

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022년 1월 13일 (13.01.2022)

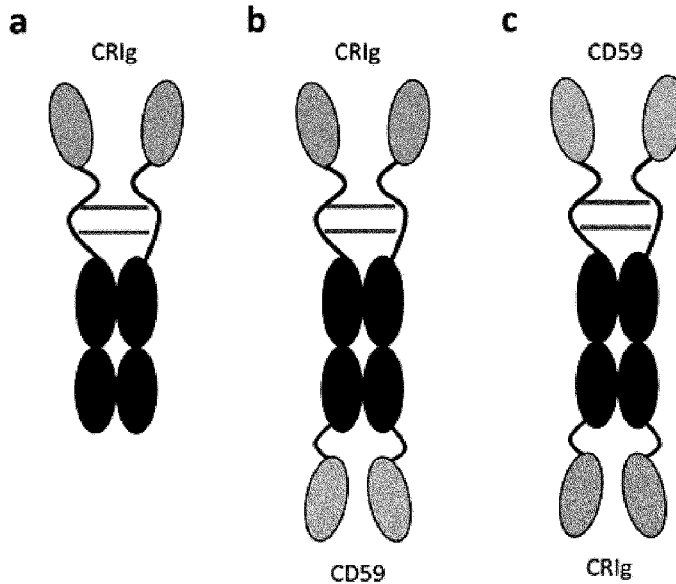


(10) 국제공개번호
WO 2022/010273 A1

- (51) 국제특허분류: C07K 14/705 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/008683
- (22) 국제출원일: 2021년 7월 7일 (07.07.2021)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2020-0083536 2020년 7월 7일 (07.07.2020) KR
- (71) 출원인: 주식회사 카나프테라퓨틱스 (KANAPH THERAPEUTICS INC.) [KR/KR]; 04348 서울시 용산구 이태원로55가길 3, 5층, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 정으뜸 (CHUNG, Eu Ddeum); 13476 경기도 성남시 분당구 판교로 50, 102동 601호, Gyeonggi-do (KR).
유수민 (RYU, Soomin); 14109 경기도 안양시 동안구 경수대로596번길 62-12, 101동 804호, Gyeonggi-do (KR).
- 김동건 (KIM, Donggeon); 05629 서울시 송파구 위례성대로6길 23, 301호, Seoul (KR). 장지훈 (CHANG, Ji-hoon); 04211 서울시 마포구 마포대로 156, 518호, Seoul (KR). 이병철 (LEE, Byoung Chul); 06289 서울시 강남구 선릉로 120, 12동 309호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 류종우 등 (RYU, Jong Woo et al.); 06160 서울시 강남구 테헤란로69길 13, 명지빌딩 4층 선정국제특허법률사무소, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: FUSION PROTEINS COMPRISING COMPLEMENT PATHWAY INHIBITOR AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 보체 경로 억제제를 포함하는 융합단백질 및 이의 용도



(57) Abstract: Provided is a fusion protein comprising: an extracellular domain of CR1g or a fragment thereof; and CD59 or a mutant thereof. Also, a fusion protein comprising CD59 or a mutant thereof is provided. The proteins can efficiently regulate complement-related pathways. Thus, the fusion protein dimers can be effectively used in the treatment and prevention of eye diseases, particularly macular degeneration, and therefore are highly industrially applicable.

(57) 요약서: CR1g 의 세포외도메인 또는 이의 단편; 및 CD59 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질을 제공한다. 또한, CD59 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질을 제공한다. 상기 단백질은 보체 관련 경로를 효율적으로 조절할 수 있다. 따라서, 상기 융합단백질 이량체는 안질환, 특히 황반 변성의 치료 및 예방에 효과적으로 활용할 수 있어 산업적 활용 가능성이 높다.

[다음 쪽 계속]



WO 2022/010273 A1

SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역
내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,
LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유
럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 보체 경로 억제제를 포함하는 융합단백질 및 이의 용도

기술분야

- [1] 보체 경로 억제 단백질을 포함하는 융합단백질 및 이를 이용한 안질환, 구체적으로 황반 변성 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 황반 변성은 브루크막, 맥락막, 신경 망막 및/또는 망막 색소 상피의 이상과 관련된 중앙 시력의 상실을 특징으로 하는 질병을 의미한다. 망막의 중심에 직경이 약 1/3 내지 1/2 cm인 황반이 존재한다. 망막 아래에, 섬유 조직 내에 묻힌 혈관의 집합체인 맥락막, 및 맥락막층 위에 색소 상피(PE)가 존재한다. 이때, 맥락막 혈관은 망막에 영양을 제공한다. 맥락막 및 PE는 눈의 전방에서 발견된다.
- [3] 황반 변성 중 하나인 노인성 황반 변성(AMD)은 시야의 중앙부에서 시각의 진행성 상실, 색 식별력의 변화, 및 비정상적인 압 반응 및 민감도와 연관된 질환이다. AMD는 크게 건성 또는 습성 AMD로 구분된다. 건성 AMD는 읽기, 운전 또는 안면 인식과 같은 활동에 사용되는 미세 시력을 위해 요구되는 중앙 망막 또는 황반의 위축성 세포 사멸과 연관된다. 상기 건성 AMD 환자의 약 10-20%는 습성 AMD로서 알려진 AMD의 제2형으로 진행된다.
- [4] 두 형태의 발병에서 가장 유의한 위험 인자는 연령 및 망막 색소 상피 뒤에서 비정상적인 세포외 침착물인 결정체(drusen)의 침착이다. 결정체는 AMD와 관련된 특징적인 침착물이다. 상기 결정체는 보체 활성화제, 억제제, 활성화-특이적 보체 단편, 및 말단 경로 인자, 예를 들어 세포막 공격 복합체(MAC 또는 C5b-9)를 포함한다고 알려져 있다. 뿐만 아니라, 습성 AMD는 맥락막 혈관신생(CNV)과 연관되어 있다. 새로운 맥락막 혈관 형성의 발병기전은 거의 알려지지 않았지만, 염증, 허혈, 및 혈관신생 인자의 국소 생산과 같은 요소가 중요한 것으로 생각된다.
- [5] 한편, 보체계는 미생물 감염에 대한 선천 면역의 중대한 성분이고, 정상적으로 혈청 내에 비활성 상태로 존재하는 단백질의 집단을 포함한다. 상기 단백질은 전통적인 경로, 렉틴 경로 및 대체 경로를 통해 활성화된다. 미생물 표면의 분자는 상기 경로를 활성화시켜 C3-전환효소로 알려진 프로테아제 복합체의 형성시킬 수 있다.
- [6] 보체 경로의 활성화는 백혈구 화학주성, 대식세포, 호중구, 혈소판, 비만세포 및 내피세포의 활성화, 증가된 혈관 투과성, 세포 용해, 및 조직 손상에서 염증 반응을 매개하는 보체 단백질의 생물학적 활성 단편, 예를 들어 C3a 및 C5a 과민독소(Anaphylatoxin) 및 C5b-9 세포막 공격 복합체(MAC)를 생성한다. 또한,

안질환 중 일부는 보체가 관련되어 있다는 점이 보고된 바 있다(일본특허출원 제2007-536964호). 그러나, 현재까지도 안질환, 특히 황반 변성을 효과적으로 치료하기 위한 약물에 대한 니즈가 증가되고 있어, 황반 변성 치료제에 대한 연구는 계속되고 있는 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 이에 본 발명자들은 안질환, 특히 황반 변성을 효과적으로 치료 및 예방하기 위하여 연구한 결과, 보체 관련 경로를 차단하는 융합단백질이 황반 변성 치료제로 활용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [8] 본 발명의 일 측면은 CRIg(Complement receptor of the immunoglobulin superfamily)의 세포외도메인 또는 이의 단편; 및 CD59 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질을 제공한다.
- [9] 본 발명의 다른 측면은 상기 융합단백질 2개가 결합된 융합단백질 이량체를 제공한다.
- [10] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [11] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [12] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 벡터가 도입된 형질전환 세포를 제공한다.
- [13] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 융합단백질 또는 융합단백질 이량체를 유효성분으로 포함하는 안질환 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.
- [14] 본 발명의 또 다른 측면은 안질환을 치료하기 위한 CRIg의 세포외도메인 또는 이의 단편; 및 CD59 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질 또는 이의 이량체의 용도를 제공한다.
- [15] 본 발명의 또 다른 측면은 안질환 치료 또는 예방용 약제를 제조하기 위한 CRIg의 세포외도메인 또는 이의 단편; 및 CD59 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질 또는 이의 이량체의 용도를 제공한다.
- [16] 본 발명의 또 다른 측면은 CRIg의 세포외도메인 또는 이의 단편; 및 CD59 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질 또는 이의 이량체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 안질환을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [17] 보체 관련 경로 억제 단백질인, CRIg의 세포외도메인 또는 이의 단편; 및 CD59 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질은 보체 관련 기작을 효율적으로 억제할 수 있다. 따라서, 보체계에 의해 유발되는 안질환을 효과적으로 치료 또는 예방할 수 있다. 따라서, 상기 융합단백질은 효율적으로 황반 변성, 특히, 건성 황반 변성 및 습성 황반 변성을 모두 효과적 치료하는데 유용하게 사용될

수 있다.

도면의 간단한 설명

- [18] 도 1은 C2.01, C2.02, C2.03, C2.05, C2.06, C2.07 및 C2.08의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 도이다.
- [19] 도 2는 C2.09, C2.10, C2.11, C2.12, C2.10m, C2.11m 및 C2.12m의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 도이다.
- [20] 도 3은 C2.13, C2.14, C2.15 및 C2.16의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 도이다.
- [21] 도 4는 C2.04, C2.01m, C2.04m, C2.05m 및 C2.07m의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 도이다.
- [22] 도 5는 융합단백질의 모식도를 나타낸 도이다. CRIg-Fc(왼쪽), CRIg-Fc-CD59(가운데), CD59-Fc-CRIg(오른쪽)를 의미한다.
- [23] 도 6a는 인간 C3b에 대한 C2.01, C2.03, C2.04의 결합 친화도를 비아코어 분석을 통해 농도별로 나타낸 그래프이다.
- [24] 도 6b는 마우스 C3b에 대한 C2.01m 및 C2.04m의 결합 친화도를 비아코어 분석을 통해 농도별로 나타낸 그래프이다.
- [25] 도 7a는 인간 C3b에 대한 C2.01, C2.11, C2.12 및 hIgG1의 결합 친화도를 ELISA를 통해 나타낸 그래프이다.
- [26] 도 7b는 마우스 C3b에 대한 C2.01, C2.11, C2.12 및 hIgG1의 결합 친화도를 ELISA를 통해 나타낸 그래프이다.
- [27] 도 7c는 인간 C3b에 대한 C2.04, C2.10 및 C2.11의 결합 친화도를 ELISA를 통해 나타낸 그래프이다.
- [28] 도 7d는 C9에 대한 C2.04, C2.10 및 C2.11의 결합 친화도를 ELISA를 통해 나타낸 그래프이다.
- [29] 도 8은 C2.11의 고전 보체 경로 억제 효과를 용혈 분석(CH50)을 통하여 나타낸 그래프이다.
- [30] 도 9는 C2.11의 대체 보체 경로 억제 효과를 용혈 분석(AH50)을 통하여 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [31] **CRIg** 세포외도메인을 포함하는 융합단백질
- [32] 본 발명의 일 측면은 CRIg(Complement receptor of the immunoglobulin superfamily)의 세포외도메인 또는 이의 단편; 및 CD59 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질을 제공한다.
- [33] 본 명세서에서 사용된 용어, "CRIg"는 VSIG4 유전자에서 코딩되는 면역글로불린 보체 수용체를 의미하며, Protein Z39Ig라고도 명명된다. 상기 CRIg는 보체 수용체의 4종류 중 제4형 보체 수용체에 속하는 수용체로서, 간장 내에서 식균작용을 하는 쿠퍼(Kupffer) 세포와 같은 대식세포의 표면에 발현된다. 상기 CRIg는 면역글로불린 도메인을 포함하는 세포외 부위와

결합되어 있는 막단백질(Integral Membrane Protein)이다. CRlg은 보체 단편인 C3b와 iC3b와 결합하며, 인체내로 들어온 박테리아나 혈액내의 감염균을 식균세포가 인지하고 제거하도록 기능한다.

- [34] 상기 CRlg는 CRlg 동형체(isoform) 또는 스플라이싱된 형태(spliced form)를 포함한다. 상기 동형체는, CRlg isoform 1, 2 또는 3을 포함한다. 상기 스플라이싱된 형태는 CRlg(L) 또는 CRlg(S)를 포함한다. 상기 CRlg(L)은 V 및 C2-타입 말단 Ig 도메인을 포함하고, CRlg(S)는 V-타입 도메인만을 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 CRlg(S)는 서열번호 36의 서열을 포함할 수 있다.
- [35] 상기 CRlg 세포외도메인은 수용체의 막관통도메인 및 세포질도메인 부분을 제외한 부분일 수 있다.
- [36] 상기 CRlg는 CRlg 세포외도메인의 단편을 포함할 수 있다. 상기 CRlg의 세포외도메인의 단편이란, CRlg의 세포외도메인과 동등 또는 유사 활성을 가지는 절단형을 의미한다. 구체적으로, 상기 단편은 C3b 또는 iC3b와 결합하여 보체 작용 또는 식균 작용을 촉진하는 활성을 가지는 CRlg의 단편을 의미한다.
- [37] 일 구체예에 있어서, 상기 CRlg는 서열번호 28, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37 또는 서열번호 72의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 구체적으로, 사람 CRlg는 서열번호 35, 서열번호 36 또는 서열번호 72의 아미노산 서열을 가질 수 있으며, 마우스 CRlg는 서열번호 37의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, 사람 CRlg 세포외도메인은 서열번호 28 또는 서열번호 67의 아미노산 서열 포함할 수 있으며, 마우스 CRlg 세포외도메인은 서열번호 61의 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [38] 본 명세서에서 사용된 용어, "CD59"는 막-결합 조절기로서 자연적으로 발생하는 막 공격 복합체(MAC)형성을 감소시키는 막 결합 억제제이다. 상기 CD59는 CD59 유전자에서 코딩되며, MAC-저해 단백질(MAC-IP), 반응성 용해 막 저해제(MIRL), 또는 프로텍틴(protectin)이라고도 명명된다.
- [39] 상기 CD59는 GPI(glycophosphatidylinositol) 앵커를 통해 숙주세포에 부착하며, C9가 보체 막 공격 복합체(MAC)을 형성하는 것을 저해하고 CD59-CD9 복합체를 세포 내 이입시킨다. 노인성 황반 변성(AMD)에서, 질환 중증도는 보체 캐스케이드의 말단 단계인 막 공격 복합체(MAC)의 형성 및 MAC 형성에 관여하는 막 결합 조절 단백질인 CD59의 감소된 발현과 상관관계가 있다.
- [40] 상기 CD59는 CD59의 변이체를 포함할 수 있다. 상기 CD59의 변이체는 CD59와 동등 또는 유사 활성을 가지는 변이체를 포함한다. 이는 당업자에게 알려진 방법으로 제조될 수 있다. 상기 CD59 변이체는 인간 CD59 단백질의 일부 아미노산이 결실, 변경, 치환 및/또는 부가되거나 또는 인간 CD59의 야생형 당쇄가 변경되는 것일 수 있다.
- [41] 상기 CD59의 변이체는 야생형 CD59의 서열의 적어도 5개 이상, 적어도 10개 이상, 적어도 15개 이상, 또는 적어도 20개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 이때, 상기 인간 CD59는 서열번호 24 또는 서열번호 70의 아미노산 서열을

포함할 수 있다.

- [42] 일 구체예에 있어서, 상기 CD59 변이는 천연 CD59 단백질에서 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실, 삽입된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 서열번호 24의 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 CD59 변이는 서열번호 24의 아미노산 서열에서 66번째 및/또는 69번째 아미노산 또는 다른 아미노산으로 치환될 수 있다.
- [43] 일 구체예로, 서열번호 24의 66번째 아미노산인 라이신이 다른 아미노산으로 변경된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 라이신(K)은 알라닌(A), 알지닌(R), 아스파라진(N), 아스파르트산(D), 시스테인(C), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 글라이신(G), 히스티딘(H), 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 페닐알라닌(F), 프로린(P), 세린(S), 트레오닌(T), 트립토판(W), 타이로신(Y) 및 발린(V)으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산으로 치환될 수 있다. 바람직하게, 상기 CD59의 변이체는 서열번호 24의 66번째 아미노산이 알라닌(A) 또는 글루타민(Q)으로 치환된 형태일 수 있다.
- [44] 또 다른 구체예로, 서열번호 24의 69번째 아미노산인 히스티딘이 다른 아미노산으로 변경된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 히스티딘(H)은 알라닌(A), 알지닌(R), 아스파라진(N), 아스파르트산(D), 시스테인(C), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 글라이신(G), 라이신(K), 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 페닐알라닌(F), 프로린(P), 세린(S), 트레오닌(T), 트립토판(W), 타이로신(Y) 및 발린(V)으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산으로 치환될 수 있다. 바람직하게, 상기 CD59의 변이체는 서열번호 24의 69번째 아미노산이 글루타민(Q)으로 치환된 형태일 수 있다.
- [45] 일 구체예에 있어서, 상기 CD59 변이체는 서열번호 24의 아미노산 서열에서 K66Q, K66A, H69Q 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환이 일어난 것일 수 있다.
- [46] 상기 CD59 변이체는 CD59의 활성 또는 기능을 변화시키는 것일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 변이는 CD59의 활성을 조절하거나 또는 당화를 저해하는 것일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 K66Q 또는 H69Q는 단백질의 활성을 항상 유지하도록 조절하는 변이일 수 있다. 또한, 상기 K66A는 단백질의 당화를 조절하는 변이일 수 있다.
- [47] 구체적으로, 상기 CD59 변이체는 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 63 또는 서열번호 64의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 CD59 변이체가 두개 이상이 포함된 이량체 또는 삼량체 형태일 수 있다. 구체적으로, CD59 변이체 이량체는 서열번호 65의 서열을 포함할 수 있다. 또한, CD59 변이체 삼량체는 서열번호 66의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [48] 또한, CD59 변이체는 CD59 단편을 포함할 수 있다. 상기 단편은 CD59와 동등 또는 유사한 활성을 가지는 절단형을 의미한다. 구체적으로, 상기 숙주세포와 결합하여 보체 막 공격 복합체를 저해하는 CD59의 세포외도메인 또는 이의

단편일 수 있다.

- [49] 상기 CD59 단편은 천연 CD59의 N 말단 및/또는 C 말단의 일부가 절단된 형태일 수 있다. 구체적으로, 천연 CD59의 N-말단으로부터 연속적으로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개 또는 28개의 아미노산이 결실된 것을 포함할 수 있다.
- [50] 또한, 천연 CD59의 C-말단으로부터 연속적으로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개 또는 28개의 아미노산이 결실된 것을 포함할 수 있다.
- [51] 구체적으로, 상기 CD59 단편의 일 구체에는, 서열번호 24의 26번째 내지 128번째 서열을 가지는 것일 수 있다. 상기 CD59 단편의 일 구체에는 서열번호 24의 26번째 내지 102번째의 아미노산 서열을 가지는 것일 수 있다. 또한, 상기 CD59 단편의 일 구체에는 서열번호 24의 26번째 내지 95번째의 아미노산 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [52] 일 구체에 있어서, 상기 CD59 단편은 신호 서열(without signal peptide) 또는 C-말단 프로펩타이드가 제거된 형태일 수 있다.
- [53] 일 구체에 있어서, 상기 CD59의 변이체는 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 68, 또는 서열번호 69의 아미노산 서열을 가지는 단백질일 수 있다. 이때, CD59의 변이체는 상기 항상 활성화된 상태일 수 있다.
- [54] 이때, 상기 CR1g의 세포외도메인 또는 이의 단편; 및 CD59 또는 이의 변이체는 링커를 통해 결합된 것일 수 있다.
- [55] 또한, 상기 CR1g의 세포외도메인 또는 이의 단편과 면역글로불린 단편은 링커를 통해 결합된 것일 수 있다. 상기 링커는 두 개의 단백질을 연결시켜준다. 링커의 일 구체에는 1개 내지 50개의 아미노산, 알부민 또는 이의 단편, 또는 면역글로불린의 Fc 도메인 등을 포함할 수 있다. 이때, 상기 면역글로불린의 Fc 도메인은 면역글로불린의 중쇄 불변 영역 2(CH2) 및 중쇄 불변 영역 3(CH3)을 포함하며, 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 및 경쇄 불변 영역 1(CH1)은 포함하지 않는 단백질을 의미한다. 상기 면역글로불린은 IgG, IgA, IgE, IgD 또는 IgM 일 수 있으며, 바람직하게는 IgG1 일 수 있다. 본 명세서에서 Fc 도메인은 힌지 영역을 제외한, CH2 및 CH3 도메인을 포함한 영역을 지칭할 수 있다.
- [56] 상기 융합단백질은 구체적으로 하기 구조식(I) 또는 (II)로 이루어진 것일 수 있다:
- [57] N'-X-[링커(1)]n-Fc 도메인-[링커(2)]m-Y-C'(I)
- [58] N'-Y-[링커(1)]n-Fc 도메인-[링커(2)]m-X-C'(II)
- [59] 이때, 상기 구조식(I) 및 (II)에 있어서,

- [60] 상기 N'은 융합단백질의 N-말단이고,
 [61] 상기 C'는 융합단백질의 C-말단이며,
 [62] 상기 X는 CR1g의 세포외도메인 또는 이의 단편이고,
 [63] 상기 Y는 CD59 또는 이의 변이체이며,
 [64] 상기 링커(1) 및 링커(2)는 펩타이드 링커이고,
 [65] 상기 n 및 m은 각각 독립적으로, 0 또는 1이다.
 [66] 상기 CD59 또는 이의 변이체, 상기 CR1g의 세포외도메인 또는 이의 단편 및 Fc 도메인은 상술한 바와 같다. 구체적으로 상기 Fc 도메인은 면역글로불린 Fc 중쇄의 CH2 및 CH3 영역을 포함할 수 있다. 또한, 상기 면역글로불린의 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인뿐만 아니라, Fc 도메인 변이체일 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용하는 용어 "Fc 도메인 변이체"는 야생형 Fc 도메인의 당쇄 형태(Glycosylation pattern)와 다르거나, 야생형 Fc 도메인에 비해 증가된 당쇄, 야생형 Fc 도메인에 비해 감소한 당쇄, 또는 당쇄가 제거(Deglycosylate)된 형태일 수 있다. 또한 무당쇄(Aglycosylated) Fc 도메인도 포함된다. Fc 도메인 혹은 변이체는 배양조건 혹은 호스트의 유전자 조작을 통해 조정된 숫자의 시알산(Sialic acid), 푸코실화(Fucosylation), 당화(Glycosylation)를 갖도록 한 것일 수 있다.
- [67] 또한, 화학적 방법, 효소적 방법 및 미생물을 사용한 유전공학적 엔지니어링 방법 등과 같이 통상적인 방법으로 면역글로불린의 Fc 도메인의 당쇄를 변형시킬 수 있다. 또한, 상기 Fc 도메인 변이체는 면역글로불린 IgG, IgA, IgE, IgD 또는 IgM의 Fc 영역이 혼합된 형태일 수 있다. 또한, 상기 Fc 도메인 변이체는 상기 Fc 도메인의 일부 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 형태일 수 있다.
- [68] 본 명세서에서 용어 "Fc 도메인 변이체"는 야생형 Fc 도메인의 당쇄가 변경되거나, Fc 도메인간의 서열이 혼합된 Fc 도메인이거나, 야생형 Fc 도메인의 일부 아미노산이 결실, 변경, 치환 및/또는 부가된 것을 의미한다. 상기 야생형 Fc 도메인의 일부 아미노산의 결실, 변경, 치환 및/또는 부가는 당업자에게 알려진 방법으로 제조될 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 Fc 도메인 변이체는 야생형 Fc 도메인의 일부 아미노산 서열이 치환 및/또는 부가된 것일 수 있다.
- [69] 상기 치환 및/또는 부가에 의해 도입되는 "아미노산"은 라이신(K), 알라닌(A), 알지닌(R), 아스파라진(N), 아스파르트산(D), 시스테인(C), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 글라이신(G), 히스티딘(H), 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 페닐알라닌(F), 프로린(P), 세린(S), 트레오닌(T), 트립토판(W), 타이로신(Y) 및 발린(V)으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [70] 상기 Fc 도메인 변이는 항체의 활성 또는 기능을 조절하는 것일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 Fc 도메인 변이는 항체의 이펙터 기능(effector function) 또는 항체 세포 독성(antibody cytotoxic activities)을 조절하는 것일 수 있다.
- [71] 일 구체예에 있어서, 상기 Fc 도메인 변이체는 DANG 변이 또는 NG 변이를

포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 Fc 도메인 변이체는 IgG1 Fc 도메인에서 265번째 서열이 D에서 A로 치환된 것, 297번째 서열이 N에서 G로 치환된 것 또는 이의 조합일 수 있다.

- [72] 일 구체예에 있어서, 상기 Fc 도메인은 서열번호 5, 서열번호 19 및 서열번호 62로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 상기 Fc 도메인은 서열번호 42 또는 서열번호 56의 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 것일 수 있다.
- [73] 상기 펩타이드 링커(1)은 5 내지 80개의 연속된 아미노산, 20 내지 60개의 연속된 아미노산, 또는 25 내지 50개의 연속된 아미노산, 또는 30 내지 40개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 일 구체예로 펩타이드 링커(1)은 30개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 또한, 펩타이드 링커(1)은 적어도 하나의 시스테인을 포함할 수 있다. 구체적으로, 하나, 두 개, 세 개 또는 네 개의 시스테인을 포함할 수 있다. 또한, 상기 펩타이드 링커(1)은 면역글로불린의 힌지에서 유래된 것일 수 있다. 한 구체예에서는, 상기 펩타이드 링커(1)이 서열번호 29 또는 34의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커일 수 있다.
- [74] 상기 펩타이드 링커(2)는 1 내지 50개의 연속된 아미노산, 또는 3 내지 30개의 연속된 아미노산, 또는 5 내지 15개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 일 구체예로 상기 펩타이드 링커(2)는 $(G4S)_n$ 또는 (이때, n 은 1 내지 10의 정수) 포함할 수 있다. 이때, $(G4S)_n$ 에서 n 은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10일 수 있다. 일 실시예로, 상기 펩타이드 링커(2)가 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32 또는 33의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커일 수 있다.
- [75] 일 구체예에 있어서, 상기 이량체를 구성하는 융합단백질은 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 11, 서열번호 18 및 서열번호 22으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [76] 또 다른 구체예에 있어서, 상기 융합단백질은 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 11, 서열번호 18 및 서열번호 22으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이때, 동일성은, 예를 들어, 퍼센트 상동성, NCBI(National Center of Biotechnology Information)의 BlastN software과 같은 상동성 비교 소프트웨어를 통해 결정될 수 있다.
- [77] **융합단백질 이량체**
- [78] 본 발명의 다른 측면은, CRIG의 세포외도메인 또는 이의 단편; 및 CD59 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질 두 개가 결합된 이량체를 제공한다.
- [79] 이때, 이량체를 구성하는 융합단백질 간의 결합은 링커 내에 존재하는 시스테인에 의해 이황화 결합에 의해 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이량체를 구성하는 융합단백질은 동일한 것일 수도 있으나, 서로 상이한 융합단백질일 수 있다. 바람직하게는, 상기 이량체는

동형이량체(Homodimer)인 것일 수 있다.

- [80] 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드
- [81] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [82] 일 구체예에 있어서, 상기 폴리펩티드는 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 11, 서열번호 18 또는 서열번호 22와 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100%의 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [83] 일 구체예에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 48, 서열번호 55 및 서열번호 59로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나의 염기서열에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100%의 동일성을 가지는 것일 수 있다.
- [84] 상기 폴리뉴클레오티드는 신호서열(Signal sequence) 또는 리더 서열(Leader sequence)을 코딩하는 핵산을 추가적으로 포함할 수 있다. 본 명세서에서 용어 "신호서열"은 목적 단백질의 분비를 지시하는 신호펩타이드를 의미한다. 상기 신호펩타이드는 숙주 세포에서 번역된 후에 절단된다. 구체적으로, 상기 신호서열은 ER(Endoplasmic reticulum) 막을 관통하는 단백질의 이동을 개시하는 아미노산 서열이다.
- [85] 상기 신호서열은 당업계에 그 특징이 잘 알려져 있으며, 통상 16 내지 30개의 아미노산 잔기를 포함하나, 그보다 더 많거나 적은 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 통상적인 신호 펩타이드는 기본 N-말단 영역, 중심의 소수성 영역, 및 보다 극성인(polar) C-말단 영역의 세 영역으로 구성된다. 중심 소수성 영역은 미성숙 폴리펩타이드가 이동하는 동안 막지질 이중층을 통하여 신호서열을 고정시키는 4 내지 12개의 소수성 잔기를 포함한다.
- [86] 개시 이후에, 신호서열은 흔히 신호 펩티다아제(Signal peptidases)로 알려진 세포 효소에 의하여 ER의 루멘(Lumen) 내에서 절단된다. 이때, 상기 신호서열은 tPa(Tissue Plasminogen Activation), HSV gDs(Signal sequence of Herpes simplex virus glycoprotein D), 또는 성장 호르몬(Growth hormone)의 분비신호서열일 수 있다. 바람직하게, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵 세포에서 사용되는 분비 신호서열을 사용할 수 있다. 또한, 상기 신호서열은 야생형 신호서열을 사용하거나, 숙주세포에서 발현 빈도가 높은 코돈으로 치환하여 사용할 수 있다.
- [87] 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 적재된 벡터

- [88] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [89] 상기 벡터는 숙주 세포에 도입되어 숙주 세포 유전체 내로 재조합 및 삽입될 수 있다. 또는 상기 벡터는 에피솜으로서 자발적으로 복제될 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 수단으로 이해된다. 상기 벡터는 선형 핵산, 플라스미드, 파지미드, 코스미드, RNA 벡터, 바이러스 벡터 및 이의 유사체들을 포함한다. 바이러스 벡터의 예로는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 및 아데노-관련 바이러스를 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [90] 구체적으로, 상기 벡터는 플라스미드 DNA, 파아지 DNA 등이 될 수 있고, 상업적으로 개발된 플라스미드(pUC18, pBAD, pIDTSAMRT-AMP 등), 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pBR325, pUC118, pUC119 등), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(pUB110, pTP5 등), 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24, YCp50 등), 파아지 DNA(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt10, λgt11, λZAP 등), 동물 바이러스 벡터(레트로바이러스(Retrovirus), 아데노바이러스(Adenovirus), 백시니아 바이러스(Vaccinia virus) 등), 곤충 바이러스 벡터(배큘로바이러스(Baculovirus) 등)이 될 수 있다. 상기 벡터는 숙주 세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용함이 바람직하다.
- [91] 본 명세서에서 용어, 목적 단백질의 "유전자 발현" 또는 "발현"은, DNA 서열의 전사, mRNA 전사체의 번역 및 융합단백질 생산물 또는 이의 단편의 분비를 의미하는 것으로 이해된다. 유용한 발현 벡터는 RcCMV(Invitrogen, Carlsbad) 또는 이의 변이체일 수 있다. 상기 발현 벡터는 포유류 세포에서 목적 유전자의 연속적인 전사를 촉진하기 위한 인간 CMV(Cytomegalovirus) 프로모터, 및 전사 후 RNA의 안정상태 수준을 높이기 위한 우태 성장 인자(Bovine growth hormone) 폴리아데닐레이션 신호서열을 포함할 수 있다.
- [92] **융합단백질을 발현하는 형질전환된 세포**
- [93] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 벡터가 도입된 형질전환 세포를 제공한다.
- [94] 상기 형질전환 세포의 숙주세포로서, 원핵세포, 진핵세포, 포유동물, 식물, 곤충, 균류 또는 세포성 기원의 세포를 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 상기 원핵세포의 일 예로는 대장균을 사용할 수 있다. 또한, 진핵세포의 일 예로는 효모를 사용할 수 있다. 또한, 상기 포유동물 세포로 CHO 세포, F2N 세포, CSO 세포, BHK 세포, 바우스(Bowes) 흑색종 세포, HeLa 세포, 911 세포, AT1080 세포, A549 세포, HEK 293 세포 또는 HEK293T 세포 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 당업자에게 알려진 포유동물 숙주세포로 사용 가능한 세포는 모두 이용 가능하다.
- [95] 또한, 숙주세포로 발현벡터를 도입하는 경우, CaCl₂ 침전법, CaCl₂ 침전법에 DMSO(Dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(Electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘

카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 텍스트란 셀페이브, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 사용될 수 있다.

[96] 전술한 바와 같이, 융합단백질의 치료제로서의 특성을 최적화하거나 기타 다른 목적을 위해 호스트 세포가 갖고 있는 당화(Glycosylation) 관련 유전자를 당업자에게 알려져 있는 방법을 통해 조작하여 융합단백질의 당쇄 패턴(예를 들어, 시알산, 푸코실화, 당화)을 조정할 수 있다.

[97] **융합단백질 생산 방법**

[98] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 형질전환 세포를 배양하는 단계를 포함하는 CR1g의 세포외도메인 또는 이의 단편; 및 CD59 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

[99] 구체적으로, 상기 생산 방법은 i) 상기 형질전환 세포를 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및 ii) 상기 배양물로부터 융합단백질을 회수하는 단계를 포함할 수 있다.

[100] 상기 형질전환 세포를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로, 상기 배양은 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(Fed batch 또는 Repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있다.

[101] **융합단백질 또는 이의 이량체의 용도**

[102] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 융합단백질 또는 상기 융합단백질 2개가 결합된 융합단백질 이량체를 유효성분으로 포함하는 안질환 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[103] 상기 융합단백질 및 융합단백질 이량체는 상술한 바와 같다.

[104] 본 명세서에서 사용한 용어, "안질환"은 눈을 발병 부위로 하는 질병을 총칭하는 것일 수 있다. 상기 안질환은 보체 활성화 또는 혈관신생으로 인해 촉발 또는 악화되는 안질환 또는 과도한 혈관신생을 주요 병증으로 포함하는 안질환을 의미할 수 있다.

[105] 상기 안질환은 노화-관련 황반 변성(AMD), 지도모양 위축증(GA), 맥락막 혈관신생(CNV), 포도막염, 당뇨병성 및 다른 허혈-관련 망막증, 당뇨병성 황반 부종, 병리적 근시, 폰 힉펠-린다우병, 눈의 히스토플라스마증, 망막 중심 정맥 폐색(CRVO), 각막 혈관신생 및 망막 혈관신생으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.

[106] 상기 CR1g의 세포외도메인 또는 이의 단편, CD59 또는 이의 변이체는 상술한 바와 같다.

[107] 상기 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 안질환 치료용 또는 예방용 약학 조성물에서 그 유효성분은 안질환 치료 활성을 나타내거나, 특히, 황반 변성에 치료 효과를 나타낼 수 있는

한, 용도, 제형, 배합 목적 등에 따라 임의의 양(유효량)으로 포함될 수 있는데, 통상적인 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001 중량% 내지 20.0 중량% 범위 내에서 결정될 것이다. 본 명세서에서 사용한 용어, "유효량"이란 안질환의 상태 개선 또는 치료(Treatment) 효과, 특히 황반 변성의 상태 개선 또는 치료 효과를 유도할 수 있는 유효성분의 양을 말한다. 이러한 유효량은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 실험적으로 결정될 수 있다.

- [108] 본 명세서에서 사용한 용어, "치료"는 치료학적 처리 및 예방적 처리를 모두 포함하는 의미로 사용될 수 있다. 이때, 예방은 개체의 병리학적 상태 또는 질환을 완화시키거나 감소시키는 의미로 사용될 수 있다. 일 구체예에서, 용어 "치료"는 인간을 포함한 포유류에서 질환을 치료하기 위한 적용이나 어떠한 형태의 투약을 모두 포함한다. 또한, 상기 용어는 질환 또는 질환의 진행을 억제하거나 늦추는 것을 포함하며; 손상되거나, 결손된 기능을 회복시키거나, 수리하여, 질환을 부분적이거나 완전하게 완화시키거나; 또는 비효율적인 프로세스를 자극하거나; 심각한 질환을 완화하는 의미를 포함한다.
- [109] 생체이용률과 같은 약동학적 파라미터(Pharmacokinetic parameters) 및 클리어런스율(Clearance rate)과 같은 기본적인 파라미터(Underlying parameters)도 효능에 영향을 줄 수 있다. 따라서, "향상된 효능"(예를 들어, 효능의 개선)은 향상된 약동학적 파라미터 및 향상된 효능에 기인할 수 있으며, 시험 동물 또는 인간 대상체에서 클리어런스율 및 안질환 치료 또는 개선과 같은 파라미터를 비교하여 측정될 수 있다.
- [110] 본 명세서에서 사용한 용어, "치료학적으로 유효한 양" 또는 "약학적으로 유효한 양"이란 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 화합물 또는 조성물의 양으로서, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미한다. 상기 유효량의 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 일 구체예에서 치료학적으로 유효한 양은 안질환을 치료하는데 효과적인 약물의 양을 의미한다.
- [111] 이때, 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 환자에게 전달하기에 적절한 비-독성 물질이면 어떠한 담체라도 가능하다. 증류수, 알코올, 지방, 왁스 및 비활성 고체가 담체로 포함될 수 있다. 약물학적으로 허용되는 애쥬번트(완충제, 분산제) 또한 약학 조성물에 포함될 수 있다.
- [112] 구체적으로, 상기 약학 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하여 당업계에 공지된 통상의 방법으로 투여 경로에 따라 비경구용 제형으로 제조될 수 있다. 여기서 "약제학적으로 허용되는" 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적용 가능한 이상의 독성을 지니지

않는다는 의미이다.

- [113] 상기 약학 조성물이 비경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 주사제, 경피 투여제, 비강 흡입제 및 좌제의 형태로 제제화될 수 있다. 주사제로 제제화할 경우 적합한 담체로서는 멸균수, 에탄올, 글리세롤이나 프로필렌 글리콜 등의 폴리올 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(Phosphate Buffered Saline)나 주사용 멸균수, 5% 덱스트로스 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 약제학적 조성물의 제제화와 관련하여서는 당업계에 공지되어 있으며, 구체적으로 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)] 등을 참조할 수 있다. 상기 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주된다.
- [114] 상기 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 성별, 연령, 환자의 중증도, 투여 경로에 따라 1일 0.01 ug/kg 내지 10 g/kg 범위, 또는 0.01 mg/kg 내지 1 g/kg 범위일 수 있다. 투여는 1 일 1 회 또는 수회로 나누어 이루어질 수 있다. 이러한 투여량은 어떠한 측면으로든 본원 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 아니 된다.
- [115] 상기 약학 조성물이 적용(처방)될 수 있는 대상은 포유동물 및 사람이며, 특히 사람인 경우가 바람직하다. 본원의 약학 조성물은 유효성분 이외에, 안질환, 특히 황반 변성 치료 효과를 갖는 것으로 공지된 임의의 화합물이나 천연 추출물을 추가로 포함할 수 있다.
- [116] 본 발명의 또 다른 측면은, 안질환을 치료하기 위한 CR1g의 세포외도메인 또는 이의 단편; 및 CD59 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질 또는 이의 이량체의 용도를 제공한다.
- [117] 본 발명의 또 다른 측면은, 안질환 치료 또는 예방용 약제를 제조하기 위한 CR1g의 세포외도메인 또는 이의 단편; 및 CD59 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질 또는 이의 이량체의 용도를 제공한다.
- [118] 본 발명의 또 다른 측면은, CR1g의 세포외도메인 또는 이의 단편; 및 CD59 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질 또는 이의 이량체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 안질환을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [119] 상기 융합단백질, 이량체 및 안질환은 상술한 바와 같다. 이때, 상기 개체는 안질환을 앓고 있는 개체일 수 있다. 또한 상기 개체는 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [120] 상기 융합단백질 또는 융합단백질 이량체의 투여경로, 투여량 및 투여횟수는 환자의 상태 및 부작용의 유무에 따라 다양한 방법 및 양으로 대상에게 투여될 수 있고, 최적의 투여방법, 투여량 및 투여횟수는 통상의 기술자가 적절한 범위로 선택할 수 있다. 또한, 상기 융합단백질 또는 융합단백질 이량체는 치료하고자 하는 질환에 대하여 치료효과가 공지된 다른 약물 또는 생리학적 활성물질과 병용하여 투여되거나, 다른 약물과의 조합 제제 형태로 제형화될 수 있다.

[121] 일 실시예에 있어서, 상기 융합단백질은 보체 경로, 식균 작용 및/또는 혈관신생을 저해할 수 있다. 따라서, 습성 또는 건성 황반 변성과 같은 안질환에 효과적으로 활용할 수 있다. 특히, CR1g의 세포외도메인 또는 이의 단편; 및 CD59 또는 이의 변이체를 조합한 경우가, 하나를 포함한 경우보다 효과가 더 높고 시너지 효과 또한 존재하는 것이 확인되었다. 따라서, 상기 융합단백질은 보체경로 및 혈관신생을 효과적으로 저해하여 건성 및 습성 황반 변성을 효과적으로 치료할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[122] 이하, 본원 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본원 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본원 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[123] 제조예 1. CR1g를 포함하는 융합단백질의 제조

[124] [표1]

Code	Format	Description	해당서열
C2.01	Fc-fusion	hu CR1g-hu IgG1 Fc DANG	서열번호 1
C2.02	Fc-fusion	hu CR1g-hu IgG1 Fc DANG-hu CD59(K66Q)	서열번호 2
C2.03	Fc-fusion	hu CR1g-hu IgG1 Fc DANG-hu CD59(H69Q)	서열번호 3
C2.04	Fc-fusion	hu CR1g-hu IgG1 Fc DANG-hu CD59(H69Q) without c-terminal propeptide	서열번호 4
C2.05	Fc-fusion	hu IgG1 Fc DANG	서열번호 5
C2.06	Fc-fusion	hu IgG1 Fc DANG-hu CD59(K66Q)	서열번호 6
C2.07	Fc-fusion	hu IgG1 Fc DANG-hu CD59(H69Q)	서열번호 7
C2.08	Fc-fusion	hu IgG1 Fc DANG-hu CD59(K66A) ₂	서열번호 8
C2.09	Fc-fusion	hu IgG1 Fc DANG-hu CD59(K66A) ₃	서열번호 9
C2.10	Fc-fusion	hu CD59(H69Q)-hu IgG1 Fc DANG	서열번호 10
C2.11	Fc-fusion	hu CD59(H69Q)-hu IgG1 Fc DANG-hu CR1g	서열번호 11
C2.12	Fc-fusion	hu IgG1 Fc DANG-hu CR1g	서열번호 12
C2.13	recombinant protein	hu CD59(26 내지 102)-his tag	서열번호 13
C2.14	recombinant protein	his tag-hu CD59(26 내지 102)	서열번호 14
C2.15	recombinant protein	hu CD59(26 내지 95)-his tag	서열번호 15
C2.16	recombinant protein	his tag-hu CD59(26 내지 95)	서열번호 16
C2.01m	Fc-fusion	mu CR1g-mu IgG2a Fc DANG	서열번호 17
C2.04m	Fc-fusion	mu CR1g-mu IgG2a Fc DANG-mu CD59a	서열번호 18
C2.05m	Fc-fusion	mu IgG2a Fc DANG	서열번호 19

C2.07m	Fc-fusion	mu IgG2a Fc DANG-mu CD59a	서열번호 20
C2.10m	Fc-fusion	mu CD59a-mu IgG2a Fc DANG	서열번호 21
C2.11m	Fc-fusion	mu CD59a-mu IgG2a Fc DANG-mu CR1g	서열번호 22
C2.12m	Fc-fusion	mu IgG2a Fc DANG-mu CR1g	서열번호 23

- [125] C2.01(서열번호 1)은 사람 CR1g 단백질의 세포외도메인 영역(20 내지 283) 및 링커 및 DANG 변이(D265A, N297G)를 통해 이펙터 기능을 제거한 사람 IgG1 Fc로 구성된다.
- [126] C2.02(서열번호 2)는 사람 CR1g 단백질의 세포외도메인 영역(20 내지 283), 링커 및 사람 IgG1 Fc DANG, 링커 및 항상 활성화된 형태가 되도록 66번 라이신(K)을 글루타민(Q)으로 변이한 CD59(K66Q)로 구성된다.
- [127] C2.03(서열번호 3)은 사람 CR1g 단백질의 세포외도메인 영역(20 내지 283), 링커, 사람 IgG1 Fc DANG 및 항상 활성화된 형태가 되도록 69번 히스티딘(H)을 글루타민(Q)으로 변이한 CD59(H69Q)로 구성된다.
- [128] C2.04(서열번호 4)는 사람 CR1g 단백질의 세포외도메인 영역(20 내지 283), 링커, 사람 IgG1 Fc DANG, 링커 및 항상 활성화된 형태가 되도록 69번 히스티딘(H)을 글루타민(Q)으로 변이한 CD59(H69Q)에서 c-말단 프로펩타이드(c-terminal propeptide)(103 내지 128)가 제거된 것으로 구성된다.
- [129] C2.05(서열번호 5)는 사람 IgG1 Fc DANG으로 구성된다.
- [130] C2.06(서열번호 6)은 사람 IgG1 Fc DANG, 링커 및 항상 활성화된 형태가 되도록 66번 라이신(K)을 글루타민(Q)으로 변이한 CD59(K66Q)로 구성된다.
- [131] C2.07(서열번호 7)은 사람 IgG1 Fc DANG, 링커 및 활성화된 형태가 되도록 69번 히스티딘(H)을 글루타민(Q)으로 변이한 CD59(H69Q)로 구성된다.
- [132] C2.08(서열번호 8)은 사람 IgG1 Fc DANG, 링커, 당화를 막기 위해 66번 라이신(K)을 알라닌(A)으로 변이한 CD59(K66A), 링커 및 당화를 막기 위해 66번 라이신(K)을 알라닌(A)으로 변이한 CD59(K66A)로 구성된다.
- [133] C2.09(서열번호 9)는 사람 IgG1 Fc DANG, 링커, 당화를 막기 위해 66번 라이신(K)을 알라닌(A)으로 변이한 CD59(K66A), 링커, 당화를 막기 위해 66번 라이신(K)을 알라닌(A)으로 변이한 CD59(K66A), 링커 및 당화를 막기 위해 66번 라이신(K)을 알라닌(A)으로 변이한 CD59(K66A)로 반복 구성된다.
- [134] C2.10(서열번호 10)은 항상 활성화된 형태가 되도록 69번 히스티딘(H)을 글루타민(Q)으로 변이한 CD59(H69Q), 링커 및 사람 IgG1 Fc DANG으로 구성된다.

- [135] C2.11(서열번호 11)은 항상 활성화된 형태가 되도록 69번 히스티딘(H)을 글루타민(Q)으로 변이한 CD59(H69Q), 링커, 사람 IgG1 Fc DANG 및 사람 CR1g 단백질의 세포외도메인 영역(20 내지 283)으로 구성된다.
- [136] C2.12(서열번호 12)는 사람 IgG1 Fc DANG 및 사람 CR1g 단백질의 세포외도메인 영역(20 내지 283)으로 구성된다.
- [137] C2.13(서열번호 13)은 사람 CD59 단백질(26 내지 102) 및 폴리 히스티딘 태그로 구성된다.
- [138] C2.14(서열번호 14)는 폴리 히스티딘 태그 및 사람 CD59 단백질(26 내지 102)로 구성된다.
- [139] C2.15(서열번호 15)은 사람 CD59 단백질(26 내지 95) 및 폴리 히스티딘 태그로 구성된다.
- [140] C2.16(서열번호 16)은 폴리 히스티딘 태그 및 사람 CD59 단백질(26 내지 95)로 구성된다.
- [141] C2.01m(서열번호 17)은 마우스 CR1g 단백질의 세포외도메인 영역(20 내지 187), 링커 및 DANG 변이(D265A, N297G)를 통해 이펙터 기능을 제거한 마우스 IgG2a Fc로 구성된다.
- [142] C2.04m(서열번호 18)은 마우스 CR1g 단백질의 세포외도메인 영역(20 내지 187), 링커, 마우스 IgG2a Fc DANG 후면에 링커 및 마우스 CD59a를 추가한 것으로 구성된다.
- [143] C2.05m(서열번호 19)은 마우스 IgG2a Fc DANG만으로 구성된다.
- [144] C2.07m(서열번호 20)은 마우스 IgG2a Fc DANG, 링커 및 마우스 CD59a로 구성된다.
- [145] C2.10m(서열번호 21)은 마우스 CD59a, 링커 및 마우스 IgG2a Fc DANG로 구성된다.
- [146] C2.11m(서열번호 22)은 마우스 CD59a, 링커, 마우스 IgG2a Fc DANG, 링커 및 마우스 CR1g 단백질의 세포외도메인 영역(20 내지 187)로 구성된다.
- [147] C2.12m(서열번호 23)은 마우스 IgG2a Fc DANG, 링커 및 마우스 CR1g 단백질의 세포외도메인 영역(20 내지 187)로 구성된다.
- [148] **[서열번호 1] hu CR1g-hu IgG1 Fc DANG**
- [149] RPILVPEPVTGPWKGVDVNLPCYDPLQGYTQVLVKWLVQRGSDPVTIFLRD
SSGDHIQQAQYQGRHLVSHKVPDVSLLQLSTLEMDDDRSHYTCEVTWQTPDGN
QVVRDKITELRVQKLSVSKPTVTTGSGYGFTVPQGMRLSLQCQARGSPPIYIW
YKQQTNNQEPIKVATLSTLLFKPAVIADSGSYFCTAKGQVGSEQHSDIVKFVV
KDSSKLLKTKTEAPTTMTYPLKATSTVKQSWDWTDMGYLGETSAGPGKSL
PGGGGSDKTHTCPPEPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEOYGSTYRVVSVLTVLHODWLNKG
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGPREPQVYTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFS

CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK[150] [서열번호 2] **hu CR1g-hu IgG1 Fc DANG**-hu CD59(K66Q)

[151] RPILEVPESVTGPWKGVDNLPCTYDPLQGYTQVLVKWLVQRGSDPVTIFLRD
 SSGDHIQQAKYQGRHLVSHKVPGDVSLQLSTLEMDDRSHYTCEVTWQTPDGN
 QVVRDKITELRVQKLSVSKPTVTTGSGYGFTVPQGMRISLQCQARGSPPISYIW
 YKQQTNNQEPIKVATLSTLLFKPAVIADSGSYFCTAKGQVGSEQHSDIVKFVV
 KDSSKLLKTKTEAPTTMTYPLKATSTVKQSWDWTTDMDGYLGETSAGPGKSL
PGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHODWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQOQNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSLQCYNCPNPTADCKTAVNC
 SSDFDACLITKAGLQVYNKCWQFEHCNFNDVTTRLRENELTYCYCKKDLNCF
 NEQLENGGTSLEKTVLLLVTPLAAAWSLHP

[152] [서열번호 3] **hu CR1g-hu IgG1 Fc DANG**-hu CD59(H69Q)

[153] RPILEVPESVTGPWKGVDNLPCTYDPLQGYTQVLVKWLVQRGSDPVTIFLRD
 SSGDHIQQAKYQGRHLVSHKVPGDVSLQLSTLEMDDRSHYTCEVTWQTPDGN
 QVVRDKITELRVQKLSVSKPTVTTGSGYGFTVPQGMRISLQCQARGSPPISYIW
 YKQQTNNQEPIKVATLSTLLFKPAVIADSGSYFCTAKGQVGSEQHSDIVKFVV
 KDSSKLLKTKTEAPTTMTYPLKATSTVKQSWDWTTDMDGYLGETSAGPGKSL
PGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHODWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQOQNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSLQCYNCPNPTADCKTAVNC
 SSDFDACLITKAGLQVYNKCWKFEQCNFNDVTTRLRENELTYCYCKKDLNCF
 NEQLENGGTSLEKTVLLLVTPLAAAWSLHP

[154] [서열번호 4] **hu CR1g-hu IgG1 Fc DANG**-hu CD59(H69Q) without c-terminal propeptide

[155] RPILEVPESVTGPWKGVDNLPCTYDPLQGYTQVLVKWLVQRGSDPVTIFLRD
 SSGDHIQQAKYQGRHLVSHKVPGDVSLQLSTLEMDDRSHYTCEVTWQTPDGN
 QVVRDKITELRVQKLSVSKPTVTTGSGYGFTVPQGMRISLQCQARGSPPISYIW
 YKQQTNNQEPIKVATLSTLLFKPAVIADSGSYFCTAKGQVGSEQHSDIVKFVV
 KDSSKLLKTKTEAPTTMTYPLKATSTVKQSWDWTTDMDGYLGETSAGPGKSL
PGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHODWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQOQNVFSCS

VMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSLQCYNCPNPTADCKTAVNCSS
DFDACLITKAGLQVYNKCWKFEQCNFNVDVTTTLRENELTYYCCKKDLCNFNE
QLEN

[156] [서열번호 5] **hu IgG1 Fc DANG**

[157] SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYGSTYRVVSVLTVLHODWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTT
PPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[158] [서열번호 6] **hu IgG1 Fc DANG-hu CD59(K66Q)**

[159] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHODWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSLQCYNCPNPTADCKTAVNCSSDFDA
CLITKAGLQVYNKCWQFEHCNFDVTTTLRENELTYYCCKKDLCNFNEQLEN
GGTSLSEKTVLLL VTPFLAAAWSLHP

[160] [서열번호 7] **hu IgG1 Fc DANG-hu CD59(H69Q)**

[161] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHODWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSLQCYNCPNPTADCKTAVNCSSDFDA
CLITKAGLQVYNKCWKFEQCNFNVDVTTTLRENELTYYCCKKDLCNFNEQLEN
GGTSLSEKTVLLL VTPFLAAAWSLHP

[162] [서열번호 8] **hu IgG1 Fc DANG-hu CD59(K66A)2**

[163] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHODWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGSSGGGGSGGGGSLQCYNCPNPTADCKTAVNCSSDFD
ACLITKAGLQVYNKCWAFEHCNFDVTTTLRENELTYYCCKKDLCNFNEQLE
NSSGGGGSGGGGSGGGGSLQCYNCPNPTADCKTAVNCSSDFDACLITKAGL
QVYNKCWAFEHCNFDVTTTLRENELTYYCCKKDLCNFNEQLEN

[164] [서열번호 9] **hu IgG1 Fc DANG-hu CD59(K66A)3**

[165] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHODWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHE

ALHNHYTQKSLSLSPGSSGGGSSGGGSSLQCYNCPNPTADCKTAVNCSSDFD
ACLITKAGLQVYNKCWAFEHCNFNDVTTRLRENELTYYCCKKDLCNFNEQLE
NSSGGGSSGGGSSGGGSSLQCYNCPNPTADCKTAVNCSSDFDACLITKAGL
QVYNKCWAFEHCNFNDVTTRLRENELTYYCCKKDLCNFNEQLENSGGGSS
GGGSSGGGSSLQCYNCPNPTADCKTAVNCSSDFDACLITKAGLQVYNKCWA
FEHCNFNDVTTRLRENELTYYCCKKDLCNFNEQLE

[166] [서열번호 10] hu CD59(H69Q)-hu IgG1 Fc DANG

[167] LQCYNCPNPTADCKTAVNCSSDFDACLITKAGLQVYNKCWKFEQCNFNDVT
TRLRENELTYYCCKKDLCNFNEQLENGGGSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYGSTYRVVSVLTVLHODWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGPREP
QVYTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[168] [서열번호 11] hu CD59(H69Q)-hu IgG1 Fc DANG-hu CR1g

[169] LQCYNCPNPTADCKTAVNCSSDFDACLITKAGLQVYNKCWKFEQCNFNDVT
TRLRENELTYYCCKKDLCNFNEQLENGGGSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYGSTYRVVSVLTVLHODWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGPREP
QVYTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSS
GGGSSRPILEVPESVTGPWKGDVNLPCYDPLQGYTQVLVKWLVRGSDPVT
IFLRDSSGDHIQQAQYQGRHLVSHKVPGDVSLQLSTLEMDDRSHYTCEVTWQ
TPDGNQVVRDKITELRVQKLSVSKPTVTTGSGYGFTVPQGMRISLQCQARGSP
PISYIWKQQTNNQEPIKVATLSTLLFKPAVIADSGSYFCTAKGQVGSEQHSI
VKFVVKDSSKLLKTKTEAPTTMTYPLKATSTVKQSWDWTDMGYLGETSA
GPGKSLPG

[170] [서열번호 12] hu IgG1 Fc DANG-hu CR1g

[171] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHODWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGPREPQVYTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGGGGSSGGGSSRPILEVPESVTGPWKGDVNLPCYD
LQGYTQVLVKWLVRGSDPVTIFLRDSSGDHIQQAQYQGRHLVSHKVPGDV
LQLSTLEMDDRSHYTCEVTWQTPDGNQVVRDKITELRVQKLSVSKPTVTTG
SGYGFTVPQGMRISLQCQARGSP
PISYIWKQQTNNQEPIKVATLSTLLFKPAVI
ADSGSYFCTAKGQVGSEQHSI
VKFVVKDSSKLLKTKTEAPTTMTYPLKATST
VKQSWDWTDMGYLGETSAGPGKSLPG

[172] [서열번호 13] hu CD59(26-102)-his tag

[173] LQCYNCPNPTADCKTAVNCSSDFDAKLITKAGLQVYNKCWKFEHCNFNDVT
TRLRENELTYCCKKDLCNFNEQLENHHHHHHHHH

[174] [서열번호 14] his tag-hu CD59(26-102)

[175] HHHHHHHHLQCYNCPNPTADCKTAVNCSSDFDAKLITKAGLQVYNKCWKFEHCNFNDVT
TRLRENELTYCCKKDLCNFNEQLEN

[176] [서열번호 15] hu CD59(26-95)-his tag

[177] LQCYNCPNPTADCKTAVNCSSDFDAKLITKAGLQVYNKCWKFEHCNFNDVT
TRLRENELTYCCKKDLCNHHHHHHHHH

[178] [서열번호 16] his tag-hu CD59(26-95)

[179] HHHHHHHHLQCYNCPNPTADCKTAVNCSSDFDAKLITKAGLQVYNKCWKFEHCNFNDVT
TRLRENELTYCCKKDLCN

[180] [서열번호 17] mu CRIG-mu IgG2a Fc DANG

[181] HPTLKTPE SVTGTWKG DVKIQCIYDPLRGYRQVLVKWLV RHGSDSVTIFLRD
STGDHIQQA KYRGR LK VSHK VPGDVSLQINTLQMDDR NHYTCEVTWQTPDG
NQVIRDKIIELRVRKYNPPRINTEAPTTLHSSLEATTIMSS TSDLT TNGTGKLEET
IAGSGRNLP GGGGSEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL MIS
LSPIVTCVVVA VSEDDPDVOISWVFN NVEVHTAQTQTHRE DYGSTLRVVSALP
IQHODWMSGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISKPKGSVRAPOVYVLPPEEEMTK
KQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVL DSDGSYFMYSKLR
VEKKNWVERN SYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

[182] [서열번호 18] mu CRIG-mu IgG2a Fc DANG-mu CD59a

[183] HPTLKTPE SVTGTWKG DVKIQCIYDPLRGYRQVLVKWLV RHGSDSVTIFLRD
STGDHIQQA KYRGR LK VSHK VPGDVSLQINTLQMDDR NHYTCEVTWQTPDG
NQVIRDKIIELRVRKYNPPRINTEAPTTLHSSLEATTIMSS TSDLT TNGTGKLEET
IAGSGRNLP GGGGSEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL MISL
SPIVTCVVVA VSEDDPDVOISWVFN NVEVHTAQTQTHRE DYGSTLRVVSALPI
QHODWMSGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISKPKGSVRAPOVYVLPPEEEMTK
KQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVL DSDGSYFMYSKLR
VEKKNWVERN SYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGGGGSGGGGSLTCYHC
FQPVVSSCNMNSTCSPDQDSCLYAVAGMQVYQRCWKQSDCHGEIIMDQLEET
KLKFRCCQFNLCNKS

[184] [서열번호 19] mu IgG2a Fc DANG

[185] APNLLGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVA VSEDDPDVOISWVFN NVEV
HTAQTQTHRE DYGSTLRVVSALPIQHODWMSGKEFKCKVNNKDL PAPIERTIS
KPKGSVRAPOVYVLPPEEEMTKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTEL
NYKNTEPVL DSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERN SYSCSVVHEGLHNHHTTKS
SRTPGK

[186] [서열번호 20] mu IgG2a Fc DANG-mu CD59a

[187] EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVAIVED
DPDVQISWVNNVEVHTAQTOHREDYGSTLRVVSALPIQHODWMSGKEFKC
KVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPOVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMP
EDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCS
VVHEGLHNHHTTKSFSRTPGGGGSGGGSLTCYHCFQPVVSSCNMNSTCSP
DQDSCLYAVAGMQVYQRCWKQSDCHGEIIMDQLEETKLKFRCCQFNLCNKS

[188] [서열번호 21] mu CD59a-mu IgG2a Fc DANG

[189] LTCYHCFQPVVSSCNMNSTCSPDQDSCLYAVAGMQVYQRCWKQSDCHGEI
MDQLEETKLKFRCCQFNLCNKSGGGGSEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSV
FIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVAIVEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTOHRE
DYGSTLRVVSALPIQHODWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPO
VYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLD
SDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG

[190] [서열번호 22] mu CD59a-mu IgG2a Fc DANG-mu CRIG

[191] LTCYHCFQPVVSSCNMNSTCSPDQDSCLYAVAGMQVYQRCWKQSDCHGEI
MDQLEETKLKFRCCQFNLCNKSGGGGSEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSV
FIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVAIVEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTOHRE
DYGSTLRVVSALPIQHODWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPO
VYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLD
SDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGGGG
SGGGSHPTLKTPE SVTGTWKGDVKIQCIYDPLRGYRQVLVKWLV RHGSDSV
TIFLRDSTGDHIQQA KYRGR LKVSHKVP GDVSLQINTLQMDDRNHYTCEVTW
QTPDGNQVIRDKIIELRVRKYNPPRINTEAPTTLHSSLEATTIMSSTSDLTTNGT
GKLEETIAGSGRNLPG

[192] [서열번호 23] mu IgG2a Fc DANG-mu CRIG

[193] EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVAIVED
DPDVQISWVNNVEVHTAQTOHREDYGSTLRVVSALPIQHODWMSGKEFKC
KVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPOVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMP
EDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCS
VVHEGLHNHHTTKSFSRTPGGGGSGGGSHPTLKTPE SVTGTWKGDVKIQ
IYDPLRGYRQVLVKWLV RHGSDSVTIFLRDSTGDHIQQA KYRGR LKVSHKVP
GDVSLQINTLQMDDRNHYTCEVTWQTPDGNQVIRDKIIELRVRKYNPPRINTE
APTTLHSSLEATTIMSSTSDLTTNGTGKLEETIAGSGRNLPG

[194] 제조예 2. 인간 단백질 및 마우스 단백질(C2.10m 내지 C2.12m)의 제조

[195] 제조예 2.1. 벡터 구성과 플라스미드 맥시-프렙

[196] 하기 표 2 및 표 3은 사용한 시약 및 장비를 기재하였다.

[197] [표2]

시약	제조사	Catalog#
pTT5	chempartner	
In-Fusion HD cloning kit	Clontech	639648
Accuprime pfx DNA polymerase	Invitrogen	12344-04
Gel DNA fragment purification Kit	TaKaRa	D823A
FastDigest® BamHI	Fermentas	FD0055
FastDigest® EcoRI	Fermentas	FD0275

[198] [표3]

장비 및 도구	제조사	모델명
생물 안전 작업대	NUAIRE	LabGard class II
원심분리기	Eppendorf	5424
젤 이미징 시스템	Tanon	2500R

[199] PCR을 통해 합성한 DNA 단편을 증폭시키고, PCR 생성물을 젤로 정제하였다. 제한효소 EcoRI와 BamHI로 pTT5 벡터를 자르고 난 후 젤을 정제하였다. In-Fusion Kit를 이용해 각각의 PCR 생성물과 선형 벡터를 연결하였다. 생성된 벡터를 ECOS101 DH5α competent cell에 형질전환 시키고, 100 µg/ml 엠프실린을 함유하는 2xYT 한천 판에 배양하였다. 모든 조작 과정은 표준 형질 전환 프로토콜을 따라 수행하였다. 콜로니 PCR로 양성 재조합체를 확인하고, 재조합 플라스미드를 sequence-verify sequencing를 수행하였다. 단일 콜로니를 선택하여 100 µg/ml 엠프실린을 함유하는 5 mL 2 x YT 배지에 종균을 접종하였다. 37°C에서 8시간 동안 흔들며 배양하였다.

[200] 이후, 종균을 1:1,000의 비율로 200 mL의 선택적 2 x YT 배지에 희석하였다. 37°C에서 16시간 동안 흔들면서 배양하였다. 4°C 4,700 rpm에서 10분동안 원심 분리하여 박테리아 세포를 수확하였다. 12 mL의 RES-EF 용액에 박테리아 펠릿을 재부유시켰다. 그 후, 12 mL의 LYS-EF 용액을 첨가하고, 밀봉한 튜브를 힘차게 뒤집어 완전히 혼합한 뒤, 실온에서 5분간 배양하였다. 12 mL의 NEU-EF 용액을 용해물에 첨가하고, 힘차게 뒤집어 빠르게 완전히 혼합하였다.

[201] NucleoBond® Xtra 컬럼 필터에 용해물을 주입하기 전, 필터의 막힘을 방지하기 위해 용해물 튜브를 3번 정도 뒤집어 침전물의 균질한 현탁을 제조하였다. 그 후, 10 mL의 필터 세척 용액 FIL-EF로 NucleoBond® Xtra 컬럼 필터와 NucleoBond® Xtra 컬럼을 세척하였다. NucleoBond® Xtra 컬럼 필터를 빼내거나 컬럼을 거꾸로 뒤집어 제거하였다. 90 mL의 세척 용액 ENDO로 NucleoBond® Xtra 컬럼을 세척하였다.

- [202] 45 mL의 세척 용액 WASH-EF로 NucleoBond® Xtra 컬럼을 세척하였다. 15 mL의 용출 용액 ELU로 플라스미드 DNA를 용출시켰다. 용출액은 50 mL 원심분리 튜브에 수집하였다. 10.5 mL의 상온 이소프로판올을 첨가하여 용출된 플라스미드 DNA를 침전시켰다. 볼텍스 후, 혼합물을 2분간 그대로 방치하였다.
- [203] 그 후, 5 mL의 70% 에탄올을 펠릿에 첨가하였다. 파이펫 팁을 이용해 튜브에서 에탄올을 조심스럽게 완전히 제거하였다. 펠릿을 상온(20-25°C)에서 건조시켰다. 그 후, DNA 펠릿을 1,000 µl의 H₂O로 용해시켰다.

[204] **제조예 2.2. 세포 형질 주입과 단백질 발현**

[205] 하기 표 4에 사용한 재료 및 시약 기재하였다.

[206] [표4]

재료 및 시약	제조사(Product #)
293F cells	Invitrogen(R790-07)
OPM 293	OPM(81075-001)
Pluronic® F-68, 10%(100X)	Gibco(24040-032)
1 mg/ml PEI	Polyscience(23966)
OPTI MEM I	Gibco(31985088)
Peptone(20x)	FLUKA(P0521-1KG)
셰이커 플라스크	
ISF1-X 배양기 셰이커	Kuhner shaker

[207] 완전 배지를 넣은 293F seed strain을 130 rpm, 37°C 8% CO₂의 배양기 셰이커에서 유지하였다. 세포를 0.3 내지 0.4x10⁶ cells/ml의 밀도로 배양하고, 매 2 내지 3일마다 배지를 교환하였다. 형질 주입 24시간 전, 새로 계대 배양한 293F 세포를 2.6x10⁶ cells/ml로 준비하였다. 준비한 세포는 130 rpm, 37°C CO₂의 배양기 셰이커에서 배양하였다. 형질 주입 당일, 새로운 배지를 사용하여 5.0 x 10⁶ cells/ml의 밀도로 세포를 조정하였다. 3 L 셰이커 플라스크에서 1 L의 총 부피로 수행하였다. 0.4 mg HC 및 0.6 mg LC 플라스미드를 50 ml OPTI MEM I으로 희석하고, 0.22 µm 필터로 여과하였다. 그 후, 2 mg PEI를 50 mL OPTI MEM I으로 희석하여 형질 주입 시약을 준비하였다.

[208] 희석된 PEI를 DNA 혼합물에 첨가한 뒤, 즉시 혼합하였다. 이후 15분간 상온에서 배양하였다. 2.6x10⁶ cells/ml로 준비한 293F 세포에 DNA-PEI 혼합물을 첨가하였다. 이후 세포는 130 rpm, 37°C 8% CO₂의 배양기 셰이커에서 24시간 동안 계속 배양하였다. 형질 주입 24시간 후, 최종 농도가 0.5%가 되도록 배양액의 1/20에 10% peptone을 첨가하였다. 이후 세포는 130 rpm, 37°C 8% CO₂의 배양기 셰이커에서 계속 배양하였다. 형질 주입 후 2 내지 5일 기간에 매일 세포 밀도/생존 능력을 측정하고 기록하였다. 형질 주입 7일 후 또는 세포 생존

능력이 70% 미만에서 정제를 위해 세포를 수확하였다.

[209] 제조예 2.3. 단백질 정제(C2.01 내지 C2.03, C2.05 내지 C2.12 및 C2.10m 내지 C2.12m)

[210] 하기 표 5 내지 표 7은 단백질 정제를 위해 사용한 시약, 각 용액의 구성 및 장비를 기술하였다.

[211] [표5]

시약	제조사	Catalog#
Mabselect SuRe	GE Healthcare	11003493
Tris	SIGMA	77-86-1
NaCl	ACROS ORGANIVS	7647-14-5
Sodium citrate	Adamas-beta	76198B
Citric acid	GENERAL-Reage nt	G83162B
Arginine	VETEC	V900343-500G
Succinic acid	Sigma-Aldrich	S9512-500G
Triton X-100	ABCONE	X10010-1L
TRITON X-114	SIGMA-ALDRIC H	X114
Millex-GP Filter Unit 0.22 µm Sterile	MILLIPORE	SLGP033RS
NaOH	Merck	B146369740

[212] [표6]

용액 A	25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0
용액 B	25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.1% Triton X-114 pH 8.0
용액 C	100 mM Sodium Citrate, 150 mM NaCl, pH 3.0
용액 D	1 M Arginine, 400 mM Succinic acid, pH 9.0
용액 E	20 mM PB pH 6.5, 1 M(NH ₄) ₂ SO ₄
용액 F	20 mM PB pH 6.5, 25% isopropyl alcohol
최종용액	20 mM HEPES, pH 7.5, 240 mM sucrose 또는 20mM his acetate pH 5.5, 240 mM sucrose

[213] [표7]

기기	제조사	모델명
AKTA Pure	GE Healthcare	29-0182-24
원심분리기	Beckman	J-26xp
젤 이미징 시스템	Tanon	2500R
Sartopore 2 filter	Sartorius	5445307H9-OO-A

- [214] Mabselect sure 컬럼을 이용하여 단백질을 정제하였다. 구체적으로, 2,000xg, 4°C에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 수확하였다. 그 후, Sartopore 2 필터로 상층액을 여과하였다. 용액 A로 평형화된 5 ml MabSelect Sure 컬럼으로 정화된 상층액을 로딩하였다. 그 후, A280 흡광도가 기준치에 도달할 때까지 용액 A로 컬럼을 세척하였다. 10 CV 용액 B로 컬럼을 세척하였다. 10 CV 용액 A로 컬럼을 세척하였다. 6 CV 용액 C로 결합된 단백질을 용출하고, 1/6 부피의 용액 D를 넣어 용출한 물질을 중화하고, SDS-PAGE와 SEC-HPLC 분석을 진행하였다.
- [215] 그 후, HIC 컬럼을 통한 단백질을 정제하였다. 그 후, 밤새 4°C에서 용액 E에 대해 단백질을 투석하였다. 용액 E로 평형화된 HIC 컬럼에 상층액을 로딩하였다. 그 후, A280 흡광도가 기준치에 도달할 때까지 용액 E로 컬럼을 세척하였다. 기울기 용리(10 CV 용액 F 0%-40%)로 결합된 단백질을 용출하였다. 2 CV 100% 용액 F로 결합된 단백질을 용출하고, SDS-PAGE 분석을 진행하였다.
- [216] 단백질을 정제한 후 해당 단백질들을 한 군데로 모아준 후, 밤새 4°C에서 최종 용액에 대해 단백질을 투석하였다. 그 후, SDS-PAGE 및 SEC-HPLC 분석을 수행하였다.
- [217] 그 결과, 도 1 및 도 2에 나타낸 것과 같이, 정제된 C2.01 내지 C2.03, C2.05 내지 C2.12 및 C2.10m 내지 C2.12m 단백질을 SDS-PAGE로 확인하였다.
- [218] **제조예 2.4. 단백질 정제(C2.13 내지 C2.16)**
- [219] 하기 표 8 내지 표 10에 단백질 정제를 위해 사용한 시약, 용액의 구성 및 장비를 기술하였다.

[220] [표8]

시약	제조사	Cat.#	Lot#
His Trap™ excel	cytiva	17371206	10301622
PBS	Ambion	AM9626	148053
NaCl	ACROS ORGANIVS	7647-14-5	A0303894
Tris Base	VETEC	V900483-1KG	WXBC3183V
NaOH	Merck	B146369740	1.06469.1000
Imidazole	Sangon	228-32-4	FC11BA0017
Aarginine	GENERAL-REAGE NT	G80826C	P1123594
Succinic acid	GENERAL-REAGE NT	G14056D	P10416
Sodium citrate	Alfa Aesar	45556	S06A037
Triton X-114	Sigma	114-500ml	MKBM5296V
Triton X-100	Sigma	100-100ml	SLBJ8129V

[221] [표9]

기기	제조사	Model code
AKTA pure	GE Healthcare	11001313
HPLC	Waters	E2695
Centrifuge	Beckman	J-26xp

[222] [표10]

용액A	PBS, pH 7.4
용액B	PBS, pH 7.4 + 0.1% Triton X-114 + 0.1% Triton X-100
용액C	PBS, 500 mM Imidazole, pH 7.4
regeneration buffer	0.5M NaOH

[223] His Trap™ excel 컬럼을 통해 단백질을 정제하였다. 구체적으로, 4,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 상층액을 수확하였다. 그 후, Sartopore 2 필터로 상층액을 여과하였다. 용액 A로 평형화된 1 ml His Trap™ excel 컬럼으로 정화된 상층액을 로딩하였다. 용액 C로 해당 단백질을 용출한 뒤, SDS-PAGE 분석을 진행하였다. 최종 용액에 대해 단백질을 투석하고, MILLEX_MP 0.22 µm 멤브레인으로

여과하였다. 그 후, SDS-PAGE 및 SEC-HPLC 분석을 수행하였다.

- [224] 그 결과, 도 3에 나타낸 것과 같이, C2.13, C2.14, C2.15 및 C2.16 단백질이 성공적으로 합성되었음을 확인하였다.
- [225] 제조예 3. 인간 단백질(C2.04) 및 마우스 단백질(C2.01m, C2.04m, C2.05m, C2.07m)의 제조
- [226] 제조예 3.1. 단백질의 제조
- [227] 하기 표 11에 사용한 재료 및 시약을 기술하였다.
- [228] [표11]

재료 및 시약	제조사	Cat. #
Expi293F™ Cells	Gibco	A14527
Expi293™ Expression System Kit	Gibco	A14635
MabSelect SuRe	GE Lifesciences	17543803
Superdex 200 increase 10/300	GE Lifesciences	28990944
MPC™ Ceramic Hydroxyfluoroapatite	Bio-rad	1570200

- [229] 단백질 서열에 해당하는 DNA 단편을 Genewiz(No. 80-383034849)에서 합성하였다. 해당 DNA 단편을 PCR로 증폭시키고, 선형화된 pcDNA3.3 발현 벡터로 넣어주었다. 시퀀싱을 통해 구조를 검증한 뒤, 대규모의 플라스미드 제조과정으로 세포 형질 주입을 수행하기에 충분한 양의 DNA를 획득하였다.
- [230] 먼저 2 L의 세포 배양 배지에서 95% 이상 생존한 2.94x10⁶ cells/mL의 Expi293F 세포를 준비한다. 플라스미드 DNA와 ExpiFectamine™ 293 시약을 먼저 Opti-MEM에 희석한 다음 혼합하여 세포 배양 배지에 첨가하였다. 세포 배양은 150 rpm의 교반 속도로 platform shaker에서 진행하였다. 온도는 37°C CO₂ 농도는 8%로 유지하였다. 형질 주입 후 18 내지 20시간이 지나면 인헨서 1과 인헨서 2를 세포 배양 배지에 첨가하였다.
- [231] 세포 배양 6일 후, 세포를 4,000 rpm, 25°C에서 10분간 원심분리하였다. 정제 및 젤 전기영동을 위해 상층액을 수집하였다. 상층액은 NuPAGETM 4-12% Bis-Tris Protein Gels(ThermoFisher)에 관한 설명에 따라 SDS-PAGE 젤에 로딩하였다. 단백질의 분자량 측정을 위하여 단백질 시료와 함께 PageRuler™ Unstained Protein Ladder(ThermoFisher)이 사용되었다. 각 단백질의 남은 상층액은 이후 진행되는 정제과정에 사용되었다.
- [232] 단백질 정제는 다음과 같은 공정으로 수행하였다. 구체적으로, 단백질 A 컬럼(Protein A 컬럼)은 MabSelect Sure resin과 사전에 포장되었다. 세포 배양액을 로딩하기 이전에, 컬럼은 0.1 M Tris, pH 7.0으로 평형화 시켰다. 세포 배양액 로딩 후, 컬럼을 0.1 M Tris, pH 7.0으로 세척한 다음 0.1 M glycine, pH 3.5을 이용해 용출하였다. 용출한 물질에 0.1 M Tris, pH 9.0을 첨가하여 중화하였다. 이어서 시료를 PBS 용액(Sangon Biotech, B548117-0500)에서 투석하였다.

- [233] 시료를 로딩하기 이전에, SEC 컬럼(GE lifesciences, Superdex 200 increase 10/300)은 PBS로 평형화시켰다. 로딩 후, PBS로 시료를 용출하고 크로마토그래피를 통해 수집하였다. 각 peak를 분석하기 위해 SDS-PAGE를 수행하였다. 각 시료는 제형 용액(10 mM Sodium phosphate, 0.3 내지 0.4 M NaCl, pH 6.8)에서 투석하였다.
- [234] CHT 컬럼은 CHT resin(Bio-rad, MPC™ Ceramic Hydroxyfluoroapatite)과 사전에 포장되었고, 시료를 로딩하기 전 용액 A(10 mM Sodium phosphate, 30 mM NaCl, pH 6.8)으로 평형화시켰다. 로딩 후, 컬럼을 30% 용액 B(10 mM Sodium phosphate, 1 M NaCl, pH 6.8)로 용출시키고, 30%-90%의 선형 구배 용액 B 및 최종 100% 용액 B로 용출하였다. 용출물은 SDS-PAGE로 특성화되었고, 시료는 제형 용액(10 mM Sodium phosphate, 0.3-0.4 M NaCl, pH 6.8)에서 투석하였다. 최종 단백질은 0.2 μ m 필터로 여과하고, 1.5 mL 튜브에 0.5 mL씩 무균 상태로 분주하였다.
- [235] 그 결과, 도 4에 나타낸 것과 같이, C2.04, C2.01m, C2.04m, C2.05m 및 C2.07m 단백질이 성공적으로 합성되었음을 확인하였다.
- [236] **제조예 3.2. 단백질의 특성 분석**
- [237] 나노 드롭(Nano Drop)을 이용해 단백질의 농도를 280 nm에서 측정하였다. 단백질의 순도는 SDS-PAGE 및 HPLC-SEC로 확인하였다.
- [238] SDS-PAGE 시료는 15 μ L의 정제된 단백질과 5 μ L의 4x 로딩 버퍼를 혼합하고, 5분간 끓여 제조하였다. 혼합된 시료의 15 μ L를 NuPAGE Bis-Tris Mini Gels 4-12% 겔에 로딩하였다. SEC-HPLC 분석을 진행하기 위해 80 μ L의 정제된 단백질을 HPLC system 1260 Infinity II의 TSKgel G3000SWx1 컬럼에 로딩하였고, pH 7.0, 50 mM 인산 나트륨, 150 mM 염화 나트륨을 실행 버퍼(running buffer)로 사용하였다.
- [239] **실험예 1. 융합단백질의 결합력 확인**
- [240] **실험예 1.1. 비아코어 표면 플라즈몬 공명(SPR) 분석 기법**
- [241] 융합단백질 이량체의 결합력을 확인하기 위하여, Biacore 8K(GE Healthcare, 29129951)기기를 사용하여 제조한 융합단백질의 물성을 분석하였다.
- [242] 하기 표 12에 사용한 재료 및 시약을 기술하였다.

[243] [표12]

시약	제조사	Cat #
CM5 sensor chip	GE Healthcare	29-1496-03
HBS-EP+ buffer (10 X)	GE Healthcare	BR-1006-69
Amine coupling kit	GE Healthcare	BR-1006-33
Human antibody Capture Kit	GE Healthcare	29234600
10 mM Glycine 1.5	GE Healthcare	BR-1003-54
C3b	Complement Technology	A114

[244] 실험예 1.2. CM5 센서 칩에 항 인간 면역글로불린 G(Fc) 항체 고정

[245] 100 mL 10x HBS-EP+ 완충액과 900 mL Milli-Q 물을 섞어 1 L 1x HBS-EP+ 완충액을 준비하였다. 420초 동안 50 mM NHS와 200 mM EDC를 1:1 비율로 섞은 후 10 uL/min의 유속으로 CM5 칩을 활성화시켰다. 10,000 RU 정도의 고정 레벨을 도달하기 위해 10 uL/min의 속도로 400초 동안 25 ug/mL의 항 인간 면역글로불린 G(Fc) 항체(pH 5.0 아세테이트)을 주입시켰다. 남겨진 활성화된 에스테르 그룹 들은 10 uL/min의 속도로 420초 동안 1 M 에타놀아민(pH 8.5)을 주입시켜 블럭시켰다. 기초선을 안정시키기 위해 센서칩을 1xHBS-EP+를 사용하여 10 uL/min의 속도로 16시간 동안 세척하였다.

[246] 실험예 1.3. 결합 역동학 측정

[247] 기초선 안정화를 위해 샘플 스텝과 재생 스텝으로 이루어진 스타트업 사이클을 3번 수행하였다. 샘플 스텝: 1x HBS-EP+ 완충액을 flow cell에 30 uL/min의 유속으로 120초 동안 주입한후 120초 동안의 분열 단계와 30초 동안의 안정 단계를 거쳤다. 재생 스텝은 3초 동안 30 uL/min의 속도로 10 mM Glycine pH 1.5가 flow cell에 주입되었고 그 후 30초의 안정화 단계를 가졌다.

[248] 그 후, 다음과 같은 방식대로 결합 역동학 측정을 수행하였다:

[249] C3b stock solution은 1x HBS-EP+ 완충액을 사용하여 50 nM로 희석하였다. 그 후, 50 nM 용액은 0.78125 nM 로 희석시켰다. 샘플 스텝에서 희석된 항원들은 flow cell에 30 uL/min의 속도로 주입하였다. 2개의 0 nM 항원(1x HBS-EP+ 완충액)을 사용하여 Reference signal에서 제거하였다. 180초 동안 결합시키고, 400초 동안 분리시켰다. 분리시간 후 60초 동안의 안정화 단계를 수행하였다. 재생 스텝으로는 flow cells에 30 uL/min의 속도로 30초 동안 10 mM의 pH 1.5 글리신(Glycine)을 주입한 후 60초 동안의 안정화 단계를 가졌다.

[250] 실험예 1.4. 분석 및 결과

[251] 샘플 값에서 reference와 0 nM 값들을 뺀 후 Biacore Insight Evaluation Software(Version 2.0.15.12933)와 1:1 결합 모델 곡선 맞춤(binding model for

curved fitting)을 이용하여 결합 역동학을 계산하였다.

[252] 하기 표 13에 테스트 물질들의 결합 친화도를 기술하였다.

[253] [표13]

Capture 1 Solution	Analyte 1 Solution	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
0.5 ug/mL C2.01	Human C3b	3.47E+06	1.21E-02	3.47E-09
2 ug/mL C2.03	Human C3b	9.10E+06	4.66E-02	5.12E-09
2 µg/mL C2.04	Human C3b	4.44E+05	3.48E-03	7.84E-09
5 µg/mL C2.01m	Mouse C3b	2.00E+05	2.03E-08	1.02E-13
5 µg/mL C2.04m	Mouse C3b	1.25E+05	1.23E-07	9.87E-13

[254] 그 결과, 표 13, 도 6a 및 도 6b에 나타낸 것과 같이, 인간 및 마우스의 C2.01, C2.03, C2.02, C2.01m 및 C2.04m 모두 C3b와 높은 결합력을 가지는 것을 확인하였다.

[255] **실험예 2. 융합단백질 이량체 및 보체 단백질의 결합 친화도 확인**

[256] 일 구체예의 융합단백질 이량체의 보체 경로 저해 여부를 확인하기 위하여, 효소면역분석법을 통해 일 실시예의 융합단백질 이량체과 C3b 단백질 및 C9 단백질과의 결합 여부를 효소 면역 측정법으로 확인하였다.

[257] 구체적으로, C3b 단백질의 결합 여부를 확인하기 위해, 인간 C3b 단백질을 플레이트에 고정하고, C2.01, C2.04, C2.10, C2.11, 및 C2.12을 결합시켰다. 다음으로, 항-인간 면역글로불린 G 항체 및 항-겨자무과산화효소(HRP) 항체를 순차적으로 결합시켜 결합 친화도를 확인하였다. 또한, 마우스 C3b 단백질을 플레이트에 고정하고 C2.01m, C2.11m, 및 C2.12m를 결합시킨 뒤, 같은 방법으로 결합 친화도를 확인하였다.

[258] 더불어, C9 단백질과 CD59의 결합 여부를 확인하기 위해, C9 단백질을 플레이트에 고정하고 상기와 같은 방법으로 C2.04, C2.10, 및 C2.11의 결합을 확인하였다.

[259] 그 결과, C2.01, C2.04, C2.10, C2.11, 및 C2.12가 농도 의존적인 방법(Concentration dependent manner)으로 인간 C3b에 결합함을 확인하였다(도 7a 및 7c). 또한, C2.01m, C2.11m, 및 C2.12m가 농도 의존적인 방법으로 마우스 C3b에 결합함을 확인하였다(도 7b). 또한, C2.04, C2.10, 및 C2.11 모두 농도 의존적인 방법으로 C9 단백질에 결합함을 확인하였다(도 7d). 이러한 결과는, 일 양상의 조성물이 CR1g 및 CD59가 각각 C3b 및 C9에 효과적으로 결합함을 의미한다.

[260] **실험예 3. 용혈 분석을 통한 고전적 보체 경로 억제 효과 분석: CH50**

[261] 하기 표 14에 사용한 시약을 기술하였다.

[262] [표14]

Reagent	Vendor
Factor B-Dpl serum	Comptech
Sheep RBC	Yuduo biolody
Hemolysin	Yuduo biolody
Gelatin Veronal Buffer (GVB; 5 mM Barbitol)	Boston bioproducts
Assay plate	Corning

[263] 일 구체예의 융합단백질 이량체가 고전 보체 경로를 억제하는지 여부를 확인하기 위하여, C2.11의 용혈 분석(CH50)을 수행하였다.

[264] 구체적으로, 양의 적혈구를 TBS에 10분동안 400xg로 원심분리하고, 이 과정을 2번 반복한 뒤, 30분 동안 4°C에서 1 mL 20% 양 적혈구와 용혈소를 배양하였다. 다음으로, 10분 동안 400xg에서 원심분리기를 사용하여 양 적혈구를 TBS로 세척하였고, 이 과정을 2 번 반복한 뒤, 10분 동안 400xg에서 원심분리기를 사용하여 양 적혈구를 GVB++ 완충액으로 세척함으로써 적혈구를 민감화시켰다. 다음으로, GVB++ 완충액을 사용하여 민감해진 양 적혈구를 1x10⁶/mL의 농도로 조정하였다. C2.11의 CH50을 분석하기 위하여, 4.5%의 인간 Factor B가 결핍된 혈청(factor-B depleted serum)을 96-well plate에 추가하였다(50 µL/well). 그 후, 웰에 다양한 농도로 C2.11을 처리하였다. 4°C에서 30분 동안 배양한 후, 민감해진 양 적혈구를 추가하였다(2.5 x 10⁶/well, 50 uL/well). 37°C에서 30분 동안 배양하였다. 10분 동안 600xg에서 원심분리하여 상층액 110 uL를 수집한 후, OD₄₁₅ 값을 측정하였다.

[265] 그 결과, 도 8에 나타낸 것과 같이, C2.11가 고전적 보체 경로에 의한 용혈작용을 억제시킴을 확인하였다.

[266] 실험예 4. 용혈 분석을 통한 대체 보체 경로 억제 효과 분석: AH50

[267] 하기 표 15에 사용한 시약을 기술하였다.

[268] [표15]

Reagent	Vendor
C1q-depleted serum	Comptech
Rabbit RBC	Yuduo biolody
Gelatin Veronal Buffer (5 mM Barbitol)	Boston bioproducts
Assay plate	Corning

[269] 일 구체예의 융합단백질 이량체가 대체 보체 경로를 억제하는지 여부를 확인하기 위하여, C2.11의 용혈 분석(AH50)을 수행하였다.

[270] 구체적으로, 토끼 적혈구 3 mL을 TBS로 10분동안 400xg에서 원심분리기를

사용하여 세척하고, 이 과정을 2번 반복한 후, 토끼 적혈구를 GVB_EGTA 완충액으로 10분 동안 400xg에서 원심분리기를 사용하여 다시 한번 세척함으로써 적혈구를 민감화시켰다. 다음으로, 토끼 적혈구의 농도를 GVB_EGTA 완충액을 사용하여 1×10^9 cells/mL로 조정하였다. AH50을 분석하기 위하여, 15% 인간 C1q-결핍 혈청을 96-well plate에 추가하였다(50 uL/well). 그 후, 웰에 다양한 농도로 C2.11을 처리하였다. 4°C에서 30분동안 배양한 후 토끼 적혈구를 추가하였다(2×10^6 /well, 50 uL/well). 37°C에서 1.5시간동안 배양하고 10분동안 600xg에서 원심분리시켰다. 상층액 110 uL를 수집후 OD₄₁₅ 값을 측정하였다.

[271] 그 결과, 도 9에 나타낸 것과 같이, C2.11이 농도의존적으로 대체 보체 경로에 의한 용혈작용을 억제시키는 것을 확인하였다.

청구범위

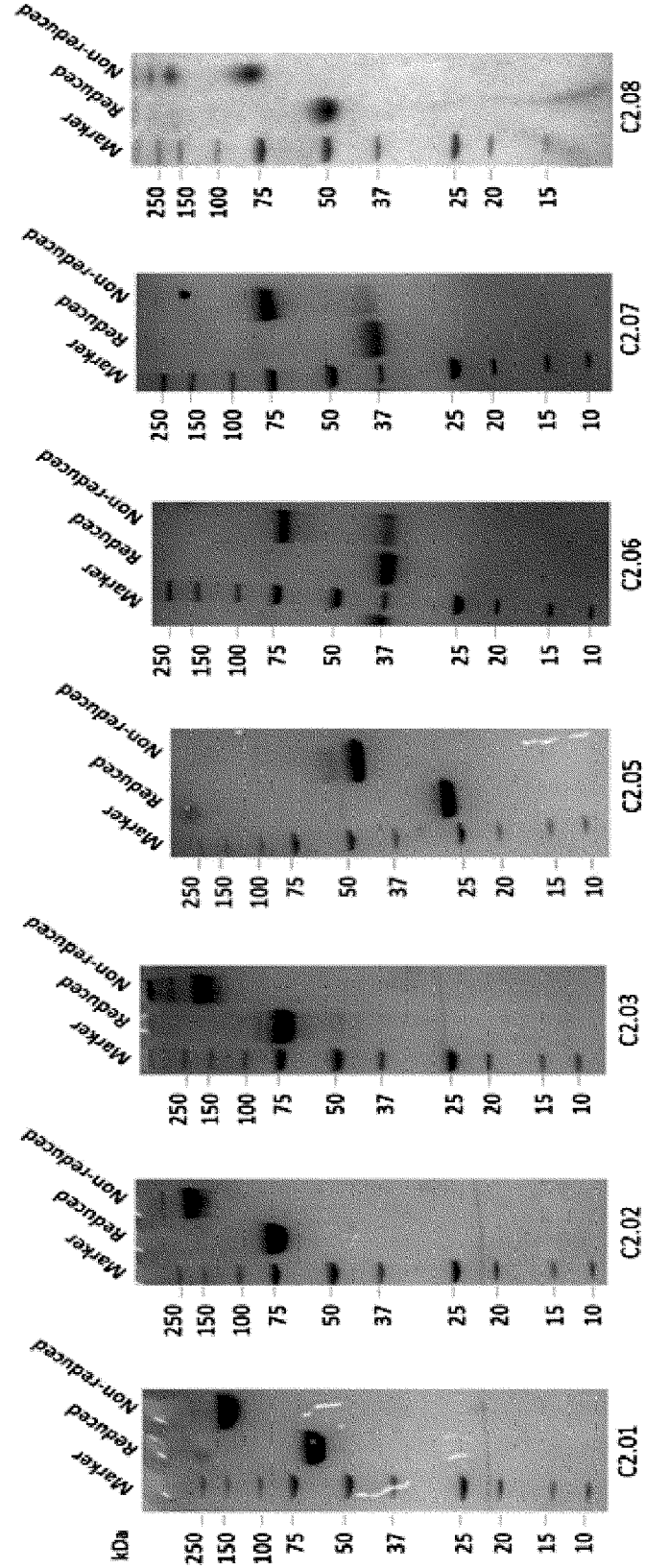
- [청구항 1] CRIg(Complement receptor of the immunoglobulin superfamily)의 세포외도메인 또는 이의 단편; 및 CD59 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
CRIg의 세포외도메인 또는 이의 단편; 및 CD59 또는 이의 변이체는 링커에 의해 결합된 것인, 융합단백질.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 링커는 펩타이드 링커, 면역글로불린 단편 또는 이의 조합인 것인, 융합단백질.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 면역글로불린 단편은 DANG 변이 또는 NG 변이를 포함하는 것인, 융합단백질.
- [청구항 5] 제3항에 있어서,
상기 면역글로불린 단편은 서열번호 5, 서열번호 19 또는 서열번호 62를 포함하는 것인, 융합단백질.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 CD59는 서열번호 24를 포함하는 것인, 융합단백질.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 CD59는 CD59의 단편인 것인, 융합단백질.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 CD59의 단편은 서열번호 24의 26번째 내지 102번째 또는 26번째 내지 95번째의 아미노산을 포함하는 것인, 융합단백질.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 CD59 변이체는 서열번호 24의 66번째 아미노산 또는 69번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것인, 융합단백질.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 CD59 변이체는 서열번호 24의 아미노산 서열에서 K66Q, K66A 및 H69Q로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환이 일어난 것인, 융합단백질.
- [청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 융합단백질은 하기 구조식 (I) 또는 (II)로 이루어진 것인,
융합단백질:
N'-X-[링커(1)]_n-Fc 도메인-[링커(2)]_m-Y-C'(I)
N'-Y-[링커(1)]_n-Fc 도메인-[링커(2)]_m-X-C'(II)
이때, 상기 구조식 (I) 및 (II)에 있어서,
상기 N'은 융합단백질의 N-말단이고,

- 상기 C'는 융합단백질의 C-말단이며,
 상기 X는 CR1g의 세포외도메인 또는 이의 단편이고,
 상기 Y는 CD59 또는 이의 변이체이며,
 상기 링커(1) 및 링커(2)는 펩타이드 링커이고,
 상기 n 및 m은 각각 독립적으로, 0 또는 1이며,
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
 상기 링커(1)이 서열번호 29 또는 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 융합단백질.
- [청구항 13] 제11항에 있어서,
 상기 링커(2)가 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32 또는 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 융합단백질.
- [청구항 14] 제1항에 있어서,
 상기 융합단백질은 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 11, 서열번호 18 및 서열번호 22로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나인 것인, 융합단백질.
- [청구항 15] 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 융합단백질 2개가 결합된 융합단백질 이량체.
- [청구항 16] 제15항에 있어서,
 상기 융합단백질 이량체는 동형이량체(Homodimer)인 것인, 융합단백질 이량체.
- [청구항 17] 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 18] 제17항에 있어서,
 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 48, 서열번호 55 및 서열번호 59로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나인 것인, 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 19] 제17항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.
- [청구항 20] 제19항의 벡터가 도입된 형질전환 세포.
- [청구항 21] 제1항의 융합단백질; 또는 제15항의 이량체를 유효성분으로 포함하는 안질환 치료 또는 예방용 약학 조성물.
- [청구항 22] 제21항에 있어서,
 상기 안질환은 노화-관련 황반 변성(AMD), 지도모양 위축증(GA), 맥락막 혈관신생(CNV), 포도막염, 당뇨병성 및 다른 허혈-관련 망막증, 당뇨병성 황반 부종, 병리적 근시, 폰 힙펠-린다우병, 눈의 히스토플라스마증, 망막 중심 정맥 폐색(CRVO), 각막 혈관신생 및 망막 혈관신생으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 안질환 치료 또는 예방용 약학 조성물.
- [청구항 23] 제21항에 있어서,

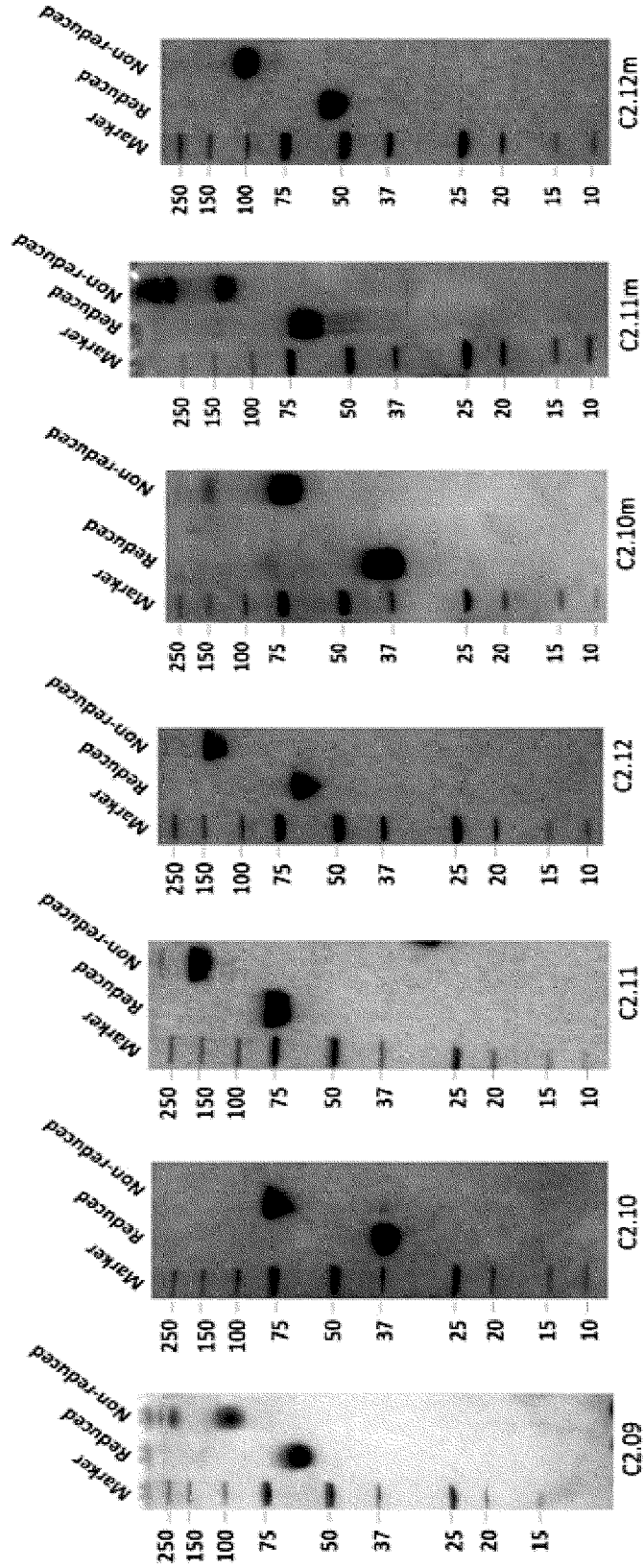
상기 약학 조성물이 약제학적으로 허용가능한 담체를 추가적으로 포함하는 것인, 안질환 치료 또는 예방용 약학 조성물.

- [청구항 24] 안질환을 치료하기 위한 CRIg의 세포외도메인 또는 이의 단편; 및 CD59 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질 또는 이의 이량체의 용도.
- [청구항 25] 안질환 치료 또는 예방용 약제를 제조하기 위한 CRIg의 세포외도메인 또는 이의 단편; 및 CD59 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질 또는 이의 이량체의 용도.
- [청구항 26] CRIg의 세포외도메인 또는 이의 단편; 및 CD59 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질 또는 이의 이량체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 안질환을 치료 및/또는 예방하는 방법.

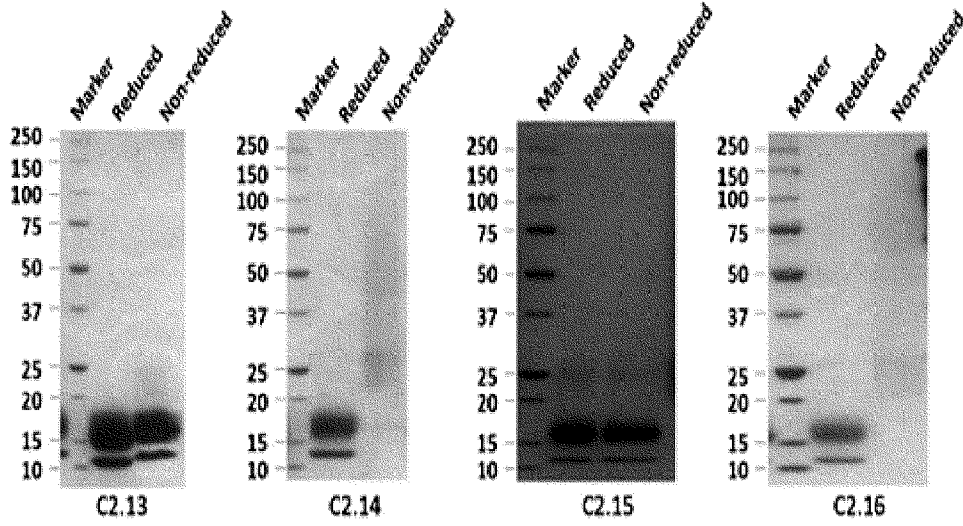
[도1]



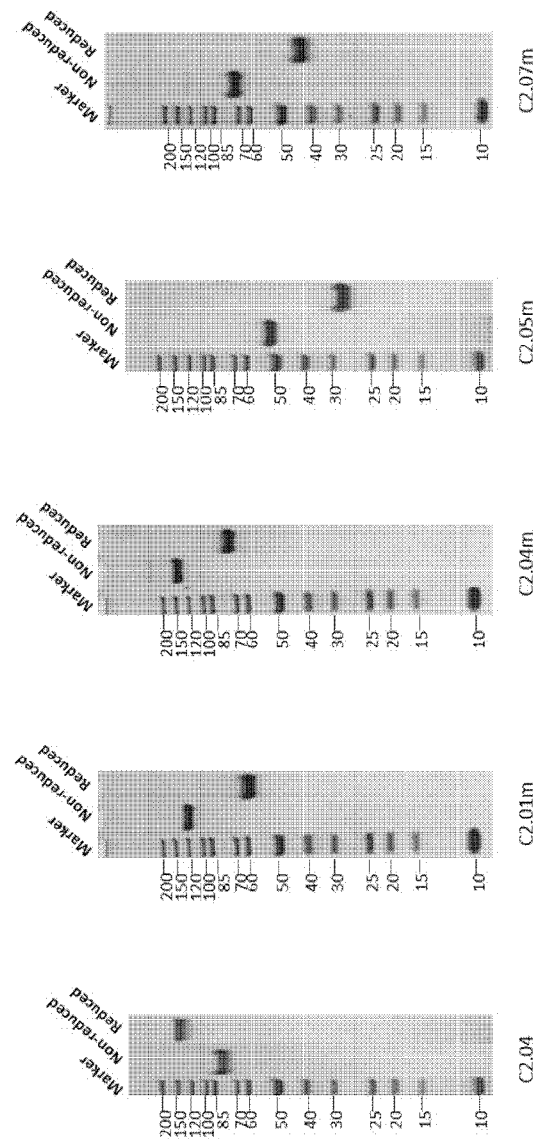
[도2]



[도3]

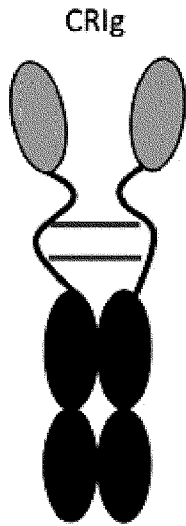


[도4]

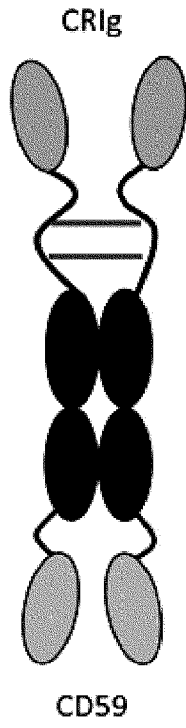


[도5]

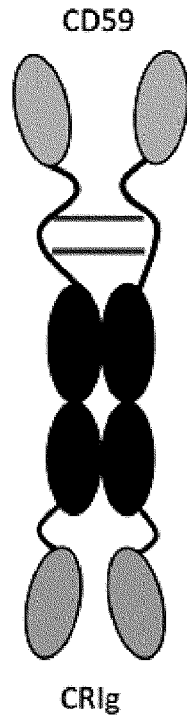
a



b

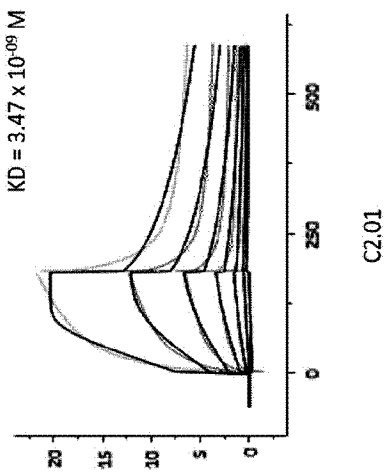
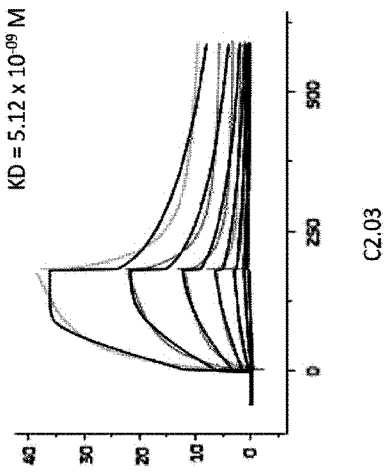
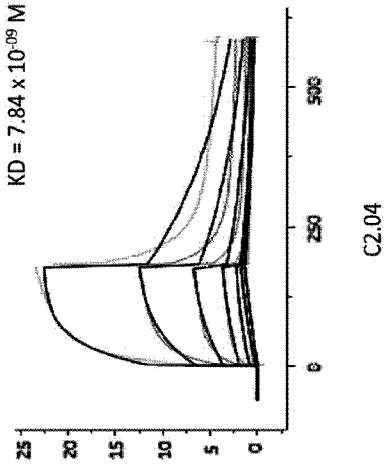


c

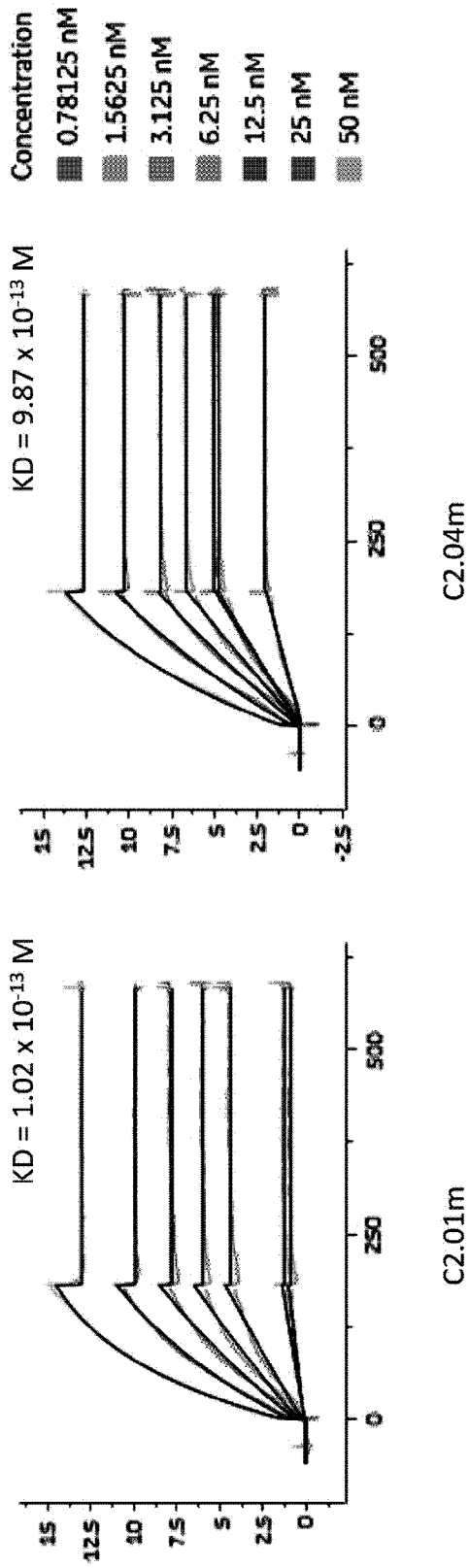


[도 6a]

Concentration
■ 0.78125 nM
■ 1.5625 nM
■ 3.125 nM
■ 6.25 nM
■ 12.5 nM
■ 25 nM
■ 50 nM

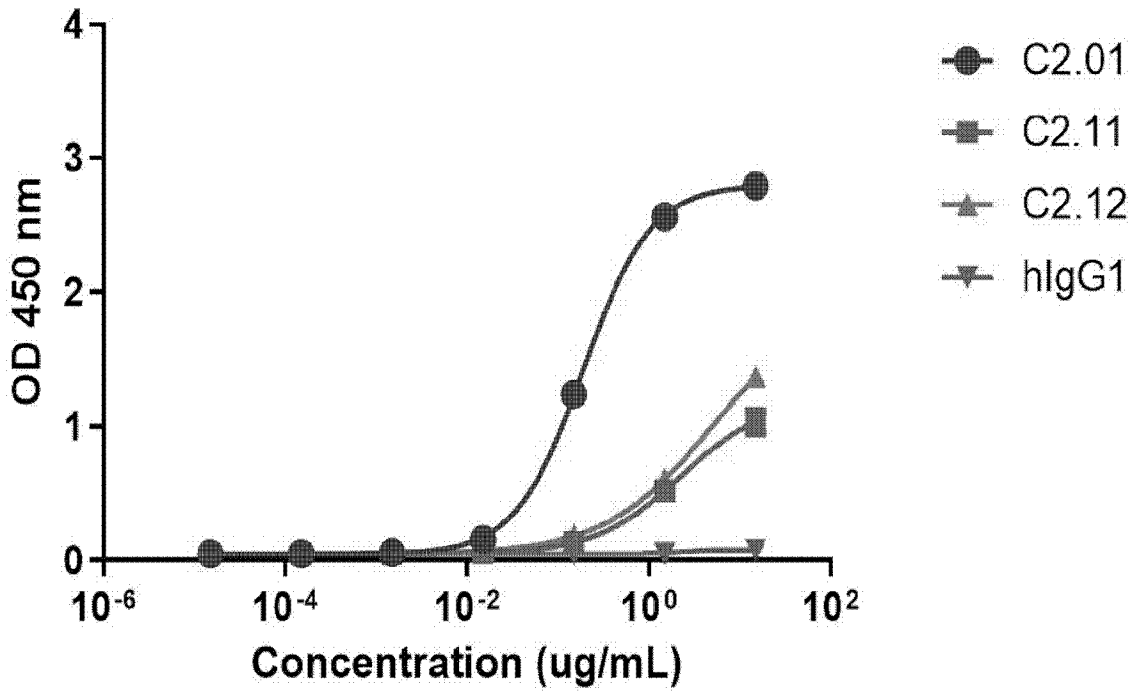


[도6b]



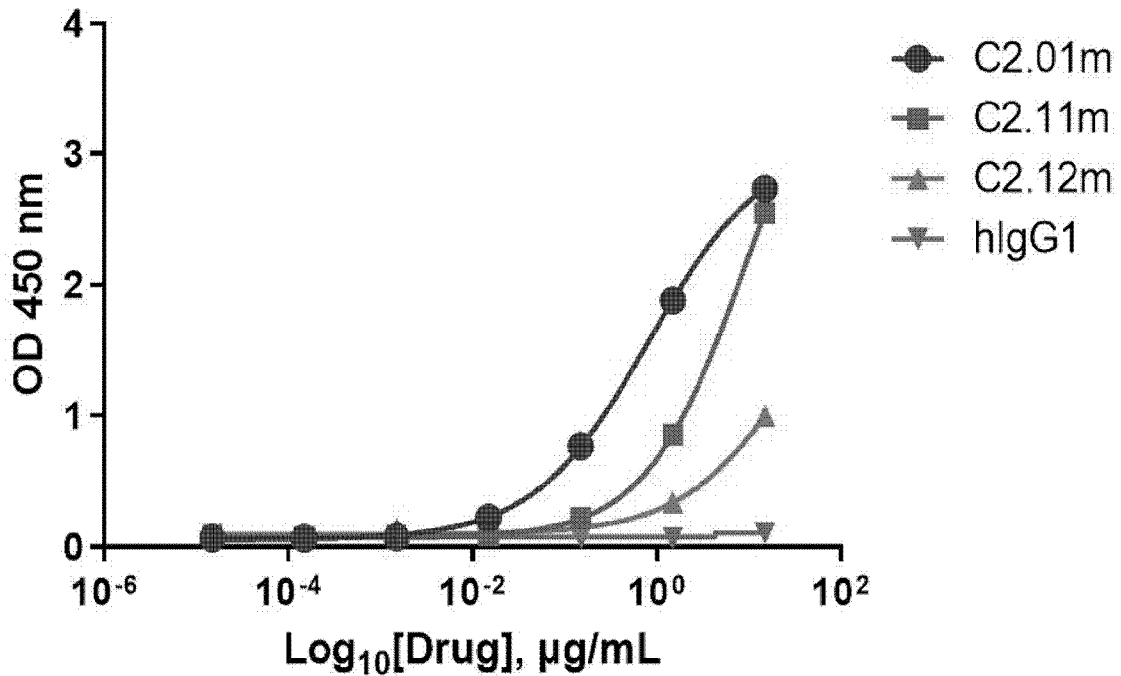
[도7a]

ELISA binding to human C3b



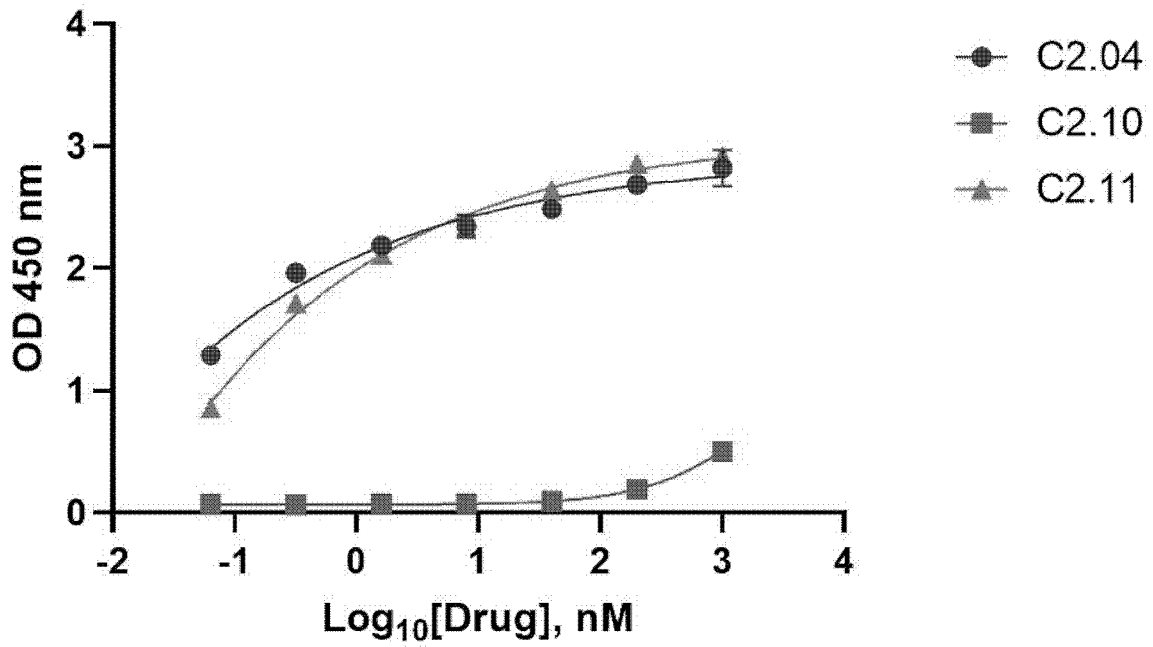
[도7b]

ELISA binding to mouse C3b



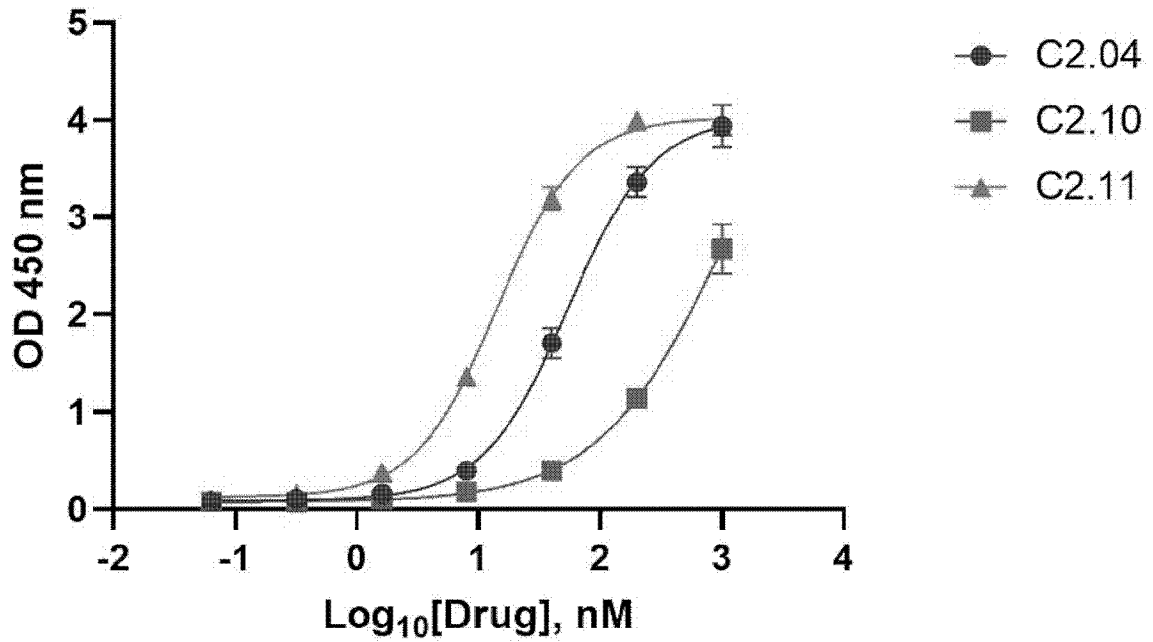
[도7c]

ELISA binding to human C3b

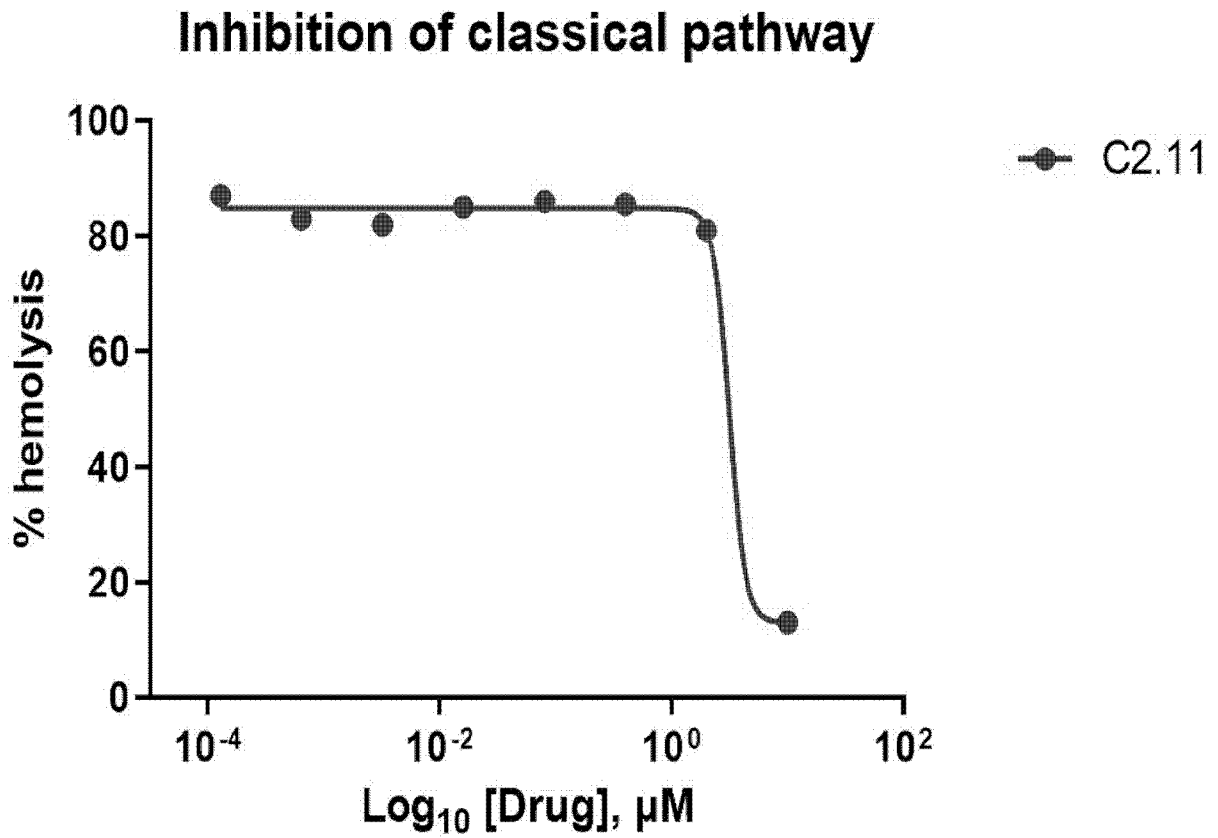


[도7d]

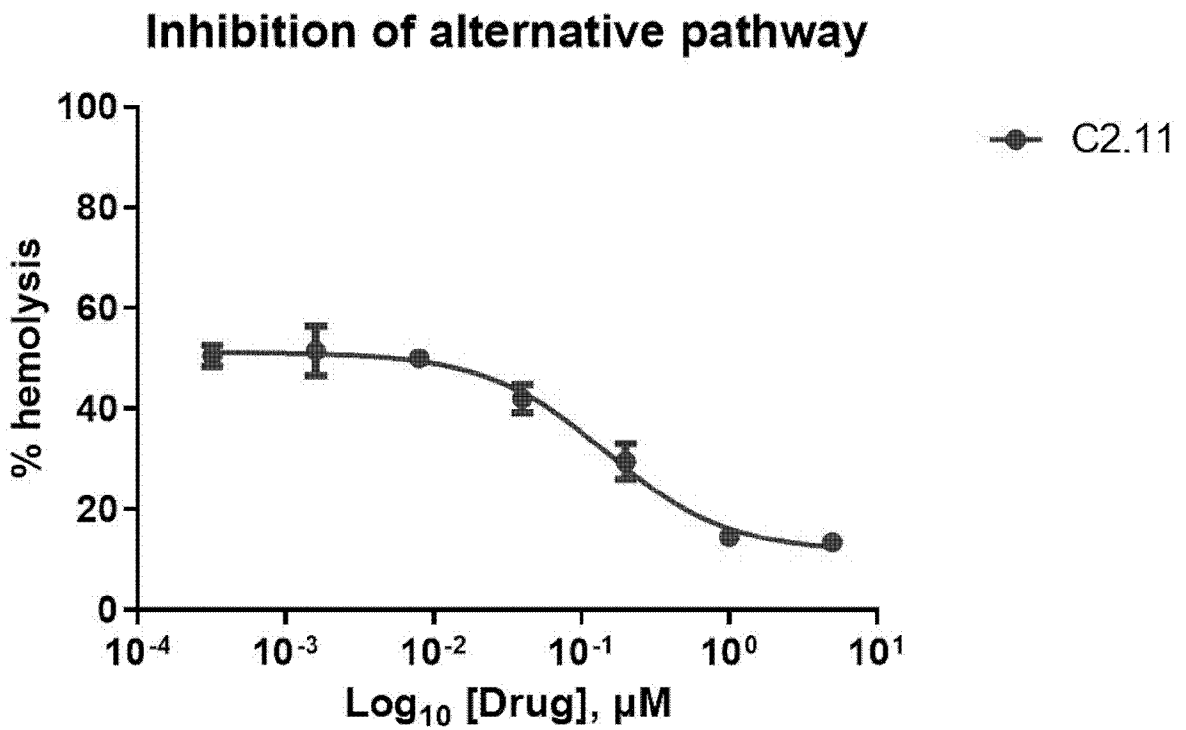
ELISA binding to human C9



[도8]



[도9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/008683

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 14/705(2006.01)i; C07K 16/22(2006.01)i; A61K 38/00(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 14/705(2006.01); A61K 47/61(2017.01); A61K 47/68(2017.01); C07K 14/47(2006.01); C12N 15/09(2006.01); C12N 15/11(2006.01); C12Q 1/68(2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: CRIG 세포외도메인(complement receptor of the immunoglobulin superfamily extracellular domain), CD59, Fc 도메인(Fc domain), 융합 단백질(fusion protein), 안질환(ocular disease), 황반 변성(macular degeneration)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2016-535062 A (FUDAN UNIVERSITY SHANGHAI CANCER CENTER) 10 November 2016 (2016-11-10) See claims 1-5; and paragraphs [0001]-[0055].	1-3,15-17,19,20,24,25
Y		4-8,11-14,18
A		9,10
Y	WO 2006-042329 A2 (GENENTECH, INC.) 20 April 2006 (2006-04-20) See claims 1-12; page 58; and figure 62.	4,5,11-14,18
Y	NCBI Reference Sequence: AAP36795.1. Homo sapiens CD59 antigen p18-20 (antigen identified by monoclonal antibodies 16.3A5, EJ16, EJ30, EL32 and G344), partial [synthetic construct]. 25 July 2016. See entire document.	6-8
A	KR 10-2013-0130732 A (GENENTECH, INC.) 02 December 2013 (2013-12-02) See abstract; and claims 1-30.	1-20,24,25
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 October 2021		Date of mailing of the international search report 22 October 2021
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/008683

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2019-0138636 A (GENENTECH, INC.) 13 December 2019 (2019-12-13) See abstract; and claims 1-158.	1-20,24,25
<hr/>		

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **26**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 26 pertains to a method for treatment of the human body by therapy (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. Claims Nos.: **22,23**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 22 and 23 refer to claim 21 which violates the manner of referring to dependent claims (PCT Rule 6.4(a)), and thus are unclear.
3. Claims Nos.: **21**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/008683

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)				
JP	2016-535062	A	10 November 2016	AU	2014-317705	A1	14 April 2016				
				AU	2014-317705	A1	12 March 2015				
				AU	2014-317705	B2	08 June 2017				
				CN	104231085	A	24 December 2014				
				CN	104231085	B	15 March 2017				
				US	2016-0326231	A1	10 November 2016				
				US	9862757	B2	09 January 2018				
				WO	2015-032167	A1	12 March 2015				
				<hr/>							
WO	2006-042329	A2	20 April 2006	AT	541931	T	15 February 2012				
				AU	2014-243951	B2	06 December 2018				
				BR	PI0908854	A2	24 September 2019				
				CA	2906006	C	05 November 2019				
				CL	2009000082	A1	02 March 2012				
				CN	109045307	A	21 December 2018				
				EP	3858387	A1	04 August 2021				
				ES	2616362	T3	12 June 2017				
				HK	1201539	A1	04 September 2015				
				IL	255015	A	28 February 2018				
				JP	2017-079751	A	18 May 2017				
				KR	10-2012-0064120	A	18 June 2012				
				US	2017-0000897	A1	05 January 2017				
				WO	2014-160307	A1	02 October 2014				
				<hr/>							
				KR	10-2013-0130732	A	02 December 2013	AR	083677	A1	13 March 2013
AU	2011-323487	A1	10 May 2012								
AU	2011-323487	A1	13 June 2013								
AU	2011-323487	B2	11 August 2016								
AU	2016-256692	A1	24 November 2016								
BR	112013010769	A2	24 September 2019								
CA	2816805	A1	10 May 2012								
CN	103201393	A	10 July 2013								
CN	103201393	B	18 January 2019								
DK	2635704	T3	19 June 2017								
EP	2635704	A1	11 September 2013								
EP	2635704	B1	19 April 2017								
EP	3170905	A1	24 May 2017								
ES	2628806	T3	04 August 2017								
HU	E032938	T2	28 November 2017								
IL	226063	A	27 June 2013								
IL	226063	D0	27 June 2013								
JP	2013-544512	A	19 December 2013								
JP	2016-154538	A	01 September 2016								
JP	2018-068285	A	10 May 2018								
JP	2019-216732	A	26 December 2019								
MX	2013004879	A	02 July 2013								
MX	348025	B	24 May 2017								
NZ	610067	A	29 May 2015								
PL	2635704	T3	29 September 2017								
RU	2013125230	A	10 December 2014								
RU	2016127684	A	06 December 2018								
RU	2016127684	A3	06 December 2018								

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/008683

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		RU 2593954 C2	10 August 2016
		SG 10201605904 A	29 September 2016
		SG 190078 A1	28 June 2013
		SI 2635704 T1	31 July 2017
		SI EP2635704 T1	31 July 2017
		TW 201250003 A	16 December 2012
		US 2012-0107315 A1	03 May 2012
		US 2014-0286947 A1	25 September 2014
		US 2018-0163262 A1	14 June 2018
		WO 2012-061421 A1	10 May 2012
		ZA 201303001 B	29 October 2014
		ZA 201405359 B	25 May 2016
<hr/>			
KR 10-2019-0138636 A	13 December 2019	AR 111249 A1	19 June 2019
		AU 2018-237359 A1	10 October 2019
		AU 2018-237359 A1	27 September 2018
		BR 112019019706 A2	28 April 2020
		CA 3056248 A1	27 September 2018
		CL 2019002658 A1	27 December 2019
		CN 110612124 A	24 December 2019
		CO 2019011582 A2	31 October 2019
		CR 20190481 A	06 January 2020
		EP 3600442 A1	05 February 2020
		IL 269378 D0	28 November 2019
		JP 2020-514376 A	21 May 2020
		MX 2019011141 A	05 November 2019
		PE 20191758 A1	12 December 2019
		PH 12019502149 A1	29 June 2020
		RU 2019132064 A	22 April 2021
		RU 2019132064 A3	26 July 2021
		SG 11201908650 A	30 October 2019
		TW 201838649 A	01 November 2018
		US 2020-0002411 A1	02 January 2020
		WO 2018-175752 A1	27 September 2018
		WO 2018-175752 A8	27 September 2018
<hr/>			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 14/705(2006.01)i; C07K 16/22(2006.01)i; A61K 38/00(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 14/705(2006.01); A61K 47/61(2017.01); A61K 47/68(2017.01); C07K 14/47(2006.01); C12N 15/09(2006.01); C12N 15/11(2006.01); C12Q 1/68(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: CR1g 세포외도메인(complement receptor of the immunoglobulin superfamily extracellular domain), CD59, Fc 도메인(Fc domain), 융합 단백질(fusion protein), 안질환(ocular disease), 황반 변성(macular degeneration)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y A	JP 2016-535062 A (FUDAN UNIVERSITY SHANGHAI CANCER CENTER) 2016.11.10 청구항 1-5; 및 단락 [0001]-[0055]	1-3,15-17,19,20,24,25 4-8,11-14,18 9,10
Y	WO 2006-042329 A2 (GENENTECH, INC.) 2006.04.20 청구항 1-12; 페이지 58; 도면 62	4,5,11-14,18
Y	NCBI Reference Sequence: AAP36795.1, Homo sapiens CD59 antigen p18-20 (antigen identified by monoclonal antibodies 16.3A5, EJ16, EJ30, EL32 and G344), partial [synthetic construct] 2016년 7월 25일 전문	6-8
A	KR 10-2013-0130732 A (제넨테크, 인크.) 2013.12.02 요약; 및 청구항 1-30	1-20,24,25
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일	
2021년10월22일 (22.10.2021)	2021년10월22일 (22.10.2021)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)	정다원	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-5373	

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2019-0138636 A (제넨테크, 인크.) 2019.12.13 요약; 및 청구항 1-158	1-20,24,25

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - 서면 혹은 이미지 파일
 - b. PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
 - c. 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. 청구항: **26**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 26은 치료에 의한 사람의 치치방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).

2. 청구항: **22,23**
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 22 및 23은 종속항 기재방법(PCT 규칙 6.4(a))을 위반한 청구항 21을 인용하고 있어 불명료합니다.

3. 청구항: **21**
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2016-535062 A	2016/11/10	AU 2014-317705 A1	2016/04/14
		AU 2014-317705 A1	2015/03/12
		AU 2014-317705 B2	2017/06/08
		CN 104231085 A	2014/12/24
		CN 104231085 B	2017/03/15
		US 2016-0326231 A1	2016/11/10
		US 9862757 B2	2018/01/09
WO 2006-042329 A2	2006/04/20	WO 2015-032167 A1	2015/03/12
		AT 541931 T	2012/02/15
		AU 2014-243951 B2	2018/12/06
		BR PI0908854 A2	2019/09/24
		CA 2906006 C	2019/11/05
		CL 2009000082 A1	2012/03/02
		CN 109045307 A	2018/12/21
		EP 3858387 A1	2021/08/04
		ES 2616362 T3	2017/06/12
		HK 1201539 A1	2015/09/04
		IL 255015 A	2018/02/28
		JP 2017-079751 A	2017/05/18
		KR 10-2012-0064120 A	2012/06/18
		US 2017-0000897 A1	2017/01/05
WO 2014-160307 A1	2014/10/02		
KR 10-2013-0130732 A	2013/12/02	AR 083677 A1	2013/03/13
		AU 2011-323487 A1	2012/05/10
		AU 2011-323487 A1	2013/06/13
		AU 2011-323487 B2	2016/08/11
		AU 2016-256692 A1	2016/11/24
		BR 112013010769 A2	2019/09/24
		CA 2816805 A1	2012/05/10
		CN 103201393 A	2013/07/10
		CN 103201393 B	2019/01/18
		DK 2635704 T3	2017/06/19
		EP 2635704 A1	2013/09/11
		EP 2635704 B1	2017/04/19
		EP 3170905 A1	2017/05/24
		ES 2628806 T3	2017/08/04
		HU E032938 T2	2017/11/28
		IL 226063 A	2013/06/27
		IL 226063 D0	2013/06/27
		JP 2013-544512 A	2013/12/19
		JP 2016-154538 A	2016/09/01
		JP 2018-068285 A	2018/05/10
		JP 2019-216732 A	2019/12/26
		MX 2013004879 A	2013/07/02
		MX 348025 B	2017/05/24
NZ 610067 A	2015/05/29		
PL 2635704 T3	2017/09/29		
RU 2013125230 A	2014/12/10		
RU 2016127684 A	2018/12/06		
RU 2016127684 A3	2018/12/06		

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		RU 2593954 C2	2016/08/10
		SG 10201605904 A	2016/09/29
		SG 190078 A1	2013/06/28
		SI 2635704 T1	2017/07/31
		SI EP2635704 T1	2017/07/31
		TW 201250003 A	2012/12/16
		US 2012-0107315 A1	2012/05/03
		US 2014-0286947 A1	2014/09/25
		US 2018-0163262 A1	2018/06/14
		WO 2012-061421 A1	2012/05/10
		ZA 201303001 B	2014/10/29
		ZA 201405359 B	2016/05/25
KR 10-2019-0138636 A	2019/12/13	AR 111249 A1	2019/06/19
		AU 2018-237359 A1	2019/10/10
		AU 2018-237359 A1	2018/09/27
		BR 112019019706 A2	2020/04/28
		CA 3056248 A1	2018/09/27
		CL 2019002658 A1	2019/12/27
		CN 110612124 A	2019/12/24
		CO 2019011582 A2	2019/10/31
		CR 20190481 A	2020/01/06
		EP 3600442 A1	2020/02/05
		IL 269378 D0	2019/11/28
		JP 2020-514376 A	2020/05/21
		MX 2019011141 A	2019/11/05
		PE 20191758 A1	2019/12/12
		PH 12019502149 A1	2020/06/29
		RU 2019132064 A	2021/04/22
		RU 2019132064 A3	2021/07/26
		SG 11201908650 A	2019/10/30
		TW 201838649 A	2018/11/01
		US 2020-0002411 A1	2020/01/02
		WO 2018-175752 A1	2018/09/27
		WO 2018-175752 A8	2018/09/27