



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년05월31일

(11) 등록번호 10-2259255

(24) 등록일자 2021년05월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/395 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)

C07K 16/2866 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7021136

(22) 출원일자(국제) 2014년01월28일

심사청구일자 2019년01월03일

(85) 번역문제출일자 2015년08월04일

(65) 공개번호 10-2015-0109386

(43) 공개일자 2015년10월01일

(86) 국제출원번호 PCT/US2014/013402

(87) 국제공개번호 WO 2014/117160

국제공개일자 2014년07월31일

(30) 우선권주장

61/757,571 2013년01월28일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2006055809 A2\*

Verma 등, Human Molecular Genetics, 2010,

Vol. 19, No. 21 4145-4159\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

샤이어 휴먼 지네틱 테라피즈 인크.

미국 매사추세츠 (우편번호 02421) 렉싱턴 샤이어  
웨이 300

리전츠 오브 더 유니버시티 오브 미네소타

미국 55455 미네소타주 미네아폴리스 스위트 600  
오크 스트리트 에스이 200 맥나마라 알럼니 센터

(72) 발명자

요시아, 세레네

미국 매사추세츠 렉싱턴 샤이어 웨이 300 샤이어  
휴먼 지네틱 테라피즈 인크. (내)

루비, 토마스 엠.

미국 매사추세츠 렉싱턴 샤이어 웨이 300 샤이어  
휴먼 지네틱 테라피즈 인크. (내)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 32 항

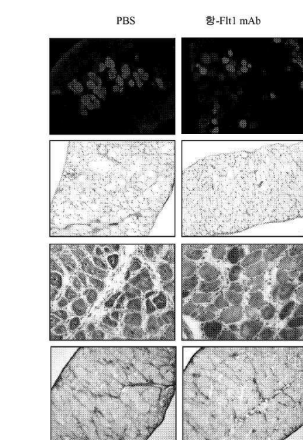
심사관 : 이예리

(54) 발명의 명칭 뒤시엔스 근위축증의 치료에서의 항-Flt-1 항체

## (57) 요약

본 발명은 무엇보다도, 근위축증, 특히, 뒤시엔스 근위축증(DMD)을 치료하기 위한 향상된 방법 및 조성물을 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명에 따른 방법은 DMD를 앓고 있거나 발병가능한 개체에게, DMD의 적어도 하나의 증상 또는 특징이 강도, 중등도, 또는 빈도에서 줄어들거나, 지연된 개시를 가지게 하기 위해, 효과적인 양의 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하는 단계를 포함한다.

대표도 - 도8



도 8

(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

(72) 발명자

**아사쿠라, 아츠시**

미국 55455 미네소타 미니애폴리스 6 스트리트 에  
스이 2001 엠티알에프 4-220

**키페, 데니스**

미국 매사추세츠 렉싱턴 샤이어 웨이 300 샤이어  
휴먼 지네틱 테라피즈 인크. (내)

---

**차르나스, 로렌스**

미국 01760 매사추세츠 나티크 밀 스트리트 49

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

효과적인 양의 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 뒤시엔느 근위축증(Duchenne Muscular Dystrophy, DMD) 치료용 약학적 조성물로서, 상기 조성물은 DMD을 앓고 있거나 발병가능한 개체에 투여되며, DMD의 하나 이상의 증상 또는 특징이 강도, 중증도, 또는 빈도에서 줄어들거나, 발병이 지연되는 것이며,

항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 Flt-1에 대한 VEGF의 결합을 저해하는, 약학적 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 표면 플라스몬 공명 결합 어세이에서  $10^{-9}$ M을 초과하는 친화도로 인간 Flt-1에 결합하는 약학적 조성물.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 표면 플라스몬 공명 결합 어세이에서 인간 Flt-1에 대해  $10^{-10}$ M을 초과하는 친화도로 결합하는 약학적 조성물.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 표면 플라스몬 공명 결합 어세이에서 인간 Flt-1에 대해  $10^{-12}$ M을 초과하는 친화도로 결합하는 약학적 조성물.

#### 청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 Flt-1를 이용한 경쟁 어세이에서 100 pM 미만의  $IC_{50}$ 를 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 Flt-1를 이용한 경쟁 어세이에서 10 pM 미만의  $IC_{50}$ 를 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 Flt-1를 이용한 경쟁 어세이에서 1 pM 미만의  $IC_{50}$ 를 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 8

제5항에 있어서, 경쟁 어세이는 인간 Flt-1에 대한 VEGF의 결합의 저해인 약학적 조성물.

#### 청구항 9

제5항에 있어서, 경쟁 어세이는 인간 Flt-1에 대한 PLGF의 결합의 저해인 약학적 조성물.

#### 청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 VEGFR2, VEGFR3, 또는 VEGFR2 및 VEGFR3에 결합하지 않는 약학적 조성물.

#### 청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 마우스 또는 원숭이 Flt-1에 결합하지 않는 약학적 조성물.

#### 청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 마우스 Flt-1, 원숭이 Flt-1, 또는 마우스 및 원숭이 Flt-1에 결합하는 약학적 조성물.

#### 청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 IgG, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, ScFvs, 디아바디(diabody), 트리아바디(triabody) 및 테트라바디(tetrabody)로 이루어진 군에서 선택되는 약학적 조성물.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 IgG인 약학적 조성물.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 IgG1인 약학적 조성물.

#### 청구항 16

제14항에 있어서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 단일클론 항체인 약학적 조성물.

#### 청구항 17

제16항에 있어서, 단일클론 항체는 인간화된 단일클론 항체인 약학적 조성물.

#### 청구항 18

제17항에 있어서, 인간화된 단일클론 항체는 인간 Fc 부위를 포함하는 약학적 조성물.

#### 청구항 19

제18항에 있어서, Fc 부위는 Fc 부위와 FcRn 수용체 사이의 결합 친화도를 증진시켜서 생체 내 항체의 반-감기가 연장되게 하는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 약학적 조성물.

#### 청구항 20

제19항에 있어서, Fc 부위는 인간 IgG1의 Thr 250, Met 252, Ser 254, Thr 256, Thr 307, Glu 380, Met 428, His 433 및 Asn 434로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상에 상응하는 하나 이상의 위치에 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 약학적 조성물.

#### 청구항 21

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 비경구적으로 투여되는 약학적 조성물.

#### 청구항 22

제21항에 있어서, 비경구 투여는 정맥내, 피내, 척추강내, 흡입, 경피(국소), 안내, 근육내, 피하, 및 점막 흡수 투여로 이루어진 군에서 선택되는 약학적 조성물.

#### 청구항 23

제22항에 있어서, 비경구 투여는 정맥내 투여인 약학적 조성물.

#### 청구항 24

제22항에 있어서, 비경구 투여는 피하 투여인 약학적 조성물.

#### 청구항 25

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 경구적으로 투여되는 약학적 조성물.

#### 청구항 26

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 매 두 달마다, 매 달마다, 매 삼 주마다, 매 이 주마다, 매 주마다, 매일, 또는 다양한 주기로 투여되는 약학적 조성물.

#### 청구항 27

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 안내의 모양체근, 홍채 확대근, 또는 홍채 팔약근; 귀의 이개근, 관자마루근, 등자근, 또는 고막긴장근; 코의 비근근, 비근, 코조임근, 비중근, 또는 상순비익거근; 입의 입꼬리올림근, 입꼬리내림근, 또는 구륜근; 협근, 대 및 소협골근, 광경근, 윗입술כות방 올림근, 아랫입술내림근, 입꼬리당김근, 턱끝근, 눈썹주름근, 원희내근, 회외근, 상완근; 교근, 측두근, 내측 익돌근, 또는 외측익돌근; 혀 및 목의 이설근, 경동설근, 구개설근, 설하근, 악이복근, 붓목빨근, 악설골근, 이설골, 견갑설골근, 흉골설골근, 흉골갑상근, 갑상설골근, 흉쇄유돌근, 전사각근, 중사각근, 또는 후방 사각근; 흉부, 흉대 및 팔의 쇄골하근, 대흉근, 소흉근, 복직근, 외복사근, 내복사근, 복횡근, 횡격막, 외늑간근, 내늑간근, 전거근, 승모근, 견갑거근, 대능형근, 소능형근, 광배근, 삼각근, 견갑하근, 극상근, 극하근, 대원근, 소원근, 또는 오쇄완근; 팔 및 어깨의 상완이두근-장두, 상완이두근-단두, 상완삼두근-장두, 상완삼두근-외측두, 상완삼두근-내측두, 주근, 원희내근, 회외근, 또는 상완근; 복부 및 등의 완요골근, 요측수근굴근, 척추수근굴근, 장장근, 척추수근신근, 장요측수근신근, 단요측수근신근, 지신근, 소지신근, 척추기립근-경근, 척추기립근-척추근, 척추기립근-최장근, 또는 척추기립근-장능근; 손의 내재근의 모지구근, 단무지외전근, 단무지굴근, 무지대립근, 소지구근, 소지외전근, 단소지굴근, 소지대립근, 장측골간근, 배측골간근 또는 충양근; 골반대 및 다리의 장요근-대요근, 장요근-장골근, 대퇴방형근, 장내전근, 단내전근, 대내전근, 박근, 봉공근, 대퇴사두근-대퇴직근, 대퇴사두근-외측광근, 대퇴사두근-내측광근, 대퇴사두근-중간광근, 비복근, 장비골근(긴종아리근), 비장근, 대둔근, 중둔근, 소둔근, 슬픽근-대퇴이두근-장두, 슬픽근-대퇴이두근-단두, 슬픽근-반건양근, 슬픽근-반막양근, 대퇴근막장근, 치골근, 또는 전경골근; 정강이 및 발의 장지신근, 장무지신근, 단비골근, 족저근, 후경골근, 장무지굴근, 단지신근, 단무지신근, 무지외전근, 단무지굴근, 소지외전근, 단소지굴근, 소지대립근, 단지신근, 발의 충양근, 족척방형근 또는 발바닥네모근, 단지굴근, 배측골간근, 또는 척측골간근으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 골격 근육으로 전달되는 약학적 조성물.

#### 청구항 28

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 횡격막, 삼두근, 비장근, 전경골근, 비복근, 장지신근, 복부직근, 및 사두근으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 표적 조직으로 전달되는 약학적 조성물.

#### 청구항 29

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 횡격막으로 전달되는 약학적 조성물.

#### 청구항 30

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 심장으로 전달되는 약학적 조성물.

#### 청구항 31

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편의 투여는 근육 재생성, 섬유증 감소, 안정성 증가, 근육 강도 증가, 유연성 증가, 운동 범위 증가, 체력 증가, 피로도 감소, 혈액 흐름 증가, 인지력 향상, 폐 기능 향상, 및 염증 저해로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 야기하는 약학적 조성물.

#### 청구항 32

제1항 또는 제2항에 있어서, DMD의 적어도 하나의 증상 또는 특징은 근소모, 근력 저하, 근육 취약성, 근육 비대증, 근육 가성비대증, 관절 구축, 골격 기형, 심근증, 연하 장애, 장 및 방광 기능 장애, 근육 허혈, 인지 장

에, 행동기능장애, 사회화 장애, 척추측만증, 및 호흡 기능 장애로 이루어진 군에서 선택되는 약학적 조성물.

### 청구항 33

삭제

### 청구항 34

삭제

### 청구항 35

삭제

### 청구항 36

삭제

### 청구항 37

삭제

### 청구항 38

삭제

### 청구항 39

삭제

### 청구항 40

삭제

### 청구항 41

삭제

### 청구항 42

삭제

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2013년 1월 28일 출원된 미국 특허 가출원 일련번호 제61/757,571호의 권리를 주장하며, 상기 개시는 본 명세서에 그 전체가 참고로서 포함된다.

## 배경 기술

[0003] 배경

[0004] 뒤시엔느 근위축증(Duchenne muscular dystrophy, DMD)은 열성 X-연관 형식의 근위축증으로, 대략 3,600명의 남자아이 중 1명에게서 발병하며, 근변성을 일으키고 결국 죽음을 초래한다. 상기 장애는 세포막의 디스트로글리칸 복합체(DGC)에 구조적 안정성을 제공하는 근육 조직 내 중요한 구조적 성분인 단백질 디스트로핀을 코딩하는, 인간 X 염색체 위에 위치한 디스트로핀 유전자 내 돌연변이에 의해 유발된다. 디스트로핀은 내부 세포질 액틴 소섬유 네트워크 및 세포외 기질에 연결되어, 근육 섬유에 물리적 강도를 제공한다. 따라서, 디스트로핀의 변형 또는 부재는 비정상적인 근형질막 막기능을 일으킨다. 모든 성별에서 돌연변이가 생길 수 있지만, 여성은 소년들에서 보이는 질환의 전형적인 임상적 특징을 거의 나타내지 않는다.

[0005] 현재, DMD에 대한 공지된 치료법은 존재하지 않는다. 유전자 요법 및 코르티코스테로이드의 투여를 비롯한 여러 가지 치료 수단이 연구된 바 있다. 이들 치료 중 일부는 특정 증상을 지연시킬 수 있지만, DMD 환자들을 위한 만족스러운 치료 수단은 현재 존재하지 않는다.

## 발명의 내용

[0006] **발명의 요약**

[0007] 본 발명은 무엇보다도, 항-FIt-1 항체 요법을 기초로 하여 근위축증, 특히, 뒤시엔느 근위축증(DMD) 및/또는 베커(Becker) 근위축증을 치료하기 위한 향상된 방법 및 조성물을 제공한다. 하기 실시예에서 기술되는 바와 같이, 본 발명은, 부분적으로, 항-FIt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편이, FIt-1 수용체에 VEGF 및 다른 리간드가 결합하는 것을 저해할 수 있고, 이를 통해 VEGF 수용체에 결합할 수 있는 VEGF 및/또는 다른 리간드의 양을 증가시킨다는 발견을 기초로 한다. DMD 증상에서의 구조적 및 기능적 향상은 증가한다. 실제로, 실시예에서 보이는 바와 같이, 본 발명자들은 항-FIt-1 항체의 투여가 DMD의 동물 모델에서 근육 병리 뿐만 아니라 근육 기능의 척도를 향상함을 증명하였다. 그러므로, 본 발명은 DMD의 치료를 위한 안전하고 효과적인 항체-기반 치료제를 제공한다.

[0008] 일부 구체예에서, 본 발명은 뒤시엔느 근위축증(DMD)을 치료하는 방법을 제공하며 상기 방법은 DMD을 앓고 있거나 발병가능한 개체에게, DMD의 적어도 하나의 증상 또는 특징이 강도, 중증도, 또는 빈도에서 줄어들거나, 지연된 개시를 가지게 하기 위해, 효과적인 양의 항-FIt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하는 단계를 포함한다.

[0009] 일부 구체예에서, 항-FIt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 비경구적으로 투여된다. 일부 구체예에서, 비경구 투여는 정맥내, 피내, 척추강내, 흡입, 경피(국소), 안내, 근육내, 피하, 및/또는 점막 흡수 투여 중에서 선택된다.

[0010] 일부 구체예에서, 항-FIt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 경구적으로 투여된다.

[0011] 일부 구체예에서, 항-FIt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 횡문근(예컨대, 골격 근육, 심장 근육) 중에서 선택된 하나 이상의 표적 조직으로 전달된다. 일부 구체예에서, 항-FIt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 심장으로 전달된다. 일부 구체예에서, 항-FIt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 골격 근육으로 전달된다. 일부 구체예에서, 항-FIt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 표 1에서 선택되는 하나 이상의 골격 근육으로 전달된다. 일부 구체예에서, 횡문근(예컨대, 골격 근육)은 삼두근, 전경골근, 비장근, 비복근, 이두근, 승모근, 삼각근, 사두근, 및 횡격막으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0012] 일부 구체예에서, 횡문근은 삼두근, 전경골근, 비장근, 비복근, 이두근, 승모근, 삼각근, 사두근, 및 횡격막으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0013] 일부 구체예에서, 항-FIt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 매 두 달마다, 매 달마다, 매 삼 주마다, 매 이 주마다, 매 주마다, 매일, 또는 다양한 주기로 투여된다.

[0014] 일부 구체예에서, 항-FIt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편의 투여는 근육 재생성, 섬유증 감소, 근육 강도 증가, 안정성 증가, 유연성 증가, 운동 범위 증가, 체력 증가, 피로도 감소, 혈액 흐름 증가, 인지력 향상, 폐 기능 향상, 및/또는 염증 저해를 야기한다.

[0015] 일부 구체예에서, 항-FIt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편의 투여는 적어도 하나의 DMD 증상의 강도, 중증도, 또는 빈도를 줄이거나, 개시를 지연시킨다. 일부 구체예에서 항-FIt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편의 투여는 근소모, 근력 저하, 근육 취약성, 근육 비대증, 근육 가성비대증, 관절 구축, 골격 기형, 심근증, 연하 장애, 장 및 방광 기능 장애, 근육 허혈, 인지 장애, 행동기능장애, 사회화 장애, 척추측만증, 및 호흡 기능 장애로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 DMD 증상의 강도, 중증도, 또는 빈도를 줄이거나, 개시를 지연시킨다.

[0016] 일부 구체예에서, 본 발명은 VEGF가 FIt-1 수용체에 결합하는 것을 저해하는 능력을 특징으로 하는 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0017] 일부 구체예에서, 항-FIt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 표면 플라스몬 공명(예컨대, BIACORE) 결합 어세에서  $10^{-9}$  M 초과,  $10^{-10}$  M 초과,  $0.5 \times 10^{-10}$  M 초과,  $10^{-11}$  M 초과,  $0.5 \times 10^{-11}$  M 초과,  $10^{-12}$  M 초과, 또는  $0.5$

$\times 10^{-12}$  M 초과와 친화도로 인간 Flt-1에 결합하는 능력을 특징으로 한다.

- [0018] 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 Flt-1를 이용한 경쟁 어세이에서 100 pM 미만, 10 pM 미만, 또는 1 pM 미만의  $IC_{50}$ 를 특징으로 한다. 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 Flt-1에 대한 VEGF의 결합 저해에 관한 경쟁 어세이에서 100 pM 미만, 10 pM 미만, 또는 1 pM 미만의  $IC_{50}$ 를 특징으로 한다. 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 Flt-1에 대한 PLGF의 결합 저해에 관한 경쟁 어세이에서 100 pM 미만, 10 pM 미만, 또는 1 pM 미만의  $IC_{50}$ 를 특징으로 한다.
- [0019] 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 VEGFR2 (Flk-1) 및/또는 VEGFR3 (Flt-4)에 결합하지 않는다.
- [0020] 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 마우스 또는 원숭이 Flt-1에 결합한다. 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 마우스 또는 원숭이 Flt-1에 결합하지 않는다.
- [0021] 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 IgG, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, ScFvs, 디아바디(diabody), 트리아바디(triabody) 및 테트라바디(tetrabody)로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0022] 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 IgG이다. 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 IgG1이다.
- [0023] 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 단일클론 항체이고, 특정 구체예에서 인간화된 단일클론 항체이다. 일부 구체예에서, 인간화된 단일클론 항체는 인간 Fc 부위를 포함한다. 일부 구체예에서, Fc 부위는 Fc 부위와 FcRn 수용체 사이의 결합 친화도를 증진시켜서 항체의 생체 내 반-감기가 연장되게 하는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 구체예에서, Fc 부위는 인간 IgG1의 Thr 250, Met 252, Ser 254, Thr 256, Thr 307, Glu 380, Met 428, His 433 및/또는 Asn 434에 상응하는 하나 이상의 위치에 하나 이상의 돌연변이를 포함한다.
- [0024] 일부 구체예에서, 본 발명은 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0025] 본 명세서에 사용된, 용어 "약" 및 "대략"은 동등하게 사용된다. 본 명세서에 약/대략이 있거나 없이 사용된 임의의 수치는 해당 분야의 숙련가가 이해하는 임의의 일반적인 변동을 포괄하는 것을 의미한다.
- [0026] 본 발명의 다른 특징, 목적, 및 장점은 이어지는 상세한 설명에서 분명해진다. 그러나, 상세한 설명은, 본 발명의 구체예를 설명하긴 하지만, 이는 단지 예시의 방식일 뿐, 제한으로서 제공되지 않음이 이해되어야 한다. 본 발명의 범위 내에서 다양한 변화 및 변형이 상세한 설명을 통하여 당해 분야의 숙련가에게 명백해질 것이다.

## 도면의 간단한 설명

### [0027] 도면의 간단한 설명

도 1은 가용성 인간 Flt-1 항원으로 번역화된 마우스의 항-가용성 인간 Flt-1 항혈청 역가를 설명하는 예시적인 결과를 나타낸다. 항-sFlt-1 혈청 역가는 투여 후 20일간 다섯 개의 개별적인 Balb/c 마우스로부터 도시된다.

도 2는 ELISA에서 인간 가용성 Flt-1과 단일클론 항체의 경쟁적 결합을 설명하는 예시적인 결과를 나타낸다. 인간 Flt-1에의 VEGF 결합을 위한 하이브리도마 상청액의 경쟁적 ELISA가 도시된다. 음성 대조(정제된 다클론 마우스 IgG)는 인간 Flt-1에 대해 어떠한 경쟁도 보이지 않는 반면, 융합 생성물 01A04 및 양성 대조 시판 항체 Abcam56300는 경쟁적 결합제이다.

도 3은 가용성 인간 Flt-1에 대한 예시적인 단일클론 항체 결합을 나타낸다. 인간 sFlt-1 항원에 대한 하이브리도마 클론 01A04-02B10 하위-클론으로부터 정제된 IgG의 직접 결합 ELISA가 도시된다. 흡광도 판독 및 현미경 형태학을 기반으로, 하위-클론 01A04-02B10-02G07이 선택되어 더욱 확대되고 특징분석되었다.

도 4는 표면 플라스몬 공명 (BIACORE) 어세이를 통해 가용성 인간 Flt-1에 대한 단일클론 항체 결합을 설명하는 예시적인 결과를 나타낸다. 고정된 인간 sFlt-1 항원에의 하이브리도마 클론 01A04 (하위-클론 02B10-02G07) IgG 결합에 대한 표면 플라스몬 공명 센소그램(sensogram)이 도시된다.

도 5는 사이노 (원숭이) Flt-1과 단일클론 항체 결합의 교차-반응성을 설명하는 예시적인 결과를 나타낸다. 인



간 및 사이노몰구스 Flt-1을 과-발현하는 세포주에 대한 하이브리도마 클론 01A04 (하위-클론 02B10-02G07)로부터 정제된 IgG의 결합이 도시된다. 더 어두운 막대그래프는 이소형(isotype) 대조 항체를 나타낸다. 더 밝은 막대그래프는 단일클론 항체 01A04-02B10-02G7를 나타낸다.

도 6은 ELISA에서 인간 가용성 Flt-1과 단일클론 항체의 경쟁적 결합을 설명하는 예시적인 결과를 나타낸다. 시판 기준에 대한 단일클론 항체 01A04 (하위-클론 02B10-02G07)의 VEGF:sFlt-1 IC<sub>50</sub> 측정이 도시된다. 인간 Flt-1에의 VEGF 결합에 대한 각각의 IgG들의 경쟁적 ELISA를 수행함으로써 수치를 획득하였다. 음성 대조(정제된 다클론 마우스 IgG)는 인간 Flt-1에 대해 어떠한 경쟁도 보이지 않는 반면 단일클론 항체 01A04, 및 Abcam로부터의 시판 항-sFlt-1 항체(카탈로그 번호 제56300호)는 VEGF 결합 부위를 두고 경쟁한다. 단일클론 항체 01A04는 시판 기준보다 더 강한 길항제이다. 01A04에 대한 IC<sub>50</sub>은 2.3 pM였다. Abcam 56300에 대한 IC<sub>50</sub>은 65 pM였다.

도 7은 세포 기반 어세이에서 sFlt-1에 대한 VEGF 결합의 항-Flt-1 단일클론 항체 저해를 설명하는 예시적인 결과를 나타낸다. 일차 HUVEC들을 재조합 인간 가용성 Flt-1 (15X 몰당량, 36nM) 및 단일클론 항체 01A04 (하위-클론 02B10-02G07)의 존재 또는 부재에서 재조합 인간 VEGF (100ng/mL, 2.4nM)으로 처리하였다. VEGF R2의 세포질 꼬리의 인산화로 미루어 보아, 01A04의 부가는 VEGF 유발성 HUVEC 활성화를 방지한다. 단일클론 항체 01A04 단독은 수용체 인산화에 아무런 영향을 주지 않는 반면, 대조 IgG는 VEGF 및 가용성 Flt-1의 존재에서 신호전달을 막지 못한다.

도 8은 항-Flt-1 항체의 투여에 의해 향상된 근육 조직병리학을 설명하는 예시적인 현미경 사진을 나타낸다. 항-sFlt-1 단일클론 항체로 처리한 후 mdx 근육 병리의 향상이 도시된다. 동물들을 sFlt-1 (앤지오 프로테오미 (Angio Proteomie), 클론 AP-MAB0702) 또는 대조로서 PBS에 대해 시판 단일클론 항체로 처리하였다. 맨 윗줄은 횡격막 근육의 에반스 블루(Evans blue) 염료 염색을 나타낸다. 두 번째 줄은 혈관을 정량화하기 위한 횡격막 근육의 CD31 염색을 나타낸다. 세 번째 줄은 횡격막 근육의 H+E 염색을 나타낸다. 마지막 줄은 섬유증을 정량화하기 위한 횡격막 근육의 반 기에슨(Van Giesson) 염색을 나타낸다.

도 9는 마우스에 항-Flt-1 항체를 투여함으로써 향상된 근육 조직학을 나타내는 조직병리학적 마커의 정량화를 설명하는 예시적인 결과를 나타낸다. 도 8에 제시된 조직병리학적 데이터의 정량화가 도시된다. 에반스 블루 양성 섬유(맨 윗 패널), CD31+ 혈관(두 번째 패널); 및 중심에 위치한 핵(세 번째 패널)의 수를 4x 및 10x 배율에서 수동으로 계수하였다. 총 섬유증 영역을 사진 분석 소프트웨어를 이용하여 정량화하였다(맨 아래 패널). 스튜던트(student)의 독립적 t-시험에 의해 \* = p<0.05.

도 10은 마우스에 항-Flt-1 항체를 투여함으로써 향상된 근육 조직학을 나타내는 조직병리학적 마커의 정량화를 설명하는 예시적인 결과를 나타낸다. 도 8에 제시된 조직병리학적 데이터의 정량화가 도시된다. 상단: 항-Flt1 단일클론 항체로 처리한 후 횡격막에서 중심에 위치한 핵(centrally located nuclei, CLN)을 갖는 섬유의 감소. CLN을 갖는 섬유를 4x 및 10x 배율로 수동으로 계수하였다. 하단: 항-Flt1 단일클론 항체로 처리한 후 횡격막에서 더 큰 섬유 크기로의 약한 이동. 섬유 직경을 4x 및 10x 배율로 수동으로 계수하였다. 스튜던트의 독립적 t-시험에 의해 \* = p<0.05.

도 11은 근육 기능에 있어서 Flt-1 항체의 생체 내 효능을 설명하는 예시적인 결과를 나타낸다. mdx 마우스에 Flt-1 항체의 투여는 악력 시험 (위 패널) 및 트레드밀 시험 (아래 패널)에서 PBS를 투여한 대조 mdx 마우스에 비해 능력을 향상시켰다. 동물의 악력은 동물당 독립적으로 3회, 각 측정마다 30분씩 간격을 두고 측정하였다. 총 트레드밀 거리를 동물당 3회씩 측정하였다.

도 12는 혈청에서 유리 가용성 Flt-1의 생체 내 감소를 설명하는 예시적인 결과를 나타낸다. mdx 마우스에 Flt-1 항체의 투여는 이소형 대조 항체에 비해 혈액 내 가용성 Flt1 수준의 매우 상당한 감소를 야기하였다. 동물들은 4주령부터 시작하여 4주 동안 일주일에 두 차례씩 20 mg/kg을 투여하였다. 부검 시, 생물 마커 분석을 위해 혈액을 수집하였다. 이소형 대비 \*\*\* p < 0.001.

도 13은 혈청 VEGF 농도에서 생체 내 증가를 설명하는 예시적인 결과를 나타낸다. mdx 마우스에 Flt-1 항체의 투여는 이소형 대조 항체에 비해 혈액 내 유리 VEGF 수준의 매우 상당한 증가를 야기하였다. 동물들은 4주령부터 시작하여 4주 동안 일주일에 두 차례씩 20 mg/kg을 투여하였다. 부검 시, 생물 마커 분석을 위해 혈액을 수집하였다. 이소형 대비 \*\*\* p = 0.0063.

도 14는 횡격막 근육에서 혈관형성의 생체 내 증가를 설명하는 예시적인 결과를 나타낸다. mdx 마우스에 Flt-1 항체의 투여는 이소형 대조 항체에 비해 횡격막 근육에서, CD31 염색으로 예시되는 바와 같이, 내피 세포 증식

의 상당한 증가를 야기하였다. 동물들은 4주령부터 시작하여 4주 동안 일주일에 두 차례씩 20 mg/kg을 투여하였다. 부검 시, 조직병리학을 위해 조직을 보관하였다. 도식된 것은 내피 세포 마커인 CD31에 대한 염색이다. 항-Fit-1 단일클론 항체로 처리한 후의 내피 세포수의 통계학적으로 유의한 증가( $p < 0.05$ )가 존재하였다. 데이터를 자동 정량화 영상화 소프트웨어를 이용하여 분석하였다. 샘플은 연구자에게는 가려졌다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

### 정의

본 발명이 더 쉽게 이해되게 하기 위해, 특정 용어가 하기에서 먼저 정의된다. 이하의 용어들 및 다른 용어에 대한 추가적인 정의는 명세서 전반에 걸쳐서 제시된다.

**동물:** 본 명세서에서 사용된, 용어 "동물"은 동물계의 임의의 구성원을 지칭한다. 일부 구체예에서, "동물"은 임의의 발달 단계에 있는 인간을 지칭한다. 일부 구체예에서, "동물"은 임의의 발달 단계에 있는 인간이-아닌 동물을 지칭한다. 특정 실시예에서, 인간이-아닌 동물은 포유류이다(예컨대, 설치류, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 양, 소, 영장류, 및/또는 돼지). 일부 구체예에서, 동물은 포유류, 조류, 파충류, 양서류, 어류, 곤충류, 및/또는 연충류를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 구체예에서, 동물은 형질전환 동물, 유전자-조작된 동물, 및/또는 클론일 수 있다.

**항체:** 본 명세서에서 사용된, 용어 "항체"는 천연이든 전부 또는 부분적으로 합성되어 생산된 것이든 임의의 면역글로불린을 지칭한다. 특이적인 결합 능력을 보유하는 이들의 모든 유도체가 또한 상기 용어에 포함된다. 상기 용어는 또한 면역글로불린-결합 도메인에 상동성이거나 대부분 상동성인 결합 도메인을 가지는 임의의 단백질을 포괄한다. 그러한 단백질은 천연 공급원으로부터 유래되거나, 부분적으로 또는 전부 합성되어 생산될 수 있다. 항체는 단일클론성 또는 다클론성일 수 있다. 항체는 인간의 임의 클래스를 포함하여 임의의 면역글로불린 클래스의 구성원일 수 있다: IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE. 특정 구체예에서, 항체는 IgG 면역글로불린 클래스의 구성원일 수 있다. 본 명세서에서 사용된, 용어 "항체 단편" 또는 "항체의 특징적인 부분"은 상호교환적으로 사용되며 전장(full-length)보다 짧은 임의의 항체 유도체를 지칭한다. 일반적으로, 항체 단편은 최소한, 전장 항체의 특이적 결합 능력 중 중요한 부분을 보유한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, Fv, dsFv 디아바디, 및 Fd 단편을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 항체 단편은 임의의 방법으로 제조될 수 있다. 예를 들면, 항체 단편은 온전한 항체의 단편화에 의해 효소적으로 또는 화학적으로 제조될 수 있고 및/또는 부분적인 항체 서열을 인코딩하는 유전자로부터 제조되어 제조될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 항체 단편은 전부 또는 부분적으로 합성되어 생산될 수 있다. 항체 단편은 임의로 단일 사슬 항체 단편을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 항체 단편은 예를 들면, 이황화 연결에 의해 서로 연결된 다중 사슬을 포함할 수 있다. 항체 단편은 임의로 다분자 복합체를 포함할 수 있다. 기능적 항체 단편은 전형적으로 적어도 약 50개의 아미노산을 포함하며 더 전형적으로는 적어도 약 200개의 아미노산을 포함한다. 특정 구체예에서, 항체는 인간 항체일 수 있다. 특정 구체예에서, 항체는 인간화 항체일 수 있다.

**항원 결합 단편:** 본 명세서에서 사용된, 용어 "항원 결합 단편"은 항원 (즉, Flt-1)과 접촉하고 이에 결합하는 면역글로불린 분자 부분을 지칭한다.

**대략 또는 약:** 본 명세서에서 사용된, 하나 이상의 관심의 수치에 적용되는 용어 "대략" 또는 "약"은 언급된 기준 수치와 유사한 수치를 지칭한다. 특정 구체예에서, 용어 "대략" 또는 "약"은 달리 언급되거나 달리 문맥으로부터 명확하지 않는 경우 언급된 기준 수치의 양 방향(그보다 초과 또는 미만)으로 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 이내에 속하는 수치의 범위를 지칭한다(다만 그러한 숫자가 가능한 수치의 100%를 초과하는 경우는 제외된다).

**생물학적으로 활성인:** 본 명세서에서 사용된, 문구 "생물학적으로 활성인"은 생물학적 시스템에서, 및 특히 유기체에서 활성을 가지는 임의의 물질의 특징을 지칭한다. 예를 들면, 유기체에 투여될 경우, 상기 유기체에 생물학적 영향을 주는 물질은 생물학적으로 활성이라고 간주된다. 펩티드가 생물학적으로 활성인 특정한 구체예에서, 상기 펩티드의 적어도 하나의 생물학적 활성을 공유하는 펩티드 부분은 전형적으로 "생물학적 활성인" 부분으로 지칭된다. 특정 구체예에서, 고유한 생물학적 활성은 없지만 하나 이상의 VEGF 리간드의 결합을 저해하는 펩티드는 생물학적으로 활성인 것으로 간주된다.

**담체 또는 희석제:** 본 명세서에서 사용된, 용어 "담체" 및 "희석제"는 약제학적으로 허용되는 (예컨대, 인간에게 투여하기에 안전하고 무독성인) 약학 제형의 제조에 있어서 유용한 담체 또는 희석 물질을 지칭한다. 예시적

인 희석제는 무균수, 방부제첨가주사용수(BWFI), pH 완충 용액(예컨대 포스페이트-완충 식염수), 무균 식염수 용액, 링거 용액 또는 텍스트로스 용액을 포함한다.

- [0036] **투여 제형:** 본 명세서에서 사용된, 용어 "투여 제형" 및 "단위 투여 제형"은 치료받을 환자를 위한 치료적 단백질(예컨대, 항체)의 물리적으로 구분된 단위를 지칭한다. 각각의 단위는 요망되는 치료적 효과를 생성하도록 계산된 소정량의 활성 물질을 함유한다. 그러나, 조성물의 총 투여량은 합리적인 의학적 판단의 범위 내에서 담당 전문의에 의해 결정되어야 함이 이해될 것이다.
- [0037] **기능적 균등물 또는 유도체:** 본 명세서에서 사용된, 용어 "기능적 균등물" 또는 "기능적 유도체"는, 아미노산 서열의 기능적 유도체의 맥락에서, 본래의 서열과 실질적으로 유사한 생물학적 활성(기능적이든 구조적이든)을 보유하는 분자를 의미한다. 기능적 유도체 또는 균등물은 천연 유도체일 수 있거나 합성되어 제조된다. 예시적인 기능적 유도체는 단백질의 생물학적 활성이 보존된다는 전제하에, 하나 이상의 아미노산의, 치환, 결실, 또는 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 치환하는 아미노산은 바람직하게는 치환된 아미노산과 유사한 화학-물리적 특성을 갖는다. 요망되는 유사한 화학-물리적 특성은 전하, 크기, 소수성, 친수성, 등에서의 유사성을 포함한다.
- [0038] **융합 단백질:** 본 명세서에서 사용된, 용어 "융합 단백질" 또는 "키메라 단백질"은 본래적으로 서로 떨어진 둘 이상의 단백질, 또는 이들의 부분을 연결함으로써 생성된 단백질을 지칭한다. 일부 구체예에서, 링커 또는 스페이서가 각각의 단백질 사이에 존재할 것이다.
- [0039] **반-감기:** 본 명세서에서 사용된, 용어 "반-감기"는 단백질 농도 또는 활성과 같은 양이 기간의 시작점에 측정된 수치의 절반까지 떨어지는데 필요한 시간이다.
- [0040] **비대증:** 본 명세서에서 사용된 용어 "비대증"은 장기 또는 조직이 성분 세포의 비대해짐으로 인해 부피가 증가한 것을 지칭한다.
- [0041] **향상되다, 증가하다, 또는 감소하다.** 본 명세서에서 사용된, 용어 "향상되다", "증가하다" 또는 "감소하다", 또는 문법적으로 동등한 표현은 기초선 측정치, 가령 본 명세서에 기술된 처리의 시작 이전에 동일 개체에서의 측정치, 또는 본 명세서에 기술된 처리가 부재하는 대조군 개체(또는 다중 대조군 개체)에서의 측정치에 대해 상대적인 수치를 가리킨다. "대조군 개체"는 처리받는 개체와 동일한 형태의 질환을 앓고, 처리받는 개체와 거의 동일한 연령을 갖는 개체이다.
- [0042] **시험관 내:** 본 명세서에서 사용된, 용어 "시험관 내"는 다-세포 유기체 내부가 아닌 인공적인 환경, 예컨대, 시험관 또는 반응 용기 내, 세포 배양액 내, 등에서 일어나는 현상을 지칭한다.
- [0043] **생체 내:** 본 명세서에서 사용된, 용어 "생체 내"는 인간 및 인간이-아닌 동물과 같은 다-세포 유기체 내부에서 일어나는 현상을 지칭한다. 세포-기반 시스템의 맥락에서, 상기 용어는 살아있는 세포 내부에서 일어나는 현상을 지칭하기 위해 사용될 수 있다(예를 들면, 시험관 내 시스템의 반대로서).
- [0044] **링커:** 본 명세서에서 사용된, 용어 "링커"는 융합 단백질에서, 천연 단백질 내 특정 위치에 나타나는 것과 다른 아미노산 서열을 지칭하며 일반적으로는 두 개의 단백질 모이어티 사이에 유연함을 주기 위해 또는 α-나선과 같은 구조를 끼워넣기 위해 설계된다. 링커는 또한 스페이서로도 지칭된다. 링커 또는 스페이서는 전형적으로 자체의 생물학적 기능을 갖지 않는다.
- [0045] **약제학적으로 허용되는:** 본 명세서에서 사용된 용어 "약제학적으로 허용되는"은 적절한 의학적 판단의 범위 내에서, 합리적인 이익/위험 비율에 비례하여 과량의 독성, 자극, 알러지 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증이 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉시켜 사용하기에 적절한 물질을 지칭한다.
- [0046] **폴리펩티드:** 본 명세서에서 사용된 용어 "폴리펩티드"는 펩티드 결합을 통해 서로 연결된 아미노산의 연속적인 사슬을 지칭한다. 상기 용어는 임의의 길이의 아미노산 사슬을 지칭하기 위해 사용되지만, 당해 분야의 숙련가는 상기 용어가 긴 사슬에 제한되지 않으며 펩티드 결합을 통해 서로 연결된 두 개의 아미노산을 포함하는 최소의 사슬을 지칭할 수도 있음을 이해할 것이다. 당해 분야의 숙련가에게 공지된 바와 같이, 폴리펩티드는 변형 및/또는 개질될 수 있다.
- [0047] **예방:** 본 명세서에서 사용된, 용어 "예방하는" 또는 "예방"은, 질환, 장애, 및/또는 용태의 발병과 연관되어 사용될 경우에, 상기 질환, 장애, 및/또는 용태가 일어날 위험을 줄이는 것을 지칭한다. "위험"의 정의를 참조하라.

- [0048] 단백질: 본 명세서에서 사용된 용어 "단백질"은 독립된 단위로서 기능하는 하나 이상의 폴리펩티드를 지칭한다. 만일 단일 폴리펩티드가 독립된 기능 단위이고 독립된 기능 단위를 형성하기 위해 다른 폴리펩티드와의 지속적 이거나 일시적인 물리적 연합을 요하지 않는 경우, 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 상호교환적으로 사용될 수 있다. 만일 독립된 기능 단위가 물리적으로 서로 연합된 하나 초과 폴리펩티드로 이루어질 경우, 용어 "단백질"은 물리적으로 연결되고 함께 독립된 단위처럼 기능하는 다중 폴리펩티드를 지칭한다.
- [0049] 위험: 문맥으로부터 이해될 바와 같이, 질환, 장애, 및/또는 용태의 "위험"은 특정한 개체가 질환, 장애, 및/또는 용태(예컨대, DMD)를 일으킬 가능성을 포함한다. 일부 구체예에서, 위험은 백분율로 표현된다. 일부 구체예에서, 위험은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 내지 최대 100%이다. 일부 구체예에서, 위험은 기준 샘플 또는 기준 샘플의 그룹에 연관된 위험에 대해 상대적인 위험으로서 표현된다. 일부 구체예에서, 기준 샘플 또는 기준 샘플의 그룹은 질환, 장애, 용태 및/또는 현상(예컨대, DMD)의 공지된 위험을 갖는다. 일부 구체예에서, 기준 샘플 또는 기준 샘플의 그룹은 특정 개체에 필적하는 개체에 속한다. 일부 구체예에서, 상대적인 위험은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상이다.
- [0050] 횡문근: 본 명세서에서 사용된, 용어 "횡문근"은 이의 세포내 수축성 단위인, 근절이 일정하게 이어져 있어서 수의적인 조절 하에 현미경을 이용하여 줄무늬가 나타나게 하는 다핵 근육 조직을 지칭한다. 전형적으로, 횡문근은 심장 근육, 골격 근육, 및 새절근(Branchiomic muscle)일 수 있다.
- [0051] 평활근: 본 명세서에서 사용된, 용어 "평활근"은 단일 및 다중-단위 근육을 비롯하여 불수의적으로 제어되는, 무늬가-없는 근육을 지칭한다.
- [0052] 개체: 본 명세서에서 사용된, 용어 "개체"는 인간 또는 임의의 인간이-아닌 동물 (예컨대, 마우스, 래트, 토끼, 개, 고양이, 소, 돼지, 양, 말 또는 영장류)를 지칭한다. 인간은 출생-전 및 -후 형상을 포함한다. 많은 구체예에서, 개체는 인간이다. 개체는 환자일 수 있고, 이는 의료 종사자에게 질환의 진단 또는 치료를 위해 제시되는 인간을 지칭한다. 용어 "개체"는 본 명세서에서 "개인" 또는 "환자"와 상호교환적으로 사용된다. 개체는 질환 또는 장애를 앓고 있거나 발병가능할 수 있지만 상기 질환 또는 장애의 증상을 나타낼 수도 나타내지 않을 수도 있다.
- [0053] 실질적으로: 본 명세서에서 사용된, 용어 "실질적으로"는 관심의 특징 또는 특성의 정도 또는 규모가 전부 또는 거의-전부 나타나는 정량적인 상태를 지칭한다. 생물학 분야의 숙련가는 생물학적 및 화학적 현상이, 만일 있더라도, 종료에 이르고 및/또는 완료까지 진행되거나 완전한 결과를 성취하거나 방지하는 경우가 드물다는 것을 이해할 것이다. 용어 "실질적으로"는 그러므로 본 명세서에서 많은 생물학적 및 화학적 현상들에 내재된 완전성 부족의 가능성을 포괄하기 위해 사용된다.
- [0054] 실질적인 상동체: 문구 "실질적인 상동체"는 본 명세서에서 아미노산 또는 핵산 서열 사이의 비교를 지칭하기 위해 사용된다. 당해 분야의 숙련가에게는 이해될 바와 같이, 두 개의 서열은 일반적으로 상응하는 위치에 상동성인 잔기를 보유할 경우 "실질적으로 상동적"인 것으로 간주된다. 상동성 잔기는 동일한 잔기일 수 있다. 대안적으로, 상동성 잔기는 적절하게는 유사한 구조적 및/또는 기능적 특징을 갖는 동일하지-않은 잔기일 수 있다. 예를 들면, 당해 분야의 숙련가에게는 잘 공지되는 바와 같이, 특정 아미노산은 전형적으로 "소수성" 또는 "친수성" 아미노산으로, 및/또는 "극성" 또는 "비-극성" 결사슬을 가지는 것으로 분류된다. 한 아미노산이 동일한 유형의 다른 것으로 치환되는 것은 흔히 "상동적" 치환으로 간주될 수 있다.
- [0055] 당해 분야에 잘 공지되어 있는 바와 같이, 아미노산 또는 핵산 서열은 시판 컴퓨터 프로그램으로 이용가능한 것들 가령 뉴클레오티드 서열을 위한 BLASTN 및 BLASTP, 간극형 BLAST(gapped BLAST), 및 아미노산 서열을 위한 PSI-BLAST를 비롯한 다양한 알고리즘 중 어느 하나를 이용하여 비교될 수 있다. 예시적인 그러한 프로그램들이 Altschul, et al., basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al., *Methods in Enzymology*; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, et al., *Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley, 1998; 및 Misener, et al., (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999에 기술되어 있다. 상동성 서열을 식별하는 것 외에도, 상기 언급된 프로그램들은 전형적으로 상동성 정도의 표시를 제공한다. 일부 구체예에서, 두 서열의 상응하는 잔기 중 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상이 연관된 구간의 잔기에 대해 상동성인 경우 이들 서열은 실질적으로 상동성인 것으로 간주된다. 일부 구체예에서, 연관된 구간은 완전한 서열이다. 일부 구체예에서, 연관된 구간은 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75,



80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 또는 그 이상의 잔기에 달한다.

[0056] **실질적 동일성:** 문구 "실질적인 동일성"은 본 명세서에서 아미노산 또는 핵산 서열 사이의 비교를 지칭하기 위해 사용된다. 당해 분야의 숙련가에게는 이해될 바와 같이, 두 개의 서열은 일반적으로 상응하는 위치에 동일한 잔기를 보유할 경우 "실질적으로 동일한" 것으로 간주된다. 당해 분야에 잘 공지되어 있는 바와 같이, 아미노산 또는 핵산 서열은 시판 컴퓨터 프로그램으로 이용가능한 것들 가령 뉴클레오타이드 서열을 위한 BLASTN 및 BLASTP, 간극형 BLAST, 및 아미노산 서열을 위한 PSI-BLAST를 비롯한 다양한 알고리즘 중 어느 하나를 이용하여 비교될 수 있다. 예시적인 그러한 프로그램들이 Altschul, et al., Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al., *Methods in Enzymology*; Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997; Baxevanis et al., *Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley, 1998; 및 Misener, et al., (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999에 기술되어 있다. 동일한 서열을 식별하는 것 외에도, 상기 언급된 프로그램들은 전형적으로 동일성 정도의 표시를 제공한다. 일부 구체예에서, 두 서열의 상응하는 잔기 중 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상이 연관된 구간의 잔기에 대해 동일한 경우 이들 서열은 실질적으로 동일한 것으로 간주된다. 일부 구체예에서, 연관된 구간은 완전한 서열이다. 일부 구체예에서, 연관된 구간은 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 또는 그 이상의 잔기에 달한다.

[0057] **고통받는:** 질환, 장애, 및/또는 용태로 인해 "고통받는" 개체는 상기 질환, 장애, 및/또는 용태를 갖는 것으로 진단되었거나 하나 이상의 증상을 나타낸다.

[0058] **발병가능한:** 질환, 장애, 및/또는 용태가 "발병가능한" 개체는 상기 질환, 장애, 및/또는 용태를 갖는 것으로 진단되지 않았다. 일부 구체예에서, 질환, 장애, 및/또는 용태가 발병가능한 개체는 상기 질환, 장애, 및/또는 용태의 증상을 나타내지 않을 수도 있다. 일부 구체예에서, 질환, 장애, 용태, 또는 현상(예를 들면, DMD)이 발병가능한 개체는 다음 중 하나 이상을 특징으로 할 수 있다: (1) 상기 질환, 장애, 및/또는 용태의 발병과 연관된 유전자 돌연변이; (2) 상기 질환, 장애, 및/또는 용태의 발병과 연관된 유전자 다형성; (3) 상기 질환, 장애, 및/또는 용태와 연관된 단백질의 증가된 및/또는 감소된 발현 및/또는 활성; (4) 상기 질환, 장애, 용태, 및/또는 현상의 발병과 연관된 습관 및/또는 생활방식 (5) 이식을 받았거나 받을 예정이거나, 필요한 경우. 일부 구체예에서, 질환, 장애, 및/또는 용태가 발병가능한 개체는 상기 질환, 장애, 및/또는 용태를 일으킬 것이다. 일부 구체예에서, 질환, 장애, 및/또는 용태가 발병가능한 개체는 상기 질환, 장애, 및/또는 용태를 일으키지 않을 것이다.

[0059] **표적 조직:** 본 명세서에서 사용된, 용어 "표적 조직"은 DMD와 같이 치료되어야 할 질환에 걸린 임의의 조직을 지칭한다. 일부 구체예에서, 표적 조직은 근소모, 골격 기형, 심근증, 근육 허혈, 인지 장애, 및 호흡 기능 장애를 포함하지만 이에 제한되지 않는 질환-연관성 병리, 증상, 또는 특징을 나타내는 조직들을 포함한다.

[0060] **치료적으로 효과적인 양:** 본 명세서에서 사용된, 용어 치료적 물질의 "치료적으로 효과적인 양"은 질환, 장애, 및/또는 용태로 고통받거나 발병가능한 개체에게 투여하였을 때, 상기 질환, 장애, 및/또는 용태의 증상(들)을 치료, 진단, 예방, 및/또는 개시를 지연시키기에 충분한 양을 의미한다. 당해 분야의 숙련가는 치료적으로 효과적인 양이 전형적으로 적어도 하나의 단위 용량을 포함하는 투여 계획을 통해 투여된다는 것을 이해할 것이다.

[0061] **치료하는:** 본 명세서에서 사용된, 용어 "치료하다", "치료", 또는 "치료하는"은 특정 질환, 장애, 및/또는 용태의 하나 이상의 증상 또는 특징을 부분적으로 또는 완전히 경감, 개선, 완화, 저해, 예방, 개시를 지연, 중증도를 감소 및/또는 발생율을 감소시키기 위해 사용되는 임의의 방법을 지칭한다. 치료제는 질환의 징후를 나타내지 않는 및/또는 질환의 이른 징후만을 나타내는 개체에게 상기 질환과 연관된 병리를 일으킬 위험을 감소시킬 목적으로 투여될 수 있다.

#### [0062] **특정한 구체예의 상세한 설명**

[0063] 본 발명은 무엇보다도, 치료제로서의 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 기초로 하여 뒤시엔스 근위축증(DMD) 및/또는 베커 근위축증을 비롯한 근위축증을 치료하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 DMD를 치료하는 방법을 제공하며 상기 방법은 DMD를 앓고 있거나 발병가능한 개체에게, DMD의 적어도 하나의 증상 또는 특징이 강도, 중증도, 또는 빈도에서 줄어들거나, 지연된 개시를 가지게 하기 위해, 효

과적인 양의 Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하는 단계를 포함한다.

[0064] 본 발명의 다양한 양태가 하기 단락에서 상세하게 기술된다. 하기 단락들의 사용은 본 발명을 제한하려는 의도가 아니다. 각각의 단락은 본 발명의 임의의 양태에 적용할 수 있다. 본 명세서에서, "또는"의 사용은 달리 언급되지 않는 한 "및/또는"을 의미한다.

[0065] **뒤시엔느 근위축증 (DMD)**

[0066] DMD는 근육의 진행성 악화 및 신체 전체에 걸친 근육 관련 기능의 손실을 특징으로 하는 질환이다. 본 발명은 근육의 악화를 늦추거나, 지연시키거나 방지하기 위한, 근육 재생성을 위한, 및 섬유증, 염증 및 DMD와 연관된 다른 증상 또는 특징 및 다양한 근육 조직에서의 다른 근위축증을 되돌리거나, 제거하거나, 지연시키거나, 예방하거나 최소화하기 위한 방법 및 조성물을 제공하는 것을 고려한다.

[0067] **근육 조직**

[0068] 동물의 근육 조직에는 두 가지 주요한 유형 - 횡문근 및 평활근이 존재한다. 본 명세서에서 사용된, 용어 "횡문근"은 반복되는 근절을 포함하는 근육 조직을 지칭한다. 횡문근은 수의적 조절 하에 있는 경향이 있으며 골격에 부착된다. 횡문근은 신체의 수의적 운동을 가능하게 하며 사두근, 비복근, 이두근, 삼두근, 승모근, 삼각근, 및 많은 다른 것들을 비롯한 주요한 근육 그룹을 포함한다. 횡문근은 매우 긴 경향이 있으며, 많은 횡문근이 독립적으로 기능할 수 있다. 그러나, 입, 항문, 심장, 및 식도의 윗부분의 근육들을 비롯한 일부 횡문근은 골격에 부착되어 있지 않다.

[0069] 평활근은, 그 반대로, 매우 상이한 구조를 갖는다. 서로 떨어진 골격에 부착된 일련의 긴 근육을 갖기보다는, 평활근은 평활근 세포들 사이에 물리적인 연결을 통해 연속적인 시트로 조직되어 있는 경향이 있다. 평활근은 흔히 속이 빈 장기의 벽에 위치하며 보통 수의적 조절하에 있지 않다. 특정 장기를 감싸는 평활근은 동일한 하중과 수축을 동시에 가져야 한다. 평활근은 적어도 부분적으로, 속이 빈 장기에서 운동 및/또는 자세나 압력의 변화로 인해 야기된 하중의 변화를 다루도록 기능한다. 이러한 이중 역할은 평활근이 횡문근처럼 수축할 수 있을 뿐 아니라 지속되는 하중에 대하여 장기 크기를 유지하기 위해 튼튼하게 수축할 수 있어야 함을 의미한다. 평활근의 예는 혈관, 세기관지, 방광, 및 위장관 가령 직장의 내벽들이다.

[0070] 근육의 강도는 근육 세포의 수와 크기 및 이들의 해부학적 배치에 따라 달라진다. 신규한 근원섬유의 합성(비대증) 및/또는 더 많은 근육 세포의 형성(과형성)에 의한 근육 섬유 직경의 증가는 근육의 근력-생성 능력을 증가시킬 것이다.

[0071] 근육은 또한 위치나 기능에 의해 나뉠 수 있다. 일부 구체예에서, Flt-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나 이상의 얼굴 근육, 하나 이상의 씹는 근육, 하나 이상의 혀 및 목 근육, 하나 이상의 흉부 근육, 하나 이상의 흉대 및 팔 근육, 하나 이상의 팔 및 어깨 근육, 하나 이상의 복부 및 전박 내측면 근육, 하나 이상의 손 근육, 하나 이상의 척추기립근, 하나 이상의 골반대 및 다리 근육, 및/또는 하나 이상의 정강이 및 발 근육을 향해 표적화된다.

[0072] 일부 구체예에서, 얼굴 근육은 눈의 근육 가령 모양체근, 홍채 확대근, 홍채 팔약근; 귀의 근육 가령 이개근, 관자마루근, 등자근, 고막긴장근; 코의 근육 가령 비근근, 비근, 코조임근, 비중근, 상순비익거근; 입의 근육 가령 입꼬리올림근, 입꼬리내림근, 구륜근, 협근, 대 및 소협골근, 광경근, 윗입술콧방울올림근, 아랫입술내림근, 입꼬리당김근, 턱끝근, 및/또는 눈썹주름근을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0073] 일부 구체예에서, 씹는 근육은 교근, 측두근, 내측익돌근, 외측익돌근을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 구체예에서, 혀 및 목의 근육은 이설근, 경동설근, 구개설근, 설하근, 악이복근, 붓목뿔근, 악설골근, 이설골근, 견갑설골근, 홍골설골근, 홍골갑상근, 갑상설골근, 홍쇄유돌근, 전사각근, 중사각근, 및/또는 후방 사각근을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0074] 일부 구체예에서, 흉부, 흉대, 및 팔의 근육은 쇄골하근 대흉근, 소흉근, 복직근, 외복사근, 내복사근, 복횡근, 횡격막, 외늑간근, 내늑간근, 전거근, 승모근, 견갑거근, 대능형근, 소능형근, 광배근, 삼각근, 견갑하근, 극상근, 극하근, 대원근, 소원근, 및/또는 오쇄완근을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0075] 일부 구체예에서, 팔 및 어깨의 근육은 상완이두근-장두, 상완이두근-단두, 상완삼두근-장두, 상완삼두근 외측두, 상완삼두근-내측두, 주근, 원회내근, 회외근, 및/또는 상완근을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0076] 일부 구체예에서, 복부 및 전박 내측면의 근육은 완요골근, 요측수근굴근, 척측수근굴근, 장장근,

척측수근신근, 장요측수근신근, 단요측수근신근, 지신근, 소지신근을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0077] 일부 구체예에서, 손의 근육은 손의 내재근 가령 모지구근, 단무지외전근, 단무지굴근, 무지대립근, 소지구근, 소지외전근, 단소지굴근, 소지대립근, 장측굴간근, 배측굴간근 및/또는 충양근을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0078] 일부 구체예에서, 척추기립근은 경근, 척추근, 최장근, 및/또는 장능근을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0079] 일부 구체예에서, 골반대 및 다리 근육은 대요근, 장골근, 대퇴방형근, 장내전근, 단내전근, 대내전근, 박근, 봉공근, 대퇴사두근 가령, 대퇴직근, 외측광근, 내측광근, 중간광근, 비복근, 장비굴근(긴종아리근), 비장근, 대둔근, 중둔근, 소둔근, 슬딕근: 대퇴이두근: 장두, 슬딕근: 대퇴이두근: 단두, 슬딕근: 반건양근, 슬딕근: 반막양근, 대퇴근막장근, 치골근, 및/또는 전경골근을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0080] 일부 구체예에서, 정강이 및 발의 근육은 장지신근, 장무지신근, 단비굴근, 족저근, 후경골근, 장무지굴근, 단지신근, 단무지신근, 무지외전근, 단무지굴근, 소지외전근, 단소지굴근, 소지대립근, 단지신근, 발의 충양근, 족척방형근 또는 발바닥내모근, 단지굴근, 배측굴간근, 및/또는 척측굴간근을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0081] 예시적인 근육 표적이 표 1에 요약된다.

표 1

[0082]

<b>안륜근</b>				
안내: 모양체근, 홍채 확대근, 홍채 팔약근				
귀: 이개근, 관자마루근, 등자근, 고막긴장근				
코: 비근근, 비근, 코조임근, 비중근, 상순비익거근				
입: 입꼬리올림근, 입꼬리내림근, 구륜근				
협근	대 및 소협골근	광경근	윗입술콧방울 올림근	
아랫입술내림근	입꼬리당김근	턱끝근	눈썹주름근	
주근	원회내근	회외근	상완근	
<b>썹는 근육</b>				
교근	측두근	내측익돌근	외측익돌근	
<b>혀 및 목의 근육</b>				
이설근	경동설근	구개설근	설하근	
악이복근	붓목빨근	악설골근	이설골근	
견갑설골근	홍골설골근	홍골갑상근	갑상설골근	
홍쇄유돌근	전사각근	중사각근	후방 사각근	
<b>흉부, 흉대 및 팔의 근육</b>				
쇄골하근	대흉근	소흉근	복직근	
외복사근	내복사근	복횡근	횡격막	
외늑간근	내늑간근	전거근	승모근	
견갑거근	대능형근	소능형근	광배근	
삼각근	견갑하근	극상근	극하근	
대원근	소원근	오혜완근		
<b>팔 및 어깨</b>				
상완이두근-장두	상완이두근-단두	상완삼두근-장두	상완삼두근-외측두	
상완삼두근-내측두	주근	원회내근	회외근	
상완근				
<b>전완근: 복부 및 등</b>				
완요골근	요측수근굴근	척측수근굴근	장장근	
척측수근신근	장요측수근신근	단요측수근신근	지신근	
소지신근	척추기립근: 경근	척추기립근: 척추근	척추기립근: 최장근	

척추기립근: 장능근					
손의 내재근: 모지구근, 단무지외전근, 단무지굴근, 및 무지대립근					
손의 내재근: 소지구근, 소지외전근, 단소지굴근, 및 소지대립근					
손의 내재근: 장측굴간근, 배측굴간근 및 충양근					
<b>골반대 및 다리의 근육</b>					
장요근: 대요근	장요근: 장굴근	대퇴방형근	장내전근		
단내전근	대내전근	박근	봉궁근		
대퇴사두근: 대퇴직근	대퇴사두근: 외측광근	대퇴사두근: 내측광근	대퇴사두근: 중간광근		
비복근	장비굴근(긴종아리근)	비장근	대둔근		
중둔근	소둔근	슬괵근: 대퇴이두근: 장두	슬괵근: 대퇴이두근: 단두		
슬괵근: 반건양근	슬괵근: 반막양근	대퇴근막장근	치굴근		
전경굴근					
<b>정강이 및 발의 근육</b>					
장지신근	장무지신근	단비굴근	족저근		
후경굴근	장무지굴근	단지신근	단무지신근		
무지외전근	단무지굴근	소지외전근	단소지굴근		
소지대립근	단지신근	발의 충양근	족척방형근 또는 발바닥네모근		
단지굴근	배측굴간근	척측굴간근			

[0083] 근위축증

[0084] 근위축증은 근육의 악화를 야기하여 운동 약화 및 장애를 일으키는 유전성 장애의 한 그룹이다. 모든 근위축증의 핵심 특징은 이들이 진행성 성질을 가진다는 것이다. 근위축증은 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다: 뒤시엔느 근위축증 (DMD), 베커 근위축증, 에머리-드레이푸스(Emery-Dreifuss) 근위축증, 안면견갑상완 근위축증, 지-대 근위축증, 및 근긴장성 위축증 제1형 및 제2형, 가령 선천성 형태의 근긴장성 위축증 제1형. 증상은 일부 또는 모든 근육이 영향받는지와 더불어 근위축증의 유형에 따라 달라질 수 있다. 근위축증의 예시적인 증상은 근육 운동 기술의 발달 지연, 하나 이상의 근육 그룹 사용의 어려움, 삼키기, 말하기 또는 먹기의 어려움, 침흘림, 눈꺼풀 처짐, 빈번한 넘어짐, 성인으로서 근육 또는 근육 그룹의 힘 상실, 근육 크기 손실, 신체 쇠약 또는 변화된 생체역학으로 인한 보행 장애, 및/또는 인지 또는 행동 장애/정신 지체를 포함한다.

[0085] 근위축증을 위한 공지된 치료법은 없는 반면, 증상 및 질환 개선 요법을 모두 포함하는 여러 보충적 치료가 사용된다. 코르티코스테로이드, ACE 저해제, 앤지오텐신 수용체 차단제, 물리적 요법, 교정 장치, 휠체어, 또는 ADL 및 폐 기능을 위한 다른 보조적 의료 장치가 근위축증에서 흔히 사용된다. 심박 조율기가 근긴장성 위축증에서 심부정맥으로 인한 갑작스러운 사망을 예방하기 위해 사용된다. 근긴장증의 증상(이완 불능)을 향상시키는 근긴장-방지제는 멕실리틴(mexilitine), 및 일부 경우에 페니토인, 프로카인아미드 및 퀴닌을 포함한다.

[0086] 뒤시엔느 근위축증

[0087] 뒤시엔느 근위축증(Duchenne muscular dystrophy, DMD)은 열성 X-연관 형식의 근위축증으로 근변성을 일으키고 결국 죽음을 초래한다. DMD는 근위 근육의 쇠약, 비정상적인 걸음걸이, 비복근(종아리) 근육 비대증, 및 상승된 크레아틴 키나아제를 특징으로 한다. 많은 DMD 환자는 증상/정후가 전형적으로 더 분명해지는 5세 무렵에 진단 받는다. 발병한 개체들은 전형적으로 10-13세 무렵 걷는 것을 중단하고 20대 중반 내지 후반 또는 그 전에 심폐 기능장애로 인해 사망한다.

[0088] 상기 장애 DMD는 세포막의 디스트로글리칸 복합체(DGC)에 구조적 안정성을 제공하는 근육 조직 내 중요한 구조적 성분인 단백질 디스트로핀을 코딩하는, 인간 X 염색체 위에 위치한 디스트로핀 유전자 내 돌연변이에 의해 유발된다. 디스트로핀은 내부 세포질 액틴 소섬유 네트워크 및 세포의 기질에 연결되어, 근육 섬유에 물리적 강도를 제공한다. 따라서, 디스트로핀의 변형 또는 부재는 비정상적인 근형질막 파열 및 근섬유의 괴사를 일으킨



다. 모든 성별에서 돌연변이가 생길 수 있지만, 여성은 질환의 심각한 징후를 거의 나타내지 않는다.

[0089] DMD의 주요 증상은 근소모와 연관된 근력 저하이며 여기서 수의적 근육이 전형적으로 가장 먼저 영향받고, 특히 엉덩이, 골반 부위, 허벅지, 어깨의 근육, 및 종아리 근육이 영향받는다. 근력 저하는 또한 팔, 목, 및 다른 부위에 일어난다. 종아리는 흔히 커진다. 징후 및 증상은 일반적으로 6세 전에 나타나며 신생아에서 이미 나타날 수 있다. 다른 신체적 증상은 독립적으로 걷는 능력의 지연, 걸기, 던지기, 또는 달리기 of 지속적인 어려움, 및 결과적인 걷는 능력의 상실(보통 12세); 빈번한 넘어짐; 피로감; 운동 기술의 어려움(달리기, 건너뛰기, 뽀뛰기); 엉덩이-굴근 근육의 짧아짐을 일으키는 요추 전만 증가; 아킬레스 건 및 슬광근의 기능 장애, 결합 조직 내 섬유증; 근육 섬유 기형; 근육 조직이 지방 및 결합 조직으로 대체됨으로써 야기되는 허 및 종아리 근육의 가성비대증(커짐); 신경행동 장애(예컨대, ADHD), 학습 장애(난독증), 및 특정한 인지 기술의 비-진행성 쇠약(특히 단어 언어 기억); 골격 기형(일부 경우 척추측만증을 포함)의 더 높은 위험을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0090] **Flt-1 수용체**

[0091] 관내피성장인자 수용체 1로도 공지된 Flt-1 수용체는 FLT1 유전자에 의해 인코딩되는 수용체이다. 신호전달 당단백질의 혈관내피성장인자(VEGF) 패밀리는 배아발생 및 출생 후 성장 도중 혈관형성의 강한 프로모터로서 작용한다. 특정하게는, VEGF-A 리간드와 VEGF 수용체의 결합은 혈관 투과성을 촉진하고 또한 내피 세포 이동, 증식, 및 생존을 일으켜, 그렇게 새로이 형성된 내피 세포가 새로운 맥관 구조의 기본 구조를 제공하는 것으로 나타났다. 혈관형성에 있어서 우세한 VEGF 신호전달 분자인, VEGF-A는 VEGF 수용체-1 (VEGF-1, 또한 Flt-1로도 공지됨) 및 VEGF 수용체-2 (VEGF-2, 또한 Flk-1로도 공지됨)를 통해 신호전달을 매개한다. 가용성 형태의 Flt-1 (sFlt-1)이 또한 존재하지만, 이는 세포내 신호전달 도메인이 없고 따라서 VEGF-A 또는 여기에 결합하는 다른 리간드를 고립시킴으로써 조절 성능에만 참여하는 것으로 여겨진다. sFlt-1 및, 세포내 신호 전달 경로로 연결되지 않는 Flt-1 결합 부위를 내포하는 다른 분자는 "바람잡이(decoy) 수용체"로서 지칭된다. Flt-1 및 Flk-1 수용체는 세포의 VEGF-A-결합 도메인 및 세포내 티로신 키나아제 도메인을 포함하며, 둘다 혈관모세포 및 내피 세포 계통에서 발달 단계 및 조직 재생 도중 발현을 나타낸다. Flt-1은 Flk-1에 비해 약 10 배 더 높은 VEGF-A에 대한 결합 친화도를 갖지만(Kd ~2-10 pM), 더 약한 티로신 키나아제 도메인은 Flt-1에의 VEGF-A 결합 후의 혈관형성 신호 전달이 Flk-1 신호전달에 비해 동등하게 약함을 말해준다. 따라서, 동형접합 Flt-1 유전자 녹아웃 마우스는 내피 세포 과다생산 및 혈관 분열로 인해 배아 단계에서 죽는다. 역으로, 동형접합 Flk-1 유전자 녹아웃 마우스는 배아발생 도중 난황-낭 혈도 형성의 결어로 인해 조직된 혈관의 발달이 결핍되어 죽는다. Flt-1 및 Flk-1 수용체는 둘다 정상적인 발달을 위해 필요하지만, VEGF-A 농도의 선별적인 증가가 Flk-1 수용체에 대한 더 높은 결합을 가능하게 하고, 모세관 밀도를 증가시키며 근육 재생, 섬유증 및 염증 감소, 및 다양한 근육 조직에서 DMD 및 다른 근위축증에 연관된 증상 및 특징의 완화를 촉진하는 혈관형성-촉진 효과를 유도할 수 있다.

[0092] 본 명세서에서 사용된, 용어 "Flt-1 수용체"는 가용성 및 막 결합 Flt-1 수용체 둘다, 또는 이들의 기능적 단편을 지칭한다.

[0093] **항-Flt-1 항체**

[0094] 본 명세서에서 사용된, 용어 "항-Flt-1 항체"는 Flt-1 수용체 (예컨대, 가용성 또는 막 결합 Flt-1 수용체)에 결합하는 임의의 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 지칭한다. 일부 구체예에서, Flt-1 수용체에 높은 친화도로 결합하는 항-Flt-1 항체가 제조된다. 이론에 구속됨을 바라지 않고, Flt-1 수용체에 결합하는 항-Flt-1 항체가 하나 이상의 내인성 리간드를 Flt-1에 결합하지 못하게 하며 이를 통해 더 많은 양의 이용가능한 리간드가 다른 VEGF 수용체, 가령 Flk-1 수용체와 연합하는 것을 허용한다고 여겨진다. 일부 구체예에서, Flt-1 수용체에 대한 항체 결합은 다른 VEGF 수용체에 결합할 수 있는 VEGF의 양을 증가시킨다. 일부 구체예에서, Flt-1 수용체에 대한 항체 결합은 다른 VEGF 수용체에 결합할 수 있는 태반 성장 인자(placental growth factor, PLGF)의 양을 증가시킨다.

[0095] 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 약  $10^{-9}$  M 초과, 약  $10^{-10}$  M 초과, 약  $0.5 \times 10^{-10}$  M 초과, 약  $10^{-11}$  M 초과, 약  $0.5 \times 10^{-11}$  M 초과, 약  $10^{-12}$  M 초과, 또는 약  $0.5 \times 10^{-12}$  M 초과와 친화도로 인간 Flt-1에 결합한다. Flt-1 항체의 친화도는 예를 들면, 표면 플라즈몬 공명 어레이, 가령 BIACORE 어레이에서 측정될 수 있다.

[0096] 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 Flt-1를 이용한 경쟁 어레이에서 100 pM 미

만, 10 pM 미만, 또는 1 pM 미만의 IC<sub>50</sub>를 특징으로 한다.

- [0097] 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 Flt-1 수용체에의 VEGF의 결합 및/또는 활성을 저해한다. 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 Flt-1에 대한 VEGF의 결합 저해에 대한 경쟁 어세이에서 100 pM 미만, 10 pM 미만, 또는 1 pM 미만의 IC<sub>50</sub>를 특징으로 한다.
- [0098] 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 Flt-1 수용체에의 PLGF의 결합 및/또는 활성을 저해한다. 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 Flt-1에 대한 PLGF의 결합 저해에 대한 경쟁 어세이에서 100 pM 미만, 10 pM 미만, 또는 1 pM 미만의 IC<sub>50</sub>를 특징으로 한다.
- [0099] 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 Flt-1에 선택적으로 결합하고 다른 VEGF 수용체에 대해 측정가능한 결합은 최소이거나 거의 없다. 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 Flt-1에 선택적으로 결합하고 VEGFR2 (Flk-1) 및/또는 VEGFR3 (Flt-4)에 대해 측정가능한 결합은 최소이거나 거의 없다.
- [0100] 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 Flt-1에 선택적으로 결합하고 다른 포유류 Flt-1 수용체에 대해 측정가능한 결합은 최소이거나 거의 없다(예컨대, 10<sup>-7</sup> M 또는 10<sup>-6</sup> M 미만의 결합 친화도를 가짐). 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 Flt-1에 선택적으로 결합하고 원숭이 Flt-1에는 결합하지 않는다. 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 Flt-1에 선택적으로 결합하고 마우스 Flt-1에는 결합하지 않는다.
- [0101] 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 Flt-1는 물론이고 원숭이 Flt-1에도 결합한다. 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 Flt-1는 물론이고 마우스 Flt-1에도 결합한다.
- [0102] 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 IgG, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, ScFvs, 디아바디, 트리아바디 및 테트라바디로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0103] 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 IgG이다. 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 IgG1이다.
- [0104] 일부 구체예에서, 적절한 항-Flt-1 항체는 Fc 도메인 또는 FcRn 수용체에 결합하는 이의 일부분을 포함한다. 비-제한적인 예시로서, 적절한 Fc 도메인은 면역글로불린 하위클래스 가령 IgG로부터 유도될 수 있다. 일부 구체예에서, 적절한 Fc 도메인은 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4로부터 유도된다. 특히 적절한 Fc 도메인은 인간 또는 인간화된 항체로부터 유도된 것들을 포함한다.
- [0105] Fc 도메인 및 FcRn 수용체간에 향상된 결합은 연장된 혈청 반-감기를 도출하는 것으로 생각된다. 따라서, 일부 구체예에서, 적절한 Fc 도메인은 FcRn에 대해 향상된 결합을 야기하는 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함한다. FcRn에 대해 향상된 결합을 일으키는 Fc 도메인 내부의 다양한 돌연변이는 당해 분야에 공지되어 있고 본 발명을 실시하기 위해 개조될 수 있다. 일부 구체예에서, 적절한 Fc 도메인은 인간 IgG1의 Thr 250, Met 252, Ser 254, Thr 256, Thr 307, Glu 380, Met 428, His 433 및/또는 Asn 434에 상응하는 하나 이상의 위치에 하나 이상의 돌연변이를 포함한다.
- [0106] 일부 구체예에서, 항-FLT-1 항체, 또는 항원 결합 단편은 스페이서를 포함하고 및/또는 또다른 독립체에 연결된다. 일부 구체예에서, 링커 또는 스페이서는 GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (SEQ ID NO: 1) (GAG 링커)에 대해 적어도 50% (예컨대, 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%) 동일한 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 링커 또는 스페이서는 GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (SEQ ID NO: 2) (GAG2 링커)에 대해 적어도 50% (예컨대, 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%) 동일한 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 링커 또는 스페이서는 GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (SEQ ID NO: 3) (GAG3 링커)에 대해 적어도 50% (예컨대, 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%) 동일한 서열을 포함한다.
- [0107] **항-Flt-1 항체 및 항원 결합 단편의 제조**
- [0108] 본 발명을 위해 적절한 재조합 항-Flt-1 항체 또는 항원 결합 단편은 임의의 이용가능한 수단에 의해 제조될 수

있다. 예를 들면, 재조합 항-Flt-1 항체 또는 항원 결합 단편은 재조합 항-Flt-1 항체 또는 항원 결합 단편-인코딩 핵산을 발현하도록 유전자조작된 숙주 세포 시스템을 이용함으로써 재조합되어 제조될 수 있다.

[0109] 항체가 재조합되어 제조되는데 있어서, 임의의 발현 시스템이 사용될 수 있다. 몇 가지 예시를 제공하자면, 공지된 발현 시스템은, 예를 들면, 계란, 배큘로바이러스(baculovirus), 식물, 효모, 또는 포유류 세포를 포함한다.

[0110] 일부 구체예에서, 본 발명을 위해 적절한 재조합 항-Flt-1 항체 또는 항원 결합 단편은 포유류 세포에서 제조된다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 포유류 세포의 비-제한적인 예시는 BALB/c 마우스 골수종 세포주(NSO/1, ECACC 번호: 85110503); 인간 망막모세포(PER.C6, 크루셀(CruCell), 라이덴, 네덜란드); SV40로 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7, ATCC CRL 1651)를 포함한다;

[0111] 일부 구체예에서, 본 발명은 인간 세포로부터 제조된 재조합 항-Flt-1 항체 또는 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 CHO 세포로부터 제조된 항-Flt-1 항체 또는 항원 결합 단편을 제공한다.

#### [0112] **약학 조성물 및 투여**

[0113] 본 발명은 추가로 본 명세서에 기술된 항-Flt-1 항체 또는 항원 결합 단편 및 생리학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 함유하는 약학 조성물을 제공한다.

[0114] 적절한 약제학적으로 허용되는 담체는 물, 염류 용액(예컨대, NaCl), 식염수, 완충 식염수, 알코올, 글리세롤, 에탄올, 아라비아 검, 식물성 오일, 벤질 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 젤라틴, 탄수화물 가령 락토스, 아밀로스 또는 전분, 당류 가령 만니톨, 수크로스, 등, 텍스트로스, 마그네슘 스테아레이트, 탈크, 규산, 점성 파라핀, 향료 오일, 지방산 에스테르, 하이드록시메틸셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 등, 뿐만 아니라 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 약학적 제제는, 요망되는 경우, 활성 화합물과 유해하게 반응하거나 활성을 방해하지 않는 보조제(예컨대, 활택제, 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 삼투압에 영향을 주는 염, 완충액, 착색, 착향 및/또는 방향족 물질 등)와 혼합될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 정맥내 투여를 위해 적절한 수용성 담체가 사용된다.

[0115] 적절한 약학 조성물 또는 의약품은, 요망되는 경우, 또한 미량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제를 함유할 수 있다. 조성물은 액체 용액, 현탁액, 유액, 정제, 환제, 캡셀제, 서방출 제형, 또는 분말일 수 있다. 조성물은 또한 전통적인 결합제 및 담체 가령 트리글리세라이드와 함께 좌제로서 배합될 수 있다. 경구 제형은 표준 담체 가령 약학 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 폴리비닐 피롤리돈, 사카린산 나트륨, 셀룰로스, 탄산마그네슘, 등을 포함할 수 있다.

[0116] 약학 조성물 또는 의약품은 인간에게 투여하기 위해 개조된 약학 조성물로서 일반적인 절차에 따라 배합될 수 있다. 예를 들면, 일부 구체예에서, 정맥내 투여를 위한 조성물은 전형적으로 무균 등장성 수성 완충액 내 용액이다. 필요한 경우, 조성물은 또한 가용화제 및 주사 위치의 통증을 완화하기 위한 국소 마취제를 포함할 수 있다. 일반적으로, 성분은 개별적으로 또는 단위 투여 형태 내에 함께 혼합되어, 예를 들면, 활성인 물질의 양을 알려주는 앰플 또는 사켓(sachette)과 같은 차단 밀봉된 용기 내 건조한 동결건조 분말 또는 무수 농축물로서 공급된다. 조성물이 수액으로 투여되어야 하는 경우에, 조성물은 무균 약학 등급 물, 식염수 또는 텍스트로스/물이 담긴 수액병과 함께 제공될 수 있다. 조성물이 주사로 투여되어야 하는 경우에, 성분을 투여 전에 혼합할 수 있도록 무균 주사용수 또는 식염수 앰플이 제공될 수 있다.

#### [0117] **투여의 경로**

[0118] 본 명세서에 기술된 항-Flt-1 항체 또는 항원 결합 단편(또는 본 명세서에 기술된 항-Flt-1 항체 또는 항원 결합 단편을 함유하는 조성물 또는 의약품)은 임의의 적절한 경로로 투여된다. 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체 또는 항원 결합 단편 단백질 또는 이들을 함유하는 약학 조성물은 비경구적으로 투여된다. 비경구 투여는 정맥내, 피내, 척추강내, 흡입, 경피(국소), 안내, 근육내, 피하, 근육내, 및/또는 점막 흡수 투여일 수 있다. 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체 또는 항원 결합 단편 또는 이들을 함유하는 약학 조성물은 피하로 투여된다. 본 명세서에서 사용된, 용어 "피하 조직"은 피부 바로 아래의 느슨하고, 불규칙적인 결합 조직의 층으로서 정의된다. 예를 들면, 피하 투여는 허벅지 부위, 복근 부위, 둔근 부위, 또는 견갑골 부위를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 부위에 조성물을 주사함으로써 수행될 수 있다. 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체 또는 항원 결합 단편 또는 이들을 함유하는 약학 조성물은 정맥내로 투여된다. 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체 또는 항원 결합 단편 또는 이들을 함유하는 약학 조성물은 경구로 투여된다. 하나 초과와 경로가 요망되는 경우 동시에 사용될

수 있다.

- [0119] 일부 구체예에서, 투여는 개체에서 오직 국소적 효과만 갖는 반면, 다른 구체예에서, 투여는 개체의 여러 부분에 걸쳐 효과를 나타내며, 예를 들면, 전신 효과를 갖는다. 전형적으로, 투여는 항-FIt-1 항체 또는 항원 결합 단편을 신장, 간, 뇌, 척수, 장관, 눈, 폐, 비장, 심장, 횡문근, 및 평활근을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 하나 이상의 표적 조직으로 송달하는 결과를 갖는다.
- [0120] 일부 구체예에서, 횡문근은 삼두근, 전경골근, 비장근, 비복근, 사두근, 및 횡격막으로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0121] 일부 구체예에서, 평활근은 으로 이루어진 군에서 선택된다
- [0122] **투여 제형 및 투여 계획**
- [0123] 일부 구체예에서, 조성물은 치료적으로 효과적인 양으로 및/또는 특정한 요망되는 결과(예컨대, 근위축증, 가령 뒤시엔느 근위축증을 치료하거나 위험을 감소시킴)와 상관관계를 갖는 투여 계획에 따라 투여된다.
- [0124] 본 발명에 따라 투여되어야 하는 특정한 용량 또는 양은, 예를 들면, 요망되는 결과의 성질 및/또는 정도, 투여의 경로 및/또는 시간 간격 상제, 및/또는 하나 이상의 특징(예컨대, 체중, 연령, 개인의 병력, 유전적 특징, 생활 방식 변수, 심장 기형의 심각성 및/또는 심장 기형 위험 수준, 등, 또는 이들의 조합)에 따라 달라질 수 있다. 그러한 용량 또는 양은 숙련가에 의해 결정될 수 있다. 일부 구체예에서, 적절한 용량 또는 양은 표준 임상 기술에 따라 결정된다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 구체예에서, 적절한 용량 또는 양은 투여되어야 하는 바람직한 또는 최적 투여 범위 또는 양을 알도록 돕는 하나 이상의 시험관 내 또는 생체 내 어세이의 사용을 통해 결정된다.
- [0125] 다양한 구체예에서, 항-FIt-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 치료적으로 효과적인 양으로 투여된다. 일반적으로, 치료적으로 효과적인 양은 의미있는 이익(예컨대, 잠재 질환 또는 용태를 치료, 조절, 치유, 예방 및/또는 개선)을 개체에게 달성하기에 충분하다. 일부 특정 구체예에서, 투여되어야 하는 적절한 용량 또는 양은 시험관 내 또는 동물 모델 시험 시스템으로부터 도출된 용량-반응 곡선으로부터 추정될 수 있다.
- [0126] 일부 구체예에서, 제공되는 조성물은 약학 제형으로서 제공된다. 일부 구체예에서, 약학 제형은 근위축증, 가령 뒤시엔느 근위축증의 발생을 또는 위험의 감소를 성취하는 것과 상관관계가 있는 투여 계획에 따라 투여하기 위한 단위 투여 용량이거나 이를 포함한다.
- [0127] 일부 구체예에서, 본 명세서에 기술된 항-FIt-1 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 제형은 단일 투여로서 투여된다. 일부 구체예에서, 본 명세서에 기술된 항-FIt-1 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 제형은 일정한 주기로 투여된다. 본 명세서에서 사용된 "주기적" 투여는 치료적으로 효과적인 양이 주기적으로 투여됨을 나타낸다(일회성 투여와 상반됨). 주기는 표준 임상 기술에 의해 결정될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 명세서에 기술된 항-FIt-1 항체, 또는 항원 결합 단편을 포함하는 제형은 매 두 달마다, 매 달마다, 한 달에 두 번씩, 매 삼 주마다, 매 이 주마다, 매 주마다, 한 주에 두 번씩, 한 주에 세 번씩, 매일, 하루 두 번씩 또는 매 여섯 시간마다 투여된다. 단일 개체를 위한 투여 주기는 고정된 주기여야 할 필요가 없지만, 개체의 필요에 따라 시간이 지나면서 달라질 수 있다.
- [0128] 본 명세서에서 사용된, 용어 "매 두 달마다"는 두 달에 한 번 있는 투여를 의미하고(즉, 매 두 달에 한 번); 용어 "매 달마다"는 한 달에 한 번 있는 투여를 의미하고; 용어 "매 삼 주마다"는 삼 주에 한 번 있는 투여를 의미하고(즉, 매 삼 주마다 한 번); 용어 "매 이 주마다"는 두 주에 한 번 있는 투여를 의미하고(즉, 매 두 주마다 한 번); 용어 "매 주마다"는 한 주에 한 번 있는 투여를 의미하며; 및 용어 "매일"은 하루에 한 번 있는 투여를 의미한다.
- [0129] 일부 구체예에서, 본 명세서에 기술된 항-FIt-1 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 제형은 일정한 주기로 투여된다. 일부 구체예에서, 본 명세서에 기술된 항-FIt-1 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 제형은 일정한 주기로 정해진 기간 동안 투여된다.
- [0130] 일부 구체예에서, 항-FIt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편의 투여는 적어도 하나의 DMD 징후 또는 증상의 강도, 중증도, 또는 빈도를 줄이거나, 개시를 지연시킨다. 일부 구체예에서, 항-FIt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편의 투여는 근소모, 골격 기형, 심근증, 근육 허혈, 인지 장애, 및 호흡 기능 장애로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 DMD 징후 또는 증상의 강도, 중증도, 또는 빈도를 줄이거나, 개시를 지연시킨다.



- [0131] 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체, 또는 이의 항원 결합 단편의 투여는 6 분 보행 시험, 정량화 근육 강도 시험, 시간당 운동 성능 시험에 의해 측정할 때의 임상적 결과를 향상시킨다. 브루크(Brooke) 및 비그노스(Vignos) 사지 기능 등급, 폐 기능 시험 (강제 폐활량, 1초량 강제호기량, 최대호기유속, 최대 호기 및 흡기 압력), 건강-관련 삶의 질, 무릎 및 팔꿈치 굴근, 팔꿈치 신근, 어깨 외전, 악력, 누운 자세부터 일어나는 시간, 노스 스타트(North Start) 보행 평가, 시간당 10 미터 걷기/달리기, 에겐(Egen)-분류 등급, 고워스(Gowers) 점수, 해머스미스(Hammersmith) 운동 능력, 소형 근수축계 검사, 운동 범위, 측각도 검사, 과탄산혈증, 신생아 및 유아 발달의 나일리(Nayley) 등급, 및/또는 간병 부담 등급.
- [0132] **병행 요법**
- [0133] 일부 구체예에서, 항-Flt-1 항체 또는 항원 결합 단편은 근위축증의 치료를 위해 현재 사용되는 하나 이상의 공지된 치료제(예컨대, 코르티코스테로이드)와 병행으로 투여된다. 일부 구체예에서, 공지된 치료제(들)는/은 이의 표준 또는 승인된 투여 계획 및/또는 스케줄에 따라 투여된다. 일부 구체예에서, 공지된 치료제(들)는/은 이의 표준 또는 승인된 투여 계획 및/또는 스케줄에 비교할 때 변형된 계획에 따라 투여된다. 일부 구체예에서, 그러한 변형된 계획은 표준 또는 승인된 투여 계획과 하나 이상의 단위 투여의 양이 변화되는 점(예컨대, 감소 또는 증가), 및/또는 투여 빈도가 변화되는 점(예컨대, 단위 투여 사이의 하나 이상의 주기가 늘어나 더 낮은 빈도를 야기하거나, 줄어들어 더 높은 빈도를 야기함)에서 상이하다.
- [0134] **실시예**
- [0135] **실시예 1. 높은 친화도 항-Flt-1 항체의 생성 및 특징분석**
- [0136] **항체 01A04**
- [0137] 가용성 Flt-1에 대한 항체를 전통적인 마우스 단일클론 항체 방법을 이용하여 생성하였다. 간략하게, Balb/c 마우스를 재조합 인간 가용성 Flt-1(ABCAM에서 구입)으로 면역화하였다. 면역화-후 제20일에, 동물을 ELISA에 의해 항-sFlt-1 생산에 대해 역가를 측정하였다(도 1). 마우스 한 마리가 높은 역가 반응개체인 것으로 발견되었고; 상기 동물을 이후 항원으로 반응촉진하고 5일 후 희생시켰다. 상기 동물로부터 비장 및 림프절 세포를 마우스 골수종 파트너와 융합시켜 하이브리도마를 제작하였다. 하이브리도마 상청액을 sFlt-1 항원에 대하여 선별하고, 양성 반응개체를 늘리고 인간 및 마우스 sFlt-1에의 결합에 대해, 뿐만 아니라 VEGF 결합을 두고 sFlt-1와 경쟁하는 능력에 대해 재-어세이하였다. 인간 및 마우스 sFlt-1 둘다에 결합할 수 있는 교차 반응성 하이브리도마는 존재하지 않았다. 그러나, 인간 sFlt-1 반응성 하이브리도마 중에서, 몇 가지 sFlt-1:VEGF 길항체가 경쟁적 ELISA에 의해 확인되었다(대표적인 실험은 도 2를 참조하라). 이들 중 가장 강한, 융합 파트너 01A04를 세 차례 단일 세포 클로닝을 거치게 하여 단일클론 항체 01A04를 얻었다. 이러한 항체를 추가로 sFlt-1 항원에 대한 결합 친화도(ELISA, BIACORE 및 FAC); sFlt-1:VEGF 경쟁적 ELISA에서 IC50; 및 세포 기반 어세이에서의 성능에 대하여 특징분석하였다.
- [0138] **항체 01A04 특징분석 - 결합**
- [0139] 융합 파트너 부모의 클로닝 및 하위-클로닝 후에, 01A04 부모의 다중 하위-클론은 고정된 가용성 Flt-1에 결합하는 것으로 나타났다(도 3). 항원 결합, 클론 형태학 및 생존력을 기초로 하여 이들 하위클론 중 하나인, 단일클론 01A04-02B10-02G07을 선택하여 수를 늘리고 세포로 보관하였다. 표면 플라즈몬 공명 방법을 통해 sFlt-1 항원에 대한 01A04-02B10-02G07의 결합 상수를 결정하였다(BIACORE, 도 4 참조). 단일클론 항체 01A04-02B10-02G07는 인간 sFlt-1에 대한 나노몰-미만 결합제이다.
- [0140] **항체 01A04 특징분석 - 교차-반응성**
- [0141] 세포에서 발현된 Flt-1 수용체에 대한 단일클론 항체 01A04의 결합을 FACS로 시험하였다. 인간, 마우스 또는 사이노 Flt-1를 발현하는 세 가지의 형질주입된 세포주를 시험하였다. 세포들을 항체와 함께 한 시간 동안 배양함으로써 모든 세 가지 세포주에 대한 결합을 시험하였다. 세포에 대한 항체의 결합은 이후 항-마우스 IgG PE 항체를 이용하여 밝혀내었다. 결과가 도 5에 나타난다. ELISA 및 BIACORE 데이터와 동일하게, 단일클론 항체 01A04는 마우스 Flt-1에 결합하지 않는다. 그러나, 상기 항체는 세포에서 발현된 인간 및 사이노몰구스 Flt-1에 결합하지 않는다.
- [0142] **항체 01A04 특징분석 - 경쟁**
- [0143] 항체의 강도를 추정하기 위해, 라마 Fab 및 IgG의 선별을 위해 준비된 경쟁 ELISA(인간 sFlt-1 및 VEGF 이용)를 이용하였다. 10 내지 0.01  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 범위의 IgG를 시험하였다. 단일클론 항체 01A04를 음성 대조 (정제된

다클론 마우스 IgG) 및 양성 대조 (시판 항-sFlt-1 단일클론 항체 Abcam56300) 분자 둘다에 대하여 어세이하였다. 최대 절반 저해 (IC50) 수치를 산출하였다. 결과가 도 6에 제시된다.

[0144] 항체 01A04 특징분석 - 세포 기반 어세이

[0145] 인간 일차 제대 정맥 내피 세포(HUVEC)를 가용성 Flt-1 및 단일클론 항체 01A04의 존재 또는 부재에서 VEGF로 자극하였다. VEGF R2 수용체의 인산화 상태를 측정함으로써 세포의 VEGF 유발성 활성화를 어세이하였다. 가용성 Flt-1의 존재에서, VEGF 유발성 HUVEC 활성화는 약화되었다. 단일클론 항체 01A04의 부가는 가용성 Flt-1에 대해 길항작용을 함으로써 세포 활성화를 막는다(도 7).

[0146] 실시예 2. 항-Flt-1 항체의 생체 내 효능

[0147] mdx 마우스에의 항-Flt-1 항체의 투여

[0148] 마우스(n=8)에 출생 후 제21일부터 항-Flt-1 항체를 주사하였다(0 (PBS), 0.1 mg, 또는 0.5 mg, 정맥으로). 항-Flt-1 항체는 시중의 공급회사로부터 공급받았다(엔지오 프로테오미(Angio Proteomie), 카다로그 번호 AP-MAB0702). 상기 항체는 공지된 Flt-1:VEGF 길항제이다. 마우스는 제48일이 될 때까지 매 3 일마다 주사하였다. 제53일에, 생체 내 효과를 평가하였다. 두 번째 실험 세트에서, Flt1에 결합하지 않는 이소형 매칭된 대조 항체에 대한 항체 성능을 시험하였다. 마우스는 제28일부터 제56일까지 20mg/kg의 고정 용량으로 한 주에 두 번씩 주사하였다. 제57일에, 생체 내 효과를 평가하였다.

[0149] 조직병리학

[0150] 0.5 mg 용량의 항-Flt-1 항체로의 처리(정맥내)는 비히클 대조군에 비해 mdx 마우스에서 근육 병리를 상당히 향상시켰다(도 8, 9 및 10). 상세하게는, 횡격막 근육에서 감소된 에반스 블루 염료 축적에 의해 측정된 바와 같이 근육 섬유 보전이 향상되었고(도 8, 위쪽 패널); 횡격막 근육의 반 기에스 염색에 의해 측정된 바와 같이 섬유 증은 감소했으며(도 8, 아래쪽 패널); 및 횡격막 근육의 헤마톡실린 및 에오신(H+E) 염색에 의해 측정된 바와 같이 근육 괴사는 감소하였다(도 8, 위에서 세 번째 패널). 근육 섬유 내 중심에 위치한 핵(CLN)은 DMD와 연관된 전형적인 표현형이다. 항체-처리 그룹 내 더 적은 CLN은 감소된 섬유 재생 및 증가된 근육 섬유 안정성을 알려준다(도 10). 항체 처리된 동물이 횡격막 및 전경골근 근육에서 증가된 수의 CD31+ 혈관을 나타내었기 때문에, 증가된 근육 관류로 인해 근육 건강 증가가 일어난 것으로 가정된다(도 8, 두 번째 패널; 도 14). 결과가 도 9, 10 및 14에 정량화된다. CD31+ 혈관 세포의 증식은 더 나아가 내인성 VEGF 길항제 가용성 Flt1의 중화에서 야기되며(도 12), 이로 인해 처리된 마우스의 혈류 내 유리 VEGF를 증가시켰다고 가정된다(도 13).

[0151] 근육 기능

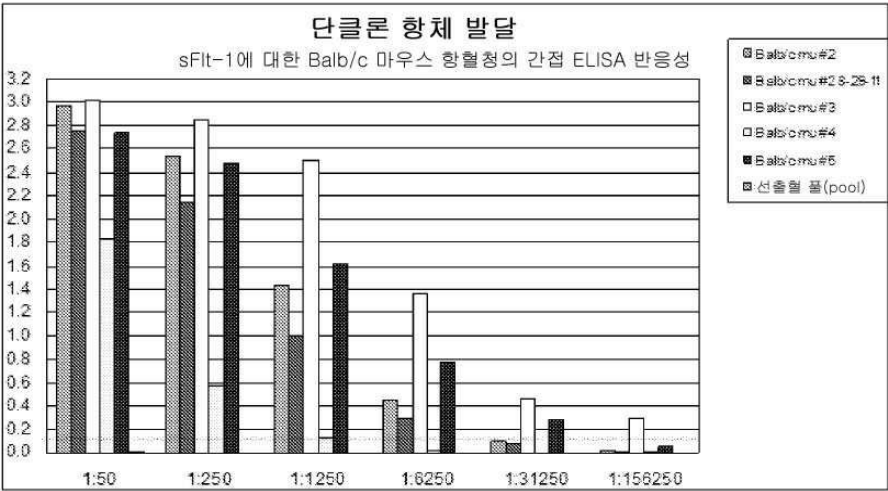
[0152] 0.5 mg 용량의 항-Flt-1 항체로의 처리(정맥내)는 악력 시험에서 마우스의 근육 기능을 상당히 향상시켰고(도 1, 위쪽 패널) 트레드밀 시험에서 명백한 개선 경향을 나타내었다(도 11, 아래쪽 패널).

[0153] 균등물 및 범위

[0154] 당해 분야의 숙련가는 더 이상의 일상적인 실험을 이용하지 않고도 본 명세서에 기술된 본 발명의 특정한 구체예에 대한 많은 균등물을 알 것이거나 알아낼 수 있을 것이다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명에 의해 제한되는 것으로 의도되지 않으며, 오히려 하기 청구범위에 제시된 것과 같다.

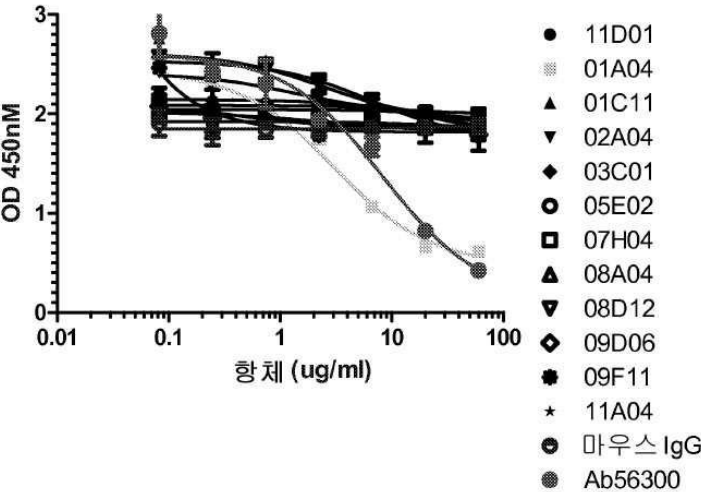
도면

도면1



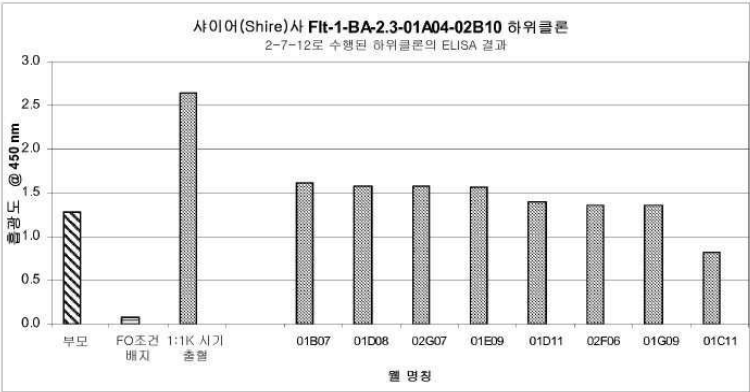
도 1

도면2



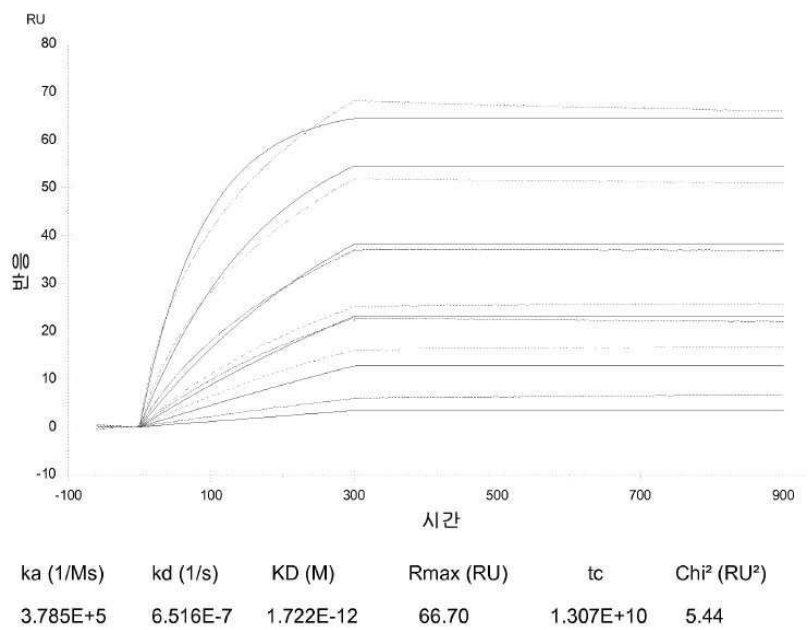
도 2

도면3



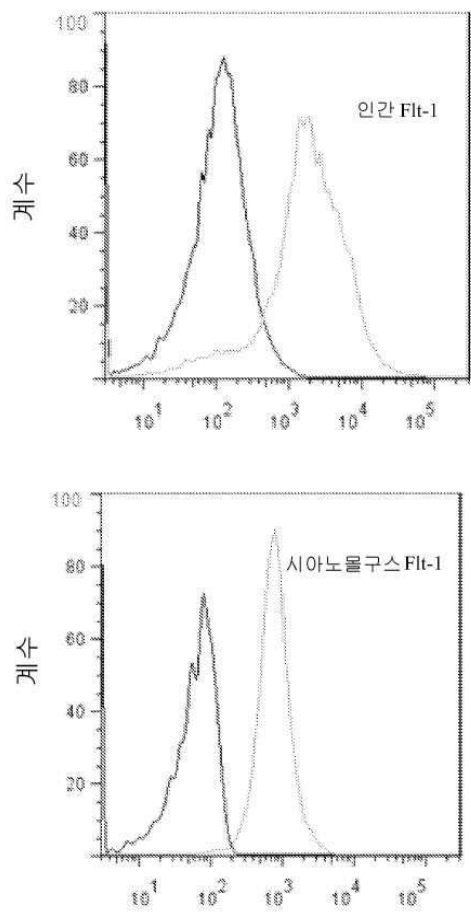
도 3

도면4



도 4

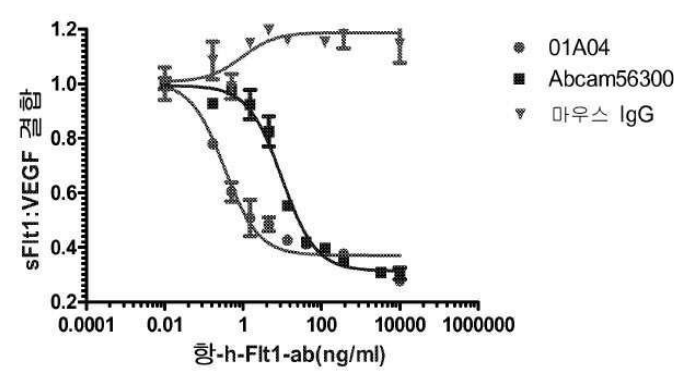
도면5



도 5

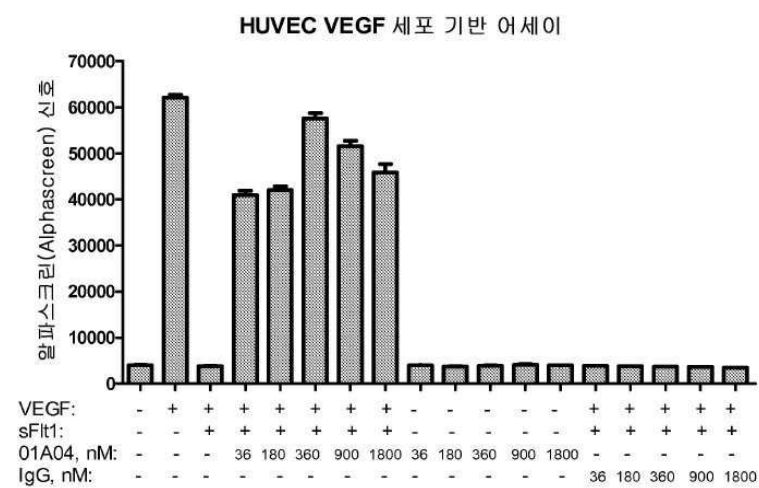


도면6



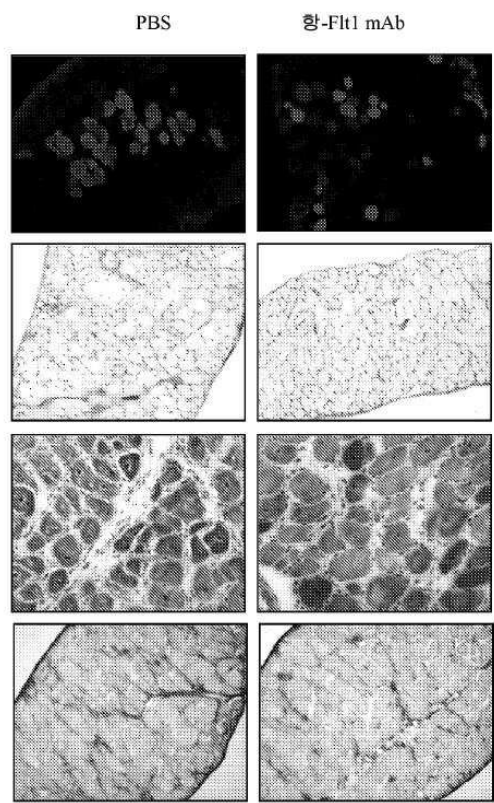
도 6

도면7



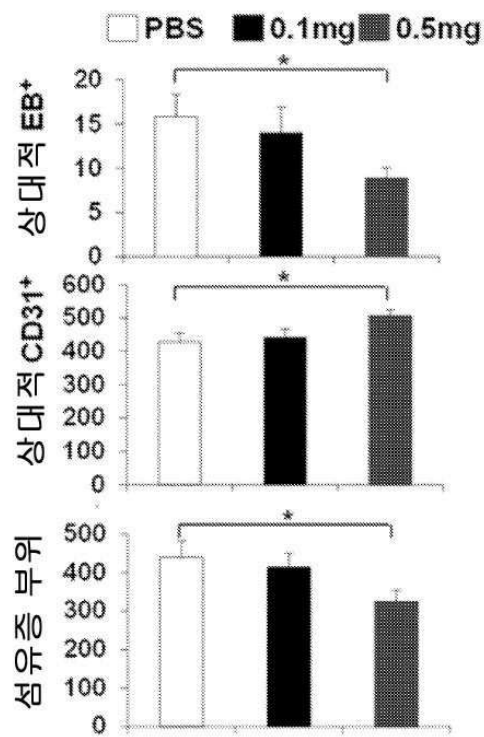
도 7

도면8



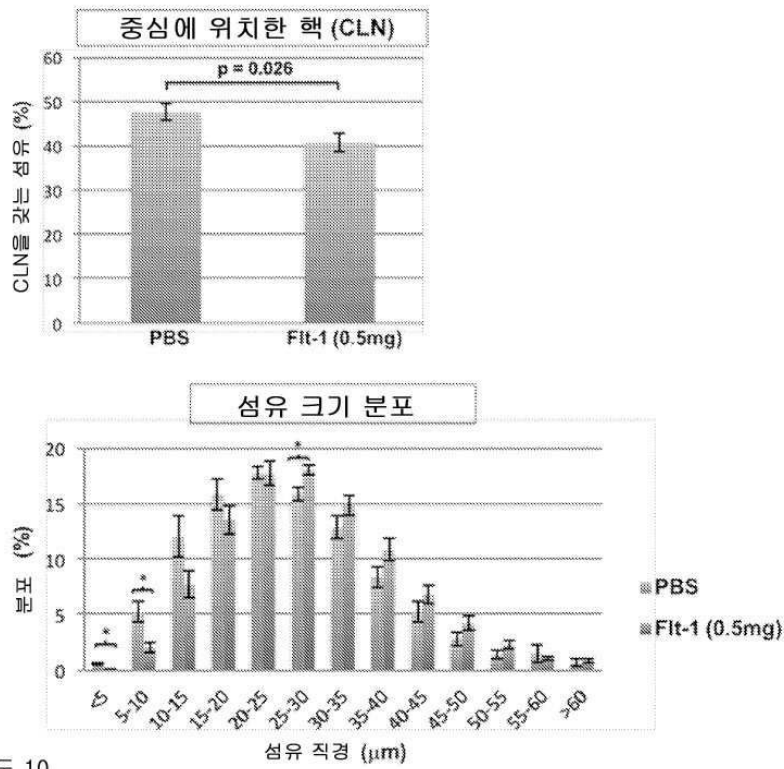
도 8

도면9



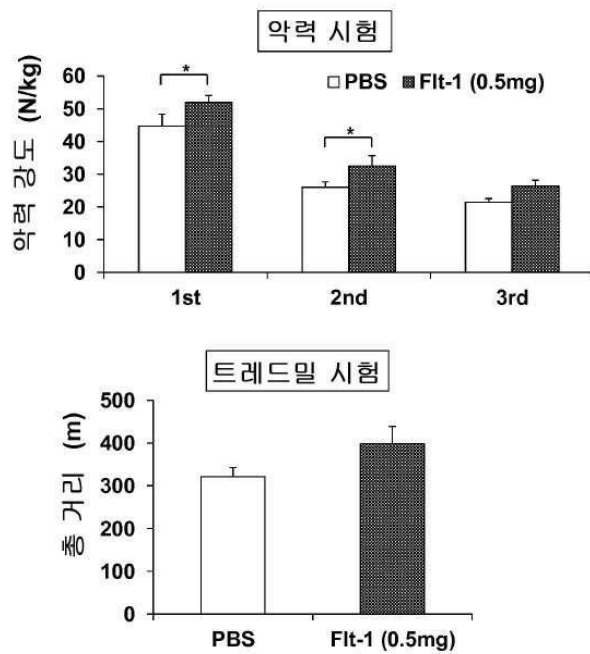
도 9

도면10



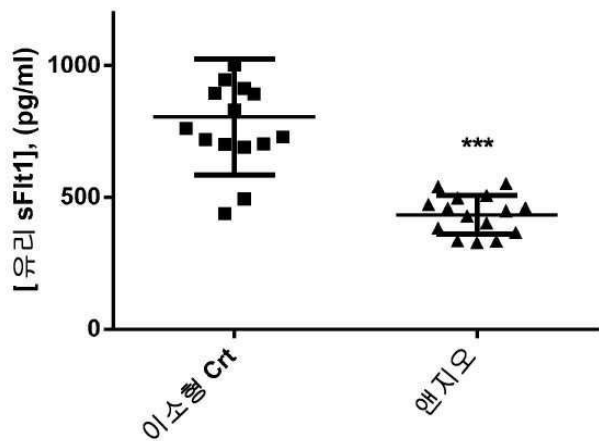
도 10

도면11



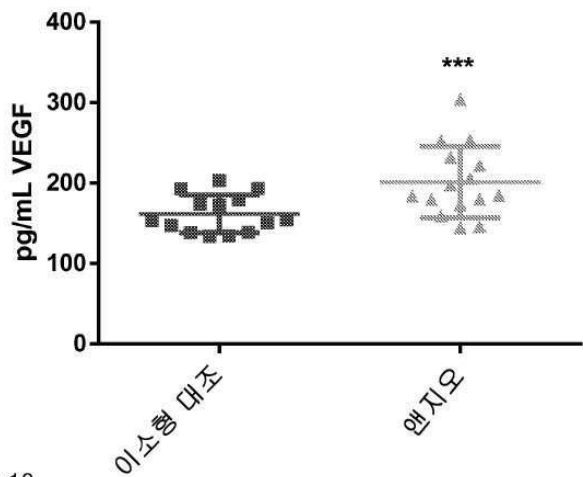
도 11

도면12



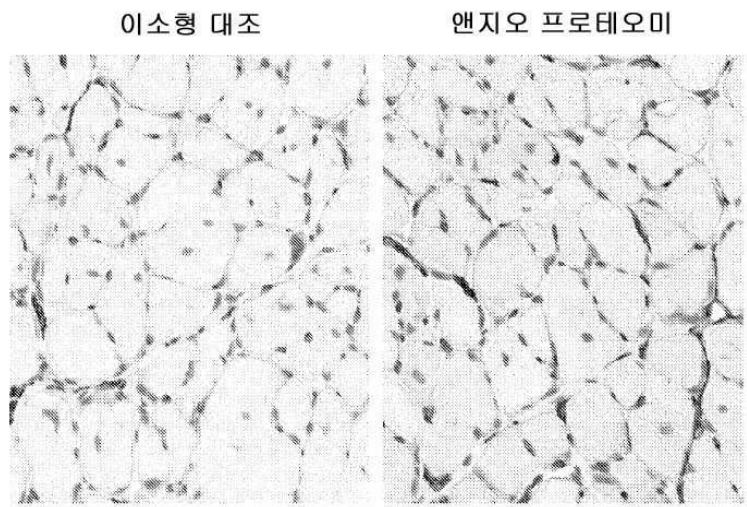
도 12

도면13



도 13

도면14



도 14

# 서열 목록

<110> SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC.  
 REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA  
 <120> ANTI-FLT-1 ANTIBODIES IN TREATING DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY  
 <130> pc48933  
 <150> PCT/US 2014/013402  
 <151> 2014-01-28  
 <150> US 61/757,571  
 <151> 2013-01-28  
 <160> 3  
 <170> KoPatentIn 3.0  
 <210> 1  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> chemically synthesized peptide  
 <400> 1

Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ala Pro

20

<210> 2  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> chemically synthesized peptide  
 <400> 2

Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly

20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Ala Pro

35

<210> 3

<211> 57

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized peptide

<400> 3

Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly

20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala

35 40 45

Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Pro

50 55