(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0006238
(43) 공개일자 2025년01월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61P 27/02 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2024-7039210
(22) 출원일자(국제) 2023년04월28일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년11월25일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/066393
(87) 국제공개번호 WO 2023/212719
국제공개일자 2023년11월02일
(30) 우선권주장
63/336,539 2022년04월29일 미국(US)

(71) 출원인
애넥슨, 인코포레이티드
미국 캘리포니아주 94005 브리즈번 시에라 포인트 파크웨이 1400, 빌딩 씨 2엔디 플로워
(72) 발명자
야드녹, 테드
미국 캘리포니아주 94005 브리즈번 시에라 포인트 파크웨이 1400, 빌딩 씨 2엔디 플로워 씨/오 애넥슨, 인크.
테일러, 로리
미국 캘리포니아주 94005 브리즈번 시에라 포인트 파크웨이 1400, 빌딩 씨 2엔디 플로워 씨/오 애넥슨, 인크.
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인아이플레이

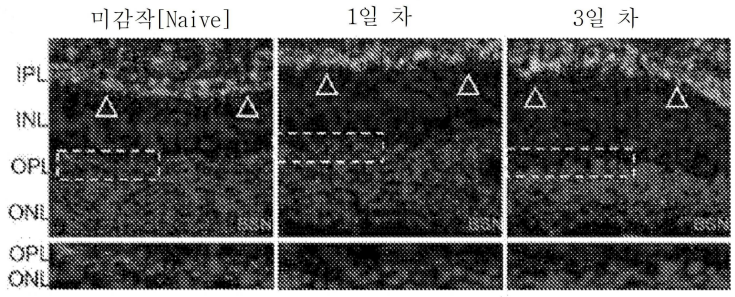
전체 청구항 수 : 총 43 항

(54) 발명의 명칭 **안구 질환을 치료하기 위한 조성물 및 방법**

(57) 요 약

본 개시는 일반적으로 유전성 망막 질환[inherited retinal disease, IRD](예를 들어, 망막색소변성증, 맥락막 결손, 스타르가르트병, 원뿔막대세포 이상증, 레버 선천성 흑암시), X-염색체 연관 RP, 및 어셔 증후군 또는 망막 박리를 예방하거나, 발병 위험을 감소시키거나, 치료하는 조성물 및 방법에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/54 (2013.01)
A61K 2039/545 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
(72) 발명자
그로버, 아니타
미국 캘리포니아주 94005 브리즈번 시에라 포인트 파크웨이 1400, 빌딩 씨 2엔디 플로워 씨/오 애넥슨, 인크.
퐁, 도널드
미국 캘리포니아주 94005 브리즈번 시에라 포인트 파크웨이 1400, 빌딩 씨 2엔디 플로워 씨/오 애넥슨, 인크.

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 환자의 유전성 망막 질환을 치료하는 방법으로서, 상기 치료방법은 항-C1q 항체 약 1 mg 내지 약 10 mg을 포함하는 조성물을 유리체강 내 주사를 통해 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하고,

이때, 상기 항체는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 HVR-L1, 서열 번호 6의 아미노산을 갖는 HVR-L2, 및 서열 번호 7의 아미노산을 갖는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 서열 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 HVR-H1, 서열 번호 10의 아미노산을 갖는 HVR-H2, 및 서열 번호 11의 아미노산을 갖는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는, 치료방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유전성 망막 질환은 망막색소변성증인, 치료방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 유전성 망막 질환은 맥락막결손인, 치료방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 유전성 망막 질환은 스타르가르트병인, 치료방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 유전성 망막 질환은 원뿔막대세포 이상증인, 치료방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 유전성 망막 질환은 레버 선천성 흑암시[leber congenital amaurosis]인, 치료방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 유전성 망막 질환은 X-염색체 연관 RP인, 치료방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 유전성 망막 질환은 어셔 증후군인, 치료방법.

청구항 9

인간 환자의 망막 박리를 치료하는 방법으로서, 상기 치료방법은 항-C1q 항체 약 1 mg 내지 약 10 mg을 포함하는 조성물을 유리체강 내 주사를 통해 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하고,

이때, 상기 항체는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 HVR-L1, 서열 번호 6의 아미노산을 갖는 HVR-L2, 및 서열 번호 7의 아미노산을 갖는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 서열 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 HVR-H1, 서열 번호 10의 아미노산을 갖는 HVR-H2, 및 서열 번호 11의 아미노산을 갖는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는, 치료방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 항-C1q 항체는 망막 박리 수술 전에 투여되는, 치료방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 항-C1q 항체는 망막 박리 수술 후에 투여되는, 치료방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 항-C1q 항체는 망막 박리 수술과 동시에 투여되는, 치료방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 인간 환자의 시력을 회복시키는, 치료방법.

청구항 14

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 인간 환자의 시력을 개선하는, 치료방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 서열 번호 4 및 35~38에서 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 상기 경쇄 가변 도메인은 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 HVR-L1, 서열 번호 6의 아미노산을 갖는 HVR-L2, 및 서열 번호 7의 아미노산을 갖는 HVR-L3을 포함하는, 치료방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 경쇄 가변 도메인은 서열 번호 4 및 35~38에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 치료방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 서열 번호 8 및 31~34에서 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하고, 상기 중쇄 가변 도메인은 서열 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 HVR-H1, 서열 번호 10의 아미노산을 갖는 HVR-H2, 및 서열 번호 11의 아미노산을 갖는 HVR-H3을 포함하는, 치료방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 중쇄 가변 도메인은 서열 번호 8 및 31~34에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 치료방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 단일 클론 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 키메라 항체, 항체 단편, 또는 이의 항체 유도체인, 치료방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 항체는 항체 단편이고, 상기 항체 단편은 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')2 단편, Fv 단편, 디아바디(diabody) 또는 단일 쇄 항체 분자인, 치료방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 Fab 단편은 서열 번호 39의 중쇄 Fab 단편 및 서열 번호 40의 경쇄 Fab 단편을 포함하는, 치료방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 주 1회 투여되는, 치료방법.

청구항 23

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 격주로 1회 투여되는, 치료방법.

청구항 24

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 3주마다 1회 투여되는, 치료방법.

청구항 25

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 월 1회 투여되는, 치료방법.

청구항 26

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 4주마다 1회 투여되는, 치료방법.

청구항 27

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 6주마다 1회 투여되는, 치료방법.

청구항 28

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 8주마다 1회 투여되는, 치료방법.

청구항 29

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 격월로 1회 투여되는, 치료방법.

청구항 30

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 10주마다 1회 투여되는, 치료방법.

청구항 31

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 12주마다 1회 투여되는, 치료방법.

청구항 32

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 3개월마다 1회 투여되는, 치료방법.

청구항 33

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 4개월마다 1회 투여되는, 치료방법.

청구항 34

제22항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 적어도 3개월, 적어도 4개월, 적어도 6개월, 적어도 7개월, 적어도 8개월, 적어도 9개월, 적어도 10개월, 적어도 11개월 또는 적어도 12개월 동안 투여되는, 치료방법.

청구항 35

제22항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 12개월 동안 투여되는, 치료방법.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여된 조성물은 상기 항-C1q 항체 약 1 mg, 약 1.5 mg, 약 2 mg, 약 2.5 mg, 약 3 mg, 약 3.5 mg, 약 4 mg, 약 4.5 mg, 약 5 mg, 약 5.5 mg, 약 6 mg, 약 6.5 mg, 약 7 mg, 약 7.5 mg, 약 8 mg, 약 8.5 mg, 약 9 mg, 약 9.5 mg, 또는 약 10 mg을 포함하는, 치료방법.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 상기 항-C1q 항체 약 1 mg 투여를 포함하는, 치료방법.

청구항 38

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 상기 항-C1q 항체 약 2.5 mg 투여를 포함하는, 치료방법.

청구항 39

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 상기 항-C1q 항체 약 5 mg 투여를 포함하는, 치료방법.

청구항 40

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 상기 항-C1q 항체 약 2 mg 투여를 포함하는, 치료방법.

청구항 41

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 상기 항-C1q 항체 약 5 mg 투여를 포함하는, 치료방법.

청구항 42

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 상기 항-C1q 항체 약 10 mg 투여를 포함하는, 치료방법.

청구항 43

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 상기 항-C1q 항체 약 1 mg 내지 약 2.5 mg, 약 2.5 mg 내지 약 5 mg, 약 5 mg 내지 약 7.5 mg, 또는 약 7.5 mg 내지 약 10 mg 투여를 포함하는, 치료방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 특허 출원은 2022년 4월 29일에 출원된 미국 특허 가출원 제63/336,539호에 대한 우선권을 주장하며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

배 경 기 술

[0003] 유전성 망막 질환[Inherited retinal disease, IRD]은 심각한 시력 상실 또는 심지어 실명을 일으킬 수 있는 질환군이다. 각 IRD는 정상적으로 작동하지 않는 적어도 하나의 유전자에 의해 발생한다. IRD(예컨대 망막색소변성증)는 모든 연령의 개인에게 영향을 미칠 수 있으며 다른 속도로 진행될 수 있고 드물게 발생한다. 하지만 대부분은 진행성인데, 이는 시간이 지날수록 질환 증상이 심해진다는 의미이다. 현재 치료에 대한 접근법은 유전적 결함을 고치는 것을 목표로 하지만, 수많은 유전적 결함이 있고 각각의 결함은 소수의 환자에게만 영향을 미친다. 유일하게 승인된 치료제인 보레티진 네파보벡-르질(voretigene neparvovec-rzyl)은 유전자 돌연변이 RPE65에 대해 표시되지만 이 유전자는 1~2%의 IRD 환자에만 존재한다. 또 다른 접근법은 망막을 직접 자극하기 위해 빛을 전기 에너지로 변환하는 '망막 보철물'이라는 장치를 사용하지만 이 접근법은 질병의 병태생리를 다루지 않는다. 현재 IRD에 대한 승인된 유전자 불문 치료제 또는 요법이 없다. 따라서 IRD 환자에 대한 치료에 대해 상당한 미충족 수요가 있다.

[0004] 망막 박리는 망막이 지지 조직의 하부 층에서 박리되는 눈의 장애이다. 망막 박리는 연간 10만 명당 약 10~12 증례가 발생한다. 증례 중 약 50%의 경우, 중심 망막이 박리되어 황반 박리가 동반된 망막 박리가 발생한다. 중심 망막이 박리되면 망막 재부착에 성공하여도 시력 회복은 박리 전 시력의 약 50%에 그친다. 이러한 제한된 시력 회복의 원인은 광수용체 변성이다. 황반 박리가 동반된 망막 박리 수술의 성공 이후 시각 기능을 개선하기 위한 승인된 치료제나 요법이 없다. 따라서 망막 박리 환자에 대한 치료제에 대해 상당한 미충족 수요가 있다.

발명의 내용

[0005] 본 개시 내용은 일반적으로 인간 환자에서 유전성 망막 질환[inherited retinal disease, IRD](예를 들어, 망막색소변성증/원뿔막대세포 이상증, 맥락막결손, 스타르가르트병, 원뿔막대세포 이상증, 레버 선천성 흑암시, X-염색체 연관 RP, 어셔 증후군) 및/또는 망막 박리를 예방하거나, 이의 발병 위험을 감소시키거나, 치료하는 조

성물 및 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 항-C1q 항체는 망막 박리 수술 전에, 망막 박리 수술 후에, 그리고/또는 망막 박리 수술과 동시에 투여된다. 이러한 방법은 인간 환자의 시력을 회복시키고/시키거나 인간 환자의 시력을 개선할 수 있다.

[0006] 이러한 방법은 약 1 mg 내지 약 10 mg의 항-C1q 항체를 포함하는 조성물을 유리체강 내 주사를 통해 환자에게 투여하는 단계를 포함하되, 이러한 항체는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 HVR-L1, 서열 번호 6의 아미노산을 갖는 HVR-L2, 및 서열 번호 7의 아미노산을 갖는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 및, 서열 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 HVR-H1, 서열 번호 10의 아미노산을 갖는 HVR-H2, 및 서열 번호 11의 아미노산을 갖는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 서열 번호 4 및 35~38에서 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 이러한 경쇄 가변 도메인은 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 HVR-L1, 서열 번호 6의 아미노산을 갖는 HVR-L2, 및 서열 번호 7의 아미노산을 갖는 HVR-L3을 포함한다. 일부 구현예에서 경쇄 가변 도메인은 서열 번호 4 및 35~38에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 서열 번호 8 및 31~34에서 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하고, 이러한 중쇄 가변 도메인은 서열 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 HVR-H1, 서열 번호 10의 아미노산을 갖는 HVR-H2, 및 서열 번호 11의 아미노산을 갖는 HVR-H3을 포함한다. 일부 구현예에서, 중쇄 가변 도메인은 서열 번호 8 및 31~34에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 서열 번호 4 및 35~38에서 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 이러한 경쇄 가변 도메인은 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 HVR-L1, 서열 번호 6의 아미노산을 갖는 HVR-L2, 및 서열 번호 7의 아미노산을 갖는 HVR-L3 및, 서열 번호 8 및 31~34에서 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하고, 이러한 중쇄 가변 도메인은 서열 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 HVR-H1, 서열 번호 10의 아미노산을 갖는 HVR-H2, 및 서열 번호 11의 아미노산을 갖는 HVR-H3을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 서열 번호 4 및 35~38에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 및 서열 번호 8 및 31~34에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 항체는 단일 클론 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 키메라 항체, 항체 단편 또는 이의 항체 유도체일 수 있다. 항체 단편은 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')2 단편, Fv 단편, 디아바디(diabody) 또는 단일 쇄 항체 분자일 수 있다. 일부 구현예에서, Fab 단편은 서열 번호 39의 중쇄 Fab 단편 및 서열 번호 40의 경쇄 Fab 단편을 포함한다.

[0007] 일부 구현예에서, 항체는 주 1회, 격주로 1회, 3주마다 1회, 월 1회, 4주마다 1회, 6주마다 1회, 8주마다 1회, 격월로 1회, 10주마다 1회, 12주마다 1회, 3개월마다 1회, 또는 4개월마다 1회 투여된다. 일부 구현예에서, 항체는 적어도 6개월, 적어도 7개월, 적어도 8개월, 적어도 9개월, 적어도 10개월, 적어도 11개월 또는 적어도 12개월 동안 투여된다.

[0008] 일부 구현예에서, 투여된 조성물은 항-C1q 항체를 약 1 mg, 약 1.5 mg, 약 2 mg, 약 2.5 mg, 약 3 mg, 약 3.5 mg, 약 4 mg, 약 4.5 mg, 약 5 mg, 약 5.5 mg, 약 6 mg, 약 6.5 mg, 약 7 mg, 약 7.5 mg, 약 8 mg, 약 8.5 mg, 약 9 mg, 약 9.5 mg, 또는 약 10 mg 포함한다. 투여된 조성물은 항-C1q 항체를 약 1 mg 내지 약 5 mg 포함할 수 있다. 투여된 조성물은 항-C1q 항체를 약 1 mg 내지 약 2.5 mg, 약 2.5 mg 내지 약 5 mg, 약 5 mg 내지 약 7.5 mg, 또는 약 7.5 mg 내지 약 10 mg 포함할 수 있다. 투여된 조성물은 항-C1q 항체를 약 5 mg 포함할 수 있다. 투여된 조성물은 항-C1q 항체를 약 10 mg 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] **도 1a~1f**는 광 노출 후 광수용체 손상과 미세아교 세포증을 보여준다. **도 1a~1c**는 면역형광[immunofluorescence, IF] 이미지 및 정량화를 보여주며, 광 손상 후 광수용체 시냅스(Basson) 및 세포체(Dapi)의 진행성 손실을 보여준다. **도 1d~1f**는 광 손상 후 증가된 미세아교세포/대식세포 반응성(Iba1 및 CD68)을 보여주는 IF 이미지 및 정량화를 보여준다. 시냅스 층에서 포식 미세아교 세포의 분포는 유의한 시냅스 손실이 처음 관찰된 1일 차에 최고조에 달했다.

도 2a~2e는 광 노출 후 망막 내 보체 특징 및 C1q 분포를 보여준다. **도 2a~2c**는 광 손상 후 망막 용해물 내 초기 고전적 보체 성분 C1q 및 C1s뿐만 아니라 하류 활성화 생성물 C3d의 증가된 수준을 나타내는 ELISA 분석을 보여준다. **도 2d**는 망막 C1q 분포 및 미세아교세포/대식세포(Iba1) 및 시냅스(Bassoon)와의 공동 국소화를 나타내는 IF를 보여준다. **도 2e**는 OPL 내 C1q 수준과 광수용체 시냅스 밀도 사이에 유의한 음의 상관 관계를 나타내는 상관 관계 분석을 보여주며 이는 인과 관계와 일치한다.

도 3a~3e는 광 노출 후 미세아교세포 시냅스 포집을 보여준다. **도 3a**는 광 손상된 망막의 OPL 내 증가된 C1q 수준 및 Bassoon+ve 시냅스(i)에 대한 근접성을 나타내는 IF를 보여준다. **도 3b**는 광 손상된 망막 내 C1q 태그 시냅스의 미세아교세포 포집을 나타내는 고해상도 및 3D 표면 렌더링된 이미지를 보여준다. **도 3c~3e**는 미감작[naive]과 비교하여 광 손상된 망막 내 시냅스 밀도의 현저한 감소(**도 3c**), C1q 태그 시냅스의 백분율 증가(**도 3d**), 및 미세아교세포 포집된 C1q 태그 시냅스의 증가(**도 3e**)를 나타내는 정량적 분석을 보여준다.

도 4a~4f는 광수용체 시냅스에 대한 포스파티딜세린(phosphatidylserine, PS) 외재화 및 C1q에 대한 시험관 내 결합을 보여준다. **도 4a**는 광 손상된 망막의 OPL 내 PS의 PSVue 표지를 나타내는 IF를 보여준다. 3D 표면 렌더링된 이미지(i~ii)는 Bassoon 및 C1q에 대한 PSVue 근접성을 보여주며, 시냅스에 대한 PS 외재화를 나타낸다. **도 4b**는 PS 지질 비드에 대한 C1q의 결합을 나타내는 분석을 보여준다. 대조군 포스파티딜콜린(phophatidylcholine, PC) 비드에 대한 결합이 없다. **도 4c~4d**는 혈청 노출 PS 지질 비드상에 C1q 및 C4의 침착을 나타내는 분석을 보여준다. PC 비드상에서 침착이 관찰되지 않았다. **도 4e~4f**는 항-C1q 중화 항체의 존재하에 혈청 노출 PS 지질 비드상에 C1q 및 C4의 침착 감소를 나타내는 경쟁 분석을 보여준다.

도 5a~5d는 항-C1q 처리 후 망막 PK/PD를 보여준다. **도 5a~5d**는 항-C1q 치료 시 C1q, C1s 및 C3d 수준의 유의한 감소와 함께 항-C1q 치료 동물의 망막 용해물에서 측정 가능한 약물 수준을 나타내는 PK/PD 데이터를 보여준다.

도 6a~6c는 인간 GA 망막 내 C1q 분포를 나타낸다. **도 6a~6b**는 시냅스 전 마커 Vglut1(**도 6a**)에 대한 면역반응성 감소 및 광수용체 시냅스 층 OPL 내 C1q에 대한 증가된 표지(**도 6b**)를 나타내는 IF를 보여주며, 이는 건강한 공여자와 비교하여 GA 망막에서 발생하는 시냅스 손실 및 C1q 축적을 확증한다. **도 6c**는 인간 GA 공여자 망막 내 광수용체 시냅스와 C1q의 공동 국소화를 확인하는 C1q(회색), 시냅스 전 마커 Vglut1 및 시냅스 후 마커(HOMER1)에 대한 삼중 면역표지를 보여준다.

도 7은 인간 C1q 결합 분석을 보여준다. 단면 ELISA 내 인간 C1q에 대한 Mab2-Fab, FabA 및 Mab2의 결합이다. 결합된 항체 또는 Fab 분자가 효소-태그 항-인간-Fc 또는 항-인간 카파 항체를 사용한 후 효소 기질을 사용하여 검출되었다. 항체는 인간 C1q에 대해 유사한 결합 친화도를 보여주었다. Mab2-Fab, FabA 및 Mab2에 대한 EC50 = 각각 4.4, 2.5 및 4.9 ng/mL(34~95 pM 범위)이다.

도 8은 FabA가 고전 경로는 억제하지만 렉틴 및 대체 보체 경로는 억제하지 않음을 보여준다. FabA 및 Mab2는 Eurodiagnostica(WeislabTM)의 ELISA 기반 분석 키트를 사용하여 고전 경로, 렉틴 경로 및 대체 경로를 억제하는 능력에 대해 평가되었다. 웰은 고전 경로(IgM), 렉틴 경로(만난) 또는 대체 경로(리포 다당류)의 특이적 활성화제로 코팅되고 모든 경로의 활성화는 C5b-9 말단 복합 검출 항체를 사용하여 평가되었다. C5에 대한 억제 항체는 양성 대조군으로 사용되었다. FabA 및 Mab2는 ≤ 0.3 μg/mL의 IC50으로 고전 경로를 선택적으로 차단하는 반면 항-C5는 세 가지 경로를 모두 억제한다.

도 9는 인간 혈청 내 IgM 코팅된 RBC의 용혈 억제를 보여준다. 표면 반응성 다클론 IgM 항체로 미리 감작된 양 RBC를 인간 혈청(100배 희석됨)으로 37 ℃에서 20~30분 동안 동시 인큐베이션하였다. RBC 용혈은 헤모글로빈의 방출을 측정하여 정량화되었고, 비처리에 의해 유발된 용혈의 백분율로 표시되었다.

도 10은 Mab1-Fab, Mab1, 또는 Mab2로 처리된 눈의 시신경 내 손상된 축삭의 수가 감소함을 보여준다. 1일 차에 각 동물의 한쪽 눈 전방에 6 μm 폴리스타이렌 비드 1 μl, 10 μm 폴리스타이렌 비드(Polybead Microspheres; Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA) 1 μl 및 점탄성 용액(10 mg/mL 히알루론산 소듐, Advanced Medical Optics Inc., USA) 1 μl를 주입하여 각 동물의 한쪽 눈의 IOP 상승을 유도하였다. 반대쪽 눈은 처리하지 않은 채 그대로 두어 대조군으로 사용하였다. 마이크로비드 주입 하루 전 및 1주 후(0일 차 및 7일 차; 각 주입별 10 mg/mL 항체 생리식염수 2 μL 대 식염수 단독)에 항체 Mab2, Mab1 및 Mab1-Fab(Fab는 Mab1의 효소 분해에 의해 유래됨) 대 식염수를 마이크로비드 주입된 눈에 유리체강 내로 투여하였다. 손상 2주 후, 동물에서 시신경(식염수 및 4% 파라폼알데하이드로 관류시킴)을 수집하고, 4% 파라폼알데하이드 및 1% 오스뮴으로 후고정[postfix]하고, 상승하는 알코올 농도에서 탈수시키고, 1% 우라닐 아세테이트/에탄올에 넣었다. 신경은 에폭시 수지에 매립되었고 반초박 절편[semi-thin section](1 um)이 절단되었다. 변성하는 축삭의 총 수는 StereoInvestigator software(MicroBrightfield, Inc, VT, USA)를 사용하여 추정되었다. 스케일 바(scale bar) 20 um. Mab1-Fab 및 Mab2 모두 시신경 내 손상된 축삭의 형성을 유의하게 감소시켰고, 항체 Mab1은 유사한 경향을 보여주었다.

도 11a~11d는 Mab1 항체를 사용한 마우스 광손상 모델 내 광수용체 뉴런 손실 및 망막 기능의 보호를 보여준다.

도 11a는 7일 동안의 마우스의 광손상 모델에 이어 Mab1 항체를 유리체강 내[intravitreal, IVT] 투여하고 14일 차에 망막 기능 및 조직의 평가를 한 것을 보여준다. 7일 차에 마우스에게 IVT 투여를 통해 7.5 mg/mL Mab1 1 μL 또는 동종형 대조군 항체를 투여하였다. **도 11b**는 Mab1 처리가 동종형 대조군과 비교했을 때 망막의 외핵층 내 Tunel +ve 광수용체 세포의 감소를 초래하였음을 보여준다. **도 11c**는 Mab1 처리가 동종형 대조군과 비교했을 때 망막 외핵층 내 광수용체 세포열 수의 증가를 초래하였음을 보여준다. **도 11d**는 Mab1 항체 처리가 동종형 대조군 항체와 비교했 때 14일 차에 망막 전위도에서 A파 및 B파의 유의한 증가를 초래하였음을 보여준다.

도 12는 단일 IVT 주사 후 안방수 내 유리 C1q를 보여준다.

도 13a~13d는 면역형광[immunofluorescence, IF] 데이터를 보여준다. **도 13b**는 치료 후 3일 차에 망막의 외망상층[outer plexiform layer, OPL](외부 시냅스 층이라고도 함) 내 감소된 미세아교증을 보여준다. 미세아교증의 감소는 염증 감소와 관련이 있다. **도 13c**는 광수용체 시냅스의 유의한 보존을 보여주고 **도 13d**는 처리 후 5일 차에 세포체의 유의한 보존을 보여준다.

도 14a~14b는 망막 내 측정 가능한 PK 및 표적 결속을 보여준다.

도 15a는 면역형광 이미지의 정량화를 보여주는 막대 그래프이다.

도 15b는 C1q 억제제로 처리했을 때 광수용체 시냅스(BSN 마커)의 보존을 입증하는 면역형광 이미지를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 일반

[0011] 본 개시 내용은 일반적으로 유전성 망막 질환[inherited retinal disease, IRD](예를 들어, 망막색소변성증, 맥락막결손, 스타르가르트병, 원뿔막대세포 이상증, 및 레버 선천성 흑암시) 또는 망막 박리를 예방하거나, 이의 발병 위험을 감소시키거나, 치료하는 조성물 및 방법에 관한 것이다.

[0012] 렉틴 또는 대체 보체 경로에 영향을 미치지 않으면서 고전 보체 캐스케이드(cascade)를 억제하는 재조합 인간화 면역글로불린 G[Immunoglobulin G, IgG1] 항원 결합 단편(Fab)이 본원에 개시되어 있다. 항-C1q Fab(예를 들어, FabA, 서열 번호 39의 중쇄 Fab 단편 및 서열 번호 40의 경쇄 Fab 단편을 포함하는 항-C1q Fab)는 유전성 망막 질환[IRD](예를 들어, 망막색소변성증, 맥락막결손, 스타르가르트병, 원뿔막대세포 이상증, 및 레버 선천성 흑암시) 및 망막 박리에 대한 치료를 위한 유리체강 내[intravitreally, IVT] 투여제로서 개발되었다. 쥐 항체 M1(서열 번호 3의 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호 7의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 Mab1 항체)에서 유래된 초가변 영역은 인간 IgG1 Fab 단편 작제물(FabA)로서 발현되었다. Mab1에서 유래된 초가변 영역을 포함하는 전장 인간 IgG4 항체(Mab2, 서열 번호 8의 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호 4의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체) 또한 발현되었다. Mab1 및 Mab2 뿐만 아니라 이의 Fab(Mab1-Fab 및 Mab2-Fab)는 약리학 시험에서 FabA에 대한 대용 분자로 사용되었다. Fc 중쇄 불변 도메인 2 및 3(CH2 및 CH3)이 결여된 1가 Fab 작제물로서 FabA는 Fc 도메인 상호 작용을 통해 C1q에 결합할 수 없다. 또한, FabA는 단일 항원 결합 군[arm]만으로는 광범위한 FabA 농도에 걸쳐 C1q에 대한 작용 활성을 나타내지 않는다.

[0013] 보체 캐스케이드는 선천 면역의 중요한 성분이고 고전, 렉틴 및 대체 보체 경로의 세 가지 별개의 경로를 통해 활성화될 수 있다. 세 가지 경로 모두 보체 성분 C3의 활성화를 초래하고, 이는 궁극적으로 면역 세포 유인, 염증, 막 공격 복합체를 통한 막 용해 및 세포 사멸을 초래한다.

[0014] 고전 보체 캐스케이드의 개시 분자인 C1q는 신경퇴행성 질환의 개시 및 전파와 관련이 있다. C1q 억제는 고전 보체 캐스케이드의 개시를 차단하고 신경 세포막에 대한 손상의 직접 감소 및 보체 활성화의 염증 영향력 감소를 통해 신경 및 시냅스 손상을 늦출 수 있다.

[0015] Mab2-Fab 및/또는 FabA는 비아코어(Biacore)(< 10 pM) 및 효소 결합 면역 흡착 분석[enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA](40~50 pM, 도 7)으로 측정했을 때 인간 C1q에 대한 고친화도 결합을 나타낸다. Mab1은 C1q의 단리된 구형[globular] 헤드 도메인에는 결합하지만 C1q의 콜라겐 꼬리(ELISA에 의해 결정됨)에는 결합하지 않는다. 이러한 결과와 일치하게, Mab1은 C1q의 구형 헤드 도메인(IgM, C-반응성 단백질[C-reactive protein, CRP] 및 포스파티딜세린)에 의해 매개되는 기질 상호 작용을 억제하고, FabA는 면역글로불린 M[immunoglobulin M, IgM]으로 코팅된 적혈구[red blood cell, RBC]와의 C1q 기능적 상호 작용을 억제한다(용혈 차단, 도 9). 항체 Mab1은 C1q를 특이적으로 인식하여 다른 보체 성분(C3b 및 C5)에 대한 결합, 또는 종양

괴사 인자[tumor necrosis factor, TNF] 및 구형 헤드 도메인에서 C1q에 대한 가장 높은 서열 동일성을 공유하는 단백질인 아디포넥틴(adiponectin)을 포함하는 다른 C1q/TNF 슈퍼패밀리 구성원에 대한 결합을 나타내지 않는다. 이들 결과와 일치하게, FabA는 만노스 결합 렉틴([mannose-binding lectin, MBL], C1q/TNF 수퍼패밀리의 또 다른 구성원]에 의해 개시되는 렉틴 보체 경로를 억제하지 않으며, 대체 보체 경로(C3b에 의해 개시됨)도 억제하지 않는다(도 8).

[0016] 정의

[0017] 본원에서 사용되는 단수 형태의 용어는 하나 이상을 의미할 수 있다. 본원의 청구 범위에 사용되는 바와 같이, 용어 '포함하는'['comprising']과 함께 사용되는 경우, 단수 형태의 용어는 하나 또는 하나 이상을 의미할 수 있다. 예를 들어, '항체'에 대한 언급은 하나 내지 여러 항체에 대한 언급이다. 본원에서 사용되는 '또 다른'은 적어도 두번째 이상을 의미할 수 있다.

[0018] 본원에서 사용되는 또 다른 화합물 또는 조성물과 '공동' 투여는 동시 투여 및/또는 상이한 시간 투여를 포함한다. 공동 투여는 또한 상이한 투약 빈도 또는 간격에서, 그리고 동일한 투여 경로 또는 상이한 투여 경로를 사용하는 것을 포함하는 공동 제형으로서의 투여 또는 별개의 조성물로서의 투여를 포함한다.

[0019] 용어 '면역글로불린'[immunoglobulin, Ig]은 본원의 '항체'와 상호 교환 가능하게 사용된다. 본원에서 용어 '항체'는 가장 넓은 의미로 사용되며, 구체적으로 단일 클론 항체, 다클론 항체, 적어도 두 개의 무손상 항체에서 형성된 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체), 생물학적 활성을 나타내는 한 항체 단편, 및 항체 유도체를 포함한다.

[0020] 기본 4-쇄 항체 단위는 두 개의 동일한 경[light, L]쇄 및 두 개의 동일한 중[heavy, H]쇄로 이루어진 이종사량체 당단백질이다. V_H와 V_L의 쌍은 단일 항원-결합 부위를 함께 형성한다. 상이한 클래스의 항체의 구조 및 특성에 대해, 예를 들어, 문헌[Basic and Clinical Immunology, 8th Ed., Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6]을 참조한다.

[0021] 임의의 척추동물 종에서의 L쇄는 카파('κ') 및 람다('λ')로 불리는 두 개의 분명하게 별개인 유형 중 하나에 부여될 수 있으며, 이는 이들의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기반한다. 중쇄[heavy chains, CH]의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라서, 면역글로불린은 상이한 클래스 또는 동종형에 부여될 수 있다. 각각 알파('α'), 델타('δ'), 엡실론('ε'), 감마('γ') 및 뮤('μ')로 지정된 중쇄를 갖는 다섯 가지 클래스의 면역글로불린인 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 있다. γ 및 α 클래스는 CH 서열 및 기능의 비교적 사소한 차이에 기반하여 하위클래스(동종형)로 더 나뉘는데, 예를 들어, 인간은 다음의 하위클래스인 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2를 발현한다. 상이한 클래스의 면역글로불린의 소단위 구조 및 3차원 입체배치는 잘 알려져 있고, 예를 들어, 문헌[Abbas et al., Cellular and Molecular Immunology, 4^{th} ed. (W.B. Saunders Co., 2000)]에 일반적으로 기재되어 있다.

[0022] '전장 항체'는 주로 두 개의 동일한 경[L]쇄 및 두 개의 동일한 중[H]쇄를 포함하는 약 150,000 달톤의 이종사량체 당단백질이 일반적이다. 각각의 경쇄는 하나의 공유 이황화 결합에 의해 중쇄에 연결되는 반면, 이황화 결합의 수는 상이한 면역글로불린 동종형의 중쇄 중에서 달라진다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적으로 이격화된 쇄내 이황화 가교를 가진다. 각각의 중쇄는 하나의 말단에서 가변 도메인[variable domain, V_H]에 이어 다수의 불변 도메인을 가진다. 각각의 경쇄는 하나의 말단에서 가변 도메인[variable domain, V_L] 및 이의 다른 말단에서 불변 도메인을 가지고, 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄와 중쇄 가변 도메인 사이의 계면을 형성하는 것으로 여겨진다.

[0023] '단리된' 분자 또는 세포는 이것이 생성된 환경에서 통상적으로 회합되는 적어도 하나의 오염 분자 또는 세포에서 확인 및 분리된 분자 또는 세포이다. 바람직하게는, 단리된 분자 또는 세포는 이의 생성 환경과 관련된 모든 성분과 회합이 없다. 단리된 분자 또는 세포는 자연에서 발견되는 형태 또는 환경과 다른 형태로 있다. 따라서, 단리된 분자는 세포에 자연적으로 존재하는 분자와 구별되며, 단리된 세포는 조직, 기관 또는 개체에 자연적으로 존재하는 세포와 구별된다. 일부 구현예에서, 단리된 분자는 본 개시의 항-C1q 항체이다. 다른 구현예에서, 단리된 세포는 본 개시의 항-C1q 항체를 생산하는 숙주 세포 또는 하이브리도마 세포이다.

[0024] '단리된' 항체는 생산 환경(예를 들어, 자연적으로 또는 재조합적으로)의 성분에서 확인, 분리 및/또는 회수된 항체이다. 바람직하게는, 단리된 폴리펩타이드는 이의 생산 환경에서의 모든 다른 오염 성분과의 회합이 없다.

이의 생산 환경에서의 오염 성분, 예컨대 재조합 형질감염 세포에서 초래된 것은 항체에 대한 연구, 진단 또는 치료 용도를 전형적으로 방해하지 않는 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 특정 바람직한 구현예에서, 폴리펩타이드는 (1) 예를 들어, 로우리(Lowry) 방법에 의해 측정되는 바와 같이 항체의 95 중량% 초과까지, 그리고 일부 구현예에서는 99 중량% 초과까지, (2) 회전 컵 서열 분석기[spinning cup sequenator]를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 수득하기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루(Coomassie blue), 또는 바람직하게는 은 염색을 사용하여 비환원 또는 환원 조건하에서 SDS-PAGE에 의해 균질성이도록 정제될 것이다. 단리된 항체에는 항체의 자연 환경 중 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에 재조합 T-세포 내에 있는 제자리 항체가 포함된다. 그러나 통상적으로, 단리된 폴리펩타이드 또는 항체는 적어도 하나의 정제 단계를 포함하는 공정에 의해 제조될 것이다.

[0025] 항체의 '가변 영역' 또는 '가변 도메인'은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단 도메인을 지칭한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 'V_H' 및 'V_L'로서 지칭될 수 있다. 이들 도메인은 일반적으로 (동일한 클래스의 다른 항체에 비해) 항체의 대부분의 가변 부분이며, 항원 결합 부위를 함유한다.

[0026] 용어 '가변'은 가변 도메인의 특정 절편[segment]이 항체 중에서 서열상 광범위하게 상이한 사실을 지칭한다. V 도메인은 항원 결합을 매개하고, 이의 특정 항원에 대한 특정 항체의 특이성을 정한다. 그러나, 가변성은 가변 도메인의 전체 폭에 걸쳐 균일하게 분포되지 않는다. 대신에, 이는 경쇄와 중쇄 가변 도메인 둘 다에서 초가변 영역[hypervariable region, HVR]으로 불리는 세 개의 절편에서 집중된다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역[framework region, FR]으로 불린다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 베타-시트(beta-sheet) 구조를 연결하고 일부 경우에 이의 부분을 형성하는 루프를 형성하는 세 개의 HVR에 의해 연결되는 베타-시트 배열을 주로 채택하는 네 개의 FR 영역을 각각 포함한다. 각각의 쇄에서 HVR은 FR 영역에 의해 근접하게 결합되고, 다른 쇄의 HVR과 함께 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다(문헌[Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)] 참조). 불변 도메인은 항원에 대한 항체의 결합에서 직접적으로 관여하지 않지만, 다양한 효과기 기능, 예컨대 항체-의존적-세포 독성에서 항체의 참여를 나타낸다.

[0027] 본원에서 사용되는 용어 'CDR' 또는 '상보성 결정 영역[complementarity determining region]'은 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드 둘 다의 가변 영역 내에서 발견되는 비인접 항원 결합 부위를 의미하는 것으로 의도된다. CDR은 문헌[Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991)](본원에서 카바트 1991로도 지칭됨); 문헌[Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)](본원에서 코티아 1987로도 지칭됨); 및 문헌[MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)]에 기재되어 있으며, 여기서 정의는 서로 비교할 때 아미노산 잔기의 중복 또는 부분 집합을 포함한다. 그럼에도, 항체의 CDR 또는 이식된 항체 또는 이의 변이체를 지칭하기 위한 정의의 적용은 본원에서 정의되고 사용되는 용어의 범위 내에 있도록 의도된다.

[0028] 본원에서 사용되는 용어 'CDR-L1', 'CDR-L2' 및 'CDR-L3'은 각각 경쇄 가변 영역에서 제1, 제2 및 제3 CDR을 지칭한다. 본원에서 사용되는 용어 'CDR-H1', 'CDR-H2' 및 'CDR-H3'은 각각 중쇄 가변 영역에서 제1, 제2 및 제3 CDR을 지칭한다. 본원에서 사용되는 용어 'CDR-1', 'CDR-2' 및 'CDR-3'은 각각 어느 한 쇄의 가변 영역의 제1, 제2 및 제3 CDR을 지칭한다.

[0029] 본원에서 사용되는 용어 '단일 클론 항체'는 실질적으로 균질한 항체 집단에서 수득된 항체를 지칭하며, 즉 집단의 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는, 가능한 자연 발생 돌연변이 및/또는 번역-후 변형[post-translation modification](예를 들어, 이성질체화[isomerization], 아마이드화[amidation])의 경우를 제외하고는 동일하다. 단일 클론 항체는 매우 특이적이며, 단일 항원 부위를 지향한다. 상이한 결정인자(에피토프)를 지향하는 상이한 항체를 전형적으로 포함하는 다클론 항체 제조와 대조되게, 각각의 단일 클론 항체는 항원에서 단일 결정인자를 지향한다. 그들의 특이성 외에도, 단일 클론 항체는 전형적으로 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않은 하이브리도마 배양에 의해 합성되기 때문에 유리하다. 수식어 '단일 클론'은 항체의 실질적으로 균질한 집단으로서 수득되는 항체의 특성을 나타내며, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생성을 필요로 하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 예를 들어, 본 개시 내용에 따라 사용될 단일 클론 항체는 예를 들어, 하이브리도마 방법(예를 들어, 문헌[Kohler and Milstein., Nature, 256:495-97 (1975); Hongo et al., Hybridoma, 14 (3):253-260 (1995), Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2d ed. 1988); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)]), 재조합 DNA 방법(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조), 파지-디스플레이 기

술(예를 들어, 문헌[Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 101(34):12467-472 (2004); 및 Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004)] 참조)을 포함하는 다양한 기법, 및 인간 면역글로불린 서열을 암호화하는 인간 면역글로불린 유전자좌 또는 유전자의 부분 또는 모두를 갖는 동물에서 인간 또는 인간과 유사한 항체를 생산하는 기법(예를 들어, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; 문헌[Jakobovits et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol. 7:33 (1993)]; 미국 특허 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016; 문헌[Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnol. 14:845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14:826 (1996); 및 Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)] 참조)에 의해 만들어질 수 있다.

[0030] 용어 '전장 항체', '무손상 항체' 및 '전체 항체'는 항체 단편 또는 항체 유도체와 대조적으로 실질적으로 온전한 형태의 항체를 지칭하기 위해 상호 교환 가능하게 사용된다. 구체적으로, 전체 항체는 Fc 영역을 포함하는 중쇄 및 경쇄를 갖는 것을 포함한다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인(예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 이의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 일부 경우에, 무손상 항체는 하나 이상의 효과기 기능을 가질 수 있다.

[0031] 항체의 '항체 단편 ' 또는 '항원 결합 단편' 또는 '기능적 단편'은 온전한 항체의 일부, 바람직하게는 무손상 항체의 항원 결합 및/또는 가변 영역 또는 변형된 FcR 결합 능력을 보유하거나 갖는 항체의 F 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', $F(ab')_2$ 및 Fv 단편; 디아바디; 및 선형 항체를 포함한다(미국 특허 제5,641,870호, 실시예 2; 문헌[Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)] 참조). 항체 단편의 추가 예에는 항체 유도체, 예컨대 단일-쇄 항체 분자, 1가 항체 및 항체 단편에서 형성된 다중특이적 항체가 포함된다.

[0032] '항체 유도체'는 항체의 항원-결합 영역을 포함하는 임의의 작제물이다. 항체 유도체의 예는 단일-쇄 항체 분자, 1가 항체 및 항체 단편에서 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.

[0033] 항체의 파파인 소화[papain digestion]는 'Fab' 단편이라고 하는 두 개의 동일한 항원-결합 단편 및 쉽게 결정화되는 능력을 반영하는 명칭인 잔류 'Fc' 단편을 생성한다. Fab 단편은 H쇄의 가변 영역 도메인[V_H], 및 하나의 중쇄의 제1 불변 도메인[constant domain of one heavy chain, C_H1]과 함께 전체 L쇄로 이루어진다. 각각의 Fab 단편은 항원 결합에 대해 1가이고, 즉, 이는 단일 항원-결합 부위를 가진다. 항체의 펩신 처리는 상이한 항원-결합 활성을 갖는 두 개의 이황화 연결된 Fab 단편에 대략 상응하고 여전히 항원을 가교할 수 있는 단일의 거대한 $F(ab')_2$ 단편을 수득한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역에서 하나 이상의 시스테인을 포함하는 C_H1 도메인의 카복시 말단에서 소수의 추가적인 잔기를 가짐으로써 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 싸이올기를 갖는 Fab'에 대한 본원에서의 명칭이다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 원래 그들 사이에 힌지 시스테인이 있는 Fab' 단편 쌍으로 생산되었다. 항체 단편의 다른 화학적 결합 또한 알려져 있다.

[0034] Fc 단편은 이황화물에 의해 함께 결합되는 H쇄 둘 다의 카복시-말단 부분을 포함한다. 항체의 효과기 기능은 Fc 영역에서 서열에 의해 결정되는데, 이 영역은 또한 특정 유형의 세포상에서 발견되는 Fc 수용체[Fc receptors, FcR]에 의해 인식된다.

[0035] 본원의 용어 'Fc 영역'은 천연-서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄의 C-말단의 영역을 정하기 위해 사용된다. 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 변할 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 Cys226번 위치의 아미노산 잔기에서, 또는 Pro230에서 이의 카복실 말단까지 신장하는 것으로 보통 정의된다. Fc 영역의 C-말단 라이신(EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)는, 예를 들어, 항체의 중쇄를 암호화하는 핵산을 재조합 조작함에 의하여, 또는 항체의 생성 또는 정제 동안, 제거될 수 있다. 따라서, 무손상 항체의 조성물은 모든 K447 잔기가 제거된 항체 집단, K447 잔기가 제거되지 않은 항체 집단, 및 K447 잔기가 있거나 없는 항체의 혼합물을 갖는 항체 집단을 포함할 수 있다. 본 개시 내용의 항체에 사용하기에 적합한 천연 서열 Fc 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다.

[0036] '천연 서열 Fc 영역'은 자연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 천연 서열 인간 Fc 영역은 천연 서열 인간 IgG1 Fc 영역(비-A 및 A 동종이인자형); 천연 서열 인간 IgG2 Fc 영역; 천

연 서열 인간 IgG3 Fc 영역; 및 천연 서열 인간 IgG4 Fc 영역뿐만 아니라 이의 자연 발생 변이체를 포함한다.

[0037] '변이체 Fc 영역'은 적어도 하나의 아미노산 변형, 바람직하게는 하나 이상의 아미노산 치환(들) 때문에 천연 서열 Fc 영역의 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩타이드(parent polypeptide)의 Fc 영역과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 치환, 예를 들어, 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩타이드의 Fc 영역에 약 1 내지 약 10개의 아미노산 치환, 그리고 바람직하게는 약 1 내지 약 5개의 아미노산 치환을 갖는다.본원의 변이체 Fc 영역은 바람직하게는 천연 서열 Fc 영역 및/또는 모 폴리펩타이드의 Fc 영역과 적어도 약 80%의 상동성을 가질 것이고, 가장 바람직하게는 이와 적어도 약 90%의 상동성, 더욱 바람직하게는 이와 적어도 약 95%의 상동성을 가질 것이다.

[0038] 'Fc 수용체' 또는 'FcR'은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재한다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 또한, 바람직한 FcR은 IgG 항체(감마 수용체)에 결합하고, 이들 수용체의 대립유전자 변이체 및 대안적으로 스플라이싱된 형태를 포함하는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII 하위클래스의 수용체를 포함하는 것이며, FcγRII 수용체는 주로 이의 세포질 도메인 내에서는 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는 FcγRIIA('활성화 수용체') 및 FcγRIIB('억제 수용체')를 포함한다. 활성화 수용체 FcγRIIA는 이의 세포질 도메인 내에 면역수용체 타이로신-기반 활성화 모티프[immunoreceptor tyrosine-based activation motif, 'ITAM']를 함유한다. 억제 수용체 FcγRIIB는 이의 세포질 도메인 내에 면역수용체 타이로신-기반 억제 모티프['Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif, ITIM']를 함유한다(예를 들어, 문헌[M. Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)] 참조). FcR은 문헌[Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); 및 de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995)]에서 검토된다. 향후 식별될 것을 포함하는 다른 FcR은 본원의 용어 'FcR'에 의해 포함된다. FcR은 또한 항체의 혈청 반감기를 증가시킬 수 있다.

[0039] 생체내 FcRn에 대한 결합 및 인간 FcRn 고친화도 결합 폴리펩타이드의 혈청 반감기는, 예를 들어, 인간 FcRn을 발현시키는 형질전환 마우스 또는 형질감염 인간 세포주에서, 또는 변이체 Fc 영역을 갖는 폴리펩타이드가 투여되는 영장류에서 분석될 수 있다. WO 2004/42072(Presta)는 FcR에 대해 개선된 또는 감소된 결합을 갖는 항체 변이체를 기재한다. 또한 예를 들어, 문헌[Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001)]을 참조한다.

[0040] 'Fv'는 완전한 항원-인식 및 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 단편은 강력한, 비공유 회합(association)에서 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 영역 도메인의 이량체로 이루어진다. 이들 두 도메인의 폴딩에서 항원 결합에 대한 아미노산 잔기에 기여하고 항체에 대해 항원 결합 특이성을 부여하는 여섯 개의 초가변 루프(H쇄 및 L쇄에서 각각 세 개의 루프)가 나온다. 그러나, 전체 결합 부위보다 더 낮은 친화도에도 불구하고, 단일 가변 도메인(또는 항원에 대해 특이적인 세 개의 HVR만을 포함하는 Fv의 절반)조차도 항원을 인식하고 결합하는 능력을 가진다.

[0041] 'sFv' 또는 'scFv'으로도 약칭되는 '단일쇄 Fv'는 단일 폴리펩타이드 쇄에 연결된 VH 및 VL 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. 바람직하게는, sFv 폴리펩타이드는 sFv가 항원 결합에 필요한 구조를 형성할 수 있게 하는 V_H와 V_L 도메인 사이의 폴리펩타이드 링커를 추가로 포함한다. sFv에 대한 검토는 문헌[Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.

[0042] 용어 '디아바디(diabody)'는 V 도메인의 쇄내 쌍형성이 아닌 쇄간 쌍형성을 달성하여 2가 단편, 즉, 두 개의 항원-결합 부위를 갖는 단편을 초래하도록 V_H와 V_L 도메인 사이의 짧은 링커(약 5 내지 10개 잔기)를 갖는 sFv 단편(앞의 단락을 참조)을 구성함으로써 제조된 작은 항체 단편을 지칭한다. 이중특이적 디아바디는 두 개의 항체의 V_H 및 V_L 도메인이 상이한 폴리펩타이드 쇄상에 존재하는 두 개의 '가교' sFv 단편의 이종이량체이다. 디아바디는 예를 들어, EP 404,097; WO 1993/011161; WO/2009/121948; WO/2014/191493; 문헌[Hollinger et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:6444-48 (1993)]에 보다 상세히 기재되어 있다.

[0043] 본원에서 사용되는, '키메라 항체'는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종에서 유래하거나 특정 항체 클래스 또는 하위클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 이에 상동인 반면, 쇄(들)의 나머지 부분은, 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 다른 종에서 유래하거나 다른 항체 클래스 또는 하위클래스에 속하는 항체 및 이러한 항체의 단편의 상응하는 서열과 동일하거나 이에 상동인, 항체(면역글로불린)를 지칭한다(미국 특허 제4,816,567호; 문헌[Morrison et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 81:6851-55 (1984)]). 본원의 목적 키메

라 항체는 PRIMATIZED® 항체를 포함하되, 항체의 항원-결합 영역은, 예를 들어, 목적 항원을 사용하여 마카크 원숭이를 면역화함으로써 생성된 항체에서 유래된다. 본원에 사용되는 '인간화 항체'는 '키메라 항체'의 부분 집합이다.

[0044] 비인간[예를 들어, 쥐(murine)] 항체의 '인간화' 형태는 비인간 면역글로불린에서 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 일부 구현예에서, 인간화 항체는 수용자의 HVR에서의 잔기가 비인간 종(공여자 항체), 예컨대 목적하는 특이성, 친화도 및/또는 능력을 갖는 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류의 HVR에서의 잔기로 대체된 인간 면역글로불린(수용자 항체)이다. 일부 경우에서, 인간 면역글로불린의 FR 잔기는 상응하는 비인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체에서 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능, 예컨대 결합 친화도를 추가로 개선하기 위해 이루어질 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 하나, 그리고 전형적으로 두 개의 가변 도메인 중 실질적으로 모두를 포함하는데, FR 영역이 항체 성능, 예컨대 결합 친화도, 이성질체화, 면역원성 등을 개선시키는 하나 이상의 개별 FR 잔기 치환을 포함할 수 있다고 해도, 초가변 루프의 모두 또는 실질적으로 모두는 비인간 면역글로불린 서열의 초가변 루프에 상응하고, FR 영역의 모두 또는 실질적으로 모두는 인간 면역글로불린 서열의 FR 영역이다. FR에서 이들 아미노산 치환의 수는 전형적으로 H쇄에서 여섯 개 이하이고, L쇄에서 세 개 이하이다. 인간화 항체는 또한 임의로 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로불린의 것을 포함할 것이다. 추가 세부사항은 예를 들어, 문헌[Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)])을 참조한다. 또한, 예를 들어, 문헌[Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)]; 및 미국 특허 제6,982,321호 및 제7,087,409호를 참조한다.

[0045] '인간 항체'는 인간에 의해 생성된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 보유하고/하거나 본원에 개시된 인간 항체 제조 기법 중 임의의 것을 사용하여 제조된 것이다. 인간 항체의 이런 정의는 비인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 구체적으로 제외한다. 인간 항체는 파지-디스플레이 라이브러리를 포함하는, 당업계에 공지된 다양한 기법을 사용하여 생성될 수 있다. 문헌[Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]. 또한 인간 단일 클론 항체의 제조를 위해 문헌[Cole et al., Monoclonal Antibodies 및 Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]에 기재된 방법을 이용할 수 있다. 또한 문헌[van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74 (2001)]을 참조한다. 인간 항체는 항원 유발[antigenic challenge]에 반응하여 이러한 인간 항체를 생성하도록 변형되지만, 이의 내인성 유전자좌가 망가진 형질전환 동물, 예컨대, 면역화된 제노마우스(xenomice)에게 항원을 투여함으로써 제조될 수 있다(또한 예를 들어, XENOMOUSE™ 기술에 대해 미국 특허 제6,075,181호 및 제6,150,584호 참조). 또한 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체에 대해, 예를 들어, 문헌[Li et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)]을 참조한다.

[0046] 본원에서 사용되는 경우 용어 '초가변 영역', 'HVR' 또는'HV'는 서열이 초가변이고/이거나 구조적으로 한정된 루프를 형성하는 항체-가변 도메인의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 여섯 개의 HVR; VH에서 세 개(H1, H2, H3), 및 VL에서 세 개(L1, L2, L3)를 포함한다. 천연 항체에서, H3 및 L3은 여섯 개의 HVR의 가장 높은 다양성을 나타내고, 특히 H3은 항체의 미세한 특이성을 부여함에 있어서 고유한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 예를 들어, 문헌[Xu et al., Immunity 13:37-45 (2000); Johnson and Wu in Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)]을 참조한다. 실제로, 중쇄만으로 이루어진 자연 발생 낙타 항체는 경쇄의 부재하에서 기능적이고 안정하다. 예를 들어, 문헌[Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993) 및 Sheriff et al., Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996)]을 참조한다.

[0047] 다수의 HVR 설명이 사용 중이며, 본원에 포함된다. 카바트(Kabat) 상보성-결정 영역[CDR]인 HVR은 서열 가변성을 기반으로 하며, 가장 일반적으로 사용된다(위의 문헌 [Kabat et al]). 대신에, 코티아(Chothia)는 구조적 루프의 위치를 지칭한다(문헌[Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]). AbM HVR은 카바트 CDR과 코티아 구조 루프 간의 절충안을 나타내며, 옥스포드 몰레큘라(Oxford Molecular)의 AbM 항체-모델링 소프트웨어에 의해 사용된다. '접촉' HVR은 이용 가능한 복합체 결정 구조의 분석에 기반한다. 각각의 이들 HVR에서의 잔기가 아래에 기재되어 있다.

루프	카바트	AbM	코티아	접촉
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B(카바트 넘버링)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35(코티아 넘버링)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0048]

[0049] HVR은 다음과 같이 '확장된 HVR'을 포함할 수 있다. VL에서 24~36 또는 24~34(L1), 46~56 또는 50~56(L2), 및 89~97 또는 89~96(L3), 및 VH에서 26~35(H1), 50~65 또는 49~65(바람직한 구현예)(H2), 및 93~102, 94~102, 또는 95~102(H3). 가변-도메인 잔기는 이들 확장된-HVR 정의 각각에 대해 위의 문헌[Kabat et al.]에 따라 넘버링된다.

[0050] '프레임워크' 또는 'FR' 잔기는 본원에 정의된 HVR 잔기 이외의 가변-도메인 잔기이다.

[0051] '카바트에서와 같은 가변-도메인 잔기-넘버링' 또는 '카바트에서와 같은 아미노산 위치 넘버링'이라는 어구 및 이의 변형은 위의 문헌[Kabat et al.]에서의 항체 모음의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 사용되는 넘버링 시스템을 지칭한다. 이러한 넘버링 시스템을 사용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 HVR의 단축 또는 이들 내로의 삽입에 상응하는 더 소수의 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 다음에 단일 아미노산 삽입(카바트에 따른 잔기 52a) 및 중쇄 FR 잔기 82 다음에 삽입된 잔기(예컨대, 카바트에 따른 잔기 82a, 82b 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 넘버링은 주어진 항체에 대해, 항체 서열을 '표준' 카바트 넘버링된 서열과 상동성 영역에서 정렬하여 결정할 수 있다.

[0052] 카바트 넘버링 시스템은 가변 도메인 내 잔기(대략적으로 경쇄의 잔기 1~107 및 중쇄의 잔기 1~113)를 언급할 때 일반적으로 사용된다(예를 들어, 문헌[Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]). 'EU 넘버링 시스템' 또는 'EU 지수'는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 내의 잔기를 지칭할 때 일반적으로 사용된다(예를 들어, 위의 문헌[Kabat et al.]에서 보고된 EU 지수). '카바트에서와 같은 EU 지수'는 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링을 지칭한다. 본원에서 달리 언급되지 않는 한, 항체의 가변 도메인 내 잔기 번호에 대한 언급은 카바트 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다. 본원에서 달리 언급되지 않는 한, 항체의 불변 도메인 내 잔기 번호에 대한 언급은 EU 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다(예를 들어, 미국 특허 공보 제2010-280227호 참조).

[0053] 본원에서 사용되는 '수용체 인간 프레임워크[acceptor human framework]'는 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크에서 유래된 VL 또는 VH 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크'에서 유래된' 수용체 인간 프레임워크는 이의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 기존 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 기존 아미노산 변화의 수는 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 또는 2개 이하이다. 기존 아미노산 변화가 VH 내 존재하는 경우, 바람직한 해당 변화는 위치 71H, 73H 및 78H 중 3, 2 또는 1개 위치에서만 생기고, 예를 들어, 해당 위치에서 아미노산 잔기는 71A, 73T 및/또는 78A일 수 있다. 일부 구현예에서, VL 수용체 인간 프레임워크는 서열에 있어서 VL 인간 면역글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 공통 프레임워크 서열과 동일하다.

[0054] '인간 공통 프레임워크'는 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택에서 가장 일반적으로 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 서열의 선택은 가변 도메인 서열의 하위 그룹에서 유래된다. 일반적으로, 서열의 하위 그룹은 문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에서와 같은 하위 그룹이다. 예는 VL의 경우에, 하위 그룹은 위의 문헌[Kabat et al.]에서와 같은 하위 그룹 카파 I, 카파 II, 카파 III 또는 카파 IV일 수 있음을 포함한다. 또한, VH의 경우에, 하위 그룹은 위의 문헌[Kabat et al]에서와 같은 하위 그룹 I, 하위 그룹 II 또는 하위 그룹 III일 수 있다.

[0055] 특정 위치에서 '아미노산 변형'은 특정 잔기의 치환 또는 결실, 또는 특정 잔기에 인접한 적어도 한 개의 아미노산 잔기의 삽입을 지칭한다. 특정 잔기에 '인접한' 삽입은 이의 한 개 내지 두 개의 잔기 내의 삽입을 의미한다. 삽입은 특정 잔기에 대한 N-말단 또는 C-말단일 수 있다. 본원에서 바람직한 아미노산 변형은 치환이다.

[0056] '친화도-성숙' 항체는 변형(들)을 보유하지 않는 모 항체와 비교하여, 항원에 대한 항체의 친화도를 개선시키는, 이의 하나 이상의 HVR에 하나 이상의 변형을 갖는 것이다. 일부 구현예에서, 친화도-성숙 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어 피코몰 친화도를 갖는다. 친화도-성숙 항체는 당업계에 공지된 절차에 의해 생성된다. 예를 들어, 문헌[Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)]은 VH-도메인 및 VL-도메인 셔플링에 의한 친화도 성숙을 기재한다. HVR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이유발은, 예를 들어, 문헌[Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al. Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); 및 Hawkins et al, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)]에 의해 기재되어 있다.

[0057] 본원에서 사용되는 용어 '특이적으로 인식한다' 또는 '특이적으로 결합한다'는 생물학적 분자를 포함하는 이종 분자 집단의 존재하에 표적의 존재를 결정할 수 있는 것으로, 측정 가능하고 재현 가능한 상호 작용, 예컨대 표적과 항체 사이의 인력 또는 결합을 지칭한다. 예를 들어, 표적 또는 에피토프에 특이적으로 또는 우선적으로 결합하는 항체는 이 표적 또는 에피토프에 다른 표적 또는 표적의 다른 에피토프에 결합하는 것보다 더 큰 친화도, 결합력, 더 큰 용이성 및/또는 더 긴 지속시간 동안 결합하는 항체이다. 예를 들어, 제1 표적에 특이적으로 또는 우선적으로 결합하는 항체(또는 모이어티)는 제2 표적에 특이적으로 또는 우선적으로 결합하거나 결합하지 않을 수 있음이 또한 이해된다. 이렇게 해서, '특이적 결합' 또는 '우선적 결합'은 (이것이 배타적 결합을 포함할 수는 있지만) 배타적 결합을 반드시 필요로 하지는 않는다. 표적에 특이적으로 결합하는 항체는 적어도 약 10^{3} M^{-1} 또는 10^{4} M^{-1}, 때로는 약 10^{5} M^{-1} 또는 10^{6} M^{-1}, 다른 예에서 약 10^{6} M^{-1} 또는 10^{7} M^{-1}, 약 10^{8} M^{-1} 내지 10^{9} M^{-1}, 또는 약 10^{10} M^{-1}내지 10^{11} M^{-1} 이상의 회합상수를 가질 수 있다. 다양한 면역분석 형식은 특정 단백질과 특이적으로 면역반응성인 항체를 선택하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 단백질과 특이적으로 면역반응성인 단일 클론 항체를 선택하기 위해 고체상 ELISA 면역분석이 일상적으로 사용된다. 특이적 면역반응성을 결정하기 위해 사용될 수 있는 면역분석 형식 및 조건의 설명을 위해, 예를 들어, 문헌[Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York]을 참조한다.

[0058] 본원에서 사용되는 '동일성'은 정렬된 서열의 임의의 특정 위치에서 아미노산 잔기가 서열 사이에서 동일함을 나타낸다. 본원에서 사용되는 '유사성'은 정렬된 서열의 임의의 특정 위치에서 아미노산 잔기가 서열 사이에서 유사한 유형을 가짐을 나타낸다. 예컨대, 류신(leucine)은 아이소류신 또는 발린(valine)으로 치환될 수 있다. 종종 서로 치환될 수 있는 다른 아미노산은 다음을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0059] - 페닐알라닌, 타이로신 및 트립토판(방향족 측쇄를 갖는 아미노산);

[0060] - 라이신, 아르지닌 및 히스티딘(염기성 측쇄를 갖는 아미노산);

[0061] - 아스파테이트 및 글루타메이트(산성 측쇄를 갖는 아미노산);

[0062] - 아스파라진 및 글루타민(아마이드 측쇄를 갖는 아미노산); 및

[0063] - 시스테인 및 메싸이오닌(황-함유 측쇄를 갖는 아미노산).

[0064] 동일성과 유사성의 정도는 쉽게 계산될 수 있다(예를 들어, 문헌[Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; 및 Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991] 참조).

[0065] 본원에서 사용되는 보체 단백질과 제2 단백질 사이의 '상호 작용'은 단백질-단백질 상호 작용, 물리적 상호 작용, 화학적 상호 작용, 결합, 공유 결합 및 이온 결합을 제한되지 않고 포함한다. 항체가 두 단백질 사이의 상호 작용을 파괴하거나, 감소시키거나 또는 완전히 제거할 때 두 단백질 사이에서 본원에서 사용되는 항체가 '상호 작용을 억제한다'. 본 개시 내용의 항체 또는 이의 단편은 항체 또는 이의 단편이 두 단백질 중 하나에 결합할 때 두 단백질 사이의 '상호 작용을 억제한다'.

[0066] '차단' 항체, '길항제' 항체, '억제' 항체 또는 '중화' 항체는 결합하는 항원의 하나 이상의 생물학적 활성을, 예컨대 하나 이상의 단백질과의 상호 작용을 억제하거나 감소시키는 항체이다. 일부 구현예에서, 차단 항체, 길항제 항체, 억제 항체, 또는 '중화' 항체는 항원의 하나 이상의 생물학적 활성 또는 상호 작용을 실질적으로 또는 완전히 억제한다.

[0067] 용어 '억제제'는 표적 생체 분자의 활성 또는 발현을 감소시킴으로써 표적 생체 분자, 예를 들어, mRNA 또는 단백질의 생물학적 기능을 억제하는 능력을 갖는 화합물을 지칭한다. 억제제는 항체, 소분자 또는 핵산 분자일 수 있다. 용어 '길항제'는 수용체에 결합하여 수용체의 생물학적 반응을 차단하거나 약화시키는 화합물을 지칭한다. 용어 '억제제'는 또한 '길항제'를 지칭할 수 있다.

[0068] 항체 '효과기 기능'은 항체의 Fc 영역(천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 해당 생물학적 활성을 지칭하고, 항체 동종형에 따라 다르다.

[0069] 본원에서 사용되는 용어 '친화도'는 두 작용제(예를 들어, 항체 및 항원)의 가역적 결합에 대한 평형 상수를 지칭하며, 해리 상수[dissociation constant, KD]로 표시된다. 친화도는 비관련 아미노산 서열에 대한 항체의 친화도보다 적어도 1배 초과, 적어도 2배 초과, 적어도 3배 초과, 적어도 4배 초과, 적어도 5배 초과, 적어도 6배 초과, 적어도 7배 초과, 적어도 8배 초과, 적어도 9배 초과, 적어도 10배 초과, 적어도 20배 초과, 적어도 30배 초과, 적어도 40배 초과, 적어도 50배 초과, 적어도 60배 초과, 적어도 70배 초과, 적어도 80배 초과, 적어도 90배 초과, 적어도 100배 초과, 또는 적어도 1,000배 초과, 또는 그 이상이다. 표적 단백질에 대한 항체의 친화도는 예를 들어, 약 100 나노몰[nanomolar, nM] 내지 약 0.1 nM, 약 100 nM 내지 약 1 피코몰[picomolar, pM], 또는 약 100 nM 내지 약 1 펨토몰[femtomolar, fM] 또는 그 이상일 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 '결합력'은 희석 후의 해리에 대한 두 개 이상 작용제의 복합체의 저항성을 지칭한다. 용어 '면역반응성' 및 '우선적으로 결합한다'는 항체 및/또는 항원-결합 단편에 대하여 본원에서 상호 교환 가능하게 사용된다.

[0070] 용어 '결합하는'은 예컨대, 염 가교와 수분 가교와 같은 상호 작용을 포함하여, 공유, 정전기, 소수성, 및 이온성 및/또는 수소-결합 상호 작용으로 인해 두 분자 사이에 직접 회합을 지칭한다. 예를 들어, 대상 항-C1q 항체는 보체 C1q 단백질 내의 에피토프에 특이적으로 결합한다. '특이적 결합'은 적어도 약 10^{-7} M 이상, 예를 들어, $5X10^{-7}$ M, 10^{-8} M, $5X10^{-8}$ M 및 그 이상의 친화도를 갖는 결합을 지칭한다. '비특이적 결합'은 약 10^{-7} M 미만의 친화도를 갖는 결합, 예를 들어, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M 등의 친화도를 갖는 결합을 지칭한다.

[0071] 본원에서 사용되는 용어 'k_{on}'은 항원에 대한 항체의 회합에 대한 속도 상수를 지칭하는 것으로 의도된다.

[0072] 본원에서 사용되는 용어 'k_{off}'는 항체/항원 복합체에서의 항체의 해리에 대한 속도 상수를 지칭하는 것으로 의도된다.

[0073] 본원에서 사용되는 용어 'K_D'는 항체-항원 상호 작용의 평형 해리 상수를 지칭하는 것으로 의도된다.

[0074] 본원에서 사용되는 바와 같은, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 항체 서열과 관련하여 '아미노산 서열 동일성 백분율(%)' 및 '상동성'은, 필요하다면, 최대 서열 동일성 백분율을 달성하기 위해 서열 및 도입 갭을 정렬시킨 후에, 임의의 보존적 치환을 서열 동일성의 일부로서 고려하지 않은 상태에서 특정 펩타이드 또는 폴리펩타이드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내 아미노산 잔기의 백분율을 지칭한다. 아미노산 서열 동일성 백분율을 측정하기 위한 정렬은 당업계의 기술 내의 다양한 방법, 예를 들어, 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 MEGALIGN™(DNASTAR) 소프트웨어로 달성될 수 있다. 당업자는 비교 중인 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하기 위해 필요한 당업계에 공지된 임의의 알고리즘을 포함하여, 정렬을 측정하기 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다.

[0075] '생물학적 샘플'은 개체에서 얻은 다양한 샘플 유형을 포함하며, 진단 또는 모니터링 분석에 사용될 수 있다. 이러한 정의는 혈액 및 생물학적 기원의 다른 액체 샘플, 고체 조직 샘플, 예컨대 생검 시료 또는 조직 배양 또는 이에서 유래된 세포 및 이의 자손을 포함한다. 이러한 정의에는 시약 처리, 가용화 또는 폴리뉴클레오타이드와 같은 특정 성분의 농축에 의한 것과 같이, 입수 후 임의의 방법으로 조작된 샘플도 포함된다. 용어 '생물학적 샘플'은 임상 샘플을 포함하며, 또한 배양물, 세포 상청액, 세포 용해물, 혈청, 혈장, 생체액, 및 조직 샘플 내의 세포를 포함한다. 용어 '생물학적 샘플'은 소변, 타액, 뇌척수액, 간질액, 안구 유체, 활막 유체, 혈액 분획물, 예컨대 혈장 및 혈청, 및 기타 동종의 것을 포함한다. 용어 '생물학적 샘플'은 또한 고체 조직 샘플, 조

직 배양 샘플, 및 세포 샘플을 포함한다.

[0076] '단리된' 핵산 분자는 핵산 분자가 생성된 환경에서 통상적으로 회합되는 적어도 하나의 오염 핵산 분자에서 확인 및 분리된 핵산 분자이다. 바람직하게는, 단리된 핵산은 이의 생성 환경과 연관된 모든 성분과의 회합이 없다. 본원의 폴리펩타이드 및 항체를 암호화하는 단리된 핵산 분자는 이것이 자연에서 발견되는 형태 또는 환경과 다른 형태로 있다. 따라서, 단리된 핵산 분자는 본원의 임의의 폴리펩타이드 및 항체를 암호화하는, 세포에 자연적으로 존재하는 핵산과 구별된다.

[0077] 본원에서 사용되는 용어 '벡터'는 이것이 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭하는 것으로 의도된다. 한 가지 유형의 벡터는 '플라스미드'인데, 이는 추가적인 DNA 절편이 연결될 수 있는 원형 이중 가닥 DNA를 지칭한다. 또 다른 유형의 벡터는 파지 벡터이다. 또 다른 유형의 벡터는 바이러스 벡터이되, 추가적인 DNA 절편은 바이러스 게놈 내로 연결될 수 있다. 특정 벡터는 이들이 도입된 숙주 세포 내 자율 복제를 할 수 있다(예를 들어, 박테리아 복제 원점 및 에피솜 포유동물 벡터를 갖는 박테리아 벡터). 다른 벡터(예를 들어, 비에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로 도입 시 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있고, 이에 의해 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 이들이 작동 가능하게 연결된 유전자의 발현을 지향할 수 있다. 본원에서 이러한 벡터는 '재조합 발현 벡터' 또는 단순하게, '발현 벡터'로서 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기법에 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드 형태이다. 본 명세서에서, '플라스미드' 및 '벡터'는 플라스미드가 가장 일반적으로 사용되는 벡터 형태이기 때문에 상호 교환 가능하게 사용될 수 있다.

[0078] 본원에서 상호 교환 가능하게 사용되는 '폴리뉴클레오타이드' 또는 '핵산'은 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 중합체를 지칭하며, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 변형된 뉴클레오타이드 또는 염기 및/또는 이들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 중합효소에 의해 또는 합성 반응에 의해 중합체 내로 혼입될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대 메틸화된 뉴클레오타이드 및 이들의 유사체를 포함할 수 있다. 존재한다면, 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 중합체의 조립 전에 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오타이드의 서열은 비뉴클레오타이드 성분에 의해 방해될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 합성 후에 이루어진 변형(들), 예컨대 표지에 대한 접합[conjugation]을 포함할 수 있다. 다른 유형의 변형은, 예를 들어, '캡', 자연 발생 뉴클레오타이드 중 하나 이상이 유사체로 치환됨, 뉴클레오타이드간 변형, 예컨대, 비하전 결합을 갖는 것(예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트라이에스터, 포스포아마이데이트, 카바메이트 등) 및 하전된 결합을 갖는 것(예를 들어, 포스포로싸이오에이트, 포스포로다이싸이오에이트 등), 현수 모이어티를 포함하는 것, 예컨대, 단백질(예를 들어, 핵산분해효소, 독소, 항체, 신호 펩타이드, 폴리-L-라이신 등), 삽입제를 갖는 것(예를 들어, 아크리딘, 프소랄렌 등), 킬레이트제를 함유하는 것(예를 들어, 금속, 방사성 금속, 붕소, 산화성 금속 등), 알킬화제를 함유하는 것, 변형된 결합을 갖는 것(예를 들어, 알파 아노머 핵산 등)뿐만 아니라 폴리뉴클레오타이드(들)의 비변형 형태를 포함한다. 추가로, 당 내에 통상적으로 존재하는 임의의 하이드록실기는, 예를 들어, 포스포네이트기, 포스페이트기에 의해 대체될 수 있거나, 표준 보호기로 보호되거나, 또는 추가적인 뉴클레오타이드에 대한 추가적인 결합을 생성하도록 활성화되거나, 또는 고체 또는 반고체 지지체에 접합될 수 있다. 5' 및 3' 말단의 OH는 인산화되거나, 또는 아민 또는 1 내지 20개의 탄소 원자의 유기 캡핑기 모이어티로 치환될 수 있다. 다른 하이드록실은 또한 표준 보호기로 유도체화될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 또한 일반적으로 당업계에 공지된 리보스 또는 데옥시리보스 당의 유사체 형태(예를 들어, 2'-O-메틸-, 2'-O-알릴-, 2'-플루오로- 또는 2'-아자이도-리보스, 탄소환식 당 유사체, α-아노머 당, 에피머 당, 예컨대 아라비노스, 자일로스 또는 릭소스, 피라노스 당, 퓨라노스 당, 세도헵툴로스, 비환식 유사체, 및 염기성 뉴클레오시드 유사체, 예컨대 메틸 리보스를 포함)를 함유할 수 있다. 하나 이상의 포스포다이에스터 결합은 대체 연결기에 의해 대체될 수 있다. 이들 대체 연결기는 포스페이트가 P(O)S('싸이오에이트'), P(S)S('다이싸이오에이트'), (O)NR_2('아마이데이트'), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH_2('폼아세탈')에 의해 대체되는 구현예를 포함하지만, 이들로 제한되지 않으며, 이때 각각의 R 또는 R'은 독립적으로 에터 (-O-) 결합, 아릴, 알켄일, 사이클로알킬, 사이클로알켄일 또는 아랄킬을 임의로 함유하는 치환 또는 비치환 알킬(1-20 C), 또는 H이다. 폴리뉴클레오타이드의 모든 결합이 동일할 필요는 없다. 앞의 설명은 RNA 및 DNA를 포함하여 본원에 언급된 모든 폴리뉴클레오타이드에 적용된다.

[0079] '숙주 세포'는 폴리뉴클레오타이드 삽입물의 혼입을 위한 벡터(들)에 대한 수용자일 수 있거나 또는 수용자인 개별 세포 또는 세포 배양물을 포함한다. 숙주 세포는 단일 숙주 세포의 자손을 포함하고, 자손은 자연적, 우연적 또는 의도적인 돌연변이에 기인하여 본래의 모 세포와 (형태 또는 게놈 DNA 상보체가) 완전히 동일할 필요는 없다. 숙주 세포는 본 개시 내용의 폴리뉴클레오타이드(들)로 생체내 형질감염된 세포를 포함한다.

[0080] 본원에 사용되는 '담체'는 사용되는 용량 및 농도에서 이에 노출되는 세포 또는 포유동물에 무독성인 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함한다. 종종 생리적으로 허용되는 담체는 수성 pH 완충 용액이다. 생리적으로 허용되는 담체의 예는 완충제, 예컨대 포스페이트, 사이트레이트 및 기타 유기 산; 아스코브산을 포함하는 산화방지제; 저분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩타이드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리바이닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글라이신, 글루타민, 아스파라진, 아르지닌 또는 라이신; 글루코스, 만노스 또는 덱스트린을 포함하는 단당류, 이당류, 및 다른 탄수화물; 킬레이트제, 예컨대 EDTA; 당 알코올, 예컨대 만니톨 또는 솔비톨; 염-형성 반대이온, 예컨대 소듐; 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 TWEEN™, 폴리에틸렌 글라이콜(polyethylene glycol, PEG) 및 PLURONICS™을 포함한다.

[0081] 용어 '예방하는'은 당업계에 인식되고, 치료를 받지 않은 환자와 관련하여 유전성 망막 질환[IRD](예를 들어, 망막색소변성증/원뿔막대세포 이상증, 맥락막결손, 스타르가르트병, 원뿔막대세포 이상증, 레버 선천성 흑암시, X-염색체 연관 RP, 및 어셔 증후군) 또는 망막 박리 또는 관련 증상과 같은 병태와 관련하여 사용될 때 사용된다.

[0082] 본원에서 사용되는 용어 '대상'은 살아있는 포유동물을 지칭하며, 용어 '환자'와 상호 교환 가능하게 사용될 수 있다. 포유동물의 예는 포유동물 클래스의 임의의 구성원으로, 인간, 비인간 영장류, 예컨대 침팬지, 및 기타 유인원 및 원숭이 종; 농장 동물, 예컨대 소, 말, 양, 염소, 돼지; 가축, 예컨대 토끼, 개 및 고양이; 래트, 마우스 및 기니피그 및 유사한 동물과 같은 설치류를 포함하는 실험실 동물 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 이 용어는 특정 연령이나 성별을 나타내지 않는다.

[0083] 본원에서 사용되는 용어 '치료하는' 또는 '치료'는 대상의 병태를 안정화하거나 개선하기 위해, 또는 대상이 치료를 받지 않은 경우만큼 심각하게 대상의 병태가 악화될 가능성을 감소시키기 위해 병태의 증상, 임상 징후 또는 근원 병리를 감소, 정지 또는 역전시키는 것을 포함한다.

[0084] '회복하는'은 정상 또는 건강한 상태로 되돌아가는 행위를 지칭한다. 회복은 부분적(예를 들어, 대상이 정상 또는 건강한 상태에 못 미치는 상태로 돌아갈 때) 또는 전체적(예를 들어, 대상이 정상 또는 건강한 상태와 동일하거나 거의 동일한 상태로 돌아갈 때)일 수 있다. 정상 또는 건강한 상태의 예는 망막 박리 전의 환자의 시력이다.

[0085] '시력 개선'은 치료 전에 비해 시력, 민감도 및/또는 시야 범위를 개선하는 것을 포함하여, 볼 수 있는 능력 또는 상태를 향상시키는 행위를 지칭한다.

[0086] 대상의 치료 방법에 관하여 화합물의 '치료 유효량'이라는 용어는 원하는 용량 용법의 일부분으로서 (포유동물, 바람직하게는 인간에게) 투여될 때 치료할 장애 또는 병태 또는 미용 목적에 대해 임상적으로 허용되는 표준치에 따라 증상을 완화하거나, 병태를 개선하거나, 질환 병태의 발병을 늦추는, 예를 들어, 임의의 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 유익성/위험성 비율을 가지는 제제 내 화합물(들)의 양을 지칭한다. 본원에서 치료 유효량은 질환 상태, 연령, 성별 및 환자 체중 및 개체에서 원하는 반응을 이끌어내는 항체의 능력과 같은 요인에 따라 변할 수 있다.

[0087] 본원에서 사용되는 특정 질환, 장애 또는 병태가 발병할 '위험이 있는' 개체는 검출 가능한 질환 또는 질환 증상을 가질 수도 있거나 갖지 않을 수 있고, 본원에 기재된 치료 방법 전에 검출 가능한 질환 또는 질환 증상을 나타낼 수 있거나 나타내지 않을 수도 있다. '위험이 있는'은 개체가 당업계에 공지된 바와 같이 특정 질환, 장애 또는 병태의 발병과 상관 관계가 있는 측정 가능한 매개변수인 하나 이상의 위험 인자를 갖고 있음을 나타낸다. 이러한 위험 요소 중 하나 이상을 가진 개체에서 이들 위험 인자 중 하나 이상이 없는 개체에서보다 특정 질환, 장애 또는 병태가 발병할 확률이 더 높다.

[0088] '만성' 투여는 장기간 동안 초기 치료 효과(활성)를 유지하기 위해 급성 모드와 반대로 연속적으로 의약(들)을 투여하는 것을 지칭한다. '간헐적' 투여는 중단 없이 연속적으로 투여되는 것이 아니라 본질적으로 주기적/정기적인 치료를 지칭한다.

[0089] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 공통적으로 이해되는 동일한 의미를 가진다. 비록 본원에서 기재된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료가 또한 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 재료는 이제 기술되고 있다. 본원에 언급된 모든 공보들은 해당 공보가 인용된 것과 관련된 방법 및/또는 재료, 예를 들어, 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3d edition (2001) Cold Spring Harbor

Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003)); the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology : A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney), ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture : Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies : A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); 및 Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993)]에 기재된 널리 사용된 방법론을 개시하고 설명하기 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0090] 항체

[0091] 본 개시 내용에서 언급된 모든 서열은 미국 특허 출원 제14/933,517호, 미국 특허 출원 제14/890,811호, 미국 특허 제8,877,197호, 미국 특허 제9,708,394호, 미국 특허 출원 제15/360,549호, 미국 특허 제9,562,106호, 미국 특허 제10,450,382호, 미국 특허 제10,457,745호, 국제 특허 출원 제PCT/US2018/022462호에서의 언급에 의해 통합되며, 이들 각각은 본원에 개시되어 있는 항체 및 관련 조성물에 대해 참조로 포함된다.

[0092] 전장 항체는 재조합 DNA 조작 기법을 사용하여 제조될 수 있다. 이러한 조작된 버전은, 예를 들어, 천연 항체의 아미노산 서열 내에 또는 이에 대한 삽입, 결실 또는 변경에 의해 천연 항체 가변 영역에서 생성된 것을 포함한다. 이러한 유형의 특정 예에는 하나의 항체에서 적어도 하나의 CDR 및 임의로 하나 이상의 프레임워크 아미노산 및 제2 항체에서 가변 영역 도메인의 나머지를 함유하는 조작된 가변 영역 도메인이 포함된다. 항체를 암호화하는 DNA는 전장 항체를 암호화하는 DNA의 원하는 부분을 제외한 모든 부분을 결실시켜 제조될 수 있다. 키메라화 항체를 암호화하는 DNA는 인간 불변 영역을 실질적으로 또는 독점적으로 암호화하는 DNA 및 인간 이외의 포유동물의 가변 영역의 서열에서 실질적으로 또는 독점적으로 유래된 가변 영역을 암호화하는 DNA를 재조합함으로써 제조될 수 있다. 인간화 항체를 암호화하는 DNA는 상응하는 인간 항체 영역에서 실질적으로 또는 독점적으로 유래된 상보성 결정 영역[CDR] 이외의 불변 영역 및 가변 영역을 암호화하는 DNA 및 인간 이외의 포유동물에서 실질적으로 또는 독점적으로 유래된 CDR을 암호화하는 DNA를 재조합함으로써 제조될 수 있다.

[0093] 항체를 암호화하는 DNA 분자의 적합한 공급원은 전장 항체를 발현하는 하이브리도마와 같은 세포를 포함한다. 예를 들어, 항체는 항체의 중쇄 및/또는 경쇄를 암호화하는 발현 벡터를 발현하는 숙주 세포에서 단리될 수 있다.

[0094] Fab 단편을 포함하지만 이에 제한되지 않는 항체 단편 및/또는 항체 유도체는 또한 항체 가변 및 불변 영역을 암호화하는 DNA의 조작 및 재발현을 포함하는 재조합 DNA 조작 기법의 사용에 의해 제조될 수 있다. 표준 분자 생물학 기법을 사용하여 추가 아미노산 또는 도메인을 원하는 대로 변형, 부가 또는 결실시킬 수 있다. 가변 또는 불변 영역에 대한 임의의 변경은 본원에서 사용되는 용어 '가변' 및 '불변' 영역에 여전히 포함된다. 일부 경우에는, PCR은 C_H1 도메인의 번역이 쇄간 시스테인에서 중단되도록 C_H1의 쇄간 시스테인을 암호화하는 코돈 바로 다음에 정지 코돈을 도입함으로써 항체 단편을 생성하는 데 사용된다. 적합한 PCR 프라이머를 설계하는 방법은 당업계에 잘 공지되어 있으며, 항체 C_H1 도메인의 서열이 쉽게 이용 가능하다. 일부 구현예에서, 정지 코돈은 부위-지향적 돌연변이유발 기법을 사용하여 도입될 수 있다.

[0095] 본 개시 내용의 항체는 예를 들어 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE 및 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한 이들의 하위클래스를 포함하는 임의의 항체 동종형('클래스')에서 유래될 수 있다. 특정 바람직한 구현예에서, 항체의 중쇄 및 경쇄는 IgG에서 유래된다. 항체의 중쇄 및/또는 경쇄는 쥐 IgG 또는 인간 IgG에서 유래될

수 있다. 특정 다른 바람직한 구현예에서, 항체의 중쇄 및/또는 경쇄는 인간 IgG1에서 유래된다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 항체의 중쇄 및/또는 경쇄는 인간 IgG4에서 유래된다.

[0096] 본 개시 내용의 항체는 C1q, C1r, 또는 C1s에 결합하여 이들의 생물학적 활성을 억제할 수 있다. 예를 들어, (1) 자가항체에 대한 C1q 결합, (2) C1r에 대한 C1q 결합, (3) C1s에 대한 C1q 결합, (4) 포스파티딜세린에 대한 C1q 결합, (5) 펜트락신-3에 대한 C1q 결합, (6) C-반응성 단백질[CRP]에 대한 C1q 결합, (7) 구형 C1q 수용체[globular C1q receptor, gC1qR]에 대한 C1q 결합, (8) 보체 수용체 1[complement receptor 1, CR1]에 대한 C1q 결합, (9) 베타-아밀로이드에 대한 C1q 결합, 또는 (10) 칼레티쿨린에 대한 C1q 결합이다. 다른 구현예에서, C1q의 생물학적 활성은 (1) 고전 보체 활성화 경로의 활성화, (2) 용해 감소 및/또는 C3 침착 감소, (3) 항체 및 보체 의존성 세포독성의 활성화, (4) CH50 용혈, (5) 적혈구 용해 감소, (6) 적혈구 식세포작용 감소, (7) 수지상 세포 침윤 감소, (8) 보체-매개 적혈구 용해 억제, (9) 림프구 침윤 감소 (10) 대식세포 침윤 감소, (11) 항체 침착 감소, (12) 호중구 침윤 감소, (13) 혈소판 식세포작용 감소, (14) 혈소판 용해 감소, (15) 이식편 생존율 개선, (16) 대식세포 매개 식세포작용 감소, (17) 자가항체 매개 보체 활성화 감소, (18) 수혈 반응으로 인한 적혈구 파괴 감소, (19) 동종항체로 인한 적혈구 용해 감소, (20) 수혈 반응으로 인한 용혈 감소, (21) 동종항체 매개 혈소판 용해 감소, (22) 빈혈 개선, (23) 호산구 감소, (24) 적혈구상에서의 C3 침착 감소(예를 들어, RBC상에서의 C3b, iC3b 등의 침착 감소), (25) 혈소판상에서의 C3 침착 감소(예를 들어, 혈소판상에서의 C3b, iC3b 등의 침착 감소), (26) 아나필라톡신 생성 감소, (27) 자가항체 매개 수포 형성 감소, (28) 자가항체 유도 홍반 감소, (29) 수혈 반응으로 인한 적혈구 파괴 감소, (30) 수혈 반응으로 인한 혈소판 용해 감소, (31) 비만 세포 활성화의 감소, (32) 비만 세포 히스타민 방출 감소, (33) 혈관 투과성 감소, (34) 이식편 내피상에서의 보체 침착 감소, (35) B-세포 항체 생성, (36) 수지상 세포 성숙, (37) T-세포 증식, (38) 사이토카인 생성, (39) 미세아교세포 활성화, (40) 아더스(Arthus) 반응, (41) 이식편 내피에서 아나필라톡신 생성 감소, 또는 (42) 보체 수용체 3[complement receptor 3, CR3/C3] 발현 세포의 활성화이다.

[0097] 일부 구현예에서, CH50 용혈은 인간, 마우스 및/또는 래트 CH50 용혈을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 CH50 용혈 적어도 약 50% 내지 적어도 약 95%를 중화할 수 있다. 일부 구현예에서, 항체는 CH50 용혈 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%를 중화할 수 있다. 항체는 또한 150 ng/ml 미만, 100 ng/ml 미만, 50 ng/ml 미만, 또는 20 ng/ml 미만의 용량에서 CH50 용혈 적어도 50%를 중화할 수 있다.

[0098] 보체 활성을 측정하기 위한 다른 시험관내 분석에는 보체 활성화 동안 형성되는 보체 성분 또는 복합체의 분할 생성물 측정을 위한 ELISA 분석이 포함된다. 고전 경로를 통한 보체 활성화는 혈청 내 C4d 및 C4 수준을 따라 측정될 수 있다. 대체 경로의 활성화는 순환 중인 Bb 또는 C3bBbP 복합체의 수준을 평가하여 ELISA에서 측정될 수 있다. 시험관내 항체 매개 보체 활성화 분석은 또한 C3a 생성의 억제를 평가하는 데 사용될 수 있다.

[0099] 본 개시 내용의 항체는 단일 클론 항체, 다클론 항체, 재조합 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 키메라 항체, 다중특이적 항체, 이의 항체 단편 또는 이의 유도체일 수 있다. 일부 구현예에서, 항체는 인간화 항체이다.

[0100] 본 개시 내용의 항체는 또한 Fab 단편, Fab' 단편, $F(ab')_2$ 단편, Fv 단편, 디아바디, 또는 단일 쇄 항체 분자와 같은 항체 단편일 수 있다. 일부 구현예에서, 항체 단편은 Fab 단편이다.

[0101] 일부 구현예에서, 항체는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리될 수 있는 인간 단일 클론 항체, 예컨대 (a) 인간 면역글로불린 유전자에 대해 형질전환된 또는 염색체 도입된[transchromosomal] 동물(예를 들어, 마우스)에서 단리된 항체 또는 이것에서 제조된 하이브리도마(아래에 추가로 기재됨), (b) 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주세포, 예를 들어, 형질감염세포[transfectoma]에서 단리된 항체, (c) 재조합, 복합 인간 항체 라이브러리에서 단리된 항체, 및 (d) 인간 면역글로불린 유전자 서열을 다른 DNA 서열에 스플라이싱하는 것을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체이다. 이러한 재조합 인간 항체는 인간 생식계열 및/또는 비생식계열 면역글로불린 서열에서 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는다. 그러나, 특정 구현예에서, 이러한 재조합 인간 항체는 시험관내 돌연변이유발(또는 인간 Ig 서열에 대해 형질전환된 동물이 사용되는 경우, 생체내 체세포 돌연변이유발)될 수 있으며, 이에 따라 재조합 항체의 V_H 및 V_L 영역의 아미노산 서열은 인간 생식계열 V_H 및 V_L 서열에서 유래되고 관련되지만 생체내 인간 항체 생식계열 레퍼토리 내에 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0102] 일부 구현예에서, 항체는 인간화 및/또는 키메라 단일 클론 항체이며, 이는 설치류(예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터 및 기니피그)를 (1) 인간 혈장 또는 혈청에서의 정제된 보체 성분의 효소 분해에서 유래된 천연 보체 성분(예를 들어, C1q), 또는 (2) 진핵 또는 원핵 시스템에 의해 발현되는 재조합 보체 성분, 또는 이의 유래 단편

으로 면역화함으로써 생성될 수 있다. 다른 동물, 예를 들어, 비인간 영장류, 인간 면역글로불린을 발현하는 형질전환 마우스, 및 인간 B-림프구가 이식된 중증 복합형 면역결핍증[severe combined immunodeficient, SCID] 마우스가 면역화에 사용될 수 있다.

[0103] 다클론 및 단일 클론 항체는 병원체에 대한 면역계의 반응에서 면역글로불린[Ig] 분자로 자연적으로 생성된다. 인간 혈청 내 농도가 8 mg/ml인 우세한 형식인 약 150 kDa IgG1 분자는 두 개의 동일한 약 50 kDa 중쇄와 두 개의 동일한 약 25 kDa 경쇄로 구성된다.

[0104] 하이브리도마는 면역화된 동물의 B-림프구를 골수종 세포와 융합함으로써 통상적인 절차에 의해 생성될 수 있다. 또한, 항-C1q 항체는 파지-디스플레이 시스템 내 인간 B-림프구에서의 재조합 단일-쇄 Fv 또는 Fab 라이브러리를 스크리닝하여 생성될 수 있다. 인간 C1q에 대한 MAb의 특이성은 효소 결합 면역 흡착 분석[ELISA], 웨스턴 면역블롯팅 또는 기타 면역화학적 기법으로 테스트될 수 있다.

[0105] 스크리닝 과정에서 확인된 항체의 보체 활성화에 대한 억제 활성은 대체 보체 경로에 대해 감작되지 않은 토끼 또는 기니피그 RBC를 사용하거나 고전 보체 경로에 대해 감작된 닭 또는 양 RBC를 사용하는 용혈 분석으로 평가될 수 있다. 고전 보체 경로에 특이적인 억제 활성을 나타내는 하이브리도마는 제한 희석에 의해 복제된다. 항체는 전술한 분석에 의해 인간 C1q에 대한 특이성의 특징 분석을 위해 정제된다.

[0106] 항-보체 C1q 항체

[0107] 본원에 개시된 항-C1q 항체는 C1q의 강력한 억제제이며, 임의의 기간에 걸쳐 C1q 기능의 지속적인 억제를 위해 투여될 수 있고, 그 후 이의 활성이 중요할 수 있는 시간에 정상 C1q 기능의 복귀를 허용하도록 임의로 철회될 수 있다. 동물 시험에서 본원에 개시된 항-C1q 항체로 얻은 결과는 인간화 또는 인간 항체뿐만 아니라 이의 단편 및/또는 유도체를 사용하여 클리닉으로 쉽게 전달할 수 있다.

[0108] C1q는 18개의 폴리펩타이드 쇄(6개의 C1q A 쇄, 6개의 C1q B 쇄 및 6개의 C1q C 쇄)로 이루어진 460 kDa의 대형 다량체 단백질이다. C1r 및 C1s 보체 단백질은 C1q 꼬리 영역에 결합하여 C1 복합체($C1qr_2s_2$)를 형성한다.

[0109] 본 개시 내용의 항체는 보체 인자 C1q 및/또는 고전 보체 활성화 경로의 C1 복합체에서의 C1q를 특이적으로 인식한다. 결합된 보체 인자는 인간, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 낙타, 양, 염소 또는 돼지와 같은 임의의 포유동물 유기체를 포함하는, 보체 시스템을 갖는 임의의 유기체에서 제한되지 않고 유래될 수 있다.

[0110] 본원에 사용된 바와 같이, 'C1 복합체'는 한 개의 C1q 단백질, 두 개의 C1r 단백질, 및 두 개의 C1s 단백질을 제한되지 않고 포함할 수 있는 단백질 복합체(예를 들어, $C1qr^2s^2$)를 지칭한다.

[0111] 본원에 개시된 항-C1q 항체는 C1 복합체 형성을 억제할 수 있다.

[0112] 본원에 사용된 바와 같이, '보체 인자 C1q'는 야생형 서열 및 자연 발생 변이체 서열 둘 다를 지칭한다.

[0113] 본 개시 내용의 항체에 의해 인식되는 보체 인자 C1q의 비제한적인 예는 세 개의 폴리펩타이드 쇄 A, B 및 C를 포함하는 인간 C1q이다.

C1q, 쇄 A(호모 사피엔스), 수탁 번호 단백질
데이터 베이스: NP_057075.1; 유전자은행 번호: NM_015991:
>gi|7705753|ref|NP_057075.1| 보체 C1q
하위구성요소 소단위 A 전구체 [호모 사피엔스]
(서열 번호 1)

[0114]
MEGPRGWLVLCVLAISLASMVTEDLCRAPDGKKGEAGRPGRRGRPGLKGEQGEPGAPGIRTGIQGLKGDQGE
PGPSGNPGKVGYPGPSGPLGARGIPGIKGTKGSPGNIKDQPRPAFSAIRRNPPMGGNVVIFDTVITNQEEPY
QNHSGRFVCTVPGYYYFTFQVLSQWEICLSIVSSSRGQVRRSLGFCDTTNKGLFQVVSGGMVLQLQQGDQVW
VEKDPKKGHIYQGSEADSVFSGFLIFPSA.

[0115]

C1q, 쇄 B (호모 사피엔스), 수탁 번호 단백질
데이터 베이스: NP_000482.3; 유전자은행 번호: NM_000491.3:
>gi|87298828|ref|NP_000482.3| 보체 C1q
하위구성요소 소단위 B 전구체 [호모 사피엔스]
(서열 번호 2)

MMMKIPWGSIPVLMLLLLLGLIDISQAQLSCTGPPAIPGIPGIPGTPGPDGQPGTPGIKGEKGLPGLAGDHG
EFGEKGDPGIPGNPGKVGPKGPMGPKGGPGAPGAPGPKGESGDYKATQKIAFSATRTINVPLRRDQTIRFDH
VITNMNNNYEPRSGKFTCKVPGLYYFTYHASSRGNLCVNLMRGRERAQKVVTFCDYAYNTFQVTTGGMVLKL
EQGENVFLQATDKNSLLGMEGANSIFSGFLLFPDMEA.

[0116]

C1q, 쇄 C (호모 사피엔스), 수탁 번호 단백질
데이터 베이스: NP_001107573.1; 유전자은행 번호:
NM_001114101.1:
>gi|166235903|ref|NP_001107573.1| 보체 C1q
하위구성요소 소단위 C 전구체 [호모 사피엔스]
(서열 번호 3)

MDVGPSSLPHLGLKLLLLLLLLPLRGQANTGCYGIPGMPGLPGAPGKDGYDGLPGPKGEPGIPAIPGIRGPK
GQKGEPGLPGHPGKNGPMGPPGMPGVPGPMGIPGEPGEEGRYKQKFQSVFTVTRQTHQPPAPNSLIRFNAVL
TNPQGDYDTSTGKFTCKVPGLYYFVYHASHTANLCVLLYRSGVKVVTFCGHTSKTNQVNSGGVLLRLQVGEE
VWLAVNDYYDMVGIQGSDSVFSGFLLFPD.

[0117] 따라서, 본 개시 내용의 항-C1q 항체는 C1q 단백질의 폴리펩타이드 쇄 A, 폴리펩타이드 쇄 B, 및/또는 폴리펩타이드 쇄 C에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시 내용의 항-C1q 항체는 인간 C1q 또는 이의 상동체, 예컨대 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 낙타, 양, 염소 또는 돼지 C1q의 폴리펩타이드 쇄 A, 폴리펩타이드 쇄 B, 및/또는 폴리펩타이드 쇄 C에 결합한다. 일부 구현예에서, 항-C1q 항체는 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 또는 이의 단편 또는 이의 유도체이다. 일부 구현예에서, 항체는 인간화 항체이다. 일부 구현예에서, 항체는 Fab 단편과 같은 항체 단편이다.

[0118] 다음 20개의 단락에서 언급된 모든 서열은 미국 특허 제9,708,394호에서의 참조에 의해 통합되며, 이는 본원에 개시되어 있는 항체 및 관련 조성물에 대해 참조로 포함된다.

[0119] 항체 M1[Antibody M1, Mab1]의 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 서열

[0120] 표준 기법을 사용하여, 항체 M1의 경쇄 가변 및 중쇄 가변 도메인을 암호화하는 핵산 및 아미노산 서열이 결정되었다. 항체 M1의 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열은 다음과 같다.

[0121]

DVQITQSPSYLAASPGETITINC**RASKSINKYLA**WYQEKPGKTNKLLIY**SGSTLQS**GIPSRFSGSGSGTDFT
LTISSLEPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGAGTKLELK(서열 번호 4).

[0122] 경쇄 가변 도메인의 초가변 영역[HVR]은 굵게 표시되고 밑줄이 그어진 텍스트로 표시된다. 일부 구현예에서, M1 경쇄 가변 도메인의 HVR-L1은 서열 RASKSINKYLA(서열 번호 5)를 갖고, M1 경쇄 가변 도메인의 HVR-L2는 서열 SGSTLQS(서열 번호 6)를 갖고, M1 경쇄 가변 도메인의 HVR-L3은 서열 QQHNEYPLT(서열 번호 7)를 갖는다.

[0123] 항체 M1의 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열은 다음과 같다.

항체 M1의 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열은 다음과 같다.

[0124]

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKSS**GYHFTSYWMH**WVKQRPGQGLEWIG**VIHPNSGSINYNEKFES**KATLTV
DKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAG**ERDSTEVLPMDY**WGQGTSVTVSS(서열 번호 8).

[0125] 중쇄 가변 도메인의 초가변 영역[HVR]은 굵게 표시되고 밑줄이 그어진 텍스트로 표시된다. 일부 구현예에서, M1 중쇄 가변 도메인의 HVR-H1은 서열 GYHFTSYWMH(서열 번호 9)를 갖고, M1 중쇄 가변 도메인의 HVR-H2는 서열 VIHPNSGSINYNEKFES(서열 번호 10)를 갖고, M1 중쇄 가변 도메인의 HVR-H3은 서열 ERDSTEVLPMDY(서열 번호 11)

를 갖는다.

[0126] 경쇄 가변 도메인을 암호화하는 핵산 서열은 다음과 같이 결정되었다.

GATGTCCAGATAACCCAGTCTCCATCTTATCTTGCTGCATCTCCTGGAGAAACCATTACTATTAATTGCAGG
GCAAGTAAGAGCATTAACAAATATTTAGCCTGGTATCAAGAGAAACCTGGGAAAACTAATAAGCTTCTTATC
TACTCTGGATCCACTTTGCAATCTGGAATTCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACT
CTCACCATCAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAATGTATTACTGTCAACAACATAATGAATACCCGCTC
ACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA(서열 번호 12).

[0127]

[0128] 중쇄 가변 도메인을 암호화하는 핵산 서열은 다음과 같이 결정되었다.

CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGTCT
TCTGGCTACCATTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATT
GGAGTGATTCATCCTAATAGTGGTAGTATTAACTACAATGAGAAGTTCGAGAGCAAGGCCACACTGACTGTA
GACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCGGCGGTCTATTATTGT
GCAGGAGAGAGAGATTCTACGGAGGTTCTCCCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCC
TCA(서열 번호 13).

[0129]

[0130] Mab1-Fab는 Mab1(M1) 항체의 Fab이다.

[0131] Mab3은 Mab1 항체에서 유래되고 쥐 실험에 최적화된 쥐 항-C1q 항체이고, Mab3-Fab는 Mab3 항체의 Fab이다.

[0132] **재료의 기탁**

[0133] 다음 재료들은 20110-2209, 미국, 버지니아주, 10801 유니버시티 블러바드(University Blvd) 소재 ATCC 특허 기탁 기관, 미국 미생물 보존센터[American Type Culture Collection, ATCC]의 부다페스트 조약에 따라 기탁되었다.

샘플 ID	동종형	기탁 일자	ATCC 수탁 번호
마우스 하이브리도마 C1qM1 7788-1(M) 051613 생성 항-C1q 항체 M1	IgG1, 카파	1 월 6 일, 2013	PTA-120399

[0134]

[0135] M1 항체를 생성하는 하이브리도마 세포주(마우스 하이브리도마 C1qM1 7788-1(M) 051613)는 특허 출원이 계류 중인 동안, 그리고 30년 동안, 또는 가장 최근의 요청 후 5년 또는 특허의 유효 기간 중 더 긴 기간 동안 배양물에 대한 접근이 가능하다는 것을 보장하는 조건하에 ATCC에 기탁되었다. 기탁물을 해당 기간 동안 사용할 수 없게 되면 기탁물은 대체될 것이다. 기탁물은 대상 출원의 대응물 또는 이의 자손이 출원된 국가의 외국 특허법에서 요구하는 대로 사용될 수 있다. 그러나, 기탁의 이용 가능성이 정부 조치에 의해 부여된 특허권을 훼손하는 대상 발명을 실시하기 위한 라이센스를 구성하지 않는다는 것을 이해해야 한다.

[0136] 본원에는 경쇄 가변 도메인 및 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항-C1q 항체를 투여하는 방법이 개시되어 있다. 항체는 적어도 인간 C1q, 마우스 C1q, 또는 래트 C1q에 결합할 수 있다. 항체는 인간화 항체, 키메라 항체 또는 인간 항체일 수 있다. 항체는 단일 클론 항체, 이의 항체 단편 및/또는 이의 항체 유도체일 수 있다. 일부 구현예에서, 항체는 인간화 항체이다. 일부 구현예에서, 항체는 Fab 단편과 같은 항체 단편이다. 경쇄 가변 도메인은 수탁 번호 PTA-120399로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일 클론 항체 M1의 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3을 포함한다. 중쇄 가변 도메인은 ATCC 수탁 번호 PTA-120399로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일 클론 항체 M1의 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3을 포함한다.

[0137] 일부 구현예에서, 경쇄 가변 도메인 및 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열은 HVR-L1의 서열 번호 5, HVR-L2의 서열 번호 6, HVR-L3의 서열 번호 7, HVR-H1의 서열 번호 9, HVR-H2의 서열 번호 10, 및 HVR-H3의 서열 번호 11 중 하나 이상을 포함한다.

[0138] 항체는 바람직하게는 HVR-L1 RASKSINKYLA(서열 번호 5), HVR-L2 SGSTLQS(서열 번호 6), 및 HVR-L3 QQHNEYPLT(서열 번호 7)를 보유하면서 서열 번호 4와 적어도 85%, 90% 또는 95% 동일한 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 항체는 바람직하게는 HVR-H1 GYHFTSYWMH(서열 번호 9), HVR-H2 VIHPNSGSINYNEKFES(서열 번호 10), 및 HVR-H3 ERDSTEVLPMDY(서열 번호 11)를 보유하면서 서열 번호 8과 적어도 85%, 90%, 또는 95% 동일한 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0139] 본원에는 C1q와 자가항체 사이의 상호 작용을 억제하는 항-C1q 항체를 투여하는 방법이 개시되어 있다. 바람직한 구현예에서, 항-C1q 항체는 순환 또는 조직에서 C1q의 제거를 야기한다.

[0140] 일부 구현예에서, 본 개시 내용의 항-C1q 항체는 C1q와 C1s 사이의 상호 작용을 억제한다. 일부 구현예에서, 항-C1q 항체는 C1q와 C1r 사이의 상호 작용을 억제한다. 일부 구현예에서 항-C1q 항체는 C1q와 C1s 사이 그리고 C1q와 C1r 사이의 상호 작용을 억제한다. 일부 구현예에서, 항-C1q 항체는 C1q와 또 다른 항체, 예컨대 자가항체 사이의 상호 작용을 억제한다. 바람직한 구현예에서, 항-C1q 항체는 순환 또는 조직에서 C1q의 제거를 야기한다. 일부 구현예에서, 항-C1q 항체는 2.5:1; 2.0:1; 1.5:1; 또는 1.0:1 미만의 화학량론에서 각각의 상호 작용을 억제한다. 일부 구현예에서, C1q 항체는 C1q 및 항-C1q 항체의 대략 등몰 농도에서 상호 작용, 예컨대 C1q-C1s 상호 작용을 억제한다. 다른 구현예에서, 항-C1q 항체는 20:1 미만; 19.5:1 미만; 19:1 미만; 18.5:1 미만; 18:1 미만; 17.5:1 미만; 17:1 미만; 16.5:1 미만; 16:1 미만; 15.5:1 미만; 15:1 미만; 14.5:1 미만; 14:1 미만; 13.5:1 미만; 13:1 미만; 12.5:1 미만; 12:1 미만; 11.5:1 미만; 11:1 미만; 10.5:1 미만; 10:1 미만; 9.5:1 미만; 9:1 미만; 8.5:1 미만; 8:1 미만; 7.5:1 미만; 7:1 미만; 6.5:1 미만; 6:1 미만; 5.5:1 미만; 5:1 미만; 4.5:1 미만; 4:1 미만; 3.5:1 미만; 3:1 미만; 2.5:1 미만; 2.0:1 미만; 1.5:1 미만; 또는 1.0:1 미만의 화학량론으로 C1q에 결합한다. 특정 구현예에서, 항-C1q 항체는 20:1 내지 1.0:1 또는 1.0:1 미만 범위의 결합 화학량론으로 C1q에 결합한다. 특정 구현예에서, 항-C1q 항체는 6:1 내지 1.0:1 또는 1.0:1 미만 범위의 결합 화학량론으로 C1q에 결합한다. 특정 구현예에서, 항-C1q 항체는 2.5:1 내지 1.0:1 또는 1.0:1 미만 범위의 결합 화학량론으로 C1q에 결합한다. 일부 구현예에서, 항-C1q 항체는 C1q와 C1r 사이, 또는 C1q와 C1s 사이, 또는 C1q와 C1r 및 C1s 둘 다 사이의 상호 작용을 억제한다. 일부 구현예에서, 항-C1q 항체는 C1q와 C1r 사이, C1q와 C1s 사이, 및/또는 C1q와 C1r과 C1s 둘 다 사이의 상호 작용을 억제한다. 일부 구현예에서, 항-C1q 항체는 C1q A-쇄에 결합한다. 다른 구현예에서, 항-C1q 항체는 C1q B-쇄에 결합한다. 다른 구현예에서, 항-C1q 항체는 C1q C-쇄에 결합한다. 일부 구현예에서, 항-C1q 항체는 C1q A-쇄, C1q B-쇄 및/또는 C1q C-쇄에 결합한다. 일부 구현예에서, 항-C1q 항체는 C1q A-쇄, B-쇄 및/또는 C-쇄의 구형 도메인에 결합한다. 다른 구현예에서, 항-C1q 항체는 C1q A-쇄, C1q B-쇄 및/또는 C1q C-쇄의 콜라겐-유사 도메인에 결합한다.

[0141] 본 개시 내용의 항체가 C1q와 C1s 사이의 상호 작용 또는 C1q와 C1r 사이의 상호 작용과 같은 두 개 이상의 보체 인자 사이의 상호 작용을 억제하는 경우, 항체의 존재하에 발생하는 상호 작용은 본 개시 내용의 항체가 존재하지 않는 대조군에 비해 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 감소될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시 내용의 항체는 두 개 이상의 보체 인자 사이의 상호 작용을 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 만큼 감소시킨다. 특정 구현예에서, 항체의 존재하에 발생하는 상호 작용은 본 개시 내용의 항체가 존재하지 않는 대조군에 비해 적어도 30% 내지 적어도 99% 범위의 양만큼 감소된다.

[0142] 일부 구현예에서, 본 개시의 항체는 C2 또는 C4-절단을 본 개시 내용의 항체가 존재하지 않는 대조군에 비해 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 만큼, 또는 적어도 30% 내지 적어도 99% 범위의 양만큼까지 억제한다. C2 또는 C4-절단을 측정하는 방법은 당업계에 잘 공지되어 있다. C2 또는 C4-절단과 관련하여 본 개시 내용의 항체에 대한 EC_{50} 값은 3 μg/ml; 2.5 μg/ml; 2.0 μg/ml; 1.5 μg/ml; 1.0 μg/ml; 0 .5 μg/ml; 0.25 μg/ml; 0.1 μg/ml; 0.05 μg/ml 미만일 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시 내용의 항체는 C1q 및 각각의 항-C1q 항체의 대략 등몰 농도에서 C2 또는 C4-절단을 억제한다.

[0143] 일부 구현예에서, 본 개시 내용의 항체는 자가항체-의존성 및 보체-의존성 세포독성[complement-dependent cytotoxicity, CDC]을 본 개시 내용의 항체가 존재하지 않는 대조군에 비해 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 만큼, 또는 적어도 30% 내지 적어도 99% 범위의 양만큼까지 억제한다. 자가항체-의존성 및 보체-의존성 세포독성 억제와 관련하여 본 개시 내용의 항체에 대한 EC_{50} 값은 3 μg/ml; 2.5 μg/ml; 2.0 μg/ml; 1.5 μg/ml; 1.0 μg/ml; 0 .5 μg/ml; 0.25 μg/ml; 0.1 μg/ml; 0.05 μg/ml 미만일 수 있다.

[0144] 일부 구현예에서, 본 개시 내용의 항체는 보체-의존성 세포-매개 세포독성[complement-dependent cell-mediated cytotoxicity, CDCC]을 본 개시 내용의 항체가 존재하지 않는 대조군에 비해 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 만큼, 또는 적어도 30% 내지 적어도 99% 범위의 양만큼까지 억제한다. CDCC를 측정하는 방법은 당업계에 잘 공지되어 있다. CDCC 억제와 관련하여 본 개시 내용의 항체에 대한 EC_{50} 값은 3 μg/ml; 2.5 μg/ml; 2.0 μg/ml; 1.5 μg/ml; 1.0 μg/ml; 0.5 μg/ml; 0.25 μg/ml; 0.1 μg/ml; 0.05 μg/ml 미만일 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시 내용의 항체는 CDCC를 억제하지만, 항체-의존성 세포 세포독성[antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC]은 억제하지 않는다.

[0145] 인간화 항-보체 C1q 항체

[0146] 본 개시 내용의 인간화 항체는 고전 보체 경로의 C1 복합체에서 보체 인자 C1q 및/또는 C1q 단백질에 특이적으로 결합한다. 인간화 항-C1q 항체는 인간 C1q, 인간 및 마우스 C1q, 래트 C1q, 또는 인간 C1q, 마우스 C1q 및 래트 C1q에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0147] 다음 16개 단락에서 언급된 모든 서열은 미국 특허 출원 제14/933,517호에서의 참조에 의해 통합되며, 이는 본원에 개시되어 있는 항체 및 관련 조성물에 대해 참조로 포함된다.

[0148] 일부 구현예에서, 인간 중쇄 불변 영역은 서열 번호 47의 아미노산 서열, 또는 서열 번호 47에 대해 적어도 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 인간 IgG4 중쇄 불변 영역이다. 인간 IgG4 중쇄 불변 영역은 카바트 넘버링에 따른 하나 이상의 변형 및/또는 아미노산 치환을 갖는 Fc 영역을 포함할 수 있다. 이러한 경우에, Fc 영역은 248번 위치에서의 류신에서 글루타메이트로의 아미노산 치환을 포함하고, 여기서 이러한 치환은 Fc 영역이 Fc 수용체와 상호 작용하는 것을 억제한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 241번 위치에서의 세린에서 프롤린으로의 아미노산 치환을 포함하고, 여기서 이러한 치환은 항체에서의 군 전환[arm switching]을 방지한다.

[0149] 인간 IgG4(S241P L248E) 중쇄 불변 도메인의 아미노산 서열은 다음과 같다.

[0150] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK(서열 번호 47).

[0151] 항체는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있으며, 여기서 중쇄 가변 도메인은 서열 번호 31~34 중 어느 하나에서 선택된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 31~34 중 어느 하나에서 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 이러한 특정 구현예에서, 경쇄 가변 도메인은 서열 번호 35~38 중 어느 하나에서 선택된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 35~38 중 어느 하나에서 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0152] 중쇄 가변 도메인 변이체 1[heavy chain variable domain variant 1, VH1]의 아미노산 서열은 다음과 같다. QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSS**GYHFTSYWMH**WVKQAPGQGLEWIG**VIHPNSGSINYNEKFES**KATITVDKSTSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAG**ERDS TEVLPMDY**WGQGTSVTVSS(서열 번호 31). VH1의 초가변 영역[HVR]은 굵고, 밑줄이 그어진 텍스트로 표시된다.

[0153] 중쇄 가변 도메인 변이체 2[heavy chain variable domain variant 2, VH2]의 아미노산 서열은 다음과 같다. QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSS**GYHFTSYWMH**WVKQAPGQGLEWIG**VIHPNSGSINYNEKFES**RATITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAG**ERDS TEVLPMDY**WGQGTTVTVSS(서열 번호 32). VH2의 초가변 영역[HVR]은 굵고, 밑줄이 그어진 텍스트로 표시된다.

[0154] 중쇄 가변 도메인 변이체 3[heavy chain variable domain variant 3, VH3]의 아미노산 서열은 다음과 같다. QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSS**GYHFTSYWMH**WVKQAPGQGLEWIG**VIHPNSGSINYNEKFES**RVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAG**ERDS TEVLPMDY**WGQGTTVTVSS(서열 번호 33). VH3의 초가변 영역[HVR]은 굵고, 밑줄이 그어진 텍스트로 표시된다.

[0155] 중쇄 가변 도메인 변이체 4[heavy chain variable domain variant 4, VH4]의 아미노산 서열은 다음과 같다. QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSS**GYHFTSYWMH**WVRQAPGQGLEWIG**VIHPNSGSINYNEKFES**RVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAG**ERDS TEVLPMDY**WGQGTTVTVSS(서열 번호 34). VH4의 초가변 영역[HVR]은 굵고, 밑줄이 그어진 텍스트로 표시된다.

[0156] 카파 경쇄 가변 도메인 변이체 1[kappa light chain variable domain variant 1, Vκ1]의 아미노산 서열은 다

음과 같다.
DVQITQSPSYLAASLGERATINC**RASKSINKYLA**WYQQKPGKTNKLLIY**SGSTLQS**GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQGT KLEIK(서열 번호 35). Vκ1의 초가변 영역[HVR]은 굵고, 밑줄이 그어진 텍스트로 표시된다.

[0157] 카파 경쇄 가변 도메인 변이체 2[kappa light chain variable domain variant 2, Vκ2]의 아미노산 서열은 다음과 같다.
DVQITQSPSSLSASLGERATINC**RASKSINKYLA**WYQQKPGKANKLLIY**SGSTLQS**GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQGT KLEIK(서열 번호 36). Vκ2의 초가변 영역[HVR]은 굵고, 밑줄이 그어진 텍스트로 표시된다.

[0158] 카파 경쇄 가변 도메인 변이체 3[kappa light chain variable domain variant 3, Vκ3]의 아미노산 서열은 다음과 같다.
DVQITQSPSSLSASLGERATINC**RASKSINKYLA**WYQQKPGKAPKLLIY**SGSTLQS**GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQGT KLEIK(서열 번호 37). Vκ3의 초가변 영역[HVR]은 굵고, 밑줄이 그어진 텍스트로 표시된다.

[0159] 카파 경쇄 가변 도메인 변이체 4[kappa light chain variable domain variant 4, Vκ4]의 아미노산 서열은 다음과 같다.
DIQLTQSPSSLSASLGERATINC**RASKSINKYLA**WYQQKPGKAPKLLIY**SGSTLQS**GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQGT KLEIK(서열 번호 38). Vκ4의 초가변 영역[HVR]은 굵고, 밑줄이 그어진 텍스트로 표시된다.

[0160] 항체는 HVR-L1 RASKSINKYLA(서열 번호 5), HVR-L2 SGSTLQS(서열 번호 6), 및 HVR-L3 QQHNEYPLT(서열 번호 7)를 보유하면서 서열 번호 35~38과 적어도 85%, 90%, 또는 95% 동일한 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 항체는 HVR-H1 GYHFTSYWMH(서열 번호 9), HVR-H2 VIHPNSGSINYNEKFES(서열 번호 10), 및 HVR-H3 ERDSTEVLPMDY(서열 번호 11)를 보유하면서 서열 번호 31~34와 적어도 85%, 90%, 또는 95% 동일한 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0161] 일부 구현예에서, 항체는 서열 번호 35의 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열 및 서열 번호 31의 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 서열 번호 36의 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열 및 서열 번호 32의 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 서열 번호 37의 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열 및 서열 번호 33의 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 서열 번호 38의 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열 및 서열 번호 34의 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 포함한다.

[0162] 전장 항체 Mab2는 중쇄 가변 도메인 변이체 3[VH3](서열 번호 33) 및 카파 경쇄 가변 도메인 변이체 3[Vκ3](서열 번호 37)을 포함한다. Mab2-Fab는 Mab2 항체의 Fab이다.

[0163] 일부 구현예에서, 본 개시 내용의 인간화 항-C1q 항체는 Fab 영역을 함유하는 중쇄 가변 영역 및 Fc 영역을 함유하는 중쇄 불변 영역을 함유하며, 여기서 Fab 영역은 본 개시 내용의 C1q 단백질에 특이적으로 결합하지만, Fc 영역은 C1q 단백질에 결합할 수 없다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 동종형에서 유래한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 보체 활성을 유도할 수 없고/없거나 항체-의존성 세포 세포독성[ADCC]을 유도할 수 없다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 제한 없이 아미노산 치환을 포함하는 하나 이상의 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 본 개시 내용의 인간화 항-C1q 항체의 Fc 영역은 카바트 넘버링 규칙에 따른 248번 위치 또는 카바트 넘버링 규칙에 따른 248번 위치에 상응하는 위치 및/또는 카바트 넘버링 규칙에 따른 241번 위치 또는 카바트 넘버링 규칙에 따른 241번 위치에 상응하는 위치에서의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 248번 위치 또는 248번 위치에 상응하는 위치에서의 아미노산 치환은 Fc 영역이 Fc 수용체와 상호 작용하는 것을 억제한다. 일부 구현예에서, 248번 위치 또는 248번 위치에 상응하는 위치에서의 아미노산 치환은 류신에서 글루타메이트로의 아미노산 치환이다. 일부 구현예에서, 241번 위치 또는 241번 위치에 상응하는 위치에서의 아미노산 치환은 항체에서의 군 전환을 방지한다. 일부 구현예에서, 241번 위치 또는 241번 위치에 상응하는 위치에서의 아미노산 치환은 세린에서 프롤린으로의 아미노산 치환이다. 특정 구현예에서, 본 개시 내용의 인간화 항-C1q 항체의 Fc 영역은 서열 번호 47의 아미노산 서열, 또는 서열 번호 47의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0164] 항-C1q Fab 단편(예를 들어, FabA)

[0165] 재조합 DNA 기술의 출현 이전에, 폴리펩타이드 서열을 절단하는 단백질분해 효소(프로테이스)는 항체 분자의 구조를 분석하고 분자의 어느 부분이 다양한 기능을 담당하는지 결정하는 데 사용되었다. 프로테이스 파파인을 사

용하는 제한된 소화는 항체 분자를 세 개의 단편으로 절단한다. Fab 단편으로 알려진 두 개의 단편은 동일하며, 항원-결합 활성을 함유한다. Fab 단편은 항체 분자의 두 개의 동일한 군에 상응하며, 이들 각각은 중쇄의 V_H 및 C_H1 도메인과 쌍을 이루는 완전한 경쇄로 구성된다. 다른 단편은 항원 결합 활성이 없지만, 원래는 쉽게 결정화되는 것이 관찰되어 이런 이유로 Fc[Fragment crystallizable] 단편으로 명명되었다. Fab 분자를 IgG 분자와 비교했을 때, Fab는 높은 이동성 및 조직 침투 능력, 그들의 감소된 순환 반감기, 항체 효과기 기능을 매개하지 않고 항원에 1가 결합하는 능력 및 낮은 면역원성으로 인해 특정 생체내 용도에서 IgG보다 우수한 것으로 나타났다.

[0166] Fab 분자는 불변 도메인 C_H2 및 C_H3에 의해 단축된 중쇄가 있는 Ig 분자의 인공적인 약 50 kDa단편이다. 두 개의 이호성(V_L-V_H 및 C_L-C_H1) 도메인 상호 작용은 Fab 분자의 2쇄 구조의 기초가 되며, 이는 C_L 및 C_H1 사이의 이황화 가교에 의해 추가로 안정화된다. Fab 및 IgG는 V_L 및 V_H에서 각각 세 개인, 여섯 개의 상보성 결정 영역[CDR](LCDR1, LCDR2, LCDR3 및 HCDR1, HCDR2, HCDR3)에 의해 형성된 동일한 항원 결합 부위를 갖는다. CDR은 항체의 초가변 항원 결합 부위를 정의한다. 가장 높은 서열 변이는 자연 면역계에서 각각 V_L 및 J_L 유전자 또는 V_H, D_H 및 J_H 유전자의 재배열에 의해 생성되는 LCDR3 및 HCDR3에서 발견된다. LCDR3 및 HCDR3은 전형적으로 항원 결합 부위의 핵심을 형성한다. 여섯 개의 CDR을 연결하고 표시하는 보존 영역을 프레임워크 영역이라고 한다. 가변 도메인의 3차원 구조에서, 프레임워크 영역은 외부의 초가변 CDR 루프와 내부의 보존된 이황화 가교에 의해 연결된 두 개의 반대 역평행 β-시트의 샌드위치를 형성한다. Fab와 IgG의 항원 결합 부위의 안정성과 다양성의 독특한 조합은 질환의 진단, 모니터링, 예방 및 치료를 위한 임상 실습에서의 성공의 기초가 된다.

[0167] 모든 항-C1q 항체 Fab 단편 서열은 미국 특허 출원 제15/360,549호에서의 참조에 의해 통합되며, 이는 본원에 개시되어 있는 항체 및 관련 조성물에 대해 참조로 포함된다.

[0168] 특정 구현예에서, 본 개시 내용은 중쇄(V_H/C_H1) 및 경쇄(V_L/C_L)를 포함하는 C1q 단백질에 결합하는 항-C1q 항체 Fab 단편을 제공하며, 여기서 항-C1q 항체 Fab 단편은 V_L 및 V_H에서 각각 세 개인, 여섯 개의 상보성 결정 영역[CDR] (HCDR1, HCDR2, HCDR3, 및 LCDR1, LCDR2, LCDR3)을 갖는다. 항체 Fab 단편의 중쇄는 IgG1의 첫 번째 중쇄 도메인(서열 번호 39) 다음에 절두되고, 다음 아미노산 서열을 포함한다.

[0169] QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSS**GYHFTSYWMH**WVKQAPGQGLEWIG**VIHPNSGSINYNEKFES**RVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAG**ERDS TEVLPMDY**WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT(서열 번호 39)

[0170] 서열 번호 39의 상보성 결정 영역[CDR]은 굵고 밑줄이 그어진 텍스트로 표시된다.

[0171] 항체 Fab 단편의 경쇄 도메인은 다음 아미노산 서열(서열 번호 40)을 포함한다.

[0172] DVQITQSPSSLSASLGERATINC**RASKSINKYLA**WYQQKPGKAPKLLIY**SGSTLQS**GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC(서열 번호 40)

[0173] 서열 번호 40의 상보성 결정 영역[CDR]은 굵고 밑줄이 그어진 텍스트로 표시된다.

[0174] FabA는 서열 번호 39를 포함하는 중쇄 도메인 및 서열 번호 40을 포함하는 경쇄 도메인을 포함하는 항-C1q 항체 Fab 단편이다.

[0175] Mab1-Fab는 Mab1(M1) 항체의 Fab이다.

[0176] Mab2-Fab는 Mab2 항체의 Fab이다.

[0177] Mab3-Fab는 Mab3 항체의 Fab이다.

[0178] 핵산, 벡터 및 숙주 세포

[0179] 본 개시 내용의 방법에 사용하기에 적합한 항체는, 예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호에 기재된 바와 같은 재조합 방법 및 조성물을 사용하여 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시 내용의 임의의 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 단리된 핵산이 제공된다. 이러한 핵산은 V_L/C_L을 함유하는 아미노산 서열 및/또는 항-C1q 항체의 V_H/C_H1을 함유하는 아미노산 서열을 암호화할 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 핵산을 함유하는

하나 이상의 벡터(예를 들어, 발현 벡터)가 제공된다. 이러한 핵산을 함유하는 숙주 세포가 또한 제공될 수 있다. 숙주 세포는 (1) 항체의 V_L/C_L을 함유하는 아미노산 서열 및 항체의 V_H/C_H1을 함유하는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 함유하는 벡터 또는 (2) 항체의 V_L/C_L을 함유하는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 함유하는 제1 벡터 및 항체의V_H/C_H1을 함유하는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 함유하는 제2 벡터를 함유할 수 있다(예를 들어, 이로 형질도입되었음). 일부 구현예에서, 숙주 세포는 진핵생물, 예를 들어, 차이니즈 햄스터 난소[Chinese Hamster Ovary, CHO] 세포 또는 림프구 세포(예를 들어, Y0, NS0, Sp20 세포)이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 대장균[*E. coli*]과 같은 박테리아이다.

[0180] 항-C1q 항체의 제조 방법이 본원에 개시되어 있다. 본 방법은 항체의 발현에 적합한 조건하에 항-C1q 항체를 암호화하는 핵산을 함유하는 본 개시 내용의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 숙주 세포(또는 숙주 세포 배양 배지)에서 나중에 회수된다.

[0181] 본 개시 내용의 인간화 항-C1q 항체의 재조합 생산을 위해, 항체를 암호화하는 핵산이 단리되고 숙주 세포에서의 추가 클로닝 및/또는 발현을 위해 하나 이상의 벡터 내로 삽입된다. 이러한 핵산은 통상적인 절차를 사용하여(예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 단리되며, 서열분석된다.

[0182] 본 개시 내용의 임의의 항체를 암호화하는 핵산 서열 또는 본원에 기재된 이의 단편 폴리펩타이드(항체 포함)를 함유하는 적합한 벡터는 클로닝 벡터 및 발현 벡터를 제한 없이 포함한다. 적합한 클로닝 벡터는 표준 기법에 따라 작제될 수 있거나, 당업계에서 이용 가능한 다수의 클로닝 벡터에서 선택될 수 있다. 선택된 클로닝 벡터는 사용하고자 하는 숙주 세포에 따라 다양할 수 있지만, 유용한 클로닝 벡터는 일반적으로 자가 복제 능력을 갖고/갖거나 특정 제한 핵산내부분해효소에 대한 단일 표적을 보유할 수 있고/있거나 벡터를 함유하는 클론을 선택하는 데 사용할 수 있는 마커에 대한 유전자를 운반할 수 있다. 적합한 예는 플라스미드 및 박테리아 바이러스, 예를 들어, pUC18, pUC19, 블루스크립트(Bluescript)(예를 들어, pBS SK+) 및 이의 유도체, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, 파지 DNA, 및 셔틀 벡터, 예컨대 pSA3 및 pAT28을 포함한다. 이들 및 기타 많은 클로닝 벡터는 BioRad, Stratagene 및 Invitrogen과 같은 상용 공급업체에서 입수할 수 있다.

[0183] 목적 핵산을 함유하는 벡터는 전기천공법, 염화칼슘, 염화루비듐, 인산칼슘, DEAE-덱스트란 또는 기타 물질을 사용하는 형질감염; 미세사출법[microprojectile bombardment]; 리포펙션; 및 감염[예를 들어, 벡터가 감염제, 예컨대 백시니아 바이러스(*vaccinia virus*)인 경우]을 포함하는 임의의 다수의 적절한 수단에 의해 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 벡터 또는 폴리뉴클레오타이드를 도입하는 선택은 종종 숙주 세포의 특징에 따를 것이다. 일부 구현예에서, 벡터는 본 개시 내용의 항-C1q 항체를 암호화하는 하나 이상의 아미노산 서열을 함유하는 핵산을 함유한다.

[0184] 항체-암호화 벡터의 클로닝 또는 발현을 위한 적합한 숙주 세포는 원핵 또는 진핵 세포를 포함한다. 예를 들어, 본 개시 내용의 항-C1q 항체는 특히 글라이코실화 및 Fc 효과기 기능이 필요하지 않은 경우 박테리아에서 생성될 수 있다. 박테리아 내 항체 단편 및 폴리펩타이드의 발현의 경우(예를 들어, 미국 특허 제5,648,237호, 제5,789,199호, 및 제5,840,523호; 및 문헌[Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254], 대장균에서 항체 단편의 발현을 설명함)]). 다른 구현예에서, 본 개시 내용의 항체는 진핵 세포(예를 들어, 차이니스 햄스터 난소[CHO] 세포 또는 림프구 세포(예를 들어, Y0, NS0, Sp20 세포)에서 생성될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 출원 제14/269,950호, 미국 특허 제8,981,071호, 문헌[Eur J Biochem. 1991 Jan 1;195(1):235-42]). 발현 후에, 항체는 가용성 분획 내 박테리아 세포 페이스트에서 단리될 수 있고, 추가로 정제될 수 있다.

[0185] 약학적 조성물 및 투여

[0186] 본 개시 내용의 항-C1q 항체(예를 들어, FabA)는 약학적 조성물의 형태로 투여될 수 있다.

[0187] 본 개시 내용의 항체, 항체 단편 및/또는 항체 유도체의 치료 제형은 원하는 정도의 순도를 갖는 항체를 임의의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합함으로써(문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. [1980]]) 동결건조 제형 또는 수용액 형태로 저장용으로 제조될 수 있다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 용량 및 농도에서 수용자에게 무독성이며, 완충제, 예컨대 포스페이트, 사이트레이트 및 기타 유기산; 아스코브산 및 메싸이오닌을 포함하는 산화방지제; 보존제(예컨대 옥타데실다이메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메쏘늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에쏘늄 클로라이드; 페놀, 뷰틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레졸시놀; 사이클

로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩타이드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리바이닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글라이신, 글루타민, 아스파라진, 히스티딘, 아르지닌 또는 라이신; 단당류, 이당류, 및 다른 탄수화물, 예컨대 글루코스, 만노스 또는 덱스트린; 킬레이트제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨; 염 형성 반대 이온, 예컨대 소듐; 금속 복합체(예를 들어, Zn-단백질 복합체); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌 글라이콜[PEG]을 포함한다.

[0188] 리포펙션 또는 리포솜은 또한 항체 또는 항체 단편, 또는 항체 유도체를 세포 내로 전달하는 데 사용될 수 있으며, 여기서 표적 단백질의 결합 도메인에 특이적으로 결합하는 에피토프 또는 가장 작은 단편이 바람직하다.

[0189] 항체는 또한 콜로이드성 약물 전달 시스템(예를 들어, 리포솜, 알부민 미소구, 마이크로에멀젼, 나노-입자 및 나노캡슐) 또는 매크로에멀젼 내, 예를 들어, 코아세르베이션 기법 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어, 각각 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에 포획될 수 있다. 이러한 기법은 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0190] 투여에 사용되는 제형은 무균일 수 있다. 이는 멸균된 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다.

[0191] 지속 방출 제제가 제조될 수 있다. 지속 방출 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 이러한 매트릭스는 성형품, 예를 들어, 필름 또는 마이크로캡슐 형태이다. 지속 방출 매트릭스의 예는 폴리에스터, 하이드로젤[예를 들어, 폴리(2-하이드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리(바이닐알코올)], 폴리락타이드(미국 특허 제3,773,919호), L-글루탐산 및 γ 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비분해성 에틸렌-바이닐 아세테이트, 분해성 락트산-글라이콜산 공중합체, 예컨대 LUPRON DEPOT™(락트산-글라이콜산 공중합체 및 류프롤라이드 아세테이트로 이루어진 주사 가능한 미소구), 및 폴리-D-(-)-3-하이드록시뷰티르산을 포함한다. 에틸렌-바이닐 아세테이트 및 락트산-글라이콜산과 같은 중합체가 100일 이상 동안 분자를 방출할 수 있지만, 특정 하이드로젤은 보다 짧은 기간 동안 단백질을 방출한다.

[0192] 본 개시 내용의 항체, 항체 단편 및/또는 항체 유도체 및 조성물은 전형적으로 유리체강 내 투여에 의해 투여된다.

[0193] 약학적 조성물은 또한 원하는 제형에 따라 희석제의 약학적으로 허용되는 무독성 담체를 포함할 수 있고, 이들은 인간 또는 동물 또는 인간 투여를 위한 약학적 조성물을 제형화하는 데 통상적으로 사용되는 비히클로서 정의된다. 조합물의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않도록 희석제가 선택된다. 이러한 희석제의 예로는 증류수, 완충수, 생리 식염수, PBS, 링거 용액, 덱스트로스 용액 및 행크 용액이 있다. 또한, 약학적 조성물 또는 제형은 다른 담체, 보조제, 또는 무독성, 비치료적, 비면역원성 안정화제, 부형제 등을 포함할 수 있다. 조성물은 또한 pH 조절제 및 완충제, 독성 조절제, 습윤제 및 세제와 같은 생리학적 조건을 근사화하기 위한 추가 물질을 포함할 수 있다.

[0194] 조성물은 또한 예컨대 산화방지제와 같은 다양한 안정화제 중 임의의 것을 포함할 수 있다. 약학적 조성물이 폴리펩타이드를 포함하는 경우, 폴리펩타이드는 폴리펩타이드의 생체내 안정성을 향상시키거나, 그렇지 않으면 이의 약리학적 특성을 향상시키는(예를 들어, 폴리펩타이드의 반감기를 증가시키고, 이의 독성을 감소시키고, 기타 약동학적 및/또는 약력학적 특성을 향상시키거나, 용해도 또는 흡수를 향상시키는) 다양한 널리 공지된 화합물과 복합체화될 수 있다. 이러한 변형 또는 착화제의 예는 설페이트, 글루코네이트, 사이트레이트 및 포스페이트를 포함한다. 조성물의 폴리펩타이드는 또한 이들의 생체내 속성을 향상시키는 분자와 복합체화될 수 있다. 이러한 분자에는 예를 들어, 탄수화물, 폴리아민, 아미노산, 다른 펩타이드, 이온(예를 들어, 소듐, 포타슘, 칼슘, 마그네슘, 망가니즈) 및 지질이 포함된다. 다양한 유형의 투여에 적합한 제형에 관한 추가 지침은 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed. (1985)]에서 찾을 수 있다. 약물 전달 방법에 대한 간략한 검토는 문헌[Langer, Science 249:1527-1533(1990)]을 참조한다.

[0195] 유효 성분의 독성 및 치료 효능은, 예를 들어, LD50(집단의 50%에 치명적인 투여량) 및 ED50(집단의 50%에 치료적으로 효과적인 투여량)을 결정하는 것을 포함하는, 세포 배양물 및/또는 실험 동물에서 표준 약학적 절차들에 따라 결정될 수 있다. 독성 효과와 치료 효과 사이의 용량 비율은 치료 지수이며, LD50/ED50의 비율로 나타낼 수 있다. 큰 치료 지수를 나타내는 화합물이 바람직하다.

[0196] 세포 배양 및/또는 동물 시험 및/또는 인간 임상 시험에서 얻은 데이터는 인간에 대한 용량 범위를 공식화하는 데 사용될 수 있다. 유효 성분의 용량은 전형적으로 독성이 낮은 ED50을 포함하는 순환 농도 범위 내에 있다.

용량은 사용되는 제형 및 사용되는 투여 경로에 따라 이의 범위 내에서 변화될 수 있다.

[0197] 약학적 조성물을 제형화하기 위해 사용되는 성분은 바람직하게는 고순도이며, 잠재적으로 유해한 오염물질(예를 들어, 최소 국가 식품[National Food, NF] 등급, 일반적으로 최소 분석 등급, 및 보다 전형적으로는 최소 약학적 등급의 것)이 실질적으로 없다. 더욱이, 비경구 사용을 위한 조성물은 일반적으로 무균 상태이다. 주어진 화합물이 사용 전에 합성되어야 하는 정도까지는, 수득한 생성물은 합성 또는 정제 과정 동안 존재할 수 있는 임의의 잠재적으로 독성인 제제, 특히 임의의 내독소가 실질적으로 없다는 점이 일반적이다. 또한, 비경구 투여용 조성물은 실질적으로 등장성이고, GMP 조건하에 제조되는 점이 일반적이다.

[0198] 본 개시 내용의 조성물은 임의의 의학적으로 적절한 절차, 예를 들어, 유리체강 내 주사를 사용하여 투여될 수 있다.

[0199] 치료 방법

[0200] 광수용체 망막 질환에서 보체의 역할은 광수용체 변성의 다수의 전임상 모델에서 보고되었으며, 여기서 고전적 보체 경로의 유전적 또는 약리학적 억제는 광수용체 생존을 증가시키고 망막 기능을 개선시켰다. 그러나 C1q 및 고전적 보체 경로가 광수용체 변성을 유도하는 기전은 잘 알려져 있지 않다. CNS 발달 및 질환의 미세아교세포 매개된 시냅스 가지치기에서 C1q의 기술된 역할에 기초하여, C1q는 망막 퇴행성 장애에서 광수용체 시냅스를 태그할 수 있고, 이는 이상 미세아교세포 매개된 시냅스 제거를 통한 뉴런 손실에 기여할 수 있다.

[0201] 광수용체 변성의 광산화 광 손상 모델을 사용하는 것은, 광수용체 시냅스상의 C1q 침착 및 C1q 태그 시냅스의 미세아교세포 포집의 증거이다. 망막 및 광수용체 시냅스의 C1q 수준과 세포체 손실 사이에 유의한 상관 관계가 나타났다. 또한, C1q 기질인 포스파티딜세린(Phosphatidylserine, PS)의 외재화는 광수용체 시냅스에서 나타나며, 이는 시냅스로의 C1q 유인에 PS의 잠재적인 관여를 시사한다. 그리고 마지막으로, 항-C1q 항체를 사용한 유리체강 내 치료는 광 손상된 망막에서 보체 성분의 수준을 감소시켰다(치료 후 표적 결속 및 신경보호 확인).

[0202] WT와 비교하여, 치료되지 않은 동물 및 IgG Rd10 동물의 망막 용해물에서 고전적인 보체 성분 C1q의 증가된 수준이 확인되었다(도 14b). 항-C1q 처리는 IgG1 처리 및 비처리 rd10 군과 비교하여 망막 용해물에서 감소된 C1q 수준을 초래하여(도 14b), 망막에서 양호한 측정 가능한 PK 및 C1q 결속을 확인하였다. 광수용체 시냅스(BNS 마커)는 C1q 억제제로 처리 시 보존되었다(도 15b).

[0203] 본 개시 내용은 일반적으로 인간 환자에서 유전성 망막 질환[inherited retinal disease, IRD](예를 들어, 망막색소변성증, 맥락막결손, 스타르가르트병, 원뿔막대세포 이상증, 및 레버 선천성 흑암시) 또는 망막 박리를 예방하거나, 이의 발병 위험을 감소시키거나, 치료하는 조성물 및 방법에 관한 것이다.

[0204] 유전성 망막 질환[IRD]은 중증 시력 상실 또는 심지어 실명을 일으킬 수 있는 질환군이다. 각 IRD는 정상적으로 작동하지 않는 적어도 하나의 유전자에 의해 발생한다. IRD는 모든 연령의 개인에게 영향을 미칠 수 있으며 상이한 속도로 진행될 수 있고 드물게 발생한다. 하지만 많은 경우 진행성인데, 이는 시간이 지날수록 질환 증상이 심해질 것이라는 의미이다.

[0205] 확인된 많은 유형의 IRD와 아직 발견되지 않은 다른 IRD가 있다. IRD의 가장 일반적인 유형은 망막색소변성증/원뿔막대세포 이상증, 맥락막결손, 스타르가르트병, 원뿔막대 이상증, 레버 선천성 흑암시, X-염색체 연관 RP 및 어셔 증후군을 포함한다. 일반적인 경로는 광수용체 변성이다.

[0206] 망막색소변성증[RP]/원뿔막대세포 이상증은 망막에 영향을 미치는 60개 유전자의 변이로 인한 관련 안구 장애군이다. RP를 앓는 사람의 경우, 망막의 빛 감지 세포가 점차 사라지면서 시력 상실이 발생한다. 중증도와 질환 진행 속도는 영향을 받는 유전자에 따라 RP를 앓는 사람마다 다를 수 있다. RP는 아동기 동안(조기 발병 RP) 또는 성인기 동안 처음 나타날 수 있다. RP의 첫 번째 징후는 일반적으로 야간 실명이라고 하는 야간 시력 상실이다. 나중에, RP로 인하여 주변(측면) 시야에 맹점이 생기게 된다. 시간이 지남에 따라 이들 맹점은 주변 시력의 감소로 진행된다. 이 질환은 시간이 지남에 따라 진행되어 결국 독서, 운전, 얼굴 인식과 같은 작업에 필요한 중심 시력에 영향을 미치며, 이는 터널 시야라고도 한다. 맥락막결손은 진행성 시력 상실이 있는 병태로 대부분 남성에게 발병한다. 이 병태의 첫 번째 증상은 일반적으로 야맹증으로, 이는 아동기 초기에 발생할 수 있다. 시간이 지남에 따라 터널 시야가 생기고 세부 사항을 볼 수 있는 기능이 상실될 것이다. 이들 시력 문제는 망막 및 인근 혈관 네트워크(맥락막이라고 함) 내 진행 중인 세포 손실로 인한 것이다. 맥락막결손의 시력 손상은 시간이 지남에 따라 악화되지만, 악화 속도는 병에 걸린 개인마다 다르다. 이 병태는 성인기 후반에 완전한 시력 상실을 야기할 수 있다.

[0207] 스타르가르트병은 스타르가르트 황반 이상증이라고도 한다. 이 질환은 예리한 정면 시력을 담당하는, 망막 중앙에 있는 작은 영역인 황반에 손상을 일으킨다. 해당 질환은 전형적으로 아동기 또는 청소년기 동안 중심 시력의 상실을 야기한다. 때로는 성인기 후반에야 시력 상실을 인지할 수 있다. 해당 질환이 있는 사람이 시력을 모두 상실하는 경우는 거의 없다.

[0208] 원뿔막대세포 이상증[CRD]은 원뿔 세포 및 막대 세포에 영향을 미치는 30가지가 넘는 IRD로 이루어진 군이다. 원뿔 세포 및 막대 세포는 망막에서 발견되는 빛에 민감한 세포이다. 원뿔 세포 및 막대 세포가 점진적으로 악화되면서, 이 병태를 앓는 사람들은 시간이 지남에 따라 시력 상실을 겪는다. 첫 번째 증상은 보통 아동기에 나타나며, 시야 흐림, 빛에 대한 강렬한 과민성(광선공포증이라고 함)을 포함할 수 있다. 이들 증상은 시야 중심 내 맹점, 색깔 보기 능력 상실, 및 측면 또는 주변 시력 상실 등이 뒤따른다. 이 병태를 앓는 대부분의 개인은 성인기 중반까지 상당히 많은 시력을 잃는다.

[0209] 레버 선천성 흑암시[LCA]는 주로 망막에 발병하는 안구 장애이다. 망막은 카메라의 필름처럼 작용하는 눈의 층으로, 시각 이미지를 포착하고 뇌에 전기 신호를 보낸다. LCA는 IRD의 가장 초기 발병 형태 중 하나이다. 이 장애를 앓는 사람은 전형적으로 영아기 때부터 심각한 시력 손실을 겪는다. LCA는 또한 다른 시력 문제, 예컨대 광선공포증: 빛에 대한 민감도 증가; 안진: 안구의 통제 불가능한 움직임; 극심한 원시: 책과 같은 근접한 물체를 명확하게 볼 수 없거나 가까운 얼굴을 명확하게 볼 수 없음; 느리게 반응하는 동공: LCA를 앓는 개인의 경우, 동공이 빛에 정상적으로 반응하지 않고, 대신에 동공이 정상보다 느리게 열리고 닫히거나, 또는 전혀 빛에 반응하지 않을 수 있음; 기형 각막: 각막은 LCA를 앓는 경우 원뿔 형태이고 비정상적으로 얇을 수 있음; 및 교차된 눈(사시): 눈의 근육이 적절하게 형성되거나 작동하지 않아서, 눈이 동시에 두 곳의 상이한 위치를 바라보게됨과 관련된다.

[0210] X-염색체 연관 RP[X-linked RP, XLRP]는 중증 형태의 망막색소변성증[RP]이다. XLRP는 X 염색체상에 위치한 유전자의 돌연변이와 관련이 있으며, 이는 해당 병태가 주로 남성에게 발병한다는 것을 의미한다. 그러나 일부 여성 보인자에게도 임상적으로 발병할 수 있지만, 보통의 경우 남성보다 훨씬 덜 심각한 표현형을 보유한다. 여성 보인자 사이의 표현형의 변이성은 망막 조직의 발달 동안 다른 유전적 및 환경적 요인에 의해 조절되는 야생형 유전자를 보유하는 X 염색체의 무작위 비활성화 패턴에 기인한다. XLRP는 X 염색체상의 망막색소변성 GTP가수분해효소 조절제[Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator, RPGR] 유전자의 돌연변이에 의해 야기되는 것이 가장 일반적이다. 조기 발병과 시력 상실의 빠른 진행으로 30년 말까지 법적 실명을 초래하는 것이 특징이다. 덜 빈번한 형태의 XLRP는 RP2 유전자 및 OFD1 유전자의 돌연변이에 의해 유발된다. RPGR 유전자의 돌연변이는 막대원뿔세포 또는 원뿔막대세포 이상증 표현형과 연관될 수 있다. 대다수의 증례는 막대원뿔세포 이상증-유형 질환 진행을 나타내는데, 여기서 중심 시력은 초기에 주변 시야의 손실보다 덜 손상된다. 그러나, 일부는 또한 질환의 초기 단계 동안 조기 원뿔세포 침범과 이에 따라 손상된 중심 시력을 나타낸다. 중심와는 궁극적으로 질환의 후기 단계 동안 모든 경우에 후속 원뿔형 광수용체 변성에 의해 영향을 받는다.

[0211] 홀그렌 증후군(Hallgren syndrome), 어셔-홀그렌 증후군(Usher-Hallgren syndrome), 망막색소변성증-청각부전 증후군 또는 망막 청각 이상증후군으로도 알려진 어셔 증후군(Usher syndrome)은 희귀 유전 장애로서 청력 상실 및 시각 장애의 조합을 초래하는 적어도 11개의 유전자 중 어느 하나의 돌연변이에 의해 유발된다. 이는 농맹의 주요 원인이며 현재 불치병이다. 이는 난청 또는 청력 상실 및 망막색소변성증[RP]이라는 안구 질환을 야기한다. 때로는, 균형과 관련된 문제 또한 야기한다. 어셔 증후군은 원인이 되는 유전자와 난청 발병에 따라 세 가지 아형(I, II 및 III)으로 분류된다. 세 가지 아형 모두 내이와 망막의 기능에 관여하는 유전자의 돌연변이에 의해 발생한다. 이들 돌연변이는 상염색체 열성 패턴으로 유전된다.

[0212] 망막 박리는 눈 뒤쪽의 신경 조직(망막)의 얇은 층이 정상 위치에서 떨어지는 상황을 나타낸다. 망막 박리는 산소와 영양을 제공하고 및 노폐물을 제거하는 망막 색소 상피[retinal pigment epithelium, RPE]에서 망막 광수용체 세포를 분리한다. 현재 망막이 RPE에서 분리되면 광수용체 변성과 이로 인한 시력 상실이 존재한다. 중심 망막이 박리되고 망막 박리가 치료되지 않는 기간이 길수록, 발병한 눈의 영구적인 시력 상실 위험이 더욱 커진다. 망막 박리의 경고 징후는 다음 중 하나 또는 모두를 포함할 수 있다. 부유물 및 섬광의 갑작스러운 출현 및 시력 저하. 망막 박리는 연간 10만 명당 약 10~12 증례가 발생한다. 증례 중 약 50%의 경우, 중심 망막이 박리된다. 중심 망막이 박리되면 망막 재부착에 성공하여도 시력 회복은 박리 전 시력의 약 50%에 겨우 그친다. 이러한 제한된 시력 회복의 원인은 광수용체 변성이다.

[0213] 고전적 보체 경로의 유전적 또는 약리학적 억제가 광수용체 생존을 증가시키고 망막 기능을 개선시켰다. 그러나 C1q 및 고전적 보체 경로가 광수용체 변성을 유도하는 기전은 잘 알려져 있지 않다. CNS 발달 및 질환의 미세아

교세포 매개된 시냅스 가지치기에서 기술된 C1q의 역할에 기초하여, 본 발명자들은 C1q에 의해 매개된 광수용체에 대한 손상의 세 가지 기전을 가정하였다. (1) C1q는 망막 변성 장애의 광수용체 시냅스를 태깅하여, 이상 미세아교세포 매개된 시냅스 제거를 통한 뉴런 손실에 기여함, (2) C1q는 추가적인 C1q를 또한 도입하는 포식 세포의 유인으로 인한 손상에 이르는 손상 광수용체(포스파티딜 세린, c-반응성 단백질, 및 변경된 광수용체 세포막)의 노폐물에 의해 활성화됨, 및 (3) 세포 용해를 야기하는 전체 고전적 보체 경로의 활성화 및 막-공격-복합체[membrane-attack-complex, MAC]의 형성.

[0214] C1q는 특정 병원체, 자기 항원의 변형, 항원 결합 항체 또는 세포 표면의 특정 분자를 인식한다. 정상적인 노화에서 C1q는 아마도 노화나 신경 스트레스로 약해진 시냅스에 축적되며 다양한 병태생리적 자극에 따라 고전 보체 캐스케이드의 활성화를 유발하여 시냅스의 부적절한 제거를 초래할 수 있다. 시냅스 제거와 관련된 이러한 비정상 염증성 반응을 보체 매개 신경변성[complement-mediated neurodegeneration, CMND]이라고 한다. CMND는 알츠하이머병, 조현병, 헌팅턴병, 전측두엽 치매, 척수성 근위축증 및 녹내장과 관련이 있다. 망막의 변성 스트레스로 인해 C1q 활성화는 시냅스 제거를 초래하고 RGC 및 시신경의 손실에 기여한다.

[0215] 광수용체 변성의 광산화 광 손상 모델을 사용하여 본 발명자들은 광수용체 시냅스상의 C1q 침착에 대한 증거를 제공하고 C1q 태그 시냅스의 미세아교세포 포집을 입증하였다. 본 발명자들은 망막 및 광수용체 시냅스의 C1q 수준과 세포체 손실 사이에 유의한 상관 관계를 보여주고 있다. 또한, 본 발명자들은 광수용체 시냅스상에서 C1q 기질인 포스파티딜세린(PS)의 외재화를 보여주어 시냅스로의 C1q 유인에 PS의 잠재적인 관여를 시사하고 있다. 그리고 마지막으로, 항-C1q 항체를 사용한 유리체강 내 치료가 광 손상된 망막에서 보체 성분의 수준을 감소시켰음을 보여주고 있다. 또한, 인간의 지도모양위축 망막 조직 내 광수용체 시냅스상에서의 C1q 침착을 확인하여 이러한 기전이 인간과 관련이 있음을 시사하였다.

[0216] 본 개시 내용은 일반적으로 인간 환자에서 유전성 망막 질환[IRD](예를 들어, 망막색소변성증, 맥락막결손, 스타르가르트병, 원뿔막대세포 이상증, 및 레버 선천성 흑암시) 또는 망막 박리를 예방하거나, 이의 발병 위험을 줄이거나, 치료하는 조성물 및 방법에 관한 것이다.

[0217] 이러한 방법은 환자에게 유리체강 내 주사를 통해 항-C1q 항체 약 1 mg 내지 약 10 mg(예를 들어, 항-C1q 항체 약 1 mg, 약 1.5 mg, 약 2 mg, 약 2.5 mg, 약 3 mg, 약 3.5 mg, 약 4 mg, 약 4.5 mg, 약 5 mg, 약 5.5 mg, 약 6 mg, 약 6.5 mg, 약 7 mg, 약 7.5 mg, 약 8 mg, 약 8.5 mg, 약 9 mg, 약 9.5 mg, 또는 약 10 mg)을 투여하는 단계를 포함한다. 이러한 방법은 또한 환자에게 유리체강 내 주사를 통해 항-C1q 항체 약 1 mg 내지 약 10 mg(예를 들어, 항-C1q 항체 약 1 mg, 약 1.5 mg, 약 2 mg, 약 2.5 mg, 약 3 mg, 약 3.5 mg, 약 4 mg, 약 4.5 mg, 약 5 mg, 약 5.5 mg, 약 6 mg, 약 6.5 mg, 약 7 mg, 약 7.5 mg, 약 8 mg, 약 8.5 mg, 약 9 mg, 약 9.5 mg, 또는 약 10 mg)을 투여하는 단계를 포함하되, 이러한 항체는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 HVR-L1, 서열 번호 6의 아미노산을 갖는 HVR-L2, 및 서열 번호 7의 아미노산을 갖는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 및, 서열 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 HVR-H1, 서열 번호 10의 아미노산을 갖는 HVR-H2, 및 서열 번호 11의 아미노산을 갖는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 투여된 조성물은 항-C1q 항체 약 1 mg 내지 약 5 mg을 포함할 수 있다. 투여된 조성물은 항-C1q 항체 약 1 mg 내지 약 2.5 mg, 약 2.5 mg 내지 약 5 mg, 약 5 mg 내지 약 7.5 mg, 또는 약 7.5 mg 내지 약 10 mg을 포함할 수 있다. 투여된 조성물은 항-C1q 항체 약 5 mg을 포함할 수 있다. 투여된 조성물은 항-C1q 항체를 약 10 mg을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 항체는 서열 번호 4 및 35~38에서 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 이러한 경쇄 가변 도메인은 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 HVR-L1, 서열 번호 6의 아미노산을 갖는 HVR-L2, 및 서열 번호 7의 아미노산을 갖는 HVR-L3을 포함한다. 일부 구현예에서, 경쇄 가변 도메인은 서열 번호 4 및 35~38에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 서열 번호 8 및 31~34에서 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하고, 이러한 중쇄 가변 도메인은 서열 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 HVR-H1, 서열 번호 10의 아미노산을 갖는 HVR-H2, 및 서열 번호 11의 아미노산을 갖는 HVR-H3을 포함한다. 일부 구현예에서, 중쇄 가변 도메인은 서열 번호 8 및 31~34로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 서열 번호 4 및 35~38에서 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 이러한 경쇄 가변 도메인은 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 HVR-L1, 서열 번호 6의 아미노산을 갖는 HVR-L2, 및 서열 번호 7의 아미노산을 갖는 HVR-L3을 포함하고, 서열 번호 8 및 31~34에서 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하고, 이러한 중쇄 가변 도메인은 서열 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 HVR-H1, 서열 번호 10의 아미노산을 갖는 HVR-H2, 및 서열 번호 11의 아미노산을 갖는 HVR-H3을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 서열 번호 4 및

35~38에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인 및, 서열 번호 8 및 31~34에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 단일 클론 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 키메라 항체, 항체 단편, 또는 이의 항체 유도체일 수 있다. 항체 단편은 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')2 단편, Fv 단편, 디아바디 또는 단일 쇄 항체 분자일 수 있다. 일부 구현예에서, Fab 단편은 서열 번호 39의 중쇄 Fab 단편 및 서열 번호 40의 경쇄 Fab 단편을 포함한다.

[0218] 일부 구현예에서, 항체는 주 1회, 격주로 1회, 3주마다 1회, 월 1회, 4주마다 1회, 6주마다 1회, 8주마다 1회, 격월로 1회, 10주마다 1회, 12주마다 1회, 3개월마다 1회, 또는 4개월마다 1회 투여된다. 일부 구현예에서, 항체는 적어도 6개월, 적어도 7개월, 적어도 8개월, 적어도 9개월, 적어도 10개월, 적어도 11개월 또는 적어도 12개월 동안 투여된다.

[0219] 특정 바람직한 구현예에서, FabA는 IVT 주사로서 매월 1회, 4주마다 1회, 6주마다 1회 또는 격월로 1회 2.5 mg/눈 용량으로 투여된다.

[0220] 특정 바람직한 구현예에서, FabA는 IVT 주사로서 매월 1회, 4주마다 1회, 6주마다 1회 또는 격월로 5 mg/눈 용량으로 투여된다. 특정 바람직한 구현예에서, FabA는 IVT 주사로서 매월 1회, 또는 4주마다 1회 5 mg/눈 용량으로 투여된다. 특정 바람직한 구현예에서, FabA는 IVT 주사로서 6주마다 1회 5 mg/눈 용량으로 투여된다. 특정 바람직한 구현예에서, FabA는 IVT 주사로서 격월로 1회 또는 8주마다 1회 5 mg/눈 용량으로 투여된다.

[0221] 특정 바람직한 구현예에서, FabA는 IVT 주사로서 매월 1회, 4주마다 1회, 6주마다 1회 또는 격월로 10 mg/눈 용량으로 투여된다. 특정 바람직한 구현예에서, FabA는 IVT 주사로서 매월 1회 또는 4주마다 1회 10 mg/눈 용량으로 투여된다. 특정 바람직한 구현예에서, FabA는 IVT 주사로서 6주마다 1회 10 mg/눈 용량으로 투여된다. 특정 바람직한 구현예에서, FabA는 IVT 주사로서 격월로 1회 또는 8주마다 1회 10 mg/눈 용량으로 투여된다.

[0222] FabA의 주사는 무균 기법을 사용하여 IVT 주사를 수행할 수 있는 교육 및 경험으로 자격을 갖춘 의사에 의해 완료된다.

[0223] 항-C1q 항체는 C1q와 자가항체 사이 또는 C1q와 C1r 사이, 또는 C1q와 C1s 사이의 상호 작용을 억제하거나, 순환 또는 조직에서 C1q의 제거를 촉진할 수 있다. 일부 구현예에서, 항-C1q 항체는 100 nM 내지 0.005 nM 또는 0.005 nM 미만 범위의 해리 상수(K_D)를 갖는다. 일부 구현예에서, 항-C1q 항체는 20:1 내지 1.0:1 또는 1.0:1 미만 범위의 결합 화학량론, 6:1 내지 1.0:1 또는 1.0:1 미만 범위의 결합 화학량론, 또는 2.5:1 내지 1.0:1 또는 1.0:1 미만 범위의 결합 화학량론으로 C1q에 결합한다.

[0224] 이 방법은 C1q의 생물학적 활성을 억제한다. 예를 들어, (1) 자가항체에 대한 C1q 결합, (2) C1r에 대한 C1q 결합, (3) C1s에 대한 C1q 결합, (4) 포스파티딜세린에 대한 C1q 결합, (5) 펜트락신-3에 대한 C1q 결합, (6) C-반응성 단백질[CRP]에 대한 C1q 결합, (7) 구형 C1q 수용체[gC1qR]에 대한 C1q 결합, (8) 보체 수용체 1[CR1]에 대한 C1q 결합, (9) 베타-아밀로이드에 대한 C1q 결합, 또는 (10) 칼레티쿨린에 대한 C1q 결합. 다른 구현예에서, C1q의 생물학적 활성은 (1) 고전 보체 활성화 경로의 활성화, (2) 용해 감소 및/또는 C3 침착 감소, (3) 항체 및 보체 의존성 세포독성의 활성화, (4) CH50 용혈, (5) 적혈구 용해 감소, (6) 적혈구 식세포작용 감소, (7) 수지상 세포 침윤 감소, (8) 보체-매개 적혈구 용해 억제, (9) 림프구 침윤 감소 (10) 대식세포 침윤 감소, (11) 항체 침착 감소, (12) 호중구 침윤 감소, (13) 혈소판 식세포작용 감소, (14) 혈소판 용해 감소, (15) 이식편 생존율 향상, (16) 대식세포 매개 식세포작용 감소, (17) 자가항체 매개 보체 활성화 감소, (18) 수혈 반응으로 인한 적혈구 파괴 감소, (19) 동종항체로 인한 적혈구 용해 감소, (20) 수혈 반응으로 인한 용혈 감소, (21) 동종항체 매개 혈소판 용해 감소, (22) 빈혈 개선, (23) 호산구 감소, (24) 적혈구상에서의 C3 침착 감소(예를 들어, RBC상에서의 C3b, iC3b 등의 침착 감소), (25) 혈소판상에서의 C3 침착 감소(예를 들어, 혈소판상에서의 C3b, iC3b 등의 침착 감소), (26) 아나필라톡신 생성 감소, (27) 자가항체 매개 수포 형성 감소, (28) 자가항체 유도 홍반 감소, (29) 수혈 반응으로 인한 적혈구 파괴 감소, (30) 수혈 반응으로 인한 혈소판 용해 감소, (31) 비만 세포 활성화의 감소, (32) 비만 세포 히스타민 방출 감소, (33) 혈관 투과성 감소, (34) 이식편 내피상에서의 보체 침착 감소, (35) B-세포 항체 생성, (36) 수지상 세포 성숙, (37) T-세포 증식, (38) 사이토카인 생성, (39) 미세아교세포 활성화, (40) 아더스 반응, (41) 이식편 내피에서 아나필라톡신 생성 감소, 또는 (42) 보체 수용체 3[CR3/C3] 발현 세포의 활성화이다.

[0225] 일부 구현예에서, CH50 용혈은 인간 CH50 용혈을 포함한다. 항체는 인간 CH50 용혈 적어도 약 50% 내지 약 100%를 중화할 수 있다. 항체는 인간 CH50 용혈 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 100%를 중화할 수 있다. 항체는 150 ng/ml 미만, 100 ng/ml 미만, 50 ng/ml 미만 또는 20 ng/ml 미만 용량에서 CH50 용혈 적어도

50%를 중화할 수 있다.

[0226] 일부 구현예에서, 항체는 단일 클론 항체, 다클론 항체, 재조합 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 키메라 항체, 1가 항체, 다중특이적 항체, 또는 항체 단편, 또는 이의 항체 유도체이다. 일부 구현예에서, 항체는 인간화 항체이다. 일부 구현예에서, 항체는 Fab 단편과 같은 항체 단편이다. 항체 단편의 예는 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')2 단편, Fv 단편, 디아바디 및 단일 쇄 항체 분자이다.

[0227] 조성물은 생체내 사용을 위해 의사의 지도하에 수득되고 사용될 수 있는 것으로 판단된다. 치료 제형 용량은 질환의 성질, 투여 빈도, 투여 방식, 숙주에서 작용제의 제거 등에 따라 광범위하게 달라질 수 있다.

[0228] 본원에 사용되는, '만성적으로 투여된', '만성 치료', '만성적으로 치료하는' 또는 이들의 유사한 문법적 변형은 장기간에 걸쳐 환자의 전신 보체 활성을 완전히 또는 실질적으로 억제하기 위해 환자의 눈 내 치료제의 특정 역치 농도를 유지하기 위해 사용되는 치료 요법을 지칭한다. 따라서, 항-C1q 항체로 만성적으로 치료받은 환자는 2주 이상의 기간 동안(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 또는 52주; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개월; 또는 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 또는 12년, 또는 환자의 남은 생애 동안) 환자의 전신 보체 활성을 억제하거나 실질적으로 억제하는 환자의 눈 내 항체의 농도를 유지하기에 충분한 양 및 투여 빈도로 항체를 이용하여 치료될 수 있다. 일부 구현예에서, 항체는 혈청 용혈 활성을 20% 이하(예를 들어, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 또는 심지어 5% 미만)로 유지하기에 효과적인 양 및 빈도로 이를 필요로 하는 환자에게 만성적으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항체는 혈청 젖산 탈수소효소[serum lactate dehydrogenase, LDH]에 대한 정상 범위의 적어도 20%(예를 들어, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 또는 심지어 5% 미만) 내에서 LDH 수준을 유지하는 데 효과적인 양 및 빈도로 환자에게 투여될 수 있다.

[0229] 치료제, 예를 들어, 항-C1q 항체는 적절한 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 조합하여 치료 투여를 위한 다양한 제형 내로 혼입될 수 있다.

[0230] **실시예**

[0231] 실시예 1: 방법

[0232] **광산화 백색광 손상 모델**

[0233] 수컷 Balb/C 마우스(12주령; Charles River Laboratories)를 실시예 2~7에 기재된 시험에 사용하였다. 동물을 광 유도의 시작까지 3~4시간 어두운 기간의 단일 연장으로 실험을 위해 밤새 암순응시켰다(급성: 4시간 동안 25 k 럭스; 약함: 30분 동안 5 k 럭스). 모델 특성화를 위해 급성 빛 설정을 사용했다(결과 도 1). 다른 모든 실험을 위해 약한 빛 설정을 사용하였다(결과 도 2~5). 동물을 희생시키고, 기준선, 1일 차, 3일 차 및 7일 차에 조직을 수집하였다.

[0234] **Rd10 마우스 모델**

[0235] Rd10 마우스는 태어날 때부터 암실 사육하였고 P30~P31에서 빛이 통제된 환경(낮 시간 동안 정상 순환 빛 약 200 럭스)의 주거지로 옮겼다.

[0236] 항-C1q 항체 치료(또는 IgG 대조군 항체)는 P12에서 시작하여 100 mg/kg 용량으로 주 2회 복강 내[intraperitoneally, i.p] 투여하였다. i.p 주사를 위해, 마우스를 손으로 부드럽게 제지하고, 8 mm, 31 게이지 바늘을 사용하여 복부를 천공하여 항체를 전달하였다. 동물을 희생시키고, 조직을 P30, P33, P38에서 수집하였다.

[0237] **말기 혈장 및 안구 조직 수집**

[0238] 동물을 마취시키고 심장 천자를 통해 말기 전혈 약 300~500 μl를 수집하였다. 혈액을 즉시 K_2EDTA 튜브에 넣고 5,000 x g에서 10분 동안 원심분리하여 혈장을 수득하였다. 혈장을 1.7 mL 스냅 캡 튜브로 옮기고 드라이아이스로 고객에게 배송될 때까지 -80 ℃에서 보관하였다. 생화학적 평가를 위해 동물을 식염수로 경심 관류시키고(transcardially perfuse) 눈을 적출하였다. 망막/RPE를 단리하고 무게를 재고 즉시 동결하고 -80 ℃에서 보관하였다. 조직병리학적 평가를 위해, 동물을 식염수로 경심 관류시킨 후, 4% PFA(최소 10분/최소 50 ml)로 경심 관류시켰다. 식염수/PFA 관류 후, 눈을 수집하였다. 후방 안구 컵을 2시간 동안 4% PFA에서 점적 고정시키고,

연속 수크로스 구배(10%, 20% 30%)를 통해 옮기고, 최적 절단 온도 화합물[optimal cutting temperature compound, OCT]에 매립하고 동결시켰다.

[0239] **유리체강 내 주사**

[0240] 동물을 아이소플루레인으로 진정시켰다. 수술용 현미경하에, 중간 유리체 내로 삽입된 32G 바늘로 눈에 주사하였다. PSVue 표지를 위해, 조직 수집 6시간 전에 눈에 1 mM PSVue 2 μl를 주사하였다. 반대편 눈을 주사하지 않은 대조군으로 사용하였다. 항 C1q 치료를 위해, 최적화된 쥐 항-C1q 항체(Mab3, Mab1에서 최적화된 것) 1 μl 또는 IgG1 MOPC 대조군 항체(7.5 μg/μl)를 빛 노출 하루 전에 양측방으로 주사하고, 조직 수집을 기준선, 3일 차 및 5일 차에 수행하였다.

[0241] **ELISA**

[0242] 동물을 식염수로 경심 관류시키고 눈을 적출하였다. 망막/RPE를 단리하고 무게를 재고 즉시 동결하고 -80 ℃에서 보관하였다. 냉동 조직을 용해 완충액(25 mM Hepes, 0.1 M NaCl, 1% Triton X100, 완전 단백질가수분해효소 억제제 칵테일[complete protease inhibitor cocktail]; 또는 Tris 완충 식염수 중 10 mM EDTA 및 Thermo Scientific #A32965) 중 막자 모터를 사용하여 균질화하였다. Micro BCA Assay Kit(Thermo Scientific #23235)를 사용하여 단백질을 정량화하였다. 보체 특징을 표준 샌드위치 ELISA 검정을 사용하여 측정하였다. 간단하게, 검정 96 웰 ELISA 플레이트(Costar #3925)를 밤새 4 ℃에서 중탄산염 완충액(pH 9.4) 중 포획 항체 10 ug/mL의 75 μL로 코팅하였다. 다음 날, 플레이트를 dPBS(pH 7.4)로 세척하고 3% 소혈청 알부민([bovine serum albumin, BSA], VWR #28382)을 함유하는 dPBS 완충액으로 차단하였다. 표준물 및 샘플을 분석 완충액(0.3% BSA, 0.1% Tween 및 0.05% EDTA를 함유하는 dPBS) 내에서 제조하였고 차단 용액의 제거 후에 플레이트(웰당 75 μL)에 첨가하였다. 플레이트를 밤새 4 ℃에서 300 rpm에서 진탕하면서 인큐베이션하였다. 다음 날, 플레이트를 세척 완충액(0.05% Tween을 함유하는 dPBS)으로 3회 세척하고, 실온에서 1시간 동안 진탕하면서 검출 항체(웰당 75 μl)와 함께 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 세척 완충액으로 3회 세척하고, 알칼리성 인산가수분해효소 기질(Life Technologies, T2214)을 첨가하여 발생시키고, 루미노미터(luminometer)를 사용하여 판독하였다. PK 분석을 위해, 마우스 C1q(M099, Complement Tech) 및 AP-접합 항-마우스 항체(115-055-071, Jackson ImmunoResearch)를 각각 포획 및 검출 항체로 사용하였다. C1q 분석을 위해, 자체 포획 항체(JL1 clone, Atum) 및 검출 항체(M1-AP, Antibody Solutions 1:3000)를 사용하였다. 항-마우스 C1s(LSBio, 2 ug/ml) 및 항-마우스 C1s-AP(LSBio, 1:5000)를 각각 포획 및 검출 항체로 사용하여 C1s 분석을 수행하였다. 항-인간 C3d(Dako, 1 ug/ml) 및 항-마우스 C3(11H9 clone, Abcam, 1:1000)을 각각 포획 및 검출 항체로 사용하여 C3d 분석을 수행하였다. 알부민 분석은 키트(Abcam, ab108792)로 수행하였다. 표준물은 4PL 로지스틱 핏을 사용하여 피팅하였고, 미지수는 농도로 전환하였고, 희석에 대해 보정하였고, 그 후 그래프패드 프리즘을 사용하여 표시하였다.

[0243] **면역조직화학**

[0244] 동물을 식염수로 경심 관류시킨 후, 4% PFA(최소 10분/최소 50 ml)로 경심 관류시켰다. 식염수/PFA 관류 후, 눈을 수집하였다. 후방 안구 컵을 2시간 동안 4% PFA에서 점적 고정시키고, 연속 수크로스 구배(10%, 20% 30%)를 통해 옮기고, 최적 절단 온도 화합물[OCT]에 매립하고 동결시켰다. 매립 후, 저온 유지 장치를 사용하여 10 μm 두께의 절편을 절단하고 현미경 슬라이드(Superfrost plus; VWR)상에 연속 수집하고 추가 사용이 있을 때까지 -80 ℃에서 보관하였다. 조직학적 염색을 위해, 망막 절편을 PBS로 세척하고, 차단 완충액(4% 당나귀 혈청, 0.3% Triton X-100을 함유하는 PBS)에서 1시간 동안 차단하고, 밤새 4 ℃에서 1차 항체와 함께 인큐베이션하였다. 다음 날, 절편을 세척하고, 적절한 Alexa-형광단-접합 2차 항체(ThermoFisher Scientific)와 함께 2시간 동안 인큐베이션하고, 세척하고, 플루오로마운트 G(Southern Biotech)를 사용하여 커버슬립으로 덮었다. 모든 세척 단계는 PBS에서 3 x 10분이었다. 핵을 Dapi를 사용하여 대조 염색하였다. 다음의 항체를 사용하였다. 자체 토끼 항-C1q(clone 4.8, ATUM,1:500), 마우스 항-bassoon(Abcam, 1:500), 기니 피그 항-vGlut1(Millipore Sigma, 1:500), 닭 항-homer1(Synaptic System, 1: 500), 염소 항-Iba1(Novus, 1:500), 래트 항-CD68(BioRad, 1:200). 토끼 IgG 동종형 항체(ThermoFisher)를 C1q 염색에 대한 음성 대조군으로 사용하였다. 이미지를 표면 형광 현미경 검사(Leica)를 사용하여 10배 또는 20배 배율로, 그리고 공초점 현미경 검사(Leica, Stellaris 5)를 사용하여 63배 배율로 캡처하였다. 이미지를 ImageJ를 사용하여 처리하였다.

[0245] **C1q 시냅스 공동 국소화 및 포집 분석**

[0246] 절편당 두 개의 z-스택 이미지(Z 스택 크기: 0.7 um, 12개의 평면)를 촬영하고 동물당 적어도 세 개의 절편을

분석하였다. 각 z-스택의 3D 볼륨 표면 렌더링을 생성하였다(Imaris Software). 망막 OPL을 목적 영역으로 선택하였다. 표면 렌더링된 이미지를 사용하여 미세아교세포 표면 및 부피뿐만 아니라 시냅스 및 C1q 요소를 확인하였다. C1q 태그 시냅스를 근접성에 기초하여 정량화하였다(≤ 400 μm 거리에서 C1q 및 bassoon 요소들). 포집된 시냅스를 중첩(bassoon - Iba1 중첩 비율 ≥ 70%)에 기초하여 정량화하였고 포집된 C1q 태그-시냅스의 수/시냅스의 총 수로 계산하였다.

[0247] **포스파티딜세린(PS) - C1q 결합 분석**

[0248] 포스파티딜세린(PS) 및 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine, PC) 지질 마이크로입자를 Echelon Biosciences(# P-B1PS 및 P-B1PC)에서 구입하였다. 정제된 인간 C1q는 Complement Technology(#A099)에서 구입하였다. 투명한 둥근 바닥 96 웰 플레이트를 분석에 사용하였다(VWR # 353227). 마이크로입자 현탁액을 제조업체의 지침에 따라 제조하였다. 간략하게, 마이크로입자를 먼저 완전히 볼텍스하여 균일한 비드 현탁액을 확인하였다. 세척, 희석, 적정 및 인큐베이션 단계를 Annexin V 결합 완충액(Thermo Fisher # BMS500BB)에서 수행하였다. 모든 세척 단계를 10분 동안 10,000 g의 원심분리 속도로 수행하였다. 비드를 사용 전에 20배 희석하였다. 각 테스트 포인트에 대해, 비드 현탁액 150 μL(약 100,000 비드)를 사용하였다. 마이크로입자를 2회 세척하고 결합 완충액에 재현탁시켰다. 웰당 50 마이크로리터를 반응 부피로 간주하였다. C1q 적정액(1:10 희석, 100-0.1 μg/mL)을 결합 완충액 중 제조하였다. C1q 및 지질 마이크로입자를 1:1 비율로 웰에 첨가하고 37 ℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 마이크로입자를 유동 완충액(PBS, 1% BSA, 2 mM EDTA) 1 부피로 2회 세척하였다. 상청액을 따라내고, 마이크로입자를 항 C1q-APC(Dako, 1:1000)를 함유하는 유동 완충액(웰당 100 ul)에 재현탁시키고, 4 ℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 마이크로입자를 2회 세척하고, 유동 완충액(150 μl)에 재현탁시키고, 마이크로입자에 대한 녹색 채널(FITC) 및 C1q 결합에 대한 원적색 채널(APC)을 사용하는 유세포분석법을 통해 분석하였다.

[0249] **보체 침착 분석**

[0250] 세척, 희석, 적정 및 인큐베이션 단계를 GVB++ 완충액(Complement Technology #B100)에서 수행하였다. PS 및 PC 지질 마이크로입자를 2회 세척하고 각 테스트 포인트에 대해 약 100,000 비드를 고려하여 적절한 부피로 재현탁시켰다. 인간 혈청 적정물을 GVB++ 중 제조하였다. 투명한 둥근 바닥 96 웰 플레이트를 분석(VWR 353227)에 사용하였다. GVB EDTA(Complement Technologies #B105)를 음성 대조군 완충액으로 사용하였다. 반응 혼합물은 완충액(GVB++ 또는 GVB EDTA, +/- 적정된 항 C1q 항체):지질 마이크로입자:인간 혈청을 최종 부피 33.3 μl에 대해 1:1:1 비로 포함하였다. 37 ℃에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 플레이트를 GVB++(150 μl)로 2회 세척하였다. 마이크로입자를 항 C1q-APC(Dako, 1:2000) 또는 항 C4-APC(Dako, 1:500)를 함유하는 유동 완충액(PBS, 1% BSA, 2 mM EDTA)에 재현탁시키고, 4 ℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 마이크로입자를 2회 세척하고, 유동 완충액(150 μl)에 재현탁시키고, 마이크로입자를 위한 녹색 채널(FITC) 및 C1q 또는 C4 침착을 위한 원적색 채널(APC)을 사용하는 유세포분석법을 통해 분석하였다.

[0251] **인간 GA 공여자 조직 조달 및 면역조직화학**

[0252] 인간 공여자 안구를 미국 캘리포니아주 San Diego Eye Bank에서 사후 24시간 이내에 얻었다. 모든 공여자에 대해 임상 기록과 가족 설문지를 얻었다. 인간 안구를 2시간 동안 4%로 고정시킨 후 밤새 PBS로 옮겼다. 다음 날, 후방 안구 컵을 24~48시간 동안 수크로스 30%에서 동결보호(cryoprotected)하였다. 그 후, 6 mm 직경의 해부 트레핀(Biomedical Research Instruments, MD, USA)을 사용하여 황반을 단리하였다. 측두부, 비강부, 상부 및 하부 영역을 동일한 트레핀을 사용하여 샘플 제작하였다. 망막 샘플을 OCT에 매립하고 동결시켰다. 매립 후, 저온 유지 장치를 사용하여 10 μm 두께의 절편을 절단하고 현미경 슬라이드(Superfrost plus; VWR)상에 연속 수집하고 추가 사용이 있을 때까지 -80 ℃에서 보관하였다. 인간 공여자 망막 절편의 조직학적 염색을 마우스 샘플에 대해 전술한 바와 같이 수행하였다. 다음 항체를 사용하였다. 토끼 항-인간 C1q(Dako, 1:500), 기니 피그 항-vGlut1(Millipore Sigma, 1:500), 닭 항-homer1(Synaptic System, 1: 500). 토끼 IgG 동종형 항체(ThermoFisher)를 C1q 염색에 대한 음성 대조군으로 사용하였다. 이미지를 표면 형광 현미경(Leica)을 사용하여 10배 배율로, 그리고 공초점 현미경(Leica, Stellaris 5)을 사용하여 63배 배율로 캡처하였다. 이미지를 ImageJ를 사용하여 처리하였다.

[0253] **통계 분석**

[0254] 모든 데이터를 평균 ± 표준 편차[standard deviation, SD]로 나타내고 있다. 통계 분석은 독립표본 스튜던트 t 테스트, 또는 일원 분산 분석[one-way analysis of variance, ANOVA] 또는 이원 분산 분석[two-way ANOVA]에

이어, Bonferroni 또는 Dunnet 또는 Sidak 또는 Tukey 사후 테스트를 사용하여 GraphPad Prism으로 수행하였다. 데이터를 평균 ± SD로 나타내고 있다. 모든 p 값은 도면 범례에 표시되며 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0255] 실시예 2: 광산화 광 손상 모델에서 광수용체 시냅스 손실 및 미세아교세포증 증가

[0256] 시냅스 전 마커 Bassoon을 사용하여 시냅스를 확인하고 표면형광법을 사용하여 시냅스 밀도를 측정하였다. 광수용체 핵의 열 개수는 광수용체 생존의 척도로 사용되었다. Iba1(미세아교세포에서 특이적으로 발현하는 칼슘 결합 단백질)을 범 미세아교세포/대식세포 마커로 사용하였다. CD68(리소좀 단백질)을 사용하여 반응성 포식 미세아교세포를 확인하였다. 진행성 광수용체 시냅스 및 세포체 손실(도 1a~1c)뿐만 아니라 증가된 미세아교세포 반응성(도 1d~1f)을 광산화 손상 후에 관찰하였다. 특히, 시냅스 층에서 포식 미세아교세포의 분포는 유의한 시냅스 손실이 처음 관찰된 시점과 동일한 1일 차에 최고조에 달했다(도 1e).

[0257] 실시예 3: 광수용체 시냅스에서의 증가된 C1q 수준은 광수용체 변성의 광산화 광 손상 모델에서 광수용체 시냅스 손실과 상관 관계가 있다

[0258] 초기 고전적 보체 성분 C1q 및 C1s뿐만 아니라 하류 활성화 생성물 C3d의 증가된 수준을 표준 ELISA에 의해 광 노출 동물에서 수득한 망막 용해물에서 관찰하였다(도 2a~2c). 이어서, 망막 C1q 분포를 면역형광법으로 조사하였다. 도 2d에 나타난 바와 같이, C1q는(i) Iba1(iii) 및 Bassoon(iv)과 함께 공동 국소화되어 미세아교세포/대식세포에서 C1q 발현 및 시냅스에서 발현/침착을 확인하였다. C1q 발현과 광수용체 시냅스 밀도 사이에 유의한 음의 상관 관계를 관찰하여(도 2g, 피어슨의 r = -0.72, p = 0.00003) 인과 관계를 시사하였다(도 2e).

[0259] 실시예 4: 광산화 손상 후 광수용체 C1q 태그 시냅스 전 요소의 미세아교세포 포집

[0260] C1q 태그 시냅스의 미세아교세포 포집을 평가하기 위해, C1q, Bassoon 및 Iba1에 대해 미감작[naive] 그리고 빛에 노출된 마우스에서 삼중 표지된 망막 절편을 수득하였다(도 3a). 공초점 현미경 검사를 사용하여 고해상도 이미징을 수행하였다. 3D 재구성 및 표면 렌더링 소프트웨어를 사용하여 포집 분석을 수행하였다(도 3b). 시냅스 밀도의 현저한 감소(도 3c)는 미감작과 비교하여 C1q 태그 시냅스의 백분율의 현저한 증가(도 3d) 및 광 손상된 망막에서 미세아교세포 포집 C1q 태그 시냅스의 현저한 증가(도 3e)와 관련이 있었다.

[0261] 실시예 5: 포스파티딜세린은 C1q에 결합하고, 광산화 광 손상 후 광수용체 시냅스에서 외재화한다

[0262] 질환에 걸린 동안 광수용체 시냅스에서 PS 노출이 발생하는지 여부를 테스트하기 위해, 본 발명자들은 광 손상 모델에서 PS-결합 프로브 PSVue(PSVue 550)의 IVT 투여를 수행하였다(문헌[Scott-Hewitt N et al, The EMBO Journal, 2020]). 망막 조직을 광 노출 후 3일 차에 IHC를 사용하여 처리하고 분석하였다. 증가된 PSVue 표지는 미감작과 비교하여 광 손상된 망막의 OPL 및 ONL에서 검출 가능하였다(도 4a). 고해상도 공초점 이미징 및 3D 재구성/표면 렌더링은 C1q 및 Bassoon을 사용한 PSVue 표지의 공동 국소화를 확인하였다(도 4a). 특히, PSVue-양성 표면은 샌드위치-유사 방식으로 Bassoon 및 C1q 양성 표면 모두에 매우 근접하게 나타나며(도 4a iii), 이는 시냅스 및 C1q 상호 작용에 대한 PS 외재화를 나타낸다.

[0263] PS가 C1q에 직접 결합하고 보체 캐스케이드를 활성화하는지 여부를 평가하기 위해 PS-지질-녹색-형광-마이크로입자를 사용하여 C1q 결합 및 보체 침착 분석을 수행하였다. 포스파티딜콜린(PC)-지질-녹색-형광 마이크로입자를 음성 대조군으로 사용하였다. PC가 아닌 PS 지질 마이크로입자에 대한 C1q의 직접적인 결합은 10 ng/mL 농도에서 C1q와 함께 인큐베이션한 후 관찰하였다(도 4b). C1q 및 C4 모두의 침착을 PS 지질 마이크로입자상에서 관찰하였지만, PC 지질 마이크로입자상에서는 관찰하지 못했다. 음성 대조군에서는 침착을 거의 또는 전혀 관찰되지 못했다(도 4c 및 d). 혈청 내에서 항-C1q 중화 항체(Mab1-Fab)의 적정은 PS 지질 마이크로입자상에서의 감소된 C1q 및 C4 침착을 초래하였고(도 4e 및 4f), 이는 항-C1q 항체 경쟁적 결합이 PS 매개 보체 활성화를 감소시켰음을 시사한다.

[0264] 실시예 6: 항 C1q 유리체강 내 치료는 광산화 광 손상 후 망막 보체 성분 수준을 감소시켰다

[0265] 중화 최적화된 쥐 항-C1q 항체(Mab3, Mab1에서 최적화된 것)의 유리체강 내 투여를 광 손상에 노출되기 하루 전에 수행하였다. 검출 가능한 약물 수준 및 선택된 보체 성분 수준을 표준 ELISA에 의해 광 손상 후 3일 차에 평가하였다. 측정 가능한 약물 수준은 항-C1q 치료를 받은 동물의 망막 용해물에서 발견하였지만 IgG1 치료 또는 비치료 그룹에서는 발견하지 못했다(도 5a). 미감작과 비교하여, 고전적인 보체 성분 C1q 및 C1s뿐만 아니라 하류 활성화 성분 C3d의 증가된 수준을 비치료 및 IgG 치료된 광 노출 동물 둘 다에서 얻은 망막 용해물에서 확인하였다(도 5b~5d). IgG 항체와 비교하여, 항-C1q 치료 후 C1q, C1s 및 C3d의 현저한 감소를 관찰하였다(도

5b~5d). 검증 시험은 치료 후 표적 결속과 신경 보호 평가를 확인한다.

[0266] 실시예 7: 인간 GA 공여자 망막에서 광수용체 시냅스상의 C1q 발현 및 침착

[0267] GA 공여자 눈을 확보하고, 망막 층에 걸친 C1q 분포의 조직학적 평가를 수행하였다. 시냅스 완전성은 GA 공여자 대 건강한 공여자 망막의 황반 영역에서 면역형광법으로 평가하였다. 시냅스 전 마커 Vglut1에 대한 감소된 면역반응성 및 광수용체 시냅스 층에서 C1q에 대한 증가된 표지는 건강한 공여자와 비교하여, GA 망막에서 발생하는 시냅스 손실 및 C1q 축적을 확인하였다(도 6a~6b). 마지막으로, C1q(회색), 시냅스 전 마커 Vglut1 및 시냅스 후 마커(Homer1)에 대한 삼중 면역표지는 인간 GA 공여자 망막에서 광수용체 시냅스와 C1q의 공동-국소화를 확인하였다(도 6c).

[0268] 실시예 8: 비임상 시험에서 FabA 평가

[0269] FabA 약물 제품[FabA Drug Product]은 IVT 주사를 위한 멸균 등장성 액체이다.

[0270] FabA는 IVT 주사를 위한 무균 일회용 바이알로 제공된다.

[0271] 일련의 광범위한 시험관내 및 생체내 약리학 시험을 FabA로 수행하였다.

[0272] 항체 Mab1, Mab1-Fab 및 Mab2는 녹내장의 급성 마우스 모델에서 활성화되어 망막 신경절 세포 및/또는 신경 섬유 손실을 방지하였다. 마우스의 광산화 광-유발 손상 모델에서, 유리체강 내 투여된 Mab1은 광수용체 세포 손실을 방지하고 눈의 망막 기능적 연결을 보호하였다.

[0273] FabA GLP 시험은 단회-용량 래트 안구 독성학 시험과 3회 반복-용량 사이노몰구스 원숭이 안구 독성학 시험으로 이루어진다. 독성학 시험을 위한 투여 경로는 IVT 주사였다. 단회 용량 및 2회 용량(월 1회) IVT GLP 시험에서 FabA는 사이노몰구스 원숭이에서 월 1회 5 mg/눈(인간 용량 10 mg과 동등), 및 1회 용량 래트 시험에서 0.05 mg/눈(인간 용량 10 mg과 동등)에서 최대 무독성 용량[No-Observed-Adverse-Effect-Level, NOAEL]을 보여 유해한 안구 독성의 증거를 보이지 않았다. 사이노몰구스 원숭이에서의 26주 만성 안구 독성학 시험에서 유해한 안구 변화는 이중 주입 절차와 관련이 있고/있거나 FabA IVT 투여의 직접적인 영향이 아닌 항-약물 항체[anti-drug antibody, ADA] 매개로 결정되었다.

[0274] 래트 및 사이노몰구스 원숭이 혈청 및 유리체에서 FabA의 약동학적 평가를 수행하였다. 원숭이에서 C1q의 FabA 억제에 대한 PD 마커로서 유리체에서 C1q 수준을 측정하였다. 원숭이에서 PK/PD 및 TK/PD 시험은 유리체에서 FabA 약물 노출 수준과 일치하는 강력한 안구 PD 효과를 입증하였다.

[0275] 인간 C1q에 대한 FabA 및 전구체 분자의 결합 및 친화도

[0276] FabA 및 전구체 분자의 C1q 결합 친화도 또한 ELISA로 검사하였다. 모든 분자(Mab2-Fab, FabA 및 Mab2, Mab1 및 Mab1-Fab)는 2.2~4.9 ng/mL(20~95 pM) 범위에서 반수 최대 유효 농도[half maximal effective concentration, EC50]로 인간 C1q에 대한 친화도를 나타내었다. C1q에 결합하는 FabA의 EC50은 2.5 ng/mL이다.

[0277] IgM-매개 적혈구 용혈에 대한 영향

[0278] 인간 혈청에서 IgM 옵소닌화-적혈구[opsonized-RBC]의 고전 보체-의존성 용혈을 기능적으로 억제하는 FabA, Mab2 및 Mab2-Fab의 활성이 측정되었다(도 9). 세 분자는 이들의 동등한 결합 친화도와 일치하는 거의 동일한 효력을 나타낸다. IgM-코팅 RBC 용혈의 FabA 억제의 반수 최대 억제 농도[half maximal inhibitory concentration, IC50]는 0.62 μg/mL(약 12 nM)이다.

[0279] 생체내 약리학 시험

[0280] 녹내장의 급성 마우스 모델에서 항-C1q 항체 치료는 시신경 손상을 예방한다.

[0281] 마우스에서, 눈 전방에 폴리스타이렌 비드를 주입하면 2주 동안 IOP가 급격히 상승하고 망막 신경절 세포가 손실되며 시신경이 손상된다. Mab1, Mab1-Fab 및 Mab2를 IOP 상승 1일 전 및 7일 후에 마우스 유리체강 내로 투여하였다. 10 mg/mL 항체 2 μL 또는 식염수 2 μL를 각 시점에 투여하였다. 마우스 눈의 유리체 부피 5~10 μL를 기준으로 항체 농도는 2000~4000 μg/mL였다. 손상 2주 후에 시신경을 수집하고 온전한 축삭 및 손상된 축삭의 수를 정량화하였다. 항-C1q 항체 치료는 녹내장의 이러한 유발 마우스 모델에서 RGC 손실 및/또는 망막 신경 섬유 손상 방지를 야기하였다(도 10).

[0282] 항-C1q 항체 치료는 광산화 광-유발 손상 모델에서 광수용체 세포 손상을 방지한다.

[0283] 광산화 손상으로 인해 마우스가 1~7일 동안 자연 백색 LED의 100 Klux에 노출되었을 때 망막 광수용체 손실이 발생하였다. 이 모델에서, 광수용체 세포 사멸 및 미세아교세포/대식세포 유인과 상관 관계가 있는 3~7일 동안 C1qa 유전자 발현에서 시간 의존적 증가가 있었다. C1qa-/- 마우스는 광수용체 세포 사멸이 적게 나타났고, 광수용체 병변으로의 미세아교세포/대식세포 유인이 감소하였고, 광손상 유발 14일 후에는 시각 기능이 더 높았지만 7일 차에는 그렇지 않았다. 광손상 후 7일 차에 Mab1 항체의 IVT 투여는 광수용체 세포 손실을 감소시켰고 망막전도에 의해 측정된 것과 같이 망막 기능을 유지하였다(도 11). 마우스에 7.5 mg/mL 항체 1 μL를 투여했으며, 이는 유리체내 750~1500 ug/mL 농도와 동등하다. 대조적으로, 0일, 4일 및 8일에 100 mg/kg에서 Mab1의 전신 전달은 광수용체 손실 또는 기능에 영향이 없었다. 망막 C1q는 초기 AMD 및 마우스 망막에서 외부 망막에 위치한 망막하 미세아교세포/대식세포에 의해 주로 발현되었다. 따라서, 항-C1q 항체에 의한 보호는 광수용체 손상의 개시에서 C1q의 분명한 역할 및 인간 질병에서 GA의 발병기전에서 고전 보체 캐스케이드의 분명한 역할을 시사한다.

[0284] 안전성 약리학

[0285] 26주 사이노몰구스 원숭이에서 만성 IVT 투여 후 전신 노출은 86.3 ng/mL를 초과하지 않은 반면, 26주 사이노몰구스 원숭이 시험에서 매주 1회 IV 투여로 동일한 CDR을 갖는 Mab2의 전신 노출은 NOAEL 200 mg/kg에서 1 mg/mL를 초과하였다.

[0286] 따라서, 원숭이에서 4주 반복-투여 GLP 독성 시험에서 매주 최대 200 mg/kg 및 원숭이에서의 26주 반복-투여 독성 시험에서 매주 최대 200 mg/kg까지 IV 투여 후 전장 항체, Mab2에 대한 안전성 약리학 평가 변수[endpoint]는 심혈관, 호흡기 또는 신경학적 평가 변수에 대한 치료-관련 효과의 증거가 없었고, FabA 투여 IVT의 전신 안전성을 지지한다.

[0287] 또한 원숭이에서의 4주 반복-투여 GLP 독성 시험에서 매일 최대 20 mg/kg까지 SC 투여 후 FabA에 대한 안전성 약리학 평가 변수는 심혈관, 호흡기 또는 신경학적 평가 변수에 대한 치료-관련 효과의 증거가 없었고, FabA 투여 IVT의 전신 안전성을 지지한다.

[0288] 동물에서의 약동학

[0289] FabA의 PK, TK 및 PD를 특성화하기 위해 고안된 비임상 시험을 래트와 사이노몰구스 원숭이에서 수행하였다. 이들 시험은 래트와 사이노몰구스 원숭이에서의 단회 용량 IVT PK 시험과 FabA를 사용한 사이노몰구스 원숭이에서의 반복-용량 TK/PD 시험을 포함한다. 보다 광범위한 TK/PD 시험을 원숭이에서 수행하였고 래트 또는 원숭이 1회 용량 시험에서 안구 독성이 없었다.

[0290] 약동학/독성학/약력학 분석

[0291] 유리체에서 FabA의 약동학

[0292] 래트에게 0.01 mg/눈(인간 용량 2 mg과 동등) 또는 0.05 mg/눈(인간 용량 10 mg과 동등)의 용량으로 FabA를 단일 양측 IVT 투여한 후, 두 용량 수준에서 약 12시간의 반감기와 일치하게, 상대적으로 빠르게 약물을 유리체에서 제거하였다. 양측 IVT FabA를 또한 투여 받은 사이노몰구스 원숭이에서, 약물은 1 mg/눈(인간 용량 2 mg과 동등) 및 5 mg/눈(인간 용량 10 mg과 동등) 용량 그룹 모두에 대해 약 3일의 반감기를 가진 래트와 비교했을 때, 더욱 느리게 유리체에 분포되었다.

[0293] 두 종 모두에서 FabA IVT PK는 용량 선형이었다. 사이노몰구스 원숭이에서의 안구 독성학 시험 데이터에서 FabA는 1.0 mg/눈(인간 용량 2 mg과 동등), 2.5 mg/눈(인간 용량 5 mg과 동등), 또는 5.0 mg/눈(인간 용량 10 mg과 동등)의 용량으로 28일 동안 2회 투여하였고, 이는 희생 시점(즉, 두 번째 투여 15일 후 및 30일 후)에 유리체 농도가 1회 투여 IVT 투여의 데이터와 대체로 일치함을 나타내었다.

[0294] 사이노몰구스 원숭이에서의 26주 만성 안구 독성학 시험에서 FabA는 매월 IVT 2.5 mg/눈(인간 용량 5 mg과 동등), 매월 5 mg/눈(인간 용량 10 mg과 동등) 또는 격주로 5 mg/눈(5 mg/눈 용량은 모두 후속적으로 2.5 mg/눈으로 감소되었고 5/2.5 mg/눈으로 지칭됨)으로 투여하였고 FabA를 169일까지 투여받은 모든 동물에서 유리체액[vitreous humor] FabA 농도를 184일에 정량화할 수 있었고, 10주간의 무투여 회복 기간 242/243일 후에 모든 동물에서 정량화 한계 미만[below the quantification limit, BQL]이었다. 유리체액 FabA 농도는 용량 그룹이나 성별 사이에 명확한 차이나 추세 없이 높은 변동성을 보였다.

[0295] 혈청에서 FabA의 약동학

[0296] 단일 IVT 투여 후, 혈청 농도는 래트에서 약 0.003 및 사이노몰구스 원숭이에서 0.000001의 C_{max} 혈청/C_{max} 유리체를 갖는 유리체에서보다 훨씬 더 낮았다. 28일 동안 양측 FabA IVT를 2회 받은 사이노몰구스 원숭이에서 혈청 농도는 낮았고 최고 평균 피크 농도(C_{max})는 10.1 ng/mL였으며 이를 두 번째 IVT 용량인 5 mg/눈을 투여한 후 관찰하였다(인간 용량 10 mg과 동등). FabA가 유리체에서 혈청 구획으로 분포함에 따라 FabA는 C1q에 결합하거나 또는 유리 형태로 남아 분석으로 정량화할 수 있어 1 mg/눈 그룹에서 정량화할 수 없는 낮은 FabA 혈청 농도(즉, < 1.25 ng/mL), 그리고 2.5 및 5.0 mg/눈에 대해 3.3 및 10.1 ng/mL의 평균 C_{max}를 각각 야기하였다.

[0297] 대조적으로, FabA를 10 mg/kg의 용량으로 IV 투여한 후, FabA 최대 농도는 테스트한 두 마리의 사이노몰구스 원숭이에서 13800 및 17000 ng/mL였으며 이후 농도는 매우 빠르게 감소하여 Fab 단편에서 예상되던 약 2시간의 반감기와 일치하였다.

[0298] 28일 동안 2회 양측 IVT 투여(5 mg/눈) 후 혈청 FabA 농도와 4주 동안 매주 1회 200 mg/kg의 용량으로 Mab2의 전신 IV 투여 후 얻은 것을 비교할 때, FabA 혈청 노출은 상당히 더 낮았다(0.00000701의 FabA/Mab2 Cmax 비율).

[0299] FabA가 매월 IVT 2.5 mg/눈, 매월 5/2.5 mg/눈 또는 격주로 5/2.5 mg/눈으로 투여된 사이노몰구스 원숭이에서의 26주 만성 안구 독성학 시험에서 혈청에서 FabA에 대한 격주 전신 노출은 낮고 투여의 국부적 경로와 일치하였다. 85일 차에 FabA의 혈청 농도는 86.3 ng/mL를 초과하지 않았고, 마지막 용량이 투여된 후 169일 차에 FabA 혈청 농도는 60.8 ng/mL를 초과하지 않았다. 최대 혈청 FabA 농도를 용량 수준/요법 및 평가일에 걸쳐 투여 후 24~48시간에 관찰하였다. 혈청에서 FabA의 반감기(T1/2) 값은 격주로 5/2.5 mg/눈 그룹의 동물 중 소수의 사례에서만 계산 가능/보고 가능하였고 모든 평가일에 걸쳐 49.9 내지 143시간 범위였으며 안구 공간에서 혈청으로 분포를 나타낼 가능성이 있었다. 매월 2.5 mg/눈으로 반복되는 IVT 투약으로 혈청에 FabA 축적이 거의 일어나지 않았다. 그러나 1일 차 이후 각 후속 평가일에 이 그룹에서 점점 더 많은 계산 가능한 FabA 혈청 농도가 있었다. 축적은 57일 차 이후 용량 수준의 변화로 인해 다른 임의의 그룹에서 1일 차부터 결정될 수 없었다. 169일 차/85일 차 곡선하 면적 대 시간 't'(AUC[0-t]) 비율은 5/2.5 mg/눈으로 1개월 1회 남성 및 여성의 경우 0.0407에서 0.664 범위이고, 5/2.5 mg/눈으로 격주로 남성 및 여성의 경우 0.132에서 7.15 범위였다. 사이노몰구스 원숭이에서 만성 26주 투여 후 FabA 및 Mab2 평균 성별 결합 전신 노출을 비교할 경우, 격주로 5/.25 mg/눈으로 양측 IVT 투여 후 FabA 노출 AUC0-t(1,230 hr*ng/mL 또는 1.23 hr*μg/mL)와 비교하여 1주 1회 전신 IV Mab2 투여 이후 수득된 200 mg/눈 AUC0-t(3,150,000 hr*μg/mL)와 비교했을 때, FabA 혈청 노출은 상당히 더 낮았다(0.000000073의 FabA /Mab2 C_{max} 비율, 0.00000039의 AUC0-t 비율).

[0300] 안구 C1q의 약력학

[0301] 대조군 동물에서 평균 유리체 유리 C1q 농도는 40.3 ng/mL였던 반면, 1 mg/눈(인간 용량 2 mg과 동등) 또는 5 mg/눈(인간 용량 10 mg과 동등)으로 단일 FabA IVT 투여를 받은 사이노몰구스 원숭이의 유리체에서 유리 C1q 수준은 시험 기간(30일) 동안 검출 한계(< 1.953 ng/mL) 미만이었으며, 이는 완전한 C1q 억제를 나타내었다. 28일마다 총 2회의 FabA를 투여받은 원숭이에서 C1q는 두 번째 투여 이후 15일 동안 모든 세 가지 용량 수준에서 억제된 상태를 유지하였다(즉, 1, 2.5 및 5 mg/눈 q 28일 x 2 투여). FabA 두 번째 투여 30일 후, C1q는 일부 눈에서 검출 한계 미만으로 유지되었지만 모든 눈에서 그렇지는 않았다.

[0302] 5 mg/눈으로 IVT 두 번째 투여 15일 후, C1q의 > 80%가 망막, 맥락막 및 시신경두[optic nerve head]에서 FabA에 결합하였다. 5 mg/눈으로 두 번째 투여 30일 후, C1q는 망막 및 맥락막에서만 억제된 상태를 유지하였다.

[0303] FabA를 매월 IVT 2.5 mg/눈으로, 매월 5/2.5 mg/눈으로 또는 격주로 5/2.5 mg/눈으로 투여한 사이노몰구스 원숭이에서의 26주 만성 안구 독성학 시험에서, 말기 부검 시 FabA를 받은 모든 그룹의 유리체액 C1q 수준의 감소가 있었고, 말기 및 회복 부검 시 각각 투여 휴지기인 동물 및/또는 10주 무투여 회복 기간 이후의 동물은 유리체액 C1q 수준이 회복되었고 이는 대조군과 비슷하였다.

[0304] 혈청 C1q 및 혈청 용혈 억제

[0305] 사이노몰구스 원숭이에게 5 mg/눈(사람 용량 10 mg과 동등)으로 양측 IVT 투여 후, C1q-의존성 혈청 용혈이 약 50~80%만큼 억제되었으며, 이는 첫 번째 IVT 용량 투여 후 약 24~48시간 동안 지속되었고, 두 번째 FabA 용량 투여 후는 96시간까지, 그 후 기준선으로 돌아갔다.

[0306] 사이노몰구스 원숭이에게 10 mg/kg으로 단일 IV 투여 후, 최대 C1q-의존성 혈청 용혈 억제는 1시간에 도달하였

다. 최대 억제를 약 24시간 동안 유지하였고 FabA 투여 120시간 후 기준선으로 돌아갔다. 무혈청 C1q 또한 급격히 감소했지만 120시간까지 기준치로 돌아오지 않았고, 이는 일부 FabA가 이러한 시간 프레임에 걸쳐 순환하는 C1q에 결합한 채 남아있음을 시사한다.

[0307] 독성학

[0308] FabA의 안전성은 임상 시험에서 IVT 투여를 위한 FabA의 사용을 지지하도록 설계된 포괄적인 비임상 안구 독성학 프로그램은 FabA의 안전성을 지지한다. FabA로 래트와 사이노몰구스 원숭이에서 초기 단회 용량 시험을 수행하였고, 이들 중 어느 것에서도 안구 독성이 관찰되지 않았다. 래트 및 원숭이에서의 유사한 결과, 및 원숭이가 래트보다 더 관련성이 있음을 나타내는 시험관내 약리학 데이터 및 서열 상동성 데이터에 기초하여, FabA의 반복-용량 안구 독성학 시험을 위해 사이노몰구스 원숭이를 선택하였다.

[0309] 반복 용량 안구 독성 시험에는 안과 검사[ophthalmic examinations, OE], IOP, 망막전도[electroretinogram, ERG], 안구 조직병리학, 및 TK 분석을 위한 혈청 내 및 유리체내 FabA 측정이 포함되었다. 또한, FabA PD 특성은 유리체(모든 반복 용량 시험) 및 안구 조직(2회 용량 시험)에서 C1q의 측정, 및 혈청(2회 용량 시험)에서 C1q-의존성 용혈의 억제를 특징으로 하였다.

[0310] 단회-용량 독성

[0311] FabA의 IVT 투여는 단회-용량(래트 및 사이노몰구스 원숭이) 안구 독성학 시험에서 잘 받아들여졌다. 이들 시험에서 래트와 사이노몰구스 원숭이에 대한 NOAEL을 각각 0.05 mg/눈(인간 용량 10mg과 동등) 및 5 mg/눈(인간 용량 10mg과 동등)으로 간주하였고, 이는 각 시험에서 평가한 최고 용량이었고, 유리체 부피(래트 0.02 mL, 원숭이 2 mL)에 대해 보정했을 때 동등했다(2.5 mg/mL).

[0312] 스프라그 돌리 래트(Sprague Dawley Rat)에서 유리체강 내 주사에 의한 FabA의 GLP 단회-용량 안구 독성 시험

[0313] 이러한 단회 용량 GLP 래트 안구 독성학 시험에서 비히클 또는 FabA를 0.01 mg/눈(인간 용량 2 mg과 동등) 및 0.05 mg/눈(인간 용량 10 mg과 동등)의 용량으로 젊은 성체 수컷 래트에게 양측 IVT 주사를 단회 투여하였다. FabA로 치료 받은 동물의 시험을 1일 차(투여 후 6시간), 3일 차, 7일 차, 10일 차, 20일 차, 30일 차에 종결하였고 모든 비히클 대조군 동물의 시험을 30일에 종결하였다. 모든 동물은 예정된 부검까지 생존하였다.

[0314] 이 시험은 표준 안전성 매개변수를 포함하였다. 종결 시 혈액 샘플을 수집하고 TK 분석을 위해 말기 유리체 샘플을 수득하였다. 또한 IOP를 포함한 안과 검사[OE] 및 안구 조직병리학을 평가하였다.

[0315] OE, IOP 및 안구 조직병리학을 포함하여 평가한 모든 안전성 매개변수에서 FabA-관련 변화는 눈에 띄지 않았다.

[0316] FabA에 대한 유리체 노출은 0.01 mg/눈(인간 용량 2 mg과 동등) 및 0.05 mg/눈(인간 용량 10 mg과 동등) 둘 다에서 투여 후 6시간(첫 번째 수집)에서 144시간 동안 치료받은 동물에서 TK를 확인하였다. FabA에 대한 혈청 노출은 0.01 및 0.05 mg/눈에서 치료받은 동물에서 TK를 확인하였다(투여 후 2 내지 48시간만).

[0317] 이 시험에서 평가한 최고 용량인 0.05 mg/눈을 포함한 임의의 용량 수준에서 FabA와 관련된 것으로 간주되는 악영향은 관찰되지 않았다. 이들 결과에 기초하여 NOAEL은 0.05 mg/눈(유리체에서 2.5 mg/mL)이었다.

[0318] 사이노몰구스 원숭이에서 유리체강 내 주사에 의한 FabA의 비GLP 단회-용량 안구 독성 시험

[0319] 이 단회 용량 비GLP 사이노몰구스 원숭이 안구 독성학 시험에서, 비히클 또는 FabA를 1 mg/눈(인간 용량 2 mg과 동등) 및 5 mg/눈(10 mg 인간 용량과 동일)의 용량의 IVT 주사로 젊은 성체 암컷 사이노몰구스 원숭이에게 양측 투여하였다. FabA로 치료받은 동물의 시험을 1일 차(투여 후 6시간), 3일 차, 7일 차, 10일 차, 20일 차, 30일 차에 종결하였다. 모든 비히클 대조군 동물의 시험을 30일에 종결하였고 모든 동물은 예정된 부검까지 생존하였다.

[0320] OE, IOP 및 안구 조직병리학을 포함한 표준 안전성 매개변수를 이 시험에서 평가하였다. 또한, 시험 전반에 걸쳐 혈액 샘플을 수집하였고 TK 및 PD에 대한 말기 유리체 샘플을 분석하였다.

[0321] FabA-관련 변화는 염증과 관련되지 않은 악영향이 없는 결과로 제한하였다. 이들 결과는 포도막의 조직구 침윤 및 1 mg/눈 용량 그룹의 경미한 호염기구증가증을 포함하였다. 5 mg/눈 용량에서 결과는 포도막에서 조직구 침윤 및 최소 내지 경미한 호염기구증가증으로 이루어졌다.

[0322] FabA-관련 변화는 OE 및 IOP에서 관찰되지 않았다. 이 시험에서 5 mg/눈(최고 평가 용량)을 포함한 임의의 용량 수준에서 FabA와 관련된 것으로 간주되는 악영향은 관찰되지 않았다. 이들 결과에 기초하여 NOAEL은 5 mg/눈(유

리체에서 2.5 mg/mL)이었다.

[0323] 유리체에서 FabA에 대한 노출을 시험 기간 동안(30일에 걸침) 모든 치료받은 동물의 TK에서 확인하였다. FabA에 대한 혈청 노출은 1 mg/눈에서는 존재하지 않았고, 5 mg/눈에서는 낮고 일시적이었고, 6 ng/mL(LLOQ 1.25 ng/mL)를 초과하지 않았다. C1q는 30일까지 모든 FabA 치료받은 동물의 유리체에서 존재하지 않았다.

[0324] 반복-용량 독성 시험

[0325] 반복-용량 안구 독성 시험에서 FabA는 IVT 주사로 4주에 적어도 1회 투여하였다. FabA의 반복-용량 투여는 사이노몰구스 원숭이에서 잘 받아들여졌다. 초기 반복-용량 GLP 안구 독성학 시험에서 사이노몰구스 원숭이에 대한 NOAEL은 5 mg/눈(인간 용량 10mg과 동등) 2회 용량으로 월 1회 투여하였고, 이는 최고 용량 평가였다. 사이노몰구스 원숭이에서의 26주 만성 안구 독성학 시험에서, 유해한 안구 변화는 이중 주사 절차와 연관되었고/되었거나 ADA-매개로 결정되었고 FabA IVT 투여의 직접적인 영향이 아니었기에 따라서 NOAEL은 2.5 mg/눈(인간 용량 5 mg과 동등)으로 격주로 또는 월 1회로 사이노몰구스 원숭이에게 각각 13 또는 7 용량으로 결정하였다.

[0326] 사이노몰구스 원숭이에서 유리체강 내 주사에 의한 FabA의 6주 GLP 반복-용량 안구 독성 시험

[0327] 이 시험은 표준 안전성 매개변수를 포함하였고 시험 전반에 걸쳐 혈액 샘플을 수집하였다. TK 및 PD 분석을 위한 말기 유리체 샘플 및 TK 및 PD 분석을 위한 말기 시신경 절편 또한 수집하였다. 또한 OE, IOP, ERG 및 안구 조직병리학을 평가하였다.

[0328] 유해하지 않은 것으로 결정된 FabA 결과를 암컷에게 1회 고용량(2.5 mg/눈)(인간 용량 5mg과 동등)으로 제한하였으며, 관련 염증(호염기구증가증으로 지칭됨) 없이 유리체의 최소 호염기성/청색 염색이 있었다. 중요한 것은 OE, IOP 및 ERG에서 FabA-관련 변화가 기록되지 않았다는 것이다. TK는 시험 기간 동안 및 회복 기간 동안(마지막 투여 후 30일) 치료받은 모든 동물의 유리체에서 FabA에 대한 노출을 확인하였다.

[0329] 혈청 노출은 1 mg/눈(인간 용량 2 mg과 동등)에서는 측정할 수 없었고, 2.5 mg/눈(인간 용량 5 mg과 동등)에서는 낮고 일시적이었고(첫 번째 투여 후 12~48시간, 마지막 투여 후 6~168시간), 8 ng/mL(LLOQ 1.25 ng/mL)를 초과하지 않았다. PD는 FabA 수준이 약 100 ng/mL일 때 치료받은 모든 동물의 유리체에서 C1q의 부재를 확인하였다. FabA ADA를 1 mg/눈(인간 용량 2 mg과 동등)(12마리 중 6마리) 및 2.5 mg/눈(인간 용량 5 mg과 동등)(12마리 중 7마리)일 때 동물에서 검출하였지만 혈청 또는 유리체에서 FabA 노출에 대한 ADA의 명확한 영향은 없었다.

[0330] 사이노몰구스 원숭이에서 유리체강 내 주사에 의한 FabA의 6주 GLP 반복-용량 안구 독성 시험

[0331] 이 6주 GLP 사이노몰구스 원숭이 안구 독성학 시험에서, 비히클 또는 FabA는 젊은 성체 수컷 및 암컷 사이노몰구스 원숭이에게 5 mg/눈(10 mg 인간 용량과 동일)의 용량으로 4주마다(1일 차 및 29일 차) IVT 주사를 통해 양측 투여하였고, 4주간의 회복 기간이 뒤따랐다. 모든 주요 시험 동물은 44일에 종결하였고 모든 회복 동물은 59/60일에 종결하였다. 모든 주요 시험 및 회복 동물은 예정된 부검까지 생존하였다.

[0332] 이 시험은 표준 안전성 매개변수를 포함하였고(전신 조직병리학은 제외) 혈액 샘플을 시험 전반에 걸쳐 수집하였고 TK 및 PD 분석을 위한 말기 유리체 샘플도 수집하였다. ADA 및 안방수[aqueous humor] 샘플을 수집하고 보관하였다. 또한 OE, IOP, ERG 및 안구 조직병리학을 평가하였다.

[0333] OE, IOP, ERG 및 안구 조직병리학을 포함하여 평가된 임의의 안전성 매개변수에서 FabA-관련 변화가 기록되지 않았다. 관련 염증(호염기구증가증으로 지칭됨)이 없는 유리체의 최소-경미한 호염기성/청색 염색 치료 동물과 대조군 동물 모두에서 관찰되었고 따라서 FabA와 관련된 것으로 간주되지 않았다.

[0334] TK는 시험 기간 동안 및 회복 기간 동안(마지막 투여 후 30일) 치료받은 모든 동물의 유리체에서 FabA에 대한 노출을 확인하였다. 대조군 동물의 혈청 및 유리체에서 FabA의 부재를 확인하였다. PD는 44일 차에 치료받은 모든 주요 시험 동물의 유리체에서 C1q의 부재를 확인하였다. 59일 차에, 회복 동물의 2/4는 유리체에서 측정 가능한 C1q를 가졌다. FabA ADA를 5 mg/눈(인간 용량 10mg과 동등)(동물 10마리 중 9마리)그룹 동물에서 검출하였지만, 혈청 또는 유리체에서 FabA 노출에 대한 ADA의 명확한 영향은 없었다.

[0335] > 80%의 C1q-의존성 용혈 억제를 FabA 투여 후 24~48시간 후에 달성하였고 그 이후 기준선으로 돌아왔다.

[0336] C1q 수준은 44일 차에 망막, 맥락막 및 시신경두에서도 상당히 감소하였고, 59일 차에는 망막 및 맥락막에서 계속 감소했지만 시신경두에서는 감소하지 않았다.

[0337] 이 시험에서 5 mg/눈(인간 용량 10 mg과 동등)(최고 용량 평가)을 포함한 임의의 용량 수준에서 FabA와 관련된 것으로 간주되는 악영향은 관찰되지 않았다. 이들 결과에 기초하여 NOAEL은 5 mg/눈(인간 용량 10 mg과 동등)(유리체내 2.5 mg/mL)이었다.

[0338] 사이노몰구스 원숭이에서 유리체강 내 주사에 의한, 10주 회복을 포함하는 FabA의 26주 GLP 반복-용량 안구 독성 시험

[0339] 이 26주 GLP 사이노몰구스 원숭이 안구 독성학 시험에서, 비히클 또는 FabA는 젊은 성체 수컷 및 암컷 사이노몰구스 원숭이에게 2.5 mg/눈(인간 용량 5 mg과 동등)의 용량으로 월 1회, 5 mg/눈(인간 용량 10 mg과 동등)의 용량으로 월 1회, 및 5 mg/눈의 용량으로 격주로(2주마다) IVT 주사를 통해 양측 투여하였고, 10주간의 회복 기간이 뒤따랐다. 2.5 mg/눈에 상응하는 50 μL의 단일 주사, 또는 총 100 μL 이중 주사(5 mg/눈에 상응하는 10분 간격 50 μL 주사 2회)를 2주마다(13회 투여 기간) 또는 4주마다(7회 투여 기간)에 투여하였다. 모든 주요 시험 동물은 184일에 종결하였고 모든 회복 동물은 242/243일에 종결하였다. 모든 주요 시험 및 회복 동물은 예정된 부검까지 생존하였다.

[0340] 투여 휴지기 또는 투여 중단은 대조군의 동물에서 월 1회 5 mg/눈(인간 용량 10 mg과 동등) 및 격주로 5 mg/눈 용량 그룹에서 발생하였다. 이들 그룹의 이중 주사를 OE에서 발견된 유해 결과로 인해 중단하였으며 절차 및 고용량 부피와 관련된 것으로 간주하였다. 시험 71일 차부터 월 1회 5 mg/눈 그룹에 월 1회 2.5 mg/눈(인간 용량 5 mg과 동등)(월 1회 5/2.5 mg/눈으로 지칭됨)을 투여하였고 격주로 5 mg/눈은 격주로 2.5 mg/눈(격주로 5/2.5 mg/눈으로 지칭함) 용량이었다. 이중 주사를 중단한 이후 이들 용량 그룹(대조군 포함)에서 투여 휴지기가 계속되었으며, 이는 아래에 언급한 바와 같이 절차 및/또는 ADA-관련이었다. 월 1회 2.5mg/눈 그룹(저용량 그룹)에서는 투여 휴지기가 없었다.

[0341] 이 시험은 표준 안전성 매개변수를 포함하였고(전신 조직병리학은 제외) 혈액 샘플을 시험 전반에 걸쳐 수집하였고 TK 및 PD 분석을 위한 말기 유리체 샘플도 수집하였다. ADA 및 안방수 샘플을 수집하고 보관하였다. 또한, 구체에 침착된 면역 복합체의 검출을 위한 OE, IOP, ERG, 안구 조직병리학 및 면역조직화학[immunohistochemistry, IHC]을 평가하였다.

[0342] FabA-관련 변화는 체중, 음식 섭취, 망막전도, 안압 측정 및 임상 병리학에서 기록되지 않았다.

[0343] FabA와 관련된 것으로 간주하는 안구 임상 징후 및 안과 검사 결과는 안구 혼탁(전방, 수정체낭[lens capsule] 및/또는 후방[posterior chamber]의 혼탁으로 인한 것으로 보임) 및 세포 및/또는 색소의 존재로 제한하였다. 혈청에서 ADA가 검출되지 않은 동물(그룹 2 동물 12마리 중 4마리, 그룹 3 동물 12마리 중 2마리, 그룹 4 동물 12마리 중 2마리)에서 이들 결과의 존재는 FabA와의 관계를 나타낸다. ADA 및 잠재적으로 면역 복합체 침착과 관련된 것으로 간주하는 결과는 더 심각한 경향이 있었고 수성 플레어[aqueous flare] 및 유리체 혼탁[vitreal haze]의 존재, 변화된 동공 광 반사[pupillary light reflex] 및 망막 혈관 감쇠를 포함하였다.

[0344] 수컷 및 암컷 원숭이에게 FabA의 IVT 투여 후 혈청 FabA 농도로 측정한 전신 노출은 일시적이고 낮았으며 85일 차 투여 후 86.3 ng/mL를 초과하지 않았거나 169일 차 마지막 투여 후 60.81 ng/mL를 초과하지 않았다. TK는 169일 차까지 FabA를 투여받은 거의 모든 치료받은 동물에서 FabA에 대한 노출을 확인하였고, 이는 투여 휴지기가 있는 일부 동물을 제외하고 유리체 C1q가 검출되지 않는 것과 일치하였다. 10주 무투여 회복 기간 후 242/243일 차에 FabA 유리체 농도는 측정할 수 없었고, C1q 농도는 모든 치료받은 용량 그룹에서 검출 가능하였다. 대조군 동물의 혈청 및 유리체에서 FabA의 부재를 확인하였다.

[0345] 혈청 샘플에서 항-FabA 항체의 존재를 그룹 1(대조군) 동물 12마리 중 4마리, 그룹 2 동물 12마리 중 8마리, 그룹 3 동물 12마리 중 10마리, 그룹 4 동물 12마리 중 10마리에서 확인하였다. 2마리의 그룹 1 동물은 1일차 이후 동물당 단일 시점에서 양성으로 확인된 반면, FabA로 치료받은 ADA-양성 동물은 3 또는 4 이상의 시점에서 확인되었다(주요 시험 동물 및 회복 동물 각각에 대해 총 4개 또는 5개의 샘플을 수집함). 혈청 또는 유리체에서 FabA 노출에 대해 ADA의 명확한 영향은 없었다.

[0346] 184일차의 말기 안락사에서 FabA에 대한 ADA-매개 면역 반응과 일치하는 극미한 변화[microscopic changes]를 월 1회 및 격주로 5/2.5 mg/눈의 오른쪽 눈에서 관찰하였다(각각 중간 용량 및 고용량 그룹). 염증과 관련된 안구 내 변화에는 모양체 및 유리체방의 경미한 혼합 세포 침윤, 유리체방 내 최소에서 중등도의 섬유증(투여 빈도에 비례하는 심각성), 최소에서 경미한 후방 수정체 변성(투여 빈도에 비례하는 심각성)을 포함한다. 각각 격주로 및 월 1회 5/2.5 mg/눈 치료 그룹에서 암컷 한 마리의 후방 망막 내에서 최소 혈관주위 단핵 세포 침윤 또한 관찰하였다. 격주로 및 월 1회 5/2.5 mg/눈 투여된 동물의 눈주위 윤부[periocular limbus] 내에서 최소 내

지 경미한 단핵 세포 침윤을 관찰하였으며, 심각성은 투여 빈도에 비례하였다.

[0347] 242/243일 차의 회복 안락사에서 FabA에 대한 ADA-매개 면역 반응과 관련된 오른쪽 눈의 극미한 변화는 월 1회 5/2.5 mg/눈에서 제한적이고 경미한 반면 추가 변화는 격주로 5/2.5 mg/눈에서 지속되거나 발달하였다. 유리체방 및 포도막의 최소 조직구 침윤 및 유리체방의 증가된 호염기구증가증은 회복 시 격주로 및/또는 월 1회 FabA 5/2.5 mg/눈 투여된 동물에서만 나타났다. 이들 변화는 IVT 주사 절차와 관련된 전방 유리체의 경미한 염증/붕괴와 관련된 것으로 간주되는 말기 부검 시 대조군 동물에서 관찰된 것과 유사하였다. 그러나, 회복 기간 후 이들 변화의 지속, 회복 시 대조군 동물에서 이들 변화의 해결, 격주 및 월 1회 FabA 5/2.5 mg/눈으로 투여된 동물의 말기 부검에서 보다 심각한 염증 변화의 존재는 회복 시 이들 변화가 주사 절차의 지속 효과보다는 FabA에 대한 ADA-매개 면역 반응과 관련된 염증 해결을 더 많이 표시함을 나타냈다. 눈주위 윤부의 최소 단핵 세포 침윤은 격주로 및 월 1회 5/2.5 mg/눈 모두에서 지속되었다.

[0348] 유리체방의 최소 혼합 세포 침윤 및 섬유증은 격주로 5/2.5 mg/눈에서 지속하였고, 중등도의 세포성 감소 및 망막의 헤모시데린 색소[hemosiderin pigment]가 발생하였다. 시신경 원판[optic disk]에서 망막의 최소 혈관주위 단핵 세포 침윤도 격주로 5/2.5 mg/눈에서 관찰하였다. 이들 변화는 또한 FabA에 대한 ADA-매개 반응에 이차적인 것으로 간주하였다.

[0349] 병리학적으로 유해한 극미한 변화는 ADA-매개 염증에 이차적인 것으로 간주하였고 격주 및 월 1회 5/2.5 mg/눈에서 유리체방 내의 섬유증, 수정체 변성 및 망막의 세포성 감소를 포함하였다.

[0350] 말기 또는 회복 안락사에서 월 1회 FabA 2.5 mg/눈과 관련된 극미한 변화는 없었다.

[0351] 그룹 1, 3 및 4로부터 각각 12마리 중 2마리, 12마리 중 4마리 및 12마리 중 6마리에 대해 면역조직화학을 수행하였다. 평가는 IHC를 위해 선택된 월 1회 중간 용량 5/2.5 mg/눈(동물 4마리 중 2마리) 및 격주로 고용량 5/2.5 mg/눈(동물 6마리 중 2마리)으로 치료받은 동물 10마리 중 4마리의 왼쪽 눈 내에 FabA, 원숭이 IgG, IgM 및/또는 C3를 포함하는 면역조직화학적으로 검출된 과립형 침착물의 존재를 밝혔다. 이들 벽내 혈관[intramural vascular] 침착물은 오른쪽 눈의 헤마톡실린(hematoxylin) 및 에오신(eosin) 평가에서 관찰된 것과 유사한 혈관주위 염증성 세포 침윤물과 회합되어 존재하였다. 오른쪽 눈에서 관찰된 다른 극미한 변화는 원숭이의 FabA에 대한 이러한 면역 반응과 관련된 이차적 변화와 일치하였다. 혈청 ADA가 음성인 일부 동물을 포함하여 면역조직화학을 위해 선택된 모든 동물에서 안구 면역 복합체 침착물이 관찰되지는 않았지만 침착물 식별이 조직 절편화[tissue sectioning]에 따라 다를 수 있고 면역 복합체 병리학과 일치하는 극미한 증거에 따라, 혈청 ADA가 동물에 항상 존재하는 것은 아니기 때문에 예상하지 못한 것은 아니다. 또한, 다중 투여 휴지기가 있는 일부 동물의 경우, ADA 및/또는 면역 복합체가 분석 전에 제거되었을 수 있다. 동물의 부분 집합을 비롯하여 면역조직화학적으로 확인된 침착물의 존재는 유사하고 병리학적으로 일관된 병리가 오른쪽 눈에서 관찰되는 것이 FabA에 대한 면역 반응과 관련이 있을 가능성이 있다는 가장 설득력 있는 비중의 증거로 간주하였다.

[0352] 사이노몰구스 원숭이에서의 26주 만성 안구 독성학 시험에서, 유해한 안구 변화는 이중 주사 절차와 연관되었고/되었거나 ADA-매개로 결정되었고 FabA IVT 투여의 직접적인 영향이 아니었으므로 NOAEL은 격주로 또는 월 1회 2.5 mg/눈(인간 용량 5mg과 동등)으로 사이노몰구스 원숭이에게 각각 13 또는 7회 투여로 결정되었다.

[0353] 실시예 9: 임상 시험에서 FabA 평가

[0354] FabA 약물 제품은 IVT 주사를 위한 멸균 등장성 액체이다. 원발성 개방각 녹내장 환자에서 FabA의 단일 IVT 주사의 초기 안전성 및 내약성을 평가하기 위해 1상 인간-최초 공개-표지 용량-증량 시험[A Phase 1 first-in-human, open-label, dose-escalation study] (FabA-GLA-01)를 수행하였다.

[0355] 원발성 개방각 녹내장 환자에서 FabA의 반복적인 IVT 주사의 안전성과 내약성을 평가하기 위해 1b상, 무작위, 이중 맹검 시험(FabA-GLA-02)을 수행하였다.

[0356] 두 시험의 결과에서 FabA IVT의 단일(1 내지 5 mg/눈)(인간 용량 2~10 mg과 동등) 및 반복 용량(2.5 및 5 mg/눈, 4주 간격으로 2회 투여)은 녹내장 환자에서 잘 받아들여졌고, 심각하거나 상당한 이상 사례[adverse event, AE]는 보고되지 않았다. 이들 시험에서 FabA로 치료받은 환자의 안구 AE는 결막 충혈, 결막 출혈 및 눈 자극을 포함하였으며 치료받은 눈에서만 발생하였다. 1b상 시험에서 허위 그룹[Sham group] 환자의 안구 AE는 안구 통증, 눈의 이물감, 안구 충혈 및 시야 흐림을 포함하였다. FabA IVT 치료와 관련된 것으로 간주되는 전신 AE는 발생하지 않았다.

[0357] 2.5 mg(인간 용량 5 mg과 동등) 및 5 mg(인간 용량 10 mg과 동등)의 FabA 단일 IVT 주사는 안방수에서 적어도

29일 동안 유리 C1q를 억제하였다(시험 FabA-GLA-02).

[0358] 인간에서 약동학 및 약력학

[0359] 안구 약동학 및 약력학

[0360] FabA-GLA-02는 PK 및 PD를 평가하기 위해 안방수를 샘플링한 1b상 시험이다. 대상에게 29일 간격으로 2.5 mg/눈 FabA(인간 용량 5 mg과 동등) 또는 눈당 5 mg/눈(인간 용량 10 mg과 동등) FabA를 허위 IVT 주사로 2회 투여하였다. 이 시험에서, 안방수는 두 번째 투여하기 전, 첫 번째 FabA 투여 전 및 투여29일 후에 샘플링하였다. 유리 FabA를 29일차(D29)에 치료받은 모든 환자의 안방수에서 검출하였다. 동시에, 2.5 mg/눈 및 5 mg/눈 FabA의 용량 수준은 둘 다 안방수에서 적어도 29일 동안 유리 C1q를 억제하였다(도 12).

[0361] 전신 약동학 및 약력학

[0362] FabA-GLA-01은 혈청 FabA 및 C1q를 투약 전 및 투약 3시간 후에 샘플링한 단일 투여 1상 시험이다. FabA-GLA-02는 29일 간격으로 각각 2회 투여에 대해 투여 전 및 투여 3시간 후에 혈청 및 FabA 및 C1q를 샘플링하는 다중 투여 1b상 시험이다. FabA는 일반적으로 1상 또는 1b상 임상 시험에서 시험한 임의의 용량 수준에서 단일 또는 반복 IVT 주사 후 전신 순환에서 검출되지 않았다. 유사하게, 순환 유리 C1q의 변화는 어느 시험에서도 발견되지 않았다.

[0363] 다음에 기술된 바와 같이, 5 mg/눈(인간 용량 10 mg과 동등) 용량 수준은 FabA 임상 시험에서 29일 간격으로 1회 또는 2회 투여처럼 잘 받아들여졌다. 위에서 기술한 바와 같이, 1b상 시험에서 2.5 mg(인간 용량 5 mg과 동등) 및 5 mg(인간 용량 10 mg과 동등)의 FabA 단회 용량은 안방수에서 최소 29일 동안 유리 C1q를 억제하였다(도 12).

[0364] 안전성과 유효성

[0365] 1상 용량 증량(FabA-GLA-01)

[0366] 이는 원발성 개방각 녹내장 환자에서 FabA의 단일 IVT 주사의 안전성/내약성 및 PK를 평가하는 1상 공개-표지 용량-증량 시험이었다. 적격 환자[eligible patient]는 신뢰할 수 있는 시야 테스트에서 평균 편차가 3~18 dB인 성인으로, 험프리 시야-분석기 스웨덴 상호 작용 임계값 알고리즘[Humphrey Field Analyzer-Swedish Interactive Threshold Algorithm, HFA-SITA] 24-2를 사용하여 고정 손실에 대한 33% 컷오프와 거짓-양성 반응 비율[false-positive response rate]에 대한 33% 컷오프로 시험 눈에서 신뢰할 수 있는 시야 테스트를 수행할 수 있었던 환자를 의미하며, 이들 환자의 IOP는 투약 전 ≥ 4주 동안 시험 눈의 안정한 IOP 치료 요법에서 < 21 mmHg이었다. 9명의 환자를 3개의 코호트에 할당하였고, 코호트당 3명의 환자를 다음과 같이 등록하였다.

[0367] · 코호트 1 = 1.0 mg/눈, 단회 용량(0.02 mL) × 1회 투여

[0368] · 코호트 2 = 2.5 mg/눈, 단회 용량(0.05 mL) × 1회 투여

[0369] · 코호트 3 = 5.0 mg/눈, 단회 용량(0.10 mL) × 1회 투여

[0370] 스크리닝 이후, 3명의 적격 환자를 가장 낮은 공개 코호트에 등록하였고, 이전의 더 낮은 용량에서 내약성 및 단기 안전성이 입증된 후에만 다음 코호트 등록을 시작하였다. 각 코호트 내의 모든 환자는 다음 코호트의 환자에게 주사할 수 있기 전 최소 15일 간의 안전성 관찰 기간을 완료해야 했다. 시험 기간 동안 용량-제한 독성[dose-limiting toxicity, DLT]은 보고되지 않았다.

[0371] 9명의 환자가 등록, 치료 및 시험을 완료하였다.

[0372] 안전성

[0373] 안구 치료-유발 이상 사례[treatment-emergent adverse event, TEAE]는 결막 충혈(모든 용량 수준), 결막 출혈(2.5 mg/눈만) 및 눈 자극(1 mg/눈만)이 포함하였으며 시험 눈에서만 발생하였다.

[0374] 시험에서 경험한 유일한 전신 TEAE는 부비동염이었다.

[0375] · 모든 TEAE는 중증도가 경증이었다.

[0376] · 심각하거나 유의미한 TEAE는 없었다.

[0377] · TEAE로 인해 치료를 중단하거나 시험을 중단한 환자는 없었다.

[0378] · IOP는 9명 중 9명의 환자에서 30분 이내에 정상으로 돌아왔다(주사 직전 IOP의 5 mmHg 이내 또는 < 21 mmHg).

[0379] · 어떤 환자도 항-FabA 항체의 증거를 보이지 않았다.

[0380] 전반적인 요약/결론:

[0381] 안정한 녹내장 환자에서의 이 시험에서 FabA의 단일 IVT 용량은 5 mg/눈까지 잘 받아들여졌다. 보고된 안구 AE는 승인된 약물의 IVT 투여로 보고된 것과 유사하였다. FabA에 대한 안전성 신호는 관찰되지 않았다.

[0382] FabA는 일반적으로 전신 순환계에서 검출되지 않았고 단일 IVT 투여 후 순환 유리 C1q의 변화는 검출되지 않았다.

[0383] 1b상(FabA-GLA-02)

[0384] 이것은 원발성 개방각 녹내장 환자에게 반복적인 IVT 주사로 투여되는 두 가지 용량 수준인 FabA와 허위 주사를 평가하기 위해 이중 맹검, 무작위화된, 허위-대조 시험이었다. 적격 환자는 신뢰할 수 있는 시야 테스트에서 평균 편차가 3~18 dB인 성인으로, HFA-SITA fast 알고리즘을 사용하여 고정 손실에 대한 33% 컷오프와 거짓-양성 반응 비율에 대한 33% 컷오프로 시험 눈에서 신뢰할 수 있는 시야 테스트를 수행할 수 있었던 환자를 의미하며, 시험 중 IOP 치료에 예상되는 변화는 없는 상태에서 이들 환자의 IOP는 스크리닝 및 1일차에 < 21 mmHg이었고, 주사 전 4주 이상(≥ 4주) 안정한 IOP 치료 요법을 받고 있었다. 환자들은 4주 간격으로 2회 주사를 받았고 총 12주 동안 안전성, 내약성, PK, PD, 면역원성 및 진행 중인 탐색적 평가를 위해 추적되었다. 환자는 다음과 같이 3개의 코호트(코호트당 5명의 환자가 계획됨) 중 하나에 무작위로 할당(1:1:1)되었다.

[0385] · 용량 수준 1 = 2.5 mg/눈, 단회 용량(0.05 mL) × 2회 투여

[0386] · 용량 2 = 5.0 mg/눈, 단회 용량(0.10mL) × 2회 투여

[0387] · 허위 = 0 mg/눈 × 2회 투여

[0388] 18명의 환자가 무작위 배정되었고(2.5 FabA 그룹에 7명, 5.0 mg FabA 그룹에 5명, 허위 그룹에 6명) 17명의 환자를 치료하였다. 2.5 mg 용량 그룹의 한 환자를 무작위 배정하였지만 치료하지 않았다. 16명의 환자가 시험을 완료하였다.

[0389] 안전성

[0390] FabA로 치료받은 환자가 경험한 안구 TEAE에는 결막 충혈(2.5 및 5 mg/눈), 결막 출혈(5 mg/눈만) 및 눈 자극(5 mg/눈만)이 포함되었고, 이들 TEAE 중 어느 것도 허위 그룹의 환자는 경험하지 않았다. 허위 그룹의 안구 TEAE는 눈 통증, 눈 이물감, 안구 충혈 및 시야 흐림을 포함하며 각각 1명의 환자에서 발생하였다.

[0391] 이 시험에서 전신 TEAE를 경험하였고, 어느 것도 조사자에 의한 시험 치료와 관련된 것으로 간주되지 않았다.

[0392] · 모든 TEAE는 중증도가 경증이었다.

[0393] · 보고된 TEAE 중 하나를 제외한 모든 TEAE는 시험 치료의 첫 번째 투여 후, 두 번째 투여 전에 발생하였다.

[0394] · 심각하거나 유의미한 TEAE는 없었다.

[0395] · TEAE로 인해 치료를 중단하거나 시험을 중단한 환자는 없었다.

[0396] · IOP는 IVT 주사 후 17명 중 16명의 환자에게서 30분 이내에, 나머지 환자는 45분 이내에 정상(< 21 mmHg)으로 돌아왔다.

[0397] · FabA가 유리체강 내 투여된 11명의 환자 중 6명의 환자가 적어도 한 시점 동안 양성 반응을 보였다. 1명의 환자는 시간에 따라 역가가 완만하게 증가한 ADA 양성이었고, 나머지 5명의 환자는 투여 전을 포함하여 시간에 따른 역가의 변화 없이 모든 시점에서 양성이었다. 한 명의 허위 환자는 투여 전을 포함하여 시간에 따른 역가의 변화 없이 모든 시점에서 ADA 양성이었다. 함께, 이들 데이터는 ADA 측정과 FabA 투여 사이의 불분명한 관계를 시사한다.

[0398] 전반적인 요약/결론:

[0399] 안정한 녹내장 환자에서 4주 간격으로 FabA의 2회 IVT 투여는 5 mg/눈까지 잘 받아들여졌다. 보고된 안구 AE는 승인된 약물의 IVT 투여로 보고된 것과 유사하였다. 이 시험에서, FabA에 대한 안전성 신호는 관찰되지 않았다.

[0400] FabA IVT의 단일 용량(2.5 및 5 mg/눈)은 적어도 29일 동안 안방수에서 유리 C1q를 억제하였다.

[0401] 실시예 10: 연령 관련 황반 변성[AMD]에 대한 2차 지도모양 위축[GA] 환자에게 유리체강 내 주사에 의해 투여된 FabA의 유효성, 안전성 및 내약성에 대한 2상 다기관, 무작위, 병렬-그룹, 이중 맹검, 4-군, 허위-대조군 시험이다.

[0402] 이론적 근거:

[0403] 간단한 요약:

[0404] 이 시험은 AMD에 대한 2차 GA 환자를 대상으로 진행하였다. 이 시험의 목적은 12개월 동안 매월[every month, EM] 1회 또는 격월로[every other month, EOM] 1회의 FabA의 유리체강 내[IVT] 주사가 GA 병변 성장 속도를 감소시키는지 결정하는 것이다. 이 시험은 30일의 스크리닝 기간과 12개월의 치료 기간, 이후 6개월의 (치료 중단) 추적 기간으로 구성되어 있다. 총 환자 참여 기간은 총 19개월이다. 환자는 치료 및/또는 안전성 평가를 위해 12개월 치료 기간 동안 매달 클리닉을 방문한다.

[0405] 약 240명의 환자를 등록하고 무작위로 4개의 치료군 중 하나에 할당하여 약 204명의 환자를 12개월차에 1차 분석을 위해 평가할 수 있다(1차 분석은 수정된 치료-의향[intent-to-treat, ITT]에 기초함).

[0406] 개입 그룹 및 기간:

[0407] 시험 개입 할당은 무작위 배정(2:2:1:1)을 기반으로 한다. 환자를 다음 치료군 중 하나에 배정한다. 용량 수준은 고정되어 있으며 수정되지 않는다.

[0408] • 1군 = FabA 5.0 mg/눈(0.10 mL) 12개월 동안 매월[EM] 1회(12회 투여)

[0409] • 2군 = FabA 5.0 mg/눈(0.10 mL) 12개월 동안 격월로[EOM] 1회(6회 투여)

[0410] • 3군 = 12개월 동안 허위 주사 EM(12회 허위 주사)

[0411] • 4군 = 12개월 동안 허위 주사 EOM(6회 허위 주사)

[0412] 주사

[0413] FabA/허위 주사 투여는 무균 기법을 사용하여 의사의 주사에 의해 완료된다.

[0414] FabA에 무작위 배정된 모든 환자는 12개월 동안 매월 1회 또는 격월로 1회 5.0 mg/눈 IVT(0.10 mL의 고정 용량)를 받는다.

[0415] 주사 후

[0416] 약물 투여 직후, 주사를 수행하는 의사는 손동작 시력[hand motion vision] 또는 중심 망막 동맥 관류 시각화를 평가한다. 필요한 경우, 유리체 출혈과 같은 다른 시력 손실 원인을 배제한다. 필요한 경우, 디지털 마사지를 수행하고 손동작 시력 또는 중심 망막 동맥 관류가 관찰될 때까지 국소/구강 IOP 저하 약물을 투여한다.

[0417] IOP(안압측정)는 약물 투여 30분 후에 시험 안구에서만 평가하고, 상승한 경우, IOP < 25 mmHg가 될 때까지 매 15분마다 평가한다.

[0418] 약동학, 약력학 및 면역원성

[0419] PK(FabA 혈청 농도) 및 PD 평가(혈청 C1q 농도 및 다른 바이오마커의 혈장 농도)를 위한 혈액 샘플을 투여 30분 전 및 투여 3시간(±15분) 후에 방문 시 수집한다.

[0420] 면역원성 검사(ADA)를 위한 샘플은 현장 방문 동안 주사 전 수집한다. 또한, ADA 샘플은 2주차에 현장에서 또는 의료진의 가정 방문 시 수집한다.

[0421] 약동학: 이 검사에는 혈청이 필요하다. FabA의 혈청 농도 측정을 위해 혈액 샘플을 수집한다.

[0422] 약력학: 이 검사에는 혈청과 혈장이 필요하다. C1q의 혈청 농도 및 탐색적 보체 바이오마커의 혈장 농도를 분석한다.

[0423] 면역원성: 이 검사에는 혈청이 필요하다. 면역원성은 혈청 항-약물(FabA) 항체[anti-drug (FabA) antibody, ADA]의 분석으로 평가한다.

[0424] 유리체강 내 주사 절차

[0425] FabA 제제

[0426] 19 게이지(gauge) × 1-1/2 인치, 5 미크론, 필터 바늘을 갖는 멸균 1.0 cc 주사기를 사용하여 FabA의 멸균 바이알에서 FabA의 전체 부피(약 0.3 mL)를 꺼낸다.

[0427] 필터 바늘을 30 게이지 × 1/2 인치 주사 바늘로 교체한다. 주사기에 필요한 주입량만 남기고 주입 직전에 주사기에서 FabA의 과잉 부피를 배출한다.

[0428] FabA의 용량 부피는 12개월 동안 매월[EM] 1회(12회 투여) 또는 12개월 동안 격월[EOM] 1회(6회 투여) 0.10 mL로 고정한다.

[0429] 유리체강 내 주사를 위한 준비

[0430] 1. 시험 눈을 확인한다.

[0431] 2. 주사 전에 시험 눈에서 수술 전 안압[IOP]을 측정하고 기록한다. 시험 눈에서만 안압 측정을 수행한다. 진행하려면 IOP가 ≤ 21 mmHg여야 한다. IOP가 > 21 mmHg인 경우, FabA 주사 일정을 변경하고 조사자의 재량에 따라 IOP를 관리한다.

[0432] 3. 필요한 경우, 주사 후 후극[posterior pole]을 시각화할 수 있도록 주사 30분 전에 시험 눈에 2.5% 국소 페닐에프린 하이드로클로라이드 안과 용액 1방울을 적용한다.

[0433] 4. 주사 직전:

[0434] • 목이 잘 받쳐진 상태의 환자를 검사 의자에 등을 대고 눕게 한다.

[0435] 유리체강 내 주사

[0436] 1. 주사 시, 손씻기, 멸균장갑, 및 수술용 마스크가 필요하다.

[0437] 2. 국소 프로파라케인 0.5%를 시험 눈에 도포한다.

[0438] 3. 속눈썹과 눈꺼풀 가장자리에 포비돈-아이오딘 10%를 도포한다. 마이봄선[meibomian gland] 발현을 피하기 위해 주사 전 또는 후에 눈꺼풀의 광범위한 마사지를 피한다.

[0439] 4. 절차가 진행되는 동안 눈꺼풀을 의도한 주사 부위에서 멀리 당긴다. 검경[speculum]을 사용하는 것이 좋다.

[0440] 5. 의도한 주사 부위를 포함하여 결막 표면에 포비돈-아이오딘 5%를 도포한다.

[0441] 6. FabA를 사용한 주사의 경우: 공막에 수직으로, 수직 및 수평 직근 사이에서 윤부 후방 3.5~4 mm 지점에 바늘을 삽입한다. 유리체 역류를 줄이기 위해 바늘을 제거한 직후 주사 부위에 멸균 면봉 어플리케이터를 적용한다.

[0442] 7. 허위 주사 : 허위 주사의 준비 및 주사 후 관리는 FabA 주사와 동일하다. 허위 주사는 주사바늘이 없는 빈 주사기의 끝이 뭉툭한 끝을 사용하여 일반적인 유리체강 내 주사 위치에서 눈에 압력을 가하여 수행된다.

[0443] 유리체강 내 주사 후

[0444] 1. 환자는 안구 평가 및 안전성 추적을 위해 주사 후 진료소에 남아 있어야 한다.

[0445] 2. 손동작 시력이나 중앙 망막 동맥 관류를 즉시 평가하고 유리체 출혈과 같은 시력 손실의 다른 원인을 배제한다. 필요한 경우, 디지털 마사지를 수행하고 손동작 시력 또는 중앙 망막 동맥 관류가 관찰될 때까지 국소/구강 IOP 저하 약물을 투여한다.

[0446] 3. 주사 후 30분에만 시험 눈에서 IOP 측정값을 얻고, 상승한 경우, IOP < 25 mmHg가 될 때까지 매 15분마다 측정값을 얻는다. 안압이 15분 이상 30 mmHg를 초과하는 경우 의사의 재량에 따라 치료해야 한다.

[0447] 4. 국소 항생제가 필요하지 않다.

[0448] 실시예 11: C1q는 광수용체 변성의 광 손상 모델에서 광수용체 시냅스의 미세아교세포 가지치기를 매개한다

[0449] 항-C1q 치료제(예를 들어, Mab3)는 광 손상 모델에서 망막 보체 수준을 감소시키고(도 5a~5d), 염증을 감소시키고(도 13a 및 13b), 신경퇴행을 감소시킨다(도 13a 및 13c~13d). 도 13a~13d는 면역형광[IF] 데이터를 보여준다. 도 13b는 치료 후 3일 차에 망막의 외망상층[outer plexiform layer, OPL](외부 시냅스 층이라고도 함) 내

감소된 미세아교증을 보여준다. 미세아교증의 감소는 염증 감소와 관련이 있다. 도 13c는 광수용체 시냅스의 유의한 보존을 보여주고 도 13d는 처리 후 5일 차에 세포체의 유의한 보존을 보여준다. 치료 후 보존된 광수용체 시냅스 및 세포체의 측정은 항-C1q 치료제를 사용한 치료가 이러한 광 손상 모델에서 신경변성을 감소시킨다는 것을 입증한다.

[0450] 실시예 12: 항 C1q 유리체강 내 치료는 rd10 마우스 모델에서 망막 보체 성분 수준을 감소시켰다

[0451] 측정 가능한 치료(예를 들어, Mab3) 수준은 항-C1q 치료를 받은 동물의 망막 용해물에서 발견하였지만 IgG1 치료 또는 비치료 그룹에서는 발견하지 못했다(도 14a). WT와 비교하여, 치료되지 않은 동물 및 IgG d10 동물의 망막 용해물에서 고전적인 보체 성분 C1q의 증가된 수준이 확인되었다(도 14b). 항-C1q 처리는 IgG1 처리 및 미처리 rd10 군과 비교하여 망막 용해물에서 감소된 C1q 수준을 초래하여(도 14b), 망막에서(그리고 혈장에서, 데이터는 미도시됨) 양호한 측정 가능한 PK 및 C1q 결속을 확인하였다. 도 15a는 면역형광 이미지의 정량화를 나타내는 막대 그래프이고, 도 15b는 C1q 억제제로 치료 시 광수용체 시냅스(BSN 마커)의 보존을 입증하는 면역형광 이미지를 보여준다. 이것은 광수용체 시냅스 보호의 증거이다.

[0452] **참조에 의한 포함**

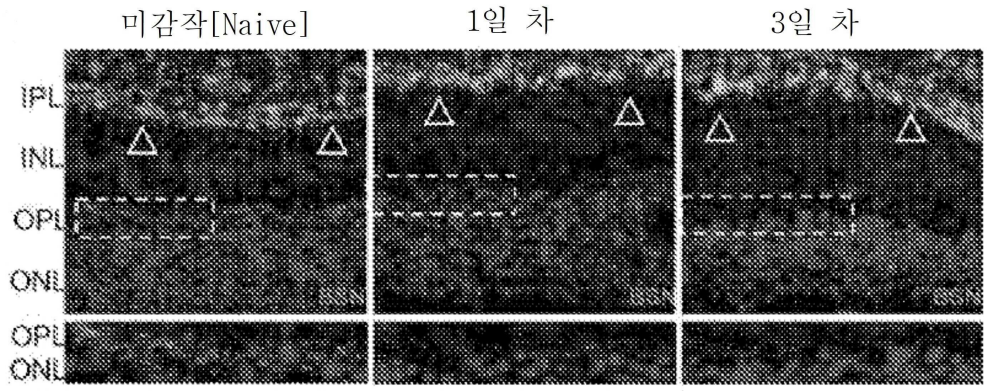
[0453] 본원에 인용된 각 특허, 공개 특허 출원 및 비특허 참고 문헌은 그 전체가 참조로 본원에 포함된다.

[0454] **균등물**

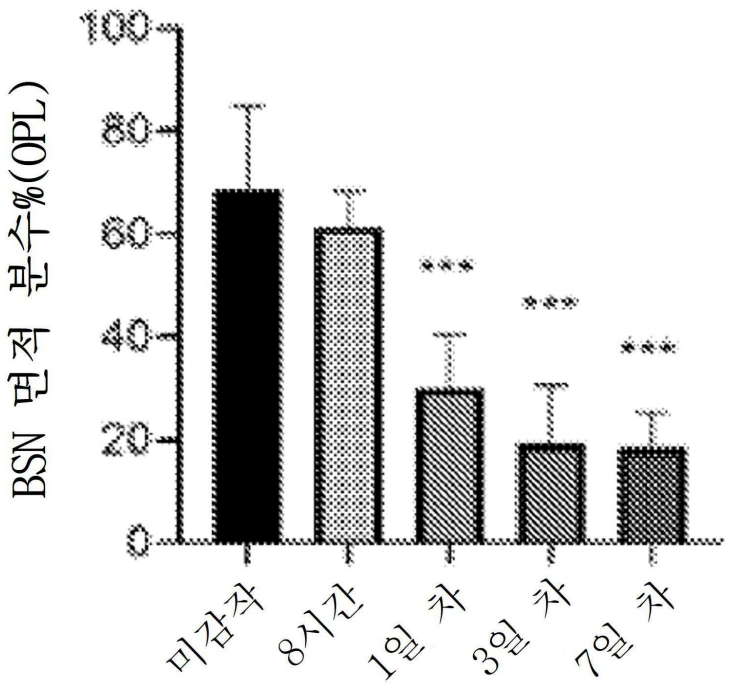
[0455] 당업자는 본원에 기재된 본 발명의 특정 구현예와 동등한 다수의 균등물을 사용하는 것을 인식하거나 또는 일상적인 실험을 사용하여 확인할 수 있다. 이러한 균등물은 하기 청구항에 포함하는 것으로 의도된다.

도면

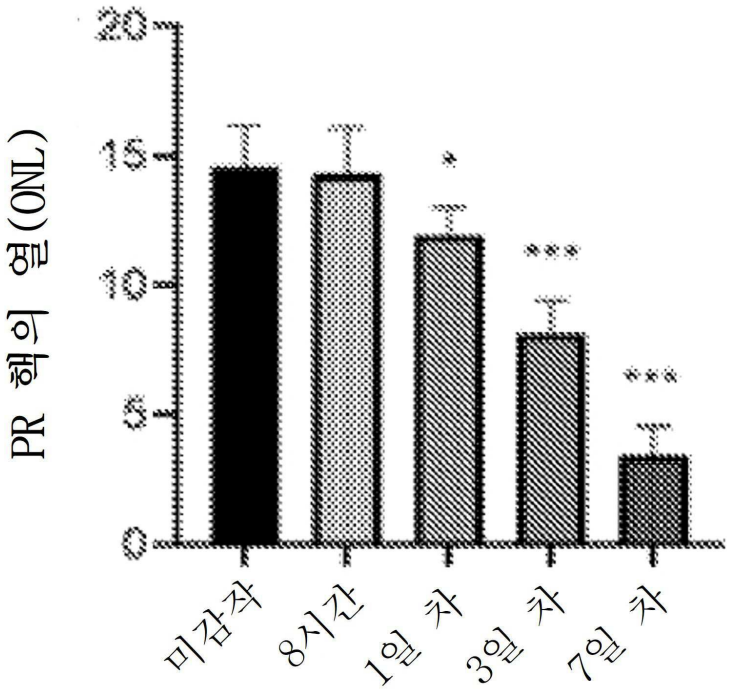
도면1a



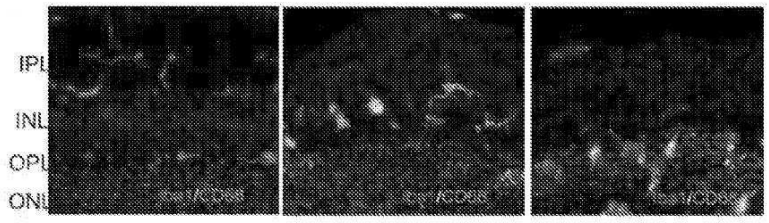
도면1b



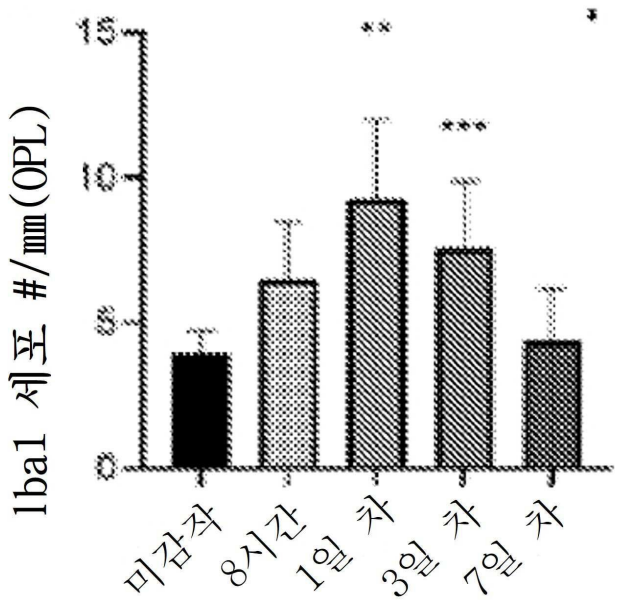
도면1c



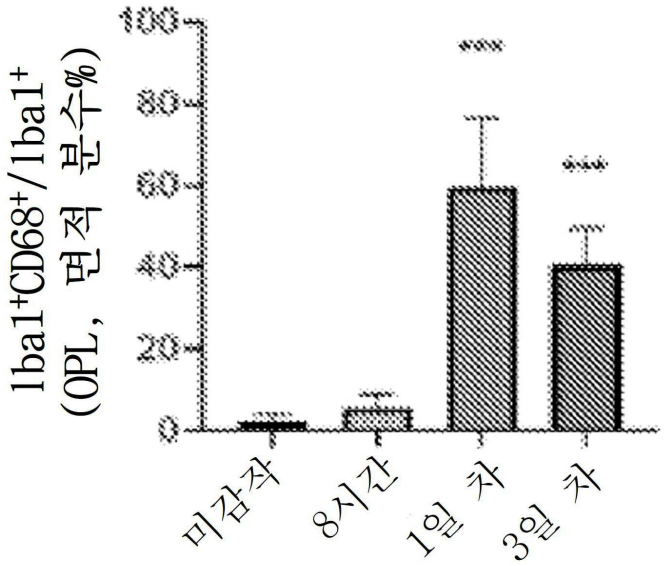
도면1d



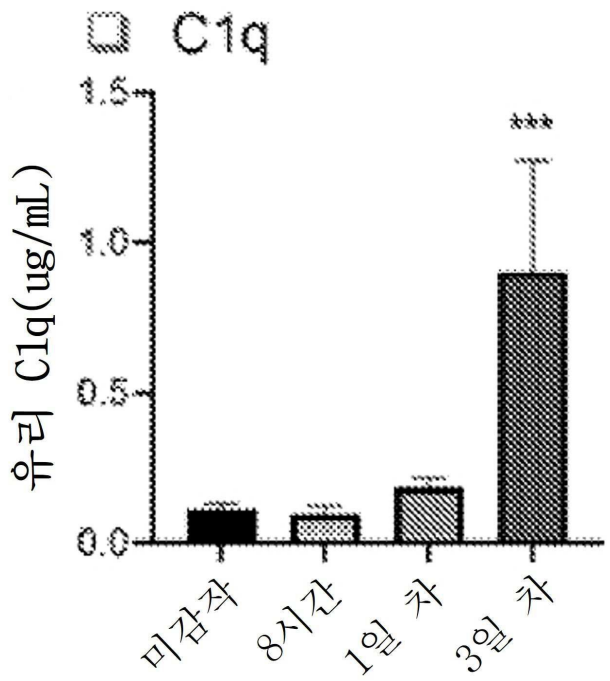
도면1e


Iba1 세포 #/㎟(OPL)
15
10
5
0
**
***
*
미감작
8시간
1일 차
3일 차
7일 차

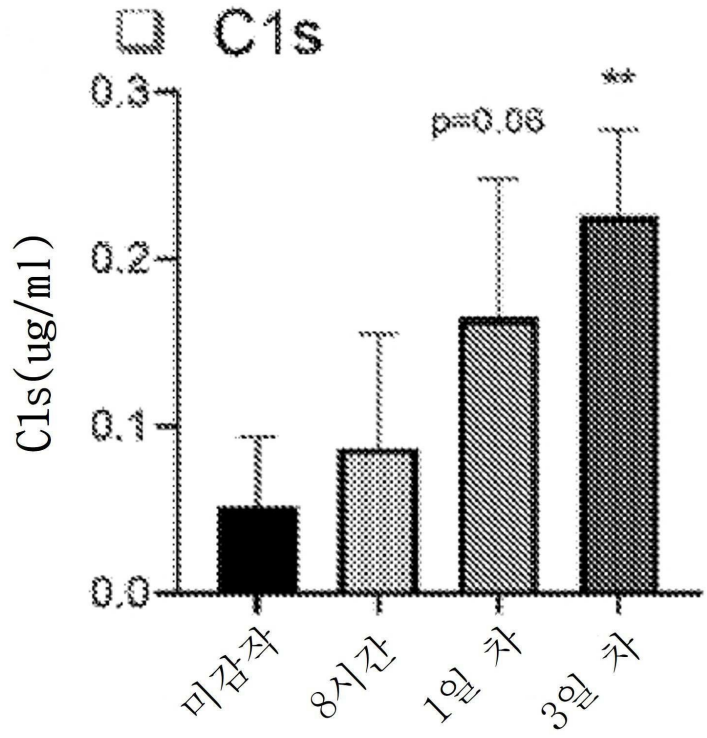
도면1f


Iba1+CD68+/Iba1+
(OPL, 면적 분수%)
100
80
60
40
20
0
****
****
미감작
8시간
1일 차
3일 차

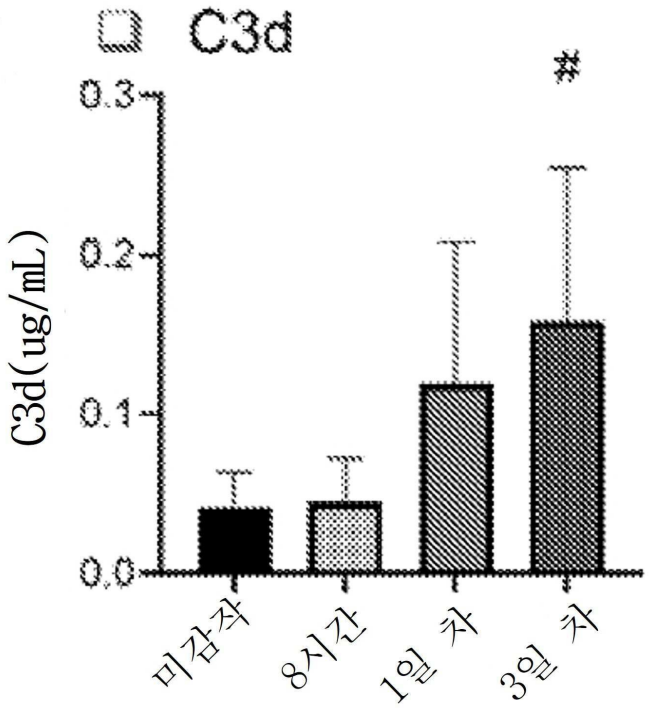
도면2a



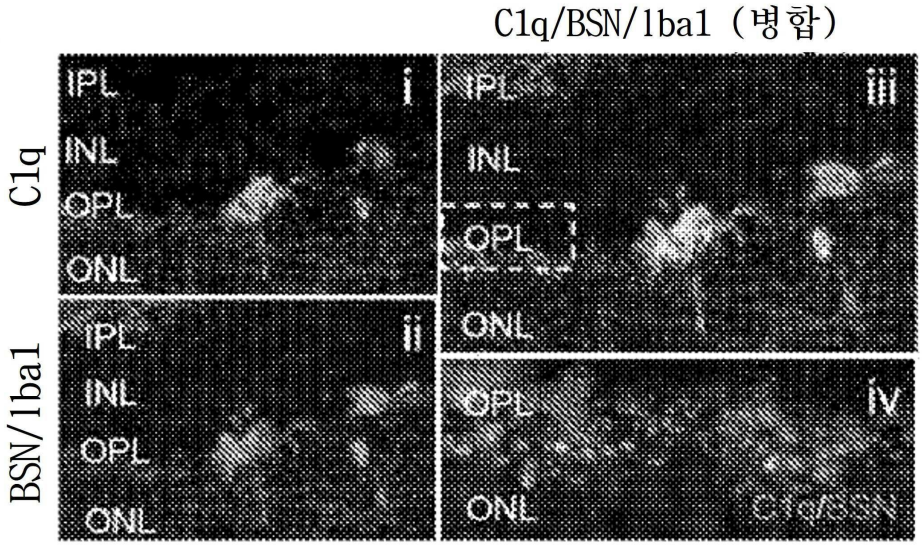
도면2b



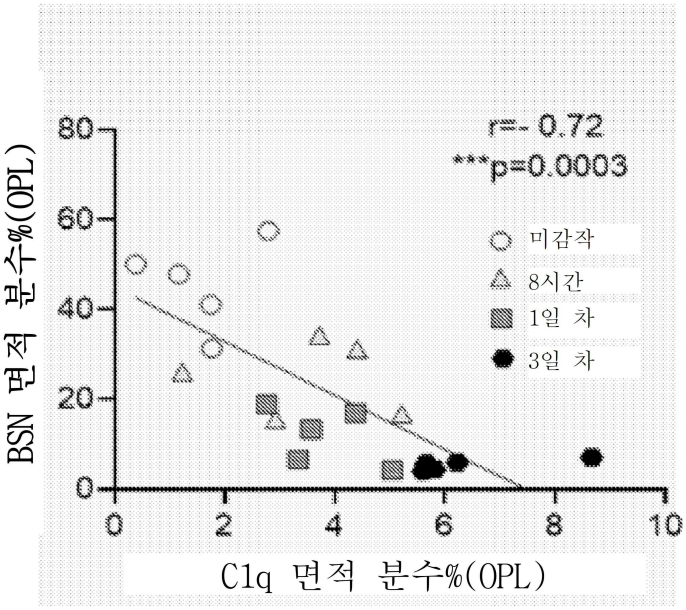
도면2c


C3d
#
0.3
0.2
0.1
0.0
C3d(ug/mL)
미감작
8시간
1일 차
3일 차

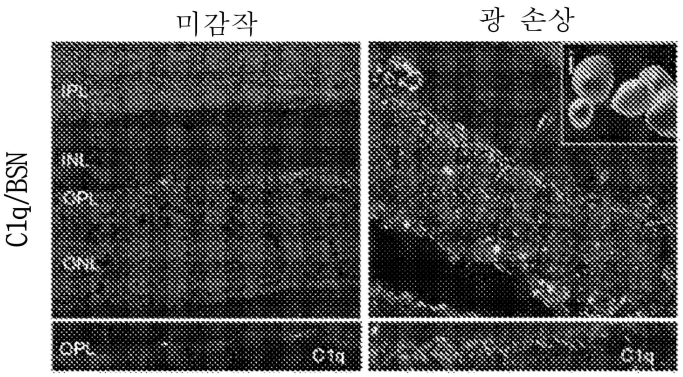
도면2d


C1q/BSN/1ba1 (병합)
C1q
BSN/1ba1
IPL
INL
OPL
ONL
i
ii
iii
iv

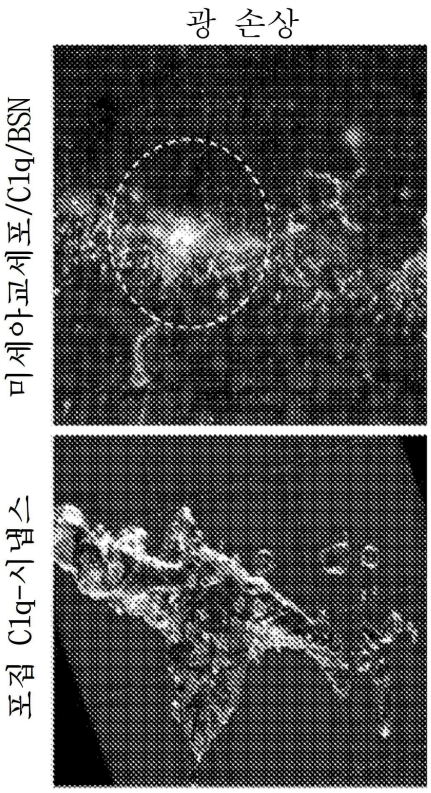
도면2e


r=-0.72
***p=0.0003
미감작
8시간
1일 차
3일 차
BSN 면적 분수%(OPL)
C1q 면적 분수%(OPL)
0
20
40
60
80
0
2
4
6
8
10

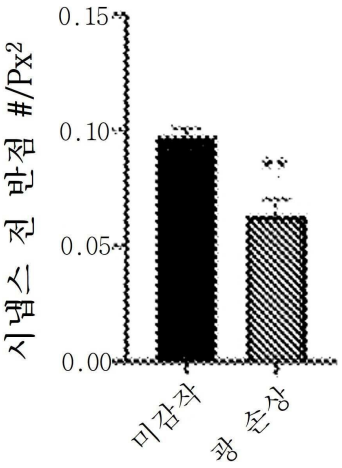
도면3a


미감작
광 손상
C1q/BSN
IPL
INL
OPL
ONL
OPL
C1q
C1q

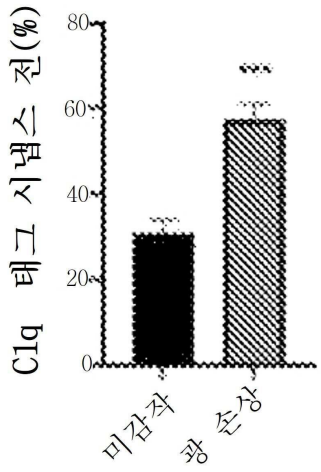
도면3b


광 손상
미세아교세포/C1q/BSN
포집 C1q-시냅스

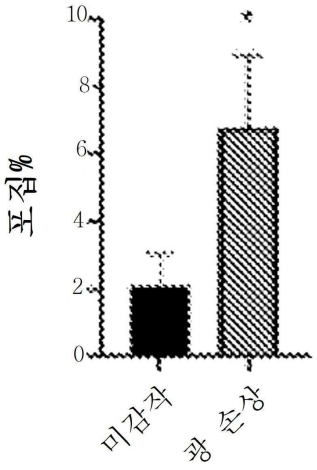
도면3c


0.15
0.10
0.05
0.00
시냅스 전 반점 #/Px²
미감작
광 손상

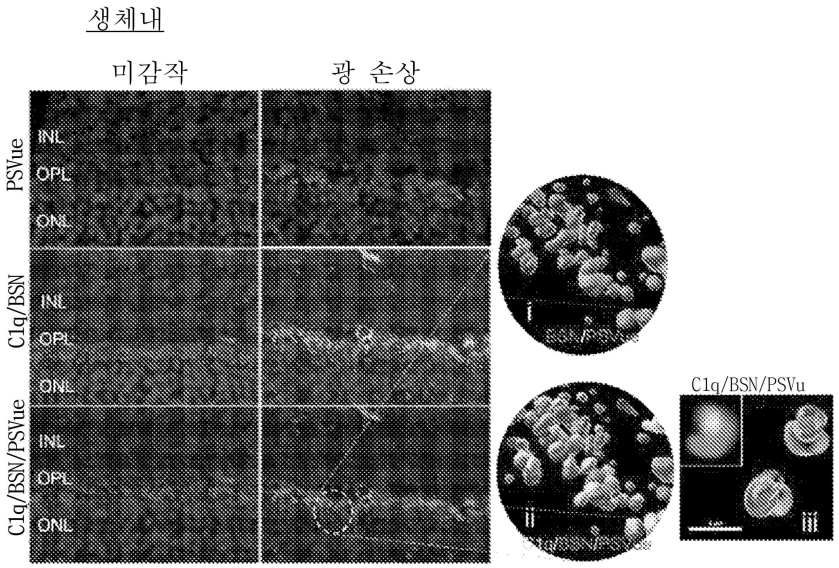
도면3d



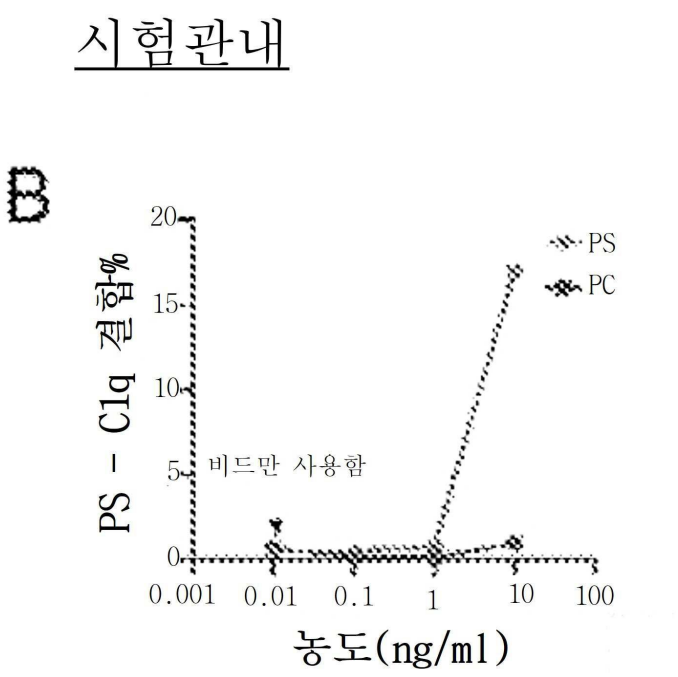
도면3e



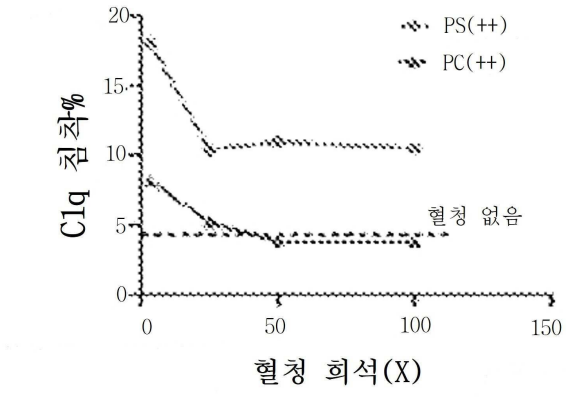
도면4a


생체내
미감작
광 손상
PSVue
C1q/BSN
C1q/BSN/PSVue
INL
OPL
ONL
C1q/BSN/PSVu
i
ii
iii

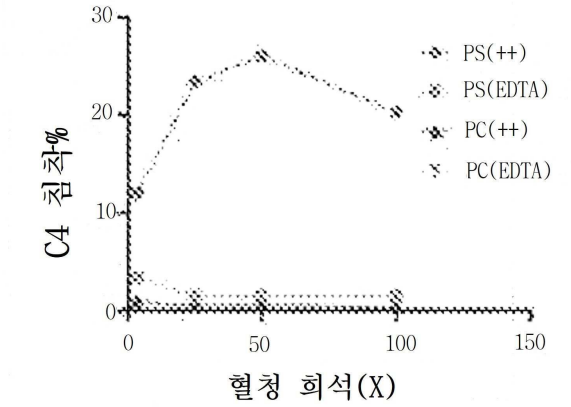
도면4b


시험관내
B
PS - C1q 결합%
20
15
10
5
0
비드만 사용함
PS
PC
0.001
0.01
0.1
1
10
100
농도(ng/ml)

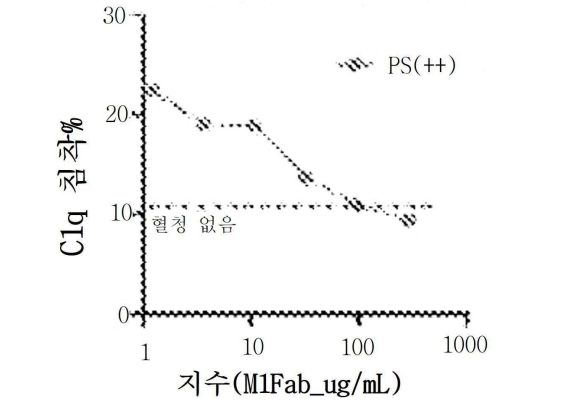
도면4c



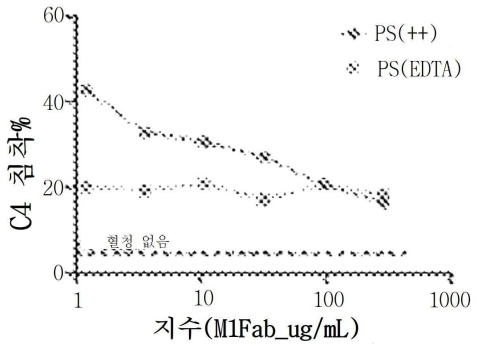
도면4d



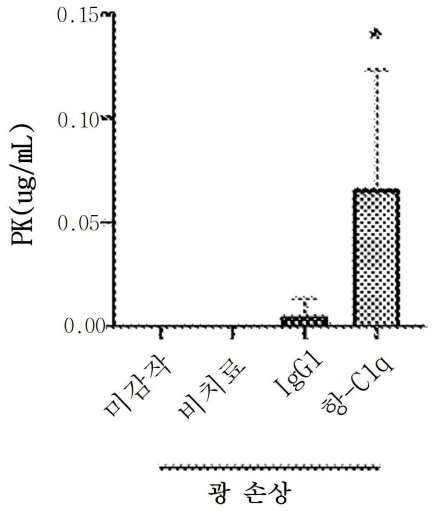
도면4e



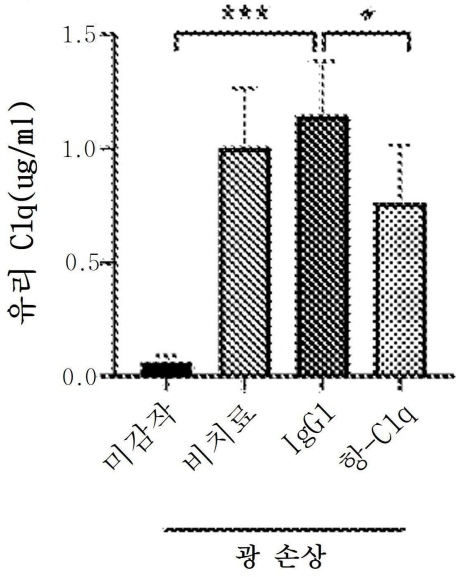
도면4f


60
40
20
0
C4 침착%
PS(++)
PS(EDTA)
혈청 없음
1
10
100
1000
지수(M1Fab_ug/mL)

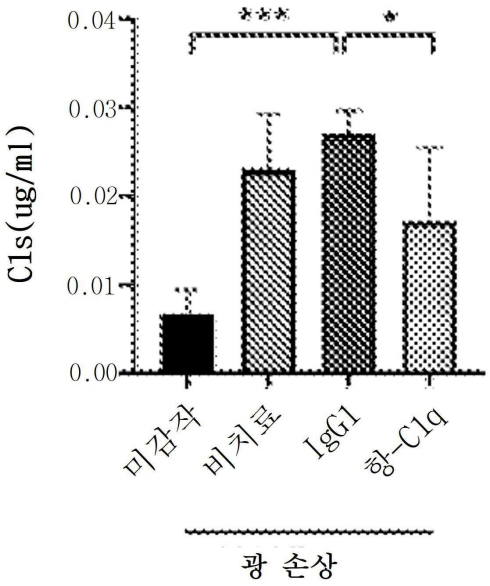
도면5a


0.15
0.10
0.05
0.00
PK(ug/mL)
미감작
비치료
IgG1
항-C1q
광 손상

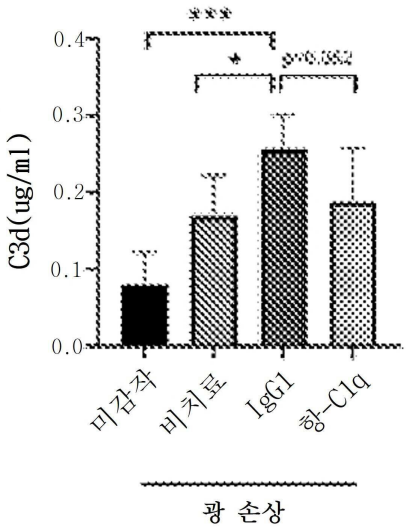
도면5b


***
*
1.5
1.0
0.5
0.0
유리 C1q(ug/ml)
미감작
비치료
IgG1
항-C1q
광 손상

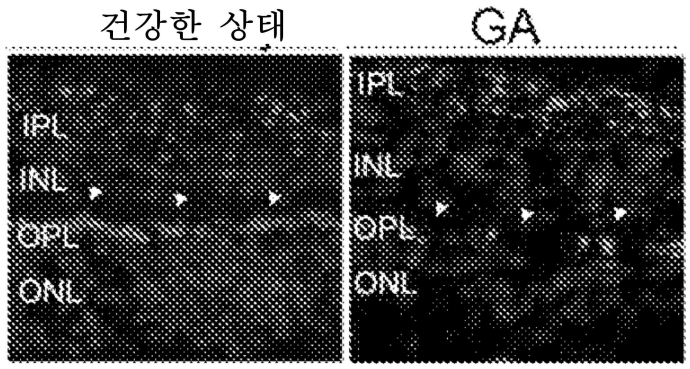
도면5c


***
*
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
C1s(ug/ml)
미감작
비치료
IgG1
항-C1q
광 손상

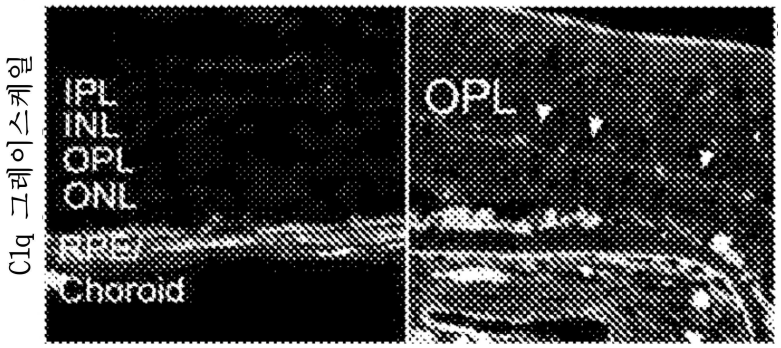
도면5d



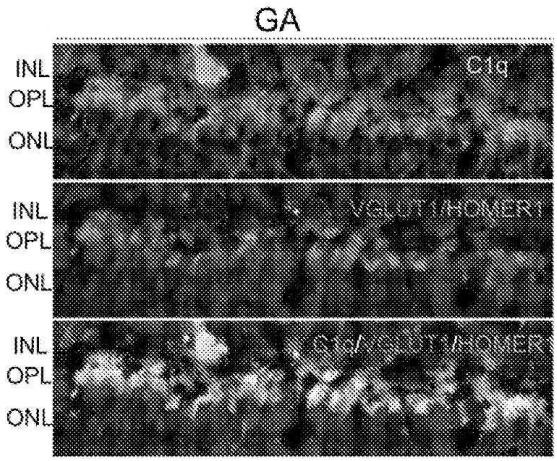
도면6a



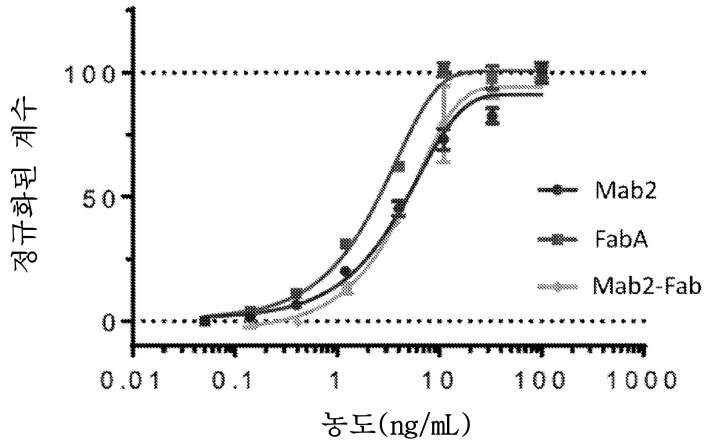
도면6b



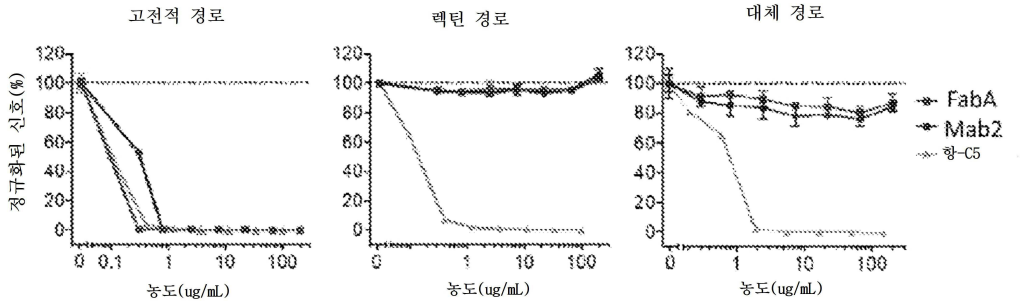
도면6c


GA
INL
OPL
ONL
C1q
INL
OPL
ONL
VGLUT1/HOMER1
INL
OPL
ONL
C1q/VGLUT1/HOMER1

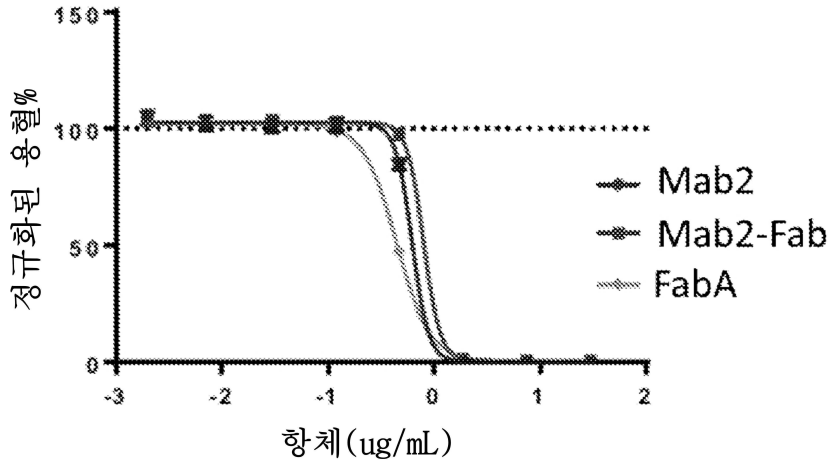
도면7


정규화된 계수
100
50
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
농도(ng/mL)
Mab2
FabA
Mab2-Fab

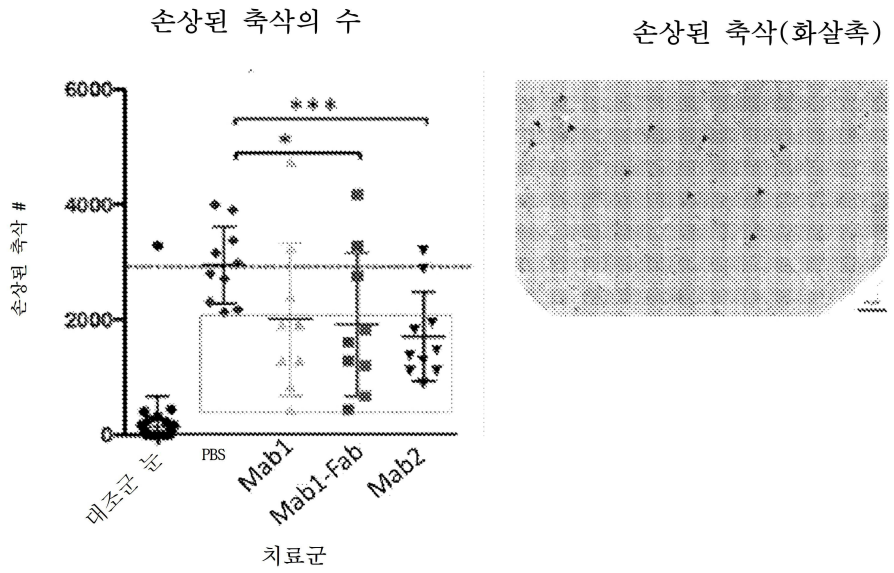
도면8


고전적 경로
렉틴 경로
대체 경로
정규화된 신호(%)
120
100
80
60
40
20
0
0 0.1 1 10 100
농도(ug/mL)
FabA
Mab2
항-C5

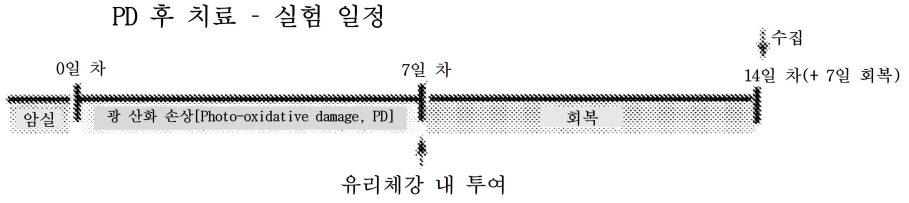
도면9



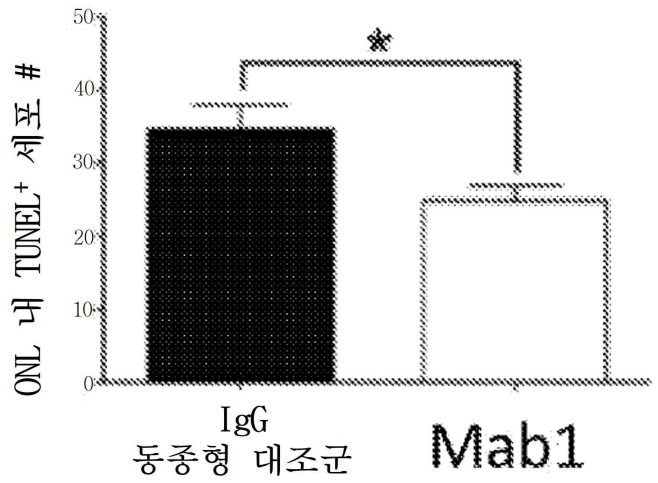
도면10



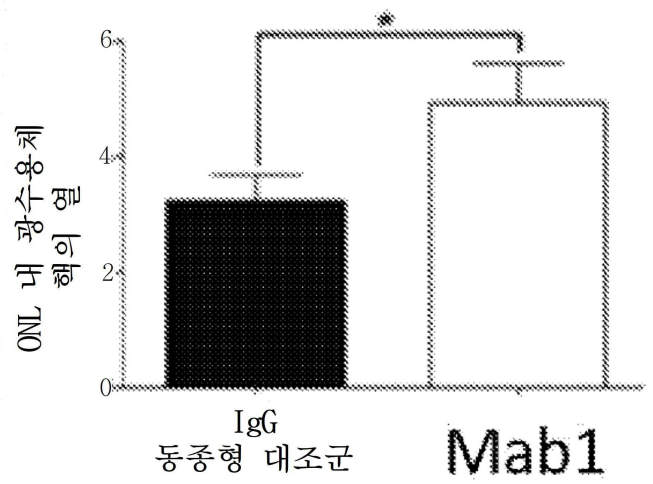
도면11a



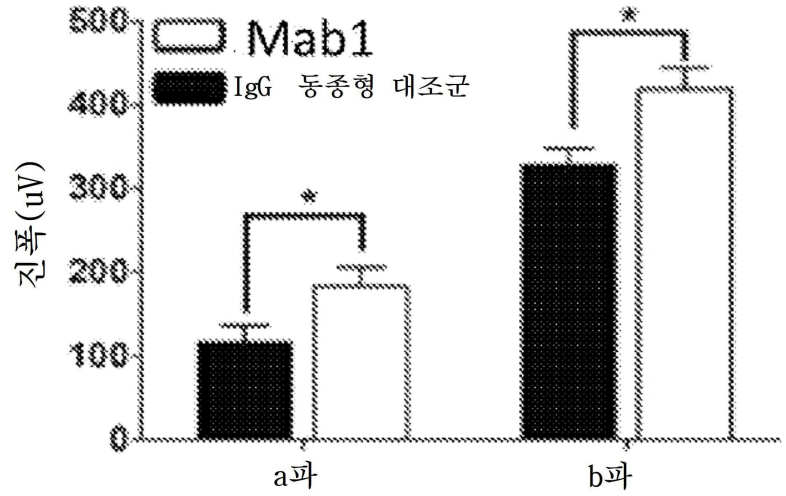
도면11b


ONL 내 TUNEL+ 세포 #
50
40
30
20
10
0
*
IgG
동종형 대조군
Mab1

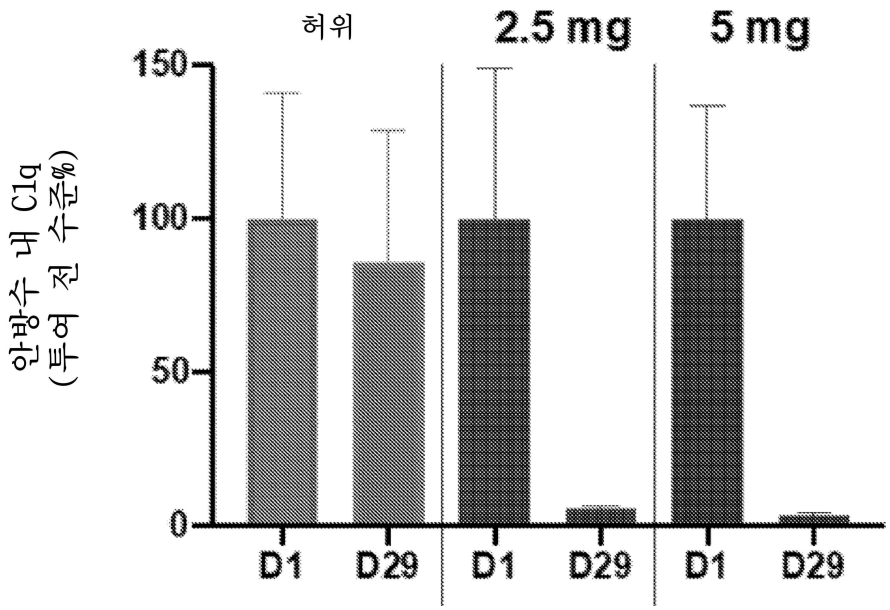
도면11c


ONL 내 광수용체 핵의 열
6
4
2
0
*
IgG
동종형 대조군
Mab1

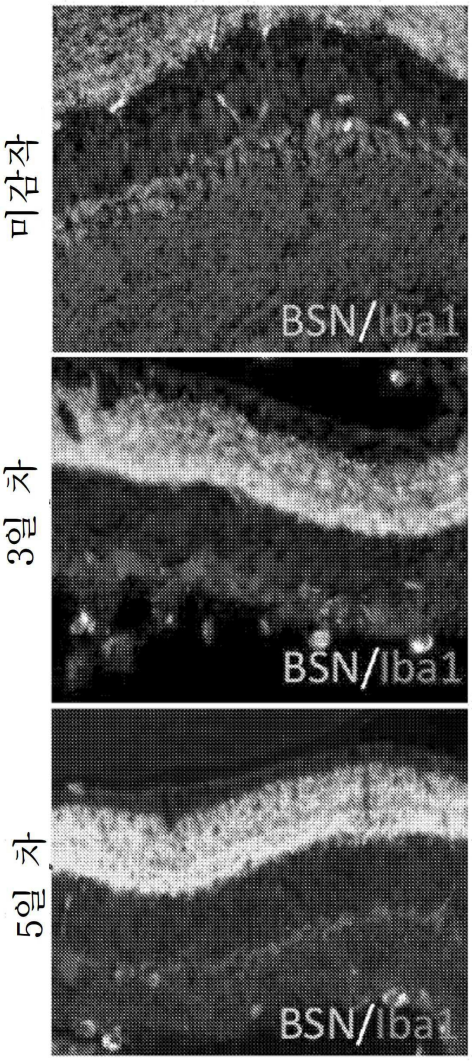
도면11d


Mab1
IgG 동종형 대조군
진폭(uV)
500
400
300
200
100
0
*
*
a파
b파

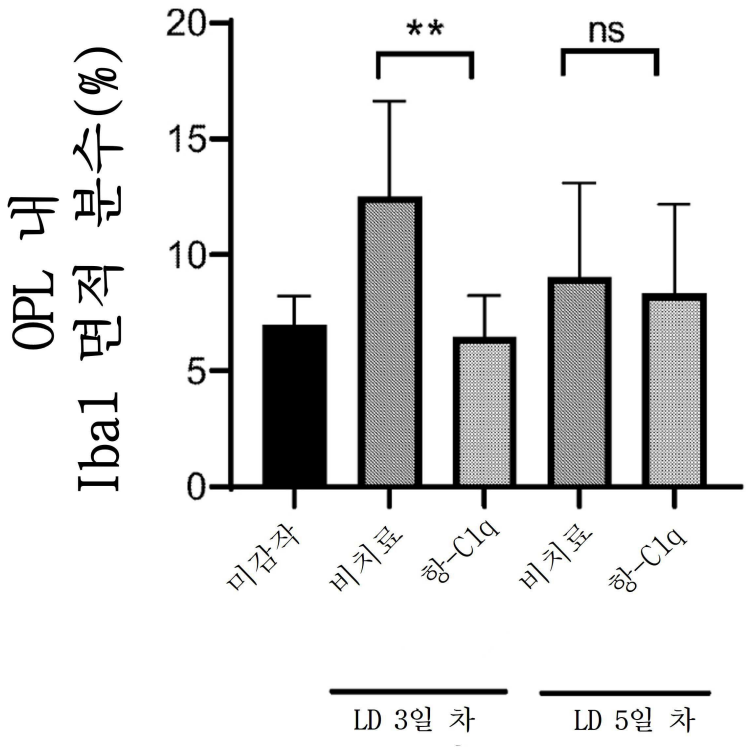
도면12


허위
2.5 mg
5 mg
안방수 내 C1q
(투여 전 수준%)
150
100
50
0
D1
D29
D1
D29
D1
D29

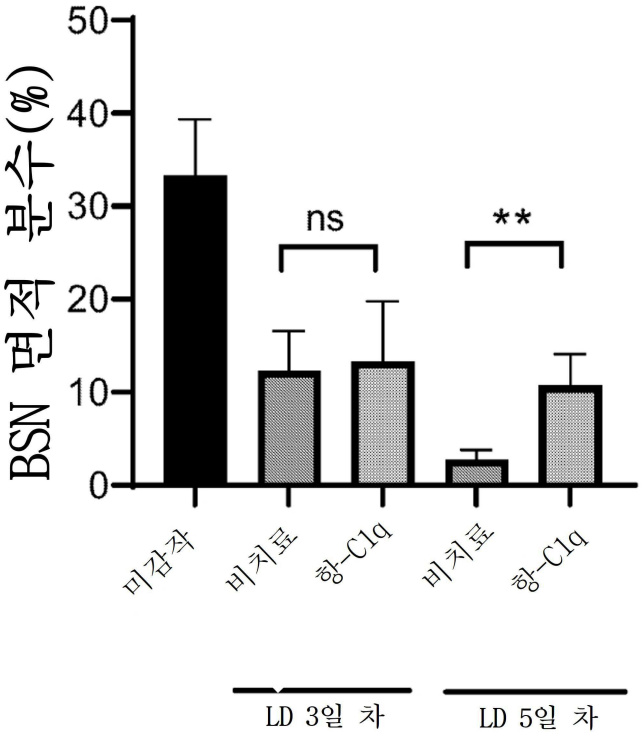
도면13a



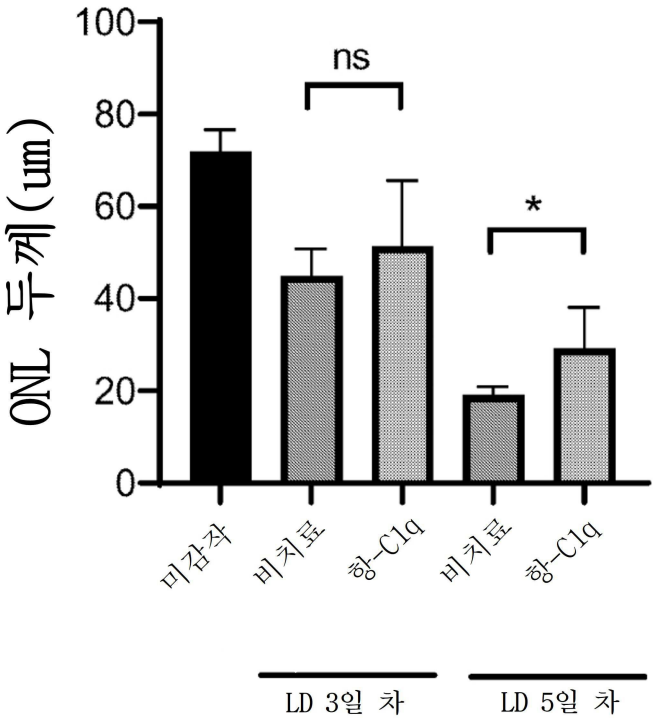
도면13b


OPL 내
Iba1 면적 분수(%)
20
15
10
5
0
**
ns
미감작
비치료
항-C1q
비치료
항-C1q
LD 3일 차
LD 5일 차

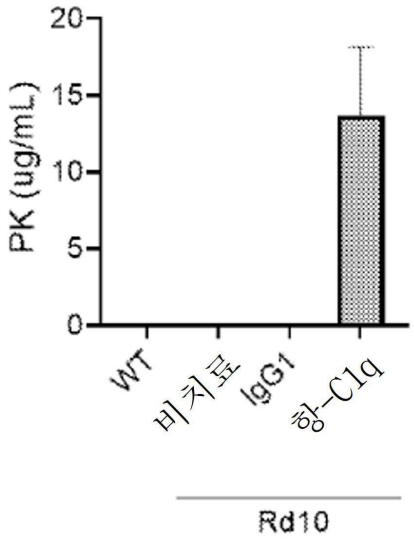
도면13c


BSN 면적 분수(%)
50
40
30
20
10
0
ns
**
미감작
비치료
항-C1q
비치료
항-C1q
LD 3일 차
LD 5일 차

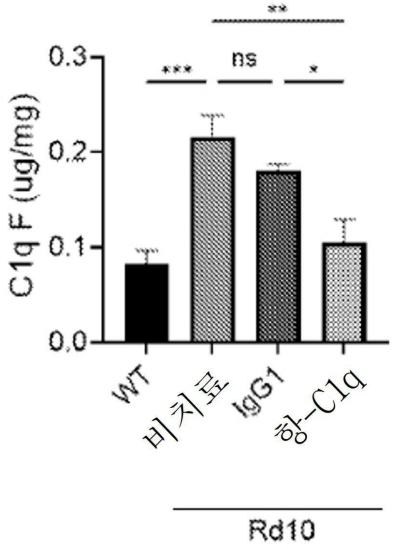
도면13d


100
80
60
40
20
0
ONL 두께(um)
ns
*
미감작
비치료
항-C1q
비치료
항-C1q
LD 3일 차
LD 5일 차

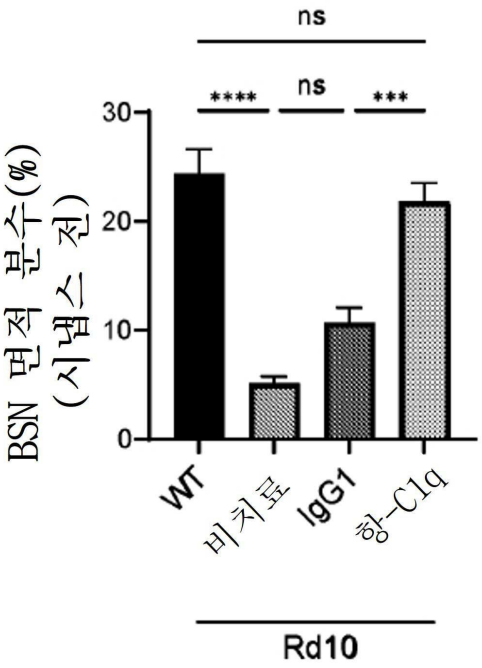
도면14a


20
15
10
5
0
PK (ug/mL)
WT
비치료
IgG1
항-C1q
Rd10

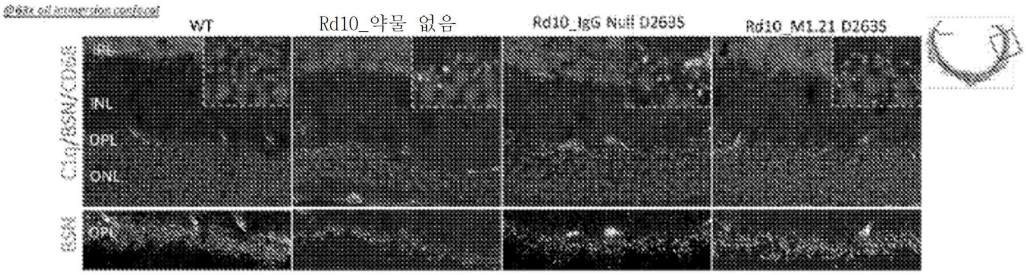
도면14b


**
***
ns
*
0.3
0.2
0.1
0.0
C1q F (ug/mg)
WT
비치료
IgG1
항-C1q
Rd10

도면15a


ns
****
ns
***
30
20
10
0
BSN 면적 분수(%)
(시냅스 전)
WT
비치료
IgG1
항-C1q
Rd10

도면15b


WT
Rd10_약물 없음
Rd10_IgG Null D2635
Rd10_M1.21 D2635
C1q/BSA/CD68
INL
OPL
ONL
BSA
OPL

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.