



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년08월31일

(11) 등록번호 10-2295623

(24) 등록일자 2021년08월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/564 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/564 (2013.01)

G01N 2333/8139 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-7013312

(22) 출원일자(국제) 2014년10월17일

심사청구일자 2019년10월10일

(85) 번역문제출일자 2016년05월19일

(65) 공개번호 10-2016-0089368

(43) 공개일자 2016년07월27일

(86) 국제출원번호 PCT/US2014/061242

(87) 국제공개번호 WO 2015/061182

국제공개일자 2015년04월30일

(30) 우선권주장

61/893,542 2013년10월21일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020110057086 A

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 26 항

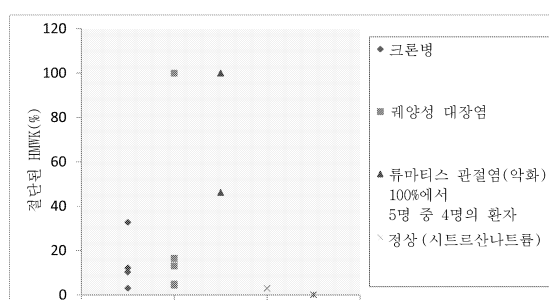
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 자가면역 질환의 진단 및 치료

(57) 요약

자가면역 질환, 예컨대 류마티스성 관절염, 크론병 및 궤양성 대장염을 진단하고 치료하기 위한 방법, 키트 및 조성물.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 2800/065 (2013.01)

G01N 2800/102 (2013.01)

G01N 2800/52 (2021.08)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020100120788 A

JP2011051259 A1

US20110212104 A1

US05025796 A

Irma Isordia-Salas et al, Archives of Medical Research (2005), vol 36, pp 119-130.

Nielsen E W et al, Journal of Internal Medicine (1996), vol 239, pp 87-95.

Reddigari S et al, Blood (1988), vol 71, no 5, pp 1334-1340.

Khan M M et al, Thrombosis and Vascular Biology (2006), vol 26, pp 2260-2266.

명세서

청구범위

청구항 1

인간 환자에서 자가면역 질환을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법으로서,

상기 방법은,

자가면역 질환을 가지는 것으로 의심되는 인간 환자의 생물학적 샘플을 제공하는 단계;

상기 생물학적 샘플에서 절단된 고분자량 키니노겐(high molecular weight kininogen: HMWK)의 수준을 측정하는 단계; 및

상기 생물학적 샘플에서 상기 절단된 HMWK의 수준이 대조군 샘플과 비교하여 상승하는 경우, 상기 인간 환자가 자가면역 질환을 가지거나 상기 질환의 위험에 있는 것으로 확인하는 단계를 포함하고,

여기서, 상기 자가면역 질환은 류마티스성 관절염, 크론병 또는 궤양성 대장염인, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 혈청 샘플 또는 혈장 샘플인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 하나 이상의 프로테아제 저해제를 포함하고, 상기 저해제는 이의 수집 후에 상기 생물학적 샘플에 첨가되는, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 절단된 HMWK의 수준은 절단된 HMWK에 특이적인 결합제를 포함하는 검정에 의해 측정되는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 결합제는 항체인, 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 검정은 효소 결합 면역흡착 검정(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) 또는 면역블로팅 검정(immunoblotting assay)인, 방법.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 검정은 리코르(LiCor) 검출을 포함하는 웨스턴블로팅 검정(Westernblotting assay)인, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 인간 환자에 상기 자가면역 질환에 대한 치료를 실시하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 인간 환자는 유효량의 혈장 칼리크레인(plasma kallikrein: pKal) 저해제가 투여되는, 방법.

청구항 10

인간 환자에서 자가면역 질환의 발생을 모니터링하는 방법으로서,

상기 방법은,

제1 시점에서 자가면역 질환을 가지는 것으로 의심되는 인간 환자의 제1 생물학적 샘플을 제공하는 단계;

상기 제1 생물학적 샘플에서 절단된 고분자량 키니노겐(HMWK)의 제1 수준을 측정하는 단계;

상기 제1 시점에 후속하는 제2 시점에서 상기 인간 환자의 제2 생물학적 샘플을 제공하는 단계;

상기 제2 생물학적 샘플에서 절단된 HMWK의 제2 수준을 측정하는 단계; 및

상기 제1 및 제2 생물학적 샘플에서 상기 절단된 HMWK의 수준의 변화에 기초하여 상기 인간 환자에서 상기 자가면역 질환의 발생을 평가하는 단계를 포함하고,

여기서, 상기 절단된 HMWK의 제1 수준보다 높은 상기 절단된 HMWK의 제2 수준은 상기 자가면역 질환이 상기 인간 환자에서 진행하거나, 상기 인간 환자가 상기 자가면역 질환을 발생시키거나 발생시킬 위험에 있다는 것을 나타내며,

상기 자가면역 질환은 류마티스성 관절염, 크론병 또는 궤양성 대장염인, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 제1 및 제2 생물학적 샘플은 혈청 샘플 또는 혈장 샘플인, 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 제1 생물학적 샘플, 상기 제2 생물학적 샘플 또는 둘 다는 하나 이상의 프로테아제 저해제를 포함하고, 상기 저해제는 이의 수집 후에 상기 생물학적 샘플(들)에 첨가되는, 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 절단된 HMWK의 제1 및 제2 수준은 절단된 HMWK에 특이적인 결합제를 포함하는 검정에 의해 측정되는, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 결합제는 항체인, 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 검정은 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA) 또는 면역블로팅 검정인, 방법.

청구항 16

제13항에 있어서, 상기 검정은 리코르 검출을 포함하는 웨스턴블로팅 검정인, 방법.

청구항 17

제10항에 있어서, 상기 인간 환자에 상기 자가면역 질환에 대한 치료를 실시하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 인간 환자는 유효량의 혈장 칼리크레인(pKa1) 저해제가 투여되는, 방법.

청구항 19

인간 환자에서 자가면역 질환에 대한 치료의 효율을 평가하는 방법으로서,

상기 방법은,

자가면역 질환에 대한 치료의 과정 동안 상기 치료가 실시된 인간 환자의 다수의 생물학적 샘플을 제공하는 단계;

상기 다수의 생물학적 샘플에서 고분자량 키니노겐(HMWK)의 수준을 측정하는 단계; 및

상기 치료의 과정 동안 상기 절단된 HMWK의 수준의 변화에 기초하여 상기 인간 환자에서 상기 치료의 효율을 평가하는 단계를 포함하고,

여기서, 상기 절단된 HMWK의 수준이 상기 치료의 과정 동안 감소하는 경우, 상기 치료가 상기 인간 환자에서 효과적이라는 것을 나타내고,

상기 자가면역 질환은 류마티스성 관절염, 크론병 또는 궤양성 대장염인, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 치료는 적어도 하나의 혈장 칼리크레인 저해제를 포함하는, 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 다수의 생물학적 샘플 중 적어도 하나는 혈청 샘플 또는 혈장 샘플인, 방법.

청구항 22

제19항에 있어서, 상기 다수의 생물학적 샘플 중 적어도 하나는 하나 이상의 프로테아제 저해제를 포함하고, 상기 저해제는 이의 수집 후에 상기 샘플에 첨가되는, 방법.

청구항 23

제19항에 있어서, 상기 다수의 생물학적 샘플에서 상기 절단된 HMWK의 수준은 절단된 HMWK에 특이적인 결합제를 포함하는 검정에 의해 측정되는, 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 결합제는 항체인, 방법.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 검정은 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA) 또는 면역블로팅 검정인, 방법.

청구항 26

제23항에 있어서, 상기 검정은 리코르 검출을 포함하는 웨스턴블로팅 검정인, 방법.

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원에 대한 상호 참조

[0002]

본 출원은 2013년 10월 21일자로 출원된 미국 가출원 제61/893,542호(이의 전체 내용이 본 명세서에 참고로 포함됨)의 출원일의 이익을 주장한다.

배경 기술

[0003]

혈장 칼리크레인(plasma kallikrein: pKal)은 순환 시 주요 브래디키닌 생성 효소 및 혈장 칼리크레인-키닌 시스템(kallikrein-kinin system: KKS)의 성분이다(Colman, R. W., and Schmaier, A. H. (1997) *Blood* 90,

3819-3843). pK1의 활성화는 유전성 혈관부종(hereditary angioedema: HAE)과 연관된 질환 병리학에서 원인인 것으로 입증된 접촉 시스템을 통해 발생한다(Zuraw, B. L., and Christiansen, S. C. (2008) *Expert Opin Investig Drugs* 17, 697-706). 브래디키닌은 통증, 염증, 부종 및 혈관신생의 주요 조절물질이다(Maurer, M., et al. (2011) *Allergy* 66, 1397-1406; Colman, R. W. (2006) *Curr Pharm Des* 12, 2599-2607).

발명의 내용

- [0004] 본 개시내용은 절단된 고분자량 키니노겐(high molecular weight kininogen: HMWK)의 수준이 자가면역 질환, 예컨대 류마티스성 관절염(RA), 크론병(CD) 및 케양성 대장염(UC)을 가지는 환자에서 상승한다는 관찰에 기초한다. 따라서, 자가면역 질환, 예컨대 RA, CD 또는 UC를 진단하거나, 자가면역 질환의 진행을 모니터링하거나, 절단된 HMWK의 수준에 기초하여 자가면역 질환에 대한 치료의 효율을 평가하는 방법이 본 명세서에 개시되어 있다.
- [0005] 일 양상에서, 본 개시내용은 대상체에서 자가면역 질환(예를 들어, RA, CD 또는 UC)을 진단하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 (i) 자가면역 질환을 가지는 것으로 의심되는 대상체의 생물학적 샘플(예를 들어, 혈청 샘플 또는 혈장 샘플)을 제공하는 단계; (ii) 생물학적 샘플에서 절단된 고분자량 키니노겐(HMWK)의 수준을 측정하는 단계; 및 (iii) 생체샘플에서 절단된 HMWK의 수준이 대조군 샘플과 비교하여 상승한 경우, 대상체가 자가면역 질환을 가지거나 이의 위험에 있는 것으로 확인하는 단계를 포함한다.
- [0006] 몇몇 실시형태에서, 절단된 HMWK의 수준은 절단된 HMWK에 특이적인 결합제(예를 들어, 항체)를 포함하는 검정에 의해 측정된다. 검정은 효소 결합 면역흡착 검정(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) 또는 면역블로팅 검정(immunoblotting assay), 예를 들어 리코르(LiCor) 검출을 포함하는 웨스턴블로팅 검정(Westernblotting assay)일 수 있다.
- [0007] 상기 방법은 자가면역 질환에 대한 치료에 대상체를 처리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 대상체는 유효량의 혈장 칼리크레인(pK1) 저해제, 예를 들어 본 명세서에 기재된 것이 투여된다.
- [0008] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 대상체에서 자가면역 질환(예를 들어, RA, CD 또는 UC)의 발생을 모니터링하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 (i) 제1 시점에서 자가면역 질환을 가지는 것으로 의심되는 대상체의 제1 생물학적 샘플을 제공하는 단계; (ii) 제1 생물학적 샘플에서 고분자량 키니노겐(HMWK)의 제1 수준을 측정하는 단계; (iii) 제1 시점에 후속하는 제2 시점에서 대상체의 제2 생물학적 샘플을 제공하는 단계; (iv) 제2 생물학적 샘플에서 절단된 HMWK의 제2 수준을 측정하는 단계; 및 (v) 제1 및 제2 생물학적 샘플에서 절단된 HMWK의 수준의 변화에 기초하여 대상체에서 자가면역 질환의 발생을 평가하는 단계를 포함한다. 절단된 HMWK의 제2 수준이 절단된 HMWK의 제1 수준보다 높은 경우, 이것은 자가면역 질환이 대상체에서 진행하거나, 대상체가 자가면역 질환을 발생시키거나 발생시킬 위험에 있다는 것을 나타낸다.
- [0009] 몇몇 실시형태에서, 제1 생물학적 샘플, 제2 생물학적 샘플, 또는 둘 다는 혈청 샘플 또는 혈장 샘플이다. 다른 실시형태에서, 절단된 HMWK의 제1 또는 제2 수준은 절단된 HMWK에 특이적인 결합제(예를 들어, 항체)를 포함하는 검정에 의해 측정된다. 몇몇 예에서, 검정은 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA) 또는 면역블로팅 검정, 예를 들어 리코르 검출을 포함하는 웨스턴블로팅 검정이다.
- [0010] 상기 방법은 자가면역 질환에 대한 치료에 대상체를 처리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 대상체는 유효량의 혈장 칼리크레인(pK1) 저해제, 예컨대 본 명세서에 기재된 것이 투여된다.
- [0011] 추가로, 본 개시내용은 환자에서 자가면역 질환(예를 들어, RA, CD 또는 UC)에 대한 치료의 효율을 평가하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 (i) 치료의 과정 동안 자가면역 질환에 대한 치료가 실시된 환자의 다수의 생물학적 샘플(예를 들어, 혈청 샘플 또는 혈장 샘플)을 제공하는 단계; (ii) 다수의 생물학적 샘플에서 고분자량 키니노겐(HMWK)의 수준을 측정하는 단계; 및 (iii) 치료의 과정 동안 절단된 HMWK의 수준의 변경에 기초하여 환자에서 치료의 효율을 평가하는 단계를 포함한다. 절단된 HMWK의 수준이 치료의 과정 동안 감소하는 경우, 이것은 치료가 환자에서 효과적이라는 것을 나타낸다.
- [0012] 몇몇 실시형태에서, 치료는 적어도 하나의 혈장 칼리크레인 저해제, 예를 들어 본 명세서에 기재된 것을 포함한다. 다른 실시형태에서, 다수의 생물학적 샘플에서 절단된 HMWK의 수준은 절단된 HMWK에 특이적인 결합제(예를 들어, 항체)를 포함하는 검정에 의해 측정된다. 몇몇 예에서, 검정은 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA) 또는 면역블로팅 검정, 예를 들어 리코르 검출을 포함하는 웨스턴 블로팅 검정이다. 본 명세서에 기재된 임의의 방법에서, 여기에서 사용된 생물학적 샘플은 수집 후에 생물학적 샘플에 첨가되는 프로테아제 저해제 또는 프로테아제

저해제 카테일을 포함할 수 있다.

- [0013] 상기 방법에서 유용한 칼리크레인 저해제는 예를 들어 혈장 칼리크레인(pKal) 저해제일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 저해제는 혈장 칼리크레인 저해제이다.
- [0014] 상기 방법에서 유용한 칼리크레인 저해제는, 임의의 쿠니츠(Kunitz) 도메인을 포함하는 더 큰 폴리펩타이드인, 당해 분야에 공지되거나 본 명세서에 기재된 임의의 쿠니츠 도메인 폴리펩타이드일 수 있되, 칼리크레인 저해제 폴리펩타이드는 표준 검정에서 결정된 칼리크레인, 칼리크레인 결합 단백질(예를 들어, 항체, 예를 들어 항-혈장 칼리크레인 항체), 또는 본 명세서에 기재된 다른 칼리크레인 저해제에 결합하고 이를 저해한다.
- [0015] pKal 활성을 저해할 수 있는 예시적인 쿠니츠 도메인 펩타이드는 Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp(서열 번호 2; DX-88), 또는 이의 단편, 예컨대 서열 번호 2의 3 내지 60번 아미노산을 포함한다.
- [0016] 몇몇 실시형태에서, 칼리크레인 저해제는 쿠니츠 도메인의 프레임워크 구역 및 DX-88 폴리펩타이드의 제1 및 제2 결합 루프 구역을 포함하거나, 이들로 이루어진다.
- [0017] 몇몇 실시형태에서, 칼리크레인 저해제는 서열 번호 2의 3 내지 60번 아미노산의 약 58개의 아미노산 서열 또는 서열 번호 2의 60개의 아미노산 서열을 가지는 DX-88 폴리펩타이드를 포함하거나, 이들로 이루어진다.
- [0018] 몇몇 실시형태에서, 칼리크레인 저해제는 혈장 칼리크레인 결합 단백질(예를 들어, 항체, 예를 들어 본 명세서에 기재된 항-혈장 칼리크레인 항체)을 포함한다.
- [0019] 몇몇 실시형태에서, 결합 단백질(예를 들어, 항체, 예를 들어 인간 항체)은 동일한 에피토프에 결합하거나, 본 명세서에 기재된 단백질과 결합에 대해 경쟁한다.
- [0020] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 단백질은 M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01(또한 본 명세서에서 DX-2922라 칭함), X81-B01, X67-D03, X67-G04, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X124-G01(또한 본 명세서에서 DX-2930이라 칭함), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 및 M35-G04로 이루어진 군으로부터 선택된다. 이러한 결합 단백질은 예를 들어 PCT 공보 WO2012/094587 및 미국 특허 출원 공보 US 제20100183625호(이들 둘 다 본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 포함됨)에 기재되어 있다.
- [0021] 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 X81-B01, X67-D03, X101-A01, M162-A04, X115-F02, X124-G01 또는 X63-G06과 동일한 에피토프와 경쟁하거나 이들에 결합한다.
- [0022] 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 프리칼리크레인(예를 들어, 인간 프리칼리크레인)에 결합하지 않지만, 혈장 칼리크레인(예를 들어, 인간 혈장 칼리크레인)의 활성 형태에 결합한다.
- [0023] 소정의 실시형태에서, 단백질은 혈장 칼리크레인의 촉매 도메인, 또는 이의 단편의 활성 부위에서 또는 이의 근처에서 결합하거나, 혈장 칼리크레인의 활성 부위와 중첩되는 에피토프에 결합한다.
- [0024] 몇몇 실시형태에서, 단백질은 His434, Asp483 및/또는 Ser578(인간 서열에 기초하여 넘버링)의 혈장 칼리크레인의 촉매 트라이어드(triad)를 형성하는 하나 이상의 아미노산에 결합한다. 다른 실시형태에서, 단백질은 Ser479, Tyr563 및/또는 Asp585(인간 서열에 기초하여 넘버링)의 하나 이상의 아미노산에 결합한다. 훨씬 다른 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 Arg 551, Gln 553, Tyr 555 및/또는 Arg 560(인간 칼리크레인 서열에 기초한 아미노산 위치 넘버링)의 하나 이상의 아미노산에 결합한다. 훨씬 다른 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 Ser 478, Asn 481, Ser 525 및/또는 Lys 526(인간 칼리크레인 서열에 기초한 아미노산 위치 넘버링)의 하나 이상의 아미노산에 결합한다.
- [0025] 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 동일한 조건 하에 그러나 단백질의 부재 하에 표준품, 예를 들어 XIIa 인자 및/또는 브래디키닌 생성과 비교하여 5% 초과, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90% 또는 약 95%로 XIIa 인자 및/또는 브래디키닌 생성을 감소시킨다.
- [0026] 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 1000 미만, 500, 100 또는 10nM의 겔보기 저해 상수($K_{i,app}$)를 가진다.

- [0027] 일 실시형태에서, HC 및 LC 가변 도메인 서열은 동일한 폴리펩타이드 사슬의 성분이다.
- [0028] 또 다른 실시형태에서, HC 및 LC 가변 도메인 서열은 상이한 폴리펩타이드 사슬의 성분이다. 예를 들어, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 IgG, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4이다. 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 가용성 Fab(sFab)일 수 있다.
- [0029] 다른 실험에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 Fab2', scFv, 미니바디, scFv::Fc 융합, Fab::HSA 융합, HSA::Fab 융합, Fab::HSA::Fab 융합, 또는 본 명세서에서 결합 단백질의 하나의 항원 조합 부위를 포함하는 다른 분자를 포함한다. 이 Fab의 VH 및 VL 구역은 IgG, Fab, Fab2, Fab2', scFv, PEG화 Fab, PEG화 scFv, PEG화 Fab2, VH::CH1::HSA+LC, HSA::VH::CH1+LC, LC::HSA + VH::CH1, HSA::LC + VH::CH1, 또는 다른 적절한 작제로서 제공될 수 있다.
- [0030] 일 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 인간 또는 인간화 항체이거나, 인간에서 비면역원성이다. 예를 들어, 단백질은 하나 이상의 인간 항체 프레임워크 구역, 예를 들어 모든 인간 프레임워크 구역을 포함한다.
- [0031] 일 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 인간 Fc 도메인, 또는 인간 Fc 도메인과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 Fc 도메인을 포함한다.
- [0032] 일 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 영장류 또는 영장류화 항체이거나, 인간에서 비면역원성이다. 예를 들어, 단백질은 하나 이상의 영장류 항체 프레임워크 구역, 예를 들어 모든 영장류 프레임워크 구역을 포함한다.
- [0033] 일 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 영장류 Fc 도메인, 또는 영장류 Fc 도메인과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 Fc 도메인을 포함한다. "영장류"는 인간(호모 사피엔스(*Homo sapiens*)), 침팬치(판 트로글로다이테스(*Pan troglodytes*) 및 판 파니스쿠스(*Pan paniscus*)(보노보스)), 고릴라(고릴라 고릴라()), 긴팔원숭이, 원숭이, 여우원숭이, 다람쥐원숭이(다우벤토니아 마다가스카리엔시스(*Daubentonia madagascariensis*)) 및 안경원숭이를 포함한다.
- [0034] 일 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 인간 프레임워크 구역, 또는 인간 프레임워크 구역과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 프레임워크 구역을 포함한다.
- [0035] 소정의 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 마우스 또는 토끼 유래의 서열을 포함하지 않는다(예를 들어, 쥐와 또는 토끼 항체가 아님).
- [0036] 몇몇 실시형태에서, 결합 단백질(예를 들어, 항체, 예컨대 인간 항체)은 중쇄 면역글로불린 가변 도메인 서열 및 경쇄 면역글로불린 가변 도메인 서열을 포함하고, 중쇄 면역글로불린 가변 도메인 서열은 본 명세서에 기재된 단백질의 중쇄 가변 도메인으로부터의 1개, 2개 또는 3개(예를 들어, 3개)의 CDR 구역을 포함하고/하거나, 경쇄 면역글로불린 가변 도메인 서열은 본 명세서에 기재된 단백질의 경쇄 가변 도메인으로부터의 1개, 2개 또는 3개(예를 들어, 3개)의 CDR 구역을 포함하고, 단백질은 혈장 칼리크레인에 결합한다(예를 들어, 그리고 이를 저해한다).
- [0037] 몇몇 실시형태에서, 중쇄 면역글로불린 가변 도메인 서열은 M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01(또한 본 명세서에서 DX-2922라 칭함), X81-B01, X67-D03, X67-G04, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X124-G01(또한 본 명세서에서 DX-2930이라 칭함), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 및 M35-G04의 중쇄 가변 도메인으로부터의 1개, 2개 또는 3개(예를 들어, 3개)의 CDR 구역을 포함하고/하거나, 경쇄 면역글로불린 가변 도메인 서열은 M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01(또한 본 명세서에서 DX-2922라 칭함), X81-B01, X67-D03, X67-G04, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X124-G01(또한 본 명세서에서 DX-2930이라 칭함), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 및 M35-G04(각각)의 경쇄 가변 도메인으로부터의 1개, 2개 또는 3개(예를 들어, 3개)의 CDR 구역을 포함한다.
- [0038] 몇몇 실시형태에서, 중쇄 가변 도메인으로부터의 1개, 2개 또는 3개(예를 들어, 3개)의 CDR 구역은 X81-B01 유래이고/이거나, 경쇄 가변 도메인으로부터의 1개, 2개 또는 3개(예를 들어, 3개)의 CDR 구역은 X81-B01 또는 X67-D03 유래이다.
- [0039] 몇몇 실시형태에서, 중쇄 면역글로불린 가변 도메인 서열은 본 명세서에 기재된 단백질의 중쇄 가변 도메인을 포함하고/하거나, 경쇄 면역글로불린 가변 도메인 서열은 본 명세서에 기재된 단백질의 경쇄 가변 도메인을 포

함한다.

- [0040] 몇몇 실시형태에서, 중쇄 면역글로불린 가변 도메인 서열은 M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01(또한 본 명세서에서 DX-2922라 칭함), X81-B01, X67-D03, X67-G04, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X124-G01(또한 본 명세서에서 DX-2930이라 칭함), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 및 M35-G04의 중쇄 가변 도메인을 포함하고/하거나, 경쇄 면역글로불린 가변 도메인 서열은 M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01(또한 본 명세서에서 DX-2922라 칭함), X81-B01, X67-D03, X67-G04, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X124-G01(또한 본 명세서에서 DX-2930이라 칭함), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 및 M35-G04(각각)의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0041] 몇몇 실시형태에서, 중쇄 면역글로불린 가변 도메인 서열은 X81-B01의 중쇄 가변 도메인을 포함하고/하거나, 경쇄 면역글로불린 가변 도메인 서열은 X81-B01의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0042] 몇몇 실시형태에서, 중쇄 면역글로불린 가변 도메인 서열은 X67-D03, X101-A01, M162-A04, X115-F02, X124-G01 또는 X63-G06의 중쇄 가변 도메인을 포함하고/하거나, 경쇄 면역글로불린 가변 도메인 서열은 X67-D03, X101-A01, M162-A04, X115-F02, X124-G01 또는 X63-G06의 경쇄 가변 도메인(각각)을 포함한다.
- [0043] 몇몇 실시형태에서, 단백질은 본 명세서에 기재된 단백질의 중쇄 및/또는 본 명세서에 기재된 단백질의 경쇄를 포함한다.
- [0044] 몇몇 실시형태에서, 단백질은 M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01(또한 본 명세서에서 DX-2922라 칭함), X81-B01, X67-D03, X67-G04, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X124-G01(또한 본 명세서에서 DX-2930이라 칭함), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 및 M35-G04의 중쇄(각각)를 포함한다.
- [0045] 몇몇 실시형태에서, 단백질은 X81-B01의 중쇄 및/또는 X81-B01의 경쇄를 포함한다.
- [0046] 몇몇 실시형태에서, 단백질은 X67-D03, X101-A01, M162-A04, X115-F02, X124-G01 또는 X63-G06의 중쇄 및/또는 X67-D03, X101-A01, M162-A04, X115-F02, X124-G01 또는 X63-G06의 경쇄(각각)를 포함한다.
- [0047] 몇몇 실시형태에서, 단백질은 하기 특징 중 하나 이상을 포함한다: (a) 인간 CDR 또는 인간 프레임워크 구역; (b) HC 면역글로불린 가변 도메인 서열이 본 명세서에 기재된 HC 가변 도메인의 CDR과 적어도 85%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 1개 이상(예를 들어, 1개, 2개 또는 3개)의 CDR을 포함하는 특징; (c) LC 면역글로불린 가변 도메인 서열이 본 명세서에 기재된 LC 가변 도메인의 CDR과 적어도 85%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 1개 이상(예를 들어, 1개, 2개 또는 3개)의 CDR을 포함하는 특징; (d) LC 면역글로불린 가변 도메인 서열이 본 명세서에 기재된 LC 가변 도메인(예를 들어, 전체 또는 프레임워크 구역 또는 CDR에서)과 적어도 85%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 특징; (e) HC 면역글로불린 가변 도메인 서열이 본 명세서에 기재된 HC 가변 도메인(예를 들어, 전체 또는 프레임워크 구역 또는 CDR에서)과 적어도 85%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 특징; (f) 단백질이 본 명세서에 기재된 단백질에 의해 결합된 에피토프에 결합하거나, 본 명세서에 기재된 단백질과 결합에 대해 경쟁하는 특징; (g) 영장류 CDR 또는 영장류 프레임워크 구역; (h) HC 면역글로불린 가변 도메인 서열이 본 명세서에 기재된 HC 가변 도메인의 CDR1과 적어도 1개의 아미노산, 그러나 2개 또는 3개 이하의 아미노산이 다른 CDR1을 포함하는 특징; (i) HC 면역글로불린 가변 도메인 서열이 본 명세서에 기재된 HC 가변 도메인의 CDR2와 적어도 1개의 아미노산, 그러나 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개 이하의 아미노산이 다른 CDR2를 포함하는 특징; (j) HC 면역글로불린 가변 도메인 서열이 본 명세서에 기재된 HC 가변 도메인의 CDR3과 적어도 1개의 아미노산, 그러나 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개 이하의 아미노산이 다른 CDR3을 포함하는 특징; (k) LC 면역글로불린 가변 도메인 서열이 본 명세서에 기재된 LC 가변 도메인의 CDR1과 적어도 1개의 아미노산, 그러나 2개, 3개, 4개 또는 5개 이하의 아미노산이 다른 CDR1을 포함하는 특징; (l) LC 면역글로불린 가변 도메인 서열이 본 명세서에 기재된 LC 가변 도메인의 CDR2와 적어도 1개의 아미노산, 그러나 2개, 3개 또는 4개 이하의 아미노산이 다른 CDR2를 포함하는 특징; (m) LC 면역글로불린 가변 도메인 서열이 본 명세서에 기재된 LC 가변 도메인의 CDR3과 적어도 1개의 아미노산, 그러나 2개, 3개, 4개 또는 5개 이하의 아미노산이 다른 CDR3을 포함하는 특징; (n) LC 면역글로불린 가변 도메인 서열이 본 명세서에 기재된 LC 가변 도메인(예를 들어, 전체 또는 프레임워크 구역 또는 CDR에서)과 적어도 1개의 아미노산, 그러나 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이하의 아

미노산이 다른 특징; 및 (o) HC 면역글로불린 가변 도메인 서열이 본 명세서에 기재된 HC 가변 도메인(예를 들어, 전체 또는 프레임워크 구역 또는 CDR에서)과 적어도 1개의 아미노산, 그러나 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이하의 아미노산이 다른 특징.

- [0048] 몇몇 실시형태에서, 단백질은 1000 미만, 500, 100 또는 10nM의 겔보기 저해 상수($K_{i,app}$)를 가진다.
- [0049] 바람직한 실시형태에서, 단백질은 M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01(또한 본 명세서에서 DX-2922라 칭함), X81-B01, X67-D03, X67-G04, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X124-G01(또한 본 명세서에서 DX-2930이라 칭함), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 및 M35-G04로 이루어진 군으로부터 선택된 항체의 경쇄 및 중쇄를 가지는 항체(예를 들어, 인간 항체)이다.
- [0050] 바람직한 실시형태에서, 단백질은 M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01(또한 본 명세서에서 DX-2922라 칭함), X81-B01, X67-D03, X67-G04, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X124-G01(또한 본 명세서에서 DX-2930이라 칭함), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 및 M35-G04로 이루어진 군으로부터 선택된 항체의 중쇄를 가지는 항체(예를 들어, 인간 항체)이다.
- [0051] 바람직한 실시형태에서, 단백질은 M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01(또한 본 명세서에서 DX-2922라 칭함), X81-B01, X67-D03, X67-G04, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X124-G01(또한 본 명세서에서 DX-2930이라 칭함), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 및 M35-G04로 이루어진 군으로부터 선택된 항체의 경쇄를 가지는 항체(예를 들어, 인간 항체)이다.
- [0052] 바람직한 실시형태에서, 단백질은 M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01(또한 본 명세서에서 DX-2922라 칭함), X81-B01, X67-D03, X67-G04, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X124-G01(또한 본 명세서에서 DX-2930이라 칭함), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 및 M35-G04로 이루어진 군으로부터 선택된 항체의 경쇄 및/또는 중쇄 항체 가변 구역을 가지는 항체(예를 들어, 인간 항체)이다.
- [0053] 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 프리칼리크레인(예를 들어, 인간 프리칼리크레인)에 결합하지 않지만, 혈장 칼리크레인(예를 들어, 인간 혈장 칼리크레인)의 활성 형태에 결합한다.
- [0054] 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 동일한 조건 하에 그러나 단백질의 부재 하에 표준품, 예를 들어 XIIa 인자 및/또는 브래디키닌 생성과 비교하여 5% 초과, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90% 또는 약 95%로 XIIa 인자 및/또는 브래디키닌 생성을 감소시킨다.
- [0055] 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 1000 미만, 500, 100, 또는 10 nM의 겔보기 저해 상수($K_{i,app}$)를 가진다.
- [0056] 일 실시형태에서, HC 및 LC 가변 도메인 서열은 동일한 폴리펩타이드 사슬의 성분이다.
- [0057] 본 개시내용의 하나 이상의 실시형태의 상세내용은 첨부한 도면 및 하기 설명에 기재되어 있다. 본 개시내용의 다른 특징, 목적 및 이점은 설명 및 도면, 및 청구범위로부터 명확할 것이다.
- [0058] 본원에 걸쳐 인용된 모든 참조문헌, 계류 중인 특허 출원 및 공개 특허의 내용은 본 명세서에 참조문헌으로 명확히 포함된다.

도면의 간단한 설명

- [0059] 도 1은 절단된 HMWK와 류마티스성 관절염, 크론병 및 궤양성 대장염의 관계를 도시한 차트.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0060] 본 개시내용은 절단된 HMWK의 상승 수준이 RA, CD 또는 UC를 가지는 환자에서 관찰된다는 예상치 못한 발견에 기초한다. 특히, 절단된 HMWK의 광범위한 수준은 RA 환자에서 관찰되고, 절단된 HMWK의 보통의 수준이 CD 및 UC 환자 둘 다에서 관찰된다. 따라서, 자가면역 질환, 예컨대 RA, UC 또는 CD를 가지거나 이를 발생시킬 위험에 있

는 대상체를 확인하고, 자가면역 질환의 진행을 모니터링하고, 대상체의 생물학적 샘플에서 절단된 HMWK의 수준에 기초하여 대상체에서 자가면역 질환에 대한 치료의 효율을 평가하기 위한 새로운 진단학적 및 예측적 방법인 본 명세서에 제공된다. pKai 저해제, 예컨대 본 명세서에 기재된 것을 사용하여 이러한 자가면역 질환, 및 혈장 칼리크레인(pKai) 시스템과 연관된 다른 질환을 치료하는 방법이 또한 본 명세서에 기재되어 있다.

[0061] 정의

[0062] 편의를 위해, 본 개시내용의 추가의 설명 전에, 명세서, 실시예 및 첨부된 청구범위에 사용된 소정의 용어가 본 명세서에 정의되어 있다.

[0063] 단수 형태 "일", "하나" 및 "이것"은 문맥이 명확히 달리 나타내지 않는 한 복수 언급을 포함한다.

[0064] 용어 "항체"는 적어도 하나의 면역글로불린 가변 도메인 또는 면역글로불린 가변 도메인 서열을 포함하는 단백질을 의미한다. 예를 들어, 항체는 중쇄(H) 가변 구역(본 명세서에서 VH로 축약), 및 경쇄(L) 가변 구역(본 명세서에서 VL이라 축약)을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 항체는 2개의 중쇄(H) 가변 구역 및 2개의 경쇄(L) 사슬 가변 구역을 포함한다. 용어 "항체"는 항체의 항원 결합 단편(예를 들어, 단일 사슬 항체, Fab 및 sFab 단편, F(ab')₂, Fd 단편, Fv 단편, scFv 및 도메인 항체(dAb) 단편(de Wildt et al., Eur J Immunol. 1996; 26(3):629-39) 및 완전한 항체를 포함한다. 항체는 IgA, IgG, IgE, IgD, IgM(및 이의 아형)의 구조적 특징을 가질 수 있다. 항체는 임의의 공급원 유래일 수 있지만, 영장류(인간 및 비인간 영장류) 및 영장류화가 바람직하다.

[0065] VH 및 VL 구역은 "프레임워크 구역"("framework region: FR")이라 칭하는 더 보존된 구역 사이의 "상보성 결정 구역"("complementarity determining region: CDR")이라 칭하는 초가변 구역으로 추가로 세분될 수 있다. 프레임워크 구역 및 CDR의 정도는 정확히 정의되어 있다(문헌[Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 간행물 91-3242호, 및 Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917] 참조, 또한 www.hgmp.mrc.ac.uk 참조). 카바트 정의가 본 명세서에서 사용된다. 각각의 VH 및 VL은 통상적으로, 아미노 말단으로부터 카복시 말단으로 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열된, 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어진다.

[0066] 항체의 VH 또는 VL 사슬은 중쇄 또는 경쇄 불변 구역의 전부 또는 일부를 추가로 포함하여 각각 중쇄 또는 경쇄 면역글로불린 사슬을 형성할 수 있다. 일 실시형태에서, 항체는 2개의 중쇄 면역글로불린 사슬 및 2개의 경쇄 면역글로불린 사슬의 사합체이고, 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 사슬은 예를 들어 이황화 결합에 의해 상호 연결된다. IgG에서, 중쇄 불변 구역은 CH1, CH2 및 CH3인 3개의 면역글로불린 도메인을 포함한다. 경쇄 불변 구역은 CL 도메인을 포함한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 구역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 구역은 통상적으로 전통적인 보체 시스템의 제1 성분(C1q) 및 면역계(예를 들어, 이펙터 세포)의 다양한 세포를 포함하는, 숙주 조직 또는 인자에 대한 항체의 결합을 매개한다. 면역글로불린의 경쇄는 카파 또는 람다의 유형일 수 있다. 일 실시형태에서, 항체는 글라이코실화된다. 항체는 항체 의존적 세포독성 및/또는 보체 매개 세포독성에 대해 기능적일 수 있다.

[0067] 항체의 하나 이상의 구역은 인간 또는 효과적으로 인간일 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 가변 구역은 인간 또는 효과적으로 인간일 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 CDR은 인간, 예를 들어 HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2 및 LC CDR3일 수 있다. 각각의 경쇄 CDR은 인간일 수 있다. HC CDR3은 인간일 수 있다. 하나 이상의 프레임워크 구역은 인간, 예를 들어 HC 또는 LC의 FR1, FR2, FR3 및 FR4일 수 있다. 예를 들어, Fc 구역은 인간일 수 있다. 일 실시형태에서, 모든 프레임워크 구역은 인간이고, 예를 들어 인간 체세포 세포, 예를 들어 면역글로불린을 생성하는 조혈 세포 또는 비조혈 세포에 의해 생성된 항체의 프레임워크의 서열을 가진다. 일 실시형태에서, 인간 서열은 예를 들어 생식선 핵산에 의해 코딩된 생식선 서열이다. 일 실시형태에서, 선택된 Fab의 프레임워크(FR) 잔기는 가장 유사한 영장류 생식선 유전자, 특히 인간 생식선 유전자에서 상응하는 잔기의 아미노산 유형으로 전환될 수 있다. 하나 이상의 불변 구역은 인간 또는 효과적으로 인간일 수 있다. 예를 들어, 면역글로불린 가변 도메인, 불변 구역, 불변 도메인(CH1, CH2, CH3, CL1), 또는 전체 항체의 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 98% 또는 100%는 인간 또는 효과적으로 인간일 수 있다.

[0068] 항체의 전부 또는 일부는 면역글로불린 유전자 또는 이의 분절에 의해 코딩될 수 있다. 예시적인 인간 면역글로불린 유전자는 카파, 람다, 알파(IgA1 및 IgA2), 감마(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), 델타, 엡실론 및 뮤 불변 구역 유전자, 및 많은 면역글로불린 가변 구역 유전자를 포함한다. 전장 면역글로불린 "경쇄"(약 25kDa 또는 약 214개의 아미노산)는 NH2 말단(약 110개의 아미노산)에서 가변 구역 유전자에 의해 코딩되고, COOH- 말단에서

카과 또는 람다 불변 구역 유전자에 의해 코딩된다. 전장 번역글로불린 "중쇄"(약 50KDa 또는 약 446개의 아미노산)는 유사하게 가변 구역 유전자(약 116개의 아미노산) 및 다른 상기 언급된 불변 구역 유전자 중 하나, 예를 들어 (약 330개의 아미노산을 코딩하는) 감마에 의해 코딩된다. HC CDR3이 약 3개의 아미노산 잔기로부터 35개 초과인 아미노산 잔기로 변하므로, 인간 HC의 길이가 상당히 변한다.

[0069] 전장 항체의 용어 "항원 결합 단편"은 관심 있는 표적에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 전장 항체의 하나 이상의 단편을 의미한다. 전장 항체의 용어 "항원 결합 단편" 내에 포함된 결합 단편의 예는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 구역에서 이황화 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 암의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편, (v) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편(Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546); 및 (vi) 작용성을 보유하는 단리된 상보성 결정 구역(CDR)을 포함한다. 더욱이, VL 및 VH인 Fv 단편의 2개의 도메인이 별개의 유전자에 의해 코딩되더라도, 이들이, 단일 사슬 Fv(scFv)로서 공지된 1가 분자를 형성하도록 VL 및 VH 구역이 쌍을 지은, 단일 단백질 사슬을 만들게 하는, 합성 링커에 의해 재조합 방법을 이용하여 이들은 연결될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,260,203호, 제4,946,778호 및 제4,881,175호; 문헌[Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; 및 Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883]을 참조한다.

[0070] 항체 단편은 당해 분야의 당업자에게 공지된 종래의 기술을 포함하는 임의의 적절한 기술을 이용하여 얻어질 수 있다. 용어 "단일특이적 항체"는 특정한 표적, 예를 들어 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타내는 항체를 의미한다. 이 용어는 "단일클론 항체" 또는 "단일클론 항체 조성물"(이는 항체가 어떻게 생성되는지와 무관하게 본 명세서에 사용된 바대로 단일 분자 조성물의 항체 또는 이의 단편 제제를 의미함)을 포함한다.

[0071] 저해 상수(K_i)는 저해제 효력의 측정치를 제공하고; 이것은 효소 활성을 반으로 감소시키는 데 필요한 저해제의 농도이고, 효소 또는 기질 농도에 의존하지 않는다. 겉보기 K_i(K_{i,app})는 반응의 정도(예를 들어, 효소 활성)에 대한 상이한 농도의 저해제(예를 들어, 저해 결합 단백질)의 저해 효과를 측정함으로써; 모리스 식(Morrison equation)(식 1)에 대한 저해제 농도의 함수가 겉보기 K_i 값의 예측치를 생성하면서, 유사-1차 속도 상수의 변화를 맞추므로써, 상이한 기질 농도에서 얻어진다. K_i는 기질 농도에 대한 K_{i,app}의 도면의 선형 회귀 분석으로부터 추출된 y 절편으로부터 얻어진다.

$$v = v_o - v_o \left(\frac{(K_{i,app} + I + E) - \sqrt{(K_{i,app} + I + E)^2 - 4 \cdot I \cdot E}}{2 \cdot E} \right)$$

[0072]

[0073] 식 중, v = 측정된 속도; v₀ = 저해제의 부재 하의 속도; K_{i,app} = 겉보기 저해 상수; I = 전체 저해제 농도; 및 E = 전체 효소 농도.

[0074] 본 명세서에 사용된 바대로, "결합 친화도"는 겉보기 결합 상수 또는 K_a를 의미한다. K_a는 분해 상수(K_d)의 역수이다. 결합 단백질은, 예를 들어 특정한 표적 분자에 대해 적어도 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰ 및 10¹¹M⁻¹의 결합 친화도를 가질 수 있다. 제2 표적에 비해 제1 표적에 대한 결합 단백질의 더 높은 친화도 결합은 제2 표적의 결합에 대한 K_a(또는 숫자 값 K_d)보다 제1 표적의 결합에 대한 더 높은 K_a(또는 더 적은 숫자 값 K_d)로 표시될 수 있다. 이러한 경우에, 결합 단백질은 제2 표적(예를 들어, 제2 입체구성의 동일한 단백질 또는 이의 모방체; 또는 제2 단백질)에 비해 제1 표적(예를 들어, 제1 입체구성의 단백질 또는 이의 모방체)에 대해 특이성을 가진다. (예를 들어, 특이성 또는 다른 비교에 대한) 결합 친화도의 차이는 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 37.5, 50, 70, 80, 91, 100, 500, 1000 또는 10⁵배일 수 있다.

[0075] 결합 친화도는 평형 투석, 평형 결합, 겔 여과, ELISA, 표면 플라즈몬 공명 또는 (예를 들어, 형광 검정을 이용한) 분광법을 포함하는 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다. 결합 친화도를 평가하기 위한 예시적인 조건은 트리스-완충제(50mM 트리스, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂(pH 7.5)) 중에 있다. 이 기술은 결합 단백질(또는 표적) 농도의 함수로서 결합 및 유리 결합 단백질의 농도를 측정하도록 이용될 수 있다. 결합 결합 단백질의 농도([결합])는 유리 결합 단백질의 농도([유리]) 및 표적에서의 결합 단백질에 대한 결합 부위의 농도와 관련되고, 여

기서 (N)은 하기 식에 의해 표적 분자마다 결합 부위의 수이다:

$$[\text{결합}] = N \cdot [\text{유리}] / ((1/K_a) + [\text{유리}])$$

[0076]

[0077]

K_a 를 정확히 결정하는 것이 항상 필요한 것이 아니더라도, 이것이 때때로 예를 들어 ELISA 또는 FACS 분석과 같은 방법을 이용하여 측정된 친화도의 정량적 측정을 얻기에 충분하므로 K_a 에 비례하고, 따라서 친화도의 정성적 측정을 얻도록, 또는 실험실내 또는 생체내 검정과 같은 기능적 검정에서, 예를 들어 활성에 의해 친화도의 추론을 얻도록, 더 높은 친화도가 예를 들어 2배 더 높은지를 결정하는 것과 같은 비교에 사용될 수 있다.

[0078]

용어 "결합 단백질"은 표적 분자와 상호작용할 수 있는 단백질을 의미한다. 이 용어는 "리간드"와 상호 교환되어 사용된다. "혈장 칼리크레인 결합 단백질"은 혈장 칼리크레인과의 상호작용(예를 들어, 결합)할 수 있는 단백질을 의미하고, 특히 혈장 칼리크레인과 우선적으로 또는 특이적으로 상호작용하고/하거나 이를 저해하는 단백질을 포함한다. 단백질은 동일한 조건 하에 단백질의 부재 하에 혈장 칼리크레인의 활성과 비교하여 혈장 칼리크레인의 활성을 감소시키는 경우 혈장 칼리크레인을 저해한다. 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 항체이다.

[0079]

용어 "칼리크레인 저해제"는 칼리크레인을 저해하는 임의의 물질 또는 분자를 의미한다.

[0080]

용어 "조합"은 동일한 환자를 치료하기 위한 2종 이상의 물질 또는 치료제의 사용을 의미하고, 물질 또는 치료제의 사용 또는 작용은 시간이 중첩한다. 물질 또는 치료제는 동시에(예를 들어, 환자에게 투여되는 단일 제제로서 또는 동시에 투여되는 2종의 별개의 제제로서) 또는 임의의 순서로 순차적으로 투여될 수 있다.

[0081]

"보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기에 의해 대체된 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 당해 분야에 정의되어 있다. 이 패밀리는 염기성 측쇄(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄(예를 들어, 글라이신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 아이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 아이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산을 포함한다.

[0082]

결합 단백질의 하나 이상의 프레임워크 및/또는 CDR 아미노산 잔기(또는 결합 루프 아미노산 잔기)가 본 명세서에 기재된 결합 단백질에 대해 하나 이상의 돌연변이(예를 들어, 치환(예를 들어, 보존적 치환 또는 비필수 아미노산의 치환), 삽입, 또는 결실)를 포함할 수 있다. 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 본 명세서에 기재된 결합 단백질에 대해 돌연변이(예를 들어, 치환(예를 들어, 보존적 치환 또는 비필수 아미노산의 치환), 삽입, 또는 결실)(예를 들어, 적어도 1개, 2개, 3개 또는 4개 및/또는 15개 미만, 12개, 10개, 9개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개 또는 2개의 돌연변이), 예를 들어 단백질 기능에 실질적인 효과를 가지지 않는 돌연변이를 가질 수 있다. 돌연변이는 프레임워크 구역, CDR(또는 결합 루프) 및/또는 불변 구역에 존재할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 돌연변이는 프레임워크 구역에 존재한다. 몇몇 실시형태에서, 돌연변이는 CDR에 존재한다. 몇몇 실시형태에서, 돌연변이는 불변 구역에 존재한다. 특정한 치환이 허용되든 또는 허용되지 않든, 즉 생물학적 특성에 부정적으로 영향을 미치지 않든, 예컨대 결합 활성은 예를 들어 돌연변이가 보존적인지를 평가함으로써 또는 문헌[Bowie, et al. (1990) Science 247:1306-1310]의 방법에 의해 예측될 수 있다.

[0083]

"효과적으로 인간" 번역글로불린 가변 구역은, 번역글로불린 가변 구역이 정상 인간에서 면역원성 반응을 발생시키지 않도록, 충분한 수의 인간 프레임워크 아미노산 위치를 포함하는 번역글로불린 가변 구역이다. "효과적으로 인간" 항체는, 항체가 정상 인간에서 면역원성 반응을 발생시키지 않도록, 충분한 수의 인간 아미노산 위치를 포함하는 항체이다.

[0084]

"에피토프"는 결합 단백질(예를 들어, 항체, 예컨대 Fab 또는 전장 항체)에 의해 결합된 표적 화합물 상의 부위를 의미한다. 표적 화합물이 단백질인 경우, 이 부위는 전부 아미노산 성분으로 이루어지거나, 전부 단백질의 아미노산의 화학 변형(예를 들어, 글라이코실 모이어티)으로 이루어지거나, 이들의 조합으로 이루어질 수 있다. 중첩하는 에피토프는 적어도 하나의 공통의 아미노산 잔기, 글라이코실기, 포스페이트기, 설페이트기 또는 다른 분자 특징을 포함한다.

[0085]

제1 결합 단백질이 제2 결합 단백질이 결합하는 표적 화합물 상의 동일한 부위에 결합하거나, 제2 결합 단백질이 결합하는 부위와 중첩(예를 들어, 아미노산 서열 또는 다른 분자 특징(예를 들어, 글라이코실기, 포스페이트기 또는 설페이트기)의 면에서, 예를 들어 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 중첩)하는 부위에 결합하는

경우, 제1 결합 단백질(예를 들어, 항체)은 제2 결합 단백질(예를 들어, 항체)과 "동일한 에피토프에 결합한다".

[0086] 에피토프에 대한 제1 결합 단백질의 결합이 에피토프에 결합하는 제2 결합 단백질의 양을 (예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이상) 감소시키는 경우, 제1 결합 단백질(예를 들어, 항체)은 제2 결합 단백질(예를 들어, 항체)과 "결합에 대해 경쟁한다". 경쟁은 직접적(예를 들어, 제1 결합 단백질은 제2 결합 단백질이 결합한 에피토프와 동일하거나 이와 중첩하는 에피토프에 결합함) 또는 간접적(예를 들어, 에피토프에 대한 제1 결합 단백질의 결합은 에피토프에 결합하는 제2 결합 단백질의 능력을 감소시키는 표적 화합물의 입체 변화를 발생시킴)일 수 있다.

[0087] 2개의 서열 사이의 "상동성" 또는 "서열 동일성"(이 용어는 본 명세서에서 상호 교환되어 사용됨)의 계산을 하기와 같이 수행한다. 최적 비교 목적을 위해 서열을 정렬한다(예를 들어, 최적 정렬을 위해 제1 아미노산 및 제2 아미노산 또는 핵산 서열 중 하나 또는 둘 다에서 갭이 도입될 수 있고, 비교 목적을 위해 비상동성 서열을 버릴 수 있음). 최적 정렬은 12의 갭 패널티(gap penalty), 4의 갭 연장 패널티(gap extend penalty) 및 5의 프레임 시프트 갭 패널티(frameshift gap penalty)를 갖는 블러섬(Blossum) 62 스코어링 매트릭스를 갖는 GCG 소프트웨어 패키지에서 GAP 프로그램을 이용하여 최고의 점수로서 결정된다. 이후, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오타이드 위치에서의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드를 비교한다. 제1 서열에서의 위치를 제2 서열에서의 상응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드가 점유하는 경우, 분자는 그 위치에서 동일하다(본 명세서에 사용된 바대로 아미노산 또는 핵산 "동일성"은 아미노산 또는 핵산 "상동성"과 동일함). 2개의 서열 사이의 동일성의 백분율은 서열이 공유한 동일한 위치의 수의 함수이다.

[0088] 바람직한 실시형태에서, 비교 목적을 위해 정렬된 기준 서열의 길이는 기준 서열의 길이의 적어도 30%, 바람직하게는 적어도 40%, 더 바람직하게는 적어도 50%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 60% 및 훨씬 더 바람직하게는 적어도 70%, 80%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% 또는 100%이다. 예를 들어, 기준 서열은 면역글로불린 가변 도메인 서열의 길이일 수 있다.

[0089] "인간화" 면역글로불린 가변 구역은, 면역글로불린 가변 구역이 정상 인간에서 면역원성 반응을 발생시키지 않도록, 충분한 수의 인간 프레임워크 아미노산 위치를 포함하도록 변형된 면역글로불린 가변 구역이다. "인간화" 면역글로불린의 상세내용은 예를 들어 미국 제6,407,213호 및 미국 제5,693,762호를 포함한다.

[0090] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 용어 "낮은 엄격도, 중간 엄격도, 높은 엄격도 또는 매우 높은 엄격도 조건 하에 하이브리드화한다"는 하이브리드화 및 세척에 대한 조건을 기술한다. 하이브리드화 반응을 수행하기 위한 가이드라인은 문헌[Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6]에서 확인될 수 있다. 수성 및 비수성 방법은 이 참조문헌에 기재되어 있고, 이 중 어느 하나가 이용될 수 있다. 본 명세서에서 언급한 특정한 하이브리드화 조건은 하기와 같다: (1) 약 45°C에서의 6X 염화나트륨/나트륨 시트레이트(SSC) 중에서, 이어서 적어도 50°C(세척의 온도는 낮은 엄격도 조건 하에 55°C로 증가할 수 있음)에서 0.2X SSC, 0.1% SDS 중의 2회 세척의 낮은 엄격도 하이브리드화 조건; (2) 약 45°C에서의 6X SSC, 이어서 60°C에서의 0.2X SSC, 0.1% SDS 중의 1회 이상의 세척의 중간 엄격도 하이브리드화 조건; (3) 약 45°C에서의 6X SSC, 이어서 65°C에서의 0.2X SSC, 0.1% SDS 중의 1회 이상의 세척의 높은 엄격도 하이브리드화 조건; 및 (4) 65°C에서의 0.5M 인산나트륨, 7% SDS, 이어서 65°C에서의 0.2X SSC, 1% SDS 중의 1회 이상의 세척의 매우 높은 엄격도 하이브리드화 조건. 매우 높은 엄격도 조건(4)이 바람직한 조건이고, 달리 기재되지 않은 한 사용되어야 하는 것이다. 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 핵산 또는 이의 보체, 예를 들어 본 명세서에 기재된 결합 단백질을 코딩하는 핵산에 낮은, 중간, 높은 또는 매우 높은 엄격도로 하이브리드화하는 핵산을 포함한다. 핵산은 기준 핵산의 길이와 동일한 길이 또는 이의 30%, 20% 또는 10% 내일 수 있다. 핵산은 본 명세서에 기재된 면역글로불린 가변 도메인 서열을 코딩하는 구역에 상응할 수 있다.

[0091] "단리된 조성물"은 단리된 조성물이 얻어질 수 있는 천연 샘플의 적어도 하나의 성분의 적어도 90%로부터 제거된 조성물을 의미한다. 관심 있는 종 또는 종의 집단이 중량-중량 기준으로 적어도 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 80%, 90%, 92%, 95%, 98% 또는 99% 순수한 경우, 인공으로 또는 천연으로 생성된 조성물은 "적어도" 소정의 정도의 순도의 "조성"일 수 있다.

[0092] "단리된" 단백질은 단리된 단백질이 얻어질 수 있는 천연 샘플의 적어도 하나의 성분의 적어도 90%로부터 제거된 단백질을 의미한다. 관심 있는 종 또는 종의 집단이 중량-중량 기준으로 적어도 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 80%, 90%, 92%, 95%, 98% 또는 99% 순수한 경우, 단백질은 "적어도" 소정의 정도의 순도의 "조성"일 수 있다.

[0093] "비필수" 아미노산 잔기는 생물학적 활성을 폐지하지 않거나 더 바람직하게는 이를 실질적으로 변경하지 않으면서 결합제, 예를 들어 항체의 야생형 서열로부터 변경될 수 있는 잔기이지만, "필수" 아미노산 잔기의 변경은 실질적인 활성을 손실시킨다.

[0094] 상기 방법에 의해 치료하고자 하는 "환자", "대상체" 또는 "숙주"(이들 용어는 상호 교환되어 사용됨)는 인간 또는 비인간 동물을 의미할 수 있다.

[0095] "이를 필요로 하는 대상체"는 예를 들어 본 명세서에 기재된 질환 또는 장애를 가지는 대상체 또는 본 명세서에 기재된 질환 또는 장애를 발생시킬 위험에 있는 대상체를 포함한다.

[0096] 용어 "칼리크레인"(예를 들어, 혈장 칼리크레인)은 세린 프로테아제 패밀리의 하위그룹인 펩티다제(단백질 중에 펩타이드 결합을 절단하는 효소)를 의미한다. 혈장 칼리크레인은 키니노겐을 절단하여 강력한 전염증성 펩타이드인 키닌을 생성시킨다. DX-88(또한 본 명세서에서 "PEP-1"이라 칭함)은 혈장 칼리크레인(NP_000883)의 강력(1nM 미만의 Ki)하고 특이적인 저해제이다. (또한, 예를 들어 WO 제95/21601호 또는 WO 제2003/103475호를 참조).

[0097] KLKb1(혈장 칼리크레인)의 아미노산 서열은 하기와 같다:

KLKb1

>gi|78191798|ref|NP_000883.2| 혈장 칼리크레인 B1 전구체 [호모 사피엔스]

MILFKQATYFISLFATVSCGCLTQLYENAFRRGGDVASMYTPNAQYQMRCTFHPRCLLFSFLPASSINDMEKRFGCFLKDSVTG
TLPKVHRTGAVSGHSLKQCGHQISACHRDIYKGVDMRGVNFNVSKVSSVEECQKRCTSNIRCQFFSYATQTFHKAERYNNCLLY
SPGGTPTAIKVLNVSSEGSFLKPCALSEIGCHMNIQHLAFSDVDVARVLTPDAFVCRTICTYHPNCLFFTFYTNVWKIESQRNV
CLLKTSESGTPSSSTPQENTISGYSLLTCKRTLPEPCHSKIYPGVDFGGEELNVTFVKGVNVCQETCTKMIRCQFFTYSLLPEDC
KEEKCKCFLRLSMDGSPTRIAYGTTQSSGYSLRLCNTGDNVCTTKTSTRIVGGTNSSGWEWPWQVSLQVKLTAQRHLCGSLIG
HQWVLTAACHCFDGLPLQDVWRIYSGILNLSIDITKDPFSQIKEIIHQNYKVSEGNHDIALIKLQAPLNYTEFKPKICLPSKGBT
STIYTCNWWTGWGFSKEKEIQNILQKVNIPLVTNEECQKRYQDYKITQRMVCAGYKEGGKDGKDGSGGPLVCKHNGMWRLVGI
TSWEGGCARREQPGVYTKVAEYMDWILEKTQSSDGKAMQSPA (서열 번호 3).

[0098]

[0099] 본 명세서에 사용된 바대로 용어 "DX-2922"는 용어 "X101-A01"과 상호 교환되어 사용된다. 이 항체의 다른 변이체는 이하에 기재되어 있다.

[0100]

[0101] 본 명세서에 사용된 바대로 용어 "DX-2930"은 용어 "X124-G01"과 상호 교환되어 사용된다. 이 항체의 다른 변이체는 이하에 기재되어 있다.

[0102]

항체 식별	설명
X63-G06	HC가 M160-G12와 동일하지만 LC가 다른, ROLIC을 이용하여 발견된 비생식선 Fab
X81-B01	HEK 293T 세포에서 생성된 생식선 IgG
X101-A01	HC 및 LC가 X81-B01과 동일한, CHO 세포에서 생성된 생식선 IgG
DX-2922	X101-A01의 대안적인 명명법

항체 식별	설명
M162-A04	과지 디스플레이를 이용하여 발견된 비생식선 Fab
M199-A08	M162-A04의 친화도 성숙에 의해 유래한, 중쇄 CDR3 가변 Fab
X115-F02	가변 중쇄가 X124-G01과 동일한, 293T 세포에서 생성된 생식선 Fab
X124-G01 또는 DX-2930	HC의 C 말단 Lys가 X124-G01에서 제거되었다(DX-2930으로 공지됨)는 것을 제외하고는, LC 및 HC가 X115-F02와 동일한, CHO 세포에서 생성된 생식선 IgG.

KLK1

>gi|13529059|gb|AAH05313.1| 칼리크레인 1 [호모 사피엔스]
 MWFLVLCLALSLGGTGAAPPIQSRIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVHRQWVLTAAHCSIDN
 YQLWLGRHNLFDDETAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKVV
 ELPTQEPEVGSTCLASGWSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDECKKVHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTG
 VGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSSAVRVL SYVKWIEDTIAENS (서열 번호 4)

[0103]

[0104]

구절 "비경구 투여" 및 "비경구로 투여된다"는, 본 명세서에 사용된 바대로, 장용 및 국소 투여 이외의 투여 방식, 보통 주사에 의한 것을 의미하고, 제한 없이 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 관절내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 기관지경, 피하, 각피내, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 점적주사를 포함한다.

[0105]

대상체에서의 질환을 "예방하는"의 용어는 대상체를 약제학적 치료로 처리하는 것, 예를 들어 질환의 적어도 하나의 증상이 예방되게 하는 약물의 투여, 즉 이것이 원치않는 병증의 발생에 대해 숙주를 보호하도록 원치않는 병증(예를 들어, 숙주 동물의 질환 또는 다른 원치않는 상태)의 임상 표출 전에 투여되는 것을 의미한다. 질환을 "예방하는"은 또한 "예방" 또는 "예방학적 치료"로 칭해질 수 있다.

[0106]

"예방학적 유효량"은 원하는 예방학적 결과를 성취하는 데 필요한 효과적인 양, 투약량 및 기간을 의미한다. 통상적으로, 예방학적 용량이 질환 전에 또는 이의 초기 병기에 대상체에서 사용되므로, 예방학적 유효량은, 반드시 아니지만, 치료학적 유효량보다 낮을 것이다.

[0107]

본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 용어 "실질적으로 동일한"(또는 "실질적으로 상동성")은 제1 아미노산 및 제2 아미노산 또는 핵산 서열이 유사한 활성, 예를 들어 결합 활성, 결합 선호도 또는 생물학적 활성을 갖도록 (또는 이를 갖는 단백질을 코딩하도록), 제2 아미노산 또는 핵산 서열과 동일한 또는 동등한(예를 들어, 유사한 측쇄, 예를 들어 보존된 아미노산 치환을 가짐) 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드의 충분한 수를 포함하는 제1 아미노산 또는 핵산 서열을 의미하도록 본 명세서에서 사용된다. 항체의 경우에, 제2 항체는 동일한 특이성 및 동일한 항원에 비해 적어도 50%, 적어도 25% 또는 적어도 10%의 친화도를 가진다.

[0108]

본 명세서에 개시된 서열에 유사하거나 상동성인 서열(예를 들어, 적어도 약 85%의 서열 동일성)은 또한 본원의 일부이다. 몇몇 실시형태에서, 서열 동일성은 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 본 명세서에 기재된 결합 단백질과 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 HC 및/또는 LC 프레임워크 구역(예를 들어, HC 및/또는 LC FR 1, 2, 3 및/또는 4)에서 본 명세서에 기재된 결합 단백질과 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 HC 및/또는 LC CDR(예를 들어, HC 및/또는 LC CDR1, 2 및/또는 3)에서 본 명세서에 기재된 결합 단백질과 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 불변 구역(예를 들어, CH1, CH2, CH3 및/또는 CL1)에서 본 명세서에 기재된 결합 단백질과 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0109]

또한, 핵산 분절이 가닥의 보체에 선택적 하이브리드화 조건(예를 들어, 매우 엄격한 하이브리드화 조건) 하에 하이브리드화할 때 실질적인 동일성이 존재한다. 핵산은 전체 세포 중에, 세포 용해물 중에 또는 부분 정제된 또는 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수 있다.

[0110]

생물중합체에 대한 모티프 서열은 아미노산이 변할 수 있는 위치를 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 상황에서 기호 "X"는 일반적으로 달리 기재되지 않은 한 임의의 아미노산(예를 들어, 임의의 20개의 천연 아미노산)을 의미하고, 예를 들어 임의의 비시스테인 아미노산을 의미한다. 다른 허용되는 아미노산은 또한 예를 들어 괄호 및 슬래시를 사용하여 표시될 수 있다. 예를 들어, "(A/W/F/N/Q)"는 알라닌, 트립토판, 페닐알라닌, 아스파라긴 및 글루타민이 이 특정한 위치에서 허용된다는 것을 의미한다.

[0111]

임의의 분야 공지된 방법에 의해 통계 유의성을 결정할 수 있다. 예시적인 통계 시험은 스튜던트 T-시험, 만 휘트니(Mann Whitney) U 비모수 시험 및 윌콕슨(Wilcoxon) 비모수 통계 시험을 포함한다. 약간 통계학적으로 유의적인 관계는 0.05 또는 0.02 미만의 P 값을 가진다. 특정한 결합 단백질은, 통계학적으로 유의적인(예를 들어, 0.05 또는 0.02 미만의 P 값)인, 예를 들어 특이성 또는 결합의 차이를 나타낼 수 있다. 2개의 상태 사이의 구별 가능한 정성적 또는 정량적 차이를 나타내는 예를 들어 용어 "유도한다", "저해한다", "강화한다", "상승시

킨다", "증가시킨다", "감소시킨다" 등은 2개의 상태 사이의 차이, 예를 들어 통계학적으로 유의적인 차이를 의미할 수 있다.

- [0112] "치료학적 유효량"은 원하는 치료학적 결과를 달성하기 위해 필요한 시간의 기간 동안 및 용량에서 효과적인 양을 의미한다. 상기 조성물의 치료학적 유효량은 개인의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개인에서 원하는 반응을 발생시키는 단백질의 능력과 같은 인자에 따라 변할 수 있다. 치료학적 유효량은 또한 치료학적으로 유리한 효과가 조성물의 임의의 독성 또는 해로운 효과를 능가하는 것이다.
- [0113] "치료학적으로 효과적인 투약량"은 바람직하게는 질환 또는 장애의 측정 가능한 매개변수를 조절한다. 예를 들어, 치료학적으로 효과적인 투약량은 질환 또는 장애의 증상의 정도를 치료 전의 증상과 비교하여 적어도 약 20%, 더 바람직하게는 적어도 약 40%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 약 60% 및 훨씬 더 바람직하게는 적어도 약 80%로 감소시킬 수 있다. 측정 가능한 매개변수, 예를 들어 질환 관련 매개변수를 조절하는 화합물의 능력은 인간 장애 및 병증에서 효능을 예견하는 동물 모델 시스템에서 평가될 수 있다. 대안적으로, 조성물의 이 특성은 실험실내 매개변수를 조절하는 화합물의 능력을 검사함으로써 평가될 수 있다.
- [0114] 대상체에서 질환 또는 장애를 "치료하는"(예를 들어, 질환 또는 장애를 가지거나 발생시킬 위험에 있는 대상체를 "치료하는"을 포함)은 질환의 적어도 하나의 증상이 예방되거나 치유되거나 경감되거나 감소하거나 기타 등등이 되도록 대상체를 약제학적 치료에 적용는 것, 예를 들어 약물의 투여를 의미한다.
- [0115] "단백질 미스폴딩 또는 응집과 연관된 질환"은 적어도 부분적으로 단백질의 폴딩된 구조의 안정성 또는 폴딩 과정의 변화(예를 들면, 파괴)로 인해 생기는 질환이다. 폴딩 과정의 파괴는 응집을 증가시키고 네이티브 단백질 구조의 탈안정화는 기능 손실 또는 기능 획득 병리학을 발생시킬 수 있다. 단백질 미스폴딩 또는 응집과 연관된 질환은 전신 아밀로이드증, 한냉글로불린혈증 및 겸상 세포 질환을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 단백질 미스폴딩 또는 응집과 연관된 신경학적 질환은 야콥-크로이츠펠트(Jacob-Kreutzfeld) 질환(프리온 단백질과 연관됨), 알츠하이머병, 다른 아밀로이드 질환, 예컨대 가족성 아밀로이드 다발성 신경염(Familial amyloidotic polyneuropathy: FAP)을 포함한다.
- [0116] **I. 자가면역 질환에 대한 진단 및 예후 검정에서 바이오마커로서의 절단된 고분자량 키니노젠(HMWK)의 용도**
- [0117] 예상치 못하게, 절단된 HMWK의 상승 수준은 자가면역 질환, 예컨대 류마티스성 관절염(RA), 크론병(CD) 및 궤양성 대장염(UC)에서 발견되었다. 하기 실시예 1. 따라서, 절단된 HMWK는 자가면역 질환(예를 들어, RA, UC 및 CD)을 진단하고, 이러한 자가면역 질환의 진행을 모니터링하고, 질환에 대한 치료의 효능을 평가하기 위한 신뢰 가능한 바이오마커로서 작용할 수 있다.
- [0118] 따라서, 후보 환자로부터 얻은 생체샘플(예를 들어, 혈장 샘플)에서의 절단된 HMWK의 수준에 기초한, 자가면역 질환(예를 들어, RA, UC 및 CD)을 위한 진단학적 및 예후적 방법이 본 명세서에 기재되어 있다.
- [0119] 또한 윌리엄스-피츠제랄드-플라우제악(Williams-Fitzgerald-Flaujeac) 인자 또는 피츠제랄드 인자 또는 HMWK-칼리크레인 인자로 공지된 고분자량 키니노젠(HMWK)은 혈액 응고 시스템, 및 키닌-칼리크레인 시스템 유래의 단백질이다. 이것은 생체내 혈액과 접촉하는 생체재료의 표면에 흡착하는 단백질이다. 고분자량 키니노젠(HMWK)은 분자량이 대략 110kDa인 단일 폴리펩타이드(1-사슬) 다중도메인(도메인 1-6) 단백질로서 혈장에 존재한다. HMWK는 도메인 4 내에 pKa에 의해 절단되어, 9개의 아미노산, 전염증성 펩타이드 브래디키닌 및 HMWK(절단된 키니노젠)의 2-사슬 형태를 방출한다. HMWK의 2 사슬은 HMWK의 도메인 1 내지 3을 함유하는 중쇄, 및 HMWK의 도메인 5 및 6을 함유하는 경쇄이다. 중쇄 및 경쇄는 각각 대략 56 및 46킬로달톤의 분자량을 가진다.
- [0120] HMWK를 코딩하는 인간 유전자는 키니노젠 1(KNG1)이다. KNG1은 전사되고 대안적으로 스플라이싱되어 HMWK 또는 저분자량 키니노젠(LMWK)을 코딩하는 mRNA를 형성한다. HMWK의 예시적인 단백질 서열이 하기 제공된다:

>gi|156231037|ref|NP_001095886.1| 키니노젠-1 아이소폼 1 전구체 [호모 사피엔스]

MKLITILFLCSRLLLSLTQESQSEEIDCNDKDLFAVDAALKKYNSQNSQNFVLYRITTEATKTGSDTFYSFKYEIKEGDCPVQSGKTWQDCEYKDAKAATGECTATVGKRSSTKFSVATQTCQITPAEGPVVTAQYDCLGCVHPISTQSPDLEPILRHGIQYFNNNTQHSSFLMLNEVKRAQRQVAVGLNFRITYSIVQTNCSENFLEFLTPDCKSLWNGDTGECTDNAYIDIQLRIASFQNCDIYPGKDFVQPPPTKICVGCPRDIPTNSPELEETLTHITITKLAENNATFYFKIDNVKKARVQVAVAGKKYFIDFVARETTCSKESNEELTESCETKKLGQSLDCNAEVYVVPWEKKIYPTVNCQPLGMSLMKRPPGFSPFRSSRIGEIKEETTVSPHTSMAPAQDEERDSGKEQGHTRRHWDGHEKQRKHNLGHGKHERDQGHGHRGHLGHGHEQQHGLGHGKFKLDDLEHQGGHVLHDHGKHKHGHGKHNKGKNGKHNGWKTEHLASSEDSTTPSAQTQEKTEGPTIPSLAKPGVTVTFSDFQSDLIATMMPPISPAPIQSDDDWIPDIQIDPNGLSFNPISDFPDTTSPKCPGRPWKSVSEINPTTQMKESYFDLTDGLS (서열 번호 5)

[0121]

[0122]

온전한 고분자량 키니노젠(HMWK)은 예를 들어 응고제 또는 면역학적 방법, 예를 들어 방사선면역검정을 이용하여 평가될 수 있다(예를 들어, 문헌[Kerbiriou-Nabias, D.M., Br J Haematol, 1984, 56(2):2734-86] 참조). 인간 HMWK의 경쇄에 대한 단일클론 항체가 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Reddigari, S.R. & Kaplan, A.P., Blood, 1999, 74:695-702]을 참조한다. 발색 기질에 의존하는 HMWK에 대한 검정을 또한 사용할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Scott, C.F. et al. Thromb Res, 1987, 48(6):685-700; Gallimore, M.J. et al. Thromb Res, 2004, 114(2):91-96]을 참조한다.

[0123]

또한 본 명세서에서 "절단된 키니노젠"이라 칭하는 절단된 고분자량 키니노젠(HMWK)은 예를 들어 실시예 1에 기재된 방법, 예를 들어 웨스턴 블롯을 이용하여 평가될 수 있다. 마우스 mAb 클론 11H05 등과 같은 절단된 HMWK에 특이적으로 결합하는 항체를 사용할 수 있다. 부가적으로, 절단된 HMWK는 질량 분광법을 이용하여 평가될 수 있다. 절단된 HMWK의 수준을 평가하기 위한 면역블로팅 기법은 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Buhler R. et al. Blood Coagul Fibrinolysis, 1995, 6(3):223-232]을 참조한다.

[0124]

절단된 키니노젠의 중쇄 및 경쇄의 예시적인 서열은 하기 제공된다.

> 절단된 키니노젠-1 중쇄

QESQSEEIDCNDKDLFAVDAALKKYNSQNSQNFVLYRITTEATKTGSDTFYSFKYEIKEGDCPVQSGKTWQDCEYKDAKAATGECTATVGKRSSTKFSVATQTCQITPAEGPVVTAQYDCLGCVHPISTQSPDLEPILRHGIQYFNNNTQHSSFLMLNEVKRAQRQVAVGLNFRITYSIVQTNCSENFLEFLTPDCKSLWNGDTGECTDNAYIDIQLRIASFQNCDIYPGKDFVQPPPTKICVGCPRDIPTNSPELEETLTHITITKLAENNATFYFKIDNVKKARVQVAVAGKKYFIDFVARETTCSKESNEELTESCETKKLGQSLDCNAEVYVVPWEKKIYPTVNCQPLGMSLMK (서열 번호 6)

[0125]

> 절단된 키니노젠-1 경쇄

SSRIGEIKEETTVSPHTSMAPAQDEERDSGKEQGHTRRHWDGHEKQRKHNLGHGKHERDQGHGHRGHLGHGHEQQHGLGHGKFKLDDLEHQGGHVLHDHGKHKHGHGKHNKGKNGKHNGWKTEHLASSEDSTTPSAQTQEKTEGPTIPSLAKPGVTVTFSDFQSDLIATMMPPISPAPIQSDDDWIPDIQIDPNGLSFNPISDFPDTTSPKCPGRPWKSVSEINPTTQMKESYFDLTDGLS (서열 번호 7)

[0126]

[0127]

몇몇 예에서, 온전한 HMWK 및 절단된 HMWK의 수준은 웨스턴 블롯 분석, 예를 들어 심플 웨스턴(Simple Western)(상표명) 프로테인 심플(Protein Simple)(등록상표) 웨스턴 블롯 분석에 의해 측정된다. 심플 웨스턴(상표명) 검정은 당해 분야에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Rustandi et al. Qualitative and quantitative evaluation of Simon™, a new CE-based automated Western blot system as applied to vaccine development. Electrophoresis. 2012 Sep;33(17):2790-7]을 참조한다). 심플 웨스턴(상표명) 제품은 또한 상업적으로 구입 가능하다(예를 들어, 프로테인심플(등록상표)(캘리포니아주 산타 클라라) 참조).

[0128]

본 명세서에 기재된 임의의 진단학적 및/또는 예후적 방법을 실행하기 위해, 생체샘플(예를 들어, 생체유체 샘플, 예컨대 혈장 샘플 또는 혈청 샘플)은 절단된 HMWK의 수준을 측정하기 위해 후보 대상체(예를 들어, 후보 인간 환자)로부터 얻어질 수 있다. 대상체는 포유동물, 더 바람직하게는 인간일 수 있다. 비인간 포유동물은 농장

동물, 스포츠 동물, 애완동물, 영장류, 말, 개, 고양이, 마우스 및 랫트를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 인간 대상체는 자가면역 질환, 예컨대 본 명세서에 기재된 것, 예를 들어 RA, CD 또는 UC를 가지는 것으로 의심되는 인간 환자일 수 있다.

- [0129] 대상체로부터 얻어진 생체샘플은 조직 또는 유체 샘플일 수 있다. 유체 샘플의 예는 타액, 혈액, 혈장, 혈청 및 뇨를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 몇몇 실시형태에서, 대상체로부터의 생체샘플은 혈액, 예를 들어 혈액 샘플을 포함한다. 생체샘플은 당해 분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 정맥천자, 생검 또는 면봉을 이용하여 환자로부터 얻어질 수 있다. 분석 전에, 프로테아제 저해제 또는 프로테아제 저해제 카테일은 실험실 내 HMWK의 절단을 저해하기 위해 생체샘플에 첨가될 수 있다. 당해 분야에 공지된 임의의 프로테아제 저해제는 본 명세서에 기재된 방법에서 사용될 수 있다.
- [0130] 절단된 HMWK의 수준은 당해 분야에 공지된 임의의 적합한 검정에 의해 측정될 수 있다(예를 들어, 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001, Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Microarray technology is described in Microarray Methods and Protocols, R. Matson, CRC Press, 2009, 또는 Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York]을 참조한다).
- [0131] 몇몇 실시형태에서, 샘플에서의 절단된 HMWK 단백질의 수준을 측정한다. 절단된 HMWK 단백질 수준을 검출하기 위한 검정은 면역검정(또한 본 명세서에서 면역 기반 또는 면역-기반 검정, 예를 들어 웨스턴 블롯, 면역조직화학 및 ELISA 검정이라 칭함), 질량 분광법, 및 멀티플렉스 비드 기반 검정을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 단백질 수준 검출을 위한 이러한 검정은 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0132] 몇몇 예에서, 절단된 HMWK의 수준은 본 명세서에 기재된 바와 같은 리코르 검출을 포함할 수 있는 웨스턴 블롯 검정에 의해 측정된다. 다른 예에서, 절단된 HMWK 단백질의 수준은 결합 파트너, 예컨대 절단된 HMWK에 특이적으로 결합하거나 절단된 및 비절단된 HMWK에 특이적으로 결합하는 항체를 포함할 수 있는 면역조직화학 검정에 의해 측정된다.
- [0133] 단백질 검출을 위한 결합 파트너는 당해 분야에 공지되고 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법을 이용하여 설계될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 절단된 HMWK 단백질 결합 파트너, 예를 들어 항-절단된 HMWK 항체는 HMWK 단백질의 일부 또는 전체 아미노산 서열에 결합한다. 단백질 검출 및 정량 방법의 다른 예는 예를 들어 미국 특허 제6,939,720호 및 제8,148,171호, 및 공개 미국 특허 출원 제2008/0255766호에 기재된 바와 같은 멀티플렉스화 면역검정, 및 예를 들어 공개 미국 특허 출원 제2009/0088329호에 기재된 바와 같은 단백질 마이크로레이를 포함한다. 절단된 HMWK에 대한 임의의 적합한 결합 파트너는 절단된 HMWK 수준의 검출에 고려된다. 몇몇 실시형태에서, 결합 파트너는 HMWK 단백질 또는 절단된 HMWK 단백질에 특이적으로 결합하는 임의의 분자이다. 이러한 결합 파트너는 비절단된 HMWK에 대한 결합과 비교하여 훨씬 더 높은 친화도로 HMWK의 절단된 버전(예를 들어, 절단된 HMWK)에 결합할 수 있다. 몇몇 경우에, 결합 파트너, 예컨대 항체는 오직 HMWK의 절단된 버전에 결합할 수 있다.
- [0134] 본 명세서에 기재된 방법에 사용되는 항체는 전장 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 예컨대 Fab, F(ab)₂, Fv, 단쇄 항체, Fab 및 sFab 단편, F(ab')₂, Fd 단편, scFv, 또는 dAb 단편(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 임의의 형태일 수 있다. 항체를 제조하는 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2nd Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Lewin, "Genes IV", Oxford University Press, New York, (1990), 및 Roitt et al., "Immunology" (2nd Ed.), Gower Medical Publishing, London, New York (1989)], WO2006/040153, WO2006/122786, 및 WO2003/002609 참조). 또한 본 명세서에서 설명을 참조한다.
- [0135] 다른 실시형태에서, 절단된 HMWK의 수준을 측정하기 위해 사용되는 결합 파트너는 절단된 HMWK에 특이적으로 결합하는 비항체 펩타이드 분자 또는 아타머(aptamer)일 수 있다. 펩타이드 분자 및 아타머를 제조하는 방법은 당해 분야에 또한 공지되어 있다(예를 들어, 공개 미국 특허 출원 제2009/0075834호, 미국 특허 제7435542호, 제7807351호 및 제7239742호 참조).
- [0136] 후보 대상체로부터 얻은 생체샘플에서 절단된 HMWK의 수준이 결정되면, 이것은 대상체가 자가면역 질환, 예컨대 RA, CD 또는 UC를 가지거나, 이의 위험에 있거나, 이를 가지는 것으로 의심되는지를 결정하기 위해 대조군 수준과 비교될 수 있다.

- [0137] 몇몇 실시형태에서, 대조군 수준은 바람직하게는 후보 대상체와 동일한 종인 건강한 대상체 또는 건강한 대상체의 집단으로부터 얻은 대조군 샘플, 예컨대 세포, 조직 또는 유체에서의 절단된 HMWK의 수준이다. 본 명세서에 사용된 바대로, 건강한 대상체는 HMWK 수준이 측정되는 때에 표적 질환(예를 들어, RA, CD 또는 UC)이 명확히 없거나 질환의 병력을 가지지 않는 대상체이다.
- [0138] 몇몇 실시형태에서, 대조군 수준은 표준 검출 방법(예를 들어, 웨스턴 블롯 또는 면역조직화학)을 이용하여 얻은 배경/노이즈 수준보다 낮거나 검출 불가능한 절단된 HMWK의 수준이다. 바람직하게는, 표준 검출 방법은 후보 대상체의 샘플에서 절단된 HMWK의 수준을 측정하기 위해 사용된 동일한 방법이다.
- [0139] 대조군 수준은 또한 미리 결정된 수준일 수 있다. 이러한 미리 결정된 수준은 본 명세서에 기재된 바와 같은 자가면역 질환을 가지지 않거나 이의 위험이 없는 대상체의 집단에서의 절단된 HMWK의 수준을 나타낼 수 있다. 미리 결정된 수준은 다양한 형태를 취할 수 있다. 예를 들어, 이것은 단일 컷오프 값, 예컨대 중앙 또는 평균일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 이러한 미리 결정된 수준은 예컨대 하나의 한정된 그룹이 표적 자가면역 질환(예를 들어, RA, UC 또는 CD)을 가지는 것으로 공지되어 있는 경우 및 또 다른 한정된 그룹이 표적 자가면역 질환을 가지지 않는 것으로 공지된 경우 비교 가능한 그룹에 기초하여 확립될 수 있다. 대안적으로, 미리 결정된 수준은 미리 결정된 백분위 내의 대조군 집단에서의 절단된 HMWK의 수준을 나타내는 범위와 같은 범위일 수 있다.
- [0140] 미리 결정된 수준은 선택된 특정한 집단에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 명확히 건강한(검출 가능한 질환 또는 표적 자가면역 질환, 예컨대 RA, CD 또는 UC의 이전 병력이 없는)은 구성원이, 관해 상태일 수 있는, 표적 자가면역 질환을 가지거나 이의 위험이 있는 집단보다 절단된 HMWK의 상이한 '정상' 범위를 가질 것이다. 따라서, 선택된 미리 결정된 수준은 대상체가 해당하는 카테고리를 고려하여 취해질 수 있다. 적절한 범위 및 카테고리는 당해 분야의 당업자에 의해 단지 일상적인 것에 지나지 않는 실험에 의해 선택될 수 있다.
- [0141] 본 명세서에 기재된 바와 같은 대조군 수준은 일상적 기술에 의해 결정될 수 있다. 몇몇 예에서, 대조군 수준은 또한 본 명세서에 기재된 바와 같은 대조군 샘플에서 종래의 방법(예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 시험 샘플에서 절단된 HMWK의 수준을 얻기 위한 동일한 검정)을 수행함으로써 얻어질 수 있다. 다른 예에서, 절단된 HMWK의 수준은 대조군 집단의 구성원으로부터 얻어질 수 있고, 대조군 집단에서 절단된 HMWK의 수준을 나타내는 대조군 수준(미리 결정된 수준)을 얻기 위해 결과는 예를 들어 컴퓨터 프로그램에 의해 분석될 수 있다.
- [0142] 후보 대상체로부터 얻은 샘플의 절단된 HMWK의 수준을 본 명세서에 기재된 바와 같은 대조군 수준과 비교함으로써, 후보 대상체가 표적 자가면역 질환을 가지거나 이의 위험에 있는지에 대해 결정될 수 있다. 예를 들어, 후보 대상체의 절단된 HMWK의 수준이 대조군 수준으로부터 벗어나는 경우(예를 들어, 대조군 수준과 비교하여 증가 또는 감소), 후보 대상체는 표적 자가면역 질환을 가지거나 이의 위험에 있는 것으로 확인될 것이다.
- [0143] 본 명세서에 사용된 바대로, "상승 수준 또는 대조군보다 높은 수준"은 절단된 HMWK의 수준이 대조군 수준, 예컨대 대조군 샘플에서 절단된 HMWK의 미리 결정된 한계치 또는 수준보다 높다는 것을 의미한다. 대조군 수준은 본 명세서에 자세히 기재되어 있다. 절단된 HMWK의 상승 수준은 대조군 수준보다 예를 들어 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500% 이상 높은 절단된 HMWK 수준을 포함한다. 절단된 HMWK의 상승 수준은 또한 0의 상태(예를 들어, 대조군에서 절단된 HMWK가 검출 가능하지 않거나 없음)로부터 0이 아닌 상태(예를 들어, 샘플에서 절단된 HMWK가 약간 있거나 절단된 HMWK가 검출 가능함)로의 현상을 증가시키는 것을 포함한다.
- [0144] 본 명세서에 사용된 바대로, "감소 수준 또는 대조군보다 낮은 수준"은 절단된 HMWK의 수준이 대조군 수준, 예컨대 대조군 샘플에서 절단된 HMWK의 미리 결정된 한계치 또는 수준보다 낮다는 것을 의미한다. 대조군 수준은 본 명세서에 자세히 기재되어 있다. 절단된 HMWK의 감소 수준은 대조군 수준보다 예를 들어 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500% 이상 낮은 절단된 HMWK 수준을 포함한다. 절단된 HMWK의 감소 수준은 또한 0이 아닌 상태(예를 들어, 샘플에서 절단된 HMWK가 약간 있거나 절단된 HMWK가 검출 가능함)로부터 0의 상태(예를 들어, 대조군에서 절단된 HMWK가 검출 가능하지 않거나 없음)로의 현상을 감소시키는 것을 포함한다.
- [0145] 몇몇 실시형태에서, 절단된 HMWK의 광범위한 수준(예를 들어, 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%)이 RA 후보 환자로부터 얻어진 생체샘플에서 관찰되는 경우, 이 후보는 RA 악화를 가지거나 이의 위험에 있는 것으로 진단된다. 절단된 HMWK의 보통의 수준(예를 들어, 약 10-30%)이 UC 또는 CD 후보 환자로부터 얻은 생체샘플에서 관찰되는 경우, 이 후보는 UC 또는 CD를 가지거나 이의 위험에 있는 것으로 진단된다.
- [0146] 추가로, 절단된 HMWK의 수준은 자가면역 질환, 예컨대 RA, UC 및 CD의 발생을 모니터링하기 위해 바이오마커로

서 사용될 수 있다. 예를 들어, 적어도 2개의 생체샘플(예를 들어, 혈청 샘플 또는 혈장 샘플)은 상이한 시점에서 표적 자가면역 질환, 예컨대 RA, UC 또는 CD를 가지거나 이를 발생시킬 위험에 있는 인간 대상체로부터 얻어질 수 있다. 몇몇 예에서, 제2 생체샘플은 제1 생체샘플이 얻어진 후 적어도 1개월(예를 들어, 3개월, 6개월, 9개월 또는 12개월)에 얻어질 수 있다. 절단된 HMWK의 수준은 적어도 2개의 생체샘플에서 측정될 수 있다. 절단된 HMWK의 수준이 시간에 걸쳐 상승하고(예를 들어, 나중에 얻어진 생체샘플에서의 절단된 HMWK의 수준은 이전에 얻어진 생체샘플에서의 것보다 예를 들어 적어도 20%, 50%, 70%, 90%, 1배, 5배, 10배, 20배, 50배, 또는 100배 높음), 이것은 대상체에서의 질환 진행을 나타낸다(예를 들어, 자가면역 질환을 발생시킬 위험이 더 높거나, 자가면역 질환이 대상체에서 악화됨).

[0147] 더구나, 절단된 HMWK의 수준은 항자가면역 치료, 예를 들어 본 명세서에 기재된 것에 대한 대상체의 반응성을 평가하기 위해 바이오마커로서 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, 복수의 생체샘플은 치료의 기간 동안 치료가 실시된 인간 환자로부터 얻어질 수 있고, 절단된 HMWK의 수준은 통상적 기술, 예컨대 본 명세서에 기재된 것에 따라 측정될 수 있다. 치료가 실시된 인간 환자에서의 절단된 HMWK의 수준이 치료의 과정에 걸쳐 감소하게 머무르는 경우(예를 들어, 나중에 얻어진 생체샘플에서의 절단된 HMWK의 수준은 이전에 얻어진 생체샘플에서의 것보다 예를 들어 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%, 2배, 5배, 10배, 50배, 또는 100배 낮음), 이것은 인간 환자가 치료에 반응성이라는 것을 나타낸다. 반면, 절단된 HMWK의 수준이 치료의 과정에 걸쳐 실질적으로 동일하게 머무르는 경우(예를 들어, 나중에 얻어진 생체샘플에서의 절단된 HMWK의 수준은 이전에 얻어진 생체샘플의 것과 실질적으로 동일하거나 이것에 비해 20% 미만, 예를 들어 15%, 10% 또는 5% 감소함), 이것은 인간 환자가 치료에 반응성이 아니라는 것을 나타낸다.

[0148] 대상체가 본 명세서에 기재된 임의의 방법에 의해 자가면역 질환(예를 들어, RA, UC 또는 CD)을 가지거나 이의 위험에 있는 것으로 확인될 때, 질환을 치료하기 위해 적합한 치료가 수행될 수 있다. 몇몇 예에서, 대상체는 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 이상의 pKa1 저해제에 의해 치료될 수 있다. 대상체가 본 명세서에 기재된 임의의 방법에 의해 치료에 반응성이 아닌 것으로 결정될 때, 더 높은 용량 및/또는 투약 빈도의 치료제(예를 들어, pKa1 저해제)가 대상체에게 투여될 수 있다. 대안적으로, 대상체는 상이한 치료로 전환될 수 있다. 반면, 치료제의 투약량 또는 투약 빈도는 치료에 반응성인 것으로 확인되거나 추가의 치료를 필요로 하지 않는 대상체에서 유지되거나 저하되거나 중지된다.

[0149] II. 자가면역 질환의 치료

[0150] 당뇨병성 황반 부종, 망막 증식, 뇌 외상, 급성 척수 손상, 국소 아밀로이드증, 자가면역 질환, 예컨대 건선, 다발성 경화증, 염증성 장 질환, 류마티스성 관절염, 혈관염, 전신 홍반 루푸스 신염, 전신 비만세포증, 중증 화상 및 신경병증성 통증(당뇨병성 및 대상포진 후 신경통)(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 혈장 칼리크레인(pKa1) 시스템과 연관된 질환을 치료하는 방법이 본 명세서에 또한 기재되어 있다. 이러한 방법은 적합한 경로를 통해 하나 이상의 칼리크레인 저해제의 유효량을 치료를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 질환을 가지거나 이의 위험에 있는 인간 환자)에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0151] (A) 혈장 칼리크레인

[0152] 혈장 칼리크레인 결합 단백질이 발생할 수 있는 예시적인 혈장 칼리크레인 서열은 인간, 마우스 또는 랫트 혈장 칼리크레인 아미노산 서열, 이들의 서열 또는 이들의 단편, 예를 들어 하기 제공된 서열 중 하나와 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함할 수 있다.

[0153] 결합 단백질의 선택 및 후속하는 스크리닝에 사용되는 인간 혈장 칼리크레인의 서열은 이하에 기재되어 있다(수탁 번호 NP_000883.2). 사용된 인간 혈장 칼리크레인(86kDa)은 상업적 판매사에 의해 인간 혈장으로부터 정제되고 XIIa 인자에 의해 활성화된다. XIIa 인자는 (하기 서열에서 "/"로 표시된 절단 부위인, Arg371-Ile372 사이의) 단일 부위에서 폴리펩타이드 서열을 절단함으로써 프리칼리크레인을 활성화한다(이로써 활성 혈장 칼리크레인을 생성하고, 이것은 이후 2개의 이황화 연결된 폴리펩타이드; 대략 52kDa의 중쇄 및 대략 34kDa의 측쇄 도메인으로 이루어짐)[Colman and Schmaier, (1997) "Contact System: A Vascular Biology Modulator With Anticoagulant, Profibrinolytic, Antiadhesive, and Proinflammatory Attributes", Blood, 90, 3819-3843].

[0154] 인간, 마우스 및 랫트 프리칼리크레인 아미노산 서열, 및 이를 코딩하는 mRNA 서열은 하기 예시되어 있다. 활성 혈장 칼리크레인(pk1)이 2개의 사슬을 생성하기 위해 단일 위치에서 절단된("/")로 표시) 단일 폴리펩타이드 사슬을 가진다는 것을 제외하고는, 프리칼리크레인의 서열은 혈장 칼리크레인과 동일하다. 하기 제공된 서열은 신호 서열을 포함하는 완전 서열이다. 발현 세포로부터 분비되면, 신호 서열이 제거되는 것으로 예상된다.

- [0155] 다양한 종으로부터의 예시적인 혈장 칼리크레인 단백질은 수탁 번호 NP_000883.2(인간 pKa1 단백질), NM_000892(인간 pKa1 mRNA), NP_032481.1(마우스 pKa1 단백질), NM_008455.2(마우스 pKa1 mRNA), NP_036857.2(랫트 pKa1 단백질) 및 NM_012725(랫트 pKa1 mRNA) 하에 진뱅크에서 발견될 수 있다.
- [0156] (B) 칼리크레인 저해제
- [0157] **쿠니츠 도메인 저해제.** 조직 및/또는 혈장 칼리크레인인 칼리크레인의 다수의 유용한 단백질 저해제는 쿠니츠 도메인을 포함한다. 예시적인 쿠니츠 도메인 저해제는 미국 특허 출원 공보 US20100183625(본 명세서에 참조문헌으로 포함됨)에 기재되어 있다.
- [0158] 본 명세서에 사용된 바대로, "쿠니츠 도메인"은 적어도 51개의 아미노산을 갖고 적어도 2개 및 바람직하게는 3개의 이황화를 포함하는 폴리펩타이드 도메인이다. 이 도메인은 폴딩되어 제1 시스테인과 제6 시스테인, 제2 시스테인과 제4 시스테인 및 제3 시스테인과 제5 시스테인은 이황화 결합을 형성하거나(예를 들어, 58개의 아미노산을 갖는 쿠니츠 도메인에서, 시스테인은 하기 제공된 BPTI 상동성 서열의 수에 따라 5번, 14번, 30번, 38번, 51번 및 55번 아미노산에 상응하는 위치에 존재할 수 있고, 이황화는 5번과 55번, 14번과 38번 및 30번과 51번 위치의 시스테인 사이에 형성될 수 있음), 2개의 이황화가 존재하는 경우, 이들은 이의 시스테인의 상응하는 하위세트 사이에 형성될 수 있다. 각자의 시스테인 사이의 간격은 하기 제공된 BPTI 서열의 넘버링에 따라 5번 내지 55번, 14번 내지 38번 및 30번 내지 51번에 상응하는 위치 사이의 상기 간격의 7개, 5개, 4개, 3개, 2개, 1개 또는 0개의 아미노산 내에 있을 수 있다. BPTI 서열은 임의의 제너릭 쿠니츠 도메인에서 특정 위치를 언급하도록 기준으로서 사용될 수 있다. 정렬된 시스테인의 수가 최대화되는 베스트 피트 정렬(best fit alignment)을 확인함으로써 관심 있는 쿠니츠 도메인과 BPTI의 비교를 수행할 수 있다.
- [0159] BPTI의 쿠니츠 도메인의 (높은 해상도의) 3D 구조가 공지되어 있다. X선 구조 중 하나는 "6PTI"로서 브룩하벤(Brookhaven) 단백질 데이터 은행에 수탁되어 있다. 몇몇 BPTI 동족체의 3D 구조(Eigenbrot *et al.*, (1990) Protein Engineering, 3(7):591-598; Hynes *et al.*, (1990) Biochemistry, 29:10018-10022)가 공지되어 있다. 적어도 81개의 쿠니츠 도메인 서열이 공지되어 있다. 공지된 인간 동족체는 조직 인자 경로 저해제(tissue factor pathway inhibitor: TFPI)로서 또한 공지된 LACI의 3개의 쿠니츠 도메인(Wun *et al.*, (1988) J. Biol. Chem. 263(13):6001-6004; Girard *et al.*, (1989) Nature, 338:518-20; Novotny *et al.*, (1989) J. Biol. Chem., 264(31):18832-18837), α -트립신 간 저해제의 2개의 쿠니츠 도메인, APP-I(Kido *et al.*, (1988) J. Biol. Chem., 263(34):18104-18107), 콜라겐으로부터의 쿠니츠 도메인, TFPI-2의 3개의 쿠니츠 도메인(Sprecher *et al.*, (1994) PNAS USA, 91:3353-3357), 간세포 성장 인자 활성화 저해제 1형의 쿠니츠 도메인, 간세포 성장 인자 활성화 저해제 2형의 쿠니츠 도메인, 미국 특허 공보 제2004-0152633호에 기재된 쿠니츠 도메인을 포함한다. LACI는 3개의 쿠니츠 도메인을 함유하는 분자량이 39kDa인 인간 혈청 포스포글라이코단백질이다.
- [0160] 상기 쿠니츠 도메인은 LACI-K1(50번 내지 107번 잔기), LACI-K2(121번 내지 178번 잔기) 및 LACI-K3(213번 내지 270번 잔기)이라 칭해진다. LACI의 cDNA 서열은 문헌[Wun *et al.* (J. Biol. Chem., 1988, 263(13):6001-6004)]에 보고되어 있다. 문헌[Girard *et al.* (Nature, 1989, 338:518-20)]은 3개의 쿠니츠 도메인의 각각의 P1 잔기가 변경된 돌연변이 연구를 보고하였다. VIIa 인자(F.VIIa)가 조직 인자와 복합체화될 때 LACI-K1은 F.VIIa를 저해하고, LACI-K2는 Xa 인자를 저해한다.

[0161] 예시적인 쿠니츠 도메인을 함유하는 단백질은 하기를 포함하고, SWISS-PROT 수탁 번호는 괄호 내에 있다:

A4_HUMAN (P05067), A4_MACFA (P53601), A4_MACMU (P29216),
A4_MOUSE (P12023), A4_RAT (P08592), A4_SAISC (Q95241),
AMBP_PLEPL (P36992), APP2_HUMAN (Q06481), APP2_RAT (P15943),
AXP1_ANTAF (P81547), AXP2_ANTAF (P81548), BPT1_BOVIN (P00974),
BPT2_BOVIN (P04815), CA17_HUMAN (Q02388), CA36_CHICK (P15989),
CA36_HUMAN (P12111), CRPT_BOOMI (P81162), ELAC_MACEU (O62845),
ELAC_TRIVU (Q29143), EPPI_HUMAN (O95925), EPPI_MOUSE (Q9DA01),
HTIB_MANSE (P26227), IBP_CARCR (P00993), IBPC_BOVIN (P00976),
IBPI_TACTR (P16044), IBPS_BOVIN (P00975), ICS3_BOMMO (P07481),
IMAP_DROFU (P11424), IP52_ANESU (P10280), ISC1_BOMMO (P10831),
ISC2_BOMMO (P10832), ISH1_STOHE (P31713), ISH2_STOHE (P81129),
ISIK_HELPO (P00994), ISP2_GALME (P81906), IVB1_BUNFA (P25660),
IVB1_BUNMU (P00987), IVB1_VIPAA (P00991), IVB2_BUNMU (P00989),
IVB2_DABRU (P00990), IVB2_HEMHA (P00985), IVB2_NAJNI (P00986),
IVB3_VIPAA (P00992), IVBB_DENPO (P00983), IVBC_NAJNA (P19859),
IVBC_OPHHA (P82966), IVBE_DENPO (P00984), IVBI_DENAN (P00980),
IVBI_DENPO (P00979), IVBK_DENAN (P00982), IVBK_DENPO (P00981),
IVBT_ERIMA (P24541), IVBT_NAJNA (P20229), MCPI_MELCP (P82968),
SBPI_SARBU (P26228), SPT3_HUMAN (P49223), TKD1_BOVIN (Q28201),
TKD1_SHEEP (Q29428), TXCA_DENAN (P81658), UPTI_PIG (Q29100),
AMBP_BOVIN (P00978), AMBP_HUMAN (P02760), AMBP_MERUN (Q62577),
AMBP_MESAU (Q60559), AMBP_MOUSE (Q07456), AMBP_PIG (P04366),
AMBP_RAT (Q64240), IATR_HORSE (P04365), IATR_SHEEP (P13371),
SPT1_HUMAN (O43278), SPT1_MOUSE (Q9R097), SPT2_HUMAN (O43291),
SPT2_MOUSE (Q9WU03), TFP2_HUMAN (P48307), TFP2_MOUSE (O35536),
TFPI_HUMAN (P10646), TFPI_MACMU (Q28864), TFPI_MOUSE (O54819),
TFPI_RABIT (P19761), TFPI_RAT (Q02445), YN81_CAEEL (Q03610)

[0162]

[0163] 서열 데이터베이스로부터 쿠니츠 도메인을 확인하기 위해 다양한 방법을 이용할 수 있다. 예를 들어, 쿠니츠 도메인, 공통 서열 또는 모티프(예를 들어, 프로사이트(ProSite) 모티프)의 공지된 아미노산 서열이 예를 들어 BLAST를 사용한 젠뱅크(GenBank) 서열 데이터베이스(국립 바이오기술 정보 기관(National Center for Biotechnology Information), 국립 보건원(National Institutes of Health), 메사추세츠주 베데스다); 예를 들어 Pfam 조사에 대한 디폴트 매개변수를 사용한 HMM(히든 마코브(Hidden Markov) 모델)의 Pfam 데이터베이스; SMART 데이터베이스; 또는 ProDom 데이터베이스에 대해 조사될 수 있다. 예를 들어, Pfam 방출 9의 Pfam 수탁 번호 PF00014는 수많은 쿠니츠 도메인 및 쿠니츠 도메인을 확인하기 위한 HMM을 제공한다. Pfam 데이터베이스의 설명은 문헌[Sonhammer *et al.* (1997) *Proteins* 28(3):405-420]에서 확인될 수 있고, HMM의 자세한 설명은 예를 들어 문헌[Gribskov *et al.* (1990) *Meth. Enzymol.* 183:146-159; Gribskov *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4355-4358; Krogh *et al.* (1994) *J. Mol. Biol.* 235:1501-1531; 및 Stultz *et al.* (1993) *Protein Sci.* 2:305-314]에서 확인될 수 있다. HMM의 SMART 데이터베이스(Simple Modular Architecture Research Tool, EMBL, 독일 하이델베르크)는 문헌[Schultz *et al.* (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5857 및 Schultz *et al.* (2000) *Nucl. Acids Res* 28:231]에 기재되어 있다. SMART 데이터베이스는 HMMer2 조사 프로그램의 히든 마코브 모델에 의한 프로파일링에 의해 확인된 도메인을 함유한다(R. Durbin *et al.* (1998) *Biological sequence analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids*. Cambridge University Press). 데이터베이스는 또한 설명되고 모니터링된다. ProDom 단백질 도메인 데이터베이스는 상동성 도메인의 자동 편집으로 이루어진다(Corpet *et al.* (1999), *Nucl. Acids Res.* 27:263-267). 현재의 ProDom 버전은 SWISS-PROT 38 및 TREMBL 단백질 데이터베이스의 귀납적 PSI-BLAST 조사를 이용하여 축조되었다(Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; Gouzy *et al.* (1999) *Computers and Chemistry* 23:333-340.). 데이터베이스는 각각의 도메인에 대한 공통 서열을 자동으로 생성한다. 프로사이트는 모티프로써 쿠니츠 도메인을 목록화하고 쿠니츠 도메인을 함유하는 단백질을 확인한다. 예를 들어, 문헌[Falquet *et al.* *Nucleic Acids Res.* 30:235-238(2002)]을 참조한다.

[0164]

쿠니츠 도메인은 2개의 루프 구역("결합 루프")에서 아미노산을 주로 사용하여 표적 프로테아제와 상호작용한다. 제1 루프 구역은 BPTI의 13번 내지 20번 아미노산에 상응하는 잔기 사이에 있다. 제2 루프 구역은 BPTI의 31번 내지 39번 아미노산에 상응하는 잔기 사이에 있다. 쿠니츠 도메인의 예시적인 라이브러리는 제1 및/또는 제2 루프 구역에서 하나 이상의 아미노산 위치가 변한다. 칼리크레인과 상호작용하는 쿠니츠 도메인을 스크리닝할 때 또는 개선된 친화도 변이체를 선택할 때, 특히 변하기 유용한 위치는 BPTI의 서열과 관련하여 13

번, 15번, 16번, 17번, 18번, 19번, 31번, 32번, 34번 및 39번 위치를 포함한다. 이들 위치 중 적어도 몇몇은 표적 프로테아제와 가깝게 접촉하는 것으로 예상된다. 다른 위치, 예를 들어 3차원 구조에서 상기 언급된 위치에 인접한 위치를 변화시키는 것이 또한 유용하다.

- [0165] 쿠니츠 도메인의 "프레임워크 구역"은 쿠니츠 도메인의 일부인 잔기로서 규정되지만, 구체적으로 제1 및 제2 결합 루프 구역에서의 잔기, 즉 BPTI의 13번 내지 20번 아미노산 및 BPTI의 31번 내지 39번 아미노산에 상응하는 잔기를 배제한다. 반대로, 결합 루프에 있지 않은 잔기는 더 넓은 범위의 아미노산 치환(예를 들어, 보존적 및/또는 비보존적 치환)을 용인할 수 있다.
- [0166] 일 실시형태에서, 이 쿠니츠 도메인은 인간 리포단백질 관련 응고 저해제(lipoprotein-associated coagulation inhibitor: LACI) 단백질의 쿠니츠 도메인 1을 포함하는 루프로 된 구조의 변이체 형태이다. LACI는 패러다임 쿠니츠 도메인인, 3개의 내부의, 잘 한정된, 펩타이드 루프 구조를 함유한다(Girard, T. et al., 1989. Nature, 338:518-520). 본 명세서에 기재된 LACI의 쿠니츠 도메인 1의 변이체가 스크리닝되고 단리되고, 증가한 친화도 및 특이성으로 칼리크레인에 결합한다(예를 들어, 미국 특허 제5,795,865호 및 제6,057,287호 참조). 이 방법은 또한 칼리크레인, 예를 들어 혈장 칼리크레인과 상호작용하는 다른 쿠니츠 도메인을 얻기 위해 다른 쿠니츠 도메인 프레임워크에 적용될 수 있다. 칼리크레인 기능의 유용한 조절자는 통상적으로, 칼리크레인 결합 및 저해 검정을 이용하여 결정된 것처럼, 칼리크레인에 결합하고/하거나 이를 저해한다.
- [0167] 혈장 칼리크레인을 저해하는 쿠니츠 도메인을 포함하는 예시적인 폴리펩타이드는 서열 번호 2의 3 내지 60번 아미노산에 의해 한정된 아미노산 서열을 가지거나 포함한다. 혈장 칼리크레인을 저해하는 쿠니츠 도메인을 포함하는 또 다른 예시적인 폴리펩타이드는 서열 번호 2의 아미노산 서열을 가지거나 포함한다.
- [0168] 예시적인 폴리펩타이드는 아미노산 서열을 포함한다:
- [0169] Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys Xaa56 Xaa57 Xaa58(서열 번호 1).
- [0170] "Xaa"는 상이한 아미노산의 임의의 수일 수 있는 펩타이드 사슬에서의 위치를 의미한다. 제1 예에서, Xaa는 시스테인을 제외한 임의의 아미노산일 수 있다. 또 다른 예에서, 하기 중 하나 이상이 적용된다: Xaa10은 Asp 또는 Glu일 수 있고; Xaa11은 Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala 또는 Thr일 수 있고; Xaa13은 Pro, Arg, His, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys 또는 Gln일 수 있고; Xaa15는 Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn 또는 Gln일 수 있고; Xaa16은 Ala, Gly, Ser, Asp 또는 Asn일 수 있고; Xaa17은 Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln 또는 Thr일 수 있고; Xaa18은 His, Leu, Gln 또는 Ala일 수 있고; Xaa19는 Pro, Gln, Leu, Asn 또는 Ile일 수 있고; Xaa21은 Trp, Phe, Tyr, His 또는 Ile일 수 있고; Xaa31은 Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile 또는 Thr일 수 있고; Xaa32는 Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly 또는 Val일 수 있고; Xaa34는 Ile, Thr, Ser, Val, Ala, Asn, Gly 또는 Leu일 수 있고; Xaa35는 Tyr, Trp 또는 Phe일 수 있고; Xaa39는 Glu, Gly, Ala, Ser 또는 Asp일 수 있다. 아미노산 Xaa6, Xaa7, Xaa8, Xaa9, Xaa20, Xaa24, Xaa25, Xaa26, Xaa27, Xaa28, Xaa29, Xaa41, Xaa42, Xaa44, Xaa46, Xaa47, Xaa48, Xaa49, Xaa50, Xaa52, Xaa53 및 Xaa54는 임의의 아미노산일 수 있다.
- [0171] 부가적으로, 서열 번호 1의 아미노산의 처음의 4개(Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4) 및 마지막 3개(Xaa56, Xaa57 또는 Xaa58)의 각각은 임의로 존재하거나 부재할 수 있고, 임의의 아미노산, 존재하는 경우, 예를 들어 임의의 비시스테인 아미노산일 수 있다.
- [0172] 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 하기 특성 중 하나 이상을 가지는 서열을 가진다: Xaa11은 Asp, Gly, Ser 또는 Val일 수 있고; Xaa13은 Pro, Arg, His 또는 Asn일 수 있고; Xaa15는 Arg 또는 Lys일 수 있고; Xaa16은 Ala 또는 Gly일 수 있고; Xaa17은 Ala, Asn, Ser 또는 Ile일 수 있고; Xaa18은 His, Leu 또는 Gln일 수 있고; Xaa19는 Pro, Gln 또는 Leu일 수 있고; Xaa21은 Trp 또는 Phe일 수 있고; Xaa31은 Glu이고; Xaa32는 Glu 또는 Gln일 수 있고; Xaa34는 Ile, Thr 또는 Ser일 수 있고; Xaa35는 Tyr이고; Xaa39는 Glu, Gly 또는 Ala일 수 있다.
- [0173] 예시적인 폴리펩타이드는 하기 아미노산을 포함할 수 있다: Xaa10은 Asp이고; Xaa11은 Asp이고; Xaa13은 Pro 또는 Arg일 수 있고; Xaa15는 Arg이고; Xaa16은 Ala 또는 Gly일 수 있고; Xaa17은 Ala이고; Xaa18은 His이고; Xaa19는 Pro이고; Xaa21은 Trp이고; Xaa31은 Glu이고; Xaa32는 Glu이고; Xaa34는 Ile 또는 Ser일 수 있고;

Xaa35는 Tyr이고; Xaa39는 Gly이다.

- [0174] 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드의 부분을 또한 사용할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩타이드는 특이적 칼리크레인 에피토프에 대한 결합 도메인을 포함한다. 예를 들어, 쿠니츠 도메인의 결합 루프는 고리화되고 단리 시 사용될 수 있거나, 또 다른 도메인, 예를 들어 또 다른 쿠니츠 도메인의 프레임워크에 그래프팅될 수 있다. 본 명세서에 기재된 아미노산 서열의 N 말단으로부터 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 및/또는 본 명세서에 기재된 아미노산 서열의 C 말단으로부터 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산을 또한 제거할 수 있다.
- [0175] 서열의 부가적인 예는 본 명세서에 기재된 아미노산 서열, 예를 들어 상기 제공된 아미노산 서열에 대해 적어도 1개의 아미노산, 그러나 7개 미만, 6개, 5개, 4개, 3개 또는 2개의 아미노산 차이로 다른 것을 포함한다. 일 실시형태에서, 3개 미만, 2개 또는 1개의 차이는 결합 루프 중 하나에 있다. 예를 들어, 제1 결합 루프는 본 명세서에 기재된 아미노산 서열, 예를 들어 상기 제공된 아미노산 서열에 비해 차이를 가지지 않을 수 있다. 또 다른 예에서, 제1 결합 루프도 제2 결합 루프도 본 명세서에 기재된 아미노산 서열, 예를 들어 상기 제공된 아미노산과 다르지 않다.
- [0176] 혈장 칼리크레인을 저해하는 훨씬 다른 폴리펩타이드는 서열 번호 2의 3 내지 60번 아미노산의 약 58개의 아미노산 서열 또는 서열 번호 2의 60개의 아미노산 서열을 가지는 PEP-1 폴리펩타이드를 포함한다. 본 명세서에 사용된 바대로 용어 "PEP-1" 및 "DX-88"은 둘 다 서열 번호 2의 60개의 아미노산 서열을 의미한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 아프로티닌이 아니고, 예를 들어 아프로티닌으로부터 적어도 1개, 2개, 3개, 5개, 10개 또는 15개의 아미노산이 다르다.
- [0177] 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드는 임의의 표준 폴리펩타이드 합성 프로토콜 및 설비를 사용하여 합성으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩타이드의 단계식 합성은 초기(즉, 카복시 말단) 아미노산으로부터의 아미노(N) 말단 보호기의 제거, 및 폴리펩타이드의 서열에서 다음의 아미노산의 카복실 말단의 이에 대한 커플링에 의해 수행될 수 있다. 이 아미노산은 또한 적합하게 보호된다. 유입 아미노산의 카복실기는 반응성 기로의 형성, 예컨대 카보다이드미드, 대칭 산 언하이드라이드, 또는 "활성 에스터" 기, 예컨대 하이드록시벤조트라이아졸 또는 펜타플루오로페닐 에스터로의 형성에 의해 결합 아미노산의 N 말단과 반응하도록 활성화될 수 있다. 바람직한 고상 펩타이드 합성 방법은 I-아미노 보호기로서 tert-부틸옥시카보닐을 사용하는 BOC 방법, 및 아미노산 잔기의 알파-아미노를 보호하는 9-플루오레닐메톡시카보닐을 사용하는 FMOC 방법을 포함한다. 방법 둘 다는 당해 분야의 당업자에게 널리 공지되어 있다(Stewart, J. and Young, J., Solid-Phase Peptide Synthesis (W. H. Freeman Co., San Francisco 1989); Merrifield, J., 1963. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154; Bodanszky, M. and Bodanszky, A., The Practice of Peptide Synthesis (Springer-Verlag, New York 1984)). 원하는 경우, 부가적인 아미노 및/또는 카복시 말단 아미노산은 아미노산 서열로 설계되고 폴리펩타이드 합성 동안 첨가될 수 있다.
- [0178] 폴리펩타이드는 재조합 기술을 이용하여 또한 제조될 수 있다. 재조합 방법은 박테리아 발현 벡터, 효모 발현 벡터, 바쿠로바이러스 발현 벡터, 포유동물 바이러스 발현 벡터 등(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 임의의 다수의 세포 및 상응하는 발현 벡터를 사용할 수 있다. 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드는 형질전환 동물에 의해, 예를 들어 형질전환 동물의 유선에서 제조될 수 있다. 몇몇 경우에, 숙주 세포에서 용이하게 발현되는 융합 폴리펩타이드를 형성하기 위해 발현 벡터에서 칼리크레인을 저해하는 폴리펩타이드(예를 들어, 쿠니츠 도메인을 포함하는 폴리펩타이드)에 대한 코딩 서열을 또 다른 코딩 서열에 융합하는 것이 필요하거나 유리할 수 있다. 부가적인 서열의 일부 또는 전부를 예를 들어 프로테아제 분해에 의해 제거할 수 있다.
- [0179] 칼리크레인을 저해하는 폴리펩타이드(예를 들어, 쿠니츠 도메인을 포함하는 폴리펩타이드)를 제조하기 위한 예시적인 재조합 발현 시스템은 효모 발현 벡터이고, 이것은, 저해제 폴리펩타이드에 대해 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열이, 동일한 리딩 프레임에서 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*)의 MAT α 프리프로 리더 펩타이드 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 연결되게 하여서, 결국 작동 가능한 효모 프로모터의 제어 하에 있다. 생성된 재조합 효모 발현 플라스미드는 표준 방법에 의해 적절한 맞는 효모 숙주의 세포로 형질전환될 수 있고, 이 세포는 재조합 효모 발현 벡터로부터 재조합 단백질을 발현할 수 있다. 바람직하게는, 이러한 재조합 발현 벡터에 의해 형질전환된 숙주 효모 세포는 활성 저해제 폴리펩타이드를 제공하기 위해 융합 단백질을 또한 프로세싱할 수 있다. 재조합 폴리펩타이드를 제조하기 위한 다른 예시적인 효모 숙주는 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)이다.
- [0180] 상기 기재된 바대로, 칼리크레인을 저해하는 폴리펩타이드는 본 명세서에 기재된 쿠니츠 도메인 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 몇몇 폴리펩타이드는 아미노 및/또는 카복시 말단 말단에서 바람직하게는 1개 내지 6개의 아미

노산 길이의 부가적인 플랭킹 서열을 포함할 수 있되, 단 이러한 부가적인 아미노산은 칼리크레인 결합 친화도 또는 칼리크레인 저해 활성을 유의적으로 감소시키지 않아서, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물에서의 사용을 배제한다. 이러한 부가적인 아미노산은 특정한 재조합 숙주 세포에서 폴리펩타이드를 발현하도록 의도적으로 첨가될 수 있거나, 부가적인 기능을 제공하도록 첨가될 수 있어서, 예를 들어 또 다른 분자에 대한 링커를 제공하거나, 폴리펩타이드의 정제를 수월하게 하는 친화도 모이어티를 제공한다. 바람직하게는, 부가적인 아미노산(들)은 시스테인을 포함하지 않고, 이 시스테인은 쿠니츠 도메인의 다이설파이드 결합과 상호작용할 수 있다.

[0181] 예시적인 쿠니츠 도메인 폴리펩타이드는 서열 번호 2의 3 내지 60번 잔기의 아미노산 서열을 포함한다. 효모 융합 단백질 발현 시스템(예를 들어, 통합 발현 플라스미드 pHIL-D2에 기초함)에서 발현되고 프로세싱될 때, 이러한 쿠니츠 도메인 폴리펩타이드는 에스. 세레비시아에의 MAT알파-프레프 리더 펩타이드 서열과의 융합으로부터 부가적인 아미노 말단 Glu-Ala 다이펩타이드를 보유한다. 효모 숙주 세포로부터 분비될 때, 대부분의 리더 펩타이드는 융합 단백질로부터 프로세싱되어, 서열 번호 2의 아미노산 서열을 가지는 기능적 폴리펩타이드(본 명세서에서 "PEP-1"이라 칭함)를 생성한다.

[0182] 예를 들어, 서열 번호 1을 포함하는 통상적인 쿠니츠 도메인은 다수의 불변 위치를 함유하고, 예를 들어 BPTI 넘버링 계획에서 5번, 14번, 30번, 33번, 38번, 45번, 51번 및 55번 위치에 상응하는 위치는 시스테인이다. 이들 위치 사이의 공간은 쿠니츠 도메인 폴드 내에 허용 가능한 정도로 변할 수 있어서, 예를 들어 3개의 다이설파이드 결합이 형성된다. 예를 들어, 6번, 7번, 8번, 9번, 20번, 24번, 25번, 26번, 27번, 28번, 29번, 41번, 42번, 44번, 46번, 47번, 48번, 49번, 50번, 52번, 53번 및 54번 위치와 같은 다른 위치, 또는 이들 위치에 상응하는 위치는 임의의 아미노산(비유전적으로 코딩된 발생 아미노산을 포함)일 수 있다. 특별히 바람직한 실시형태에서, 하나 이상의 아미노산은 네이티브 서열의 것에 상응한다. 또 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 가변 위치는 네이티브 서열의 것과 다르다. 훨씬 또 다른 바람직한 실시형태에서, 아미노산은 각각 개별적으로 또는 총체적으로 보존적 또는 비보존적 아미노산 치환에 의해 치환될 수 있다.

[0183] 보존적 아미노산 치환은 유사한 화학 성질의 또 다른 아미노산에 의해 아미노산을 대체하고, 단백질 기능에 영향을 가지지 않을 수 있다. 비보존적 아미노산 치환은 비유사 화학 구조의 또 다른 아미노산에 의해 아미노산을 대체한다. 보존된 아미노산 치환의 예는 예를 들어 Asn→Gln, Arg→Lys 및 Ser→Thr을 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 이들 아미노산 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개 및/또는 21개는 서열 번호 2의 상응하는 위치에 상응하도록 개별적으로 또는 임의의 조합으로 총체적으로 선택될 수 있다.

[0184] 10번, 11번, 13번, 15번, 16번, 17번, 18번, 19번, 21번, 22번, 23번, 31번, 32번, 34번, 35번, 39번, 40번, 43번 및 45번 위치와 같은 다른 위치, 또는 이들 위치에 상응하는 위치는 아미노산의 임의의 선택된 세트일 수 있다. 예를 들어, 서열 번호 1은 가능한 서열의 세트를 한정한다. 이 세트의 각각의 구성원은 예를 들어 5번, 14번, 30번, 51번 및 55번 위치에서의 시스테인, 및 10번, 11번, 13번, 15번, 16번, 17번, 18번, 19번, 21번, 22번, 23번, 31번, 32번, 34번, 35번, 39번, 40번, 43번 및 45번 위치, 또는 이들 위치에 상응하는 위치에서의 특정한 세트의 아미노산 중 임의의 하나를 함유한다. 바람직한 실시형태에서, 이들 아미노산 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개 및/또는 19개는 서열 번호 2의 상응하는 위치에 상응하도록 개별적으로 또는 임의의 조합으로 총체적으로 선택될 수 있다. 폴리펩타이드는 바람직하게는 서열 번호 2와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 가진다.

[0185] 서열의 비교 및 2개의 서열 사이의 상동성 백분율의 결정은 수학 알고리즘을 이용하여 달성될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 2개의 아미노산 서열 사이의 상동성 백분율은 문헌[Needleman and Wunsch (1970), J. Mol. Biol. 48:444-453]을 이용하여 결정되고, 이의 알고리즘은 블러섬(Blossum) 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 갭 중량 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 중량을 사용하여 GCG 소프트웨어 패키지에서 GAP 프로그램으로 통합된다. 훨씬 또 다른 바람직한 실시형태에서, 2개의 뉴클레오타이드 서열 사이의 상동성 백분율은 NWSgapdna.CMP 매트릭스 및 40, 50, 60, 70 또는 80의 갭 중량 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 중량을 사용하여 GCG 소프트웨어 패키지에서 GAP 프로그램을 사용하여 결정된다. 매개변수(및 분자가 상동성 한계 내에 있는지를 결정하기 위해 어떠한 매개변수가 적용되어야 하는지에 대해 실행자가 확신하지 못하는 경우 사용되어야 하는 것)의 특히 바람직한 세트는 12의 갭 패널티(gap penalty), 4의 갭 연장 패널티(gap extend penalty) 및 5의 프레임시프트 갭 패널티(frameshift gap penalty)를 갖는 블러섬 62 스코어링 매트릭스이다.

- [0186] **결합 단백질 저해제**. 다른 실시형태에서, 칼리크레인의 저해제는 결합 단백질, 예컨대 항체이다. 예시적인 결합 단백질, 예컨대 항체는 예를 들어 PCT 공보 W02012/094587 및 미국 특허 출원 공보 US 제20100183625호(이들 둘 다 본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 포함됨)에 기재되어 있다.
- [0187] 일 양상에서, 본 개시내용은 혈장 칼리크레인(예를 들어, 인간 혈장 칼리크레인)에 결합하고, 적어도 하나의 면역글로불린 가변 구역을 포함하는 단백질(예를 들어, 단리된 단백질)을 특징으로 한다. 예를 들어, 단백질은 중쇄(HC) 면역글로불린 가변 도메인 서열 및/또는 경쇄(LC) 면역글로불린 가변 도메인 서열을 포함한다. 단백질은 혈장 칼리크레인, 예를 들어 인간 혈장 칼리크레인에 결합하고 이를 저해할 수 있다.
- [0188] 단백질은 하기 특징 중 하나 이상을 포함할 수 있다: (a) 인간 CDR 또는 인간 프레임워크 구역; (b) HC 면역글로불린 가변 도메인 서열은 본 명세서에 기재된 HC 가변 도메인의 CDR과 적어도 85%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 1개 이상(예를 들어, 1개, 2개 또는 3개)의 CDR을 포함하는 특징; (c) LC 면역글로불린 가변 도메인 서열이 본 명세서에 기재된 LC 가변 도메인의 CDR과 적어도 85%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 1개 이상(예를 들어, 1개, 2개 또는 3개)의 CDR을 포함하는 특징; (d) LC 면역글로불린 가변 도메인 서열이 본 명세서에 기재된 LC 가변 도메인(예를 들어, 전체 또는 프레임워크 구역 또는 CDR에서)과 적어도 85%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 특징; (e) HC 면역글로불린 가변 도메인 서열이 본 명세서에 기재된 HC 가변 도메인(예를 들어, 전체 또는 프레임워크 구역 또는 CDR에서)과 적어도 85%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 특징; (f) 단백질이 본 명세서에 기재된 단백질의 의해 결합된 에피토프에 결합하거나, 본 명세서에 기재된 단백질에 의한 결합에 경쟁하는 특징; (g) 영장류 CDR 또는 영장류 프레임워크 구역; (h) HC 면역글로불린 가변 도메인 서열이 본 명세서에 기재된 HC 가변 도메인의 CDR1과 적어도 1개의 아미노산, 그러나 2개 또는 3개 이하의 아미노산이 다른 CDR1을 포함하는 특징; (i) HC 면역글로불린 가변 도메인 서열이 본 명세서에 기재된 HC 가변 도메인의 CDR2와 적어도 1개의 아미노산, 그러나 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개 이하의 아미노산이 다른 CDR2를 포함하는 특징; (j) HC 면역글로불린 가변 도메인 서열이 본 명세서에 기재된 HC 가변 도메인의 CDR3과 적어도 1개의 아미노산, 그러나 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개 이하의 아미노산이 다른 CDR3을 포함하는 특징; (k) LC 면역글로불린 가변 도메인 서열이 본 명세서에 기재된 LC 가변 도메인의 CDR1과 적어도 1개의 아미노산, 그러나 2개, 3개, 4개 또는 5개 이하의 아미노산이 다른 CDR1을 포함하는 특징; (l) LC 면역글로불린 가변 도메인 서열이 본 명세서에 기재된 LC 가변 도메인의 CDR2와 적어도 1개의 아미노산, 그러나 2개, 3개 또는 4개 이하의 아미노산이 다른 CDR2를 포함하는 특징; (m) LC 면역글로불린 가변 도메인 서열이 본 명세서에 기재된 LC 가변 도메인의 CDR3과 적어도 1개의 아미노산, 그러나 2개, 3개, 4개 또는 5개 이하의 아미노산이 다른 CDR3을 포함하는 특징; (n) LC 면역글로불린 가변 도메인 서열이 본 명세서에 기재된 LC 가변 도메인(예를 들어, 전체 또는 프레임워크 구역 또는 CDR에서)과 적어도 1개의 아미노산, 그러나 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이하의 아미노산이 다른 특징; 및 (o) HC 면역글로불린 가변 도메인 서열이 본 명세서에 기재된 HC 가변 도메인(예를 들어, 전체 또는 프레임워크 구역 또는 CDR에서)과 적어도 1개의 아미노산, 그러나 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이하의 아미노산이 다른 특징.
- [0189] 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 단리된 단백질(예를 들어, 다른 단백질이 적어도 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 없음)일 수 있다. 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 혈장 칼리크레인, 예를 들어 인간 혈장 칼리크레인을 저해할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 프리칼리크레인(예를 들어, 인간 프리칼리크레인)에 결합하지 않지만, 혈장 칼리크레인(예를 들어, 인간 혈장 칼리크레인)의 활성 형태에 결합한다.
- [0190] 소정의 실시형태에서, 단백질은 혈장 칼리크레인의 촉매 도메인, 또는 이의 단편의 활성 부위에서 또는 이의 근처에서 결합하거나, 혈장 칼리크레인의 활성 부위와 중첩되는 에피토프에 결합한다. 몇몇 양상에서, 단백질은 동일한 에피토프에 결합하거나, 본 명세서에 기재된 단백질과 결합에 대해 경쟁한다.
- [0191] 몇몇 실시형태에서, 단백질은 M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01(또한 본 명세서에서 DX-2922라 칭함), X81-B01, X67-D03, X67-G04, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X124-G01(또한 본 명세서에서 DX-2930이라 칭함), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 및 M35-G04와 동일한 에피토프와 경쟁하거나 이들에 결합한다. 예를 들어, PCT 공보 W02012/094587 및 미국 특허 출원 공보 US 제20100183625호를 참조한다.
- [0192] 몇몇 실시형태에서, 단백질은 His434, Asp483 및/또는 Ser578(인간 서열에 기초하여 numbering)의 혈장 칼리크레인의 촉매 트라이어드를 형성하는 하나 이상의 아미노산에 결합한다.

- [0193] 몇몇 실시형태에서, 단백질은 Ser479, Tyr563 및/또는 Asp585(인간 서열에 기초하여 넘버링)의 하나 이상의 아미노산에 결합한다.
- [0194] 단백질은 적어도 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} 및 10^{11}M^{-1} 의 결합 친화도로 혈장 칼리크레인, 예를 들어 인간 혈장 칼리크레인에 결합할 수 있다. 일 실시형태에서, 단백질은 1×10^{-3} , $5 \times 10^{-4} \text{초}^{-1}$, 또는 $1 \times 10^{-4} \text{초}^{-1}$ 보다 느린 K_{off} 로 인간 혈장 칼리크레인에 결합한다. 일 실시형태에서, 단백질은 1×10^2 , 1×10^3 , 또는 $5 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{초}^{-1}$ 보다 빠른 K_{on} 으로 인간 혈장 칼리크레인에 결합한다. 일 실시형태에서, 단백질은 혈장 칼리크레인에 결합하지만, 조직 칼리크레인 및/또는 혈장 프리칼리크레인에 결합하지 않는다(예를 들어, 단백질은 혈장 칼리크레인에 결합하는 것보다 조직 칼리크레인 및/또는 혈장 프리칼리크레인에 덜 효과적으로(예를 들어, 음성 대조군과 비교하여 예를 들어 5배, 10배, 50배, 100배 또는 1000배 덜 또는 전혀) 결합한다).
- [0195] 일 실시형태에서, 단백질은 예를 들어 10^{-5} 미만, 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} 및 10^{-10}M 의 K_i 로 인간 혈장 칼리크레인 활성을 저해한다. 단백질은 예를 들어 100nM 미만, 10nM 또는 1nM의 IC_{50} 을 가질 수 있다. 예를 들어, 단백질은 혈장 칼리크레인 활성, 및 XIIa 인자(예를 들어, XII 인자로부터의) 및/또는 브래디키닌(예를 들어, 고분자량 키니노겐(HMWK)으로부터의)의 제조를 조절할 수 있다. 단백질은 혈장 칼리크레인 활성 및/또는 XIIa 인자(예를 들어, XII 인자로부터의) 및/또는 브래디키닌(예를 들어, 고분자량 키니노겐(HMWK)으로부터의)의 제조를 저해할 수 있다. 인간 혈장 칼리크레인에 대한 단백질의 친화도는 100nM 미만, 10nM 미만 또는 1nM 미만의 K_D 를 특징으로 할 수 있다. 일 실시형태에서, 단백질은 혈장 칼리크레인을 저해하지만, 조직 칼리크레인을 저해하지 않는다(예를 들어, 단백질은 혈장 칼리크레인을 저해하는 것보다 조직 칼리크레인을 덜 효과적으로(예를 들어, 음성 대조군과 비교하여 예를 들어 5배, 10배, 50배, 100배 또는 1000배 덜 또는 전혀) 저해한다).
- [0196] 몇몇 실시형태에서, 단백질은 1000 미만, 500, 100 또는 10nM의 겔보기 저해 상수($K_{i, \text{app}}$)를 가진다.
- [0197] 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 항체일 수 있다. 혈장 칼리크레인 결합 항체는 단일 폴리펩타이드(예를 들어, scFv) 내에, 또는 상이한 폴리펩타이드(예를 들어, IgG 또는 Fab) 상에 포함된 이의 HC 및 LC 가변 도메인 서열을 가질 수 있다.
- [0198] 바람직한 실시형태에서, 단백질은 M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01(또한 본 명세서에서 DX-2922라 칭함), X81-B01, X67-D03, X67-G04, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X124-G01(또한 본 명세서에서 DX-2930이라 칭함), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 및 M35-G04로 이루어진 군으로부터 선택된 항체의 경쇄 및/또는 중쇄를 가지는 항체(예를 들어, 인간 항체)이다.
- [0199] 바람직한 실시형태에서, 단백질은 M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01(또한 본 명세서에서 DX-2922라 칭함), X81-B01, X67-D03, X67-G04, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X124-G01(또한 본 명세서에서 DX-2930이라 칭함), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 및 M35-G04로 이루어진 중쇄의 군의 상응하는 CDR로부터 선택된 1개 이상(예를 들어, 1개, 2개 또는 3개)의 중쇄 CDR을 가지는 항체(예를 들어, 인간 항체)이다.
- [0200] 바람직한 실시형태에서, 단백질은 M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01(또한 본 명세서에서 DX-2922라 칭함), X81-B01, X67-D03, X67-G04, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X124-G01(또한 본 명세서에서 DX-2930이라 칭함), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 및 M35-G04로 이루어진 경쇄의 군의 상응하는 CDR로부터 선택된 1개 이상(예를 들어, 1개, 2개 또는 3개)의 경쇄 CDR을 가지는 항체(예를 들어, 인간 항체)이다.
- [0201] 바람직한 실시형태에서, 단백질은 M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01(또한 본 명세서에서 DX-2922라 칭함), X81-B01, X67-D03, X67-G04, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X124-G01(또한 본 명세서에서 DX-2930이라 칭함), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 및 M35-G04로 이루어진 경쇄의 군의 상응하는 CDR로부터 선택된 1개 이상(예를 들어, 1개, 2개 또는 3개)의 경쇄 CDR 및 1개 이상(예를 들어, 1개, 2개 또는 3개)의 중쇄 CDR을 가지는 항체(예를 들어, 인간 항체)이다.
- [0202] 일 실시형태에서, HC 및 LC 가변 도메인 서열은 동일한 폴리펩타이드 사슬의 성분이다. 또 다른 실시형태에서,

HC 및 LC 가변 도메인 서열은 상이한 폴리펩타이드 사슬의 성분이다. 예를 들어, 단백질은 IgG, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4이다. 단백질은 가용성 Fab일 수 있다. 다른 실행에서, 단백질은 Fab2', scFv, 미니바디, scFv::Fc 융합, Fab::HSA 융합, HSA::Fab 융합, Fab::HSA::Fab 융합, 또는 본 명세서에서 결합 단백질 중 하나의 항원 조합 부위를 포함하는 다른 분자를 포함한다. 이 Fab의 VH 및 VL 구역은 IgG, Fab, Fab2, Fab2', scFv, PEG화 Fab, PEG화 scFv, PEG화 Fab2, VH::CH1::HSA+LC, HSA::VH::CH1+LC, LC::HSA + VH::CH1, HSA::LC + VH::CH1, 또는 다른 적절한 작제로서 제공될 수 있다.

[0203] 일 실시형태에서, 단백질은 인간 또는 인간화 항체이거나, 인간에서 비면역원성이다. 예를 들어, 단백질은 하나 이상의 인간 항체 프레임워크 구역, 예를 들어 모든 인간 프레임워크 구역, 또는 인간 프레임워크 구역과 적어도 85%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일한 프레임워크 구역을 포함한다. 일 실시형태에서, 단백질은 인간 Fc 도메인, 또는 인간 Fc 도메인과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 Fc 도메인을 포함한다.

[0204] 일 실시형태에서, 단백질은 영장류 또는 영장류화 항체이거나, 인간에서 비면역원성이다. 예를 들어, 단백질은 하나 이상의 영장류 항체 프레임워크 구역, 예를 들어 모든 영장류 프레임워크 구역, 또는 영장류 프레임워크 구역과 적어도 85%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일한 프레임워크 구역을 포함한다. 일 실시형태에서, 단백질은 영장류 Fc 도메인, 또는 영장류 Fc 도메인과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 Fc 도메인을 포함한다. "영장류"는 인간(호모 사피엔스), 침팬치(판 트로글로다이테스 및 판 파니스쿠스(보노보스)), 고릴라(고릴라 고릴라), 긴팔원숭이, 원숭이, 여우원숭이, 다람쥐원숭이(다우벤토니아 마다가스카리엔시스) 및 안경원숭이를 포함한다.

[0205] 몇몇 실시형태에서, 인간 혈장 칼리크레인에 대한 영장류 항체의 친화도는 1000 미만, 500, 100 또는 10nM, 예를 들어 10nM 미만 또는 1nM 미만의 K_D 를 특징으로 한다.

[0206] 일 실시형태에서, 단백질은 인간 프레임워크 구역, 또는 인간 프레임워크 구역과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 프레임워크 구역을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 단백질은 마우스 또는 토끼 유래의 서열을 포함하지 않는다(예를 들어, 쥐와 또는 토끼 항체가 아님).

[0207] 몇몇 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법에서 혈장 칼리크레인(예를 들어, 인간 혈장 칼리크레인)에 결합하고, 적어도 하나의 면역글로불린 가변 구역을 포함하는 단백질(예를 들어, 결합 단백질, 예를 들어 항체)(예를 들어, 본 명세서에 기재된 단백질)의 용도를 제공한다. 예를 들어, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 중쇄(HC) 면역글로불린 가변 도메인 서열 및 경쇄(LC) 면역글로불린 가변 도메인 서열을 포함한다. 다수의 예시적인 혈장 칼리크레인 결합 단백질이 본 명세서에 기재되어 있다.

[0208] 칼리크레인 표적을 사용하여 라이브러리를 스크리닝함으로써, 및 다른 방법에 의해 항체가 발견될 수 있다. 예를 들어, 칼리크레인 단백질 또는 이의 구역은 비인간 동물, 예를 들어 설치류에서 항원으로서 사용될 수 있다. 항원 결합에 직접적으로 관여하지 않는 Fv 가변 구역의 서열을 인간 Fv 가변 구역으로부터의 동등한 서열에 의해 대체함으로써 인간화 항체를 생성할 수 있다. 인간화 항체를 생성하는 일반 방법은 문헌[Morrison, S. L., 1985, *Science* 229:1202-1207, by Oi et al., 1986, *BioTechniques* 4:214], 및 퀸(Queen) 등의 미국 특허 제 5,585,089호, US 제5,693,761호 및 US 제5,693,762호에 의해 제공된다. 이들 방법은 적어도 하나의 중쇄 또는 경쇄로부터의 면역글로불린 Fv 가변 구역의 전부 또는 일부를 코딩하는 핵산 서열을 단리하고 조작하고 발현시키는 것을 포함한다. 이러한 핵산의 많은 공급원이 구입 가능하다. 예를 들어, 핵산은 상기 기재된 바대로 미리 결정된 표적에 대해 하이브리도마 생성 항체로부터 얻어질 수 있다. 인간화 항체를 코딩하는 재조합 DNA, 또는 이의 단편은 이후 적절한 발현 벡터로 클로닝될 수 있다.

[0209] 면역글로불린 칼리크레인 결합 단백질(예를 들어, IgG 또는 Fab 칼리크레인 결합 단백질)은 면역원성을 감소시키도록 변형될 수 있다. 면역원성의 감소는 치료제로서의 사용에 의도되는 칼리크레인 결합 단백질에서 바람직한데, 왜냐하면 이것이 대상체가 치료학적 분자에 대해 면역 반응을 발생시킬 기회를 감소시키기 때문이다. 칼리크레인 결합 단백질의 면역원성을 감소시키는 데 유용한 기법은 잠재적 인간 T 세포 에피토프의 결실/변형 및 CDR 밖의 서열(예를 들어, 프레임워크 및 Fc)의 '생식선화(germlining)'를 포함한다.

[0210] 칼리크레인 결합 항체는 WO 98/52976 및 WO 00/34317에 개시된 방법에 의해 인간 T 세포 에피토프의 특이적 결실 또는 "탈면역화"에 의해 변형될 수 있다. 간단히 말하면, 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 구역은 MHC 클래스 II에 결합하는 펩타이드에 대해 분석되고; 이 펩타이드는 (WO 98/52976 및 WO 00/34317에 정의된 바대로) 잠재적 T 세포 에피토프를 나타낸다. 잠재적 T 세포 에피토프의 검출을 위해, "펩타이드 트레딩(threading)"이라 칭해지

는 컴퓨터 모델링 접근법이 적용될 수 있고, 또한 인간 MHC 클래스 II 결합 펩타이드의 데이터베이스는 WO 98/52976 및 WO 00/34317에 기재된 바대로 VH 및 VL 서열에 존재하는 모티프에 대해 조사될 수 있다. 이 모티프는 임의의 18 주요 MHC 클래스 II DR 동종이인자형에 결합하고, 이로써 잠재적 T 세포 에피토프를 구성한다. 검출된 잠재적 T 세포 에피토프는 가변 구역에서의 적은 수의 아미노산 잔기를 치환함으로써, 또는 바람직하게는 단일 아미노산 치환에 의해 제거될 수 있다. 배타적이 아니지만 대개 가능한 보존적 치환이 만들어지는 한, 인간 생식선 항체 서열에서 이 위치에 흔한 아미노산을 사용할 수 있다. 인간 생식선 서열은 문헌[Tomlinson, I.A. et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 227:776-798; Cook, G. P. et al., 1995, *Immunol. Today* Vol. 16 (5): 237-242; Chothia, D. et al., 1992, *J. Mol. Bio.* 227:799-817]에 개시되어 있다. V BASE 디렉토리는 인간 면역글로불린 가변 구역 서열의 포괄적인 디렉토리를 제공한다(Tomlinson, I.A. et al. MRC Centre for Protein Engineering(영국 캠브리지)에 의해 편집됨). 탈면역화 변화를 확인한 후, V_H 및 V_L 을 코딩하는 핵산은 돌연변이 유발 또는 다른 합성 방법에 의해 작제될 수 있다(예를 들어, 신생 합성, 카세트 대체, 기타 등등). 돌연변이 유발된 가변 서열은 인간 불변 구역, 예를 들어 인간 IgG1 또는 k 불변 구역에 임의로 융합될 수 있다.

[0211] 몇몇 경우에, 잠재적 T 세포 에피토프는 항체 기능에 중요하다고 공지되거나 예측된 잔기를 포함할 것이다. 예를 들어, 잠재적 T 세포 에피토프는 CDR을 향해 보통 바이어싱된다. 또한, 잠재적 T 세포 에피토프는 항체 구조 및 결합에 중요한 프레임워크 잔기에서 발생할 수 있다. 이 잠재적 에피토프를 제거하기 위한 변화는 몇몇 경우에 변화와 함께 및 변화 없이 예를 들어 사슬을 만들고 시험함으로써 더 많은 검토를 요할 것이다. 가능한 경우, CDR과 중첩되는 잠재적 T 세포 에피토프는 CDR 밖의 치환에 의해 제거된다. 몇몇 경우에, CDR 내의 변경이 유일한 옵션이고, 따라서 이 치환을 갖는 변이체 및 갖지 않는 변이체를 시험해야 한다. 다른 경우에, 잠재적 T 세포 에피토프를 제거하는 것이 필요한 치환은 항체 결합에 중요한 프레임워크 내의 잔기 위치에서이다. 이 경우에, 이 치환을 갖는 변이체 및 갖지 않는 변이체를 시험해야 한다. 따라서, 몇몇 경우에 몇몇 변이체 탈면역화된 중쇄 및 경쇄 가변 구역을 설계하고, 최적 탈면역화 항체를 확인하기 위해 다양한 중쇄/경쇄 조합을 시험하였다. 탈면역화의 정도와 조합하여 상이한 변이체의 결합 친화도, 즉 가변 구역에 남은 잠재적 T 세포 에피토프의 수를 고려함으로써 최종 탈면역화된 항체의 선택이 이후 만들어질 수 있다. 임의의 항체, 예를 들어 비인간 서열을 포함하는 항체, 예를 들어 합성 항체, 쥐과 항체, 다른 비인간 단일클론 항체, 또는 디스플레이 라이브러리로부터 단리된 항체를 변형시키기 위해 탈면역화를 이용할 수 있다.

[0212] 칼리크레인 결합 항체는, 결합 특성이 실질적으로 보유되는 한, 프레임워크 구역에서 하나 이상의 비생식선 아미노산을 항체의 상응하는 생식선 아미노산으로 복귀시킴으로써 "생식선화"된다. 유사한 방법은 불변 구역, 예를 들어 불변 면역글로불린 도메인에서 또한 사용될 수 있다.

[0213] 항체의 가변 구역을 하나 이상의 생식선 서열과 더 유사하게 만들기 위해 칼리크레인에 결합하는 항체, 예를 들어 본 명세서에 기재된 항체를 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 항체는 예를 들어 프레임워크, CDR 또는 불변 구역에서 1개, 2개, 3개 이상의 아미노산 치환을 포함하여, 이것이 기준 생식선 서열과 더 유사하게 만들 수 있다. 예시적인 일 생식선화 방법은 단리된 항체의 서열과 유사한(예를 들어, 특정한 데이터베이스에서 가장 유사한) 하나 이상의 생식선 서열을 확인하는 것을 포함할 수 있다. (아미노산 수준에서의) 돌연변이는 이후 증가하여 또는 다른 돌연변이와 조합되어 단리된 항체에서 만들어진다. 예를 들어, 몇몇 또는 모든 가능한 생식선 돌연변이를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산 라이브러리가 제조된다. 돌연변이된 항체는 이후 예를 들어 단리된 항체에 비해 하나 이상의 부가적인 생식선 잔기를 가지고 여전히 유용한(예를 들어, 기능적 활성을 가짐) 항체를 확인하기 위해 평가된다. 일 실시형태에서, 가능한 많은 생식선 잔기가 단리된 항체로 도입된다.

[0214] 일 실시형태에서, 프레임워크 및/또는 불변 구역으로 하나 이상의 생식선 잔기를 치환하거나 삽입하기 위해 돌연변이유발을 이용한다. 예를 들어, 생식선 프레임워크 및/또는 불변 구역 잔기는 변형된 비가변 구역과 유사한(예를 들어, 가장 유사한) 생식선 서열 유래일 수 있다. 돌연변이유발 후, 항체의 활성(예를 들어, 결합 또는 다른 기능적 활성)은 생식선 잔기 또는 잔기들이 허용되는지(즉, 활성을 무효화하지 않음)를 결정하기 위해 평가될 수 있다. 유사한 돌연변이유발은 프레임워크 구역에서 수행될 수 있다.

[0215] 생식선 서열의 선택은 상이한 방식으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 생식선 서열은 선택성 또는 유사성, 예를 들어 적어도 소정의 백분율 동일성에 대한 미리 결정된 기준, 예를 들어 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 99.5%의 동일성을 만족시키는 경우 선택될 수 있다. 선택은 적어도 2개, 3개, 5개 또는 10개의 생식선 서열을 사용하여 수행될 수 있다. CDR1 및 CDR2의 경우에, 유사한 생식선 서열을 확인하는 것은 하나의 이러한 서열을 선택하는 것을 포함할 수 있다. CDR3의 경우에, 유사한 생식선 서열을 확인하는 것은 하나의 이러한 서열을 선택하는 것을 포함할 수 있지만, 아미노 말단 부분 및 카복시 말단 부

분에 별개로 기여하는 2개의 생식선 서열을 사용하는 것을 포함할 수 있다. 다른 실행에서, 1개 초과 또는 2개의 생식선 서열을 사용하여, 예를 들어 공통 서열을 형성한다.

[0216] 일 실시형태에서, 특정한 기준 가변 도메인 서열, 예를 들어 본 명세서에 기재된 서열과 관련하여, 관련 가변 도메인 서열은, 기준 CDR 서열에서의 잔기와 동일하지 않고, 인간 생식선 서열(즉, 인간 생식선 핵산에 의해 코딩된 아미노산 서열)에서 상응하는 위치에서의 잔기와 동일한, 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%의 CDR 아미노산 위치를 가진다.

[0217] 일 실시형태에서, 특정한 기준 가변 도메인 서열, 예를 들어 본 명세서에 기재된 서열과 관련하여, 관련 가변 도메인 서열은 인간 생식선 서열, 예를 들어 기준 가변 도메인 서열과 관련된 생식선 서열로부터 FR 서열과 동일한 적어도 30, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100%의 FR 구역을 가진다.

[0218] 따라서, 관심 있는 소정의 항체와 유사한, 그러나 하나 이상의 생식선 서열, 특히 하나 이상의 인간 생식선 서열과 더 유사한 활성을 가지는 항체를 분리할 수 있다. 예를 들어, 항체는 CDR 밖의 구역(예를 들어, 프레임워크 구역)에서 생식선 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 99.5% 동일할 수 있다. 추가로, 항체는 CDR 구역에서 적어도 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 생식선 잔기를 포함할 수 있고, 생식선 잔기는 변형되는 가변 구역과 유사한(예를 들어, 가장 유사한) 생식선 서열 유래이다. 1차 관심의 생식선 서열은 인간 생식선 서열이다. 항체의 활성(예를 들어, K_A 에 의해 측정된 바와 같은 결합 활성)은 원래 항체의 100, 10, 5, 2, 0.5, 0.1 및 0.001의 인자 내에 있을 수 있다.

[0219] 인간 면역글로불린 유전자의 생식선 서열은 결정될 수 있고, 국제 ImMunoGeneTics 정보 시스템(등록상표)(IMGT)(imgt.cines.fr에서 월드 와이드 웹을 통해 구입 가능함), 및 V BASE 디렉토리(vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk에서 월드 와이드 웹을 통해 구입 가능한, Tomlinson, I.A. et al. MRC Centre for Protein Engineering(영국 캠브리지)에 의해 편집됨)을 포함하는 다수의 공급원으로부터 구입 가능하다.

[0220] V_{kappa} 에 대한 예시적인 생식선 기준 서열은 012/02, 018/08, A20, A30, L14, L1, L15, L4/18a, L5/L19, L8, L23, L9, L24, L11, L12, 011/01, A17, A1, A18, A2, A19/A3, A23, A27, A11, L2/L16, L6, L20, L25, B3, B2, A26/A10 및 A14를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Tomlinson et al., 1995, *EMBO J.* 14(18):4628-3]을 참조한다.

[0221] HC 가변 도메인에 대한 생식선 기준 서열은 특정한 전형적 구조, 예를 들어 H1 및 H2 초가변 루프에서의 1-3 구조를 가지는 서열에 기초할 수 있다. 면역글로불린 가변 도메인의 초가변 루프의 전형적 구조는 문헌[Chothia et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 227:799-817; Tomlinson et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 227:776-798]; 및 Tomlinson et al., 1995, *EMBO J.* 14(18):4628-38]에 기재된 바대로 이의 서열로부터 추론될 수 있다. 1-3 구조를 가지는 예시적인 서열은 DP-1, DP-8, DP-12, DP-2, DP-25, DP-15, DP-7, DP-4, DP-31, DP-32, DP-33, DP-35, DP-40, 7-2, hv3005, hv3005f3, DP-46, DP-47, DP-58, DP-49, DP-50, DP-51, DP-53 및 DP-54를 포함한다.

[0222] 유용한 폴리펩타이드는 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산에 하이브리드화하는 핵산에 의해 또한 코딩될 수 있다. 핵산은 중간, 높은 또는 매우 높은 엄격도 조건 하에 하이브리드화할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 용어 "낮은 엄격도, 중간 엄격도, 높은 엄격도 또는 매우 높은 엄격도 조건 하에 하이브리드화한다"는 하이브리드화 및 세척에 대한 조건을 기술한다. 하이브리드화 반응을 수행하기 위한 가이드라인은 문헌[*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6]에서 확인될 수 있다. 수성 및 비수성 방법은 이 참조문헌에 기재되어 있고, 이 중 어느 하나가 이용될 수 있다. 본 명세서에서 언급한 특정한 하이브리드화 조건은 하기와 같다: (1) 약 45°C에서의 6X 염화나트륨/나트륨 시트레이트(SSC) 중에서, 이어서 적어도 50°C(세척의 온도는 낮은 엄격도 조건 하에 55°C로 증가할 수 있음)에서 0.2X SSC, 0.1% SDS 중의 2회 세척의 낮은 엄격도 하이브리드화 조건; (2) 약 45°C에서의 6X SSC, 이어서 60°C에서의 0.2X SSC, 0.1% SDS 중의 1회 이상의 세척의 중간 엄격도 하이브리드화 조건; (3) 약 45°C에서의 6X SSC, 이어서 65°C에서의 0.2X SSC, 0.1% SDS 중의 1회 이상의 세척의 높은 엄격도 하이브리드화 조건; 및 (4) 65°C에서의 0.5M 인산나트륨, 7% SDS, 이어서 65°C에서의 0.2X SSC, 1% SDS 중의 1회 이상의 세척의 매우 높은 엄격도 하이브리드화 조건.

[0223] **단백질 제조.** 표준 재조합 핵산 방법은 혈장 칼리크레인에 결합하는 단백질을 발현하도록 사용될 수 있다. 일반적으로, 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 핵산 발현 벡터로 클로닝된다. 물론, 단백질이 다수의 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 경우, 각각의 사슬은 발현 벡터, 예를 들어 동일한 또는 상이한 세포에서 발현된, 동일한 또는 상이한 벡터로 클로닝될 수 있다.

- [0224] **항체 제조.** 몇몇 항체, 예를 들어 Fab는 박테리아 세포, 예를 들어 이. 콜라이 세포에서 제조될 수 있다. 예를 들어, Fab가 디스플레이 집합체와 박테리오파지 단백질(또는 이의 단편) 사이의 억제 가능한 중지 코돈을 포함하는 파지 디스플레이 벡터에서 서열에 의해 코딩되는 경우, 벡터 핵산은 중지 코돈을 억제할 수 없는 박테리아 세포로 전달될 수 있다. 이 경우에, Fab는 유전자 III 단백질에 융합되지 않고, 주변세포질 및/또는 배지로 분비된다.
- [0225] 항체는 진핵 세포에서 또한 제조될 수 있다. 일 실시형태에서, 항체(예를 들어, scFv)는 효모 세포, 예컨대 피치아(예를 들어, 문헌[Powers et al., 2001, J. Immunol. Methods. 251:123-35] 참조), 한세울라(*Hanseula*) 또는 사카로마이세스에서 발현된다.
- [0226] 바람직한 일 실시형태에서, 항체는 포유동물 세포에서 제조된다. 클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 발현하기 위한 바람직한 포유동물 숙주 세포는 중국 햄스터 난소(CHO 세포)(예를 들어, 문헌[Kaufman and Sharp, 1982, Mol. Biol. 159:601-621]에 기재된 바와 같은 DHFR 선택 가능한 마커와 사용되는, 문헌[Urlaub and Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220]에 기재된 dhfr- CHO 세포 포함), 림프구 세포주, 예를 들어 NS0 골수종 세포 및 SP2 세포, COS 세포, HEK293T 세포(J. Immunol. Methods (2004) 289(1-2):65-80), 및 형질전환 동물, 예를 들어 형질전환 포유동물로부터의 세포를 포함한다. 예를 들어, 세포는 유방 상피 세포이다.
- [0227] 다각화된 면역글로불린 도메인을 코딩하는 핵산 서열 이외에, 재조합 발현 벡터는 부가적인 서열, 예컨대 숙주 세포에서 벡터의 복제를 조절하는 서열(예를 들어, 복제 기원) 및 선택 가능한 마커 유전자를 보유할 수 있다. 선택 가능한 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포의 선택이 수월하게 한다(예를 들어, 미국 특허 제 4,399,216호, 제4,634,665호 및 제5,179,017호 참조). 예를 들어, 통상적으로 선택 가능한 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포에서 G418, 하이그로마이신 또는 메토틱세이트와 같은 약물에 내성을 부여한다. 바람직한 선택 가능한 마커 유전자는 엽산 환원효소(DHFR) 유전자(메토틱세이트 선택/증폭에 의한 dhfr^r 숙주 세포에서의 사용을 위한) 및 neo 유전자(G418 선택을 위한)를 포함한다.
- [0228] 항체, 또는 이의 항원 결합 부분의 재조합 발현을 위한 예시적인 시스템에서, 항체 중쇄 및 항체 경쇄 둘 다를 코딩하는 재조합 발현 벡터는 인간칼슘 매개 형질감염에 의해 dhfr^r CHO 세포로 도입된다. 재조합 발현 벡터 내에, 항체 중쇄 및 경쇄 유전자는 각각 인핸서/프로모터 조절 요소(예를 들어, SV40, CMV, 아데노바이러스 등, 예컨대 CMV 인핸서/AdMLP 프로모터 조절 요소 또는 SV40 인핸서/AdMLP 프로모터 조절 요소로부터 유래)에 작동적으로 연결되어서, 유전자의 높은 수준의 전사를 추진시킨다. 재조합 발현 벡터는 또한 DHFR 유전자를 보유하고, 이것은 메토틱세이트 선택/증폭을 사용하여 벡터에 의해 형질감염된 CHO 세포의 선택을 허용한다. 선택된 형질전환체 숙주 세포는 항체 중쇄 및 경쇄의 발현을 허용하도록 배양되고, 온전한 항체는 배양 배지로부터 회수된다. 표준 분자 생물학 기법은 재조합 발현 벡터를 제조하고, 숙주 세포를 형질감염시키고, 형질감염체를 선택하고, 숙주 세포를 배양하고, 배양 배지로부터 항체를 회수하기 위해 사용된다. 예를 들어, 몇몇 항체는 단백질 A 또는 단백질 G 커플링된 매트릭스를 가지는 친화도 크로마토그래피에 의해 분리될 수 있다.
- [0229] Fc 도메인을 포함하는 항체의 경우, 항체 제조 시스템은 Fc 구역이 글라이코실화된 항체를 제조할 수 있다. 예를 들어, IgG 분자의 Fc 도메인은 CH2 도메인에서 아스파라긴 297에서 글라이코실화된다. 이 아스파라긴은 2안테나(biantennary) 유형 올리고사카라이드에 의한 변형에 대한 부위이다. 이 글라이코실화가 Fcγ 수용체 및 보체 C1q에 의해 매개되는 이펙터 기능에 필요한 것으로 입증되었다(Burton and Woof, 1992, Adv. Immunol. 51:1-84; Jefferis et al., 1998, Immunol. Rev. 163:59-76). 일 실시형태에서, Fc 도메인은 아스파라긴 297에 상응하는 잔기를 적절히 글라이코실화하는 포유동물 발현 시스템에서 제조된다. Fc 도메인은 다른 진핵생물 번역 후 변형을 또한 포함할 수 있다.
- [0230] 항체는 형질전환 동물에 의해 또한 제조될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,849,992호는 형질전환 동물의 유선에서 항체를 발현하는 방법을 기재한다. 몇 특이적 프로모터 및 관심 있는 항체를 코딩하는 핵산 및 분비를 위한 신호 서열을 포함하는 전이유전자가 작제된다. 이러한 형질전환 포유동물의 암컷에 의해 제조된 것은, 내부에 분비된, 관심 있는 항체를 포함한다. 항체는 것으로부터 정제될 수 있거나, 몇몇 분야에 대해, 바로 사용될 수 있다.
- [0231] (C) 변형
- [0232] 다양한 방식으로 칼리크레인을 저해하는 폴리펩타이드를 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 폴리펩타이드는 화합물을 안정화시키거나 보유 시간을 예를 들어 적어도 2배, 4배, 5배, 8배, 10배, 15배, 20배, 50배, 100배, 500배

또는 1000배 연장하도록 하나 이상의 폴리에틸렌 글라이콜 모이어티에 부착될 수 있다.

[0233] 일 실시형태에서, 칼리크레인 결합 단백질은 예를 들어 혈액, 혈청, 림프, 또는 다른 조직에서 순환 시 이의 안정화 및/또는 보유를 예를 들어 적어도 1.5배, 2배, 5배, 10배 또는 50배 개선하는 모이어티에 의해 물리적으로 회합된다. 예를 들어, 칼리크레인 결합 단백질은 중합체, 예를 들어 실질적으로 비항원성인 중합체, 예컨대 폴리알킬렌 옥사이드 또는 폴리에틸렌 옥사이드와 회합될 수 있다. 적합한 중합체는 실질적으로 중량이 변할 수 있다. 약 200 내지 약 35,000(또는 약 1,000 내지 약 15,000, 및 2,000 내지 약 12,500)의 범위의 분자 수 평균 중량을 가지는 중합체를 사용할 수 있다. 예를 들어, 칼리크레인 결합 단백질은 수용성 중합체, 예를 들어 친수성 폴리비닐 중합체, 예를 들어 폴리비닐알콜 및 폴리비닐피롤리돈에 접합될 수 있다. 복수의 중합체 모이어티는 예를 들어 평균 분자량이 약 2,000 내지 7,000달톤인 1개의 폴리펩타이드, 예를 들어 적어도 2개, 3개 또는 4개의 이러한 모이어티에 부착될 수 있다. 이러한 중합체의 비제한적인 목록은 폴리알킬렌 옥사이드 단독 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 글라이콜(PEG) 또는 폴리프로필렌 글라이콜, 폴리옥시에틸렌화 폴리올, 이의 공중합체 및 이의 블록 공중합체를 포함하되, 단 블록 공중합체의 수용해도가 유지된다.

[0234] 예를 들어, 폴리펩타이드는 수용성 중합체, 예를 들어 친수성 폴리비닐 중합체, 예를 들어 폴리비닐알콜 및 폴리비닐피롤리돈에 접합될 수 있다. 이러한 중합체의 비제한적인 목록은 폴리알킬렌 옥사이드 단독중합체, 예컨대 폴리에틸렌 글라이콜(PEG) 또는 폴리프로필렌 글라이콜, 폴리옥시에틸렌화 폴리올, 이의 공중합체 및 이의 블록 공중합체를 포함하되, 단 블록 공중합체의 수용해도가 유지된다. 추가적인 유용한 중합체는 폴리옥시알킬렌, 예컨대 폴리옥시에틸렌, 폴리옥시프로필렌, 및 폴리옥시에틸렌과 폴리옥시프로필렌(Pluronic)의 블록 공중합체; 폴리메타크릴레이트; 카보머; 사카라이드 단량체 D-만노스, D- 및 L-갈락토스, 푸코스, 프룩토스, D-자일로스, L-아라비노스, D-글루쿠론산, 시알산, D-갈락투론산, D-만누론산(예를 들어, 폴리만누론산 또는 알긴산), D-글루코사민, D-갈락토사민, D-글루코스 및 뉴라민산을 포함하는 분지 또는 비분지 폴리사카라이드, 예컨대 호모폴리사카라이드 및 헤테로폴리사카라이드, 예컨대 락토스, 아밀로펙틴, 전분, 하이드록시에틸 전분, 아밀로스, 황산텍스트란, 텍스트란, 텍스트린, 글라이코젠, 또는 산 류코폴리사카라이드의 폴리사카라이드 하위 단위, 예를 들어 히알루론산; 당 알콜의 중합체, 예컨대 폴리소르비톨 및 폴리만니톨; 헤파린 또는 헤파란을 포함한다.

[0235] 결합 단백질의 하나 이상의 프레임워크 및/또는 CDR 아미노산 잔기가 본 명세서에 기재된 결합 단백질에 대해 하나 이상의 돌연변이(예를 들어, 치환(예를 들어, 보존적 치환 또는 비필수 아미노산의 치환), 삽입, 또는 결실)을 포함할 수 있다. 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 본 명세서에 기재된 결합 단백질에 대해 돌연변이(예를 들어, 치환(예를 들어, 보존적 치환 또는 비필수 아미노산의 치환), 삽입, 또는 결실)(예를 들어, 적어도 1개, 2개, 3개 또는 4개 및/또는 15개 미만, 12개, 10개, 9개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개 또는 2개의 돌연변이), 예를 들어 단백질 기능에 대해 실질적인 효과를 갖지 않는 돌연변이를 가질 수 있다. 돌연변이는 프레임워크 구역, CDR 및/또는 불변 구역에 존재할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 돌연변이는 프레임워크 구역에 존재한다. 몇몇 실시형태에서, 돌연변이는 CDR에 존재한다. 몇몇 실시형태에서, 돌연변이가 불변 구역에 존재한다. 특정한 치환이 허용되는지, 즉 생물학적 특성, 예컨대 결합 활성에 부정적으로 영향을 미치지 않는지는 예를 들어 돌연변이가 보존적인지를 평가함으로써 또는 문헌[Bowie, et al. (1990) Science 247:1306-1310]의 방법에 의해 예측될 수 있다.

[0236] 칼리크레인 결합 단백질은 운반 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 예컨대 인간 혈청 알부민과 또한 회합될 수 있다. 예를 들어, 번역 융합은 운반 단백질을 칼리크레인 결합 단백질과 회합시키도록 사용될 수 있다.

[0237] (D) 칼리크레인 시스템과 연관된 자가면역 질환의 치료

[0238] 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 이상의 pKa1 저해제는 당뇨병성 황반 부종, 망막 증식, 뇌 외상, 급성 척수 손상, 국소 아밀로이드증, 자가면역 질환, 예컨대 건선, 다발성 경화증, 염증성 장 질환, 류마티스성 관절염, 혈관염, 전신 홍반 루푸스 신염, 전신 비만세포증, 중증 화상 및 신경병증성 통증(당뇨병성 및 대상포진 후 신경통)(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 pKa1 시스템과 연관된 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0239] 자가면역 또는 본 명세서에 언급된 다른 pKa1 연관 질환을 발생시킬 위험(예를 들어, 인간 환자)에 있는 대상체는 예를 들어 질환의 발생과 연관된 질환을 가지는 대상체, 질환의 발생과 연관된 환경 인자에 노출된 대상체, 질환의 가족 병력을 가지는 대상체, 또는 질환의 발생과 연관된 유전자를 보유하는 대상체일 수 있다.

[0240] 대상체는 자가면역 또는 다른 pKa1 연관 질환의 하나에 대한 치료를 필요로 하는 인간(예를 들어, 질환을 가지거나 질환을 발생시킬 위험에 있는 인간) 또는 비인간 대상체(예를 들어, 자가면역 또는 다른 pKa1 연관 질환

중 하나의 동물 모델)일 수 있다.

- [0241] 몇몇 실시형태에서, 대상체는 자가면역 질환, 예컨대 류마티스성 관절염(RA), 크론병(CD) 또는 궤양성 대장염(UC)을 발생시킬 위험에 있는 대상체(예를 들어, 인간 환자)이다. 자가면역 질환은 대상체 자체의 신체에 비정상 면역 반응에 의해 야기된 질환이다. 비정상 면역 반응은 자가면역 질환의 유형에 따라 소정의 장기 또는 조직에 대한 것일 수 있다.
- [0242] RA는 관절, 예컨대 손 및/또는 발의 윤활 관절에 일반적으로 영향을 미치는 만성 염증성 질환이다. RA에서의 염증성 반응은 대개 연골의 파괴 및 관절의 결함을 발생시켜서, 기능 및 이동성이 소실된다. RA의 증상은 붓고/붓거나 화끈거리는 관절, 강직, 류마티스 결절, 피곤, 열 및 체중 감소를 포함한다. RA에 대한 예시적인 치료는 신체 치료, 정형술, 진통제, 소염 약물, 스테로이드제 및 질환 변경 항류마티스 약물(disease-modifying antirheumatic drug: DMARD)을 포함한다.
- [0243] CD는 GI 관의 임의의 부분에 영향을 미칠 수 있는 염증성 장 질환이다. 증상은 복부 통증, 설사, 열, 피곤 및 체중 감소를 포함한다. CD에 대한 예시적인 치료는 코티코스테로이드, 5-아미노살리실산 약물, 아자티오프린, 메토타렉세이트, 인플릭시맵, 아달리무맵, 세르톨리주맵, 나탈리주맵, 식이 조정제 및 수술을 포함한다.
- [0244] UC는 대장에 일반적으로 영향을 미치는 염증성 장 질환이다. 증상은 혈액 및/또는 점액 함유 설사, 체중 감소, 빈혈, 복부 통증 및 직장에서의 혈액을 포함한다. UC에 대한 예시적인 치료는 5-아미노살리실산 약물, 코티코스테로이드, 아자티오프린, 부데소나이드, 인플릭시맵, 아달리무맵 및 수술을 포함한다.
- [0245] (E) 조합 치료
- [0246] 혈장 칼리크레인 저해제는 본 명세서에 기재된 질환 또는 장애에 대한 조합 치료의 일부로서 또 다른 치료제와 함께 투여될 수 있다.
- [0247] 칼리크레인 저해제 및 또 다른 치료제에 의한 조합 치료는 복수의 상이한 구성으로 제공될 수 있다. 칼리크레인 저해제가 관절내 주사에 의해 투여되는 상황에서, 칼리크레인 저해제 및 치료제는 단일 조성물로서 동시 투여될 수 있거나, 이들은 별개의 주사에 의해 투여될 수 있다. 몇몇 상황에서, 칼리크레인 저해제 및 치료제는 조합 치료의 2종의 성분에 대한 투여의 원하는 스케줄에 따라 밀접히 시간상 근접하게(예를 들어, 주사 사이의 짧은 시간 간격, 예컨대 동일한 치료 시간 동안) 또는 더 광범위한 간격으로 투여된다. 칼리크레인 저해제가 전신(비경구) 투여에 의해 투여될 때, 칼리크레인 저해제 및 치료제는 조합 치료의 2종의 성분에 대한 의도된 투약 스케줄에 따라 밀접히 시간상 근접하게 또는 더 광범위한 간격으로 투여될 수 있다.
- [0248] 다른 실시형태에서, 칼리크레인 저해제는 자가면역 질환에 관여된 염증을 치료하거나 예방하기에 유용한 다른 화합물과 조합되어 투여될 수 있다. 예시적인 소염제는 예를 들어 스테로이드제(예를 들어, 코티솔, 코르티손, 플루드로코티손, 프레드니손, 6[알파]-메틸프레드니손, 트리암시놀론, 베타메타손 또는 덱사메타손), 비스테로이드성 소염 약물(NSAID(예를 들어, 아스피린, 아세트아미노펜, 톨메틴, 이부프로펜, 메페남산, 피록시캄, 나부메톤, 로페콕시브, 셀레콕시브, 에토돌락 또는 니메술라이드)를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 다른 치료제는 항생제(예를 들어, 반코마이신, 페니실린, 아목시실린, 암피실린, 세프트리악손, 세픽심, 리팜핀, 메트로니다졸, 독시사이클린 또는 스트렙토마이신)이다. 또 다른 실시형태에서, 다른 치료제는 PDE4 저해제(예를 들어, 로플루밀라스트 또는 롤리프람)이다. 또 다른 실시형태에서, 다른 치료제는 항히스타민제(예를 들어, 사이클리진, 하이드록시진, 프로메타진 또는 디펜하이드라민)이다.
- [0249] 소염제의 추가의 예는 예를 들어 아세클로페낙, 아세메타신, e-아세트아미노카프로산, 아세트아미노펜, 아세트아미노살롤, 아세타닐리드, 아세틸살리실산, S-아데노실메티오닌, 아클로페낙, 알클로메타손, 알펜타닐, 알게스톤, 알릴프로딘, 알미노프로펜, 알록시프린, 알파프로딘, 알루미늄 비스(아세틸살리실레이트), 암시노나이드, 암페낙, 아미노클로르테녹사진, 3-아미노-4-하이드록시뷰티르산, 2-아미노-4-피롤린, 아미노프로필론, 아미노피롤린, 아미세트린, 암모늄 살리실레이트, 암피록시캄, 암톨메틴 구아실, 아닐레리딘, 안티피린, 안트라페닌, 아파존, 베클로메타손, 벤다자, 베노릴레이트, 베녹사프로펜, 벤지페릴론, 벤지다민, 벤질몰핀, 베르모프로펜, 베타메타손, 베타메타손-17-발러레이트, 베지트라마이드, [알파]-비사볼롤, 브롬페낙, p-브로모아세타닐리드, 5-브로모살리실산 아세테이트, 브로모살리게닌, 부세틴, 부클록실산, 부콜롬, 부데소나이드, 부펙사막, 부마디존, 부프레노르핀, 부타세틴, 부티부펜, 부토르파놀, 카르바마제핀, 카르비펜, 카이프로펜, 카르살람, 클로로부타놀, 클로로프레드니손, 클로르테녹사진, 콜린 살리실레이트, 신코펜, 신메타신, 시라마돌, 클린다나, 클로베타솔, 클로코르톨론, 클로메타신, 클로니타젠, 클로닉신, 클로피락, 클로프레드놀, 클로브, 코데인, 코데인 메틸 브로마이드, 코데인 포스페이트, 코데인 설페이트, 코르티손, 코르티바졸, 크로프로파마이드, 크로테타

마이드 및 사이클라조신을 포함한다.

[0250] 소염제의 추가의 예는 데플라자코트, 데하이드로테스토스테론, 데소몰핀, 데소나이드, 데속시메타손, 텍사메타손, 텍사메타손-21-아이소니코티네이트, 데속사드롤, 텍스트로모라마이드, 텍스트로프로폭시펜, 데옥시코르티코스테론, 데조신, 디암프로마이드, 디아몰론, 디클로페낙, 디페나미졸, 디펜피라마이드, 디플루라손, 디플루코르톨론, 디플루니살, 디플루프레드네이트, 디하이드로코데인, 디하이드로코데이논 엔올 아세테이트, 디하이드로몰핀, 디하이드록시알루미늄 아세틸살리실레이트, 디메녹사돌, 디메헵타놀, 디메틸티암뷰텐, 디옥사페틸 뷰티레이트, 디피파논, 디프로세틸, 디피론, 디타졸, 드록시칸, 에모르파존, 에페남산, 오녹솔론, 에피리졸, 엡타조신, 에테르살레이트, 에텐자마이드, 에토헬타진, 에톡사젠, 에틸메틸티암뷰텐, 에틸몰핀, 에토돌락, 에토펜아메이트, 에토니타젠, 에우레놀, 펠비낙, 펜부펜, 펜클로질산, 펜도살, 페노프로펜, 펜타닐, 펜티아작, 페프라디놀, 페프라존, 플록타페닌, 플루자코르트, 플루클로로나이드, 플루페남산, 플루메타손, 플루니솔라이드, 플루닉신, 플루녹사프로펜, 플루오시놀론 아세토나이드, 플루오시노나이드, 플루오시놀론 아세토나이드, 플루오코르틴 뷰틸, 플루오코이톨론, 플루오레손, 플루오로메톨론, 플루페롤론, 플루피르틴, 플루프레드니텐, 플루프레드니솔론, 플루프로쿠아존, 플루란드레놀라이드, 플루르비프로펜, 플루티카손, 포르모코르탈 및 포스포살을 포함한다.

[0251] 소염제의 추가의 예는 겐티신산, 글라페닌, 글루카메타신, 글라이콜 살리실레이트, 구아이하줄렌, 할시노나이드, 할로베타솔, 할로베타손, 할로프레드논, 헤로인, 하이드로코돈, 하이드로코르타메이트, 하이드로코티손, 하이드로코티손 아세테이트, 하이드로코티손 숙시네이트, 하이드로코티손 헤미숙시네이트, 하이드로코티손 21-라이시네이트, 하이드로코티손 사이피오네이트, 하이드로몰핀, 하이드록시페티딘, 이부페낙, 이부프로펜, 이부프로삼, 이미다졸 살리실레이트, 인도메타신, 인도프로펜, 이소페졸락, 이소플루프레돈, 이소플루프레돈 아세테이트, 이솔라돌, 이소메타돈, 이소닉신, 이속세팍, 이속시감, 케토베미돈, 케토프로펜, 케토롤락, p-락토펜에타이드, 레페타민, 레발로르판, 레보르파놀, 레보페나실-몰판, 로펜타닐, 로나졸락, 로르녹시감, 록소프로펜, 라이신 아세틸살리실레이트, 마지프레돈, 메클로페남산, 메드리손, 메페남산, 멜록시감, 메페리딘, 메프레드니손, 메프타지놀, 메살라민, 메타조신, 메타돈, 메토티리메프라진, 메틸프레드니솔론, 메틸프레드니솔론 아세테이트, 메틸프레드니솔론 나트륨 숙시네이트, 메틸프레드니솔론 설렘트네이트, 메티아진산, 메토폴린, 메토폰, 모페뷰타존, 모페졸락, 모메타손, 모라존, 몰핀, 몰핀 하이드로클로라이드, 몰핀 설페이트, 몰폴린 살리실레이트 및 미로핀을 포함한다.

[0252] 소염제의 추가의 예는 나부메톤, 날부핀, 날로르핀, 1-나프틸 살리실레이트, 나프록센, 나르세인, 네포팜, 니코몰핀, 니페나존, 니플롬산, 니메솔라이드 5'-나이트로-2'-프로폭시아세타닐리드, 노르레보르파놀, 노르메타돈, 노르몰핀, 노르피파논, 올살라진, 오피움, 옥사세프롤, 옥사메타신, 옥사프로진, 옥시코돈, 옥시몰핀, 옥시펜뷰타존, 파파베레툼, 파라메타손, 파라닐린, 파르살마이드, 펜타조신, 페리속살, 페나세틴, 페나독손, 페나조신, 페나조피리딘 하이드로클로라이드, 페노콜, 페노페리딘, 페노피라존, 페노모르판, 페닐 아세틸살리실레이트, 페닐뷰타존, 페닐 살리실레이트, 페니라미돌, 피케토프로펜, 피미노딘, 피페부존, 피페릴론, 피라졸락, 피리트라마이드, 피록시감, 피르프로펜, 프라노프로펜, 프레드니카르베이트, 프레드니솔론, 프레드니손, 프레드니발, 프레드닐리텐, 프로글루메타신, 프로헵타진, 프로메돌, 프로파세타몰, 프로페리딘, 프로피람, 프로폭시펜, 프로피페나존, 프로쿠아존, 프로티진산, 프록사졸, 라미페나존, 레미펜타닐, 리마졸롬 메틸설페이트, 살아세트아마이드, 살리신, 살리실라마이드, 살리실라마이드 o-아세트산, 살리실산, 살리실황산, 살살레이트, 살베린, 시메트라이드, 수펜타닐, 설파살라진, 술린닥, 슈퍼옥사이드 디스뮤타제, 수프로펜, 숙시부존, 탈니플루메이트, 테니답, 테녹시감, 테로페나메이트, 테트란드린, 티아졸리노뷰타존, 티아프로펜산, 티아르아마이드, 티리딘, 티노리딘, 텍소코르톨, 톨페남산, 톨메틴, 트라마돌, 트리암시놀론, 트리암시놀론 아세토나이드, 트로페신, 비미놀, 젠부신, 지모프로펜, 잘토프로펜 및 조메피락을 포함한다.

[0253] (F) 투여

[0254] 환자는 일반적으로 인간이지만, 또한 비인간 포유동물일 수 있다. 인간 환자는 성인, 예를 들어 19-25세, 26-40세, 41-55세, 56-75세 및 76세 이상의 환자, 및 소아 환자, 예를 들어 0-2세, 3-6세, 7-12세 및 13-18세의 환자를 포함한다.

[0255] 용어 "약제학적으로 허용되는" 조성물은 본 명세서에 기재된 칼리크레인 저해제와 함께 환자에게 투여될 수 있는 비독성 담체 또는 부형제를 의미한다. 담체 또는 부형제는 조성물의 생물학적 또는 약리학적 활성에 적합하게 선택된다. 본 명세서에 기재된 칼리크레인 저해제(그리고, 조합 치료의 경우에, 다른 치료제)는 전신 투여, 예를 들어 정맥내 및 흡입 등(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 환자에게 저해제 및/또는 다른 치료제의 저

해량의 전달을 위한 임의의 적합한 수단에 의해 국소로 또는 전신으로 투여될 수 있다. 비경구 투여는 칼리크레인 저해제에 특히 바람직하다.

[0256] 비경구 투여의 경우, 칼리크레인 저해제는 정맥내로, 근육내, 복강내 또는 피하로 주사될 수 있다. 피하 주사 및 i.v. 투여는 비경구 투여에 바람직한 경로이다. 국소(관절내) 주사가 또한 유용하다.

[0257] 통상적으로, 주사에 의한 투여를 위한 조성물은 무균 등장성 수성 완충제 중의 용액(예를 들어, 인산나트륨/인산칼륨 완충 식염수)이다. 다른 약제학적으로 허용되는 담체는 무균수, 식염수 용액 및 완충 식염수(인산염 또는 아세트산염과 같은 완충제 포함), 알콜, 식물성 오일, 폴리에틸렌 글라이콜, 젤라틴, 락토스, 아밀로오스, 스테아르산마그네슘, 활석, 규산, 파라핀 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 필요한 경우, 상기 조성물은, 활성 화합물과 해롭게 반응하지 않는 한, 가용화제 및 국소 마취제, 예컨대 주사 부위의 통증을 없애는 리도카인, 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 염, 활택제 등을 또한 포함할 수 있다. 유사하게, 상기 조성물은 활성 화합물과 해롭게 반응하지 않는 비경구, 장용 또는 비강내 적용에 적합한 전통적인 부형제, 예를 들어 약제학적으로 허용되는 유기 또는 무기 담체 물질을 포함할 수 있다. 일반적으로, 성분은 별개로 또는 단위 제형으로 함께 혼합되어, 예를 들어 활성 단위 중의 활성제의 분량을 나타내는 용봉된 용기, 예컨대 앰플, 사세트(sachette) 또는 바이알 내의 건조 동결 분말 또는 물 비함유 농축물로서 제공될 것이다. 상기 조성물이 점적주사에 의해 투여되는 경우, 이것은 무균 약제학적 등급 "주사용수" 또는 식염수를 함유하는 점적주사 병이 필요 없을 수 있다. 상기 조성물이 주사에 의해 투여되는 경우, 무균 주사용수 또는 식염수의 용기(예를 들어, 앰플 또는 바이알)는 투여 전에 성분들이 혼합될 수 있도록 제공될 수 있다.

[0258] 단리된 칼리크레인 저해제의 피하 투여를 위한 예시적인 제제는 완충제(예를 들어, 히스티딘 또는 인산염 완충제) 및 저온보호제(예를 들어, 임의로 텍스트란, 예컨대 텍스트란 40을 포함하는, 수크로스 또는 수크로스 및 만니톨)를 함유하는 완충 용액을 포함하고, 미국 공보 출원 제2007-0213275호(미국 출원 제11/716,278호(2007년 3월 9일 출원))에 기재되어 바대로 저장 및 분포에 대해 동결건조될 수 있다.

[0259] 일 실시형태에서, 칼리크레인 저해제는 임의의 승인된 절차에 따라 정맥내 점적주사로서 환자에게 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 칼리크레인 저해제는 피하 볼루스로서 환자에게 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 칼리크레인 저해제는 관절내 주사에 의해 환자에게 투여된다. I.V. 및 관절내 투여는 임상 환경(예를 들어, 병원, 긴급 치료, 또는 의사 사무실)에서 건강 관리 전문가에 의해 통상적으로 수행되지만, 피하 주사는 자가 투여되거나 건강 관리 전문가에 의해 투여될 수 있다.

[0260] 전신 투여를 위한 칼리크레인 저해제의 용량을 결정하기 위해 평가될 수 있는 매개변수는 DX-88(비천연 발생 칼리크레인 저해제, 서열 번호 2)와 관련하여 하기 기재되어 있다. 혈장에서 순환하는 프리칼리크레인의 전체 양은 대략 500nM 내지 600nM인 것으로 보고되어 있다(Silverberg et al., "The Contact System and Its Disorders," in Blood: Principles and Practice of Hematology, Handin, R. et al., eds, J B Lippincott Co., Philadelphia, 1995). 모든 프리칼리크레인이 활성화되면, 약 520nmole/ℓ의 DX-88(DX88)은 화학량론적 방식으로 칼리크레인을 저해하도록 사용될 수 있다. 5ℓ의 혈장을 가지는 개체는 7,054달톤의 DX-88의 분자량에 기초하여 2.6μmole의 DX-88, 또는 대략 18mg의 용량을 요구할 것이다. 이것은 하기와 같이 계산된다: DX88의 K_i 는 0.025nM이다. 예를 들어 1nM의 혈장 칼리크레인(PK)의 농도를 가지는 것이 바람직할 때, 단단한 결합 저해제를 위한 하기 제제는 유리 DX-88의 농도가 12.0nM이라는 것을 나타낸다. 따라서, 필요한 DX-88의 전체 양은 $499 + 12$ 또는 511nM일 것이다.

[0261]

$$[DX88]_{total} = \frac{K_{i,app}[pKal - DX88]}{[DX88]_{free}} + [pKal - DX88]$$

[0262]

$$511nM = (0.025)(499)/(1) + (499)$$

[0263] 용량은 프리칼리크레인의 전부가 활성화되지 않는지 또는 칼리크레인의 일부가 내인성 저해제, 예를 들어 C1 에스테라제 저해제(C1INH)에 의해 탈활성화되는지 비례하여 감소할 수 있다. 따라서, 소정의 실시형태에서, 약 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80, 120, 250, 500, 600, 700, 800, 1000mg의 DX-88은 단일 용량으로 또는 24시간 기간에 걸쳐 분산된 하나 이상의 용량으로 대상체에게 투여될 수 있다. 여러 다른 인자의 고려, 예컨대 환자 연령, 체중 및 병증(들)의 중등도는 실행 시 필요한 DX-88의 용량의 더 정확한 예측을 제공할 수 있다.

[0264] 몇몇 실시형태에서, 칼리크레인 저해제 폴리펩타이드는 약 1 내지 500mg/m², 바람직하게는 약 1 내지 250mg/m²,

1 내지 100mg/m²의 용량으로 투여된다.

[0265] (G) 장치 및 키트

[0266] 칼리크레인 저해제를 포함하는 약제학적 조성물은 의학 장치에 의해 투여될 수 있다. 상기 장치는 (예를 들어, 가정 또는 의사 사무실에서 환자의 또는 보호자에 의해) 병원 또는 응급실/응급 관리 시설의 밖의 환경에서 사용될 수 있도록 휴대성, 실온 저장 및 사용의 용이성과 같은 특징에 의해 설계될 수 있다. 상기 장치는 예를 들어 단리된 칼리크레인 저해제를 포함하는 약제학적 제제를 저장하기 위한 하나 이상의 하우징을 포함할 수 있고, 물질 또는 물질들의 하나 이상의 단위 용량을 전달하도록 구성될 수 있다.

[0267] I.V. 투여는 적절한 주사 또는 점적주사 장치(예를 들어, 카테터, 점적주사 펌프, 임플란트 등)를 사용하여 블루스 또는 점적주사에 의할 수 있다. 피하 주사는 예를 들어 카테터 및 점적주사 펌프 또는 이식 가능한 장치를 사용하여 점적주사에 의할 수 있다. 많은 다른 장치, 임플란트, 전달 시스템 및 모듈이 또한 공지되어 있다.

[0268] 칼리크레인 저해제가 동결건조 분말로서 유통되는 경우, 이것은 사용 전에 재구성되어야 한다. 수동 재구성(예를 들어, 주사에 의해 주사 포트를 통해 동결건조 제제를 함유하는 용기로 동결건조 제제로의 희석제의 수동 첨가)을 이용할 수 있거나, 칼리크레인 저해제는 자동 재구성에 구성된 장치(예를 들어, 동결건조 제제로의 희석제의 자동 첨가), 예컨대 벡턴-딕킨슨 비디(Becton-Dickinson BD)(상표명) 리퀴드 드라이 인젝터(Liquid Dry Injector)에 제공될 수 있다.

[0269] 단리된 칼리크레인 저해제는 키트에서 제공될 수 있다. 일 실시형태에서, 키트는 (a) 단리된 칼리크레인 저해제를 포함하는 조성물을 함유하는 용기, 및 (b) 본 명세서에 기재된 방법 및/또는 치료학적 이점을 위한 물질의 사용과 관련된 정보 자료를 포함한다.

[0270] 소정의 실시형태에서, 키트는 또 다른 치료제를 또한 포함한다. 예를 들어, 키트는 단리된 칼리크레인 저해제를 포함하는 조성물을 함유하는 제1 용기, 및 다른 치료제를 포함하는 제2 용기를 포함한다. 단리된 칼리크레인 저해제 및 다른 치료제는 칼리크레인 저해제 및 치료제가 단일 조성물로서 투여되는 방법에서 사용하기 위해 동일한 용기에서 공급될 수 있다.

[0271] 키트의 정보 자료는 이의 형태에서 제한되지 않는다. 일 실시형태에서, 정보 자료는 화합물의 제조, 화합물의 분자량, 농도, 만료 일자에 대한 정보, 배취 또는 제조 부지 정보, 및 기타 등등을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 정보 자료는 대상체(들)를 치료하기 위해 단리된 칼리크레인 저해제를 예를 들어 적합한 용량, 투약량 형태 또는 투여 방식(예를 들어, 본 명세서에 기재된 용량, 투약량 형태 또는 투여 방식)으로 투여하는 방법에 관한 것이다. 정보는 다양한 포맷으로 제공될 수 있고, 인쇄된 텍스트, 컴퓨터 판독 가능한 자료, 비디오 기록 또는 오디오 기록, 또는 실질적인 자료에 대한 링크 또는 주소를 제공하는 정보를 포함한다.

[0272] 단리된 칼리크레인 저해제(및, 존재하는 경우, 부가적인 치료제(들)) 이외에, 키트 내의 조성물은 다른 성분, 예컨대 용매 또는 완충제, 안정화제, 또는 보존제를 포함할 수 있다. 단리된 칼리크레인 저해제(및 존재하는 경우 다른 치료제)는 임의의 형태, 예를 들어 액체, 건조 또는 동결건조 형태, 바람직하게는 실질적으로 순수한 및/또는 무균 형태로 제공될 수 있다. 상기 물질이 액체 용액 중에 제공되는 경우, 액체 용액은 바람직하게는 수성 용액이다. 상기 물질이 건조 형태로서 제공될 때, 재구성은 일반적으로 적합한 용매의 첨가에 의한다. 용매, 예를 들어 무균수 또는 완충제는 임의로 키트에 제공될 수 있다.

[0273] 키트는 상기 물질을 함유하는 조성물 또는 조성물들을 위한 하나 이상의 용기를 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 키트는 조성물 및 정보 자료를 위한 별개의 용기, 분리장치 또는 구획을 함유한다. 예를 들어, 상기 조성물은 병, 바이알 또는 주사기에 함유될 수 있고, 정보 자료는 플라스틱 슬리브 또는 패킷에 함유될 수 있다. 다른 실시형태에서, 키트의 별개의 부재는 단일의 미분할 용기 내에 함유된다. 예를 들어, 상기 조성물은 라벨의 형태로 정보 자료가 부착된 병, 바이알 또는 주사기에 함유된다. 몇몇 실시형태에서, 키트는 개별 용기의 다수(예를 들어, 팩)를 포함하고, 각각은 상기 물질의 하나 이상의 단위 제형(예를 들어, 본 명세서에 기재된 제형)을 함유한다. 용기는 조합 제형, 예를 들어 원하는 비율로 예를 들어 단리된 칼리크레인 저해제 및 또 다른 치료제 둘 다를 포함하는 단위를 포함할 수 있다. 예를 들어, 키트는 복수의 주사기, 앰플, 호일 패킷, 블리스터 팩 또는 의학 장치를 포함하고, 예를 들어 각각은 단일 조합 단위 용량을 함유한다. 키트의 용기는 기밀, 방수(예를 들어, 수분 또는 증발의 변화에 불투과성) 및/또는 빛 차단(light-tight)일 수 있다.

[0274] 키트는 임의로 상기 조성물의 투여에 적합한 장치, 예를 들어 주사기 또는 다른 적합한 전달 장치를 포함한다. 상기 장치는 물질 중 하나 또는 둘 다에 의해 프리 로딩으로 제공될 수 있거나, 비어있을 수 있지만, 로딩에 적

합할 수 있다.

[0275]

실시예

[0276]

하기 실시예는 추가의 예시를 제공하고, 제한이 아니다.

[0277]

실시예 1: 절단된 고분자량 키니노젠(HMWK)과 자가면역 질환 사이의 연관

[0278]

자가면역 질환에서 절단된 HMWK의 수준을 결정하기 위해, 류마티스성 관절염(RA), 궤양성 대장염(UC) 및 크론병(CD)의 환자, 및 건강한 대장체로부터 얻은 혈장 샘플에서 온전한 및 절단된 HMWK의 양을 하기 기재된 바대로 리코르 검출에 의해 웨스턴 블롯을 사용하여 측정하였다.

[0279]

(i) 샘플 제조

[0280]

10 μ l의 10X 항프로테아제 저해제 각테일을 90 μ l의 100% HMWK 결핍 혈장에 첨가함으로써 치료된 HMWK 결핍 혈장을 제조하였다. 용액은 사용 전에 적어도 30분 동안 침전되게 허용되었다.

[0281]

5 μ l의 스톱 용액(1.61mg/ml)을 15 μ l의 치료된 HMWK 결핍 혈장에 첨가함으로써 단쇄 HMWK의 1:4 중간체를 제조하였다. 5 μ l의 스톱 용액(2.01mg/ml)을 15 μ l의 치료된 HMWK 결핍 혈장에 첨가함으로써 2-사슬 HMWK의 1:4 중간체를 제조하였다.

[0282]

3.35 μ l의 1:4 단쇄 HMWK 중간체 및 2.69 μ l의 1:4 2-사슬 HMWK 중간체를 23.96 μ l의 치료된 HMWK 결핍 혈장에 첨가함으로써 45 μ g/ml의 치료된 HMWK 결핍 대조군 혈장 용액을 제조하였다.

[0283]

5 μ l의 혈장 샘플을 95 μ l의 1X TBS에 첨가함으로써 각각의 샘플을 1X TBS 중의 5% 혈장(1:20)으로 희석하였다. 5 μ l의 4X 샘플 완충제를 15 μ l의 5% 샘플에 첨가함으로써 비환원 샘플을 제조하였다. 5 μ l의 4X 샘플 완충제 및 2 μ l의 10X 환원제를 13 μ l의 5% 샘플에 첨가함으로써 환원 샘플을 제조하였다.

[0284]

열 블록을 사용하여 모든 샘플을 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 가열하였다. 각각의 샘플을 간단히 원심분리하여 샘플 관의 캡으로부터 임의의 용액을 제거하였다.

[0285]

(ii) 겔 로딩, 실행 및 이동

[0286]

1,900ml의 DI 물에 100ml의 20X 실행 완충제를 첨가함으로써 트리스-아세테이트 실행 완충제를 제조하였다. 4 μ l의 용적의 원-갈라 단백질 마커를 모든 검정에서 대조군으로서 사용하였다. 13 μ l의 용적의 비환원 샘플 및 환원 샘플을 겔 1의 겔의 레인에 첨가하였다. 겔을 약 2시간 동안 125볼트에서 실행하였다.

[0287]

iBlot 필터 페이퍼를 DI 물에 위치시키고, 5분 동안 침지시켰다. 애노드 스택, 하부를 개방하고, 구리 측이 아래로 하면서 iBlot의 블로팅 표면에 위치시켰다. 겔 실행의 완료 시, 2개의 겔 카세트를 개봉하고, 겔을 제거하였다. 겔을 이동 막에 위치시켰다. 예비침지된 필터 페이퍼를 겔의 상부에 위치시켰다. 캐소드 스택, 상부를 개방하고, 구리 측이 위로 하면서 필터 페이퍼의 상부에 위치시켰다. 블로팅 롤러를 사용하여 스택에서의 버블을 온화하게 롤링 아웃하였다. 폐기 가능한 스펀지를 iBlot 뚜껑에 위치시켰다. iBlot를 키고, 프로그램 P0을 선택하였다.

[0288]

iBlot 이동의 완료 시, iBlot를 개봉하고, 스펀지, 캐소드 스택 및 겔을 버렸다. 각각의 막을 iBlot로부터 개별적으로 제거하고, 이것을 20ml의 오디세이 차단 완충제를 함유하는 플라스틱 트레이에 위치시켰다. 막을 실온에서 1시간 동안 플레이트 진탕기에서 항온처리하였다.

[0289]

(iii) 리코르 검출에 의한 웨스턴블롯 검정

[0290]

57.14 μ l의 마우스 항-LC HMWK, 클론 11H05호(스톡 농도 1.4mg/ml)를 80ml의 오디세이 차단제 + 0.2% Tween-20에 첨가함으로써 1 μ g/ml의 1차 항체 용액을 제조하였다. 플라스틱 트레이로부터 차단 완충제를 제거하였다. 20ml의 용적의 1차 항체 용액을 각각의 트레이에 첨가하고, 막을 실온에서 1시간 동안 플레이트 진탕기에서 항온처리하였다. 5.33 μ l의 스톱 용액을 80ml의 오디세이 차단제 + 0.2% Tween-20에 첨가함으로써 1:15,000 희석에서 염소 항-마우스 IgG IRDye 680 용액을 제조하였다. 플라스틱 트레이로부터 1차 항체 용액을 제거하였다. 막을 5분 동안 20ml의 1X PBS + 0.1% Tween-20에 의해 세척하고, 이후 세척물을 버렸다. 전체 4 세척물에 대해 3회 반복하였다. 20ml의 용적의 염소 항-마우스 IgG IRDye 680 용액을 각각의 트레이에 첨가하였다. 트레이를 알루미늄 호일로 덮어, 광으로부터 막 및 2차 항체 용액을 보호하였다. 막을 실온에서 1시간 동안 플레이트 진탕기에서 항온처리하였다. 플라스틱 트레이로부터 2차 항체 용액을 제거하였다. 막을 5분 동안 20ml의 1X PBS + 0.1% Tween-20에 의해 세척하고, 이후 세척물을 버렸다. 전체 4 세척물에 대해 3회 반복하였다. 막을 PBS에 의

해 세척하고, 리코르 오디세이(Odyssey) CLx에서 스캐닝하였다. 막을 알루미늄 호일로 덮고, 밤새 건조되게 하였다. 건조된 막을 보호성 커버 시트에 위치시키고, 나중 사용을 위해 저장하였다.

[0291] (iv) 결과:

[0292] 예상된 바대로 수행된, 45µg/ml의 단일 및 2-사슬 HMWK가 스파이킹된, 대조군, 치료된 HMWK 결핍 혈장은 대략 120 및 95kDa의 밴드를 생성하였다. 정상 인간 혈장은 절단된 HMWK의 21.3%로 대략 120 및 100kDa의 밴드를 생성하였다. 항프로테아제 저해제 각테일을 함유하는 환자 샘플은 시트르산나트륨에서 수집된 환자 샘플보다 극적으로 상이한 결과를 생성하였다. 항프로테아제 저해제가 첨가된 수집된 환자 샘플은 환원된 2-사슬 HMWK보다 상당히 더 많은 단쇄 HMWK를 함유하였다. 이 결과는 항프로테아제 저해제 각테일의 첨가가 수집 후 HMWK의 절단을 방지하는 데 필요하다는 것을 나타낸다.

[0293] 다수의 UC, CD, RA 및 HAE 환자로부터의 혈장 샘플은 이 연구에서 조사되었다. 대조군 샘플 및 정상 인간 혈장은 예상된 결과를 생성하였다. HAE 공격 샘플은 HAE 기준 샘플보다 더 많은 절단된 HMWK를 함유하였다. 하기 표 1 및 또한 도 1에 나타난 것처럼, 자가면역 환자로부터의 아주 다량의 샘플, 특히 류마티스성 관절염 샘플은 오직 46kDa에서 밴드를 생성하여서, 절단된 HMWK의 수준이 자가면역 질환, 예컨대 RA, UC 및 CD와 연관된다는 것을 나타낸다. 더 구체적으로, RA 악화가 광범위한 절단된 HMWK와 연관된 것으로 밝혀졌고; 크론병은 보통의 양의 절단된 HMWK를 가지는 것으로 밝혀졌고; 궤양성 대장염은 보통의 양의 절단된 HMWK를 가지는 것으로 밝혀졌다.

[0294] 요약하면, 이 연구의 결과는 자가면역 질환, 예컨대 CD, UC 및 RA 혈장에서 접촉 활성화를 나타낸다. 따라서, 접촉 활성화를 저해하는 물질, 예컨대 pKa1의 저해제(예를 들어, 본 명세서에 기재된 것)는 이러한 질환을 치료하는 데 있어서 효과적일 수 있다. 추가로, 이 연구의 결과는 절단된 HMWK의 수준이 자가면역 질환, 예컨대 CD, UC 및 RA를 가지거나 이의 위험에 있는 환자를 확인하기 위한 신뢰성 있는 바이오마커로서 및/또는 이러한 자가면역 질환에 대한 치료의 효율을 평가하기 위한 바이오마커로서 작용할 수 있다는 것을 나타낸다.

RA, UC 및 CD 환자에서의 절단된 HMWK의 수준

UID	연령	성별	약제	질환	질환 상태	절단된 HMWK(%)
106659	34	남성	펜타사 500 mg	크론병, 고콜레스테롤증	악화	3
104006	50	여성	펜타사 500 mg	크론병	안정	12.2
100929	59	남성	시프로플록사신, 후라질	크론병	안정	32.7
118166	62	남성	티니다졸 500 mg	크론병	안정	10.3
105772	22	여성	리알다	크론병	안정	95.7
72211	53	여성	카나사 좌제, 비타민 C	궤양성 대장염	안정	13.1
96319	78	남성	아사콜, 카나사, 하이드로코티손, 프릴로색, 타이레놀, ASA, 딜타젬, 로라제팜, 얼라인 프로바이오틱, 비타민	궤양성 대장염	안정	4.4
93587	24	여성	카나사 좌제, 카라페이트, 오메프라졸, 아사콜, 레미케이드	궤양성 대장염	안정	100
92122	21	여성	프레드니손, 리알다, 레미케이드, 피코셋	궤양성 대장염	안정	4.9
94441	77	남성	리알다, 플라빅스	궤양성 대장염	악화	16.5
147603	72	여성	엔브렐, 아라바 20 mg, 엽산 1 mg, 아젤라딘 500 mg, 센지로이드 0.175 mg,	류마티스성 관절염(악화), 100%에서 5명 중 4명의 환자	악화	100
100953	50	여성	플라케닐, 멜록시캄, MTX, 프레드니손	류마티스성 관절염(RA), 고혈압(HTN), 활액낭염	악화	100
72015	36	여성	메토타렉세이트; 엽산; MVI; 칼슘 및 비타민 D; 프레드니손	류마티스성 관절염(RA)	악화	100
31567	49	여성	엔브렐; 타이레놀; 메드롤; 프릴로색; 시탈로프람; HCT; 어유; 나프로신	류마티스성 관절염(RA)	악화	100
33503	44	여성	센지로이드; 오렌시아; 프레드니손; 엠비언; 메토타렉세이트; 하이드로코돈; 엽산	류마티스성 관절염(RA)	악화	46.2

[0295]

[0296] **참조문헌**

[0297] 본원에 걸쳐 인용된 문헌 참조, 등록 특허, 공개 또는 비공개 특허 출원, 및 하기 기재된 것을 포함하는 모든 인용된 참조의 내용은 본 명세서에 언급된 목적 또는 대상에 대해 그 전문이 참조문헌으로 본 명세서에 명확히 포함된다. 상충의 경우, 본 명세서에서의 임의의 정의를 포함하는 본원이 우세할 것이다.

[0298] **균등물 및 범위**

[0299] 당해 분야의 당업자는 단지 일상적인 것에 지나지 않는 실험을 사용하여 본 명세서에 기재된 본 개시내용의 구

체적인 실시형태에 대한 많은 균등물을 인식하거나 확신할 수 있을 것이다. 본 개시내용의 범위는 상기 설명을 제한하는 것으로 의도되지 않고, 오히려 첨부된 청구범위에 기재되어 있다.

[0300] 청구항에서 "일", "하나" 및 "이것"과 같은 관사는, 반대를 표시되지 않는 한 또는 그렇지 않으면 문맥으로부터 명확하지 않은 한, 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다. 그룹의 하나 이상의 구성원 사이의 "또는"을 포함하는 청구항 또는 설명은, 반대를 표시되지 않는 한 또는 그렇지 않으면 문맥으로부터 명확하지 않은 한, 그룹 구성원 중 하나, 하나 초과 또는 모두가 소정의 생성물 또는 방법에 존재하거나, 이들에서 사용되거나, 그렇지 않으면 이들과 관련되는 경우 충족되는 것으로 생각된다. 본 개시내용은 정확하게 그룹 구성원 중 하나가 소정의 생성물 또는 방법에 존재하거나, 이들에서 사용되거나, 그렇지 않으면 이들과 관련되는 실시형태를 포함한다. 본 개시내용은 그룹 구성원 중 하나 초과 또는 모두가 소정의 생성물 또는 방법에 존재하거나, 이들에서 사용되거나, 그렇지 않으면 이들과 관련되는 실시형태를 포함한다.

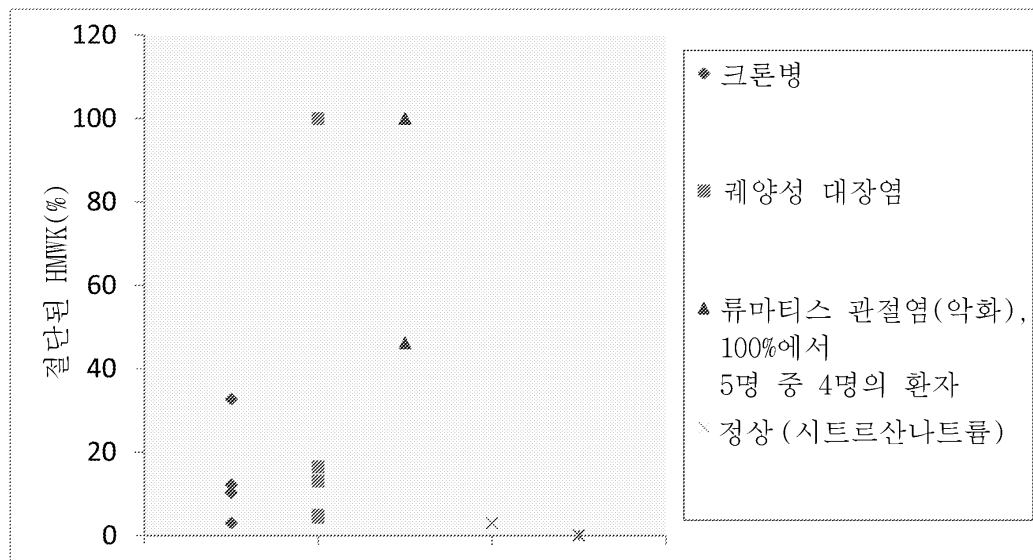
[0301] 더욱이, 본 개시내용은 하나 이상의 기재된 청구항으로부터의 하나 이상의 제한, 부재, 조항 및 설명적 용어가 또 다른 청구항으로 도입되는 모든 변형, 조합 및 순열을 포함한다. 예를 들어, 또 다른 청구항에 종속하는 임의의 청구항은 동일한 기본 청구항에 종속하는 임의의 다른 청구항에서 발견되는 하나 이상의 제한을 포함하도록 변형될 수 있다. 부재가 예를 들어 마쿠쉬 그룹 포맷으로 목록으로 제시되는 경우, 부재의 각각의 하위그룹이 또한 개시되고, 임의의 부재(들)는 그룹으로부터 제거될 수 있다. 일반적으로 본 개시내용 또는 본 개시내용의 양상이 특정한 부재 및/또는 특징을 포함하는 것으로 언급되는 경우, 본 개시내용의 소정의 실시형태 또는 본 개시내용의 양상이 이러한 부재 및/또는 특징으로 이루어지거나, 본질적으로 이루어지는 것으로 이해되어야 한다. 단순함의 목적을 위해, 이 실시형태는 본 명세서에 다른 말로 구체적으로 기재되어 있지 않다. 용어 "포함하는" 및 "함유하는"은 개방적이고 부가적인 부재 또는 단계의 포함을 허용하는 것으로 의도된다는 것에 또한 주목한다. 범위가 제공되는 경우, 종점이 포함된다. 더욱이, 달리 표시되지 않는 한 또는 그렇지 않으면 문맥 및 당해 분야의 당업자의 이해로부터 명확하지 않은 한, 범위로서 표시된 값은, 문맥이 명확히 달리 기술하지 않는 한, 범위의 하한의 단위의 10/1까지, 본 개시내용의 상이한 실시형태에서 기술된 범위 내의 임의의 특정한 값 또는 하위범위를 취할 수 있다.

[0302] 본원은 다양한 등록 특허, 공개 특허 출원, 저널 논문 및 다른 공보(이들 모두 본 명세서에 참조문헌으로 포함됨)에 관한 것이다. 임의의 도입된 참조와 본 명세서 사이에 상충이 있는 경우, 명세서가 우세해야 한다. 또한, 선행 기술 내에 해당하는 본 개시내용의 임의의 특정한 실시형태는 임의의 하나 이상의 청구항으로부터 명백히 배제될 수 있다. 이러한 실시형태가 당해 분야의 당업자에게 공지된 것으로 생각되므로, 이들은 본 명세서에 배제가 명백히 기재되지 않더라도 배제될 수 있다. 본 개시내용의 임의의 특정한 실시형태는 선행 기술의 존재와 관련되든 또는 관련되지 않든, 임의의 이유로, 임의의 청구항으로부터 배제될 수 있다.

[0303] 당해 분야의 당업자는 단지 일상적인 것에 지나지 않는 실험을 사용하여 본 명세서에 기재된 특정한 실시형태에 대한 많은 균등물을 인식하거나 확신할 수 있을 것이다. 본 명세서에 기재된 본 실시형태의 범위는 상기 설명을 제한하는 것으로 의도되지 않고, 오히려 첨부된 청구범위에 기재되어 있다. 당해 분야의 당업자는 이 설명에 대한 다양한 변경 및 변형이 하기 청구항에 정의된 바대로 본 개시내용의 사상 또는 정신으로부터 벗어나지 않으면서 만들어질 수 있다는 것을 이해할 것이다.

도면

도면1



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> DYAX CORP.
- <120> DIAGNOSIS AND TREATMENT OF AUTOIMMUNE DISEASES
- <130> WO 2015/061182
- <140> PCT/US2014/061242
- <141> 2014-10-17
- <150> US 61/893,542
- <151> 2013-10-21
- <160> 7
- <170> PatentIn version 2.0
- <210> 1
- <211> 58
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Synthetic Polypeptide
- <220><221> misc_feature
- <222> (1)..(4)
- <223> Xaa can be any amino acid except for Cys

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(11)

<223> Xaa can be any amino acid except for Cys

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> Xaa can be any amino acid except for Cys

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(29)

<223> Xaa can be any amino acid except for Cys

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(32)

<223> Xaa can be any amino acid except for Cys

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(35)

<223> Xaa can be any amino acid except for Cys

<220><221> misc_feature

<222> (39)..(50)

<223> Xaa can be any amino acid except for Cys

<220><221> misc_feature

<

222> (52)..(54)

<223> Xaa can be any amino acid except for Cys

<220><221> misc_feature

<222> (56)..(58)

<223> Xaa can be any amino acid except for Cys

<400> 1

Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Cys Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa

20 25 30

Phe Xaa Xaa Gly Gly Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

35 40 45

Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa

50 55

<210> 2

<211> 60

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 2

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys

1 5 10 15

Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys

20 25 30

Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu

35 40 45

Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp

50 55 60

<210> 3

<211> 638

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ile Leu Phe Lys Gln Ala Thr Tyr Phe Ile Ser Leu Phe Ala Thr

1 5 10 15

Val Ser Cys Gly Cys Leu Thr Gln Leu Tyr Glu Asn Ala Phe Phe Arg

20 25 30

Gly Gly Asp Val Ala Ser Met Tyr Thr Pro Asn Ala Gln Tyr Cys Gln

35 40 45

Met Arg Cys Thr Phe His Pro Arg Cys Leu Leu Phe Ser Phe Leu Pro

50 55 60

Ala Ser Ser Ile Asn Asp Met Glu Lys Arg Phe Gly Cys Phe Leu Lys

65 70 75 80

Asp Ser Val Thr Gly Thr Leu Pro Lys Val His Arg Thr Gly Ala Val

85 90 95

Ser Gly His Ser Leu Lys Gln Cys Gly His Gln Ile Ser Ala Cys His

100 105 110
Arg Asp Ile Tyr Lys Gly Val Asp Met Arg Gly Val Asn Phe Asn Val

115 120 125
Ser Lys Val Ser Ser Val Glu Glu Cys Gln Lys Arg Cys Thr Ser Asn

130 135 140
Ile Arg Cys Gln Phe Phe Ser Tyr Ala Thr Gln Thr Phe His Lys Ala

145 150 155 160
Glu Tyr Arg Asn Asn Cys Leu Leu Lys Tyr Ser Pro Gly Gly Thr Pro

165 170 175
Thr Ala Ile Lys Val Leu Ser Asn Val Glu Ser Gly Phe Ser Leu Lys

180 185 190
Pro Cys Ala Leu Ser Glu Ile Gly Cys His Met Asn Ile Phe Gln His

195 200 205
Leu Ala Phe Ser Asp Val Asp Val Ala Arg Val Leu Thr Pro Asp Ala

210 215 220
Phe Val Cys Arg Thr Ile Cys Thr Tyr His Pro Asn Cys Leu Phe Phe

225 230 235 240
Thr Phe Tyr Thr Asn Val Trp Lys Ile Glu Ser Gln Arg Asn Val Cys

245 250 255
Leu Leu Lys Thr Ser Glu Ser Gly Thr Pro Ser Ser Ser Thr Pro Gln

260 265 270
Glu Asn Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Leu Leu Thr Cys Lys Arg Thr Leu

275 280 285
Pro Glu Pro Cys His Ser Lys Ile Tyr Pro Gly Val Asp Phe Gly Gly

290 295 300
Glu Glu Leu Asn Val Thr Phe Val Lys Gly Val Asn Val Cys Gln Glu

305 310 315 320
Thr Cys Thr Lys Met Ile Arg Cys Gln Phe Phe Thr Tyr Ser Leu Leu

325 330 335
Pro Glu Asp Cys Lys Glu Glu Lys Cys Lys Cys Phe Leu Arg Leu Ser

340 345 350
 Met Asp Gly Ser Pro Thr Arg Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Gly Ser Ser

 355 360 365
 Gly Tyr Ser Leu Arg Leu Cys Asn Thr Gly Asp Asn Ser Val Cys Thr
 370 375 380
 Thr Lys Thr Ser Thr Arg Ile Val Gly Gly Thr Asn Ser Ser Trp Gly
 385 390 395 400
 Glu Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Val Lys Leu Thr Ala Gln Arg
 405 410 415
 His Leu Cys Gly Gly Ser Leu Ile Gly His Gln Trp Val Leu Thr Ala

 420 425 430
 Ala His Cys Phe Asp Gly Leu Pro Leu Gln Asp Val Trp Arg Ile Tyr
 435 440 445
 Ser Gly Ile Leu Asn Leu Ser Asp Ile Thr Lys Asp Thr Pro Phe Ser
 450 455 460
 Gln Ile Lys Glu Ile Ile Ile His Gln Asn Tyr Lys Val Ser Glu Gly
 465 470 475 480
 Asn His Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Gln Ala Pro Leu Asn Tyr Thr

 485 490 495
 Glu Phe Gln Lys Pro Ile Cys Leu Pro Ser Lys Gly Asp Thr Ser Thr
 500 505 510
 Ile Tyr Thr Asn Cys Trp Val Thr Gly Trp Gly Phe Ser Lys Glu Lys
 515 520 525
 Gly Glu Ile Gln Asn Ile Leu Gln Lys Val Asn Ile Pro Leu Val Thr
 530 535 540
 Asn Glu Glu Cys Gln Lys Arg Tyr Gln Asp Tyr Lys Ile Thr Gln Arg

 545 550 555 560
 Met Val Cys Ala Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Lys Asp Ala Cys Lys Gly
 565 570 575
 Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Lys His Asn Gly Met Trp Arg Leu
 580 585 590

Val Gly Ile Thr Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg Arg Glu Gln Pro
595 600 605

Gly Val Tyr Thr Lys Val Ala Glu Tyr Met Asp Trp Ile Leu Glu Lys

610 615 620

Thr Gln Ser Ser Asp Gly Lys Ala Gln Met Gln Ser Pro Ala

625 630 635

<210> 4

<211> 262

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Trp Phe Leu Val Leu Cys Leu Ala Leu Ser Leu Gly Gly Thr Gly

1 5 10 15

Ala Ala Pro Pro Ile Gln Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu

20 25 30

Gln His Ser Gln Pro Trp Gln Ala Ala Leu Tyr His Phe Ser Thr Phe

35 40 45

Gln Cys Gly Gly Ile Leu Val His Arg Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala

50 55 60

His Cys Ile Ser Asp Asn Tyr Gln Leu Trp Leu Gly Arg His Asn Leu

65 70 75 80

Phe Asp Asp Glu Asn Thr Ala Gln Phe Val His Val Ser Glu Ser Phe

85 90 95

Pro His Pro Gly Phe Asn Met Ser Leu Leu Glu Asn His Thr Arg Gln

100 105 110

Ala Asp Glu Asp Tyr Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Thr Glu

115 120 125

Pro Ala Asp Thr Ile Thr Asp Ala Val Lys Val Val Glu Leu Pro Thr

130 135 140

Gln Glu Pro Glu Val Gly Ser Thr Cys Leu Ala Ser Gly Trp Gly Ser

145 150 155 160

Ile Glu Pro Glu Asn Phe Ser Phe Pro Asp Asp Leu Gln Cys Val Asp
165 170 175
Leu Lys Ile Leu Pro Asn Asp Glu Cys Lys Lys Val His Val Gln Lys
180 185 190
Val Thr Asp Phe Met Leu Cys Val Gly His Leu Glu Gly Gly Lys Asp
195 200 205
Thr Cys Val Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Asp Gly Val Leu
210 215 220

Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Val Pro Cys Gly Thr Pro Asn Lys
225 230 235 240
Pro Ser Val Ala Val Arg Val Leu Ser Tyr Val Lys Trp Ile Glu Asp
245 250 255
Thr Ile Ala Glu Asn Ser
260

<210> 5

<211> 644

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Lys Leu Ile Thr Ile Leu Phe Leu Cys Ser Arg Leu Leu Leu Ser
1 5 10 15

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

Gly Asp Cys Pro Val Gln Ser Gly Lys Thr Trp Gln Asp Cys Glu Tyr
85 90 95
Lys Asp Ala Ala Lys Ala Ala Thr Gly Glu Cys Thr Ala Thr Val Gly

100	105	110	
Lys Arg Ser Ser Thr Lys Phe Ser Val Ala Thr Gln Thr Cys Gln Ile			
115	120	125	
Thr Pro Ala Glu Gly Pro Val Val Thr Ala Gln Tyr Asp Cys Leu Gly			
130	135	140	
Cys Val His Pro Ile Ser Thr Gln Ser Pro Asp Leu Glu Pro Ile Leu			
145	150	155	160
Arg His Gly Ile Gln Tyr Phe Asn Asn Asn Thr Gln His Ser Ser Leu			
165	170	175	
Phe Met Leu Asn Glu Val Lys Arg Ala Gln Arg Gln Val Val Ala Gly			
180	185	190	
Leu Asn Phe Arg Ile Thr Tyr Ser Ile Val Gln Thr Asn Cys Ser Lys			
195	200	205	
Glu Asn Phe Leu Phe Leu Thr Pro Asp Cys Lys Ser Leu Trp Asn Gly			
210	215	220	
Asp Thr Gly Glu Cys Thr Asp Asn Ala Tyr Ile Asp Ile Gln Leu Arg			
225	230	235	240
Ile Ala Ser Phe Ser Gln Asn Cys Asp Ile Tyr Pro Gly Lys Asp Phe			
245	250	255	
Val Gln Pro Pro Thr Lys Ile Cys Val Gly Cys Pro Arg Asp Ile Pro			
260	265	270	
Thr Asn Ser Pro Glu Leu Glu Glu Thr Leu Thr His Thr Ile Thr Lys			
275	280	285	
Leu Asn Ala Glu Asn Asn Ala Thr Phe Tyr Phe Lys Ile Asp Asn Val			
290	295	300	
Lys Lys Ala Arg Val Gln Val Val Ala Gly Lys Lys Tyr Phe Ile Asp			
305	310	315	320
Phe Val Ala Arg Glu Thr Thr Cys Ser Lys Glu Ser Asn Glu Glu Leu			
325	330	335	
Thr Glu Ser Cys Glu Thr Lys Lys Leu Gly Gln Ser Leu Asp Cys Asn			
340	345	350	

Ala Glu Val Tyr Val Val Pro Trp Glu Lys Lys Ile Tyr Pro Thr Val
355 360 365

Asn Cys Gln Pro Leu Gly Met Ile Ser Leu Met Lys Arg Pro Pro Gly
370 375 380

Phe Ser Pro Phe Arg Ser Ser Arg Ile Gly Glu Ile Lys Glu Glu Thr
385 390 395 400

Thr Val Ser Pro Pro His Thr Ser Met Ala Pro Ala Gln Asp Glu Glu
405 410 415

Arg Asp Ser Gly Lys Glu Gln Gly His Thr Arg Arg His Asp Trp Gly
420 425 430

His Glu Lys Gln Arg Lys His Asn Leu Gly His Gly His Lys His Glu
435 440 445

Arg Asp Gln Gly His Gly His Gln Arg Gly His Gly Leu Gly His Gly
450 455 460

His Glu Gln Gln His Gly Leu Gly His Gly His Lys Phe Lys Leu Asp
465 470 475 480

Asp Asp Leu Glu His Gln Gly Gly His Val Leu Asp His Gly His Lys
485 490 495

His Lys His Gly His Gly His Gly Lys His Lys Asn Lys Gly Lys Lys
500 505 510

Asn Gly Lys His Asn Gly Trp Lys Thr Glu His Leu Ala Ser Ser Ser
515 520 525

Glu Asp Ser Thr Thr Pro Ser Ala Gln Thr Gln Glu Lys Thr Glu Gly
530 535 540

Pro Thr Pro Ile Pro Ser Leu Ala Lys Pro Gly Val Thr Val Thr Phe
545 550 555 560

Ser Asp Phe Gln Asp Ser Asp Leu Ile Ala Thr Met Met Pro Pro Ile
565 570 575

Ser Pro Ala Pro Ile Gln Ser Asp Asp Asp Trp Ile Pro Asp Ile Gln
580 585 590

Ile Asp Pro Asn Gly Leu Ser Phe Asn Pro Ile Ser Asp Phe Pro Asp

595 600 605
 Thr Thr Ser Pro Lys Cys Pro Gly Arg Pro Trp Lys Ser Val Ser Glu
 610 615 620
 Ile Asn Pro Thr Thr Gln Met Lys Glu Ser Tyr Tyr Phe Asp Leu Thr
 625 630 635 640
 Asp Gly Leu Ser

<210> 6

<211> 362

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 6

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

Cys Pro Val Gln Ser Gly Lys Thr Trp Gln Asp Cys Glu Tyr Lys Asp
 65 70 75 80
 Ala Ala Lys Ala Ala Thr Gly Glu Cys Thr Ala Thr Val Gly Lys Arg
 85 90 95
 Ser Ser Thr Lys Phe Ser Val Ala Thr Gln Thr Cys Gln Ile Thr Pro
 100 105 110
 Ala Glu Gly Pro Val Val Thr Ala Gln Tyr Asp Cys Leu Gly Cys Val
 115 120 125

His Pro Ile Ser Thr Gln Ser Pro Asp Leu Glu Pro Ile Leu Arg His
 130 135 140
 Gly Ile Gln Tyr Phe Asn Asn Asn Thr Gln His Ser Ser Leu Phe Met

145 150 155 160
 Leu Asn Glu Val Lys Arg Ala Gln Arg Gln Val Val Ala Gly Leu Asn
 165 170 175
 Phe Arg Ile Thr Tyr Ser Ile Val Gln Thr Asn Cys Ser Lys Glu Asn
 180 185 190

 Phe Leu Phe Leu Thr Pro Asp Cys Lys Ser Leu Trp Asn Gly Asp Thr
 195 200 205
 Gly Glu Cys Thr Asp Asn Ala Tyr Ile Asp Ile Gln Leu Arg Ile Ala
 210 215 220
 Ser Phe Ser Gln Asn Cys Asp Ile Tyr Pro Gly Lys Asp Phe Val Gln
 225 230 235 240
 Pro Pro Thr Lys Ile Cys Val Gly Cys Pro Arg Asp Ile Pro Thr Asn
 245 250 255

 Ser Pro Glu Leu Glu Glu Thr Leu Thr His Thr Ile Thr Lys Leu Asn
 260 265 270
 Ala Glu Asn Asn Ala Thr Phe Tyr Phe Lys Ile Asp Asn Val Lys Lys
 275 280 285
 Ala Arg Val Gln Val Val Ala Gly Lys Lys Tyr Phe Ile Asp Phe Val
 290 295 300
 Ala Arg Glu Thr Thr Cys Ser Lys Glu Ser Asn Glu Glu Leu Thr Glu
 305 310 315 320

 Ser Cys Glu Thr Lys Lys Leu Gly Gln Ser Leu Asp Cys Asn Ala Glu
 325 330 335
 Val Tyr Val Val Pro Trp Glu Lys Lys Ile Tyr Pro Thr Val Asn Cys
 340 345 350
 Gln Pro Leu Gly Met Ile Ser Leu Met Lys
 355 360

 <210> 7
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 7

Ser Ser Arg Ile Gly Glu Ile Lys Glu Glu Thr Thr Val Ser Pro Pro

1 5 10 15

His Thr Ser Met Ala Pro Ala Gln Asp Glu Glu Arg Asp Ser Gly Lys

20 25 30

Glu Gln Gly His Thr Arg Arg His Asp Trp Gly His Glu Lys Gln Arg

35 40 45

Lys His Asn Leu Gly His Gly His Lys His Glu Arg Asp Gln Gly His

50 55 60

Gly His Gln Arg Gly His Gly Leu Gly His Gly His Glu Gln Gln His

65 70 75 80

Gly Leu Gly His Gly His Lys Phe Lys Leu Asp Asp Asp Leu Glu His

85 90 95

Gln Gly Gly His Val Leu Asp His Gly His Lys His Lys His Gly His

100 105 110

Gly His Gly Lys His Lys Asn Lys Gly Lys Lys Asn Gly Lys His Asn

115 120 125

Gly Trp Lys Thr Glu His Leu Ala Ser Ser Ser Glu Asp Ser Thr Thr

130 135 140

Pro Ser Ala Gln Thr Gln Glu Lys Thr Glu Gly Pro Thr Pro Ile Pro

145 150 155 160

Ser Leu Ala Lys Pro Gly Val Thr Val Thr Phe Ser Asp Phe Gln Asp

165 170 175

Ser Asp Leu Ile Ala Thr Met Met Pro Pro Ile Ser Pro Ala Pro Ile

180 185 190

Gln Ser Asp Asp Asp Trp Ile Pro Asp Ile Gln Ile Asp Pro Asn Gly

195 200 205

Leu Ser Phe Asn Pro Ile Ser Asp Phe Pro Asp Thr Thr Ser Pro Lys

210 215 220

Cys Pro Gly Arg Pro Trp Lys Ser Val Ser Glu Ile Asn Pro Thr Thr

225 230 235 240

Gln Met Lys Glu Ser Tyr Tyr Phe Asp Leu Thr Asp Gly Leu Ser
 245 250 255