "Fab 단편"은 가변 경쇄(VL) 도메인 및 경쇄(CL)의 불변 도메인을 포함하는 경쇄 단편, 및 가변 중쇄(VH) 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)을 포함하는 항체 단편이다. Fab 단편은 일반적으로 약 50kDa의 분자량과 약 3.0nm의 유체역학적 반경을 갖는다.

[0085] [093] 본원에 사용된 "단일쇄 가변 단편"(scFv)은 경쇄 가변 도메인(VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하는 항원 결합 단백질이다. scFv의 VH 및 VL 도메인은 임의의 적절한 당업계 인지된 링커를 통해 연결된다. 이러한 링커는 반복된 GGGGS 아미노산 서열 또는 이의 변이체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. scFv에는 일반적으로 항체 불변 도메인 영역이 없지만, 본원 개시내용의 scFv는 항체 불변 도메인 영역(예를 들어, 항체 Fc 도메인)에 연결되거나 부착되어 증가된 혈청 또는 조직 반감기를 포함하지만 이에 제한되지 않는 scFv의 다양한 성질을 변경할 수 있다. scFv는 일반적으로 약 25kDa의 분자량과 약 2.5nm의 유체역학적 반경을 갖는다.

[0086] [094] 본원에 사용된 "VHH", "나노바디" 또는 "중쇄 단독 항체"는 낙타, 라마, 알파카를 포함하는 카멜리대(*Camelidae*)과의 종으로부터 유래된 단일 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항원 결합 단백질이다. VHH는 일반적으로 약 15 kDa의 분자량을 갖는다.

[0087] [095] 본원에 사용된 용어 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 항원 특이성 및 결합 친화성을 부여하는 항체 가변 영역 내의 아미노산의 비연속 서열을 지칭한다. 일반적으로 각 중쇄 가변 영역(CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3)에는 3개의 CDR이 있고, 각 경쇄 가변 영역(CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3)에는 3개의 CDR이 있다. "프레임워크 영역" 또는 "FR"은 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 비-CDR 부분을 지칭하는 것으로 당업계에 공지되어 있다. 일반적으로 각 중쇄 가변 영역(FR-H1, FR-H2, FR-H3 및 FR-H4)에는 4개의 FR이 있고, 각 경쇄 가변 영역(FR-L1, FR-L2, FR-L3, FR-L4)에는 4개의 FR이 있다. VHH 항체의 경우 중쇄 CDR이 3개만 있고 경쇄 CDR은 없다.

[0088] [096] 소정의 CDR 또는 Fr의 정확한 아미노산 서열 경계는 하기의 문헌에 기재된 것들을 포함하는 임의의 다수의 널리 공지된 기획을 사용하여 용이하게 결정될 수 있다(문헌참조: Kabat et al. (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (“Kabat” numbering scheme), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948 (“Chothia” numbering scheme), MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), “Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography,” J. Mol. Biol. 262, 732-745. (“Contact”

numbering scheme), Lefranc M P et al., “IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains,” Dev Comp Immunol, 2003 January; 27(1):55-77 (“IMGT” numbering scheme), and Honegger A and Pluckthun A, “Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool,” J Mol Biol, 2001 Jun. 8; 309(3):657-70, (AHo numbering scheme)).

[0089] [097] 소정의 CDR 또는 FR의 경계는 동정을 위해 사용되는 기획에 따라 다양할 수 있다. 예를 들어, 캐뱃 기획은 구조적 정렬을 기준으로 하는 반면, 초티아(Chothia) 기획은 구조적 정보를 기준으로 한다. 캐뱃 및 초티아 기획 둘다를 위한 넘버링은 가장 공통된 항체 영역 서열 길이를 기준으로 하고 삽입은 삽입 문자, 예를 들어,” 30a”에 의해 수용되고 결실은 일부 항체에서 나타난다. 2개의 기획은 상이한 위치에 특정 삽입 및 결실 (“indels”)을 위치시켜 차등 넘버링을 초래한다. 접촉 기획은 복합체 결정 구조의 분석을 기준으로 하고 많은 양상에서 초티아 넘버링 기획과 유사하다.

[0090] [098] 본원에 제공된 항체의 변이체는 프레임워크 및/또는 CDR에 결실, 치환, 부가 및/또는 변형을 도입함으로써 생성될 수 있다. 이어서, 본원에 기재된 방법을 사용하여 목적하는 기능에 대해 항체 변이체를 시험할 수 있다. 생성된 변이체가 적절한 방법을 사용하여 스크리닝될 수 있는 목적하는 특징을 소유하는 경우, 결실, 치환, 부가, 변형 및 삽입의 임의의 조합(들)이 항원 결합 단백질 또는 이의 단편에 만들어질 수 있다.

[0091] [099] 본원에 사용된 "보존적 치환"은 모계 항체의 기능적 성질을 유지하는 변형을 지칭한다. 예를 들어, 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 성질을 갖는 아미노산 잔기로 대체되는 것들을 포함한다. 예를 들어, 알라닌(A)을 발린(V)으로 치환하는 것; 아르기닌(R)을 리신(K)으로 치환하는 것; 아스파라긴(N)을 글루타민(Q)으로 치환하는 것; 아스파르트산(D)을 글루탐산(E)으로 치환하는 것; 시스테인(C)을 세린(S)으로 치환하는 것; 글루탐산(E)을 아스파르트산(D)으로 치환하는 것; 글리신(G)을 알라닌(A)으로 치환하는 것; 히스티딘(H)을 아르기닌(R) 또는 리신(K)으로 치환하는 것; 이소류신(I)을 류신(L)으로 치환하는 것; 메티오닌(M)을 류신(L)으로 치환하는 것; 페닐알라닌(F)을 티로신(Y)으로 치환하는 것; 세린(S)을 트레오닌(T)으로 치환하는 것; 트립토판(W)을 티로신(Y)으로 치환하는 것; 페닐알라닌(F)을 트립토판(W)으로 치환하는 것; 및/또는 발린(V)을 류신(L)으로 치환하는 것; 및/또는 그 반대의 경우.

[0092] [0100] 따라서 달리 특정되지 않는 경우, 소정의 항체 또는 이의 영역의 "CDR" 또는 "상보성 결정 영역" 또는 개별적 특정 CDR(예를 들어, "CDR-H1, CDR-H2), 예를 들어, 이의 가변 영역은 임의의 공지된 기획에 의해 정의된 바와 같은 (또는 특정) 상보성 결정 영역을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 달리 특정되지 않는 경우, 소정의 항체 또는 이의 영역의 "FR" 또는 "상보성 결정 영역" 또는 개별적 특정 CDR(예를 들어, "FR-H1, FR-H2), 예를 들어, 이의 가변 영역은 임의의 공지된 기획에 의해 정의된 바와 같은 (또는 특정) 프레임워크 영역을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 일부 경우에, 캐뱃, 초티아, 접촉, IMGT 또는 AHo 방법에 의해 정의된 CDR과 같은 특정 CDR 또는 Fr을 동정하기 위해 기획이 특정된다. 다른 경우에, CDR 또는 FR의 특정 아미노산 서열이 주어진다. CDR 및 FR 넘버링은 하기의 문헌에 추가로 기재되어 있다(문헌참조: Kabat et al. (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (“Kabat” numbering scheme), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948 (“Chothia” numbering scheme), MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), “Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography,” J. Mol. Biol. 262, 732-745. (“Contact” numbering scheme), Lefranc M P et al., “IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains,” Dev Comp Immunol, 2003 January; 27(1):55-77 (“IMGT” numbering scheme), and Honegger A and Pluckthun A, “Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool,” J Mol Biol, 2001 Jun. 8; 309(3):657-70, (AHo numbering scheme)).

[0093] [0101] 용어 "경쟁한다" 또는 "교차-경쟁한다"는 항체 분자, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 항원 결합 단백질과 표적, 예를 들어 사람 C3 및/또는 C3b의 결합에 간섭하는 항체 분자의 능력을 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 결합에 대한 간섭은 직접적이거나 간접적일 수 있다(예를 들어, 항원 결합 분자 또는 표적의 알로스테릭 조절을 통해). 항원 결합 분자가 표적에 대한 또 다른 항원 결합 분자의 결합에 간섭할수 있는 정도, 따라서 그것이 경쟁한다고 말할 수 있는지 여부는 경쟁 결합 검정, 예를 들어 FACS 검정, ELISA 또는 BIACORE 검정을 사용하여 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, 경쟁 결합 검정은 정량적 경쟁 검정이다. 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 분자는 경쟁 결합 분석(예를 들어, 본 명세서에 기술된 경쟁 분석)에서 표적에 대한 제1 항체 분자의 결합이 10% 이상, 예를 들어 20%, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65%

이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상, 99% 이상 감소할 때 표적에 대한 결합에 대해 제2 항원 결합 분자와 경쟁한다고 한다.

[0094] [0102] 본원에 사용된 용어 "친화성"은 항체의 항원 결합 부위와 이것이 결합하는 에피토프 사이의 상호작용 강도를 지칭한다. 당업자가 용이하게 이해하는 바와 같이, 항체 또는 항원 결합 단백질 친화성은 몰농도(M)의 해리 상수(K_D)로서 보고될 수 있다. 본원 개시내용의 항체는 10^{-5} 내지 10^{-12} M 범위의 K_D 값을 가질 수 있다. 고친화성 항체는 10^{-9} M (1 나노몰, nM) 및 그 이하의 K_D 값을 갖는다. 예를 들어, 고친화성 항체는 약 1 nM 내지 약 0.01 nM 범위의 K_D 값을 가질 수 있다. 고친화성 항체는 약 1 nM, 약 0.9 nM, 약 0.8 nM, 약 0.7 nM, 약 0.6 nM, 약 0.5 nM, 약 0.4 nM, 약 0.3 nM, 약 0.2 nM, 또는 약 0.1 nM의 K_D 값을 가질 수 있다. 매우 높은 친화성 항체는 10^{-12} M (1 피코몰, pM) 및 그 이하의 K_D 값을 갖는다. 약하거나 낮은 친화성 항체는 10^{-1} 내지 10^{-4} M 범위의 K_D 값을 가질 수 있다. 낮은 친화성 항체는 10^{-4} M 및 그 이상, 예를 들어, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M, 또는 10^{-1} M의 K_D 값을 가질 수 있다.

[0095] [0103] 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 약 10^{-8} M 내지 약 10^{-14} M의 C3 및 C3b에 대한 결합 친화성을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 약 10^{-10} M 내지 약 10^{-12} M의 C3 및 C3b에 대한 결합 친화성을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 C3 및 C3b에 대해 적어도 약 10^{-8} M, 적어도 약 10^{-9} M, 적어도 약 10^{-10} M, 적어도 약 10^{-11} M, 또는 적어도 약 10^{-12} M의 결합 친화성을 갖는다.

[0096] [0104] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 C3 및 C3b에 대해 대략적으로 균등한 결합 친화성을 포함한다. 예를 들어, 그러나 어떠한 방식으로 제한되지 않고, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 C3에 대해 약 10^{-10} M의 결합 친화성 및 C3b에 대해 약 10^{-10} M의 결합 친화성을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 C3에 대해 약 10^{-11} M의 결합 친화성 및 C3b에 대해 약 10^{-11} M의 결합 친화성을 포함한다. 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 C3에 대해 약 10^{-12} M의 결합 친화성 및 C3b에 대해 약 10^{-12} M의 결합 친화성을 포함한다.

[0097] [0105] 특정 구현예에서, C3에 대한 결합 친화성은 C3b에 대한 결합 친화성의 10배 이내이다. 예를 들어, 그러나 어떠한 방식으로 제한되지 않고, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 C3에 대해 약 10^{-10} M의 결합 친화성 및 C3b에 대해 약 10^{-11} M의 결합 친화성을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 C3에 대해 약 10^{-11} M의 결합 친화성 및 C3b에 대해 약 10^{-12} M의 결합 친화성을 포함한다.

[0098] [0106] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 시노몰구스 C3와 교차반응성을 포함한다. 시노몰구스(마카카 파시쿨라리스(*Macaca fascicularis*)) C3는 사람 C3과 95.1% 동일하고 교차 반응성은 관련 동물 모델에서 본원 개시내용의 항원 결합 단백질의 전임상 및 독성학 시험을 허용한다.

[0099] [0107] 의심의 여지를 피하기 위해, 달리 명시하지 않는 한, 본원에 사용된 C3은 UniProt P01024의 사람 보체 성분 3 및 해당 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 지칭한다. C3b는 고유 C3로부터 유래하고 C3의 절단으로 형성된 두 요소 중 더 큰 요소이다.

[0100] [0108] 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 1가이고 생물층 간섭계(BLI)로 측정시 약 200 nM 이하의 K_D로 사람 C3 및 C3b에 결합한다. 특정 구현예에서, K_D는 약 200 pM 이하, 예를 들어 약 100 pM, 약 10 pM, 약 1 pM, 또는 약 0.1 pM이다.

[0101] [0109] 특정 항원성 결정인자에 결합하는 항원 결합 도메인의 능력은 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA) 또는 당업자에게 친숙한 다른 기술, 예를 들어 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기술(BIAcore 기기)(문헌참조: Liljeblad et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)) 및 통상적인 결합 검정(문헌참조: Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002))을 통해 측정될 수 있다.

[0102] 항-보체 C3 항원 결합 단백질

[0103] [0110] 하나의 양상에서, 본원 개시내용은 보체 C3 단백질에 대한 결합 특이성을 갖는 항원 결합 단백질을 제공한다. 특정 구현예에서, 항-C3 항원 결합 단백질은 scFv, Fab 단편 또는 VHH이다.

[0104] [0111] 예시적인 항-C3 항원 결합 단백질 CDR은 하기 표 1에 언급된다. 예시적인 항-C3 항원 결합 단백질 가변 중쇄 및 가변 경쇄 도메인은 하기 표 2에 언급된다. 하기에 언급된 예시적인 항-C3 항원 결합 단백질은 사람 혈장으로부터 단리된 사람 C3 단백질로 토끼와 라마를 면역화함으로써 생성되었다. M0122, M0123 및 M0124의 예시적인 VH 및 VL 도메인은 사람 C3 단백질로 면역화된 토끼로부터 유래되었고 야생형 토끼 서열이다. M0228 및 M0251의 예시적인 VHH 도메인은 사람 C3 단백질로 면역화된 라마로부터 유래되었고 야생형 라마 서열이다.

[0105] [0112] 표 1 - 항-C3 항원 결합 단백질 CDR 서열.

서열번호	서열	주지사항
1	DYTMG	M0228_CDR-H1
2	AINWRGSSTYYADSVKG	M0228_CDR-H2
3	QVSPYVELTATAAY	M0228_CDR-H3
4	NWAMG	M0251_CDR-H1
5	AIRWSVGTTNYRDSVKG	M0251_CDR-H2
6	GTPFVLARINGYDY	M0251_CDR-H3
7	NYAMN	M0122_CDR-H1
8	IINTDGNTNYASWAKG	M0122_CDR-H2
9	AVGYHHHALDP	M0122_CDR-H3
10	TLSSAHKTYTID	M0122_CDR-L1
11	LKSDGSYTKGT	M0122_CDR-L2
12	GTDYGGGYV	M0122_CDR-L3
13	SYHMS	M0123_CDR-H1
14	IIYTDGNTDYANWAKG	M0123_CDR-H2
15	RGYADYGYTFNL	M0123_CDR-H3
16	TADTLSRNYAS	M0123_CDR-L1
17	RDTSRPS	M0123_CDR-L2
18	ATGDGSGSSYQFV	M0123_CDR-L3
19	RYWMN	M0124_CDR-H1
20	YITTNDKTYYANWAKG	M0124_CDR-H2
21	RSSGAYDI	M0124_CDR-H3
22	TLSSAHKTYYIE	M0124_CDR-L1
23	LKSDGTYTKGT	M0124_CDR-L2
24	GVTGGNVYV	M0124_CDR-L3

[0106]

[0107] [0113] 표 2 - 항-C3 항원 결합 단백질 VH / VL 서열.

서열번호	서열	주지사항
25	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS GRTINDYTMGWFRQAPGKDREFVSA INWRGSSTYYADSVKGRFTISRDNAK KTIYLQMNLLKPEDTAVYYCARQVS PYVELTATAAYWGQGTQVTVSS	M0228_VHH
26	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVAS GHTFGNWAMGWFRQAPGKEREFVG AIRWSVGTTNYRDSVKGRFAISRDN ARNTVYLQMNRLKPEDTAVYYCAA GTPFVLARINGYDYWGQGTQVTVSS	M0251_VHH
27	QSVKESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGF SLYNYAMNWVRQAPGKGLEWIGIIN TDGNTNYASWAKGRFTISTTSSTTVD LKITSPTTEDTATYFCPRAVGYHHHA LDPWGPGTLVTVSS	M0122_VH
28	ELVLTQSPSVSAALGASAKLTCTLSS AHKTYTIDWYQQQQGEAPRYLMQL KSDGSYTKGTGVPDRFSGSSSGADR YLIIPSVQADDEADYYCGTDYGGGY VFGGGTQLTVTG	M0122_VL
29	QSVKESEGRLVTPGTPLTLTCTASGF TIGSYHMSWVRQAPGKGLEWIGIIYT DGNTDYANWAKGRFTISKTSTTMDL KMTSLTAADTATYFCARRGYADYG YTFNLWGQGTLVTISS	M0123_VH
30	ELVLTQPASVQVNLGQTVSLTCTAD TLSRNYASWYQQKPGQAPVLLIYRD TSRPSGVPDRFSGSSSGNTATLTISGA QAGDEADYYCATGDGSGSSYQFVFG GGTQLTVTG	M0123_VL
31	QSVKESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGI DLSRYWMNWVRQAPGKGLEWIGYI TTNDKTYYANWAKGRYTISKTSSTT VDLKMTSLTTEDTATYFCARRSSGA YDIWGPGTLVTISS	M0124_VH
32	QPVLTQSPSASATLGASAKLTCTLSS AHKTYYIEWYQQQQGEAPRYLMQL KSDGTYTKGTGVPDRFSGSSSGADR YLIISSVQAEDEADYICGVTGGNVYV FGGGTQLTVTG	M0124_VL

[0108]

[0109] [0114] 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항-C3 항원 결합 단백질은 표 1 또는 표 2의 임의의 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96% 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 서열 유사성 또는 동일성을 포함한다.

[0110] [0115] 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항-C3 항원 결합 단백질은 하나 이상의 보체 경로, 고전적 경로, 대체 경로 및 렉틴 경로를 억제하는 능력에 대해 선택된다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항-C3 항원 결합 단백질은 보체 경로, 고전적 경로, 대체 경로 및 렉틴 경로 3개 모두를 억제하는 능력에 대해 선택된다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항-C3 항원 결합 단백질은 눈에서 보체 경로 3개 모두를 억제할 수 있다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항-C3 항원 결합 단백질은 눈의 맥락막 영역에서 보체 경로 3개 모두를 억제할 수 있다. 맥락막 영역은 눈 뒤쪽의 라인을 따라 존재하는 혈관을 포함하는 층으로 망막과 공막 사이에 위치한다. 맥락막 영역은 할러(Haller)층, 새틀러(Sattler)층, 맥락막모세혈관층(Choriocapillaris) 및 브루흐막의 4개 층으로 구분된다. 유리체판(vitreous lamina)으로도 공지된 브루흐막은 맥락막의 가장 안쪽 층이고 망막색소상피(RPE)에 인접해 있다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항-C3 항원 결합 단백질은 브루흐막을 가로질러 침투하거나 확산할 수 있고 맥락막의 다른 층, 예를 들어 이에 제한되지 않지만 맥락막모세혈관층으로 진입할 수 있다.

[0111] [0116] 망막에는 전장 면역글로불린과 같은 큰 분자가 더 깊은 층으로 침투하는 것을 방지하여 치료학적 효과를 감소시킬 수 있는 실질적인 물리적 장벽이 있다(문헌참조: Jackson et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003;44(5): 2141-6). 대조적으로, 보다 작은 항체 유도체는 망막으로 보다 깊숙히 침투할 수 있다. 약 60 kDa

이하의 분자량을 갖는 예시적인 항체 유도체는 Fab, Fab' 단편, scFab, scFv, Fv 단편, 나노바디, VHH, dAb, V-Nar, sdAb, sdFv 및 단일쇄 디아바디(scDb) 또는 DART와 같은 이중특이적 및 2가 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않는 항체 단편이다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항-C3 항원 결합 단백질은 약 60 kDa 이하, 예를 들어 약 55 kDa, 약 50 kDa, 약 45 kDa, 약 40 kDa, 약 35 kDa, 약 30 kDa, 약 25 kDa, 약 20 kDa, 약 15 kDa 이하의 분자량을 갖는다.

[0112] [0117] 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항-C3 항원 결합 단백질은 침투를 촉진하기에 충분히 작은 크기로 인해 부분적으로 브루흐막을 가로질러 침투하거나 확산할 수 있다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질의 크기는 분자량으로 측정된다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 약 60 kDa 미만인 분자량을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 약 20 kDa 내지 약 30 kDa 또는 약 10 kDa 내지 약 20 kDa이다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 약 25 kDa이다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 약 15 kDa이다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질의 크기는 유체역학적 반경으로 측정된다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 약 3.0 nm 이하의 유체역학적 반경을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 약 2.5 nm 이하의 유체역학적 반경을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 약 2.0 nm 이하의 유체역학적 반경을 갖는다.

[0113] [0118] 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항-C3 항원 결합 단백질은 MO122, MO123, MO124, MO228 및 MO251을 포함하는 하나 이상의 항원 결합 단백질과 경쟁할 수 있다. 항체 경쟁은 당업계에 공지된 임의의 검정에 의해 측정될 수 있다. 특정 구현예에서, 하나의 항체는 비오틴과 같은 마커로 표지될 수 있고, C3 결합 ELISA에서 다른 항-C3 항체와 함께 항온처리된다. 일반적으로, 경쟁하는 항원 결합 단백질이 과잉으로 존재하는 경우, 이는 본원에 기재된 항원 결합 단백질 또는 이의 단편의 C3 및/또는 C3b로의 특이적 결합을 감소시킬 것이고, 즉 결합을 적어도 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% 또는 75% 이상까지 교차 차단한다. 특정 구현예에서, 경쟁 항원 결합 단백질의 존재 하에 본원에 기재된 항원 결합 단백질 또는 이의 단편의 결합은 적어도 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97%, 또는 97% 이상까지 감소된다.

[0114] [0119] 보체 C3은 13개의 서로 다른 도메인과 185킬로달톤의 분자 크기로 구성된 큰 단백질이다. 보체 활성화 동안에, C3은 상이한 부위에서 단백질 용해 절단 및 구조적 변형을 진행한다. C3 유래된 단편은 다양한 이펙터 기능을 발휘하고 3개의 보체 경로에 대한 증폭 루프를 가속화하는 컨버타제를 형성한다. 고전적 경로 및 렉틴 경로 C3 컨버타제인 C4bC2a는 전장 C3을 C3b 및 아나필라톡신 3a로 절단한다. 대체 경로는 C3b 및 C3a도 생성하지만 대체 경로 C3 컨버타제인 C3bBb를 활용한다. 또한 보체 경로에서 추가적인 C3 분해 생성물이 생성될 수 있다. 보체 인자 I(CFI)는 C3b를 iC3b로 영구적으로 불활성화할 수 있는 혈장 세린 프로테아제이고, iC3b는 이어서 CFI에 의해 추가 단편(C3dg 및 C3c)로 절단된다. 추가의 C3 단백질용해 생성물인 C3d는 보체 수용체 2(Cr2)에 결합하고 B 세포의 세포 주기 제어에서 중요한 역할을 수행할 수 있다. C3 유래된 단백질 생성물과 함께 보체 경로는 C1, C2, C4, C4b, C4a C5, C5b, C5a, C6, C7, C8, C9, C1q, C1r, C1s, 인자 B, 인자 D, 인자 P, 인자 H, 인자 I, CD46(MCP), CD55(DAF), CD59(MAC-IP), CR1(CD35), CR2(CD21), CR3, CR4, C3aR, C5aR1, C5aR2, CRIg, C4BP α-쇄, C4BP β-쇄, 피콜린-1, 만노스 결합 렉틴(MBL), MBL 관련 세린 프로테아제-1(MASP-1) 및 MBL 관련 세린 프로테아제-2(MASP-2)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 보체 경로 및 다양한 보체 경로 성분들은 추가로 문헌(문헌참조: Noris et al. Semin Nephrol. 2013; 33(6): 479-492)에 상세히 기재되어 있다.

[0115] [0120] 특정 구현예에서, 본원 개시내용은 C3 및 C3b 둘다에 결합할 수 있는 항-C3 항원 결합 단백질을 제공한다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항-C3 항원 결합 단백질은 C3 및 C3b에 대한 결합 친화성 보다 약한, C3a, iC3b, C4, C4b, C5, 및/또는 C5b에 대한 결합 친화성을 포함한다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항-C3 항원 결합 단백질은 C3a, iC3b, C4, C4b, C5, 및/또는 C5b에 대해 약 10^{-4} M 이하의 결합 친화성을 포함한다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항-C3 항원 결합 단백질은 C3a, iC3b, C4, C4b, C5 및/또는 C5b에 대한 결합 친화성을 포함하지 않는다. 본원에 사용된 "결합 친화성 부재"는 이에 제한되지 않지만 ELISA 검정과 같은 당업계에 공지된 하나 이상의 결합 친화성 검정을 사용하여 배경에 비해 검출 가능한 결합 친화성이 없음을 지칭한다.

[0116] [0121] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질은 보체 C3 상의 에피토프에 결합할 수 있고, 이러한 결합은 C3 컨버타제의 형성을 방지한다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 C3 컨버타제의 활성을 억제한다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 C3 컨버타제 증폭 루프를 억제한다.

[0117] [0122] 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항-C3 항체는 하기에 언급된 다음 성질로 인해 다른 치료요법에 비해 GA 또는 다른 안구 장애를 치료하는데 있어서 더 양호한 효능 및 안전성을 가질 것으로 예상된다.

[0118] [0123] 본원 개시내용의 항-C3 항체는 약 60 kDa 미만의 분자량을 갖는 scFv 및 VHH 항체 단편을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 어떠한 방식으로든 제한하는 것은 아니지만, 본원 개시내용의 scFv는 약 25 kDa의 분자량을 가질 수 있고 본원 개시내용의 VHH는 약 15 kDa의 분자량을 가질 수 있는 반면, 다른 치료학적 제제는 보다 큰 분자량을 가질 수 있다. 유체역학적 반경 추정에 기초하여, 본원 개시내용의 항-C3 항체는 이들이 브루흐막을 더 효율적으로 침투할 수 있고 눈의 맥락막에 더 효율적으로 진입할 수 있기 때문에 맥락막 C3을 보다 양호하게 억제할 것으로 예상된다.

[0119] [0124] 본원 개시내용의 항-C3 항체는 1개월보다 긴 치료 유효 기간을 가질 수 있고, 이는 다른 치료학적 제제에 비해 더 긴 기간일 수 있다. 증가된 치료학적 유효 기간은 7mM만큼 높게 도달할 수 있는 본원 개시내용의 항-C3 항체의 몰 농도에 기인할 수 있다.

[0120] [0125] 본원 개시내용의 항-C3 항체는 다른 치료학적 제제에 비해 눈에 용이하게 주사될 수 있다. 본원 개시내용의 항-C3 항체는 PEG를 함유하지 않으므로 그의 점도가 감소된다. 따라서, 본원 개시내용의 항-C3 항체의 점도는 다른 치료학적 제제의 점도보다 낮을 것으로 예상된다. 20센티푸아즈(cP) 이하의 용액과 같은 감소된 점도 용액은 역압이 감소하기 때문에 눈에 더 쉽게 주사된다.

[0121] 항원 결합 폴리펩타이드의 발현

[0122] [0126] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 결합 폴리펩타이드(예를 들어, 항원 결합 단백질)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 제공된다. 이들 폴리뉴클레오타이드를 발현시키는 것을 포함하는 결합 폴리펩타이드를 제조하는 방법도 제공된다.

[0123] [0127] 본원에 기재된 결합 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 일반적으로 목적하는 양의 청구된 항체 또는 이의 단편을 생산하는 데 사용될 수 있는 숙주 세포로의 도입을 위한 발현 벡터에 삽입된다. 따라서, 특정 양상에서, 본 발명은 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터 및 이들 벡터 및 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0124] [0128] 본원에서 용어 "벡터" 또는 "발현 벡터"는 목적하는 유전자를 세포 내로 도입하고 발현시키기 위한 비히클로서 본 발명에 따라 사용되는 벡터를 의미하기 위해 사용된다. 당업자에게 공지된 바와 같이, 이러한 벡터는 플라스미드, 파아지, 바이러스 및 레트로바이러스로 이루어진 그룹으로부터 용이하게 선택될 수 있다. 일반적으로, 본 발명에 적합한 벡터는 선택 마커, 목적하는 유전자의 클로닝을 촉진하기 위한 적절한 제한 부위 및 진핵 또는 원핵 세포에 진입 및/또는 복제하는 능력을 포함할 것이다.

[0125] [0129] 본 발명의 목적을 위해 수많은 발현 벡터 시스템이 사용될 수 있다. 예를 들어, 벡터의 한 부류는 소 유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 바큘로바이러스, 레트로바이러스(예를 들어, RSV, MMTV, MOMLV 등) 또는 SV40 바이러스와 같은 동물 바이러스로부터 유래된 DNA 요소를 활용한다. 다른 것들은 내부 리보솜 결합 부위를 갖는 폴리시스트론 시스템의 사용을 포함한다. 추가적으로, 염색체에 DNA가 통합된 세포는 형질감염된 숙주 세포의 선택을 가능하게 하는 하나 이상의 마커를 도입함으로써 선택될 수 있다. 마커는 영양요구성 숙주에 대한 자가영양, 살생물제 내성(예를 들어 항생제) 또는 구리와 같은 중금속에 대한 내성을 제공할 수 있다. 선택가능한 마커 유전자는 발현될 DNA 서열에 직접 연결될 수 있거나, 동시-형질감염에 의해 동일한 세포에 도입될 수 있다. 최적의 mRNA 합성을 위해서는 추가 요소가 필요할 수도 있다. 이들 요소들은 신호 서열, 스플라이스 신호, 및 전사 프로모터, 인핸서 및 종결 신호를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 클로닝된 가변 영역 유전자는 상기 논의된 바와 같이 합성된 중쇄 및 경쇄 불변 영역 유전자(예를 들어, 사람 불변 영역 유전자)와 함께 발현 벡터에 삽입된다.

[0126] [0130] 다른 구현예에서, 결합 폴리펩타이드는 폴리시스트론 작제물을 사용하여 발현될 수 있다. 이러한 발현 시스템에서, 항체의 중쇄 및 경쇄와 같은 다중 관심대상의 유전자 생성물은 단일 폴리시스트론 작제물로부터 생산될 수 있다. 이들 시스템은 진핵 숙주 세포에서 비교적 높은 수준의 폴리펩타이드를 제공하기 위해 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 유리하게 사용한다. 상용성 IRES 서열은 미국 특허 제6,193,980호에 기재되어 있고, 이는 모든 목적을 위해 이의 전문이 본원에 참조로 인용된다. 당업자는 이러한 발현 시스템이 본 출원에 개시된 전체 범위의 폴리펩타이드를 효과적으로 생산하는데 사용될 수 있음을 이해할 것이다.

[0127] [0131] 보다 일반적으로, 항체 또는 이의 단편을 암호화하는 벡터 또는 DNA 서열이 제조되면, 발현 벡터는 적절

한 숙주 세포에 도입될 수 있다. 즉, 숙주 세포는 형질전환될 수 있다. 플라스미드를 숙주 세포에 도입하는 것은 당업자에게 잘 알려진 다양한 기술에 의해 달성될 수 있다. 이들은 형질감염(전기영동 및 전기천공 포함), 원형질체 융합, 인산칼슘 침전, 외피 DNA를 사용한 세포 융합, 미세주입 및 온전한 바이러스 감염을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 문헌(Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Chapter 24.2, pp. 470-472 Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988))을 참조한다. 숙주 내로의 플라스미드 도입은 전기천공에 의해 이루어질 수 있다. 형질전환된 세포는 경쇄 및/또는 중쇄 생산에 적합한 조건에서 성장하고 중쇄 및/또는 경쇄 단백질 합성에 대해 분석된다. 예시적인 검정 기술은 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 방사면역검정(RIA), 형광 활성화 세포 분류 분석(FACS), 면역조직화학 등을 포함한다.

[0128] [0132] 본원에 사용된 용어 "형질전환"은 유전자형을 변화시키고 결과적으로 수용 세포에 변화를 초래하는 외인성 DNA를 수용자 숙주 세포에 도입하는 것을 지칭하기 위해 넓은 의미로 사용된다. 유전학적으로 변형된 수용자 세포는 일시적 또는 안정한 형질전환에 의해 외인성 서열을 함유할 수 있다. 예를 들어, 외인성 서열은 수용자 세포의 게놈 서열, 표적 부위 또는 무작위 부위에 안정적으로 통합될 수 있다. 유전자 편집 방법(예를 들어, 상동성 재조합, 트랜스포존 매개 시스템, loxP-Cre 시스템, CRISPR/Cas9 또는 TALEN을 사용하는 방법)에 의해 변형된 세포는 본원 개시내용의 범위 내에 있다. 특정 구현예에서, 안정한 세포주는 항원 결합 단백질 또는 이의 단편의 생산을 위해 생성된다. 이는 균일한 품질 및 수율의 일관된 생산 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 유리하게 생성한다.

[0129] [0133] 이들과 동일한 맥락에서, "숙주 세포"는 재조합 DNA 기술을 사용하여 작제되고 적어도 하나의 이종성 유전자를 암호화하는 벡터로 형질전환된 세포를 지칭한다. 재조합 숙주로부터 폴리펩타이드를 단리하기 위한 과정에 대한 설명에서, "세포" 및 "세포 배양물"이라는 용어는 달리 명시되지 않는 한 항체의 공급원을 나타내기 위해 상호교환적으로 사용된다. 달리 말하면, "세포"로부터의 폴리펩타이드의 회수는 회전 하강된 전체 세포로부터 또는 배지와 현탁된 세포 둘다를 함유하는 세포 배양물로부터의 회수를 의미할 수 있다.

[0130] [0134] 하나의 구현예에서, 항체 발현을 위해 사용되는 숙주 세포주는 포유동물로부터 기원한다. 당업자는 발현될 목적하는 유전자 생성물에 가장 적합한 특정 숙주 세포주를 결정할 수 있다. 예시적인 숙주 세포주는 DG44 및 DUXB11(중국 햄스터 난소 계통, DHFR 마이너스), HELA(사람 자궁경부 암종), CV-1(몽키 콩팥 계통), COS(SV40 T 항원을 갖는 CV-1의 유도체), R1610(중국 햄스터 섬유아세포) BALBC/3T3(마우스 섬유아세포), HAK(햄스터 콩팥 계통), SP2/0(마우스 골수종), BFA-1c1BPT(소 내피 세포), RAJI(사람 림프구), 293 (사람 콩팥) 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 하나의 구현예에서, 세포주는 이로부터 발현된 항체의 변경된 글리코실화, 예를 들어 어푸코실화를 제공한다(예를 들어, PER.C6®(Crucell) 또는 FUT8-녹아웃 CHO 세포주(Potelligent® 세포)(Biowa, Princeton, N.J.)). 숙주 세포주는 일반적으로 아메리칸 티슈 컬쳐 콜렉션(American Tissue Culture Collection)과 같은 상업용 서비스나 공개된 문헌에서 가용하다.

[0131] [0135] 시험관 내 생산을 통해 대규모로 목적하는 폴리펩타이드를 대량 생산할 수 있다. 조직 배양 조건 하에서 포유동물 세포 배양을 위한 기술은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 에어리프트 반응기 또는 연속 교반기 반응기에서 균질한 현탁 배양, 또는 예를 들어 중공 섬유, 마이크로캡슐, 아가로스 마이크로비드 또는 세라믹 카트리지 상에서 고정화되거나 포획된 세포 배양을 포함한다. 필요하고/하거나 원하는 경우, 폴리펩타이드 용액은 통상적인 크로마토그래피 방법, 예를 들어 겔 여과, 이온 교환 크로마토그래피, DEAE-셀룰로스를 통한 크로마토그래피 및/또는 (면역-) 친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다.

[0132] [0136] 본 발명의 특징인 항원 결합 단백질을 암호화하는 유전자는 또한 세균, 효모, 곤충 또는 식물 세포와 같은 비포유동물 세포에서 발현될 수 있다. 이와 관련하여, 세균과 같은 다양한 단세포 비포유동물 미생물도 형질전환될 수 있고, 즉 배양 또는 발효에서 성장할 수 있다는 것이 이해될 것이다. 형질전환에 민감할 수 있는 세균은 엔테로박테리아세아(enterobacteriaceae)의 구성원, 예를 들어, 에스케리치아 콜리(*Escherichia coli*) 또는 살모넬라(*Salmonella*); 바실라세아(*Bacillaceae*), 예를 들어, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*); 뉴모코커스(*Pneumococcus*); 스트렙토코커스(*Streptococcus*); 및 해모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*)의 균주를 포함한다. 세균에서 발현될 때 단백질은 봉입체의 일부가 될 수 있음이 추가로 이해될 것이다. 단백질은 단리, 정제된 다음 기능성 분자로 어셈블리되어야 한다.

[0133] [0137] 원핵생물 이외에 진핵생물도 사용될 수 있다. 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 또는 통상의 제빵 효모가 진핵 미생물 중에서 가장 통상적으로 사용되지만, 다수의 다른 균주가 통상적으로 가용하다. 사카로마이세스에서의 발현을 위해, 예를 들어, 플라스미드 YRp7(문헌참조: Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980))이

통상적으로 사용된다. 상기 플라스미드는 이미 TRP1 유전자를 포함하고, 상기 유전자는 트립토판에서 성장하는 능력이 결여된 효모의 돌연변이체 균주, 예를 들어, ATCC No. 44076 또는 PEP4-1 (문헌참조: Jones, 1977, Genetics 85:1977)에 대한 선택 마커를 제공한다. 효모 숙주 세포 게놈의 특징으로서 trp1 병변의 존재는 이어서 트립토판의 부재하에 성장에 의한 형질전환을 검출하기 위해 효과적인 환경을 제공한다.

[0134] [0138] 따라서, 하나의 양상에서, 상기된 바와 같은 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 제조하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 하기의 단계를 포함한다:

[0135] i) 숙주 세포를 본원에 기재된 단백질의 발현을 허용하는 조건하에서 배양하는 단계; 및

[0136] ii) 단백질을 회수하는 단계; 및 임의로

[0137] iii) 추가로 단백질을 정제하고/하거나 변형시키고/시키거나 제형화하는 단계.

[0138] 항원 결합 단백질의 투여 방법

[0139] [0139] 항원 결합 단백질(예를 들어, 본원에 기재된 항원 결합 단백질)을 제조하고 대상체에게 투여하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있거나 당업자에 의해 용이하게 결정된다. 본원 개시내용의 항원 결합 단백질의 투여 경로는 경구, 비경구, 흡입, 국소 또는 안구내일 수 있다. 본원에서 사용된 용어 비경구는 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 피하, 직장 또는 질 투여를 포함한다. 본원에서 사용된 용어 안구내는 결막하, 유리체강내, 안구뒤 또는 전방내를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본원에 사용된 국소라는 용어는 액체 또는 용액 점안액, 에멀젼(예를 들어, 수중유 에멀젼), 현탁액 및 연고를 사용한 투여를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0140] [0140] 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 안구내로 투여된다. 망막과 같은 눈의 다양한 구조에 치료 화합물을 전달하는 것은 도전 과제이다. 이러한 과제는 몇 가지 제한적인 안구 장벽, 눈 깜박임 및 전달된 화합물의 세척 소실을 포함한 눈물 기전, 제한된 국소 주사 용적, 제한된 국소 생체이용률, 불순물 및 오염 물질에 대한 낮은 내성을 포함하지만 이에 제한되지 않는다(문헌참조: 예를 들어, Patel et al. World J Pharmacol. 2013; 2(2): 47-64; Morrison et al. Ther. Deliv. 2014; 5(12): 1297-1315). 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 이들 과제를 극복할 수 있다. 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 약 60 kDa 이하의 분자량을 갖는다. 약 60 kDa 이하의 항원 결합 단백질의 예는 scFv, VHH 및 Fab 단편을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 전장 항체에 비해 본원 개시내용의 항원 결합 단백질의 보다 작은 크기는 주사당 보다 많은 치료학적 항체의 전달을 가능하게 한다. 이를 통해 눈에 대한 항체의 농도는 높아질 수 있다. 본원 개시내용의 항원 결합 단백질의 보다 작은 크기는 또한 질환 관련 조직, 즉 눈의 맥락막 영역으로의 침투를 개선시킬 수 있다. 항원 결합 단백질은 할러층, 새틀러층, 맥락막모세혈관층 및 브루흐막을 포함하는 맥락막 영역의 하나 이상의 층을 침투하여 맥락막 영역의 해당 층 내의 보체 C3 및 C3b를 표적화할 수 있다.

[0141] [0141] 특정 구현예에서, 안구내 투여는 약물 전달 장치, 예를 들어, 맥락막상 약물 전달 장치 또는 망막하 약물 전달 장치와 같은 약물 전달 장치를 사용하여 성취된다. 맥락막상 투여 절차는 눈의 맥락막상 공간에 약물을 투여하는 것을 포함하고, 일반적으로 미세바늘이 있는 미세주사기와 같은 맥락막상 약물 전달 장치를 사용하여 수행된다(문헌참조: 예를 들어, Hariprasad, Retinal Physician; 2016; 13: 20-23; Goldstein, 2014, Retina Today 9(5): 82-87; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 맥락막상 공간에 본원 개시내용의 항원 결합 단백질을 침착시키는 데 사용될 수 있는 맥락막상 약물 전달 장치는 제조사(Clearside® Biomedical, Inc.)에 의해 제조된 맥락막상 약물 전달 장치를 포함하지만 이에 제한되지 않는다(예를 들어 Hariprasad, 2016 상기 참조). 맥락막상 공간을 통해 망막하 공간에 본원 개시내용의 항원 결합 단백질을 침착시키는 데 사용될 수 있는 망막하 약물 전달 장치는 제조사(Janssen Pharmaceuticals, Inc.)에 의해 제조된 망막하 약물 전달 장치를 포함하지만 이에 제한되지 않는다(문헌참조: 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2016/040635).

[0142] [0142] 특정 구현예에서, 안구내 투여는 유리체강내 경로를 통해 달성된다. 유리체강내 투여는 흔히 시린지 및 27-게이지 내지 30-게이지 바늘을 사용하여 수행된다(예를 들어, Jiang et al. 상기참조).

[0143] [0143] 모든 이들 투여 형태가 본원 개시내용의 범위 내에 있는 것으로 명백히 고려되지만, 투여 형태는 주사, 특히 유리체강내 주사를 위한 용액일 수 있다. 일반적으로, 주사용의 적합한 약제학적 조성물은 완충제(예를 들어, 아세테이트, 포스페이트 또는 시트레이트 완충제), 계면활성제(예를 들어, 폴리소르베이트), 선택적으로 안정화제(예를 들어, 사람 알부민) 등을 포함할 수 있다. 그러나 본원의 교시와 상용될 수 있는 다른 방법에서는 변형된 항체가 불리한 세포 집단의 부위에 직접 전달될 수 있어 치료학적 제제에 대한 환부 조직의 노출을 증가시킨다.

[0144] [0144] 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 낮은 점도를 갖는 용액 중에서 제형화된다. 용액의 점도는 센티푸아즈(cP) 단위로 측정된다. 높은 점도 항체 용액은 본원 개시내용의 항원 결합 단백질을 눈에 투여하는 데 어려움을 부여할 수 있다. 예를 들어, 점도가 50cP를 초과하는 용액은 역압이 높아 미세한 바늘로 투여하기 어려울 수 있다. 따라서 본원 개시내용의 항원 결합 단백질을 저점도 용액으로 제형화하는 것이 바람직하다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질 및 이의 약제학적 조성물은 약 1cP 내지 약 50cP 사이의 점도를 갖는다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질 및 이의 약제학적 조성물은 약 20cP, 약 15cP, 약 10cP, 약 5cP, 약 4cP, 약 3cP, 약 2cP 또는 약 1 cp 이하의 점도를 갖는다. 항체 점도에 관한 추가의 세부사항은 문헌(참조: Tomar et al. MAbs. 2016; 8(2): 216-228 and Fennell et al. MAbs. 2013; 5(6): 882-895)에 기재되어 있다.

[0145] [0145] 투여를 위한 제제는 멸균 수용액 또는 비-수용액, 현탁액 및 에멀젼을 포함한다. 비-수성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일, 예를 들어, 올리브유 및 주사가능한 유기 에스테르, 예를 들어, 에틸 올레에이트이다. 수성 담체는 식염수 및 완충 매질을 포함하는, 물, 알코올/수용액, 에멀젼 또는 현탁액을 포함한다. 본원 개시내용의 조성물 및 방법에서, 약제학적으로 허용되는 담체는 0.01-0.1M 또는 0.05M 포스페이트 완충액, 또는 0.8% 식염수를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 다른 통상적인 비경구 비히클은 인산나트륨 용액, 링거 덱스트로스, 덱스트로스 및 염화나트륨, 락테이트화된 링거, 고정 오일 등을 포함한다. 정맥내 비히클은 체액 및 영양 보충제, 전해질 보충제, 예를 들어, 링거 덱스트로스 기반의 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예를 들어 항미생물제, 항산화제, 킬레이팅 제제, 불활성 가스 등과 같은 보존제 및 기타 첨가제도 존재할 수 있다. 특정 구현예에서, 주사용으로 적합한 약제학적 조성물은 멸균 수용액(수용성인 경우) 또는 분산액, 및 멸균 주사용 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 그러한 경우에 있어서, 상기 조성물은 멸균되어야 하고, 용이한 주사가능성이 존재하는 정도로 유동성이 있어야 한다. 제조 및 저장 조건에서 안정적이어야 하고 세균 및 진균류와 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 담체는 예를 들면, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 렉시틴과 같은 코팅제의 사용에 의하여, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의하여, 그리고 계면활성제의 사용에 의하여 유지될 수 있다.

[0146] [0146] 미생물 작용의 방지는 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산 및 티메로살 등에 의하여 달성될 수 있다. 등장화제, 예를 들어 슈가, 다가알코올 또는 염화나트륨도 조성물에 포함될 수 있다. 주사가능한 조성물의 흡수 지연은 해당 조성물 중에 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 겔라틴을 포함하여 유발될 수 있다.

[0147] [0147] 임의의 경우에, 멸균 주사가능한 용액은, 적절한 용매에 필요에 따라 상기 열거된 성분들 중 하나 또는 조합물과 함께 활성 화합물(예를 들어, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편)을 요구되는 양으로 혼입시키고, 이어서, 멸균 여과함으로써 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산 매질 및 상기 열거된 것들로부터 필요한 기타 성분을 함유하는 멸균 비히클에 활성 화합물을 혼입하여 제조된다. 멸균 주사가능한 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법은 전형적으로 이의 사전 멸균-여과된 용액으로부터 활성 성분 및 임의의 추가의 바람직한 성분의 분말을 수득하는 진공 건조 및 동결-건조를 포함한다. 주사용 제제는 가공되어 앰푸울, 백, 병, 주사기 또는 바이알과 같은 컨테이너에 충전되고 당업계에 공지된 방법에 따라 무균 조건 하에 밀봉시킨다.

[0148] [0148] 상기된 병태의 치료를 위한 본원 개시내용의 조성물의 유효량은 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리학적 상태, 환자가 사람 또는 동물 인지의 여부, 투여되는 다른 약물 처리 및 처리가 예방을 위한 것인지 치료를 위한 것인지의 여부를 포함하는 많은 상이한 인자에 의존하여 다양하다. 일반적으로 환자는 사람이지만 유전자전이 포유류를 포함한 비사람 포유류도 치료할 수 있다. 치료 용량은 안전성과 효능을 최적화하기 위해 당업자에게 공지된 일상적인 방법을 사용하여 적정될 수 있다.

[0149] [0149] 이전에 논의된 바와 같이, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질, 이의 면역반응성 단편 또는 재조합체는 포유동물 장애의 생체내 치료를 위해 약제학적 유효량으로 투여될 수 있다. 이와 관련하여, 기재된 항원 결합 단백질은 투여를 용이하게 하고 활성제의 안정성을 촉진하도록 제형화될 것이라는 것이 이해될 것이다.

[0150] [0150] 본원 개시내용에 따른 약제학적 조성물은 전형적으로 생리 식염수, 비독성 완충제, 보존제 등과 같은 약제학적으로 허용되는 비독성 멸균 담체를 포함한다. 본 출원의 목적을 위해, 치료학적 제제에 접합되거나 접합되지 않은 변형된 항원 결합 단백질, 면역반응 단편 또는 이의 재조합체의 약제학적 유효량은 항원에 대한 효과적인 결합을 달성하고 이득을 성취하는, 예를 들어, 질환 또는 장애의 증상을 개선하거나 물질이나 세포를 검출

하기에 충분한 양을 의미하는 것으로 간주되어야 한다. 종양 세포의 경우, 변형된 결합 폴리펩타이드는 전형적으로 신생물 또는 면역반응성 세포 상의 선택된 면역반응성 항원과 상호작용할 수 있고 이들 세포의 사멸을 증가시킬 수 있다. 물론, 본원 개시내용의 약제학적 조성물은 변형된 결합 폴리펩타이드의 약제학적 유효량을 제공하기 위해 단일 또는 다중 용량으로 투여될 수 있다.

[0151] [0151] 본원 개시내용의 범위에 따라, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 치료학적 또는 예방학적 효과를 생성하기에 충분한 양으로 전술한 치료 방법에 따라 사람 또는 다른 동물에게 투여될 수 있다. 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 공지된 기술에 따라 본원 개시내용의 항체를 통상적인 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 조합하여 제조된 통상적인 투여 형태로 상기 사람 또는 다른 동물에게 투여될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제의 형태 및 특징은 이것이 배합되는 활성 성분의 양, 투여 경로 및 기타 잘 알려진 변수에 의해 결정된다는 것이 당업자라면 인지할 것이다. 당업자는 본원 개시내용에 기재된 하나 이상의 결합 폴리펩타이드 종을 포함하는 칵테일이 특히 효과적인 것으로 입증될 수 있음을 추가로 이해할 것이다.

[0152] [0152] 본원에 정의된 약제학적 조성물의 생물학적 활성은 예를 들어, 보체 억제 검정, 예를 들어 그러나 어떠한 제한 없이, 사람 혈청에서 기능성 고전적, 렉틴 및 대체 보체 경로 활성을 결정하기 위한 효소 면역검정에 의해 측정될 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에 정의된 약제학적 조성물의 억제 활성은 보체 시스템 스크리닝 Wieslab®을 사용하여 평가될 수 있다(Euro Diagnostica AB, Malmo, Sweden).

[0153] [0153] 보체 경로를 억제하는 본원 개시내용의 항체의 능력을 연구하기 위한 기능성 검정은 정제된 보체 성분을 사용하여 수행될 수 있고, 상기 보체 성분으로부터의 효소 복합체는 문헌(참조: Okroj et al. PLoS One.; 2012; 7(10): e47245)에 의해 기재된 바와 같이 적혈구 또는 인공 기질의 표면에서 재구성된다.

[0154] [0154] 표준 50% 용혈 보체(CH50) 검정은 또한 문헌(참조: Jaskowski et al. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology; 1999; 6(1):137-9)에 기재된 바와 같이 고전적 보체 경로의 기능성 활성을 억제하는 화합물의 능력을 평가하는 통상적으로 사용되는 방법이다.

[0155] [0155] 특정 구현예에서, CP, LP 및 AP 보체 경로의 활성은 본원 개시내용의 항원 결합 단백질의 존재하의 적혈구 용혈 수준을 본원 개시내용의 항원 결합 단백질의 부재 하의 적혈구 용혈 수준과 비교하여 측정함으로써 결정될 수 있다. 특정 구현예에서, 항체-감작화된 양 적혈구를 사용하여 고전적 경로에 의해 매개되는 보체 의존성 용혈을 측정할 수 있다. 특정 구현예에서, 항체 감작화된 토끼 적혈구는 문헌(참조: Tomlinson et al. J Immunol.1997; 159 (11): 5606-5609)에 기재된 바와 같이 대체 경로에 의해 매개되는 보체 의존성 용혈을 측정하기 위해 사용될 수 있다.

[0156] [0156] 특정 구현예에서, CP, LP 및 AP 보체 경로의 활성은 본원 개시내용의 항원 결합 단백질의 존재하의 막 공격 복합체 (MAC) 형성을 본원 개시내용의 항원 결합 단백질의 부재 하의 MAC 형성과 비교하여 측정함으로써 측정될 수 있다. 사람 혈청에서 고전적 보체 경로의 IgM 매개 활성화에 대한 MAC 검정은 IgM 코팅된 ELISA 플레이트상에 MAC의 침착을 유도한다. MAC 형성은 C5b-9에 대한 알칼린 포스파티스 표지된 항체를 사용하여 검출할 수 있다. 본원 개시내용의 항원 결합 단백질의 부재하에, ELISA 신호는 용량 의존적 방식으로 감소된다. 대체 경로를 시험하기 위해, 사람 혈청에서 대체 보체 경로의 LPS 매개 활성화에 대한 MAC 분석을 사용하여 LPS 코팅된 ELISA 플레이트상에 MAC를 침착시킬 수 있다. 적절한 MAC 검정은 퍼시픽 바이오마커 보체 막 공격 복합체(Pacific Biomarkers Complement Membrane Attack Complex)(SC5b-9) ELISA 검정을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0157] [0157] 본원에 사용된 "효능" 또는 "생체내 효능"은 예를 들어 표준 안과학적 반응 기준과 같은 표준화된 반응 기준을 사용하여 본원 개시내용의 약제학적 조성물에 의한 치료요법에 대한 반응을 지칭한다. 본원 개시내용의 약제학적 조성물을 사용하는 치료요법의 성공 또는 생체내 효능은 의도된 목적에 대한 조성물의 효과, 즉 목적하는 효과를 유발하는 조성물의 능력, 즉 눈에서 보체 경로의 억제를 지칭한다. 생체내 효능은 다양한 안구 질환에 대해 확립된 표준 방법에 의해 모니터링될 수 있다. 모니터링하는 방법은 암슬러 격자 시험(Amsler grid test), 검안경, 안저 현미경(ocular fundus microscopy), 안구 컴퓨터 촬영술, 및 광 간섭 단층 촬영을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 추가로, 다양한 질환 특이적 임상적 화학 파라미터 및 기타 확립된 표준 방법이 사용될 수 있다.

[0158] 항체 가공 및 최적화

[0159] [0158] 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 가공되거나 최적화될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "최적화된" 또는 "최적화"는 하나 이상의 기능적 성질을 개선하기 위해 항원 결합 단백질을 변경하는 것을 지칭

한다. 변경은 항원 결합 단백질 내의 하나 이상의 아미노산의 결실, 치환, 부가 및/또는 변형을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0160] [0159] 본원에 사용된 용어 "기능적 성질"은 개선(예를 들어, 통상적인 항원 결합 단백질에 비해)이 당업자에게 바람직하고/하거나 유리한 항원 결합 단백질의 성질이고, 예를 들어, 상기 개선은 단백질의 제조 성질 또는 치료학적 효능을 개선하기 위한 것이다. 하나의 구현예에서, 기능적 성질은 안정성(예를 들어, 열 안정성)이다. 또 다른 구현예에서, 기능적 성질은 용해도(예를 들어, 세포 조건하에서)이다. 또 다른 구현예에서, 기능적 성질은 응집 거동이다. 여전히 또 다른 구현예에서, 기능적 성질은 단백질 발현(예를 들어, 원핵생물 세포에서)이다. 또 다른 구현예에서 기능적 성질은 제조 공정에서 봉입체 가용화 이후의 재폴딩 거동이다. 특정 구현예에서, 기능적 성질은 항원 결합 친화성의 개선이 아니다. 또 다른 구현예에서, 하나 이상의 기능적 성질의 개선은 항원 결합 단백질의 결합 친화성에 실질적인 효과를 갖지 않는다.

[0161] [0160] 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 scFv이고, 항원 결합 단백질 내 관심 대상의 아미노산 위치(예를 들어, 적어도 하나의 바람직한 성질을 갖는 scFv 서열의 데이터베이스를 비교함으로써 동정된 아미노산 위치, 예를 들어, 성숙한 항체 서열의 데이터베이스, 예를 들어, Kabat 데이터베이스에 대해 품질 관리(QC) 검정으로 선택된 것과 같은))에서 치환, 결실 및/또는 첨가될 바람직한 아미노산 잔기를 동정함으로써 최적화된다. 따라서, 본원 개시내용은 특정 아미노산 잔기를 선택하기 위한 "집적/배제" 방법을 추가로 제공한다. 여전히 추가로, 본원 개시내용은 본원에 기재된 "기능적 컨센서스" 접근법을 사용하여 동정된 특정 프레임워크 아미노산 위치를 돌연변이시킴으로써 항원 결합 단백질(예를 들어, scFv)을 가공하는 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, 프레임워크 아미노산 위치는 본원에 기재된 "집적/배제" 분석 방법을 사용하여 기존 아미노산 잔기를 "집적된" 잔기인 것으로 밝혀진 잔기로 치환함으로써 프레임워크 아미노산 위치가 돌연변이된다. 하나의 양상에서, 본원 개시내용은 VH 및 VL 아미노산 서열을 갖는 단일쇄 항체(scFv)에서 돌연변이에 대한 아미노산 위치를 동정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 a) scFv VH, VL 또는 VH 및 VL 아미노산 서열을 scFv VH, VL 또는 VH 및 VL 아미노산 서열이 항체 VH, VL 또는 VH 및 VL 아미노산 서열이 데이터베이스의 항체 VH, VL 또는 VH 및 VL 아미노산 서열과 정렬되도록 다수의 항체 VH, VL 또는 VH 및 VL 아미노산 서열을 포함하는 데이터베이스로 입력하는 단계; b) scFv VH 또는 VL 아미노산 서열 내의 아미노산 위치를 데이터베이스의 항체 VH 또는 VL 아미노산 서열 내의 상응하는 위치와 비교하는 단계; c) scFv VH 또는 VL 아미노산 서열 내의 아미노산 위치가 데이터베이스의 항체 VH 또는 VL 아미노산 서열 내의 상응하는 위치에 보존되는 아미노산 잔기에 의해 점유되는지 여부를 결정하는 단계; 및 d) 아미노산 위치가 데이터베이스의 항체 VH 또는 VL 내의 상응하는 위치에서 보존되지 않는 아미노산 잔기에 의해 점유되는 경우 scFv VH 또는 VL 아미노산 서열 내의 아미노산 위치를 돌연변이에 대한 아미노산 위치로서 동정하는 단계를 포함한다. ScFV 최적화는 WO2008110348, WO2009000099, WO2009000098, 및 WO2009155725에 추가로 상세히 기재되어 있고, 이 모두는 본원에 참조로 인용된다.

[0162] 사람화:

[0163] [0161] 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 사람화될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "사람화된"은 사람에서 자연적으로 생성된 항체와의 유사성을 증가시키도록 변형된 비사람 공여자 항체를 지칭한다. 본원에서 사용되는 용어 "사람화"는 비사람 공여자 항체를 사람화하는 공정을 지칭한다. 사람화는 비사람 공여자 항체(예를 들어, 토끼 또는 라마 항체 CDR)의 CDR을 사람 또는 사람화 항체 수용체 프레임워크 영역, 예를 들어, 가용성 및 안정한 경쇄 및/또는 중쇄 사람 항체 프레임워크 영역에 접목시킴으로써 달성될 수 있다. 사람 수용체 프레임워크에 CDR을 접목시키는 일반적인 방법은 윈터(Winter)의 미국 특허 제5,225,539호 및 퀸 등(Queen et al.)의 WO199007861에 기재되어 있고, 상기 문헌은 본원에 참조로 인용된다. 적절한 수용체 프레임워크 영역은 개선된 용해도 및 안정성과 같은 우수한 기능적 성질을 나타낼 수 있다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 토끼 항체이다. 상기 토끼 항체의 CDR은 본원에 참조로 인용된 WO2009155726에 기재된 프레임워크 영역과 같은 범용 수용체 프레임워크 영역에 접목될 수 있다.

[0164] [0162] 특정 구현예에서, 비사람 항체의 사람화/안정화 또는 사람 항체의 안정화를 위한 사람 프레임워크는 κ 가변 경쇄 도메인 내 κ 연결 세그먼트를 λ 연결 세그먼트로 대체하여 단백질 안정성이 개선되고 응집 성향이 감소된 κ-λ 키메라 가변 경쇄 도메인을 생성하는 것과 관련이 있다. 이는 또한 단백질 안정성을 추가로 개선하고 응집 성향을 추가로 감소시키기 위한, AHo101 위치에서 κ 컨센서스 잔기의 돌연변이 및 κ-λ 키메라 가변 경쇄 도메인에서 λ 연결 세그먼트의 팩킹을 지원하기 위한 λ 컨센서스 잔기에 의한 대체에 관한 것이다. 이들 사람 프레임워크 영역에 관한 추가의 상세한 사항은 본원에 참조로 인용된 WO2014206561 및 Wo2019057787에 기재되어 있다.

[0165] 보체 C3 매개 질환 및 장애를 치료하는 방법

[0166] [0163] 보체 C3 매개 질환 및 장애를 앓고 있는 대상체에서 본원에 기재된 항원 결합 단백질을 사용하여 보체 C3 매개 질환 및 장애를 치료하는 방법이 제공된다.

[0167] [0164] 특정 구현예에서, 보체 C3 매개 질환 또는 장애는 노인성 황반 변성(AMD), 지도형 위축(GA), 신생혈관 녹내장, 당뇨병성 망막병증, 미숙아 망막병증, 수정체후 섬유증식증(retrolental fibroplasia), 자가면역 포도막염, 맥락망막염, 망막염, 류마티스 관절염, 건선 및 죽상 동맥 경화증으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정 구현예에서, C3 매개 질환은 AMD의 한 형태이다. AMD는 일반적으로 2개의 주요 부류인 무수 AMD 및 습윤 AMD로 나누어진다. 비삼출성 AMD라고도 알려진 무수 AMD는 황반 영역에 드루젠(노란색 침착물)이 존재하는 것을 특징으로 한다. 삼출물 AMD 또는 신생혈관 AMD로서도 공지된 습윤 AMD는 황반 아래 맥락막으로부터의 비정상적 혈관의 성장을 특징으로 한다. 상기 공정은 맥락막 혈관신생이라고도 불리우고, 새로운 혈관은 혈액과 같은 체액이 망막 내로 및 주변으로 누출될 수 있다. 위축성 AMD 또는 진행성 무수 AMD로도 알려진 지도형 위축은 망막 세포의 점진적이고 비가역적인 손실을 초래할 수 있는 진행된 형태의 AMD이다.

[0168] [0165] 이것은 특히 상기된 AMD와 같은 안구 질환을 치료하는 것은 특히 도전 과제이다. 이전에 언급한 바와 같이, 치료학적 제제를 눈으로 전달하는 것은 RPE와 같은 혈액-망막-장벽을 포함하지만 이에 제한되지 않는 여러 장벽으로 인해 제한된다. RPE를 침투하여 눈의 맥락막에 진입하는 능력은 약물의 치료학적 잠재력을 증진시킨다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 눈의 맥락막 영역의 RPE 및 브루흐막을 침투하여 맥락막 영역에서 보체 C3을 표적화할 수 있다. RPE 및 브루흐막을 침투하는 본원 개시내용의 항원 결합 단백질의 능력은 보체 C3 매개 질환 또는 장애의 치료에서 이들의 치료학적 잠재력을 개선시킨다. 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 침투를 촉진하기에 충분히 낮은 크기로 인해 부분적으로 RPE 및 브루흐막을 침투할 수 있다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질의 크기는 분자량으로 측정된다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 약 60 kDa 미만인 분자량을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 약 20 kDa 내지 약 30 kDa 또는 약 10 kDa 내지 약 20 kDa이다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 약 25 kDa이다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 약 15 kDa이다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질의 크기는 유체역학적 반경으로 측정된다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 약 3.0 nm 이하의 유체역학적 반경을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 약 2.5 nm 이하의 유체역학적 반경을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 약 2.0 nm 이하의 유체역학적 반경을 갖는다.

[0169] [0166] 하나의 양상에서, 본원 개시내용은 보체 고전적 경로(CP), 렉틴 경로(LP) 및 대체 경로(AP)의 활성을 억제하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 보체 C3을, 보체 C3 상의 에피토프에 결합하는 항원 결합 단백질 또는 이의 단편과 접촉시키는 것을 포함한다. 3개의 보체 경로 모두를 억제하는 본원 개시내용의 항원 결합 단백질의 능력은 보체 C3 매개 질환 또는 장애의 치료에서 이들의 치료학적 잠재력을 추가로 개선시킨다. 이론에 얽매이고자 하는 것 없이, 3개 보체 경로 모두를 억제하면 하나의 활성 경로의 질환 촉진 효과가 다른 비활성화된 경로를 보상하는 것을 방지함으로써 본원 개시내용의 항원 결합 단백질의 치료학적 잠재력을 개선시킬 수 있다.

[0170] [0167] 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 CP, LP 및 AP 보체 경로의 활성을 대략적으로 동등하게 억제할 수 있다. 예를 들어, 그러나 어떠한 방식으로 제한되지 않고, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 CP 경로의 활성을 적어도 80%까지 억제할 수 있고, LP의 활성을 적어도 80%까지 억제할 수 있고, AP의 활성을 적어도 80%까지 억제할 수 있다. 특정 구현예에서, CP, LP 및 AP 보체 경로의 활성 억제는 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%이다.

[0171] [0168] 또 다른 양상에서, 본원 개시내용은 보체 C3 상의 에피토프에 결합하는 항원 결합 단백질 또는 이의 단편의 안구내 투여를 통해 맥락막에 위치된 보체 C3의 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 눈의 맥락막 영역에서 활성화된 보체 경로는 보체 C3 매개 질환 또는 장애에 기여할 수 있다. 따라서 맥락막 영역으로 침투하거나 확산할 수 있고 보체 C3 및 C3b를 표적화할 수 있는 항원 결합 단백질을 제공하는 것이 본원 개시내용의 목적이다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 눈의 맥락막 영역에서 C3 컨버타제의 활성을 억제한다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 항원 결합 단백질은 눈의 맥락막 영역에서 C3 컨버타제 증폭 루프를 억제한다.

[0172] 의학적 용도

[0173] [0169] 본 발명은 또한 대상체에서 보체 C3 매개 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 항원 결합 단백질 또는 이의 단편에 관한 것이다. 항원 결합 단백질 또는 이의 단편에 관해 본원에 기재된 모든 기술적 특성이 적용 가능하다.

[0174] 키트

[0175] [0170] 본 발명은 또한 본원에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 키트를 포함한다. 하나의 구현예에서, 키트는 유효량의 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 단위 투여 형태로 함유하는 조성물을 포함한다. 이러한 키트는 조성물을 포함하는 멸균 컨테이너를 포함할 수 있고; 이러한 컨테이너의 비제한적인 예는 바이알, 앰푸울, 병, 튜브, 주사기, 블리스터 팩을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 조성물은 약제학적 조성물이고, 컨테이너는 약제를 유지하기 위해 적합한 재료로 만들어진다. 하나의 구현예에서, 키트는 동결건조된 형태의 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 제1 컨테이너에 포함할 수 있고, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 재구성하거나 희석하기 위한 희석제(예를 들어, 멸균수)는 제2 컨테이너에 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 희석제는 약제학적으로 허용되는 희석제이다.

[0176] [0171] 전형적으로, 키트는 사용 지침과 함께 컨테이너 내에 또는 컨테이너와 함께 공급되는 별도의 시트, 팜플렛 또는 카드를 추가로 포함할 것이다. 키트가 약제학적 용도로 의도된 경우, 이는 다음 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다: 보체 C3 매개 질환 또는 장애가 있는 대상체에게 조성물을 투여하기 위한 정보 및 투여 일정, 치료학적 제제 설명, 주의사항, 경고, 징후, 반대 징후, 과다 복용 정보 및/또는 이상 반응.

[0177] 진단학적 적용 및/또는 검출

[0178] [0172] 본 발명의 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 생체내 및/또는 시험관내에서 검출 또는 진단 목적으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 특정 세포 또는 조직에서의 발현을 검출하기 위한 항원 결합 단백질을 포함하는 광범위한 면역검정이 당업자에게 공지되어 있다. 이러한 적용을 위해, 본원에 기재된 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 표지되거나 표지되지 않을 수 있다. 예를 들어, 그러나 어떠한 방식으로 제한되지 않고, 표지되지 않은 항원 결합 단백질이 사용될 수 있고, 본원에 기재된 항원 결합 단백질 상의 에피토프를 인지하는 2차 항체에 의해 검출될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 검출기 물질(들)에 의해 인지될 수 있는 하나 이상의 물질과 접합되고, 예를 들어 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 스트렙타비딘에 의해 검출될 수 있는 비오틴과 접합된다. 특정 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 샘플 내 C3 및/또는 C3b의 존재를 검출하는 데 유용하다. 특정 구현예에서, 샘플은 생물학적 샘플이다. 본원에 사용된 용어 "검출하는"은 정량적 및/또는 정성적 검출을 포함한다. 특정 구현예에서, 생물학적 샘플은 사람 환자로부터의 세포 또는 조직, 예를 들어, 망막 조직을 포함한다.

[0179] [0173] 특정 구현예에서, 상기 방법은 생물학적 샘플을 본 발명의 하나 이상의 항원 결합 단백질 또는 이의 단편과 접촉시키는 단계; 샘플 내 C3(존재하는 경우)와 항원 결합 단백질 또는 이의 단편 간의 복합체를 형성하도록 방치하는 단계; 및 이어서 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 검출하는 단계를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 보체 C3 및 C3b 둘다에 결합할 수 있다.

[0180] [0174] 하나의 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 검출가능한 신호에 의해 검출된다. 또 다른 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 ELISA, 면역세포화학(ICC), 면역조직화학(IHC), 웨스턴 블롯팅 및/또는 유동 세포측정법에 의해 검출된다.

[0181] [0175] 생물학적 샘플은 망막 조직과 같은 조직 샘플일 수 있다. 조직 샘플은 고정된 조직 샘플, 예를 들어, 포르말린으로 고정되고 파라핀으로 포매된 조직 샘플일 수 있다.

[0182] [0176] 하나의 구현예에서, 이러한 방법은 환자를 선택하기 위해, 즉 본원에 기재된 바와 같은 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 사용한 치료요법에 대한 대상체의 적격성을 결정하기 위해 사용된다.

[0183] [0177] 본원에 기재된 구현예의 범위를 벗어나지 않고 적합한 등가물을 사용하여 본원에 기재된 방법의 다른 적절한 변형 및 적응이 이루어질 수 있다는 것이 당업자에게 용이하게 명백할 것이다. 지금 특정 구현예가 상세히 기재되었고, 동일한 구현예는 하기 실시예를 참조로 보다 명확하게 이해될 것이고, 이는 단지 설명을 목적으로 포함되고 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0184] **실시예**

[0185] **실시예 1 - 항-C3 항체 라이브러리의 생성 및 특징 분석**

[0186] [0178] 보체의 부분 억제제를 사용하여 가능한 것보다 더 효율적으로 보체 캐스케이드를 억제하는 항체를 생성하기 위해 다양한 에피토프 인지를 갖춘 광범위한 항-C3 항체 수거물이 목적하는 기능을 가진 항체의 단리 가능성을 증가시키는 것으로 추정되었다. 이를 위해, C3로 면역화된 동물의 B 세포로부터 유래된 항체 가변 도메인을 암호화하는 게놈 정보를 사용하여 대형 항체 파아지 라이브러리를 구축하였다.

[0187] [0179] C3 상의 상이한 에피토프를 인지할 수 있는 수많은 항체를 생성하기 위해 뉴질랜드 흰 토끼 3마리와 라마 2마리를 혈청으로부터 정제한 고유 사람 C3 단백질로 면역화하였다(**도 2**). 각 동물에 서로 다른 시점에 완전 또는 불완전 프로인트 보조제와 함께 C3 단백질을 4회 주사하였다(**도 3a**). 각 동물의 면역 반응은 면역화된 동물의 혈청 샘플에 존재하는 항-C3 항체를 정량화하기 위해 ELISA로 시험하였다. 혈청의 항체 역가는 우수한 면역 반응을 지적하였다(**도 3b**).

[0188] [0180] scFv 항체 cDNA 라이브러리는 PCR 증폭을 통해 토끼로부터 단리된 PBMC 및 비장 림프구로부터 추출된 RNA로부터 구축하였다. 가변 경쇄 및 중쇄 도메인에 대한 암호화 서열을 개별적으로 증폭시키고 일련의 중첩 폴리머라제 연쇄 반응(**PCR**) 단계를 통해 연결하여 최종 scFv 생성물을 수득하였다.

[0189] [0181] 라마의 경우, 대형 채혈을 수행하여 이로부터 역전사 효소 키트를 사용하여 RNA를 단리하고 cDNA로 전사하였다. cDNA를 세정하고 중쇄 단편을 리더 서열 영역 및 CH2 영역에서 어닐링하는 프라이머를 사용하여 증폭시켰다.

[0190] [0182] 토끼로부터 scFv 및 라마로부터 VHH를 암호화하는 증폭된 DNA 서열을 적절한 제한 효소를 사용하여 분해한 후 파지미드 벡터에 연결하였다. 파지미드 벡터로 항체 파아지 디스플레이 라이브러리 생성에 매우 적합한 TG1 전기적격 세포를 형질전환시켰다. 이들 공정은 10^8개 초과의 클론 크기를 갖는 4개의 항체 라이브러리를 생성시켰고 삽입 퍼센트는 100%에 가까웠다(**도 4a** 및 **도 4b**).

[0191] **실시예 2 - 3개의 보체 경로 모두를 억제하는 항-C3 항체의 스크리닝**

[0192] [0183] C3은 13개의 서로 다른 도메인과 185킬로달톤의 분자 크기로 구성된 대형 단백질이다. 보체 활성화 동안에, C3은 상이한 부위에서 단백질 용해 절단 및 구조적 변형을 진행한다. C3 유래된 단편은 서로 상이한 이펙터 기능을 발휘하고 보체 경로의 증폭 루프를 가속화하는 컨버타제를 형성한다. 효소 C3-컨버타제는 여러 C3 분자를 C3b로 절단하여 강력한 증폭 루프에서 더 많은 C3 컨버타제를 생성하여 보체 시스템을 완전히 활성화시키는 능력을 갖는다. 본원에 기재된 스크리닝은 C3 및 C3b 둘다의 서로 다른 에피토프에 결합하고 보체 활성화의 3개의 경로(고전적, 렉틴 및 대체)를 모두 효과적으로 차단하는 항체를 동정하는 데 사용되었다.

[0193] [0184] 친화성이 높은 항-C3 항체를 스크리닝하기 위해, 파아지에 디스플레이된 scFvs 및 VHH 항체를 생산하고 혈청으로부터 정제된 고유 사람 C3에 대해 여러 라운드의 바이오패닝(선택)을 수행하였다. 바이오패닝에 사용된 C3 단백질의 농도를 감소시키거나 세척의 엄중도를 증가시킴으로써 각 라운드마다 선택의 엄중도를 증가시켰다. 대략 380개의 모노클로날 파아지를 선택하여 ELISA 검정에서 C3에 결합하는 능력에 대해 스크리닝하였다(**도 5**).

[0194] [0185] ELISA 데이터와 DNA 핑거프린트를 기반으로 41개의 파아지 클론을 서열분석을 위해 선택하고 항체 단백질로 재조합적으로 생산하고 사람 C3 및 C3b에 결합하는 능력과 추가 특징 분석을 위해 평가하였다(**도 5**).

[0195] [0186] 3개의 보체 경로 모두를 차단하는 항체를 동정하기 위해 Wieslab® 보체 시스템 스크리닝(Svar Life Science AB, Malmo, Sweden)을 사용하여 사람 혈청에서 기능성 고전적, 렉틴 및 대체 보체 경로를 정성적으로 결정하기 위한 효소 면역검정을 사용하여 항체를 스크리닝하였다. 생성된 C5b-C9 신생항원의 양은 보체 경로의 기능적 활성에 비례한다. **도 6**에 도시된 바와 같이, 5개의 항체, MO251, MO228, MO122, MO123 및 MO124는 사람 혈청(Quidel)에서 2 μM의 고정 농도에서 3개의 보체 경로 모두를 적어도 90%로 억제할 수 있었다.

[0196] **실시예 3 - 항-C3 항체의 특징 분석: MO251, MO228, MO122, MO123, 및 MO124**

[0197] [0187] MO251, MO228, MO122, MO123 및 MO124는 C3상의 동일한 영역(에피토프)을 표적화하는 것들을 동정하기 위해 쌍별 조합 방식으로 시험하였다. 간략하게, 하나의 항체를 바이오티닐화를 통해 표지시키고 C3 결합 ELISA에서 다른 항체 클론과 함께 항온처리하였다. 동일한 결합 영역에 대해 경쟁하는 항-C3 항체는 유사한 에피토프를 공유하므로 유사한 기능을 갖는 것으로 간주되었다. 상기 정보를 통해 에피토프 다양성을 유지하면서 잠재적인 항체 후보물의 수를 감소시킬수 있다. 3개의 보체 경로 모두를 억제하는 5개의 항체 중에서 MO251, MO228 및 MO123은 C3상에서 동일한 에피토프를 공유하는 것으로 간주되었다(**도 7d**). 억제 리드는 C3상의 3개의 다른 에피토프에 결합하는 것으로 추정되었다(**도 7a-7d**).

[0198] [0188] 3개 보체 경로 모두를 억제할 수 있는 것으로 동정된 항체는 ELISA에서 시노몰구스 몽키 C3에 결합하는 능력에 대해 평가하였다. 간략하게, 96웰 ELISA 플레이트를 cyno C3에 교차반응하는 것으로 간주되는 폴리클로날 염소 항혈청으로 코팅하고 이어서 시노몰구스 몽키 혈청(BioIVT, NB-151558)의 맞춤 제제와 2차 결합시켰다. 항체 분자의 연속 희석액을 ELISA 플레이트에 첨가하고 cyno C3에 결합하는 항체를 토끼 항-사람 카파 HRP 항체(Abcam, ab202549) 또는 마우스 항-His 태그 HRP 항체(R&D Systems, MAB050H)를 사용하여 검출하였다. 리드 MO122, MO124 및 MO251은 시노몰구스 몽키 C3에 대한 용량 반응 방식의 결합을 보여준다. 흥미롭게도, MO251, MO228 및 MO123은 사람 C3상의 동일한 에피토프에 대해 경쟁하지만 MO251만이 cyno C3에 대한 결합 활성을 보여주었다(**도 15a** 및 **15b**).

[0199] [0189] Wieslab 보체 시스템 스크리닝을 사용하여 시노몰구스 몽키 혈청에서 보체 활성화의 모든 경로를 억제하는 항-C3 항체의 능력을 평가하였다. 항-C3 항체는 cyno 혈청의 맞춤 제제에 첨가하였다. **도14a**는 2 μM의 고정 농도에서 MO122, MO124 및 MO251에 의한 3개 보체 경로 모두의 강력한 억제를 보여주고, 이는 MO122, MO124 및 MO251이 cyno 혈청에서 보체 매개 MAC 형성의 강력한 억제제임을 시사한다. MO228은 cyno 혈청에서 보체 경로의 억제 활성을 나타내지 않았고, 이는 cyno C3에 대한 상기 항체에 대해 관찰된 결합 활성의 결여를 확인시켜 준다(**도 14b**). 시노몰구스 몽키 혈청에서 고전적 및 대체 경로의 용량 의존적 억제를 상응하는 Wieslab 보체 시스템 키트를 사용하여 MO122, MO124 및 MO251에 대해 추가로 평가하였다(**도 14b 및 14c**).

[0200] [0190] MO122, MO124 및 MO228은 직접 결합 ELISA 검정에서 사람 C3 및 C3b 둘다에 결합하는 이들의 능력에 대해 평가하였다(**도 8a 및 도 8b**). 간략하게, 96웰 ELISA 플레이트를 정제된 고유 사람 C3 또는 C3b(Complement Technology, A113 및 A114)로 코팅하였다. 항체 분자의 연속 희석물을 플레이트에 첨가하고 토끼 항-사람 카파 HRP 항체(Abcam, ab202549) 또는 토끼 항-His 태그 HRP 항체(Abcam, ab1187)에 의해 검출하였다. MO122, MO124 및 MO228은 사람 C3 및 C3b 둘 다에 대한 높은 친화성 결합을 보여준다. 사람 C3에 대한 MO122, MO124 및 MO228의 결합 동력학은 낮은 피코몰 범위의 친화성을 나타내는 바이오층 간섭계로 추가로 분석하였다(**도 10**).

[0201] [0191] 사람 혈청에서 대체 및 고전적 경로의 용량 의존적 억제는 상응하는 Wieslab 보체 시스템 키트를 사용하여 MO122, MO124 및 MO228에 대해 평가하였다. MO122, MO124 및 MO228은 사람 혈청에서 대체 및 고전적 경로의 강한 억제를 보여준다(**도 9a 및 도 9b**). 항-C3 항체 MO122, MO123 및 MO124를 용량 반응 방식으로 렉틴 경로를 억제하는 능력에 대해 추가로 평가하였다. **도 16**은 사람 혈청에서 렉틴 경로의 효율적인 억제를 보여준다. 모두 종합하면, 이들 결과는 본 발명의 항체에 의한 보체 활성화의 3개 경로 모두의 효율적인 억제를 추가로 뒷받침한다.

[0202] **실시예 4 - 항-C3 항체는 APL-2보다 브루흐막을 침투할 가능성이 보다 높다**

[0203] [0192] 현재 보체 시스템이 지도형 위축의 발병기전에 중요한 역할을 하는 것으로 공지되어 있다. 그러나 보체 활성이 눈에서 어떻게 구분되는지, GA 치료요법의 효능이 눈 내의 올바른 해부학적 부위에 치료제를 어떻게 전달하는지 여부에 따라 달라지는지는 아직 완전히 이해되지 않고 있다. 본원 발명자들은 GA에서 병변 성장을 더 크게 감소시키기 위해서는 질환 관련 망막 조직(즉, RPE, 브루흐막 및 맥락막)으로 더 잘 침투하는 것이 필요할 수 있음을 추정한다. 맥락막의 내부 부분은 맥락막모세혈관층이라고 불리우고, 브루흐막(BrM)이라고 불리우는 세포외 막 시트로 분리된 모세혈관을 포함한다(**도 11**).

[0204] [0193] 브루흐막은 항체와 생물학적 제제에 선택적으로 투과 가능하다. Clark 등이 보고한 바와 같이(Front. Immunol. 2017. 8:1-10), 보체 경로 단백질은 FHL-1, 인자 D 및 C5a를 제외하고 브루흐막을 통과할 수 없다. 전반적으로 유체역학적 반경이 큰 항체와 생물학적 제제는 브루흐막을 통과할 가능성이 적다. 하기 **표 3**에 나타낸 바와 같이, APL-2 및 CDR2(본원 개시내용의 항-C3 scFv) 외에, 3.00보다 큰 유체역학적 반경을 갖는 나열된 분자는 FHL-1을 제외하고 브루흐막을 통과할 수 없고; 반면에, 3.00보다 큰 유체역학적 반경을 가진 나열된 모든 분자는 C3a를 제외하고 브루흐막을 통과할 수 있다.

[0205] **표 3: 생물학적 제제의 A 목록의 크기 인자**

단백질	유체역학적 반경 (nm)	MW (kDa)	확산 (>70세 연령 BM)
APL-2*	**~7-8**	**43 (선형 PEG)**	**Nk**
IgG	~6	150	아니오
인자 H	5.56	155	아니오
C3	4.84	180	아니오
FHL-1	4.40	49	예
인자 B	3.22	83	아니오
인자 I	3.07	65	아니오
Fab 단편	2.91	50	예
CDR2*	**2.5**	**26**	**Nk**
인자 D	2.08	24	예
C3a	1.56	9	아니오
C5a	1.63	8.3	예

[0206]

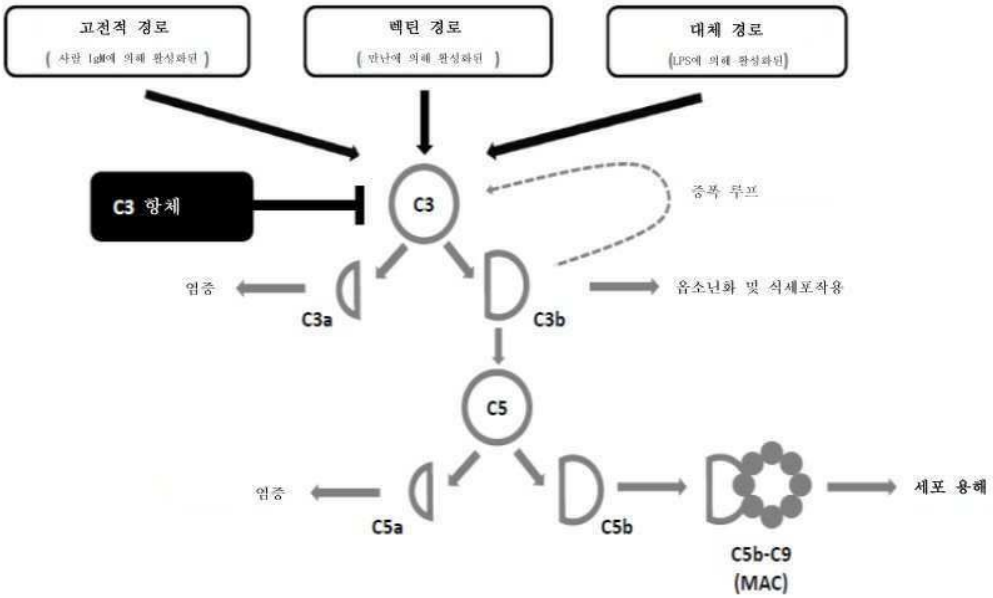
[0207] [0194] 또한, 피트카넨 등(Pitkanen et al.)(문헌참조: Invest Ophalmol Vis Sci. 2005; 46(2):641-6)은 분자량이 4~80kDa인, 소의 눈으로부터 채취한 신선한 RPE 맥락막 표본의 카복시플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC) 표지 덱스트란의 투과성을 연구하였다. 본원 발명자는 분자 크기에 대한 투과성을 플롯팅하였다(**도 12**, 검은 점). 본원 발명자는 또한 히르보넨 등(Hirvonen et al.)이 수행한 연구를 사용하여 유체역학적 반경을 기반으로 scFv, 루센티스(lucentis), 에닐레아(eylea) 및 APL2의 투과성 값을 도출하였고(문헌참조: Pharm Res. 2016;33(8):2025-32), 동일한 그래프에 분자량에 대한 투과성을 플롯팅하였다(**도 12**, 색칠된 점). 이러한 경향은 분자량이 클수록 브루흐막의 투과성이 불량해지는 것을 나타낸다.

[0208] [0195] 본원 발명자들은 약 2.5 nm 이하의 유체역학적 반경을 갖는 scFv 또는 VHH 포맷과 같으나 이에 제한되지 않는 항체 단편으로서의 본원 개시내용의 항-C3 항체가 이의 유체역학적 반경이 적어도 7 nm인 APL-2(40 kDa 선형 PEG에 연결된 2개의 항-C3 사이클릭 APL-1 펩타이드, 총 43 kDa)보다 브루흐막에 더 잘 침투할 수 있을 가능성이 매우 높다고 예측하였다.

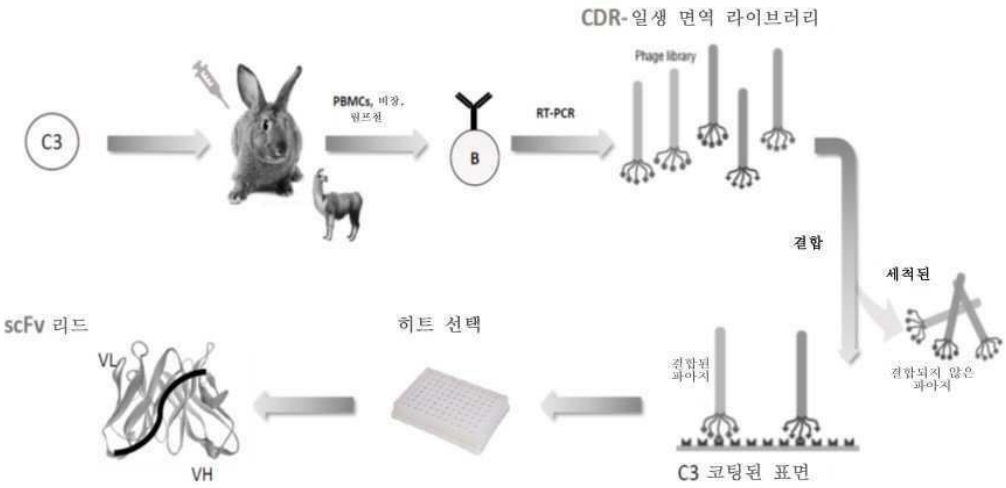
[0209] [0196] 상기 가설을 시험하기 위해, BrM을 통과하는 항-C3 분자의 능력을 우싱(Ussing) 챔버에 탑재된 집적된 돼지 BrM을 사용하여 평가하였다. 간략하게, 집적된 브루흐막을 돼지 눈으로부터 단리하고 우싱 확산 챔버에 탑재하였다(문헌참조: Multi Channel Systems MCS GmbH, Cat. No. 660026). 일단 탑재되면, 5-mm 직경의 브루흐막은 2개의 동일한 구획 사이의 유일한 장벽이었다. 브루흐막의 양면을 실온에서 적어도 5분동안 PBS 1ml로 세척하였다. 누출 시험을 위해 PBS 1ml를 샘플 챔버에 첨가하고 두 번째 구획으로의 누출을 5분 동안 추적하였다. 막 온전성의 손상을 나타내는 누출이 검출되지 않는 경우, 항체 단백질을 100㎍/ml의 1ml PBS 중 샘플 챔버에 첨가하고 1ml PBS를 두 번째 구획(확산 챔버)에 첨가하였다. 확산되는 단백질의 구배 생성을 피하기 위해 전체 우싱 챔버를 부드럽게 흔들면서 실온에서 24시간 동안 항온처리하였다. 각 챔버로부터의 샘플(15 ㎕)을 겔 전기영동으로 분석하였다. 사전 제작된 4~12% NuPAGE Bis Tris SDS 겔(Thermo Fisher Scientific)을 환원 조건하에서 200V에서 40분 동안 수행하였다. 항체 단백질 검출을 위해 실온에서 60분 동안 겔을 인스턴트 블루(Instant Blue) 염색(Expedeon)으로 염색하거나 PEG 검출을 위해 요오드화 바륨 용액으로 염색하였다(겔을 0.1M 과염소산으로 고정하고 15분 후 5% $BaCl_2$ 20ml과 0.1M 요오드 용액 8ml의 예비 혼합물로 대체하고 10분 후 1시간 동안 10분마다 탈이온수로 반복적으로 대체한다). 샘플 또는 확산 챔버의 단백질 퍼센트를 계산하기 위해 인스턴트 블루(Instant Blue) 염색 또는 BaI_2 염색 SDS 겔의 밴드 밀도를 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 측정하였다. 이들 밴드의 평균 강도는 100% 부하된 단백질(즉, 100 ㎍/ml의 15㎕)을 나타내는 대조군 밴드의 밀도와 비교하였다. 이어서 계산된 퍼센트 단백질은 ± SD로 플롯팅하였다. 돼지 BrM을 교차시키는 능력은 4개의 서로 다른 돼지 눈으로부터의 BrM 제제상에서 동시에 항온처리된, M0123(26 kDa)의 scFv 유도체와 APL-2 대용물(40 kDa 선형 PEG에 연결된 하나의 항-C3 사이클릭 APL-1 펩타이드, 총 42 kDa)에 대해 비교되었다. APL-2 대용물과 비교하여 4개의 막 제제 모두에서 상당히 더 많은 양의 scFv가 BrM을 통과하였다(**도 13a** 및 **도 13b**).

도면

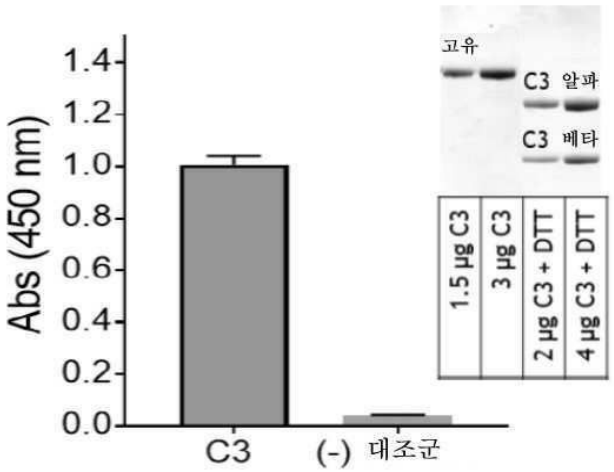
도면1


고전적 경로
(사람 IgM에 의해 활성화된)
렉틴 경로
(만난에 의해 활성화된)
대체 경로
(LPS에 의해 활성화된)
C3 항체
C3
증폭 루프
염증
C3a
C3b
옵소닌화 및 식세포작용
C5
염증
C5a
C5b
C5b-C9
(MAC)
세포 용해

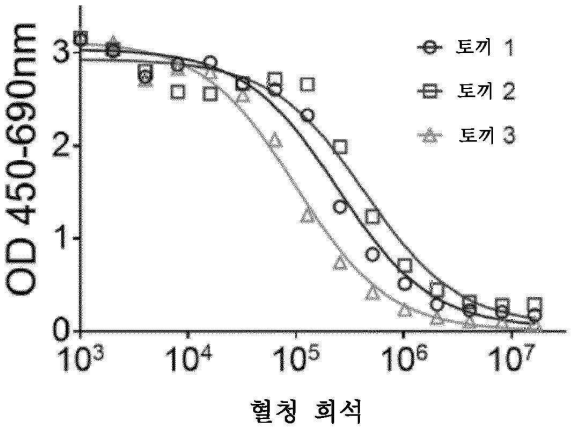
도면2

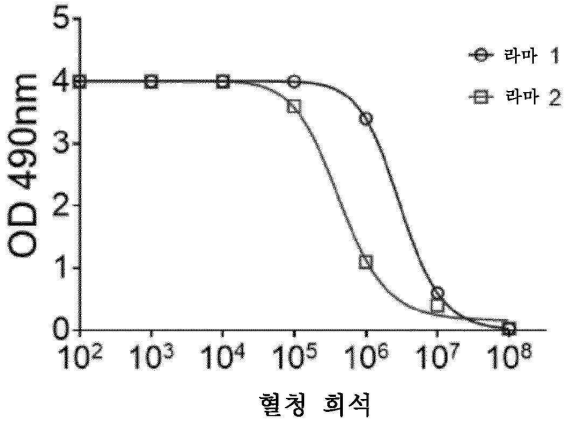

CDR-일생 면역 라이브러리
C3
PBMCs, 비장,
림프절
B
RT-PCR
Phage library
결합
세척된
결합되지 않은
파아지
결합된
파아지
C3 코팅된 표면
히트 선택
scFv 리드
VL
VH

도면3a


Abs (450 nm)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
C3
(-) 대조군
고유
C3 알파
C3 베타
1.5 μg C3
3 μg C3
2 μg C3 + DTT
4 μg C3 + DTT

도면3b

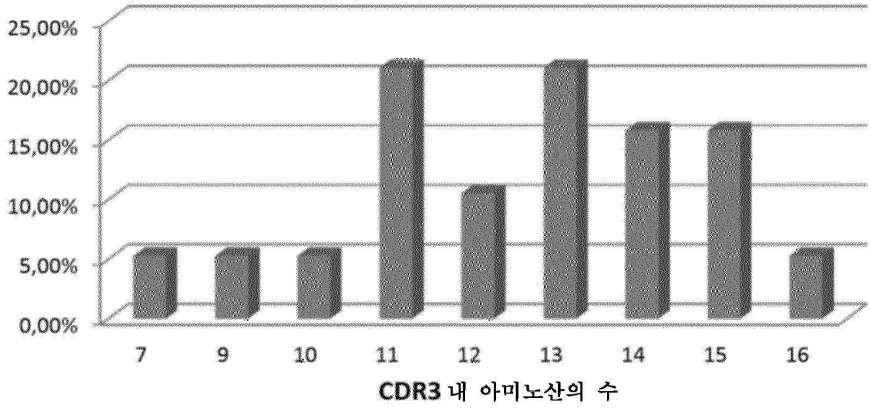

OD 450-690nm
토끼 1
토끼 2
토끼 3
혈청 희석


OD 490nm
라마 1
라마 2
혈청 희석

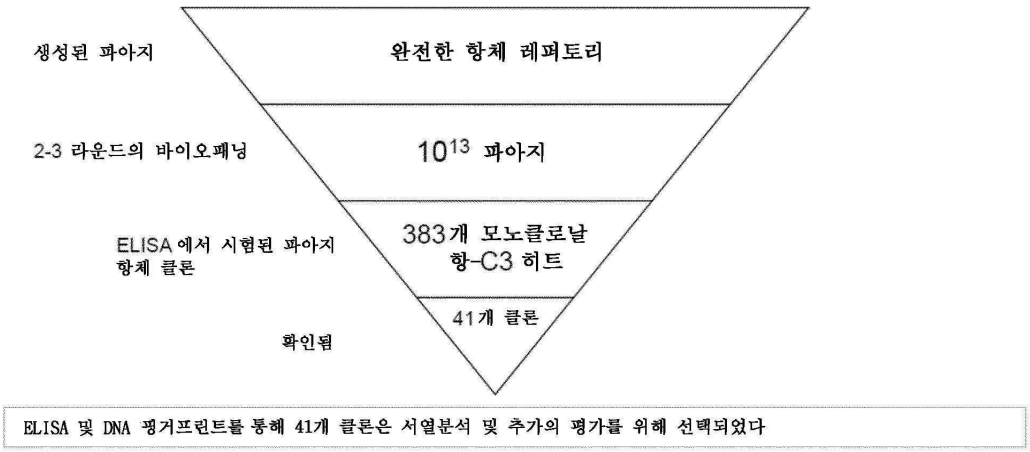
도면4a

라이브러리	다양성	삽입 정확도
PTX-C3-001-Vk	$1,0x10^9$	97.6%
PTX-C3-002-VL	$2.2x10^9$	97.6%
QV-C3-001	$3.2x10^8$	100%
QV-C3-002	$1.6x10^8$	100%

도면4b

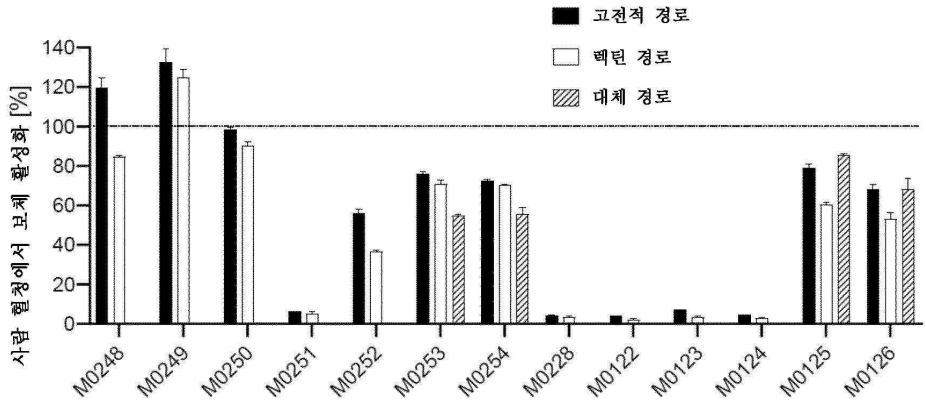


도면5

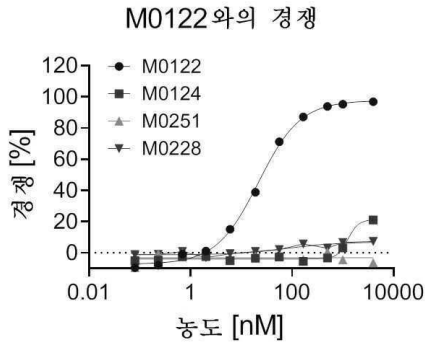


ELISA 및 DNA 핑거프린트를 통해 41개 클론은 서열분석 및 추가의 평가를 위해 선택되었다

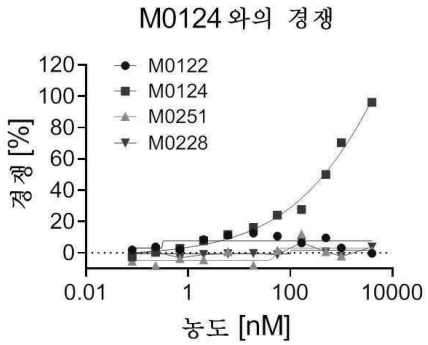
도면6



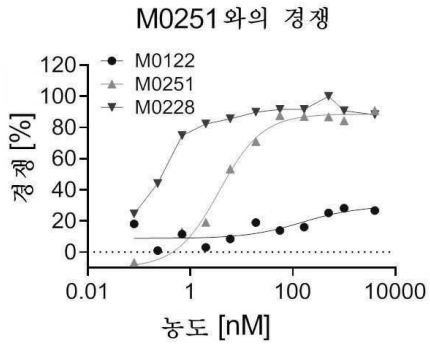
도면7a



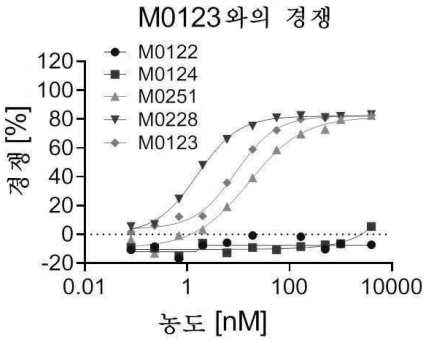
도면7b



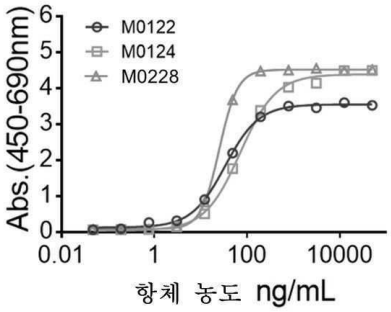
도면7c



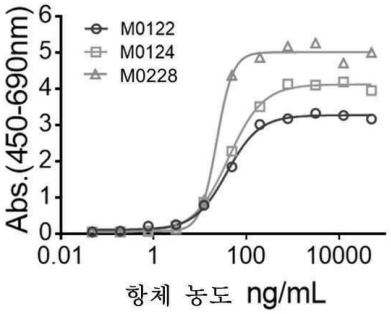
도면7d



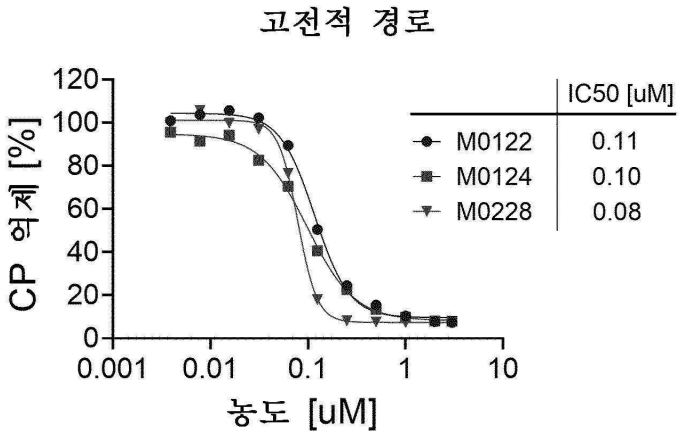
도면8a



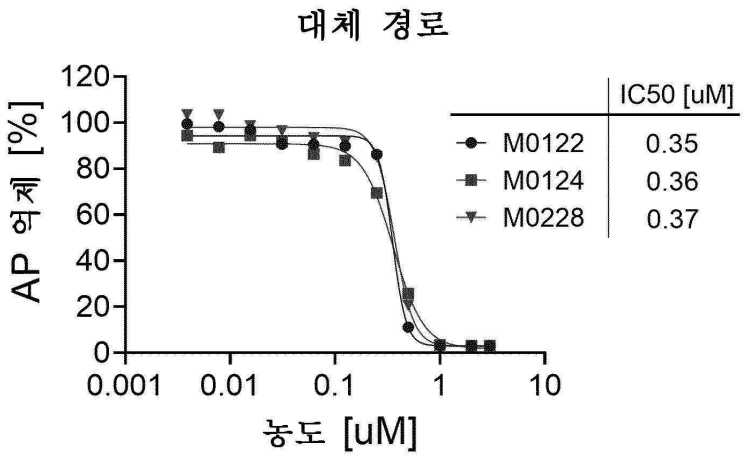
도면8b



도면9a



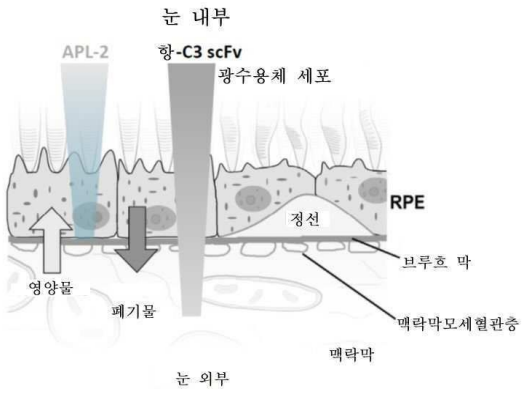
도면9b



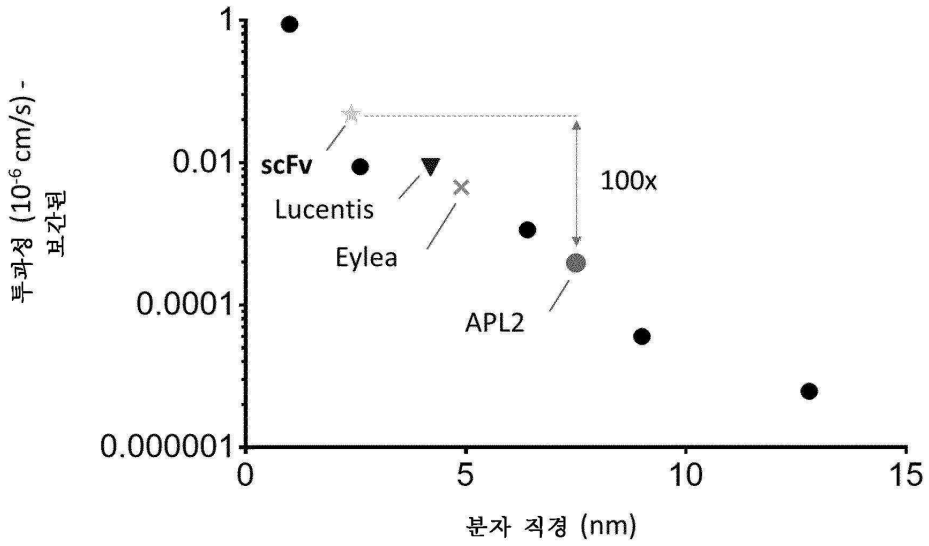
도면10

ID	KD (M)	ka(1/Ms)	kd (1/s)	Rmax
M0228	1.99E-10	5.57E+05	1.11E-04	0.0744
M0122	5.28E-11	8.90E+04	4.70E-06	0.3153
M0124	1.24E-11	4.16+06	5.18E-05	0.1291

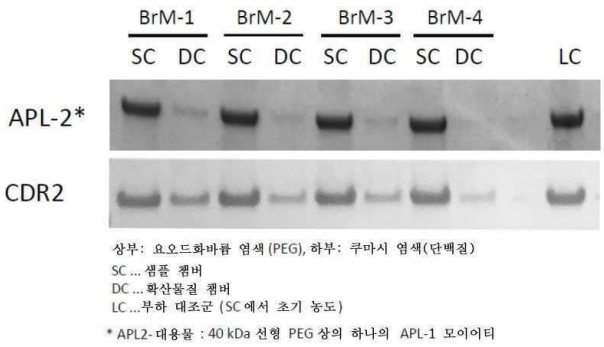
도면11



도면12

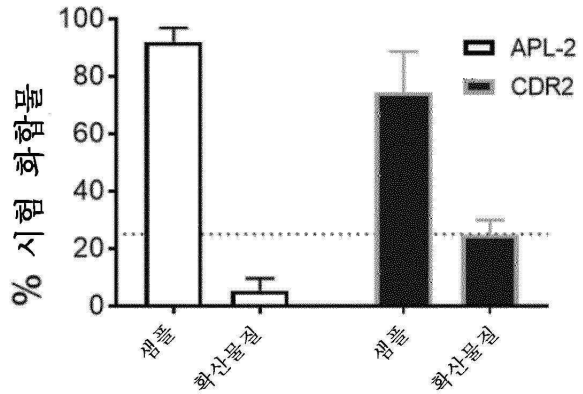


도면13a

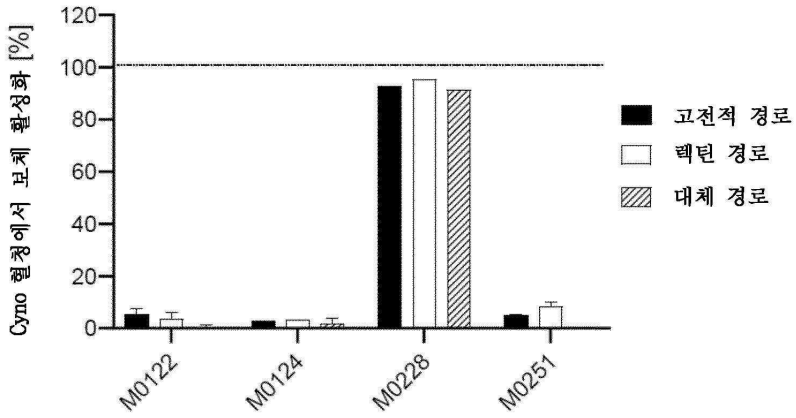


상부: 요오드화바륨 염색 (PEG), 하부: 쿠마시 염색(단백질)
SC ... 샘플 챔버
DC ... 확산물질 챔버
LC ...부하 대조군 (SC 에서 초기 농도)
* APL2-대용물 : 40 kDa 선형 PEG 상의 하나의 APL-1 모이어티

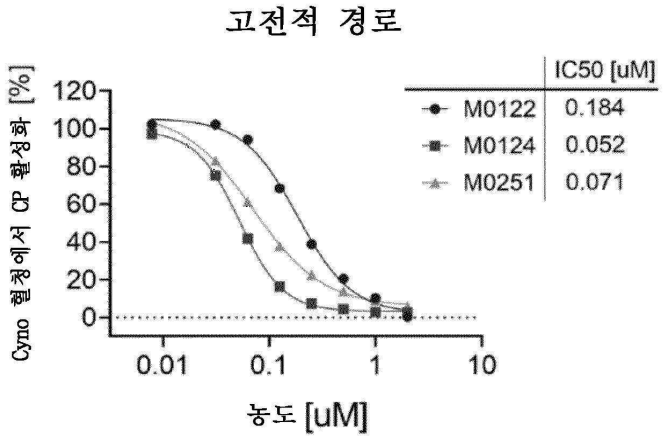
도면13b



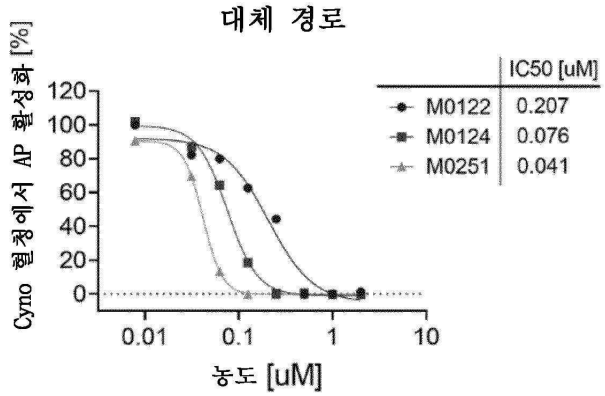
도면14a



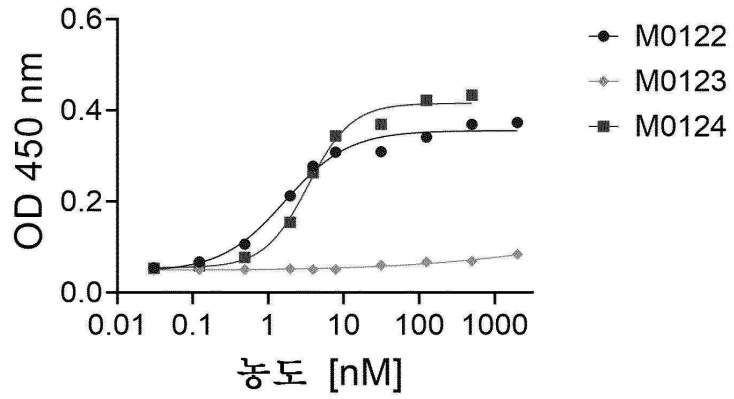
도면14b



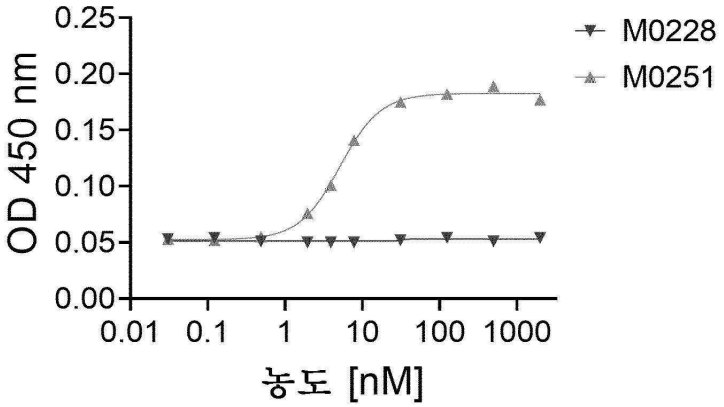
도면14c



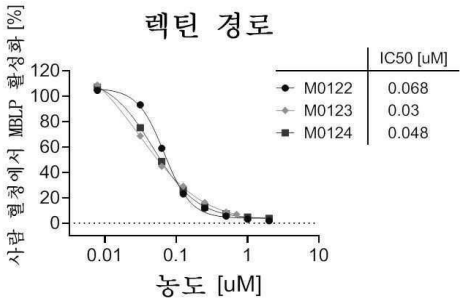
도면15a



도면15b



도면16



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> CDR-LIFE AG

Boehringer Ingelheim International GMBH

<120> COMPLEMENT C3 ANTIGEN BINDING PROTEINS

<130> 02-0558

<160> 32

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 1

Asp Tyr Thr Met Gly

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 2

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

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 3

Gln Val Ser Pro Tyr Val Glu Leu Thr Ala Thr Ala Ala Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 4

Asn Trp Ala Met Gly

1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 5

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

1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 6

Gly Thr Pro Phe Val Leu Ala Arg Ile Asn Gly Tyr Asp Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 7

Asn Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 8

Ile Ile Asn Thr Asp Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly

1 5 10 15

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 9

Ala Val Gly Tyr His His His Ala Leu Asp Pro

1 5 10

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 10

Thr Leu Ser Ser Ala His Lys Thr Tyr Thr Ile Asp

1 5 10

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 11

Leu Lys Ser Asp Gly Ser Tyr Thr Lys Gly Thr

1 5 10

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 12

Gly Thr Asp Tyr Gly Gly Gly Tyr Val

1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 13

Ser Tyr His Met Ser

1 5

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 14

Ile Ile Tyr Thr Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly

1 5 10 15

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 15

Arg Gly Tyr Ala Asp Tyr Gly Tyr Thr Phe Asn Leu

1 5 10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 16

Thr Ala Asp Thr Leu Ser Arg Asn Tyr Ala Ser

1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 17

Arg Asp Thr Ser Arg Pro Ser

1 5

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 18

Ala Thr Gly Asp Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Gln Phe Val

1 5 10

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 19

Arg Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 20

Tyr Ile Thr Thr Asn Asp Lys Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly

1 5 10 15

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 21

Arg Ser Ser Gly Ala Tyr Asp Ile

1 5

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 22

Thr Leu Ser Ser Ala His Lys Thr Tyr Tyr Ile Glu

1 5 10

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 23

Leu Lys Ser Asp Gly Thr Tyr Thr Lys Gly Thr

1 5 10

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 24

Gly Val Thr Gly Gly Asn Val Tyr Val

1 5

<210> 25

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 25

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Ile Asn Asp Tyr

20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val

35 40 45

Ser Ala Ile Asn Trp Arg Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Leu Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 26

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 26

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly His Thr Phe Gly Asn Trp

20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35 40 45

Gly Ala Ile Arg Trp Ser Val Gly Thr Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ala Gly Thr Pro Phe Val Leu Ala Arg Ile Asn Gly Tyr Asp Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 27

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 27

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

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Tyr Asn Tyr Ala
20 25 30

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

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

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

Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Pro Arg Ala
85 90 95

Val Gly Tyr His His His Ala Leu Asp Pro Trp Gly Pro Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 28

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 28

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

Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Ala His Lys Thr Tyr Thr
20 25 30

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

Ser Val Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Asp Tyr
85 90 95
Gly Gly Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Thr Gly
100 105 110

<210> 29
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic polypeptide
<400> 29

Gln Ser Val Lys Glu Ser Glu Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Ile Gly Ser Tyr His

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

85 90 95
Tyr Ala Asp Tyr Gly Tyr Thr Phe Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Ile Ser Ser

115

<210> 30

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 30

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

Thr Val Ser Leu Thr Cys Thr Ala Asp Thr Leu Ser Arg Asn Tyr Ala

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Arg Asp Thr Ser Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Gly Asp Gly Ser Gly Ser Ser

85 90 95

Tyr Gln Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Thr Gly
100 105 110

<210> 31

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 31

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

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Trp

20 25 30

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

Ser Ser Gly Ala Tyr Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Ile
100 105 110
Ser Ser

<210> 32
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic polypeptide
<400> 32
Gln Pro Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Thr Leu Gly Ala
1 5 10 15
Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Ala His Lys Thr Tyr Tyr
20 25 30

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

85 90 95

Gly Asn Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Thr Gly

100 105 110