



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년04월09일
(11) 등록번호 10-2656199
(24) 등록일자 2024년04월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 38/1767 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7031711
- (22) 출원일자(국제) 2018년04월20일
심사청구일자 2021년04월19일
- (85) 번역문제출일자 2019년10월25일
- (65) 공개번호 10-2019-0139233
- (43) 공개일자 2019년12월17일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2018/060241
- (87) 국제공개번호 WO 2018/193122
국제공개일자 2018년10월25일
- (30) 우선권주장
1706404.9 2017년04월21일 영국(GB)
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
WO2010100396 A1
WO2016123371 A1
WO2014160958 A1
WO2016094834 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
볼루션 이뮤노 파마슈티컬스 에스에이
스위스, 3461-1211 제네바, 플레이스 데스 오 비브 6
- (72) 발명자
년 마이즈 앤드류
스위스, 3 제네바, 케이스 포스탈레 3461-1211,
플레이스 데스 오 비브 6, 볼루션 이뮤노 파마슈
티컬스 에스에이 내
아프히안카 브리하드
스위스, 3 제네바, 케이스 포스탈레 3461-1211,
플레이스 데스 오 비브 6, 볼루션 이뮤노 파마슈
티컬스 에스에이 내
사딕 크리스티안 데이비드
덴마크, 뤼베크, 라체부르거 알리 160, 유니버시
티 오브 뤼베크, 디파트먼트 오브 더마톨로지
- (74) 대리인
특허법인한일

전체 청구항 수 : 총 14 항

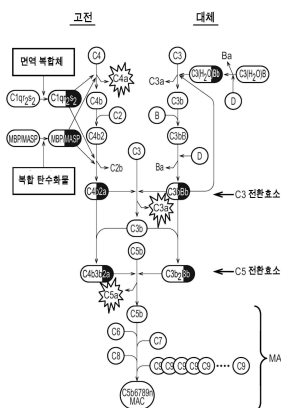
심사관 : 윤소라

(54) 발명의 명칭 자가면역 수포 질환의 치료를 위한 코버신

(57) 요약

본 발명은 AIBD를 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/0021 (2013.01)

A61P 17/00 (2018.01)

A61P 37/00 (2018.01)

(30) 우선권주장

1706406.4 2017년04월21일 영국(GB)

1706452.8 2017년04월24일 영국(GB)

명세서

청구범위

청구항 1

치료적 또는 예방적 유효량의 제제를 포함하는 대상체에서 자가면역 수포 질환 (AIBD)을 치료 또는 예방하기 위한 약제학적 조성물로서, 상기 AIBD가 수포성 유천포창 (BP) 또는 후천성 수포성 표피박리증 (EBA)이고, 상기 제제가 하기의 단백질이거나 이를 암호화하는 핵산 분자인, 약제학적 조성물:

- i) 서열 번호 2 또는 서열 번호 4로 이루어진 단백질, 또는
- ii) 서열 번호 23으로 이루어진 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단백질이 C5에 결합하여 전환효소에 의한 보체 C5a 및 보체 C5b로의 보체 C5의 절단을 방지하고 LTB4에 결합하는, 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단백질이 LTB4에 결합하는, 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 제제가 서열 번호 2의 아미노산 19 내지 168의 서열로 이루어진 단백질이거나 이를 암호화하는, 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 제제가 피하 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간인, 약제학적 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 제제가 0.0001 mg/kg 내지 20 mg/kg, 0.001 mg/kg 내지 10 mg/kg, 0.01 mg/kg 내지 2 mg/kg, 0.1 mg/kg 내지 1 mg/kg, 0.2 mg/kg 내지 0.8 mg/kg, 0.3 mg/kg 내지 0.6 mg/kg, 0.4 mg/kg 내지 0.6 mg/kg, 또는 0.57 mg/kg의 범위의 용량으로 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 약제학적 조성물이 대상체에게 초기 부하 용량의 제제를 투여한 다음 이의 유지 용량으로 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 초기 유지 용량 및 하나 이상의 추가 유지 용량이 있는, 약제학적 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 약제학적 조성물이 제2 AIBD 치료를 추가로 포함하되, 제2 AIBD 치료가 전신 코르티코스테로이드 요법 및 국소 코르티코스테로이드 요법으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 코르티코스테로이드가 프레드니손 및 프레드니솔론으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, AIBD가 수포성 유천포창인, 약제학적 조성물.

청구항 13

치료적 또는 예방적 유효량의 제제를 포함하는 대상체에서 자가면역 수포 질환 (AIBD)을 치료 또는 예방하기 위한 약제학적 조성물로서, 상기 AIBD가 수포성 유천포창 (BP) 또는 후천성 수포성 표피박리증 (EBA)이고, 상기 제제가 하기로 이루어진 융합 단백질인 단백질이거나 이를 암호화하는 핵산 분자인, 약제학적 조성물:

(a) 서열 번호 15 내지 21 중 어느 하나의 5 내지 40개 카피, 10 내지 30개 카피, 15 내지 25개 카피, 18 내지 20개 카피, 또는 20 내지 30개 카피로 이루어진 PAS 서열, 및

(b) (i) 서열 번호 2 또는 4, 또는 (ii) 서열 번호 23으로부터 선택되는 서열.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 융합 단백질이 (a) 서열 번호 15의 30개 카피로 이루어진 PAS 서열, 및 (b) 서열 번호 2의 아미노산 19 내지 168을 포함하고, 여기서 (a)가 (b)의 N 말단에 융합되는, 약제학적 조성물.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 자가면역 수포 질환을 치료 및 예방하는 방법에 관한 것이다.

[0002] 본문에 언급되고 본 설명의 끝에 열거된 모든 문서는 본원에 참고로 포함된다.

배경 기술

- [0003] 보체
- [0004] 보체 시스템은 외래 침입에 대한 신체의 자연 방어 기전의 필수 부분이며 염증 과정에도 관여한다. 혈청 및 세포 표면에서의 30개 이상의 단백질이 보체 시스템의 기능 및 조절에 관여한다. 최근, 유리한 과정 및 병리학적 과정 둘 다와 관련될 수 있는 보체 시스템의 대략 35개의 알려진 성분은 물론, 보체 시스템 자체가 혈관신생, 혈소판 활성화, 글루코스 대사 및 정자형성과 같은 다양한 기능을 가진 적어도 85개의 생물학적 경로와 상호작용한다는 것이 자명해졌다.
- [0005] 보체 시스템은 외래 항원의 존재에 의해 활성화된다. 세 가지 활성화 경로가 존재한다: (1) IgM 및 IgG 복합체에 의해 또는 탄수화물의 인식에 의해 활성화되는 고전 경로; (2) (특정 조절 분자가 결핍된) 비-자기 표면에 의해 및 박테리아 내독소에 의해 활성화되는 대체 경로; 및 (3) 병원체의 표면 상의 만노스 잔기에의 만난-결합 렉틴 (MBL)의 결합에 의해 활성화되는 렉틴 경로. 세 가지 경로는 세포 표면 상의 유사한 C3¹ 및 C5 전환효소의 형성을 통해 보체 활성화의 생성을 야기하여, 염증의 급성 매개체 (C3a 및 C5a)의 방출 및 막 공격 복합체 (MAC)의 형성을 초래하는 사건들의 평행 캐스케이드를 포함한다. [¹ "C3"이 보체 시스템의 세 번째 성분을 지칭하도록 문자 "C"와 그 뒤에 "3"과 같은 숫자로 보체 경로의 성분을 지칭하는 것이 통상적이다. 이들 성분 중 일부는 보체 시스템의 활성화 동안 절단되고 절단 산물은 숫자 뒤에 소문자로 제공된다. 따라서, C5는 통상적으로 C5a 및 C5b로 표지되는 단편으로 절단된다. 보체 단백질은 반드시 이들의 숫자 순서대로 작용할 필요는 없으므로, 그 숫자가 반드시 작용 순서를 나타내는 것은 아니다. 이러한 명명 규칙이 본 출원에서 사용된다.].
- [0006] 고전 경로 및 대체 경로에 관련된 평행 캐스케이드가 도 1에 나타내어져 있다.
- [0007] 고전 보체 경로, 대체 보체 경로 및 렉틴 보체 경로를 본원에서 집합적으로 보체 경로라고 한다. C5b는 보체 활성화의 '말기' 이벤트를 개시한다. 이들은 말단 보체 성분이 상호작용하여 MAC을 형성하는 일련의 중합 반응을 포함하며, 이것은 일부 병원체의 세포막에 기공을 생성하여 이들의 사망을 초래할 수 있다. 말단 보체 성분은 C5b (막 공격 복합체의 조립을 개시함), C6, C7, C8 및 C9를 포함한다.
- [0008] LTB4
- [0009] 류코트리엔 B4 (LTB4)는 기술된 가장 강력한 화학주성 및 화학운동성 에이코사노이드이며, 인테그린의 상향조절을 통해 혈관 내피에 대한 호중구의 부착을 촉진한다 [1]. 이것은 또한 호중구의 완전한 분비촉진제이며, 이들의 응집을 유도하고 미세혈관 투과성을 증가시킨다. LTB4는 자연 살해 세포, 단핵구 및 호산구를 모집하고 활성화시킨다. 이것은 수퍼옥사이드 라디칼 형성을 증가시키고 [2] 다수의 전염증성 사이토킨 및 조직 염증을 증가 및 연장시킬 수 있는 매개체의 생성을 포함한 유전자 발현을 조절한다 [3,4]. LTB4는 또한 적응 면역 반응의 유도 및 관리에 역할을 한다. 예를 들면 배수 림프절로의 수지상 세포 트래피킹의 조절 [5,6], 페 T 세포로부터의 Th2 사이토킨 IL-13 생산 [7], 항원-특이 이펙터 CD8+ T 세포의 동원 [8] 및 인간 B 림프구의 활성화 및 증식 [9].
- [0010] 류코트리엔 B4 (LTB4) 및 하이드록시에이코사노이드는 BLT1 및 BLT2 G-단백질 결합된 수용체를 통해 이들의 효과를 매개한다 [10,11]. 인간 BLT1은 경쟁 결합 연구 [13]에서 LTB4를 대체할 수 있는 20-하이드록시 LTB4 및 12-epi LTB4만을 갖는 LTB4에 특이적인 고친화성 수용체 (Kd 0.39 - 1.5nM; [12])이다. 인간 BLT2는 BLT1보다 LTB4에 대해 20배 더 낮은 친화도 (K_d 23nM)를 가지며 12-epi LTB4, 20-하이드록시 LTB4, 12(S)- 및 15(S)-HETE 및 12(S)- 및 15(S)-HPETE를 포함하여 보다 광범위한 범위의 에이코사노이드에 결합함으로써 활성화된다 [13]. 인간 BLT2는 인간 및 마우스 BLT1과 45.2 및 44.6% 아미노산 동일성을 갖는 반면 인간 및 마우스 BLT2는 92.7% 동일성을 갖는다 [11].
- [0011] 인간 BLT1은 백혈구 표면에서 주로 발현되지만, 최근에 내피 세포 및 혈관 평활근 세포에서도 기술되었다. 인간 BLT2는 보다 광범위한 조직 및 세포 유형에서 발현된다. 인간 호중구의 활성화, 혈관외유출 및 아포토시스를 억제하고 [14] 염증성 관절염 [15] 및 신장 허혈 재관류 [16]의 마우스 모델에서 호중구 침윤에 의해 야기된 증상을 감소시키는 BLT1 및 BLT2의 다수의 특정 길항제가 기술되었다. 증가하는 수의 연구들에서 BLT1과 BLT2 둘 다가 LTB4 및 하이드록시에이코사노이드를 통해 병리학적 효과를 매개할 수 있는 것으로 나타나고 있지만 [17], BLT1은 마우스에서 콜라겐 유발 관절염과 같은 일부 병리학에서 확실히 지배적인 역할을 한다 [18]. BLT1-/-결핍 마우스가 또한 염증 반응에서 호중구 이동을 지시하는데 있어서 BLT1의 중요성을 강조하였다. 특히, 5L0 결핍 마우스 균주가 호중구에 대한 BLT1의 자가분비 활성화가 관절염 관절로의 이들의 모집에 필요하다

는 것을 보여주기 위해 사용되었다 [19].

- [0012] 다수의 시판 약물이 에이코사노이드를 표적으로 한다. 이들은 포스포리파제 A2 (PLA2)를 조절함으로써 에이코사노이드 전구체 아라키돈산 (AA)의 방출을 억제하는 글루코코르티코이드를 포함한다 [20]. 프로스타글란딘 및 트롬복산의 합성을 방지하는 비-스테로이드성 항염증 약물 (NSAID) 및 기타 COX2 억제제 [21]. 또한 LTB4 합성에 필요한 5-L0 효소를 억제하거나 (Zileuton; [22]), 또는 시스테이닐 류코트리엔의 효과를 매개하는 CysLT1 수용체를 길항시키는 다수의 LK 개질제가 있다 (Zafirlukast and Montelukast) [23]. LK 개질제는 경구로 이용 가능하며, 예를 들어 천식의 치료에 사용하기 위해 FDA에 의해 승인되었다. LTB4 또는 이의 수용체에 특이적으로 작용하는 약물은 아직 시장에 출시되지 않았다.
- [0013] 자가면역 수포 질환 (AIBD)
- [0014] 신체의 가장 큰 기관인 피부는 5개의 별개의 층으로 구성된다. 표피는 피부의 가장 바깥쪽에 있는 보호 층이며, (피부를 구성하는) 표피와 피하 조직 사이에 있는 진피에 부착된다. 진피는 주로 조밀하고 불규칙 결합 조직으로 구성되며 기저막을 통해 표피에 단단히 결합된다. 진피와 표피가 부착되기 위해 특수한 단백질과 구조가 필요하며, 이 층들이 분리되면 수포 또는 물집이 발생한다.
- [0015] 정상적인 상황하에서는, 수포가 피부의 자극이나 손상에 반응하여 발생하지만, 자가면역 수포 질환 (AIBD)에서 수포는 접착반 또는 반결합소체 구조 단백질을 공격하는 자가항체의 결과로서 발생한다. 이들 단백질은 기저막 영역의 적절한 기능에 필수적이다. AIBD에서, 표피와 진피의 부착은 자가항체로부터 야기되는 특정 구조 또는 단백질에 대한 공격의 결과로서 손상되어, 궁극적으로 표피 및 진피가 분리되고 수포가 형성된다.
- [0016] 따라서 AIBD는 피부 항원에 지시된 자가항체의 결과로서 피부에 주로 영향을 미치는 수포 병변이 발생하는 자가면역 장애의 한 그룹이다. 일부 AIBD에서는, 수포가 점막 (예를 들어, 식도, 항문, 입, 비강 통로, 생식기 및 목)에도 형성될 수 있다.
- [0017] AIBD의 발병 위험 인자는 노령, 약물 치료, 바이러스 감염 및 UV 방사선이나 엑스레이에 대한 노출을 포함한다.
- [0018] 수포 질환의 특정 증상과 중증도는 사람마다 다르며, 어떤 경우에는 수포 병변이 피부의 상당 부분을 덮을 수 있다. AIBD가 치유되지는 않지만, 치료법은 존재한다. 이러한 치료가 없으면 질환이 생명을 위협하는 합병증을 야기할 수 있다.
- [0019] 천포창, 유천포창, IgA-매개된 피부병 및 후천성 수포성 표피박리증 (EBA)을 포함한 AIBD의 여러 상이한 범주가 있다. 천포창, 유천포창 및 IgA-매개된 피부병은 추가의 하위유형으로 세분화될 수 있다.
- [0020] "천포창"은 데스모글레인에 대한 항체 매개된 자가면역 반응에 의해 야기된 관련 AIBD 그룹에 대한 일반 용어이다. 천포창의 두 가지 주요 유형은 심상성 천포창 및 낙엽성 천포창이다.
- [0021] 심상성 천포창은 Dsg3에 대한 자가항체 (환자의 약 50%가 또한 Dsg1에 대한 자가항체를 가짐) 및 쉽게 파열되고 고통스러운 짓무름을 일으키는 수포를 특징으로 하는, 천포창의 가장 흔한 형태이다. 대부분의 경우, 심상성 천포창은 어떤 부위에도 잠재적으로 영향을 줄 수 있지만, 처음에 입에서 발생하고 나서 피부에 수포를 발생한다.
- [0022] 낙엽성 천포창은 빠르게 갈라져서 피부의 최상층에 영향을 미치는 가렵고 비늘이 있고 딱딱한 병변을 형성하는 다수의 작은 수포를 특징으로 한다. 두피와 얼굴이 통상적으로 먼저 영향을 받는다. 결국, 가슴, 등이 연루될 수 있다. 병변은 통상적으로 고통스럽지 않다. 점막은 통상적으로 영향을 받지 않는다. 이들 환자는 Dsg1에 대한 자가항체를 갖는다.
- [0023] 추가 장애는 때때로 방종양성 천포창 (종양에서 유래하는 AIBD이며, 예를 들어 Dsg1 및 Dsg3에 대한 자가항체를 가짐) 및 천포창 IgA (데스모글레인에 대한 자가항체를 가짐)를 포함하는 천포창의 하위유형으로 분류된다.
- [0024] "유천포창"은 수포성 피부 발진을 특징으로 하는 관련 질병군을 지칭하는데 사용된다. 유천포창의 주요 형태는 수포성 유천포창, 점막 유천포창, 및 임신 유천포창이다.
- [0025] 수포성 유천포창은 소양증과 단단한 표피하 수포를 특징으로 하는 만성 피부 질환이다. 항원 BP180 (디스토닌으로도 불림) 및 이의 NC16A 도메인 (콜라겐 XVII에 위치함)에 대한 자가항체가 관찰된다. 이러한 표적 항원은 반결합소체 항원이다. 수 주 내에, 수포가 종종 사타구니, 겨드랑이, 복부 및 굴근의 피부로 퍼지고 병변이 피부의 상당 부분을 덮도록 널리 퍼질 수 있으며 수포가 입 안에 형성될 수 있다. 대부분의 경우, 점막은 영향을 받지 않으며, 있을 때에는 빠르게 치유되는 경향이 있다. 수포성 유천포창의 병변은 종종 극심한 가려움증과

관련된다.

- [0026] 점막 유천포창 (MMP) (반흔성 유천포창 (CP)으로도 불림)은 또한 표피하 수포와 관련되며 주로 점막에 영향을 미친다 (주로 입과 눈이지만 코, 목, 생식기 및 항문도 영향을 받을 수 있음). MMP의 증상은 관련된 특정 부위 (들) 및 질병의 진행에 따라 영향을 받는 개체마다 다르다. 자가항원은 다시 BP180에 대해 지시되지만 다양한 다른 자가항원이 확인되었다.
- [0027] 후천성 수포성 표피박리증은 비교적 드물다. 이 상태에서는, BP에서 보여지는 바와 같은 진피표피 분리가 또한 보인다. VII형 콜라겐 (이것은 표피와 BMZ를 유두 진피에 연결하는 고정원섬유를 형성함)에 대한 자가항체가 전형적으로 중년 및 노인에게 영향을 미치는 피부의 자가면역 장애의 특징이다.
- [0028] 대부분의 형태는 중년의 개인, 통상적으로 50대와 60대 사람들에게서 발생한다. 그러나, 자가면역 수포 질환은 어린이를 포함한 모든 연령의 개인에게 영향을 줄 수 있다. 이러한 병태의 전반적인 발생률과 유병률은 연구되는 특정 인구에 따라 다르다. 예를 들면, 수포성 유천포창은 영국에서 연간 백만 명당 43건, 유럽의 다른 지역에서는 연간 백만 명당 7-13건으로 보고된 서유럽에서 가장 흔한 면역수포성 질환이다 [24].
- [0029] AIBD 진단은 임상 평가, 및 상세한 환자 이력 뿐만 아니라, 예를 들어, 혈액 또는 피부 생검에서의 특징적인 자가항체의 식별을 기반으로 한다. 면역형광 분석이 선호되는 진단 방법이다.
- [0030] 현재 이러한 장애에 대한 치료법은 없지만, 이들을 프레드니손과 같은 코르티코스테로이드로 조절할 수는 있다. 치료는 건디가가 힘들고 독성과 관련이 있을 수 있다 [24]. 예를 들어, 전신 코르티코스테로이드 요법 (예를 들어 프레드니손 및 프레드니솔론)이 효과적일 수 있지만, 이것이 모든 경우에 효과적이지는 않으며 고용량의 코르티코스테로이드로의 장기간 치료는 심각한 부작용을 발생할 수 있다. 스테로이드는 일반적 및 비특이적 항염증제이다. 대상체가 장기 고용량 스테로이드를 유지할 수 없기 때문에 다른 면역억제제가 "다리(bridge)"로서 이러한 여러 병태에서 사용된다.
- [0031] 국소 코르티코스테로이드도 사용되지만, 광범위한 질환에서의 이들의 사용은 실제적인 요인 (환자가 치료를 적용할 수 있는 능력)에 의해 제한될 수 있으며 이들은 전신 흡수 및 부작용과 관련될 수 있다. 면역억제 약물 (예를 들어, 답손 메틸프레드니솔론, 마이코페놀레이트, 아자티오프린 또는 사이클로포스파미드) 및 면역억제 생물학적 치료법 (예를 들어, 리툽시맙, 및 정맥내 면역글로불린 G (IVIG))이 또한 사용되어 왔지만 부작용이 있을 수 있다.
- [0032] 따라서 AIBD를 치료 및 예방하기 위한 새로운 치료법이 필요하다.
- [0033] 보체 억제제
- [0034] 제WO 2004/106369호 (Evolutec Limited [25])는 보체 억제제에 관한 것이다. 개시된 보체 억제제의 특정 서브 세트는 C5에 지시되어 C5가 임의의 보체 활성화 경로에 의해 C5a 및 C5b로 절단되는 것을 방지한다. 이러한 C5 절단의 억제제의 특정 예는 제WO 2004/106369의 도 4에 나타난 아미노산 서열의 아미노산 19 내지 168로 구성된 단백질인 *오르니트도로스 모우바타* (Ornithodoros moubata) 종의 진드기에 의해 생성된 단백질이다. 제WO 2004/106369호에서, 이 단백질은 "EV576" 및 "OmCI 단백질"이라는 이름으로 알려져 있으며 보다 최근에는 "코버신(Coversin)"으로 알려졌다 (예를 들면, 참조; Jore et. al., Nature Structural & Molecular Biology, Structural basis for therapeutic inhibition of complement C5, published online on 28th March, 2016 - doi:10.1038/nsmb.3196). 이 단백질을 본원에서 "코버신"이라고 한다.
- [0035] 진드기에서, 코버신은 성숙 코버신 단백질의 N-말단에서 제WO 2004/106369호의 도 4에 나타난 아미노산 서열의 아미노산 1 내지 18을 포함하는 리더 서열을 갖는 단백질원(pre-protein)으로서 발현된다. 리더 서열은 발현 후 절단된다. 성숙 단백질은 제WO 2004/106369호의 도 4 및 본 출원의 도 2에 나타난 아미노산 서열의 아미노산 19 내지 168로 구성된 서열을 갖는다.
- [0036] 코버신은 또한 류코트리엔 B4 (LTB4) 활성을 억제하는 능력을 갖는다. LTB4에 결합하는 능력은 당업계에 공지된 표준 시험관내 검정에 의해, 예를 들면, 표지된 LTB-4에 결합하기 위해 경쟁하는 코버신과 항-LTB4 항체 사이의 경쟁적 ELISA에 의해, 등온선 적정 열량측정법에 의해 또는 형광 적정에 의해 입증될 수 있다.
- [0037] 다양한 용도에서의 코버신 또는 이의 기능적 등가물의 사용에 관한 제WO 2007/028968호, 제WO 2008/029167호, 제WO 2008/029169호, 제WO 2011/083317호 및 제WO 2016/198133호와 같은 다수의 추가의 특허 출원이 있다. 제WO 2015/185760호는 코버신 및 이의 구조적 등가물, 예를 들어 시판되는 C5 보체 억제제 에콜리주맙의 치료 효과를 감소시키는 C5의 다형체의 절단을 방지하는데 효과적임을 개시한다. 이러한 출원들 중의 어느 것에도

AIBD의 치료에서의 코버신 또는 이의 기능적 등가물의 사용에 대한 개시는 없다.

[0038] 보체 경로의 잠재적인 역할이 AIBD의 맥락에서 논의되었지만, 현재 AIBD 치료는 보체를 표적으로 하지 않으며, 이러한 질환의 병리생리학은 완전히 이해되지 않는다. 또한, 수포 형성이 직접적으로, 그리고 보체 활성화없이 유도될 수 있다는 증거도 있으며 [26], 이를 근거로 하여 보체 활성화의 방지보다는 자가항체 결합의 차단을 목표로 하는 새로운 치료법이 이 분야에 제안되어 있다 [26]. 또한, 외인성 C5a 또는 IL-17A는 Ltbr1-/- 마우스에서 유천포창 질환-유사 피부 염증에 대한 내성을 극복할 수 없다 [27].

[0039] 마찬가지로, LTB4의 역할이 AIBD에서, 특히 질환에서 호중구 모집과 관련하여 논의되었지만, 이러한 병태에 대해 현재 승인된 치료가 이 분자를 표적으로 하지는 않는다.

[0040] 이와 달리, 본 발명으로 이끄는 연구에서, 상기 논의된 바와 같이 LTB4에 결합하고 C5에 결합함으로써 보체 경로를 또한 억제하는 분자 코버신은 AIBD의 마우스 모델에서 수포로 영향을 받는 체표면적 (ABSA)을 감소시키는 것으로 나타났다. 코버신은 보체 (C5를 억제함으로써) 및 또한 LTB4 둘 다를 억제하는 능력을 가지며 따라서, 단독으로 또는 다른 AIBD 치료와 함께, AIBD의 예방 및 치료에 특히 유리하다.

발명의 내용

[0041] 코버신은 EBA의 마우스 모델에서 영향을 받은 체표면적 (ABSA) 퍼센트를 감소시키는 것으로 나타났다. 실시예 1에서, 질병 유도 전후의 코버신의 투여는 코버신으로 처리되지 않은 마우스와 비교하여 (홍반, 수포, 짓무름, 피각질 또는 탈모를 나타내는 피부 부위를 측정하고 피부 병변에 의해 영향을 받은 전체 체표면 (ABSA)의 퍼센트를 계산함으로써 평가되는 바와 같은) ABSA 퍼센트의 감소를 야기하는 것으로 나타났다. 다른 약제 (질류톤 및 메틸프레드니솔론)를 사용한 유사한 실험과 비교하여, 코버신의 투여로 더 큰 효과가 관찰될 수 있으며, 이것은 더 높은 농도 (예를 들어, 2.5mg/kg 및 0.25mg/kg)에서 특히 자명하다. 따라서 코버신은 AIBD의 치료에 현재 사용되는 전신 면역억제제 (메틸프레드니솔론)보다 더 효과적이며 LTB4 억제제 (질류톤)보다 더 효과적인 것으로 보인다. 질환의 유도 후 코버신의 투여가 또한 ABSA 퍼센트의 감소를 초래할 수 있는 것으로 또한 나타났다 (실시예 2). C5 및 LTB4 둘 다를 표적으로 하는 코버신의 이중 억제 활성이 AIBD의 치료에 특히 유리한 것으로 보인다.

[0042] 예방 실험은 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB4-결합 능력을 보유하는 변형된 코버신 폴리펩타이드를 사용하여 수행하였다. ABSA 퍼센트의 감소가 또한 이 제제(agent)를 사용하여 관찰되었다. C5-결합 활성 및 LTB4-결합 활성 둘 다를 갖는 제제가 바람직하지만, 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB4-결합 능력을 보유하거나 감소되거나 부재하는 LTB4-결합 활성을 갖지만 C5-결합 능력을 보유하는 제제가 본 발명에서 사용될 수 있다.

[0043] 따라서, 본 발명자들은 진드기 단백질 코버신 (당업계 및 본원에서는 EV576 및 OmCI라고도 함 [25])의 투여가 AIBD를 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있음을 입증하였다.

[0044] 따라서 본 발명은 치료적 또는 예방적 유효량의 도 2의 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질 또는 이 단백질의 기능적 등가물인 제제를 투여함을 포함하여, AIBD를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0045] 본 발명은 또한 AIBD를 치료 또는 예방하는 방법에서 사용하기 위한, 도 2의 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질 또는 이 단백질의 기능적 등가물인 제제를 제공한다.

[0046] 본 발명은 또한 치료적 또는 예방적 유효량의 도 2의 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질 또는 이 단백질의 기능적 등가물을 암호화하는 핵산 분자인 제제를 투여함을 포함하여, AIBD를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0047] 본 발명은 또한 AIBD를 치료 또는 예방하는 방법에서 사용하기 위한, 도 2의 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질 또는 이 단백질의 기능적 등가물을 암호화하는 핵산 분자인 제제를 제공한다.

[0048] 본 발명은 또한 (a) 치료적 또는 예방적 유효량의 도 2의 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질 또는 이 단백질의 기능적 등가물인 제제 및 (b) 제2 AIBD 치료(AIBD treatment)를 투여함을 포함하여, AIBD를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0049] 본 발명은 또한 AIBD를 치료 또는 예방하는 방법에서 사용하기 위한, (a) 도 2의 아미노산 서열 (서열 번호 2)

의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질 또는 이 단백질의 기능적 등가물인 제제 및 (b) 제2 AIBD 치료를 제공한다.

[0050] 본 발명은 또한 (a) 치료적 또는 예방적 유효량의 도 2의 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질 또는 이 단백질의 기능적 등가물을 암호화하는 핵산 분자인 제제 및 (b) 제2 AIBD 치료를 투여함을 포함하여, AIBD를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0051] 본 발명은 또한 AIBD를 치료 또는 예방하는 방법에서 사용하기 위한, (a) 도 2의 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질 또는 이 단백질의 기능적 등가물을 암호화하는 핵산 분자인 제제 및 (b) 제2 AIBD 치료를 제공한다.

[0052] 본 발명은 또한 치료적 또는 예방적 유효량의 도 2의 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질 또는 이 단백질의 기능적 등가물인 제제, 또는 상기 제제를 암호화하는 핵산 분자, 및 상기 제2 AIBD 치료를 투여함을 포함하여, AIBD를 치료 또는 예방하는데 필요한 제2 AIBD 치료의 양을 감소시키거나, AIBD를 치료 또는 예방하는데 필요한 제2 AIBD 치료의 지속시간을 감소시키는 방법을 제공한다.

[0053] 본 발명은 또한 치료적 또는 예방적 유효량의 도 2의 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질 또는 이 단백질의 기능적 등가물인 제제, 또는 상기 제제를 암호화하는 핵산 분자를 투여함을 포함하여, AIBD를 갖는 대상체에서 자가항체 역가를 감소시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 임의로 제2 AIBD 치료를 투여함을 포함할 수 있다.

[0054] **[상세한 설명]**

[0055] 질환

[0056] 대상체는 AIBD를 앓거나, 앓는 것으로 의심되거나, 발병할 위험이 있을 수 있다.

[0057] AIBD는 바람직하게는 천포창, 유천포창, IgA-매개된 피부병 및 후천성 수포성 표피박리증 (EBA)으로부터 선택된다. 천포창은 심상성 천포창 또는 낙엽성 천포창일 수 있다. "유천포창"은 수포성 유천포창, 점막 유천포창, 및/또는 임신 유천포창일 수 있다. 바람직하게는 AIBD는 EBA 또는 수포성 유천포창이다. 실시예에서 사용된 마우스 모델은 EBA에 대한 모델이지만 다른 AIBD, 특히 수포성 유천포창과 관련하여 유익하다. 원인 메카니즘, 즉 면역 복합체 형성 및 특히 강한 호중구 및/또는 호산구 관여로의 면역 반응의 정교화는 모든 AIBD에 대해 유사하다.

[0058] 이러한 질환의 존재는 당업계에서 잘 이해되는 일상적인 진단에 의해 결정될 수 있다 (예를 들면 [28] 참조).

[0059] AIBD가 발병할 위험이 있는 대상체는 AIBD를 예방하기 위해 본원에 언급된 제제의 투여로부터 이익을 얻을 수 있다. AIBD, 및 특히 수포성 유천포창에 대한 위험 인자는 유전적 인자 및 다른 유도성 인자를 포함한다 [29]. BP 및 점막 유천포창을 가진 환자에서 주요 조직적합성 복합체 클래스 II (MHC II) 유전자 HLA-DQB1*0301의 존재와 관련하여 유전적 소인에 대한 보고가 있다. 미토콘드리아 인코딩된 ATP 신타제 8 유전자 (MT-ATP8)에서의 다형성이 BP 병인과 관련될 수 있다. CYP2D6 유전자 다형성 및 FC감마 R IIIa 다형성이 또한 포함된다.

[0060] 다른 유도성 인자는 다음을 포함한다:

[0061] 1. 약물 : BP-유도 약물의 대부분은 설프하이드릴 그룹을 함유하거나 방출한다 (페니실라민, 캅토프릴, 페니실린 및 이의 유도체, 푸로세미드, 및 일부 세팔로스포린). 또한 페놀 환을 함유하는 약물 (일부 세팔로스포린 및 아세틸살리실산), 캅토프릴 이외의 안지오텐신-전환 효소 억제제, 대부분의 비-스테로이드성 항염증 약물, 백신과 같은 면역조절제, 디펩티딜 펩티다제-IV 억제제 (글립틴), 특히 빌다글립틴, 및 TNF- α 차단제가 BP를 유도하는 것으로 보고되었다.

[0062] 2. 바이러스: 백신화 후

[0063] 3. UV 또는 엑스레이 조사

[0064] BP 환자의 약 3분의 1은 신경-정신병을 갖는다; 뇌졸중, 치매, 파킨슨 등.

[0065] 이러한 위험 인자 중 하나 이상을 갖는 대상체가 AIBD의 치료 또는 예방 측면에서 바람직하다.

[0066] 투여의 결과

[0067] 대상체는, 치료의 결과로서, 증상의 발생률 감소, 증상의 완화, 증상의 발생 또는 재발의 억제 또는 지연, 이들

의 조합을 가질 수 있다. 바람직하게는 치료는 전형적인 질병 상태 증상의 감소를 가져온다. 예를 들면, 이것은 수포의 크기를 줄이거나, 수포의 수를 줄이거나, 영향을 받은 체표면의 퍼센트를 줄이거나, 수포의 삼출 정도를 줄이거나, 소양증을 줄이거나, 수포로부터 야기되는 감염의 발생률 및/또는 중증도를 줄이는 것으로 나타날 수 있다. 대상체의 일부는 증상이 완전히 해결되거나 더 이상 재발하지 않을 것이다.

- [0068] 임상 스코어링은 수포성 유천포창 질병 활동성 지표 (BPDAI)를 사용하여 수행될 수 있다 [30]. 전반적 BPDAI는 2가지 스코어로 구성된다: 총 BPDAI 활동성 및 BPDAI 손상. 총 BPDAI 활동성 스코어는 3가지 하위성분의 산술 합계이다 - 피부 수포/긁무름, 피부 두드러기/홍반, 및 점막 수포/긁무름.
- [0069] BPDAI 손상 스코어는 염증후 과다색소침착, 흉터 등과 같은 보다 영구적인 특징으로 인한 손상에 대해 국지적으로 등급이 매겨진 항목의 산술 합계이다. BPDAI는 병변 수 및 크기 임계치를 정량한다. 병변은 영향을 받은 영역에 기초하여 평가된다. BPDAI는 BP에서 임상 반응을 더 잘 구별하기 위해 사지와 같이 BP에서 주로 영향을 받은 피부 부위에 추가 가중치를 부여하고 두피와 얼굴에 대해서는 덜 강조한다.
- [0070] 전반적 BPDAI 스코어는 0 내지 372에 이를 수 있다. BPDAI 활동성의 경우 최대 360 (총 피부 활동성의 경우 최대 240-[긁무름/수포의 경우 120, 두드러기/홍반의 경우 120], 점막 활동성의 경우 120), BPDAI 손상의 경우 0 내지 12이며, 점수가 높을수록 더 큰 질병 활동성 또는 손상을 나타낸다. 전반적 BPDAI 스코어는 대상체의 포함을 평가하는데 사용될 것이다.
- [0071] BPDAI는 또한 BPDAI-소양증 지표로 알려진 별도의 주관적 척도를 갖는다. BPDAI 소양증 성분은 시각 아날로그 척도를 기준으로 하며, 지난 24시간 (0-10), 지난 주 (0-10) 및 지난 달 (0-10) 동안의 가려움증의 중증도를 총 30점으로 하여 측정한다.
- [0072] 바람직하게는 치료는 수포성 유천포창 질병 활동성 지표 (BPDAI)에 의해 측정된 하나 이상의 징후의 점수의 감소를 가져온다. 바람직하게는 치료는 피부 수포/긁무름, 피부 두드러기/홍반 및 점막 수포/긁무름 중의 하나 이상 (예를 들면 2개 또는 3개)의 점수의 감소를 가져온다.
- [0073] 하나의 실시양태에서 치료는 피부 수포/긁무름에 대한 점수의 감소를 가져온다. 하나의 실시양태에서 치료는 피부 두드러기/홍반에 대한 점수의 감소를 가져온다. 하나의 실시양태에서 치료는 점막 수포/긁무름에 대한 점수의 감소를 가져온다. 하나의 실시양태에서 치료는 피부 수포/긁무름 및 피부 두드러기/홍반에 대한 점수의 감소를 가져온다. 하나의 실시양태에서 치료는 피부 수포/긁무름 및 점막 수포/긁무름에 대한 점수의 감소를 가져온다. 하나의 실시양태에서 치료는 BPDAI-소양증 지표에 대한 점수의 감소를 가져온다.
- [0074] 일부 실시양태에서, 효과는 호중구 및/또는 호산구 관여의 감소 또는 예방에 의해 매개될 수 있다.
- [0075] 치료는 또한 질병의 하나 이상의 단계의 발병 전, 또는 질병 단계의 진행 사이에 잠재 기간을 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서 수포가 예방될 수 있다.
- [0076] 치료는 또한 자가면역 항체 역가를 감소시킬 수 있다.
- [0077] 치료는 또한 필요한 제2 AIBD 치료의 양 또는 지속기간을 감소시킬 수 있다.
- [0078] 따라서 본 발명의 추가의 실시양태에서, 치료적 또는 예방적 유효량의 도 2의 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질 또는 이 단백질의 기능적 등가물인 제제, 또는 상기 제제를 암호화하는 핵산 분자를 투여함을 포함하여, AIBD를 갖는 대상체에서 수포의 크기 및/또는 수를 감소시키거나, AIBD를 갖는 대상체에서 영향을 받은 체표면의 퍼센트를 감소시키는 방법이 제공된다. 이것은 단독으로 또는 제2 AIBD 치료와 함께 이루어질 수 있다.
- [0079] 본 발명은 또한 AIBD를 갖는 대상체에서 수포의 크기 및/또는 수를 감소시키거나, AIBD를 갖는 대상체에서 영향을 받은 체표면의 퍼센트를 감소시키는 방법에서 사용하기 위한, 도 2의 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질 또는 이 단백질의 기능적 등가물인 제제, 상기 제제를 암호화하는 핵산 분자를 제공한다. 이것은 단독으로 또는 제2 AIBD 치료와 함께 이루어질 수 있다.
- [0080] 본 발명의 제제는 상기 논의된 바와 같이 다른 AIBD 치료와 조합하여 사용될 수 있다. 본 발명의 제제와 다른 것 (본원에서 "제2" AIBD 치료라고 함)의 조합은 제2 AIBD의 양이 본 발명의 제제로의 치료의 부재하에서 사용되는 양에 비해 감소되거나, 제2 AIBD로의 치료의 지속시간이 본 발명의 제제로의 치료의 부재하에서 사용되는 치료의 지속시간에 비해 감소되도록 이루어질 수 있다. 이것은 스테로이드와 같은 특성의 알려진 치료의 부작

용, 예를 들어, 감염, 당뇨병, 골다공증, 혈전증 및 위장 궤양을 고려할 때 유리하다. 따라서, 전술한 바와 같이, 치료에 사용되는 제2 AIBD 치료의 양을 감소시키거나 제2 AIBD로의 치료 지속시간을 감소시키는 방법이 또한 제공된다.

- [0081] 바람직하게는 제2 AIBD 치료는 전신 코르티코스테로이드 요법, 국소 코르티코스테로이드 요법, 면역억제 요법 및 면역억제 생물학적 요법으로부터 선택된다.
- [0082] 바람직하게는 코르티코스테로이드는 프레드니손 및 프레드니솔론으로부터 선택된다. 바람직하게는 면역억제 요법은 메틸프레드니솔론, 미코페놀레이트, 아자티오프린, 항염증성 항생제 (예를 들어 답손) 및 사이클로포스파미드로부터 선택된다. 바람직하게는 면역억제 생물학적 요법은 리툭시맙 및 정맥내 면역글로불린 G (IVIG)로부터 선택된다.
- [0083] 본 발명의 제제 및 제2 AIBD 치료가 사용될 때, 이들은 함께 또는 별도로 투여될 수 있다. 본 발명의 제제가 먼저 투여될 수 있고 제2 AIBD 치료는 두번째로 투여될 수 있으며, 그 반대도 마찬가지이다.
- [0084] 따라서, 본 발명의 제제가, 예를 들어 상기와 같이 기술된 방법에서 하나 이상의 다른 AIBD 치료와 조합하여 사용되는 경우, 이것은 제2 AIBD 치료로 AIBD를 치료 또는 예방하는 방법에서 사용하기 위한 도 2의 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질 또는 이 단백질의 기능적 등가물인 제제, 또는 도 2의 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질 또는 이 단백질의 기능적 등가물인 제제로 AIBD를 치료 또는 예방하는 방법에서 사용하기 위한 제2 AIBD 치료로서 설명될 수 있다.
- [0085] 치료가 제2 AIBD 치료의 양, 또는 제2 AIBD로의 치료의 지속시간을 감소시키는 경우, 감소는 본 발명의 제제의 부재하에서 사용되는 제2 AIBD 치료의 양에 비해 최대 또는 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80%일 수 있다.
- [0086] 대상체
- [0087] 바람직한 대상체, 제제, 용량 등은 본원에 개시된 바와 같다.
- [0088] 임의의 감소 또는 증가에 대한 임의의 언급은 질환 매개변수의 감소 또는 증가가 치료의 부재하에서 상기 대상체와 비교된다. 바람직하게는, 매개변수는 정량할 수 있으며 이 경우 증가 또는 감소는 바람직하게는 통계적으로 유의하다. 예를 들면 증가는 치료의 부재하 (예를 들어 상기 치료가 시작되기 전)에서의 매개변수에 비해 적어도 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50% 또는 그 이상일 수 있다.
- [0089] 본 발명의 실시에서 제제가 투여되는 대상체는 바람직하게는 포유동물, 바람직하게는 인간이다. 제제가 투여되는 대상체는 AIBD의 위험이 있거나 AIBD를 갖는 대상체이다.
- [0090] 본 발명의 방법은 또한 (i) 대상체가 AIBD의 위험이 있는지 또는 AIBD를 갖는지 여부를 결정하는 단계, (ii) 코버신 투여 전 및/또는 후에 수행될 수 있는 AIBD의 중증도를 결정하는 단계의 하나 이상의 추가 단계를 포함할 수 있다.
- [0091] 본 발명에서 사용되는 제제
- [0092] 본 발명의 하나의 실시양태에 따르면, 제제는 코버신 자체 또는 이의 기능적 등가물이다. 하기에서, 용어 "코버신-타입 단백질"은 "도 2에 나타난 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질 또는 이의 기능적 등가물"에 대한 약칭으로서 사용된다.
- [0093] 코버신은 진드기 오르니트도로스 모우바타의 침샘으로부터 단리되었다. 코버신은 리포칼린 계열의 외부 구성원이며 보체 활성화를 억제하는 것으로 나타난 최초의 리포칼린 계열 구성원이다. 코버신은 C5에 결합하고 C5 전환효소에 의한 C5a 및 C5b로의 이의 절단을 방지함으로써 고전, 대체 및 렉틴 보체 경로를 억제하여, 활성화 (예를 들어, 전염증성) 켈타이드인 C5a의 생성, 및 MAC의 형성 둘 다를 억제한다. 코버신은 대략 0.02mg/ml의 IC50으로 래트, 마우스 및 인간 혈청에서 C5에 결합하고 C5 전환효소에 의한 이의 절단을 방지하는 것으로 입증되었다.
- [0094] 따라서, 코버신-타입 단백질은 도 2의 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지 168 또는 도 2의 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 1 내지 168을 포함하거나 이들로 이루어질 수 있다. 도 2에 제공된 단백질 서열의 처음 18개 아미노산은 C5 결합 또는 LTB-4 결합 활성화에 필요하지 않은 신호 서열을 형성하므로 이것은, 예를 들면, 재조합 단백질 생산 효율을 위해 생략될 수 있다.

- [0095] 코버신 단백질은 표면 플라즈몬 공명 (SPR)을 사용하여 측정된 1nM의 Kd로 C5에 결합하는 것으로 입증되었다 [31]. 코버신-타입 펩타이드 (예를 들어 코버신 단백질의 기능적 등가물)는 바람직하게는 통상적으로 360nM 미만, 보다 통상적으로 300nM 미만, 가장 통상적으로 250nM 미만, 바람직하게는 200nM 미만, 보다 바람직하게는 150nM 미만, 가장 바람직하게는 100nM 미만, 보다 더 바람직하게는 50, 40, 30, 20, 또는 10nM 미만, 및 유리하게는 5nM 미만의 Kd로 C5에 결합하는 능력을 보유하며, 여기서 상기 Kd는 표면 플라즈몬 공명을 사용하여, 바람직하게는 [31]에 기술된 방법에 따라 결정된다.
- [0096] 코버신은 고전 보체 경로, 대체 보체 경로 및 렉틴 보체 경로를 억제한다. 바람직하게는, 코버신-타입 단백질은 C5의 전체 입체구조를 안정화시키지만 세 가지 활성화 경로의 C5 전환효소에 의해 표적화된 C5 절단 부위를 직접적으로 차단하지 않는 방식으로 C5에 결합한다. C5에 대한 코버신의 결합은 C5의 전체 입체구조의 안정화를 초래하지만, 전환효소 절단 부위를 차단하지는 않는다. 코버신의 기능적 등가물이 또한 바람직하게는 이러한 특성을 공유한다.
- [0097] C5는 C5 전환효소에 의해 절단된다 (도 1). 이러한 절단의 산물들은 막 공격 복합체 (MAC)로도 알려진 C5b, C6, C7, C8 및 C9의 복합체의 형성을 촉진하는 아나필라톡신 C5a 및 용해 복합체 C5b를 포함한다. C5a는 호중구 및 호산구 화학주성, 호중구 활성화, 증가된 모세관 투과성 및 호중구 아포토시스의 억제를 포함한 다수의 병리학적 염증 과정에 관여하는 고도의 전염증성 펩타이드이다 [32].
- [0098] C5에 결합하여 이를 억제하는 단클론 항체 및 소분자가 다양한 질환 [33], 특히 PNH, 건선, 류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스 및 이식 거부를 치료하기 위해 개발되어 왔다. 그러나, 이들 단클론 항체 중 일부는 C5 다형성을 갖는 대상체로부터의 특정 C5 단백질에 결합하지 않으므로 이들 대상체에서 효과적이지 않다 [34]. 바람직하게는, 코버신-타입 단백질은 야생형 C5 뿐만 아니라 C5 다형성 (예를 들어, 에쿨리주맵에 의한 치료를 비효과적으로 만들거나, 에쿨리주맵으로의 치료 효능을 감소시키는 C5 다형성)을 갖는 대상체로부터의 C5에 결합하여 이의 절단을 억제한다. 용어 "C5 다형성"은 삽입, 결실, 아미노산 치환, 프레임-시프트, 절단에 의해 변경된 임의의 버전의 C5를 포함하며, 이들 중 어느 것은 단일 또는 다중일 수 있거나, 또는 야생형 C5에 비해 이들 변화 중 하나 이상의 조합일 수 있다. 인간 대상체에서, 야생형 C5는 수탁 번호 NP_001726.2; 버전 GI:38016947을 갖는 C5 단백질로 간주된다. C5 다형성의 예는 아미노산 위치 885에서의 다형성, 예를 들어 mAb 에쿨리주맵의 효과를 감소시키는 Arg885Cys (c.2653C>T에 의해 암호화됨), p.Arg885His (c.2654G>A에 의해 암호화됨) 및 Arg885Ser를 포함한다 [34].
- [0099] C5 다형성, 예를 들어 에쿨리주맵에 의한 치료를 비효과적으로 만들거나, 에쿨리주맵에 의한 치료의 효능을 감소시키는 C5 다형성을 갖는 대상체로부터의 C5를 포함한 C5에 결합하는 제제의 능력은 당업계에 공지된 표준 시험관내 검정에 의해, 예를 들면 표면 플라즈몬 공명 또는 표지된 C5를 갖는 겔 상에서 단백질의 배양 후 웨스턴 블롯팅에 의해 결정될 수 있다. 바람직하게는, 코버신-타입 단백질은 360nM 미만, 보다 통상적으로 300nM 미만, 가장 통상적으로 250nM 미만, 바람직하게는 200nM 미만, 보다 바람직하게는 150nM 미만, 가장 바람직하게는 100nM 미만, 보다 더 바람직하게는 50, 40, 30, 20, 또는 10nM 미만, 및 유리하게는 5nM 미만의 Kd로 야생형 C5 및/또는 C5 다형성, 예를 들어 에쿨리주맵에 의한 치료를 비효과적으로 만들거나, 에쿨리주맵에 의한 치료의 효능을 감소시키는 C5 다형성을 갖는 대상체로부터의 C5에 결합하며, 여기서 상기 Kd는 바람직하게는 [31]에 기술된 방법에 따라 표면 플라즈몬 공명을 사용하여 결정된다.
- [0100] 이것은 야생형 C5 및 C5 다형성, 예를 들어 에쿨리주맵에 의한 치료를 비효과적으로 만들거나, 에쿨리주맵에 의한 치료의 효능을 감소시키는 C5 다형성을 갖는 대상체로부터의 C5에 대해 더 높거나, 낮거나 동일한 친화도를 보일 수 있다.
- [0101] 보체 활성화를 억제하는 코버신-타입 단백질의 능력은 혈청에서 보체 활성화를 억제하는 제제의 능력을 측정함으로써 또한 결정될 수 있다. 예를 들면, 혈청에서의 보체 활성화는 당업계에 공지되거나 본원에 기술된 임의의 수단에 의해 측정될 수 있다.
- [0102] 코버신-타입 단백질은 또한 에이코사노이드 활성을 억제하는 기능을 가질 수 있는 것으로 정의될 수 있다. 코버신은 또한 LTB4에 결합하는 것으로 입증되었다. 코버신 단백질의 기능적 등가물은 또한 코버신 단백질과 유사한 친화도로 LTB4에 결합하는 능력을 보유할 수 있다. 코버신-타입 단백질이 C5-결합 활성을 보유하지 않는다면, 이러한 코버신-타입 단백질은 상당한 LTB-4-결합 활성을 보유해야 한다.
- [0103] LTB-4에 결합하는 코버신-타입 단백질의 능력은 당업계에 공지된 표준 시험관내 검정에 의해, 예를 들면, 표지된 LTB-4에 결합하기 위해 경쟁하는 코버신과 항-LTB-4 항체 간의 경쟁 ELISA에 의해, 등온선 적정 열량측정법

에 의해 또는 형광 적정에 의해 결정될 수 있다. 형광 적정을 사용하여 취득된 데이터는 코버신이 200 내지 300 pM의 Kd로 LTB4에 결합한다는 것을 보여준다. 예를 들면, 인산염 완충 염수 (PBS)에서 LTB4 (Caymen Chemicals, Ann Arbor, MI, USA)에 대한 결합 활성은 분광형광계, 예를 들어 LS 50 B 분광형광계 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)에서 정량할 수 있다. 이것은 다음과 같이 수행될 수 있다:

- [0104] 2 mL PBS 중의 코버신의 정제된 100 nM 용액을 자기 교반기가 장착된 석영 큐벳 (10 mm 경로 길이; Hellma, Mühlheim, Germany)에 적용하였다. 온도를 20°C로 조절하고, 평형에 도달한 후, 단백질 Tyr/Trp 형광을 280 nm (슬릿 폭: 15 nm)에서 여기시켰다. 형광 방출은 방출 최대치에 상응하는 340 nm (슬릿 폭: 16 nm)에서 측정하였다. PBS 중의 30 µM LTB4의 리간드 용액을 20 µL의 최대 부피 (전체 샘플 부피의 1%)까지 단계적으로 첨가하고, 30 s 배양 후 정상 상태 형광을 측정하였다. KD 값의 계산을 위해, 데이터를 100%의 초기 형광 강도로 정규화하고, 3 µM N-아세틸-트립토판아미드 용액의 적정을 사용하여 내부 필터 효과를 보정하고 데이터를 상응하는 리간드 농도에 대해 플롯팅하였다. 그 후, 이분자 복합체 형성에 대한 질량 작용 법칙에 근거한 비선형 최소 제곱 회귀를 사용하여 공개된 공식을 사용하여 Origin 소프트웨어 버전 8.5 (OriginLab, Northampton, USA)로 데이터를 맞추었다 (Breustedt et al., 2006) [35].
- [0105] 코버신은 1nM 미만, 보다 통상적으로 0.9nM 미만, 가장 통상적으로 0.8nM 미만, 바람직하게는 0.7nM 미만, 보다 바람직하게는 0.6nM 미만, 가장 바람직하게는 0.5nM 미만, 보다 더 바람직하게는 0.4 nM 미만, 및 유리하게는 0.3nM 미만의 Kd로 LTB4에 결합할 수 있으며, 여기서 상기 Kd는 형광 적정을 사용하여, 바람직하게는 상기 방법에 따라 결정된다. 코버신-타입 단백질은 바람직하게는 이러한 특성들을 공유한다.
- [0106] 코버신-타입 단백질 (예를 들어 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 변형된 코버신 폴리펩타이드)은, 예를 들어 5nM, 2nM 또는 1nM 미만, 보다 통상적으로 0.9nM 미만, 가장 통상적으로 0.8nM 미만, 바람직하게는 0.7nM 미만, 보다 바람직하게는 0.6nM 미만, 가장 바람직하게는 0.5nM 미만, 보다 더 바람직하게는 0.4 nM 미만, 및 유리하게는 0.3nM 미만의 Kd로 LTB4에 결합할 수 있으며, 여기서 상기 Kd는 형광 적정을 사용하여, 바람직하게는 상기 방법에 따라 결정된다.
- [0107] 본 발명의 하나의 실시양태에 따르면, 코버신-타입 단백질은 야생형 C5 및 C5 다형성, 예를 들어, 에쿨리주맵에 의한 치료를 비효과적으로 만들거나, 에쿨리주맵에 의한 치료의 효능을 감소시키는 C5 다형성을 갖는 대상체로부터의 C5 둘 다에 및 LTB-4에 결합할 수 있다.
- [0108] 따라서, 코버신-타입 단백질은 C5 전환효소에 의한 보체 C5a 및 보체 C5b로의 보체 C5의 절단을 방지하고 또한 LTB-4 활성을 억제하는 작용을 할 수 있다. C5 및 LTB4 둘 다에 결합하는 제제를 사용하는 것이 특히 유리하다. C5 및 에이코사노이드 경로가 둘 다 AIBD에서 관찰된 병리에 기여할 수 있다. 따라서 AIBD에 관여하는 다중 경로를 억제하는 단일 제제를 사용함으로써, 보체-매개 질환 및 장애의 염증 효과에 관여하는 단일 경로만을 억제하는 제제를 사용하는 것에 비해 향상된 효과가 달성될 수 있다. 단일 분자를 투여하는 것과 관련된 추가의 실질적인 이점이 있다.
- [0109] 바람직하게는, 본 발명의 제제는 흡혈성 절지동물로부터 유래된다. 용어 "흡혈성 절지동물"은 곤충, 진드기, 이, 벼룩 및 응애와 같은 적절한 숙주로부터 혈분을 섭취하는 모든 절지동물을 포함한다. 바람직하게는, 제제는 진드기, 바람직하게는 진드기 *오르니토도로스 모우바타*로부터 유래된다.
- [0110] 코버신의 기능적 등가물은 야생형 C5 또는 C5 다형성을 갖는 대상체로부터의 C5 중의 어느 하나인 C5에 결합할 수 있고, C5 전환효소에 의한 C5a 및 C5b로의 C5의 절단을 방지할 수 있는 능력을 보유하는 코버신의 상동체 또는 단편일 수 있다. 상동체 또는 단편은 또한 LTB4에 결합하는 능력을 보유할 수 있다.
- [0111] 코버신의 기능적 등가물은 또한 코버신과 구조적으로 유사하거나, 특히 야생형 C5 또는 C5 다형성, 예를 들어, 에쿨리주맵에 의한 치료를 비효과적으로 만들거나, 에쿨리주맵으로의 치료 효능을 감소시키는 C5 다형성을 갖는 대상체로부터의 C5 중의 어느 하나인 C5, 및/또는 LTB-4에 결합하는 코버신의 활성 부위 또는 활성 부위들의 환경에서 유사하거나 동일한 삼차 구조를 함유하는 분자, 예를 들어 합성 분자일 수 있다. C5 및 LTB4에 결합하기 위해 필요한 코버신에서의 정확한 아미노산 잔기는 Jore 등의 상기 제공된 참고문헌에 제시되어 있다.
- [0112] 상동체는, 예를 들면, *리피세팔루스 아펜디쿨라투스 (Rhipicephalus appendiculatus)*, *R. 산귀네우스 (R. sanguineus)*, *R. 부르사 (R. bursa)*, *A. 아메리카눔 (A. americanum)*, *A. 카제넨세 (A. cajennense)*, *A. 헤브라에움 (A. hebraeum)*, *부필루스 마이크로플루스 (Boophilus microplus)*, *B. 아눌라투스 (B. annulatus)*, *B. 데콜로라투스 (B. decoloratus)*, *데르마센토르 레티쿨라투스 (Dermacentor reticulatus)*, *D. 안테르소니 (D. andersoni)*,

D. 마르기나투스(D. marginatus), *D. 바리아빌리스(D. variabilis)*, *헤마피살리스 이너미스(Haemaphysalis inermis)*, *Ha. 리치이(Ha. leachii)*, *Ha. 푼타타(Ha. punctata)*, *히알로마 아나톨리쿰 아나톨리쿰(Hyalomma anatolicum anatolicum)*, *Hy. 드로메다리(Hy. dromedarii)*, *Hy. 마르기나툼 마르기나툼(Hy. marginatum marginatum)*, *익소테스 리시누스(Ixodes ricinus)*, *I. 페르술카투스(I. persulcatus)*, *I. 스카폴라리스(I. scapularis)*, *I. 헥사고누스(I. hexagonus)*, *아르가스 페르시쿠스(Argas persicus)*, *A. 레플렉수스(A. reflexus)*, *오르니토도로스 에라티쿠스(Ornithodoros erraticus)*, *O. 모우바타 모우바타(O. moubata moubata)*, *O. m. 포르시누스(O. m. porcinus)*, 및 *O. 사비그니이(O. savignyi)*를 포함하는 다른 진드기 종으로부터의 코버신 단백질 서열을 포함하는, 도 2에 명백히 확인된 코버신 서열의 파라로그(paralogue) 및 오르소로그(orthologue)를 포함한다.

[0113] 용어 "상동체"는 또한 *쿨렉스(Culex)*, *아노펠레스(Anopheles)* 및 *에데스(Aedes)* 속, 특히 *쿨렉스 퀸퀘파시아투스(Culex quinquefasciatus)*, *에데스 에집티(Aedes aegypti)* 및 *아노펠레스 감비에(and Anopheles gambiae)*를 포함하는 모기 종; *테노세팔리데스 펠리스(Ctenocephalides felis)*(고양이 벼룩)과 같은 벼룩 종; 말파리; 모래 파리; 진딧물; 체체파리; 이; 진드기; 거머리; 및 편형동물으로부터의 등가의 코버신 단백질 서열을 포함함을 의미한다. 천연 코버신 단백질은 대략 18kDa의 다른 세 가지 형태로 *O. 모우바타*에 존재하는 것으로 생각되며 용어 "상동체"는 코버신의 이러한 대안적인 형태를 포함하는 것으로 의도된다.

[0114] 도 2에 제공된 코버신 서열의 상동체의 확인을 위한 방법은 당업계의 숙련가들에게 명백할 것이다. 예를 들면, 상동체는 공개 및 개인 서열 데이터베이스 둘 다의 상동성 검색에 의해 확인될 수 있다. 통상적으로, 공개적으로 이용 가능한 데이터베이스가 사용될 수 있지만, 개인 또는 상업적으로 이용 가능한 데이터베이스는 특히 이들이 공개 데이터베이스에 표시되지 않은 데이터를 담고 있다면 동일하게 유용하다. 일차 데이터베이스는 일차 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 데이터 수탁 사이트이며 공개적으로 또는 상업적으로 이용 가능할 수 있다. 공개적으로 이용 가능한 일차 데이터베이스의 예는 GenBank 데이터베이스 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), EMBL 데이터베이스 (<http://www.ebi.ac.uk/>), DDBJ 데이터베이스 (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>), SWISS-PROT 단백질 데이터베이스 (<http://expasy.hcuge.ch/>), PIR (<http://pir.georgetown.edu/>), TrEMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>), TIGR 데이터베이스 (<http://www.tigr.org/tdb/index.html> 참조), NRL-3D 데이터베이스 (<http://www.nbrfa.georgetown.edu>), 단백질 데이터 베이스 (<http://www.rcsb.org/pdb>), NRDB 데이터베이스 (<ftp://ncbi.nlm.nih.gov/pub/nrdb/README>), OWL 데이터베이스 (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/dbbrowser/OWL/>) 및 이차 데이터베이스 PROSITE (<http://expasy.hcuge.ch/sprot/prosite.html>), PRINTS (<http://iupab.leeds.ac.uk/bmb5dp/prints.html>), Profiles (http://ulrec3.unil.ch/software/PFSCAN_form.html), Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/software/pfam>), Identify (<http://dna.stanford.edu/identify/>) 및 Blocks (<http://www.blocks.fhcrc.org>) 데이터베이스를 포함한다. 상업적으로 이용 가능한 데이터베이스 또는 개인 데이터베이스의 예는 PathoGenome (Genome Therapeutics Inc.) 및 PathoSeq (previously of Incyte Pharmaceuticals Inc.)를 포함한다.

[0115] 전형적으로, (바람직하게는 활성 부위와 같은 특정 영역에 걸쳐) 두 개의 폴리펩타이드 사이의 30% 이상의 동일성은 기능적 등가성의 표시로 간주되며 따라서 두 개의 단백질이 상동성이라는 표시로 간주된다. 바람직하게는, 상동성인 단백질은 도 2에 확인된 코버신 단백질 서열 (서열 번호 2)과 60% 이상의 서열 동일성의 정도를 갖는다. 보다 바람직한 상동체는 도 2에 제공된 코버신 단백질 서열 (서열 번호 2)과 각각 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 동일성 정도를 갖는다. 본원에 언급된 바와 같은 동일성 퍼센트는 NCBI (the National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 의해 지정된 디폴트 파라미터를 사용하여 BLAST 버전 2.1.3을 사용하여 결정된 바와 같다 [Blosum 62 매트릭스; 갭 개방 패널티=11 및 갭 연장 패널티=1]. 동일성 %는 관련 참조 서열 (예를 들어, 서열 번호 2의 아미노산 1-168 또는 서열 번호 2의 아미노산 19-168)의 전체 길이에 걸쳐 있을 수 있다.

[0116] 따라서, 코버신-타입 단백질은 참조 서열, 예를 들어 도 2, 서열 번호 2의 아미노산 19-168, 또는 도 2, 서열 번호 2의 아미노산 1-168과의 특정 아미노산 서열 동일성 %에 대한 언급에 의해, 예를 들어 도 2, 서열 번호 2의 아미노산 19-168 또는 도 2, 서열 번호 2의 아미노산 1-168과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이들로 이루어진 단백질로서 설명될 수 있다. 코버신-타입 단백질이 상기 서열을 포함하는 경우, 코버신-타입 단백질은 (예를 들어 다른 단백질, 예를 들어 이중 단백질과의) 융합 단백질일 수 있다. 적합한 제2 단백질은 아래에 논의되어 있다.

[0117] 도 2에 제공된 코버신 단백질 서열의 기능적 등가물은, 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10개 또는 그 이상의 아

미노산, 또는 최대 1, 2, 3, 4, 5, 7 또는 10개 아미노산의, 야생형 서열로부터의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실 (예를 들어 N 또는 C 말단으로부터의 결실)을 함유하는 돌연변이체를 포함하며 단 이러한 돌연변이체는 야생형 C5 및/또는 C5 다형성 (예를 들어 에쿨리주맵에 의한 치료를 비효과적으로 만들거나, 에쿨리주맵에 의한 치료의 효능을 감소시키는 C5 다형성)을 갖는 대상체로부터의 C5 및/또는 LTB4에 결합할 수 있는 능력을 보유해야 한다. 이것은 관련 참조 서열 (예를 들어, 서열 번호 2의 아미노산 1-168 또는 서열 번호 2의 아미노산 19-168)을 기준으로 한다. 따라서 돌연변이체는 단백질의 기능 또는 활성에 불리한 방식으로 영향을 미치지 않는 보존적 아미노산 치환을 함유하는 단백질을 포함한다. 이 용어는 또한 자연 생물학적 변이체 (예를 들어, 코버신 단백질이 유래된 종 내의 대립유전자 변이체 또는 지리적 변이체)를 포함하는 것으로 의도된다. 야생형 C5 및/또는 C5 다형성 (예를 들어 에쿨리주맵에 의한 치료를 비효과적으로 만들거나, 에쿨리주맵에 의한 치료의 효능을 감소시키는 C5 다형성)을 갖는 대상체로부터의 C5 및/또는 LTB4에 결합하는 개선된 능력을 갖는 돌연변이체는 또한 단백질 서열에서 특정 잔기의 전체 또는 부위 돌연변이를 통해 설계될 수 있다.

[0118] 코버신의 기능적 등가물은 코버신 단백질의 단편을 포함하며, 단 이러한 단편은 야생형 C5 및/또는 C5 다형성 (예를 들어 에쿨리주맵에 의한 치료를 비효과적으로 만들거나, 에쿨리주맵에 의한 치료의 효능을 감소시키는 C5 다형성)을 갖는 대상체로부터의 C5 및/또는 LTB4에 결합할 수 있는 능력을 보유해야 한다. 단편은, 예를 들면, 150개 미만의 아미노산, 145개 미만의 아미노산인 코버신 단백질 서열 (또는 상동체)로부터 유도된 폴리펩타이드를 포함할 수 있으며, 단 이들 단편은 보체 야생형 C5 및/또는 C5 다형성 (예를 들어 에쿨리주맵에 의한 치료를 비효과적으로 만들거나, 에쿨리주맵에 의한 치료의 효능을 감소시키는 C5 다형성)을 갖는 대상체로부터의 C5 및/또는 LTB4에 결합할 수 있는 능력을 보유해야 한다. 단편은, 예를 들면, 적어도 150개 아미노산, 적어도 145개 아미노산인 코버신 단백질 서열 (또는 상동체)로부터 유도된 폴리펩타이드를 포함할 수 있으며, 단 이들 단편은 보체 야생형 C5 및/또는 C5 다형성 (예를 들어 에쿨리주맵에 의한 치료를 비효과적으로 만들거나, 에쿨리주맵에 의한 치료의 효능을 감소시키는 C5 다형성)을 갖는 대상체로부터의 C5 및/또는 LTB4에 결합할 수 있는 능력을 보유해야 한다.

[0119] 임의의 기능적 등가물 또는 이의 단편은 바람직하게는 코버신에서 발견되는 시스템 잔기의 패턴을 보유한다. 예를 들면, 상기 기능적 등가물은 도 2의 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 1 내지 168에 따르는 서열의 아미노 말단에서 카복실 말단으로 정렬하여 32개 아미노산, 62개 아미노산, 28개 아미노산, 1개 아미노산 및 21개 아미노산의 거리로 서로에 대해 이격된 6개의 시스템 잔기를 포함한다. 코버신 단백질의 예시적인 단편은 서열 번호 4, 서열 번호 6, 서열 번호 8, 서열 번호 10, 서열 번호 12, 서열 번호 14에 개시되어 있다. 상응하는 단편을 암호화하는 DNA는 서열 번호 3, 서열 번호 5, 서열 번호 7, 서열 번호 9, 서열 번호 11, 서열 번호 13에 개시되어 있다.

[0120] 이러한 단편으로서 도 2에서 본원에 명백히 확인된 O. 모우바타 코버신 단백질의 단편 뿐만 아니라 상기 기술된 바와 같은 이 단백질의 상동체의 단편이 포함된다. 이러한 상동체의 단편은 전형적으로 도 2의 코버신 단백질 서열의 단편과 60% 이상의 동일성을 가질 것이지만, 보다 바람직한 상동체의 단편은 도 2의 코버신 단백질 단편과 각각 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 동일성을 나타낼 것이다. 바람직하게는 이러한 단편은 위에서 언급한 시스템 간격을 유지할 것이다. 개선된 특성을 갖는 단편은 물론 야생형 서열의 전체 돌연변이 또는 단편화에 이은 적절한 활성 분석에 의해 합리적으로 설계될 수 있다. 단편은 야생형 C5 또는 C5의 다형성 변이체 중의 어느 하나 또는 둘 다, 및/또는 LTB-4에 대해 코버신과 유사하거나 더 큰 친화도를 나타낼 수 있다. 이들 단편은 코버신 단백질의 단편에 대해 상기 기술된 크기일 수 있다.

[0121] 상기 논의된 바와 같이, 코버신-타입 단백질은 바람직하게는 야생형 C5 및/또는 C5 다형성 (예를 들어 에쿨리주맵에 의한 치료를 비효과적으로 만들거나, 에쿨리주맵에 의한 치료의 효능을 감소시키는 C5 다형성)을 갖는 대상체로부터의 C5 및 LTB4 둘 다에 결합한다. 감소되거나 부재하는 C5 결합 활성을 갖지만 LTB4 결합 활성을 보유하는 코버신-타입 단백질이 또한 본 발명에서 사용될 수 있다.

[0122] C5-결합 능력은 보유하지 않지만 LTB-4-결합 활성을 보유하는 코버신-타입 단백질은, 예를 들어, 2017년 4월 21일자로 출원된 공-계류중인 UK 특허 출원 제GB 1706406.4호 (출원인의 참조번호 P070475GB) 및 본 출원과 동일자로 출원된 국제 출원 제PCT/EP2018/XXXXXX호 (출원인의 참조번호 P070475WO)에 개시되어 있으며, 이들의 전체 내용은 본원에 참고로 포함된다. 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 이러한 코버신-타입 단백질이 본 발명의 모든 측면에서 사용될 수 있다.

[0123] 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 활성을 보유하는 이러한 코버신-타입 단백질은 하기 서열을 포함하거나 이들로 이루어질 수 있다:

- [0124] 서열 번호 22 (제GB 1706406.4호의 서열 번호 5)는 서열 번호 4가 Met114를 Gln으로, Met116을 Gln으로, Leu117을 Ser로, Asp118을 Asn으로, Ala119를 Gly로, Gly120을 Ser로, Gly121을 Ala로, Leu122를 Asp로, Glu123을 Asp로, Val124를 Lys로 변경하도록 변형된, 변형된 코버신의 아미노산 서열이다. (코버신 변이체 1)
- [0125] 서열 번호 23 (제GB 1706406.4호의 서열 번호 6)은 서열 번호 4가 Ala44를 Asn로, Met116을 Gln로, Leu117을 Ser로, Gly121을 Ala로, Leu122를 Asp로, Glu123을 Ala로, Asp149를 Gly로 변경하도록 변형된, 변형된 코버신의 아미노산 서열이다. (코버신 변이체 2)
- [0126] 서열 번호 24 (제GB 1706406.4호의 서열 번호 7)는 서열 번호 4가 Ala44를 Asn로, Met116을 Gln로, Leu122를 Asp로, Asp149를 Gly로 변경하도록 변형된, 변형된 코버신의 아미노산 서열이다. (코버신 변이체 3)
- [0127] 서열 번호 25 (제GB 1706406.4호의 서열 번호 8)는 서열 번호 4가 Ala44를 Asn로 변경하도록 변형된, 변형된 코버신의 아미노산 서열이다. (코버신 변이체 4)
- [0128] 서열 번호 26 (제GB 1706406.4호의 서열 번호 9)은 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124 (서열 번호 2의 아미노산 위치 132-142)에서 베타 H와 알파2 사이의 루프의 아미노산 서열이다.
- [0129] 서열 번호 27 (제GB 1706406.4호의 서열 번호 10)은 코버신 변이체 1 (서열 번호 22)에서 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124에서 베타 H와 알파2 사이의 루프의 아미노산 서열이다.
- [0130] 서열 번호 28 (제GB 1706406.4호의 서열 번호 11)은 코버신 변이체 2 (서열 번호 23)에서 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124에서 베타 H와 알파2 사이의 루프의 아미노산 서열이다.
- [0131] 서열 번호 29 (제GB 1706406.4호의 서열 번호 12)는 코버신 변이체 3 (서열 번호 24)에서 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124에서 베타 H와 알파2 사이의 루프의 아미노산 서열이다.
- [0132] 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 코버신-타입 폴리펩타이드는 (예를 들어 류코트리엔 또는 하이드록시에이코사노이드 결합 활성 및 감소되거나 부재하는 C5 결합을 나타내는) 변형된 코버신 폴리펩타이드로 설명될 수 있다. "변형된 코버신 폴리펩타이드"에 대한 언급은 서열 번호 2 또는 서열 번호 4의 변형된 버전, 즉 서열 번호 2의 N-말단에서 보이는 18개 아미노산 신호 서열을 갖거나 갖지 않는 코버신 폴리펩타이드에 대한 언급으로서 이해되어야 한다.
- [0133] 이러한 폴리펩타이드는 류코트리엔 또는 하이드록시에이코사노이드 결합 활성 및 감소되거나 부재하는 C5 결합을 나타낼 수 있으며 1 내지 30개 아미노산 치환이 이루어진 서열 번호 4, 또는 변형된 코버신 폴리펩타이드의 N 말단으로부터 최대 5개의 아미노산이 결실된 이의 단편을 포함할 수 있고, 여기서
- [0134] (i) 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에서 하기 치환 (a)-(j) 중의 하나 이상이 이루어지고:
- [0135] a. Met114는 Gln, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His, 또는 Thr로 대체되고;
- [0136] b. Met116은 Gln, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His, 또는 Thr로 대체되고;
- [0137] c. Leu117은 Ser, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, 또는 Pro로 대체되고;
- [0138] d. Asp118은 Asn, Gln, Arg, Lys, Gly, Ala, Leu, Ser, Ile, Phe, Tyr, Met Pro, His, 또는 Thr로 대체되고;
- [0139] e. Ala119는 Gly, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His로 대체되고;
- [0140] f. Gly120은 Ser, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His로 대체되고;
- [0141] g. Gly121은 Ala, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His로 대체되고;
- [0142] h. Leu122는 Asp, Glu, Asn, Ala, Gln, Arg, Lys, Pro, 또는 His로 대체되고;
- [0143] i. Glu123은 Asp, Ala, Gln, Asn, Arg, Lys, Gly, Leu, Ser, Ile, Phe, Tyr, Pro, His, 또는 Thr로 대체되고;
- [0144] j. Val124는 Lys, Gln, Asn, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His, 또는 Thr로 대체되고/되거나;
- [0145] (ii) 서열 번호 4에서 Ala44는 Asn, Asp, Gln, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His로 대체된다.
- [0146] 본원에서 사용되는 바와 같은 LK/E 결합 활성은 LTB4, B4 이소류코트리엔 및 이의 임의의 하이드록실화된 유도체, HETE, HPETE 및 EET를 포함하지만 이에 제한되지 않는 류코트리엔 및 하이드록시에이코사노이드에 결합하는

능력을 가리킨다. LTB4 결합이 특히 중요하다.

- [0147] 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 변형된 코버신 폴리펩타이드는 아래의 설명에 따라 변형된 서열 번호 2 또는 4로 구성될 수 있거나, 아래의 설명에 따라 변형된 서열 번호 2 또는 4를 포함할 수 있다.
- [0148] 서열 번호 2 및 서열 번호 4에서 비변형된 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124 (서열 번호 2의 아미노산 위치 132-142)에서 베타 H와 알파2 사이의 루프를 특징으로 한다. 이러한 루프는 아래에 나타난 서열을 갖는다:
- [0149] -Met-Trp-Met-Leu-Asp-Ala-Gly-Gly-Leu-Glu-Val- (서열 번호 26)
- [0150] 첫 번째 Met는 서열 번호 4의 위치 114와 서열 번호 2의 위치 132에 있다.
- [0151] 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 변형된 코버신 폴리펩타이드에서, 서열 번호 2 또는 서열 번호 4의 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에서 하기 치환 (a)-(j) 중의 하나 이상이 이루어지도록 변형된다:
- [0152] a. Met114는 Gln, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Gln 또는 Ala로 대체되고;
- [0153] b. Met116은 Gln, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Gln 또는 Ala로 대체되고;
- [0154] c. Leu117은 Ser, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, 또는 Pro, 바람직하게는 Ser 또는 Ala로 대체되고;
- [0155] d. Asp118은 Asn, Gln, Arg, Lys, Gly, Ala, Leu, Ser, Ile, Phe, Tyr, Met Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Asn로 대체되고;
- [0156] e. Ala119은 Gly, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His, 바람직하게는 Gly 또는 Asn로 대체되고;
- [0157] f. Gly120은 Ser, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His, 바람직하게는 Ser 또는 Asn로 대체되고;
- [0158] g. Gly121은 Ala, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His, 바람직하게는 Ala 또는 Asn로 대체되고;
- [0159] h. Leu122는 Asp, Glu, Asn, Ala, Gln, Arg, Lys, Pro, 또는 His, 바람직하게는 Asp 또는 Ala로 대체되고;
- [0160] i. Glu123은 Asp, Ala, Gln, Asn, Arg, Lys, Gly, Leu, Ser, Ile, Phe, Tyr, Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Asp, Ala, Gln 또는 Asn로 대체되고;
- [0161] j. Val124는 Lys, Gln, Asn, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Lys 또는 Ala로 대체된다.
- [0162] 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 서열 번호 2 또는 서열 번호 4의 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에서 하기 치환 (a)-(j) 중의 하나 이상이 이루어지도록 변형될 수 있다:
- [0163] a. Met114는 Gln로 대체되고;
- [0164] b. Met116은 Gln로 대체되고;
- [0165] c. Leu117은 Ser로 대체되고;
- [0166] d. Asp118은 Asn로 대체되고;
- [0167] e. Ala119는 Gly로 대체되고;
- [0168] f. Gly120은 Ser로 대체되고;
- [0169] g. Gly121은 Ala로 대체되고;

- [0170] h. Leu122는 Asp로 대체되고;
- [0171] i. Glu123은 Asp, 또는 Ala로 대체되고;
- [0172] j. Val124는 Lys로 대체된다.
- [0173] 변형된 코버신 폴리펩타이드에는 치환 (a)-(j) 중의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개가 존재한다. 바람직하게는 치환 (a)-(j) 중의 2개 이상, 5개 이상, 또는 8개 이상이 존재한다.
- [0174] 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 서열 번호 2 또는 서열 번호 4의 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에서 하기 치환이 존재하도록 변형될 수 있다:
- [0175] a. Met114는 Gln로 대체되고;
- [0176] b. Met116은 Gln로 대체되고;
- [0177] c. Leu117은 Ser로 대체되고;
- [0178] d. Asp118은 Asn로 대체되고;
- [0179] e. Ala119는 Gly로 대체되고;
- [0180] f. Gly120은 Ser로 대체되고;
- [0181] g. Gly121은 Ala로 대체되고;
- [0182] h. Leu122는 Asp로 대체되고;
- [0183] i. Glu123은 Asp로 대체되고;
- [0184] j. Val124는 Lys로 대체된다.
- [0185] 임의로 상기 언급된 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 Trp115는 치환되지 않는다. 바람직한 변형된 코버신 폴리펩타이드는 서열 Gln-Trp-Gln-Ser-Asn-Gly- Ser-Ala-Asp-Asp-Lys (서열 번호 27)을 갖는, 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124에서 베타 H와 알파2 사이에 루프를 갖는다.
- [0186] 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 변형된 코버신 폴리펩타이드에서, 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에서 하기 치환이 존재하도록 변형될 수 있다:
- [0187] a. Met114는 Gln, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Gln로 대체되고;
- [0188] b. Leu117은 Ser, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, 또는 Pro, 바람직하게는 Ser로 대체되고;
- [0189] c. Gly121은 Ala, Asp, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His, 바람직하게는 Ala로 대체되고;
- [0190] d. Leu122는 Asp, Glu, Asn, Gln, Arg, Lys, Pro, 또는 His, 바람직하게는 Asp로 대체되고;
- [0191] e. Glu123은 Asp, Ala, Gln, Asn, Arg, Lys, Gly, Leu, Ser, Ile, Phe, Tyr, Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Asp로 대체된다.
- [0192] 보다 특정한 실시양태에서;
- [0193] a. Met116은 Gln로 대체되고;
- [0194] b. Leu117은 Ser로 대체되고;
- [0195] c. Gly121은 Ala로 대체되고;
- [0196] d. Leu122는 Asp로 대체되고;
- [0197] e. Glu123은 Ala로 대체된다.
- [0198] 임의로 상기 언급된 이러한 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 Trp 115는 치환되지 않는다. 임의로 이러한 실시양태에서 Met114, Trp 115, Asp118, Ala119, Gly120 및 Val124는 치환되지 않거나, 본원의 다른 곳에서 언급된 바와 같이 보존적 치환으로 치환된다. 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하

는 바람직한 변형된 코버신 폴리펩타이드는 서열 Met-Trp-Gln-Ser-Asp-Ala-Gly-Ala-Asp-Ala-Val (서열 번호 28)을 갖는, 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124에서 베타 H와 알파2 사이에 루프를 갖는다.

- [0199] 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 변형된 코버신 폴리펩타이드에서, 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에서 하기 치환이 존재하도록 변형될 수 있다:
- [0200] a. Met116은 Gln, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Gln로 대체되고;
- [0201] b. Leu122는 Asp, Glu, Asn, Gln, Arg, Lys, Pro, 또는 His, 바람직하게는 Asp로 대체된다;
- [0202] 보다 특정한 실시양태에서;
- [0203] a. Met116은 Gln로 대체되고;
- [0204] b. Leu122는 Asp로 대체된다.
- [0205] 임의로 상기 언급된 이러한 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 Trp 115는 치환되지 않는다. 임의로 이러한 실시양태에서 Met114, Trp 115, Leu117, Asp118, Ala119, Gly120, Gly121, Glu123 및 Val124는 치환되지 않는다. 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 바람직한 변형된 코버신 폴리펩타이드는 서열 Met-Trp-Gln-Leu-Asp-Ala-Gly-Gly-Asp-Glu-Val (서열 번호 29)를 갖는, 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124에서 베타 H와 알파2 사이에 루프를 갖는다.
- [0206] 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 Ala44 (서열 번호 2의 Ala62)가 Asn, Asp, Gln, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His로 대체되도록 변형될 수 있다.
- [0207] 바람직한 실시양태에서 서열 번호 4의 Ala44는 Asn로 대체된다.
- [0208] 서열 번호 4의 위치 44 (또는 서열 번호 2의 위치 62)에서의 이러한 치환은 본원에 언급된 다른 치환 중의 어느 것과 조합하여 이루어질 수 있다.
- [0209] 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 또 다른 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에서 하기 치환 (a)-(j) 중의 하나 이상이 존재하도록 변형될 수 있다:
- [0210] a. Met114는 Gln, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Gln 또는 Ala, 예를 들어 Gln로 대체되고;
- [0211] b. Met116은 Gln, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Gln 또는 Ala, 예를 들어, Gln로 대체되고;
- [0212] c. Leu117은 Ser, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, 또는 Pro, 바람직하게는 Ser 또는 Ala, 예를 들어, Ser로 대체되고;
- [0213] d. Asp118은 Asn, Gln, Arg, Lys, Gly, Ala, Leu, Ser, Ile, Phe, Tyr, Met Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Asn로 대체되고;
- [0214] e. Ala119는 Gly, Asp, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His, 바람직하게는 Gly 또는 Asn, 예를 들어, Gly로 대체되고;
- [0215] f. Gly120은 Ser, Asp, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His, 바람직하게는 Ser 또는 Asn, 예를 들어, Ser로 대체되고;
- [0216] g. Gly121은 Ala, Asp, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His 바람직하게는 Ala 또는 Asn, 예를 들어, Ala로 대체되고;
- [0217] h. Leu122는 Asp, Glu, Asn, Gln, Arg, Lys, Pro, 또는 His, 바람직하게는 Asp 또는 Ala, 예를 들어, Asp로 대체되고;
- [0218] i. Glu123은 Asp, Ala, Gln, Asn, Arg, Lys, Gly, Leu, Ser, Ile, Phe, Tyr, Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Asp, Ala, Gln 또는 Asn, 예를 들어, Asp 또는 Ala로 대체되고;
- [0219] j. Val124는 Lys, Gln, Asn, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Lys 또는 Ala, 예를

들어, Lys로 대체되고;

- [0220] 추가로 서열 번호 4의 Ala44 (서열 번호 2의 Ala62)는 Asn, Asp, Gln, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His, 바람직하게는 Asn로 대체된다.
- [0221] 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 몇몇 변형된 코버신 폴리펩타이드에서, 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에서 하기 치환이 존재하도록 변형될 수 있다:
 - [0222] a. Met116은 Gln로 대체되고;
 - [0223] b. Leu117은 Ser로 대체되고;
 - [0224] c. Gly121은 Ala로 대체되고;
 - [0225] d. Leu122는 Asp로 대체되고;
 - [0226] e. Glu123은 Ala로 대체되고;
- [0227] 서열 번호 4의 Ala44는 Asn로 대체된다.
- [0228] 이러한 실시양태의 바람직한 측면에서 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에 상응하는 아미노산 잔기는 서열 번호 28에 제시된 바와 같다.
- [0229] 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 몇몇 변형된 코버신 폴리펩타이드에서, 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에서 하기 치환이 존재하도록 변형된다:
 - [0230] a. Met116은 Gln로 대체되고;
 - [0231] b. Leu122는 Asp로 대체되고;
- [0232] 서열 번호 4의 Ala44는 Asn로 대체된다.
- [0233] 이러한 실시양태의 바람직한 측면에서 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에 상응하는 아미노산 잔기는 서열 번호 29에 제시된 바와 같다.
- [0234] 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 몇몇 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 Asp149가 Gly, Gln, Asn, Ala, Met, Arg, Lys, Leu, Ser, Ile, Phe, Tyr, Pro, His, 또는 Thr로 대체되도록 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 Asp149가 Gly로 대체되도록 변형된다. 서열 번호 4의 위치 149 (서열 번호 2의 위치 167)에서의 이러한 치환은 본원에 언급된 다른 치환들 중의 어느 것과 조합하여 이루어질 수 있다.
- [0235] 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 몇몇 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에서 하기 치환이 존재하도록 변형될 수 있다:
 - [0236] a. Met116은 Gln로 대체되고;
 - [0237] b. Leu117은 Ser로 대체되고;
 - [0238] c. Gly121은 Ala로 대체되고;
 - [0239] d. Leu122는 Asp로 대체되고;
 - [0240] e. Glu123은 Ala로 대체되고;
- [0241] 서열 번호 4의 Ala44는 Asn로 대체되고 서열 번호 4의 Asp149는 Gly149로 대체된다.
- [0242] 이러한 실시양태의 바람직한 측면에서 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에 상응하는 아미노산 잔기는 서열 번호 28에 제시된 바와 같다.
- [0243] 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 몇몇 변형된 코버신 폴리펩타이드에서, 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에서 하기 치환이 존재하도록 변형될 수 있다:

- [0244] a. Met116은 Gln로 대체되고;
- [0245] b. Leu122는 Asp로 대체되고;
- [0246] 서열 번호 4의 Ala44는 Asn로 대체되고 서열 번호 4의 Asp149는 Gly149로 대체된다.
- [0247] 이러한 실시양태의 바람직한 측면에서 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에 상응하는 아미노산 잔기는 서열 번호 29에 제시된 바와 같다.
- [0248] 이러한 개시의 다양한 측면 및 실시양태에서, 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 변형된 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 2 및 서열 번호 4에서 비변형된 코버신 폴리펩타이드와는 1 내지 30개 아미노산까지 상이하다. 생성되는 변형된 코버신 폴리펩타이드가 비변형된 코버신 폴리펩타이드에 비해 LK/E 결합 활성 및 감소되거나 부재하는 C5 결합을 나타내는 한 서열 번호 2 및 서열 번호 4에서 코버신 폴리펩타이드에 임의의 변형이 이루어질 수 있다.
- [0249] 일부 실시양태에서 서열 번호 4의 위치 6, 38, 100, 128, 129, 150에서의 6개의 시스테인 아미노산은 본 발명의 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 유지된다.
- [0250] 몇몇 변형된 코버신 폴리펩타이드에서, 서열 번호 4의 Asn60 및 Asn84는 각각 Gln로 대체된다. 이러한 변형은 폴리펩타이드가 효모에서 발현되는 경우 N-결합된 과당화(hyperglycosylation)를 방지하기 위해 부위 지정 돌연변이 유발에 의해 수행될 수 있다.
- [0251] 몇몇 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 서열 번호 4의 하기 아미노산 중의 하나 이상은 LTB4에의 결합에 관련되는 것으로 생각되며 따라서 비변형된 형태로 유지될 수 있다: Phe18, Tyr25, Arg36, Leu39, Gly41, Pro43, Leu52, Val54, Met56, Phe58, Thr67, Trp69, Phe71, Gln87, Arg89, His99, His101, Asp103, 및 Trp115. 몇몇 변형된 코버신 폴리펩타이드에서, 이러한 아미노산 중의 적어도 5개, 10개 또는 15개, 또는 전부가 본 발명의 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 비변형된 형태로 유지된다. 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 몇몇 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 이들 아미노산 중의 하나 이상은 보존적으로 치환될 수 있다. 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 몇몇 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 이들 아미노산 중의 최대 5개, 10개 또는 15개, 또는 전부가 본 발명의 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 보존적으로 치환된다.
- [0252] 서열 번호 4에서 하기 위치의 아미노산은 코버신과 TSGP2 및 TSGP3 사이에 고도로 보존된다: 5, 6, 11, 13-15, 20-21, 24-27, 29-32, 35-41, 45, 47-48, 50, 52-60, 64, 66, 69-81, 83, 84, 86, 90-94, 97-104, 112-113, 115, 125-129, 132-139, 145, 148, 및 150.
- [0253] 서열 번호 4에서 하기 위치의 아미노산은 LTB4에의 결합에 관련되는 것으로 생각되고/되거나 코버신과 TSGP2 및 TSGP3 사이에 고도로 보존된다: 5, 6, 11, 13-15, 18, 20-21, 24-27, 29-32, 35-41, 43, 45, 47-48, 50, 52-60, 64, 66, 67, 69-81, 83, 84, 86, 87, 89, 90-94, 97-104, 112-113, 115, 125-129, 132-139, 145, 148, 및 150.
- [0254] 서열 번호 4에서 하기 위치의 아미노산은 LTB4에의 결합에 관련되는 것으로 생각되고/되거나 코버신과 TSGP2 및 TSGP3 사이에 고도로 보존된다: 5, 6, 11, 13-15, 18, 20-21, 24-25, 27, 30-32, 35-41, 43, 47-48, 50, 52-60, 64, 66, 67, 69-81, 83, 84, 86, 87, 89, 90-94, 98, 100, 102-104, 112-113, 115, 126, 128-129, 132-139, 145, 148, 및 150.
- [0255] 따라서, 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 몇몇 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 상기 아미노산은 비변형된 형태로 유지된다. 일부 실시양태에서, 이들 아미노산 중의 적어도 5개, 10개 또는 15개, 또는 전부는 본 발명의 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 비변형된 형태로 유지된다. 일부 실시양태에서 이들 아미노산 중의 하나 이상은 보존적으로 치환될 수 있다. 일부 실시양태에서 이들 아미노산 중의 최대 5개, 10개 또는 15개, 20개, 25개, 30개, 40개, 50개 또는 전부는 본 발명의 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 보존적으로 치환된다.
- [0256] 본원에 언급된 변형된 코버신 폴리펩타이드는 전형적으로 서열 번호 2 또는 서열 번호 4와는 1 내지 30개, 바람직하게는 2 내지 25개, 보다 바람직하게는 3 내지 20개, 보다 더 바람직하게는 4 내지 15개 아미노산까지 상이하다. 전형적으로 차이는 5 내지 12개, 또는 6 내지 10개 아미노산 변화일 것이다. 예를 들면, 1 내지 30개, 또는 2 내지 25개, 3 내지 30개, 4 내지 15개, 5 내지 12개, 또는 6 내지 10개 아미노산 치환이 서열 번호 2 또

는 서열 번호 4에서 이루어질 수 있다.

- [0257] 서열 번호 27에 제시된 바와 같은, 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124 (서열 번호 2의 아미노산 위치 132-142)에서 베타 H와 알파2 사이에 루프를 갖는 변형된 코버신 폴리펩타이드는 이러한 루프의 존재의 결과로서 서열 번호 4에 비해 10개의 아미노산 치환을 갖는다. 따라서 일부 실시양태에서, 본원에 언급된 변형된 코버신 폴리펩타이드는 바람직하게는 (예를 들어 서열 번호 27의 루프에서) 서열 번호 22에 제시된 것을 증가하여 서열 번호 4에 비해 1-15, 2-10, 3-5, 또는 최대 2, 3, 4 또는 5개의 추가의 치환을 갖는다.
- [0258] 서열 번호 28에 제시된 바와 같은, 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124 (서열 번호 2의 아미노산 위치 132-142)에서 베타 H와 알파2 사이에 루프를 갖는 변형된 코버신 폴리펩타이드는 이러한 루프의 존재의 결과로서 서열 번호 4에 비해 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 따라서 일부 실시양태에서, 본원에 언급된 변형된 코버신 폴리펩타이드는 바람직하게는 (예를 들어 서열 번호 28의 루프에서) 서열 번호 23에 제시된 것을 증가하여 서열 번호 4에 비해 1-20, 2-15, 3-10, 또는 최대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개의 추가의 치환을 갖는다. 추가의 치환은 바람직하게는 본원의 다른 곳에 제시된 바와 같이 위치 44 및 149에서의 치환을 포함한다.
- [0259] 서열 번호 29에 제시된 바와 같은, 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124 (서열 번호 2의 아미노산 위치 132-142)에서 베타 H와 알파2 사이에 루프를 갖는 변형된 코버신 폴리펩타이드는 이러한 루프의 존재의 결과로서 서열 번호 4에 비해 2개의 아미노산 치환을 갖는다. 따라서 일부 실시양태에서, 변형된 코버신 폴리펩타이드는 바람직하게는 서열 번호 24에 제시된 것을 증가하여 서열 번호 4에 비해 1-25, 2-12, 3-15, 또는 최대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15개의 추가의 치환 (예를 들어 서열 번호 29의 루프에서의 치환)을 갖는다. 추가의 치환은 바람직하게는 본원의 다른 곳에 제시된 바와 같이 위치 44 및 149에서의 치환을 포함한다.
- [0260] 본원의 다른 곳에 제시된 바와 같이 서열 번호 4의 위치 44에 치환을 갖는 변형된 코버신 폴리펩타이드는 바람직하게는 서열 번호 4에 비해 1-25, 2-12, 3-15, 또는 최대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15개의 추가의 치환을 갖는다.
- [0261] 상기 명백히 언급된 것 이외의 치환은 바람직하게는, 예를 들면, 하기 표에 따르는 보존적 치환이다. 두번째 컬럼의 동일 블록 및 바람직하게는 세번째 컬럼의 동일 라인의 아미노산은 서로 치환될 수 있다:

지방족	비-극성	GAP
		ILV
	극성 - 하전되지 않음	CSTM
		NQ
		DE
	극성 - 하전됨	KR
HFVY		
방향족		HFVY

- [0262]
- [0263] 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 바람직한 변형된 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 22, 23, 24, 25 중의 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어질 수 있다.
- [0264] 본 발명은 또한 변형된 코버신 폴리펩타이드의 N 말단으로부터 최대 5개의 아미노산이 결실된 상기 언급된 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 변형된 코버신 폴리펩타이드의 단편의 사용을 포함한다. 단편은 변형된 코버신 폴리펩타이드의 N 말단으로부터의 1, 2, 3, 4 또는 5개 결실에 상응할 수 있다. 생성되는 폴리펩타이드가 변형된 코버신의 LK/E 결합 활성을 보유하고 감소되거나 부재하는 보체 억제 활성을 갖는다면, 서열 번호 2 또는 서열 번호 4의 아미노산 서열에서 다른 위치로부터의 결실이 또한 본 발명의 일부를 형성하는 것으로 간주된다.
- [0265] 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 변형된 코버신 폴리펩타이드가 사용되는 경우, C5 결합은, 예를 들면, 서열 번호 2 또는 4에서 비변형된 코버신 폴리펩타이드가 나타내는 결합에 비해 적어도 2, 5, 10, 15, 20, 50, 100배까지 감소되거나 없어질 수 있다. C5 결합은, 예를 들어, 서열 번호 2

또는 4에서 비변형된 코버신 폴리펩타이드에 비해 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95%까지 감소될 수 있다. 변형된 코버신 폴리펩타이드는 문헌 [Roversi et al. (2013) J Biol Chem. 288, 18789-18802]에 기술된 방법에 따라 표면 플라즈몬 공명에 의해 결정되는 바와 같이, 또는 제GB1706406.4호의 실시예 2에 제시된 바와 같이 1 마이크로몰 이상의 KD로 C5에 결합할 수 있다.

[0266] 본 발명에 따라 사용되는 기능적 등가물은, 예를 들면, 이중 단백질 서열에 대한 코딩 서열에 프레임으로 코버신 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 클로닝함으로써 수득되는 융합 단백질일 수 있다. 용어 "이중"은, 본원에서 사용되는 경우, 코버신 단백질 또는 이의 기능적 등가물 이외의 임의의 폴리펩타이드를 명시하도록 의도된다. N- 또는 C-말단에서 가용성 융합 단백질에 포함될 수 있는 이중 서열의 예는 다음과 같다: 막-결합 단백질의 세포외 도메인, 면역글로불린 불변 영역 (Fc 영역), PAS 또는 XTEN 또는 유사한 비구조화된 폴리펩타이드, 다량체화 도메인, 세포외 단백질의 도메인, 신호 서열, 배출 서열, 또는 친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있는 서열. 이들 이중 서열 중 다수는 발현 플라스미드로 상업적으로 이용 가능한데, 그 이유는 이들 서열이 이들에 융합된 단백질의 특이 생물학적 활성을 상당히 손상시키지 않으면서 추가의 특성을 제공하기 위해 융합 단백질에 일반적으로 포함되기 때문이다 [36]. 이러한 추가의 특성의 예는 체액에서의 보다 긴 반감기 (예를 들어 Fc 영역의 부가 또는 Pas화(Pasylation)로부터 야기됨 [37]), 세포외 국재화, 또는 히스티딘, GST, FLAG, 아비딘 또는 HA 태그와 같은 태그에 의해 허용되는 바와 같은 보다 용이한 정제이다. 융합 단백질은 성분들이 이러한 링커에 의해 분리되도록 링커 서열 (예를 들어 1-50개 아미노산 길이)을 추가로 함유할 수 있다.

[0267] 따라서 융합 단백질은 코버신-유사 단백질을 포함하는 단백질의 예이며, 구체적인 예로서 PAS 서열 및 코버신-타입 단백질 서열을 포함하는 단백질을 포함한다. PAS 서열은, 예를 들어, 문헌[Schlapschy M, et al [37]], 및 제EP 08773567.6호에 기술되어 있고, PAS화 코버신 분자는 Kuhn 등 [38]에 기술되어 있다. PAS화는 아미노산 Pro, Ala, 및/또는 Ser로 구성된 구조적으로 무질서한 폴리펩타이드 서열과 단백질의 유전자 융합을 기술한다. 이것은 XL Protein (<http://xl-protein.com/>)에 의해 개발된 기술이며 유체역학적 부피가 큰 용매화된 무작위 사슬을 이것이 융합되는 단백질에 부착하는 간단한 방법을 제공한다. 폴리펩타이드 서열은 부피가 큰 랜덤 코일 구조를 채택한다. 따라서 생성되는 융합 단백질의 크기는 이것이 융합되는 단백질보다 훨씬 더 크다. 이것은 생물학적 시스템에서 제거율(clearance)을 감소시키는 것으로 나타났다. 적절한 PAS 서열은 제EP08773567.6호 및 상기 Schlapschy 참고 문헌에 기술되어 있다. 임의의 적합한 PAS 서열이 융합 단백질에 사용될 수 있다. 예는 랜덤 코일 형태를 형성하는 적어도 약 100개의 아미노산 잔기로 이루어지고 알라닌, 세린 및 프롤린 잔기로 이루어진 (또는 프롤린 및 알라닌 잔기로 이루어진) 아미노산 서열을 포함한다. 이것은 다수의 아미노산 반복체를 포함할 수 있으며, 여기서 상기 반복체는 Ala, Ser 및 Pro 잔기 (또는 프롤린 및 알라닌 잔기)로 이루어지고 6개 이하의 연속 아미노산 잔기는 동일하다. 프롤린 잔기가 서열의 아미노산의 4% 이상 및 40% 미만을 구성할 수 있다. 서열은 다음으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 이들 서열의 전체 또는 일부로서 이들 서열의 순환 치환된 버전 또는 다량체를 포함할 수 있다:

- [0268] ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (서열 번호 15);
- [0269] AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (서열 번호 16);
- [0270] APSSPSPASPSSPASPS (서열 번호 17),
- [0271] SAPSSPSPASPSSPASPS (서열 번호 18),
- [0272] SSPSPSPSSPASPSSPA (서열 번호 19),
- [0273] AASPAAPSAPAAASPAAPSAPPA (서열 번호 20) 및
- [0274] ASAAAPAAASAAASAPSAAA (서열 번호 21)

[0275] 예를 들면, PAS 서열에 존재하는 반복체 중 하나, 즉 서열 번호 15-21 중 하나, 바람직하게는 서열 번호 15의 5-40, 10-30, 15-25, 18-20, 바람직하게는 20-30 또는 30개 카피가 있을 수 있다. 바람직하게는 PAS 서열은 서열 번호 15의 30개 카피를 포함하거나 이들로 이루어진다. 바람직하게는 PAS 서열은 (직접적으로 또는 링커 서열을 통해) 코버신-타입 단백질의 N 말단에 융합되며, 특정의 바람직한 실시양태에서 코버신-타입 단백질은 서열 번호 2의 아미노산 19-168을 포함하거나 이들로 이루어질 수 있다 (예를 들어 융합 단백질은 (a) 서열 번호 15의 30개 카피로 이루어진 PAS 서열 및 (b) 서열 번호 2의 아미노산 19-168을 포함하고, 여기서 (a)는 직접적으로 또는 링커 서열을 통해 (b)의 N 말단에 융합된다).

[0276] 융합 단백질은 성분들이 이러한 링커에 의해 분리되도록 링커 서열 (예를 들어 1-50, 2-30, 3-20, 5-10개 아미

노산 길이)을 추가로 함유할 수 있다. 하나의 실시양태에서 링커 서열은 단일 알라닌 잔기일 수 있다.

- [0277] 단백질 및 이의 기능적 등가물은 숙주 세포에서 발현에 의해 재조합체 형태로 제조될 수 있다. 이러한 발현 방법은 당업계의 숙련자들에게 널리 알려져 있으며 [39] 및 [40]에 상세하게 기술되어 있다. 코버신 단백질 및 이의 기능적 등가물의 재조합체 형태는 바람직하게는 비글리코실화된다. 바람직하게는 숙주 세포는 대장균 (*E.coli*)이다.
- [0278] 코버신 단백질 및 이의 기능적 등가물은 바람직하게는 단리된 형태, 예를 들어, 이것이 발현되는 숙주 세포 및/또는 세포 성장 배지의 적어도 하나의 성분으로부터 분리된 형태이다. 일부 실시양태에서, 코버신 단백질 또는 이의 기능적 등가물은, 예를 들면, 전기영동 또는 크로마토그래피에 의해 결정되는 바와 같이 적어도 90%, 95% 또는 99% 순도로 정제된다. 본 발명의 단백질 및 단편은 또한 단백질 화학의 통상의 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들면, 단백질 단편은 화학적 합성에 의해 제조될 수 있다. 융합 단백질의 생성을 위한 방법은 본 기술 분야의 표준이며 당업자에게 공지되어 있을 것이다. 예를 들면, 가장 일반적인 분자 생물학, 미생물학 재조합 DNA 기술 및 면역 기술은 [39] 또는 [41]에서 찾아볼 수 있다.
- [0279] 본 발명의 추가의 실시양태에 따르면, 제제는 코버신-타입 단백질을 암호화하는 핵산 분자일 수 있다. 예를 들면, 유전자 요법이 *생체내* 또는 *생체외* 대상체에서 관련 세포에 의한 코버신-타입 단백질의 내인성 생산을 수행하는데 사용될 수 있다. 또 다른 접근법은 치료 유전자가 혈류 또는 근육 조직에 직접 주입되는 "네이키드 DNA"의 투여이다.
- [0280] 바람직하게는, 이러한 핵산 분자는 도 2의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 1)의 염기 55 내지 507을 포함하거나 이들로 이루어진다. 이러한 뉴클레오티드 서열은 신호 서열 없이 도 2의 코버신 단백질을 암호화한다. 도 2의 뉴클레오티드 서열의 처음 54개 염기는 보체 억제 활성 또는 LTb4 결합 활성에 필요하지 않은 신호 서열을 암호화한다. 대안적으로, 핵산 분자는 신호 서열을 갖는 단백질을 암호화하는, 도 2의 핵산 서열의 염기 1 내지 507을 포함하거나 이들로 이루어질 수 있다.
- [0281] 투여 모드
- [0282] 코버신-타입 단백질은 투여를 실시하기 위해 의료 전문가가 필요하지 않으며, 이들 분자는 빠르게 흡수된다. 이와 달리, 다수의 재조합 항체는 매우 느리게 흡수되며 결과적으로 장기간에 걸쳐 (예를 들어 정맥내) 주입되어야 한다. 따라서, 이러한 분자의 투여는 또한 의료 전문가를 필요로 한다. 따라서, C5 다형성을 갖는 대상체에서 보체 경로의 활성화를 억제하는데 보다 효과적이라는 이점을 가질 뿐만 아니라, 코버신-타입 단백질은 또한 에쿨리주맙 같은 항체와 같은 다른 제제보다 투여하기가 더 쉽다는 이점을 갖는다.
- [0283] 제제는 치료적 또는 예방적 유효량으로 투여된다. 용어 "치료적 유효량"은 AIBD를 치료하는데 필요한 제제의 양을 가리킨다. 이와 관련하여, "치료하는"은 장애의 중증도를 감소시킴을 포함한다.
- [0284] 본원에서 사용되는 용어 "예방적 유효량"은 관련 병태, 예를 들어, AIBD를 예방하는데 필요한 제제의 양을 가리킨다. 이와 관련하여, "예방하는"은, 예를 들어 제제의 투여가 시작되기 전에 장애의 존재가 감지되지 않는다면, 장애의 중증도 감소를 포함한다. 장애의 중증도를 감소시키는 것은, 예를 들면, 본원의 다른 곳에서 논의된 바와 같이, 영향을 받은 체표면의 수포의 크기 또는 수를 감소시키는 것일 수 있다.
- [0285] 감소 또는 개선은 본원에 기술된 바와 같은 투여 또는 제제의 부재하에서의 결과에 대한 것이다. 결과는 이러한 환자를 평가하는데 사용되는 표준 기준에 따라 평가된다. 이를 정량화할 수 있는 정도로, 관련 기준 (영향을 받은 체표면의 수포의 크기 또는 수)에서 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%의 감소 또는 개선이 존재한다.
- [0286] 바람직하게는, 제제의 용량은 대상체에서 가능한 많은 이용 가능한 C5, 보다 바람직하게는, 모든 이용 가능한 C5에 결합하기에 충분하다. 제제의 용량은 대안적으로 대상체에서 가능한 많은 이용 가능한 LTb4, 보다 바람직하게는, 모든 이용 가능한 LTb4에 결합하기에 충분할 수 있다. 몇몇 측면에서, 제제의 용량은 가능한 많은 이용 가능한 C5 및 LTb4, 예를 들면 모든 이용 가능한 C5 및 LTb4에 결합하기에 충분하다. 공급되는 제제의 용량은 대상체에서 모든 이용 가능한 C5 및/또는 LTb4에 결합하는데 필요한 물 용량의 적어도 1x 또는 1.5배 또는 2배일 수 있다. 공급되는 제제의 용량은, 예를 들어, 대상체에서 모든 이용 가능한 C5 및/또는 LTb4에 결합하는데 필요한 물 용량의 약 또는 적어도 1, 1.5, 2, 2.5배, 3배 또는 4배일 수 있다.
- [0287] 바람직하게는, 용량은 0.0001mg/kg (환자의 질량에 비교한 약물의 질량) 내지 20mg/kg, 0.001 mg/kg 내지 10 mg/kg, 0.01 mg/kg 내지 2 mg/kg, 0.1mg/kg 내지 1mg/kg, 0.2mg/kg 내지 0.8mg/kg, 0.3mg/kg 내지 0.6mg/kg,

0.4mg/kg 내지 0.6mg/kg (예를 들어, 약 0.57mg/kg)이다.

- [0288] 치료적 또는 예방적 유효량은 추가로 말단 보체의 억제 측면에서, 예를 들어, 말단 보체 활성화 (TCA)이 치료의 부재하에서의 말단 보체 활성화와 비교하여 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100%까지 감소됨을 의미하는 양으로 정의될 수 있다. 예를 들면 치료의 부재하에서의 말단 보체 활성화와 비교하여 10% 이하, 예를 들면 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% 이하일 수 있는 원하는 수준으로 말단 보체 활성을 유지하기 위해 용량 및 빈도를 조절할 수 있다.
- [0289] 용량이 주어지는 경우, 이는 단백질 또는 이의 기능적 등가물인 제제의 용량과 관련된다. 핵산 분자인 제제에 대한 적절한 용량을 사용하여 이러한 수준을 야기할 수 있다.
- [0290] 말단 보체 활성화는 당업계에 공지된 표준 분석에 의해, 예를 들어 Quidel CH₅₀ 용혈 분석 및 양 적혈구 용해 CH50 분석을 사용하여 측정될 수 있다.
- [0291] 용량을 투여해야 하는 빈도는 관련된 제제의 반감기에 따라 좌우될 것이다. 코버신 단백질 또는 이의 기능적 등가물은, 예를 들어 매일 2회, 매일 또는 2일마다, 3일마다, 4일마다, 5일마다, 6일마다, 7일마다, 10일마다, 15일마다 또는 20일마다 또는 그 이상으로 투여될 수 있다.
- [0292] 단일 또는 다중 용량이 투여될 수 있다. 예를 들면 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8회 용량이 투여될 수 있다. 단일 용량이 하나의 실시형태이다. 정확한 투여량 및 투여 빈도는 또한 투여 시간에서의 환자의 상태에 따라 좌우될 수 있다. 투여량을 결정할 때 고려할 수 있는 인자는 치료 또는 예방의 필요성, 환자의 질병 상태의 중증도, 환자의 일반적인 건강, 연령, 체중, 성별, 식이, 투여 시간 및 빈도, 약물 조합, 반응 민감도 및 치료에 대한 환자의 내성 또는 반응을 포함한다. 정확한 양은 일상적인 실험에 의해 결정될 수 있지만, 궁극적으로 임상주의 판단에 달려 있다.
- [0293] 투여량 섭생은 또한 초기 "부하 용량"에 이어 하나 이상의 후속 "유지 용량"의 형태를 취할 수 있다. 일반적으로, 부하 용량은 유지 용량보다 클 것이다. 부하 용량은 유지 용량보다 2, 5, 10배 이상 클 수 있다. 부하 용량은 단일 용량으로, 또는 특정 시간 프레임에서 하나 이상의 용량으로 투여될 수 있다. 전형적으로, 부하 용량은 단일 24시간 내에 투여되는 1, 2, 3, 4 또는 5회 용량일 것이다. 유지 용량은 규칙적인 간격으로 반복되는 보다 적은 용량일 수 있다. 유지 용량은 3, 4, 6, 8, 12, 24 또는 48시간마다와 같은 간격으로 반복될 수 있다. 정확한 섭생은 일상적인 실험에 의해 결정될 수 있지만, 궁극적으로 임상주의 판단에 달려 있다. 유지 용량은 초기 부하 용량의 적어도 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100%, 또는 초기 부하 용량의 최대 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100%일 수 있다.
- [0294] 추가의 실시양태에서 치료 과정 내내 (예를 들어 매일 또는 매일 2회) 동일 용량이 사용된다.
- [0295] 부하 용량은 0.0001mg/kg (환자의 질량에 비교한 약물의 질량) 내지 20mg/kg일 수 있고, 유지 용량은 0.0001 mg/kg 내지 20mg/kg일 수 있으며; 대안적으로 부하 용량은 0.001 mg/kg 내지 10 mg/kg이고 유지 용량은 0.001 mg/kg 내지 10 mg/kg이며, 대안적으로 부하 용량은 0.01 mg/kg 내지 2 mg/kg이고 유지 용량은 0.01mg/kg 내지 2mg/kg이며; 대안적으로 부하 용량은 0.1mg/kg 내지 1mg/kg이고 유지 용량은 0.1mg/kg 내지 1mg/kg이며; 대안적으로 부하 용량은 0.1mg/kg 내지 1mg/kg이고 유지 용량은 0.05mg/kg 내지 0.5mg/kg이며; 대안적으로 부하 용량은 0.2mg/kg 내지 0.8mg/kg이고 유지 용량은 0.1mg/kg 내지 0.4mg/kg이며; 대안적으로 부하 용량은 0.3mg/kg 내지 0.7mg/kg이고 유지 용량은 0.1mg/kg 내지 0.3mg/kg이며; 대안적으로 부하 용량은 0.4mg/kg 내지 0.6mg/kg 이고 유지 용량은 0.1mg/kg 내지 0.2mg/kg이며, 예를 들면 부하 용량은 0.57mg/kg이고 유지 용량은 0.14mg/kg 이다. 예를 들면 0.6mg/kg-1.8mg/kg의 부하 용량에 이어 0.2mg/kg-0.6mg/kg (예를 들면 0.3mg/kg)의 유지 용량이 뒤따른다.
- [0296] 부하 용량은 0.0001mg/kg (환자의 질량에 비교한 약물의 질량) 내지 20mg/kg일 수 있고, 유지 용량은 0.0001 mg/kg 내지 20mg/kg일 수 있으며; 대안적으로 유지 용량은 0.001 mg/kg 내지 10 mg/kg일 수 있고, 대안적으로 유지 용량은 0.01mg/kg 내지 2mg/kg일 수 있으며; 대안적으로 유지 용량은 0.1mg/kg 내지 1mg/kg일 수 있고; 대안적으로 유지 용량은 0.1mg/kg 내지 0.8mg/kg일 수 있으며; 대안적으로 유지 용량은 0.1mg/kg 내지 0.6mg/kg일 수 있고; 대안적으로 유지 용량은 0.1mg/kg 내지 0.4mg/kg일 수 있으며; 대안적으로 유지 용량은 0.1mg/kg 내지 0.2mg/kg일 수 있다.
- [0297] 부하 용량은 0.0001mg/kg (환자의 질량에 비교한 약물의 질량) 내지 20mg/kg일 수 있고, 유지 용량은 0.0001 mg/kg 내지 20mg/kg일 수 있으며; 대안적으로 부하 용량은 0.001 mg/kg 내지 10 mg/kg일 수 있고, 대안적으로

부하 용량은 0.01 mg/kg 내지 2 mg/kg일 수 있으며; 대안적으로 부하 용량은 0.1mg/kg 내지 1mg/kg일 수 있고; 대안적으로 부하 용량은 0.1mg/kg 내지 1mg/kg일 수 있으며; 대안적으로 부하 용량은 0.2mg/kg 내지 0.8mg/kg일 수 있고; 대안적으로 부하 용량은 0.3mg/kg 내지 0.6mg/kg일 수 있으며; 대안적으로 부하 용량은 0.4mg/kg 내지 0.6mg/kg, 또는 0.6mg/kg-1.8mg/kg일 수 있다.

- [0298] 제제는 일반적으로 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 투여될 것이다. 용어 "약제학적으로 허용되는 담체"는, 본원에서 사용되는 바와 같이, 유전자, 폴리펩타이드, 항체, 리포솜, 다당류, 폴리락트산, 폴리글리콜산 및 불활성 바이러스 입자 또는, 담체가 자체적으로 독성 효과를 유발하지 않거나 약제학적 조성물을 제공받는 개인에게 유해한 항체의 생산을 야기하지 않는 한, 실제로 임의의 다른 제제를 포함한다. 약제학적으로 허용되는 담체는 물, 염수, 글리콜, 에탄올과 같은 액체 또는 습윤제 또는 유화제, pH 완충 물질 등과 같은 보조 물질을 추가로 함유할 수 있다. 따라서, 사용되는 약제학적 담체는 투여 경로에 따라 다를 것이다. 담체는 약제학적 조성물을 정제, 환제, 당의정, 캡슐, 액체, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁액으로 제형화하여 환자의 섭취를 보조할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체의 철저한 논의는 [42]에서 이용 가능하다. 바람직한 실시양태에서 제제는 물 또는 PBS에서 투여된다.
- [0299] 제제는 임의의 공지된 투여 경로에 의해 전달될 수 있다. 제제는 국소 또는 전신으로 전달될 수 있다. 제제는 비경구 경로로 (예를 들어 피하, 복강내, 정맥내 또는 근육내 주사에 의해 또는 조직의 간질 공간으로 전달) 전달될 수 있다. 조성물은 또한 병변에 투여될 수 있다. 다른 투여 방식은 경구 및 폐 투여, 좌제, 및 경피 또는 피부경유 도포, 바늘, 및 하이포스프레이를 포함한다. 국소(local) 투여는, 예를 들어 영향을 받은 영역에서 국소(topical) 투여, 예를 들어 피부에의 적용을 포함한다. 이것은 경증 AIBD, 예를 들어 경증 BP에서 특히 사용될 수 있다.
- [0300] 바람직하게는 제제는 피하 주사를 통해 전달된다. 일부 실시양태에서 이것은 1일 1회 또는 2회 피하 주사를 통해 이루어지며, 예를 들어 0.0001mg/kg (환자 질량에 비교한 약물의 질량) 내지 20mg/kg의 초기 부하 용량에 이어 0.0001mg/kg 내지 20mg/kg의 1일 1회 유지 용량, 또는 본원의 다른 곳에 개시된 다른 용량이 뒤따른다. 대안적으로 제제는 피하 주사를 통해 격일로 전달될 수 있다.
- [0301] 바람직한 실시양태에서 제제는 0.6mg/kg-1.8mg/kg (예를 들면 0.57mg/kg)의 초기 부하 용량에 이어 0.2mg/kg-0.6mg/kg (예를 들면 0.3mg/kg)의 1일 1회 유지 용량으로 1일 1회 피하 주사를 통해, 또는 0.6mg/kg-3.6mg/kg (예를 들면 1.0 mg/kg)의 초기 부하 용량에 이어 0.2mg/kg-1.2mg/kg (예를 들면 0.6mg/kg)의 1일 1회 유지 용량으로 1일 1회 피하 주사를 통해 전달된다.
- [0302] 바람직하게는 치료 과정은 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6주 동안 지속된다.
- [0303] 치료 과정은 바람직하게는 환자의 증상이 감소될 때까지 지속된다. 따라서, 치료 과정은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40주 동안의 제제의 (예를 들어, 매일) 투여일 수 있다.
- [0304] 유지 용량 (예를 들어 단독 매일 유지 용량)은 치료 과정 전반에 걸쳐 일정하게 유지될 수 있거나 유지 용량 (예를 들어 매일 유지 용량)은 치료 과정 동안 변경 (예를 들어 증가 또는 감소)될 수 있다. 유지 용량은 말단 보체 활성을 원하는 수준으로, 예를 들어, 치료의 부재하에서의 상기 환자로부터의 혈청과 비교하여 또는 정상 대조군 혈청과 비교하여 10% 이하로 유지하기 위해 변경될 수 있다. 당해 또는 각각의 유지 용량은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10주 동안, 예를 들어 매일 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10주 동안 지속될 수 있다. 유지 용량은 대상체의 증상이 개선됨에 따라 감소될 수 있다. 대상체의 증상이 개선됨에 따라 제제의 양 또는 제제가 투여되는 빈도가 감소될 수 있다.
- [0305] 따라서, 초기 부하 용량에 이어 상기 정의된 바와 같은 유지 용량일 수 있는 초기 유지 용량 (예를 들어, 매일 초기 유지 용량), 및 하나 이상의 추가 유지 용량 (예를 들어, 매일 추가 유지 용량), 예를 들어, 적어도 2, 3, 4, 5회 추가 유지 용량이 있을 수 있다.
- [0306] 따라서, 본 발명은 대상체에게 상기 정의된 바와 같은 제제의 초기 부하 용량을 투여한 다음, 상기 정의된 바와 같은 제제의 유지 용량 (예를 들어, 매일 유지 용량)을 투여함을 포함하여, 대상체에서 AIBD를 치료 또는 예방하는 방법을 추가로 포함하며, 여기서 초기 유지 용량 및 하나 이상의 추가 유지 용량이 존재한다.
- [0307] 따라서, 본 발명은 대상체에게 상기 정의된 바와 같은 제제의 초기 부하 용량을 투여한 다음, 상기 정의된 바와 같은 제제의 유지 용량 (예를 들어, 매일 유지 용량)을 투여함을 포함하여 대상체에서 AIBD를 치료 또는 예방하는 방법에서 사용하기 위한 상기 정의된 바와 같은 제제를 추가로 포함하며, 여기서 초기 유지 용량 및 하나 이

상의 추가 유지 용량이 존재한다.

- [0308] 하나 이상의 추가 유지 용량은 대상체에서 (예를 들어 대상체로부터의 생물학적 샘플에서) 말단 보체 활성을 시험하고, 말단 보체 활성의 수준에 기초하여 추가 유지 용량을 결정함으로써 및/또는 대상체의 증상을 시험하고 증상에 기초하여 추가 유지 용량을 결정함으로써 결정될 수 있다. 상기 방법은 임의로 상기 추가 유지 용량을 투여함을 추가로 포함할 수 있다. 상기 추가 용량은 말단 보체 활성을 원하는 수준으로 유지하는 수준으로 계산될 수 있다.
- [0309] 생물학적 샘플을 채취하는 경우, 이것은 혈액, 예를 들어, 전혈 또는 혈청 샘플일 수 있다. 상기 방법은 임의로 샘플을 채취하는 단계를 추가로 포함하고, 추가로 임의로 샘플의 TCA를 결정하는 단계를 포함한다.
- [0310] 하나 이상의 추가 유지 용량은 대상체에서 (예를 들어 생물학적 샘플에서) 말단 보체 활성을 시험하고, 말단 보체 활성의 수준에 기초하여 추가 유지 용량을 결정함으로써 및/또는 대상체의 증상을 시험하고 증상에 기초하여 추가 유지 용량을 결정함으로써 결정될 수 있다. 상기 방법은 임의로 상기 추가 유지 용량을 투여함을 추가로 포함할 수 있다. 상기 추가 용량은 말단 보체 활성을 원하는 수준으로 유지하는 수준으로 계산될 수 있다.
- [0311] 특정 측면에서, 원하는 보체 활성 수준은 치료의 부재하에서의 상기 대상체로부터의 혈청과 비교하여 또는 정상 대조군 혈청과 비교하여 10% 이하이다.
- [0312] 특정 측면에서, TCA가 원하는 수준보다 높으면 유지 용량이 증가하고, 임의로 TCA가 5, 4, 3, 2, 1% 미만인 경우 용량은 유지되거나 감소된다.
- [0313] 특정 측면에서, 증상이 악화되면 유지 용량이 증가하고, 임의로 증상이 개선되면 용량이 유지되거나 감소된다.
- [0314] 일부 실시양태에서 대상체는 치료를 시작한지 1달 이내에, 치료를 시작한지 2주 이내에, 치료를 시작한지 1주 이내에 시험된다. 또 다른 실시양태에서 대상체는 하루에 한 번 또는 적어도 하루에 한 번, 1주일에 한 번, 또는 적어도 일주일에 한 번, 매 2주에 한 번 또는 적어도 매 2주에 한 번, 한 달에 한 번 또는 매 두 달에 한 번 시험된다.
- [0315] 바람직하게는 부하 용량은 1.2mg/kg 또는 약 1.2mg/kg 단백질 또는 기능적 등가물이고 유지 용량은 적어도 0.6mg/kg (예를 들어 적어도 0.7mg/kg, 0.8-1.5, 0.9-1.2 또는 1.0-1.25mg/kg)이거나 최대 0.3mg/kg (예를 들어 최대 0.2mg/kg, 0.15-0.4, 0.2-0.3mg/kg)이고 임의로 (i) 유지 용량은 적어도 2, 3, 4, 5, 6주 동안 지속되고/되거나 (ii) 치료는 적어도 6주 동안 지속되고/되거나 (iii) 치료는 적어도 3, 4, 5, 6주 동안 매일 지속된다.
- [0316] 바람직하게는 부하 용량은 0.6-1.8 mg/kg 단백질 또는 기능적 등가물이고 유지 용량은 0.2-0.6 mg/kg, 예를 들어 약 0.3mg/kg이고, (i) 유지 용량은 적어도 2, 3, 4, 5, 6주 동안 지속되고/되거나 (ii) 치료는 적어도 6주 동안 지속되고/되거나 (iii) 치료는 적어도 3, 4, 5, 6주 동안 매일 지속된다.
- [0317] 투여량 섭생은 또한 치료되는 대상체의 체중에 의존하지 않는 고정 용량의 형태를 취할 수 있다. 고정 용량은 단일 용량으로, 또는 특정 시간 프레임에서 하나 이상의 용량으로 투여될 수 있다. 고정 용량은 전형적인 인간 환자 (예를 들어, 체중 50kg 내지 100kg 사이의 환자)에 대해 1mg-100mg의 코버신 (서열 번호 4)일 수 있다. 코버신-타입 단백질 및 변형된 코버신 폴리펩타이드의 분자량을 사용하여 기능적 등가물 체제의 등가물 고정 용량을 계산할 수 있다. 일부 실시양태에서, 고정 용량은 1mg-80mg, 1mg-50mg, 5mg-80mg, 5mg-50mg, 10mg-60mg, 10mg-50mg, 20mg-50mg, 20mg-40mg 또는 25mg-35mg이다. 바람직하게는 고정 용량은 30mg의 코버신 (서열 번호 4) 또는 물 당량의 코버신-타입 단백질 또는 변형된 코버신 폴리펩타이드이다. 전형적으로, 고정 용량은 단일 24시간 내에 투여되는 1, 2, 3, 4 또는 5회 용량일 것이다. 고정 용량은 3, 4, 6, 8, 12, 24 또는 48시간마다와 같은 간격으로 반복될 수 있다. 정확한 섭생은 일상적인 실험에 의해 결정될 수 있지만, 궁극적으로 임상학의 판단에 달려 있다.

도면의 간단한 설명

[0318] **도 1:** 보체 활성화의 고전 경로 및 대체 경로의 개략도. 효소 성분, 진회색. 아나필라톡신은 스타버스트에 둘러싸임.

도 2a: 코버신의 제1 서열. 신호 서열은 밑줄이 그어져 있음. 시스테인 잔기는 볼드체 타입임. 오른쪽에는 뉴클레오티드 및 아미노산 번호가 나타내어져 있음.

도 2b: 코버신 변이체의 예

도 3: 비히클 대 예방적 코버신으로 처리된 마우스에서의 실험적 EBA의 임상 점수는 비히클 대조군 및 메틸프레드니솔론 그룹과 비교하여 모든 용량의 코버신으로 처리된 마우스에서 개선된 질환을 입증한다, 실험 1.

도 4: 비히클 대 예방적 코버신으로 처리된 마우스에서의 실험적 EBA의 임상 점수는 비히클 대조군 및 메틸프레드니솔론 그룹과 비교하여 모든 용량의 코버신으로 처리된 마우스에서 개선된 질환을 입증한다, 실험 2. 첫 번째 실험과 비교하여, 코버신 만이 2.5mg/kg 용량에서 비히클 대조군에 비해 유의적인 효과를 가졌다. 특히, 이 실험에서, 대조군의 몇몇 마우스는 유의한 수준의 질병을 발병하지 않았으며, 이것이 첫 번째 실험과 비교하여 이러한 차이의 원인일 것 같다.

도 5: 비히클 대 예방적 코버신으로 처리된 마우스에서의 실험적 EBA의 임상 점수는 비히클 대조군 및 메틸프레드니솔론 그룹과 비교하여 모든 용량의 코버신으로 처리된 마우스에서 개선된 질환을 입증한다, 실험 1과 2의 조합된 결과, 이원 ANOVA 분석은 250 및 2500 µg/ml의 용량에서 비히클 대조군과 코버신 간의 통계학적으로 유의한 차이를 나타낸다.

도 6a: 비히클 대 예방적 코버신 및 예방적 PAS-L-코버신으로 처리된 마우스에서의 실험적 EBA의 임상 점수는 2.5mg/kg 코버신으로 처리된 마우스에서 개선된 질환을 입증한다 (실시예 4, 실험 1).

도 6b: 비히클 대 예방적 코버신 및 예방적 PAS-L-코버신으로 처리된 마우스에서의 실험적 EBA의 임상 점수는 2.5mg/kg 코버신으로 처리된 마우스에서 개선된 질환을 입증한다 (실시예 4, 실험 2). 여기서 10mg/kg 용량의 PAS-L-코버신과 2.5mg/kg 코버신 둘 다는 ABSA에 대해 통계적으로 유의한 효과를 보여준다.

도 6c: 비히클 대 예방적 코버신 및 예방적 PAS-L-코버신으로 처리된 마우스에서의 실험적 EBA의 임상 점수. 이것은 실시예 4, 실험 1 및 2의 조합된 결과를 보여준다.

도 7: 수동 EBA 마우스 모델에서 유천포창 질환-유사 피부 염증의 과정에 대한 치료적으로 투여된 코버신의 효과 (실시예 2, 실험 1). 코버신 용량-의존적으로 개선된 피부 염증. 데이터는 평균 +/- SEM으로 나타내어진다; 그룹당 N = 5마리 마우스; 통계적 유의성에 대한 이원 ANOVA 검정은 사용된 모든 용량에서 비히클 대조군과 코버신 간의 유의적인 차이를 확인시켜 준다. 실험은 암컷에서만 수행하였다.

도 8: 수동 EBA 마우스 모델에서 유천포창 질환-유사 피부 염증의 과정에 대한 치료적으로 투여된 코버신의 효과 (실시예 2, 실험 2). 코버신 용량-의존적으로 개선된 피부 염증. 데이터는 평균 +/- SEM으로 나타내어진다; 그룹당 N = 5마리 마우스; 통계적 유의성에 대한 이원 ANOVA 검정은 사용된 모든 용량에서 비히클 대조군과 코버신 간의 유의적인 차이를 확인시켜 준다. 실험은 수컷에서만 수행하였다.

도 9a는 수포성 유천포창 환자의 수포액에서의 C5a 수준을 보여준다.

도 9b는 수포성 유천포창 환자의 수포액에서의 LTB4 수준을 보여준다.

도 10는 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 특성의 변형된 코버신 폴리펩타이드의 서열을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0319] 실시예

[0320] 실시예 1- 코버신이 예방적으로 투여된 EBA 전달 모델에서의 코버신의 효과

[0321] 항체 전달 EBA는 시타루 등(Sitaru et al., 2005) [43]에 의해 기술된 프로토콜의 수정된 버전을 사용하여 유도하였다. 각 처리 그룹에서 5마리 마우스를 시험하였다. 간략하게, 마우스에게 0, 2 및 4일에 50 µg 친화도-정제된 항-Co17 IgG를 피하 주사하였다. 항-Co17 IgG의 첫 번째 주사 4일 전에 시작하여 세 가지 다양한 용량의 코버신을 마우스에게 매일 2회 피하 주사하였다 (-2일). 이러한 적용은 실험 11일째 마지막 날까지 실험 전체에 걸쳐 계속되었다. 대조군에서, 마우스는 비히클만을 피하로, 또는 20mg/kg 메틸프레드니솔론을 매일 1회 제공받았다.

[0322] 무린 타입 VII 콜라겐 ("항-COL7")에 대해 지시된 항체를 생성하기 위해, 뉴질랜드 백색 토끼를 불완전 프로인트 아주반트와 함께 콜라겐 VII의 비-콜라겐성 1 (NC1) 도메인으로부터 유래된 세 개의 상이한 재조합 단백질 ("Co17A, B 및 C")을 함유하는 200 µg의 단백질 혼합물로 면역화시켰다. 단백질 G를 사용하여 면역화된 토끼의 혈청으로부터 IgG를 단리하고, 그 후 IgG를 his-Co17로 친화도-정제하여 토끼 항-Co17 IgG를 특이적으로 수득

하였다. 크리오섹션 분석에서 역가 및 효능을 결정함으로써 항체의 품질을 확인하였다.

[0323] 4일째에 시작하여, 피부 병변의 정도를 격일로 각각의 개별 마우스에서 스코어링하였다. 흉반, 수포, 짓무름, 피각질 또는 탈모를 나타내는 피부 부위를 훈련 된 관찰자에 의해 "영향을 받은(affected)" 또는 "영향을 받지 않은(unaffected)"으로 분류하였다 [43]. 피부 병변에 의해 영향을 받은 전체 체표면 (ABSA)의 퍼센트를 계산하였다.

[0324] 두 가지 독립적인 실험을 수행하였다.

[0325] 첫 번째 실험의 결과가 도 4에 나타내어져 있다. 25 µg/kg의 코버신으로 처리된 마우스에서의 ABSA의 퍼센트가 감소되었고, 코버신 2500 µg/kg 및 코버신 250 µg/kg에서 코버신으로의 처리가 더욱 감소된 것을 알 수 있다. 비히클과 0.25mg/kg 용량 간에 63% 차이가 있었다. 양측 t-검정에 의한 이러한 차이의 P 값은 0.0023이다. 10일째 비히클 및 0.25mg/kg 용량에 대한 평균 ABSA 점수는 6.23±1.1 및 2.65±0.4이었다. 평균 뒤의 값은 SD이다.

[0326] 코버신은 ABSA의 퍼센트를 이전에 시험된 분자보다 더 크게 감소시켰다. 예를 들면, 이전의 유사한 실험에서 5-리폭시게나제 억제 (5-L0) 경구 억제제 (아라키돈산 캐스케이드의 중요한 효소이고 생활성 류코트리엔 (LT)의 형성에 관여함)인 N-[1-(1-벤조티엔-2-일)에틸]-N-하이드록시우레아 (질류톤)를 예방적 투여 계획으로 C57B1/6J 8주령 암컷 마우스에게 투여하였다. 이러한 초기 실험에서, 마우스를 두 그룹으로 분배하고 0.6-0.8 mg/마우스/일 질류톤 또는 식수에 보충된 비히클 대조물을 제공하였다. 실험적 EBA를 유도하고 평가하였다 [44]. %ABSA는 감소되었으며, "실험의 7일째부터 시작하여 종점까지, 질류톤으로 처리된 마우스는 대조군과 비교하여 유의적으로 감소된 질환 중증도를 나타내었다"라고 결론지었다 (임상 점수 7일째; 대조군: \bar{X} = 9.2±0.7; 질류톤 처리군: \bar{X} = 5.9±0.5%의 영향을 받은 체표면적)".

[0327] EBA의 항체 전달 모델에서 20mg/kg/일의 메틸프레드니솔론을 투여하는 유사한 초기 실험에서, 체표면적의 7.5±0.1%가 실험 종료시 대조군 마우스에서 피부 병변에 의해 영향을 받았지만, 이 질환 중증도는 메틸프레드니솔론 처리된 마우스에서 4.7±0.4%로 유의적으로 감소되었다 [45].

[0328] **실시에 2 EBA 전달 모델에서의 코버신의 효과**

[0329] 연구에는 다음의 실험 그룹이 포함되었으며, 각 실험 그룹에 5마리의 마우스가 있다:

[0330] 1. 비히클 (PBS) 대조군

[0331] 2. 125 µg/kg 코버신 매일 2x s.c.

[0332] 3. 2500 µg/kg 코버신 매일 2x s.c.

[0333] 항체 전달 EBA-유사 피부 염증은 Sezin 등에 기술된 바와 같이 유도하였다 [46]. 간략하게, C57B1/6J WT 마우스에게 0, 2 및 4일에 50 µg 친화도-정제된 항-Col7 IgG를 피하 (s.c.) 주사하였다.

[0334] 코버신으로의 마우스의 처리는 실험 5일째에 시작하였다 (0일 = 항-COL7 항체의 첫 투여일). 그후, 마우스에게 실험이 끝날 때까지 코버신 또는 비히클 대조물로 견갑골 부위에 12시간마다 s.c로 주사하였다.

[0335] 질환 중증도를 점수매겼다. 질환 중증도를 점수매기기 위해, 흉반, 수포, 짓무름, 피각질 또는 탈모를 나타내는 피부 부위는 치료에 대해 알지 못하는 한 명의 훈련된 검사관에 의해 "영향을 받은" 것으로 분류되었다. 피부 병변에 의해 영향을 받은 절대 체표면 (ABSA)의 퍼센트를 계산하였다. 질환을 점수매기기 위해, 마우스는 실험의 4일째에 시작하여 i.p. 투여된 케타민/자일라진의 혼합물로 격일로 마취시켰다.

[0336] 두 가지 독립적인 실험을 이 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0337] 시험 항목 준비

[0338] 18 mg의 코버신을 0.6 ml의 멸균수로 재구성하여 30 mg/ml의 농도를 달성하고, 분취하여, 최종 희석시까지 -20 °C에서 저장하였다.

[0339] 실험을 시작하기 전에 마우스의 평균 중량을 계산하고, 2.5 mg/kg 및 0.125 mg/kg의 약물을 PBS pH 7.2에서 최종 용적 100 µl로 되도록 신선하게 제조하였다. 약물은 마우스에게 최종 주사하기 30분 전에 매일 2회 신선하게 제조하였다. 그후, 마우스의 평균 중량을 기준으로 하여 약물을 PBS pH 7.2로 최종 용적 100 µl에서 필요한 mg/kg 용량을 제공하기에 적절한 농도로 조정하였다. 약물은 동물에 최종 적용하기 30분 전에 매일 2회 신

선하게 제조하였다. 비히클 대조군으로서 100 μ l의 PBS pH 7.2를 마우스에서 s.c 주사하였다.

- [0340] 통계 분석
- [0341] 처리군 사이의 ABSA는 GraphPad Prism 7을 사용하여 수행된 이원 ANOVA에 의해 평가하였다.
- [0342] 결과
- [0343] 임상 증상 및 치료 효능
- [0344] 실험 1에서, 코버신은 영향을 받은 절대 체표면적 (ABSA)에 의해 측정된 피부 염증을 용량-의존적으로 개선시켰다. 2.5 mg/kg 코버신이 ABSA를 감소시키는데 효과적이었다 (도 6). 음성 대조 (비히클) 그룹에서의 ABSA는 실험 1에서 약 7%이었으며, 이것은 이 모델에서 달성되는 전형적인 값이다. 음성 대조군의 모든 마우스는 유사한 염증 반응을 보였다.
- [0345] 실험 2에서, 2.5 mg/kg 코버신은 (ABSA)에 의해 측정된 피부 염증을 유의적으로 ($P < 0.01$) 개선시켰다 (도 7). 이 실험에서, 음성 대조 (비히클) 그룹에서의 ABSA는 약 4%의 평균에서 정점에 도달하였으며, 이것은 이 모델에서 주로 달성되는 값보다 약간 낮다.
- [0346] 두 실험에서 마우스를 치료하는 동안 사망은 없었다. Co17 IgG 수동 전달의 개시 후 12일째에 마우스를 종료시켰다.
- [0347] **실시예 3 환자의 수포액 중의 C5 및 LTB4**
- [0348] 4명의 수포성 유천포창 환자로부터의 수포액 중의 C5a 및 LTB4의 수준을 시험하였다. 4명 환자 각각의 결과도 9a (C5a) 및 9b (LTB4)에 나타내어져 있다. 급성 BP를 갖는 입원 환자 클리닉에 입원한 4명의 BP 환자의 수포로부터 주사기로 수포액을 흡인하였다. 샘플을 즉시 액체 질소에 동결시켰다. LTB4 및 C5a 수준을 R&D Systems으로부터의 ELISA 키트를 사용하여 유체에서 측정하였다.
- [0349] **실시예 4 이중 작용 및 단일 작용 코버신의 효과의 비교**
- [0350] 추가의 실험에서, PAS-L-코버신의 효과를 평가하였다. 마우스를 0.1mg/kg, 10mg/kg, 1mg/kg PAS-L-코버신, 또는 2.5mg/kg 코버신으로 처리하였으며, 실험은 상기 기술된 바와 같이 수행하였다. PAS-L-코버신은 코버신 서열의 N-말단에 융합된 PAS 서열을 가지며, 이것은 LTB4에 결합하지만 C5에는 결합하지 않도록 돌연변이되었다 ("L-코버신"이라고 함). L-코버신 서열의 서열은 하기 잔기가 변형된 성숙한 코버신 서열 (서열 번호 4)의 변이체이다: Ala44가 Asn로, Met116이 Gln로, Leu117이 Ser로, Gly121이 Ala로, Leu122가 Asp로, Glu123이 Ala로, Asp149가 Gly로, (변이체 2라고 함, 서열은 dsesdctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepNgekqdn tlpvmmftkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgntqnre vvydsqshhc hvdkvekevp dyemwQsdag ADAveveccr qkleelasgr nqmyphlkGc (서열 번호 23)이며, 여기서 서열 번호 4의 고유 코버신 서열에 대한 변화는 대문자이다). PAS-L-Cov의 보다 높은 분자량 때문에, 10mg/kg PAS-L-Cov는 2.5mg/kg 코버신에 상응한다. 첫 번째 실험(도 6a)에서 1mg/kg 또는 0.1mg/kg 용량이 아니라 10mg/kg 용량의 PAS-L-코버신이 대조군에 비해 ABSA를 감소시켰다. 두 번째 실험 (도 6b)에서, 0.1mg/kg 용량이 아니라 10mg/kg 용량 및 1mg/kg 용량의 PAS-L-코버신은 대조군에 비해 ABSA를 감소시켰다. 10mg/kg 용량의 PAS-L-코버신은 물 당량 2.5mg/kg 용량의 코버신만큼 효과적이지 않았다 (10mg/kg 용량의 PAS-L-코버신이 두 번째 실험에서 통계적으로 유의적인 효과를 보이기는 하지만). 이것은 코버신의 이중 억제 활성화 (C5 및 LTB4 억제)이 이 모델에서 개선된 치료 이익을 제공함을 시사한다.

[0351] 참고문헌

- [1] Hoover et al, 1984, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 81, 2191-2193
- [2] Harrison and Murphy, 1995, J. Biol. Chem. 270, 17273-17276
- [3] Ford-Hutchinson, 1990, Crit. Rev. Immunol. 10, 1-12
- [4] Showell et al., 1995, J. Pharm. Exp. Ther. 273, 176-184
- [5] Klaas et al, 2005 J. Exp. Med. 201, 1281-1292
- [6] Del Prete et al, 2007 Blood, 109, 626-631
- [7] Miyahara et al, 2006 Allergol Int. 55, 91-7
- [8] Taube et al, 2006 J. Immunol. 176, 3157-3164
- [9] Yamaoka et al, 1989 J. Immunol. 143, 1996-2000
- [10] Yokomizo et al, 1997 Nature 387, 620-624
- [11] Yokomizo et al, 2000 J. Exp. Med. 192, 421-432
- [12] Tager and Luster, 2003 Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 69, 123-134
- [13] Yokomizo et al., 2001, J. Biol. Chem. 276, 12454-12459
- [14] Kim, N. D. and Luster, A.D. (2007) The Scientific World Journal 7, 1307-1328.
- [15] Kim et al., 2006. J. Exp. Med. 203, 829-835
- [16] Noiri et al., 2000 Proc Nat Acad Sci USA 97, 823-828
- [17] Lundeen et al., 2006 . J. Immunol. 177, 3439-3447
- [18] Shao et al, 2006 . J. Immunol. 176, 6254-6261
- [19] Chen et al., 2006 . J. Exp. Med. 203, 837-842
- [20] Sebaldt et al., 1990 Proc Natl Acad Sci U.S.A. 8, 6974-6978
- [21] Curry et al., 2005 Journal of the American Animal Hospital Association 41 , 298- 309
- [22] Dube et al., 1998. Zileuton: the first leukotriene inhibitor for use in the management of chronic asthma. In: Drazen JM, Dahlen S, Lee TH, eds. Five-lipoxygenase Products in Asthma. New York, NY: Marcel Dekkar, Inc
- [23] Sharma and Mohammed, 2006 Immunopharmacology 14, 10-16
- [24] Venning, V. A., British Journal of Dermatology, Volume 167, Issue 6, pages 1200–1214, December 2012
- [25] WO2004/106369
- [26] Ujiie, H., et al., J Immunol. 2014 Nov 1;193(9):4415-28
- [27] Sezin T, et al, The Journal of Investigative Dermatology (2017), doi: 10.1016/j.jid.2016.12.021.
- [28] Schmidt, E. E., Dtsch Arztebl Int. 2011 Jun; 108(23): 399–405.
- [29] Bağcı IS, et al, Bullous pemphigoid, Autoimmun Rev (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2017.03.010>
- [30] Murrell et al Definitions and outcome measures for bullous pemphigoid: Recommendations by an international panel of experts. J Am Acad Dermatol. 2012 Mar;66(3):479-85
- [31] Roversi, P *et al* Journal of Biological Chemistry 2013, 288(26) 18789-18802
- [32] Guo, R.F. and P.A. Ward, Annu Rev Immunol, 2005, 23: p. 821-52
- [33] Ricklin D & Lambris J, Nature Biotechnology, 25: 1265-1275 (2007)
- [34] Nishimura, J et al., New Engl J. Med., 30;7: 632-639 (2014)
- [35] Breustedt D.A., Schönfeld D.L., Skerra A. (2006) Comparative ligand-binding analysis of ten human lipocalins. Biochim Biophys Acta 1764(2):161-173.

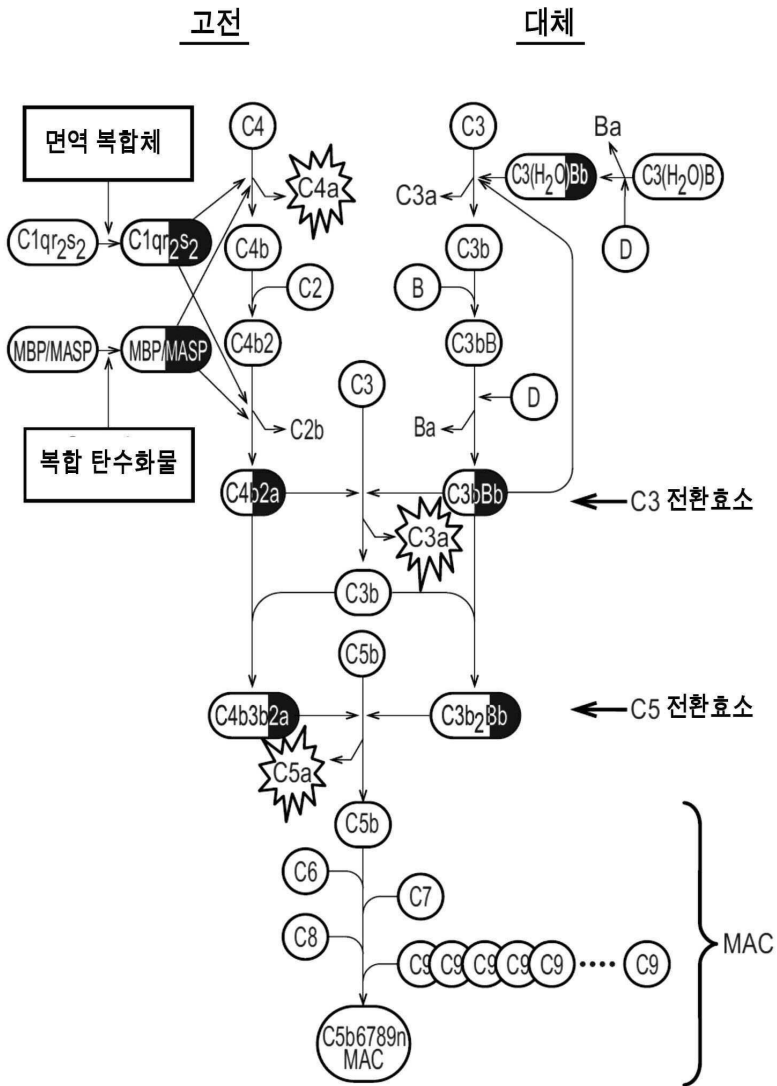
[0352]

- [36] Terpe K, Appl Microbiol Biotechnol, 60: 523-33, 2003
- [37] Schlapschy M, *et al* Protein Eng Des Sel. 2013 Aug;26(8):489-501
- [38] Kuhn et al Bioconjugate Chem., 2016, 27 (10), pp 2359–2371
- [39] Sambrook *et al* (2000)
- [40] Fernandez & Hoeffler (1998)
- [41] Ausubel *et al.* (1991)
- [42] Remington's Pharmaceutical Sciences; Mack Pub. Co., N.J. 1991
- [43] Sitaru, C., et al. J Clin Invest 2005;115:870-8.
- [44] Sezin, T PhD thesis, Lubeck University 2016 <http://www.zhb.uni-luebeck.de/epubs/ediss1702.pdf>
- [45] Hellberg, L., *et al* Journal of Investigative Dermatology (2013) 133, 2390–2399.
- [46] Sezin T, Krajewski M, Wutkowski A, Mousavi S, Chakievska L, Bieber K, et al. The Leukotriene B4 and Its Receptor BLT1 Act as Critical Drivers of Neutrophil Recruitment in Murine Bullous Pemphigoid-Like Epidermolysis Bullosa Acquisita. J Invest Dermatol. 2017, 137(5):1104-13.

[0353]

도면

도면1



도면2a

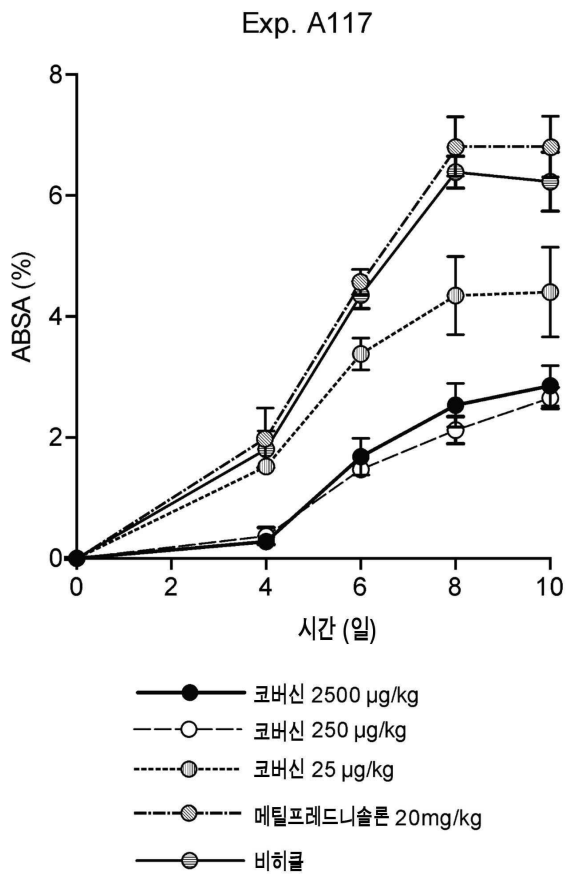
```

ATGCTGGTTTTGGTGACCTGATTTTCTCCTTTTCTGCGAACATCGCATATGCTGACAGC 60
M L V L V T L I F S F S A N I A Y A D S 20
GAAAGCGACTGCACTGGAAGCGAACCTGTTGACGCCTTCCAAGCTTTCAGTGAGGGCAA 120
E S D C T G S E P V D A F Q A F S E G K 40
GAGGCATATGTCCTGGTGAGGTCCACGGATCCCAAAGCGAGGGACTGCTTGAAAGGAGAA 180
E A Y V L V R S T D P K A R D C L K G E 60
CCAGCCGGAGAAAAGCAGGACAACACGTTGCCGGTGATGATGACGTTTAAGAATGGCACA 240
P A G E K Q D N T L P V M M T F K N G T 80
GACTGGGCTTCAACCGATTGGACGTTTACTTTGGACGGCGCAAAGGTAACGGCAACCTT 300
D W A S T D W T F T L D G A K V T A T L 100
GGTAACCTAACCCAAAATAGGGAAGTGGTCTACGACTCGCAAAGTCATCACTGCCACGTT 360
G N L T Q N R E V V Y D S Q S H H C H V 120
GACAAGGTCGAGAAGGAAGTTCAGATTATGAGATGTGGATGCTCGATGCGGGAGGGCTT 420
D K V E K E V P D Y E M W M L D A G G L 140
GAAGTGAAGTCGAGTGCTGCCGTCAAAGCTTGAAGAGTTGGCGTCTGGCAGGAACCAA 480
E V E V E C C R Q K L E E L A S G R N Q 160
ATGTATCCCCATCTCAAGGACTGCTAG 507
M Y P H L K D C * 168
    
```

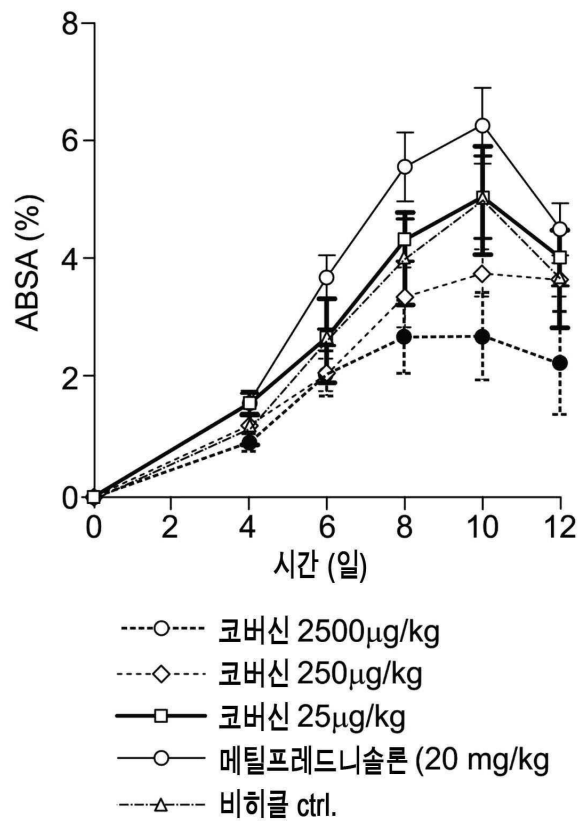
도면2b

서열 번호 :4 (150 아미노산)	dsesdctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepagekqdn tlpvmmmfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgnltqnre vvydsqshhc hvdkvekevp dyemwmldag gleveveccr qkleelasgr nqmyphlkdc
서열 번호 :6 (149 아미노산)	sesdctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepagekqdn tlpvmmmfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgnltqnre vvydsqshhc hvdkvekevp dyemwmldag gleveveccr qkleelasgr nqmyphlkdc
서열 번호 :8 (148아미노산)	esdctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepagekqdn tlpvmmmfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgnltqnre vvydsqshhc hvdkvekevp dyemwmldag gleveveccr qkleelasgr nqmyphlkdc
서열 번호 :10 (147 아미노산)	sdctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepagekqdn tlpvmmmfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgnltqnre vvydsqshhc hvdkvekevp dyemwmldag gleveveccr qkleelasgr nqmyphlkdc
서열 번호 :12 (146 아미노산)	dctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepagekqdn tlpvmmmfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgnltqnre vvydsqshhc hvdkvekevp dyemwmldag gleveveccr qkleelasgr nqmyphlkdc
서열 번호 :14 (145 아미노산)	ctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepagekqdn tlpvmmmfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgnltqnre vvydsqshhc hvdkvekevp dyemwmldag gleveveccr qkleelasgr nqmyphlkdc

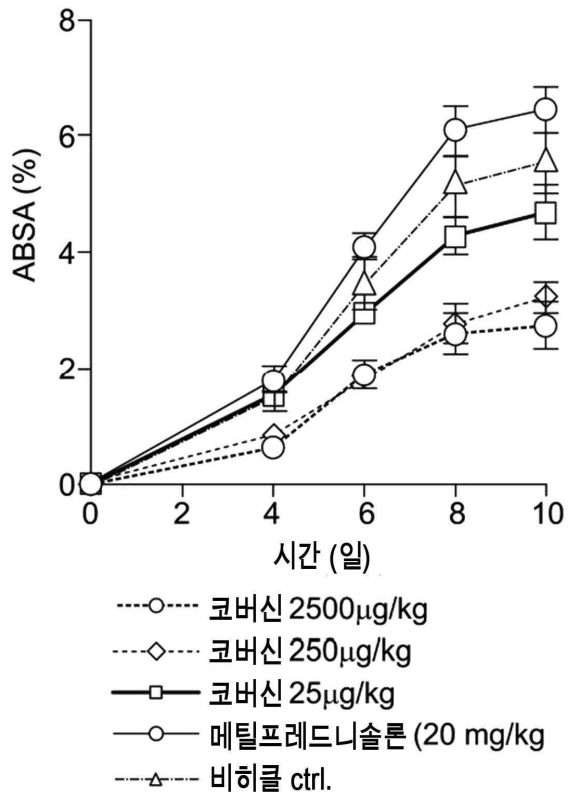
도면3



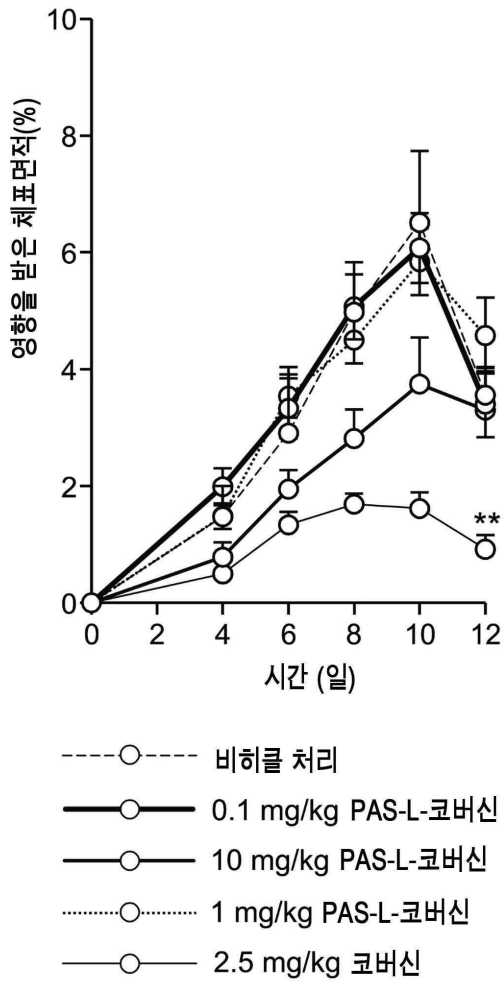
도면4



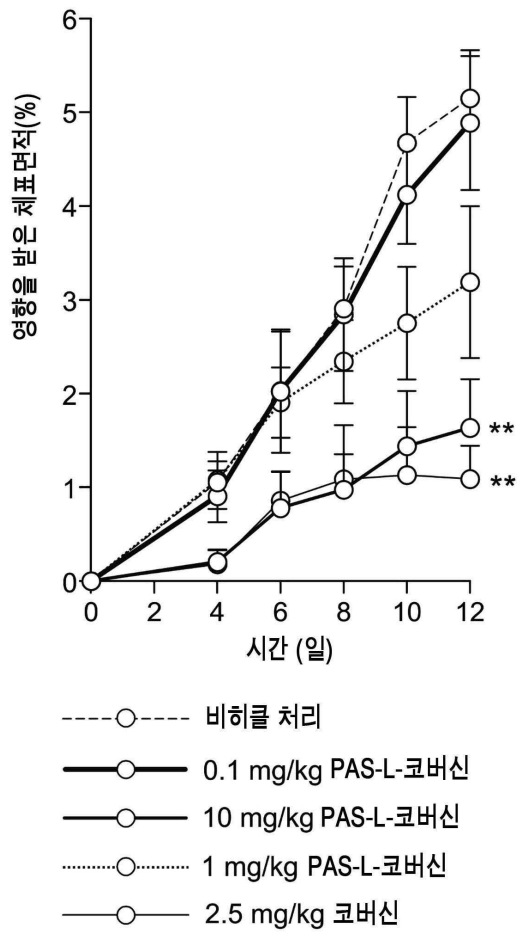
도면5



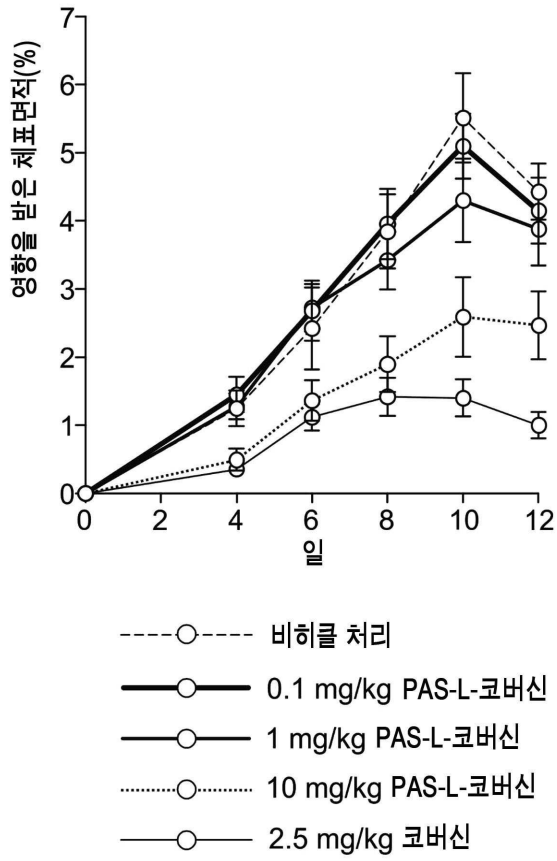
도면6a



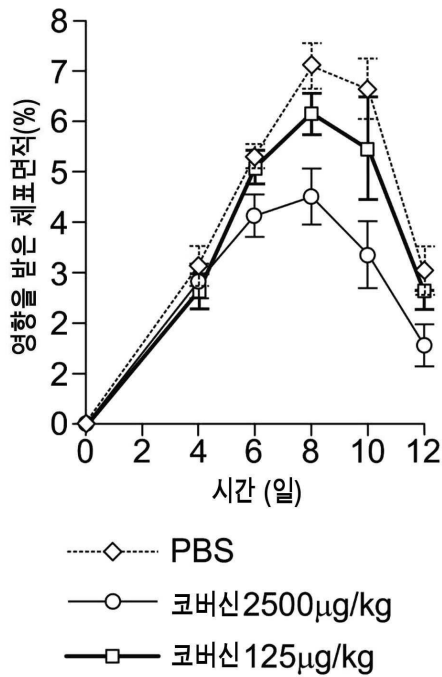
도면6b



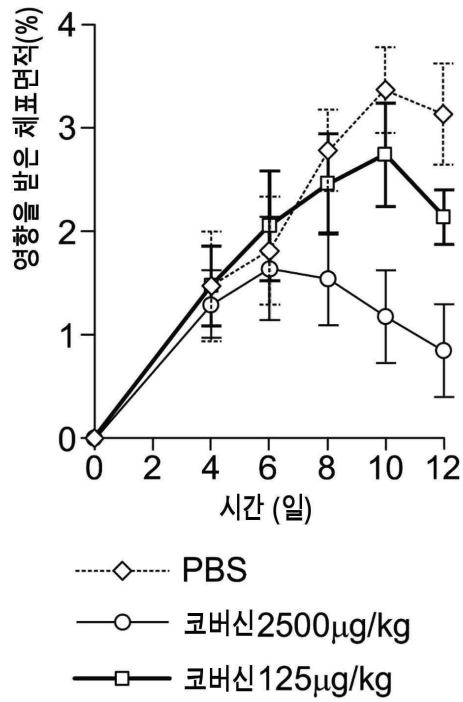
도면6c



도면7

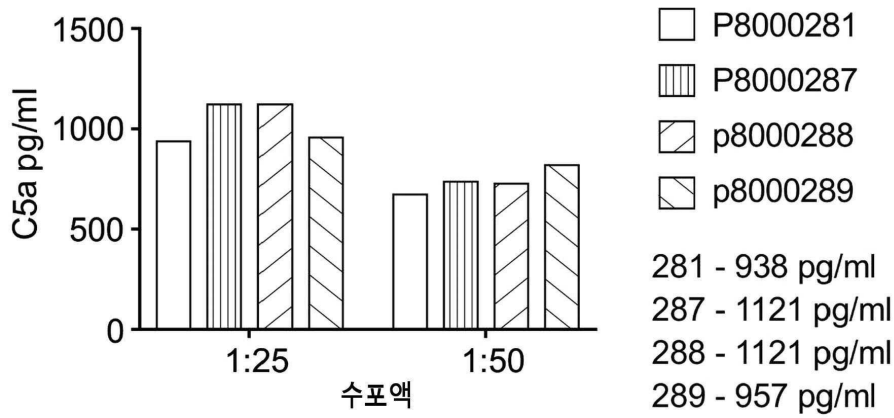


도면8

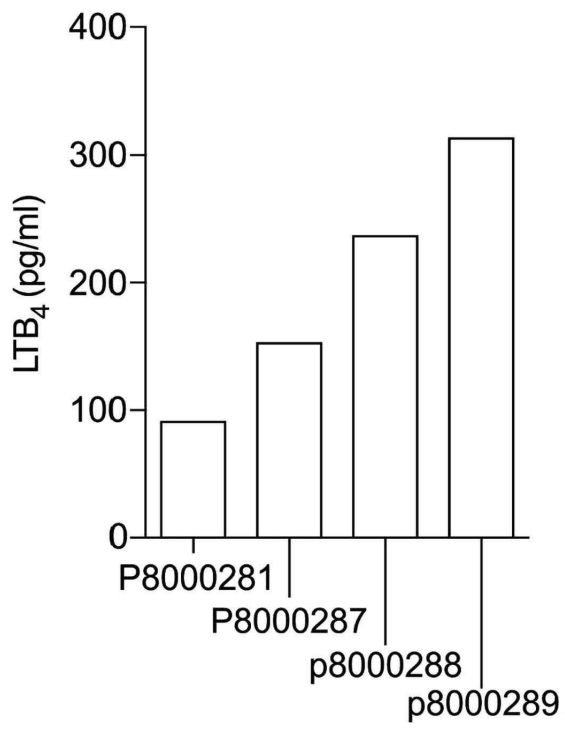


도면9a

C5a ELISA에 의해 결정된 수포액 중의 C5a 수준



도면9b



도면10

돌연변이체 #1 서열 번호:22 (150아미노산)

**dsesdctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepagekqdn
tlpvmmtfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgntqnre vvydsqshhc
hvdkvekevp dyeqwqsnsgs addkeveccr qkleelasgr nqmyphlkdc**

돌연변이체 #2 서열 번호:23 (150아미노산)

**dsesdctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepngekqdn
tlpvmmtfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgntqnre vvydsqshhc
hvdkvekevp dyemwqsdag adaveveccr qkleelasgr nqmyphlkgc**

돌연변이체 #3 서열 번호:24 (150아미노산)

**dsesdctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepngekqdn
tlpvmmtfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgntqnre vvydsqshhc
hvdkvekevp dyemwqldag gdeveveccr qkleelasgr nqmyphlkgc**

돌연변이체 #4 서열 번호:25 (150아미노산)

**dsesdctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepngekqdn
tlpvmmtfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgntqnre vvydsqshhc
hvdkvekevp dyemwmldag gleveveccr qkleelasgr nqmyphlkdc**

서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124 및 서열 번호 2의 132-142로부터의 서열 번호 26 (11개 아미노산)

mwmldagglev

코버신 변이체 1 (서열 번호 22)에서 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124로부터의 서열 번호 27 (11개 아미노산)

qwqsnsgsaddk

코버신 변이체 2 (서열 번호 23)에서 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124로부터의 서열 번호 28 (11개 아미노산)

mwqsdagadav

코버신 변이체 3 (서열 번호 24)에서 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124로부터의 서열 번호 29 (11개 아미노산)

mwqldagggdev

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> VOLUTION IMMUNO PHARMACEUTICALS SA

<120> COVERSIN FOR THE TREATMENT OF AUTOIMMUNE BLISTERING DISEASES

<130> IPA191230-GB

<150> GB 1706404.9

<151> 2017-04-21

<150> GB 1706406.4

<151> 2017-04-21

<150> GB 1706452.8

<151> 2017-04-24

<160> 29

<170> SeqWin2010, version 1.0

<210> 1

<211> 507

<212> DNA

<213> Ornithodoros moubata

<400> 1

```

atgctggttt tggtagacct gatctctcc tttctgcga acatgcata tgctgacagc 60
gaaagcgact gcactggaag cgaacctgtt gacgccttcc aagctttcag tgaggcaca 120

gaggcatatg tcttggtag gtccacggat ccaaagcga gggactgctt gaaaggagaa 180
ccagccggag aaaagcagga caacacgttg ccggtgatga tgacgtttaa gaatggcaca 240
gactgggctt caaccgattg gacgtttact ttggacggcg caaaggtaac ggcaaccctt 300
ggtaacctaa cccaaaatag ggaagtggtc tacgactcgc aaagtcatca ctgccacgtt 360
gacaaggctc agaaggaagt tccagattat gagatgtgga tgctcgatgc gggagggtt 420
gaagtggaag tcgagtgtc cctcaaaag ctgaagagt tggcgtctgg caggaaccaa 480
atgtatcccc atctcaagga ctgctag 507
    
```

<210

> 2

<211> 168

<212> PRT

<213> Ornithodoros moubata

<400> 2

```

Met Leu Val Leu Val Thr Leu Ile Phe Ser Phe Ser Ala Asn Ile Ala
1           5           10          15
Tyr Ala Asp Ser Glu Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala
           20           25           30
Phe Gln Ala Phe Ser Glu Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu Val Arg Ser
           35           40           45
Thr Asp Pro Lys Ala Arg Asp Cys Leu Lys Gly Glu Pro Ala Gly Glu
           50           55           60
    
```


Asp Ser Glu Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala Phe Gln
 1 5 10 15
 Ala Phe Ser Glu Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu Val Arg Ser Thr Asp
 20 25 30
 Pro Lys Ala Arg Asp Cys Leu Lys Gly Glu Pro Ala Gly Glu Lys Gln
 35 40 45
 Asp Asn Thr Leu Pro Val Met Met Thr Phe Lys Asn Gly Thr Asp Trp
 50 55 60
 Ala Ser Thr Asp Trp Thr Phe Thr Leu Asp Gly Ala Lys Val Thr Ala
 65 70 75 80
 Thr Leu Gly Asn Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val Val Tyr Asp Ser Gln
 85 90 95
 Ser His His Cys His Val Asp Lys Val Glu Lys Glu Val Pro Asp Tyr
 100 105 110
 Glu Met Trp Met Leu Asp Ala Gly Gly Leu Glu Val Glu Val Glu Cys

 115 120 125
 Cys Arg Gln Lys Leu Glu Glu Leu Ala Ser Gly Arg Asn Gln Met Tyr
 130 135 140

Pro His Leu Lys Asp Cys
 145 150

<210> 5

<211> 450

<212> DNA

<213> Ornithodoros moubata

<400> 5

agcgaagcg actgactgg aagcgaacct gttgacgctt tccaagcttt cagtgagggc 60
 aaagaggcat atgtcctggt gaggtccacg gatcccaaag cgagggactg cttgaaagga 120
 gaaccagccg gagaaaagca ggacaacacg ttgccggtga tgatgacgtt taagaatggc 180

 acagactggg cttcaaccga ttggacgttt actttggacg gcgcaaaggt aacggcaacc 240
 cttgtaacc taacccaaaa tagggaagtg gtctacgact cgcaaagtca tcaactgccac 300
 gttgacaagg tcgagaagga agttccagat tatgagatgt ggatgctcga tgcgggaggg 360
 cttgaagtgg aagtcgagtg ctgccgtcaa aagcttgaag agttggcgtc tggcaggaac 420

caaatgtatc cccatctcaa ggactgctag

450

<210> 6

<211> 149

<212> PRT

<213> Ornithodoros moubata

<400> 6

Ser Glu Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala Phe Gln Ala

1 5 10 15
Phe Ser Glu Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu Val Arg Ser Thr Asp Pro

 20 25 30
Lys Ala Arg Asp Cys Leu Lys Gly Glu Pro Ala Gly Glu Lys Gln Asp

 35 40 45
Asn Thr Leu Pro Val Met Met Thr Phe Lys Asn Gly Thr Asp Trp Ala

 50 55 60
Ser Thr Asp Trp Thr Phe Thr Leu Asp Gly Ala Lys Val Thr Ala Thr

65 70 75 80
Leu Gly Asn Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val Val Tyr Asp Ser Gln Ser

 85 90 95
His His Cys His Val Asp Lys Val Glu Lys Glu Val Pro Asp Tyr Glu

 100 105 110
Met Trp Met Leu Asp Ala Gly Gly Leu Glu Val Glu Val Glu Cys Cys

 115 120 125
Arg Gln Lys Leu Glu Glu Leu Ala Ser Gly Arg Asn Gln Met Tyr Pro

 130 135 140
His Leu Lys Asp Cys

145

<210> 7

<211> 447

<212> DNA

<213> Ornithodoros moubata

<400> 7

gaaagcgact gcactggaag cgaacctgtt gacgccttcc aagctttcag tgagggcaaa 60

gaggcatatg tcctggtgag gtccacggat cccaaagcga gggactgctt gaaaggagaa 120
 ccagccggag aaaagcagga caacacgttg ccggtgatga tgacgtttaa gaatggcaca 180
 gactgggctt caaccgattg gacgtttact ttggacggcg caaagtaac ggcaaccctt 240
 ggtaacctaa cccaaaatag ggaagtggtc tacgactcgc aaagtcatca ctgccacgtt 300

gacaaggtcg agaaggaagt tccagattat gagatgtgga tgctcgatgc gggagggctt 360
 gaagtggaag tcgagtgctg ccgtcaaaag cttgaagagt tggcgtctgg caggaaccaa 420
 atgtatcccc atctcaagga ctgctag 447

<210> 8

<211> 148

<212> PRT

<213> Ornithodoros moubata

<400> 8

Glu Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala Phe Gln Ala Phe

1 5 10 15

Ser Glu Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu Val Arg Ser Thr Asp Pro Lys

20 25 30

Ala Arg Asp Cys Leu Lys Gly Glu Pro Ala Gly Glu Lys Gln Asp Asn

35 40 45

Thr Leu Pro Val Met Met Thr Phe Lys Asn Gly Thr Asp Trp Ala Ser

50 55 60

Thr Asp Trp Thr Phe Thr Leu Asp Gly Ala Lys Val Thr Ala Thr Leu

65 70 75 80

Gly Asn Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val Val Tyr Asp Ser Gln Ser His

85 90 95

His Cys His Val Asp Lys Val Glu Lys Glu Val Pro Asp Tyr Glu Met

100 105 110

Trp Met Leu Asp Ala Gly Gly Leu Glu Val Glu Val Glu Cys Cys Arg

115 120 125

Gln Lys Leu Glu Glu Leu Ala Ser Gly Arg Asn Gln Met Tyr Pro His

130 135 140

Leu Lys Asp Cys

145

<210> 9
 <211> 444
 <212> DNA
 <213> Ornithodoros moubata
 <400> 9

```

agcgactgca ctggaagcga acctgttgac gccttccaag ctttcagtga gggcaaagag 60
gcatatgtcc tggtagagtc cacggatccc aaagcgaggg actgcttgaa aggagaacca 120
gccggagaaa agcaggacaa cacgttgccg gtgatgatga cgtttaagaa tggcacagac 180
tgggcttcaa ccgattggac gtttactttg gacggcgcaa aggtaacggc aacccttgg 240
aacctaacc aaaatagga agtggcttac gactcgcaaa gtcactactg ccacgttgac 300
aaggtcgaga aggaagtcc agattatgag atgtggatgc tcatgctggg agggcttgaa 360
gtggaagtcg agtgcctccg tcaaaagctt gaagagtgg cgtctggcag gaaccaaag 420
tatcccatc tcaaggactg ctag 444
    
```

<210> 10
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Ornithodoros moubata
 <400> 10

```

Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala Phe Gln Ala Phe Ser
1           5           10           15
Glu Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu Val Arg Ser Thr Asp Pro Lys Ala
           20           25           30
Arg Asp Cys Leu Lys Gly Glu Pro Ala Gly Glu Lys Gln Asp Asn Thr
           35           40           45
Leu Pro Val Met Met Thr Phe Lys Asn Gly Thr Asp Trp Ala Ser Thr
           50           55           60
Asp Trp Thr Phe Thr Leu Asp Gly Ala Lys Val Thr Ala Thr Leu Gly
65           70           75           80
Asn Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val Val Tyr Asp Ser Gln Ser His His
           85           90           95
Cys His Val Asp Lys Val Glu Lys Glu Val Pro Asp Tyr Glu Met Trp
           100          105          110
    
```

Met Leu Asp Ala Gly Gly Leu Glu Val Glu Val Glu Cys Cys Arg Gln

115 120 125
Lys Leu Glu Glu Leu Ala Ser Gly Arg Asn Gln Met Tyr Pro His Leu

130 135 140
Lys Asp Cys

145

<210> 11

<211> 441

<212> DNA

<213> Ornithodoros moubata

<400> 11

gactgcactg gaagcgaacc tgttgacgcc ttccaagctt tcagtgaggg caaagaggca 60
tatgtcctgg tgaggccac ggatccaaa gcgagggact gcttgaaagg agaaccagcc 120
ggagaaaagc aggacaacac gttgccggtg atgatgacgt ttaagaatgg cacagactgg 180

gcttcaaccg attggacgtt tactttggac ggcgcaaagg taacggcaac ccttggtaac 240
ctaaccctaaa ataggaagt ggtctacgac tcgcaaagtc atcactgcca cgttgacaag 300
gtcgagaagg aagtccaga ttatgagatg tggatgctcg atgcgggagg gcttgaagtg 360
gaagtcgagt gctgccctca aaagctttaa gagttggcgt ctggcaggaa ccaaatgtat 420
ccccatctca aggactgcta g 441

<210> 12

<211> 146

<212> PRT

<213> Ornithodoros moubata

<400> 12

Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala Phe Gln Ala Phe Ser Glu

1 5 10 15
Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu Val Arg Ser Thr Asp Pro Lys Ala Arg
20 25 30
Asp Cys Leu Lys Gly Glu Pro Ala Gly Glu Lys Gln Asp Asn Thr Leu
35 40 45
Pro Val Met Met Thr Phe Lys Asn Gly Thr Asp Trp Ala Ser Thr Asp
50 55 60

Lys Glu Ala Tyr Val Leu Val Arg Ser Thr Asp Pro Lys Ala Arg Asp
 20 25 30

Cys Leu Lys Gly Glu Pro Ala Gly Glu Lys Gln Asp Asn Thr Leu Pro
 35 40 45

Val Met Met Thr Phe Lys Asn Gly Thr Asp Trp Ala Ser Thr Asp Trp
 50 55 60

Thr Phe Thr Leu Asp Gly Ala Lys Val Thr Ala Thr Leu Gly Asn Leu
 65 70 75 80

Thr Gln Asn Arg Glu Val Val Tyr Asp Ser Gln Ser His His Cys His
 85 90 95

Val Asp Lys Val Glu Lys Glu Val Pro Asp Tyr Glu Met Trp Met Leu
 100 105 110

Asp Ala Gly Gly Leu Glu Val Glu Val Glu Cys Cys Arg Gln Lys Leu
 115 120 125

Glu Glu Leu Ala Ser Gly Arg Asn Gln Met Tyr Pro His Leu Lys Asp
 130 135 140

Cys

145

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAS sequence

<400

> 15

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
 1 5 10 15

Ser Ala Pro Ala
 20

<210> 16

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAS sequence

<400> 16

Ala Ala Pro Ala Ser Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro

1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser

20

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAS sequence

<400> 17

Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ala

1 5 10 15

Ser Pro Ser Ser

20

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAS sequence

<400> 18

Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro

1 5 10 15

Ala Ser Pro Ser

20

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAS sequence

<400> 19

Ser Ser Pro Ser Ala Pro Ser Pro Ser Ser Pro Ala Ser Pro Ser Pro

1 5 10 15

Ser Ser Pro Ala

20

<210> 20

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAS sequence

<400> 20

Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Pro

1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala

20

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAS sequence

<400> 21

Ala Ser Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ala Pro

1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala

20

<210> 22

<211> 150

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Coversin variant 1

<400> 22

Asp Ser Glu Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala Phe Gln

1 5 10 15

Ala Phe Ser Glu Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu Val Arg Ser Thr Asp

20

25

30

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

Thr Leu Gly Asn Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val Val Tyr Asp Ser Gln
 85 90 95
 Ser His His Cys His Val Asp Lys Val Glu Lys Glu Val Pro Asp Tyr
 100 105 110
 Glu Gln Trp Gln Ser Asn Gly Ser Ala Asp Asp Lys Glu Val Glu Cys
 115 120 125
 Cys Arg Gln Lys Leu Glu Glu Leu Ala Ser Gly Arg Asn Gln Met Tyr
 130 135 140

Pro His Leu Lys Asp Cys
 145 150

<210> 23

<211> 150

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Coversin variant 2

<400> 23

Asp Ser Glu Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala Phe Gln
 1 5 10 15
 Ala Phe Ser Glu Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu Val Arg Ser Thr Asp
 20 25 30
 Pro Lys Ala Arg Asp Cys Leu Lys Gly Glu Pro Asn Gly Glu Lys Gln
 35 40 45

Asp Asn Thr Leu Pro Val Met Met Thr Phe Lys Asn Gly Thr Asp Trp
 50 55 60
 Ala Ser Thr Asp Trp Thr Phe Thr Leu Asp Gly Ala Lys Val Thr Ala
 65 70 75 80

Thr Leu Gly Asn Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val Val Tyr Asp Ser Gln
 85 90 95
 Ser His His Cys His Val Asp Lys Val Glu Lys Glu Val Pro Asp Tyr
 100 105 110

 Glu Met Trp Gln Ser Asp Ala Gly Ala Asp Ala Val Glu Val Glu Cys
 115 120 125
 Cys Arg Gln Lys Leu Glu Glu Leu Ala Ser Gly Arg Asn Gln Met Tyr
 130 135 140
 Pro His Leu Lys Gly Cys
 145 150
 <210> 24
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Coversin variant 3
 <400> 24
 Asp Ser Glu Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala Phe Gln
 1 5 10 15

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

 Thr Leu Gly Asn Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val Val Tyr Asp Ser Gln
 85 90 95
 Ser His His Cys His Val Asp Lys Val Glu Lys Glu Val Pro Asp Tyr
 100 105 110
 Glu Met Trp Gln Leu Asp Ala Gly Gly Asp Glu Val Glu Val Glu Cys
 115 120 125

Cys Arg Gln Lys Leu Glu Glu Leu Ala Ser Gly Arg Asn Gln Met Tyr
 130 135 140

Pro His Leu Lys Gly Cys
 145 150

<210> 25

<211> 150

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Coversin variant 4

<400> 25

Asp Ser Glu Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala Phe Gln
 1 5 10 15

Ala Phe Ser Glu Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu Val Arg Ser Thr Asp
 20 25 30

Pro Lys Ala Arg Asp Cys Leu Lys Gly Glu Pro Asn Gly Glu Lys Gln
 35 40 45

Asp Asn Thr Leu Pro Val Met Met Thr Phe Lys Asn Gly Thr Asp Trp
 50 55 60

Ala Ser Thr Asp Trp Thr Phe Thr Leu Asp Gly Ala Lys Val Thr Ala
 65 70 75 80

Thr Leu Gly Asn Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val Val Tyr Asp Ser Gln
 85 90 95

Ser His His Cys His Val Asp Lys Val Glu Lys Glu Val Pro Asp Tyr
 100 105 110

Glu Met Trp Met Leu Asp Ala Gly Gly Leu Glu Val Glu Val Glu Cys
 115 120 125

Cys Arg Gln Lys Leu Glu Glu Leu Ala Ser Gly Arg Asn Gln Met Tyr
 130 135 140

Pro His Leu Lys Asp Cys
 145 150

<210> 26

<211> 11

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Loop sequence
 <400> 26
 Met Trp Met Leu Asp Ala Gly Gly Leu Glu Val
 1 5 10

<210> 27
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Loop sequence of Coversin variant 1
 <400> 27
 Gln Trp Gln Ser Asn Gly Ser Ala Asp Asp Lys
 1 5 10

<210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Loop sequence of Coversin variant 2
 <400> 28
 Met Trp Gln Ser Asp Ala Gly Ala Asp Ala Val
 1 5 10

<210> 29
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Loop sequence of Coversin variant 3
 <400> 29
 Met Trp Gln Leu Asp Ala Gly Gly Asp Glu Val
 1 5 10