



공개특허 10-2019-0138650



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0138650
(43) 공개일자 2019년12월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	(71) 출원인
A61K 38/17 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)	볼루션 이뮤노 파마슈티컬스 에스에이 스위스, 3461-1211 제네바, 플레이스 데스 오 비 브 6
(52) CPC특허분류	(72) 발명자
A61K 38/1767 (2013.01)	웨스턴-데이비스 원 에이치 영국, 첼트넘 지엘54 4이에프, 살퍼톤, 로즈뱅크
A61K 45/06 (2013.01)	(74) 대리인
(21) 출원번호 10-2019-7031685	손민
(22) 출원일자(국제) 2018년04월20일	
심사청구일자 없음	
(85) 번역문제출일자 2019년10월25일	
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/060239	
(87) 국제공개번호 WO 2018/193120	
국제공개일자 2018년10월25일	
(30) 우선권주장	
1706398.3 2017년04월21일 영국(GB)	
1706406.4 2017년04월21일 영국(GB)	

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 반흔성 안구 염증성 장애의 치료를 위한 코버신

(57) 요 약

본 발명은 반흔성 안구 염증성 장애, 특히 쇼그렌 증후군, 점막 유천포창 또는 아토피성 각결막염을 치료 또는 예방하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 상기 방법은 이러한 반흔성 안구 염증성 장애를 앓고 있는 환자의 눈에 코버신-타입 단백질을 함유하는 조성물, 바람직하게는 광학적으로 허용되는 조성물을 적용, 바람직하게는 국소 적용함을 포함한다.

(52) CPC특허분류

A61K 9/0048 (2013.01)

A61P 27/02 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

반흔성 안구 염증성 장애를 앓고 있거나 앓을 위험이 있는 환자에게 도 2에 나타낸 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질 또는 이의 기능적 등가물을 함유하는 조성물을 적용함을 포함하여, 반흔성 안구 염증성 장애, 특히 쇼그렌 증후군, 점막 유천포창 또는 아토피성 각결막염을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 조성물이 광학적으로 허용되는 조성물이고 조성물이 환자의 눈에 국소 적용되는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 눈을 기준의 항히스타민제로 치료함을 추가로 포함하는 방법.

청구항 4

반흔성 안구 염증성 장애를 앓고 있거나 앓을 위험이 있는 환자에게 조성물을 적용함으로써 반흔성 안구 염증성 장애, 특히 쇼그렌 증후군, 점막 유천포창 또는 아토피성 각결막염을 치료 또는 예방하는 방법에서 사용하기 위한, 도 2에 나타낸 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질 또는 이의 기능적 등가물을 함유하는 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 광학적으로 허용되는 조성물이고 환자의 눈에 국소 적용되는 조성물.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 기준의 항히스타민제를 추가로 포함하는, 제4항 또는 제5항에 명시된 용도를 위한 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중의 어느 한 항에 있어서, 환자가 인간인 방법 또는 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중의 어느 한 항에 있어서, 도 2에 나타낸 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질의 기능적 등가물이 서열 번호 2의 아미노산 19 내지 168의 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 단백질이고,

상기 단백질이 C5에 결합하여 전환효소에 의한 보체 C5a 및 보체(complement) C5b로의 보체 C5의 절단을 방지하고/하거나 LTB4에 결합하는 방법 또는 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중의 어느 한 항에 있어서, 도 2에 나타낸 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질의 기능적 등가물이 서열 번호 2의 아미노산 19 내지 168의 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 단백질이고,

상기 단백질이 C5에 결합하여 전환효소에 의한 보체 C5a 및 보체 C5b로의 보체 C5의 절단을 방지하고/하거나 LTB4에 결합하는 방법 또는 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중의 어느 한 항에 있어서, 도 2에 나타낸 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지

168을 포함하는 단백질의 기능적 등가물이 최대 10개의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실이 이루어진 서열 번호 2의 아미노산 19 내지 168의 서열을 포함하는 단백질이고,

상기 단백질이 C5에 결합하여 전환효소에 의한 보체 C5a 및 보체 C5b로의 보체 C5의 절단을 방지하고/하거나 LTB4에 결합하는 방법 또는 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중의 어느 한 항에 있어서, 도 2에 나타낸 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질의 기능적 등가물이 제8항 내지 제10항 중의 어느 한 항에 정의된 바와 같은 단백질의 단편이고,

상기 단백질이 C5에 결합하여 전환효소에 의한 보체 C5a 및 보체 C5b로의 보체 C5의 절단을 방지하고/하거나 LTB4에 결합하는 방법 또는 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중의 어느 한 항에 있어서, 기능적 등가물이 C5 및 LTB-4 둘 다에 결합하는 능력을 갖는 방법 또는 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중의 어느 한 항에 있어서, 도 2에 나타낸 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질의 기능적 등가물이 RaCI 단백질 또는 C5에 대한 항체인 방법 또는 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제12항 중의 어느 한 항에 있어서, 도 2에 나타낸 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질의 기능적 등가물이 (a) 서열 번호 2의 아미노산 19 내지 168의 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 서열, 및 (b) 제2 서열을 포함하는 융합 단백질이고,

상기 단백질이 C5에 결합하여 전환효소에 의한 보체 C5a 및 보체 C5b로의 보체 C5의 절단을 방지하고/하거나 LTB4에 결합하는 방법 또는 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 제2 서열이 PAS 서열인 방법 또는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 쇼그렌 증후군, 점막 유천포창 및 아토피성 각결막염과 같은 반흔성 안구 염증성 장애를 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.

[0002]

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

배경 기술

[0003]

보체(complement)

[0004]

보체 시스템은 외래 침입에 대한 신체의 자연 방어 기전의 필수 부분이며 염증 과정에도 관여한다. 혈청 및 세포 표면에서의 30개 이상의 단백질이 보체 시스템의 기능 및 조절에 관여한다. 최근, 유리한 과정 및 병리학적 과정 둘 다와 관련될 수 있는 보체 시스템의 대략 35개의 알려진 성분은 물론, 보체 시스템 자체가 혈관신생, 혈소판 활성화, 글루코스 대사 및 정자형성과 같은 다양한 기능을 가진 적어도 85개의 생물학적 경로와 상호작용한다는 것이 자명해졌다.

[0005]

보체 시스템은 외래 항원의 존재에 의해 활성화된다. 세 가지 활성화 경로가 존재한다: (1) IgM 및 IgG 복합체에 의해 또는 탄수화물의 인식에 의해 활성화되는 고전 경로; (2) (특정 조절 분자가 결핍된) 비-자기 표면에 의해 및 박테리아 내독소에 의해 활성화되는 대체 경로; 및 (3) 병원체의 표면 상의 만노스 잔기에의 만난-결합

렉틴 (MBL)의 결합에 의해 활성화되는 렉틴 경로. 세 가지 경로는 세포 표면 상의 유사한 C3¹ 및 C5 전환효소의 형성을 통해 보체 활성화를 야기하여, 염증의 급성 매개체 (C3a 및 C5a)의 방출 및 막 공격 복합체 (MAC)의 형성을 초래하는 사건들의 평행 캐스케이드를 포함한다. 고전 경로 및 대체 경로에 관련된 평행 캐스케이드가 도 1에 나타내어져 있다. [¹ "C3"이 보체 시스템의 세 번째 성분을 지칭하도록 문자 "C"와 그 뒤에 "3"과 같은 숫자로 보체 경로의 성분을 지칭하는 것이 통상적이다. 이들 성분 중 일부는 보체 시스템의 활성화 동안 절단되고 절단 산물은 숫자 뒤에 소문자로 제공된다. 따라서, C5는 통상적으로 C5a 및 C5b로 표지되는 단편으로 절단된다. 보체 단백질은 반드시 이들의 숫자 순서대로 작용할 필요는 없으므로, 그 숫자가 반드시 작용 순서를 나타내는 것은 아니다. 이러한 명명 규칙이 본 출원에서 사용된다.].

[0006] 고전 보체 경로, 대체 보체 경로 및 렉틴 보체 경로를 본원에서 집합적으로 보체 경로라고 한다. C5b는 보체 활성화의 '말기' 이벤트를 개시한다. 이들은 말단 보체 성분이 상호작용하여 MAC을 형성하는 일련의 종합 반응을 포함하며, 이것은 일부 병원체의 세포막에 기공을 생성하여 이들의 사망을 초래할 수 있다. 말단 보체 성분은 C5b (막 공격 복합체의 조립을 개시함), C6, C7, C8 및 C9를 포함한다.

쇼그렌 증후군

[0008] 쇼그렌 증후군은 자가면역 질환이다. 신체의 면역계는 눈물샘 및 침샘과 같은 체액을 분비하는 샘을 공격한다. 쇼그렌 증후군의 영향은 광범위할 수 있다. 특정 샘에 염증이 생겨 눈물과 타액의 생성이 줄어들어 눈이 건조하고 입이 마르는 쇼그렌 증후군의 주요 증상을 유발한다. 여성 (가장 흔하게 영향을 받음)에서, 질을 촉촉하게 유지하는 샘이 또한 영향을 받아 질 건조증을 유발할 수 있다.

[0009] 구강 건조증은 충치, 잇몸 질환, 마른 기침, 연하 및 저작 곤란, 쉰 목소리, 말하기 어려움, (턱과 귀 사이에 위치한) 타액선 부종 및 입안의 반복된 곰팡이 감염 (구강 야구창), 설태 및 백태를 포함할 수 있는 증상과 같은 다른 관련 증상을 유발할 수 있다.

[0010] 안구 건조증은 타는 듯하거나 찌르는 듯한 눈, 가려운 눈, 눈에 칙칙한 느낌, 자극되고 부은 눈꺼풀, 광에 대한 민감 (광선공포증), 피곤한 눈 및 눈으로부터의 점액 분비물을 야기할 수 있다. 이러한 증상들은 바람이 불거나 연기가 자욱한 환경, 에어컨이 설치된 건물 또는 비행기를 타고 여행할 때 악화될 수 있다.

[0011] 더욱 심각한 경우의 쇼그렌 증후군에서는, 면역계가 신체의 다른 부위를 공격하여, 피부 건조증, 권태 및 피로와 같은 증상 및 병태를 유발할 수 있으며, 이것은 일반적이며 기진 맥진, 근육통, 관절통, 강직 및 붓기, 혈관염 (혈관의 염증) 및 집중, 기억 및 추론의 곤란을 야기할 수 있다.

[0012] 쇼그렌 증후군은 신체를 감염이나 질병으로부터 보호하는 대신 면역계가 비정상적으로 반응하여 건강한 세포와 조직을 공격하기 시작한다는 점에서 자가면역 질환이다. 쇼그렌 증후군에서, 면역계는 신체 전반에 걸쳐 눈물과 침샘 및 기타 분비샘 (외분비샘)을 공격한다. 자가면역 반응은 외분비샘을 손상시키며 이들이 더 이상 정상적으로 기능하지 못하게 할 수 있다. 면역계가 또한 이러한 샘을 제어하는 신경을 손상시키고, 이것이 이들의 효과를 더욱 감소시킨다는 몇 가지 증거들이 있다. 면역계는 근육, 관절, 혈관, 신경 및, 덜 일반적으로, 기관과 같은 신체의 다른 부분을 손상시키는 것으로 나아갈 수 있다. 이에 대한 이유는 알려져 있지 않지만, 연구들은 이것이 유전적, 환경적 및, 아마도, 호르몬 인자의 조합에 의해 유발됨을 시사한다.

[0013] 일부 사람들은 태어날 때 증후군에 더 취약하며 감염과 같은 특정 사건이 면역계의 문제를 유발할 수 있다고 생각한다.

[0014] 대부분의 연구자들은 원발성 쇼그렌 증후군이 유전적 및 환경적 인자의 조합에 의해 유발된다고 믿는다. 어떤 사람들은 이들이 결함 면역계에 더욱 취약하게 만드는 특정 유전자를 갖고 태어난다. 그후, 수년 후, 환경 인자, 아마도 일반 바이러스가 면역계가 제대로 작동하지 못하게 한다. 여성 호르몬 에스트로겐이 또한 역할을 하는 것으로 보인다. 쇼그렌 증후군은 주로 여성에서 발생하며 증상은 통상적으로 에스트로겐 수준이 떨어지기 시작하는 폐경기 경에 시작된다. 에스트로겐 수준이 떨어지면 건조에 기여할 수 있으며 이러한 건조함이 병태를 더욱 두드러지게 만들 수 있다.

[0015] 쇼그렌 증후군은 류마티스 관절염 또는 루푸스와 같은 다른 자가면역 병태와 관련될 수 있다. 이것은 이차 쇼그렌 증후군으로 알려져 있다.

[0016] 침샘 및 눈물샘은 입과 눈을 보호하는데 필수적인 역할을 하며, 이것이 쇼그렌 증후군의 증상이 광범위하고 번거로울 수 있는 이유이다. 눈물은 통상적으로 울때만 눈에 띠지만, 눈은 항상 눈물 막으로 알려진 얇은 층의

눈물로 덮여 있다. 눈물은 물, 단백질, 지방, 점액 및 감염과 싸우는 세포의 혼합물로 구성된다. 눈물은 몇 가지 중요한 기능을 한다. 이들은 눈을 윤활시키고 눈을 깨끗하고 면지가 없게 유지하며 눈을 감염으로부터 보호하고 시력을 안정시키는데 도움을 준다.

[0017] 침은 또한 입과 목을 자연적으로 윤활 상태로 유지하고, 음식을 적셔 소화를 돋고, 특정 전분을 분해할 수 있는 효소를 제공하고 자연 소독제로서 작용함을 포함하는 몇 가지 중요한 기능을 제공한다 (침은 항체, 효소 및 단백질을 함유하여 일부 일반 세균 및 곰팡이 감염으로부터 보호한다).

[0018] 쇼그렌 증후군은 때로는 합병증을 야기할 수 있다. 쇼그伦 증후군은 림프선의 암인 비호지킨 림프종의 발병 위험을 증가시킨다. 쇼그렌 증후군이 있는 여성은 일시적 "루푸스" 발진 또는 심장 이상이 있는 아이를 가질 위험이 증가한다. 잠재적인 문제에 대해 임신을 면밀히 모니터링해야 한다. 특히, 감소된 눈물 생산이 치료되지 않으면 시력이 영구적으로 손상될 수 있다. 게다가, 쇼그렌 증후군이 안구 건조증을 유발하는 일부 경우에는, 호중구 및 기타 면역 세포가 눈, 특히 결막 및 각막의 환부로 이동하여 만성 섬유화 염증을 유발하는 세포-매개 면역 반응이 있으며, 이것은 눈을 영구적으로 손상시킬 수 있다.

[0019] 쇼그렌 증후군은 가장 일반적으로 40-60세의 사람들에게 영향을 미치며, 여성이 사례의 약 90%를 차지한다. 관절염 연구 UK는 영국에서 쇼그렌 증후군을 가진 사람이 50만 명에 이를 수 있다고 추정한다.

[0020] 쇼그렌 증후군은 다른 병태와 유사한 증상을 가지며 이에 대한 단일 검사가 없기 때문에 진단하기가 어려울 수 있다.

[0021] 쇼그렌 증후군에 대한 치료법은 현재 없지만 치료가 증상을 조절하는데 도움이 될 수 있다. 안구 건조증 및 구강 건조증은 통상적으로 인공 눈물과 침으로 도움을 받을 수 있다. 감염의 발병 위험이 더욱 높기 때문에 양호한 눈과 구강 위생을 유지하는 것이 중요하다. 눈과 구강을 관리하는 것은 각막 궤양 및 충치와 같은 문제를 예방하는데 도움이 될 수 있다. 이러한 치료는 통상적으로 증후군의 증상만을 치료하며 증후군의 근본 원인에는 영향을 미치지 않는다. 현재, 눈의 세포-매개 염증을 예방 또는 감소시키는 효과적인 국소 치료법은 없다.

[0022] 따라서, 쇼그렌 증후군에 의해 야기되는 눈의 세포-매개 손상을 치료 또는 예방하는 방법을 제공할 필요가 있다.

반흔성 안구 염증성 장애

[0024] 흉터가 눈에 대한 세포-매개 손상에 의해 야기되고 특히 결막 및 각막에 영향을 미치는, 눈의 만성 흉터를 유발할 수 있는 다수의 다른 장애들이 있다. 특정 장애는 점막 유천포창 및 아토피성 각결막염 (예를 들어 스테로이드 내성 아토피성 각결막염)이다. 이들은 또한 이식편 대 숙주 증후군 안구 건조증, 건성각 결막염, 아토피성 각결막염, 안검 각결막염, 다년 각결막염, 안구 홍반 루푸스, 안 주사(Ocular rosacea), 트라코마, 세균성, 바이러스성 또는 진균성 각막염, 안구 단순 포진 또는 대상 포진, 유전성 및 외상성 원추각막을 포함하지만 이에 제한되지 않는 원추각막, 색소성 망막염, 미숙아 망막염, 다운 증후군, 골형성 부전증, 애디슨병, 레베르 선천성 흑내장, 엘러스-단로스 증후군, 지도-점-지문 각막 이영양증, 푸크스 각막 이영양증, 격자 각막 이영양증, 광각막염, 전포도막염 및 익상편을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 장애에 대한 효과적인 국소 치료법 또한 없다.

[0025] 쇼그렌 증후군, 점막 유천포창 및 아토피성 각결막염을 포함한 상기 언급된 장애, 및 호중구 및/또는 다른 면역계 세포와 같은 세포가 눈, 특히 결막 및 각막으로 이동하여 눈에 흉터 손상을 야기하는 임의의 다른 장애를 본원에서 "반흔성 안구 염증성 장애"라고 한다.

보체 억제제

[0027] 제WO 2004/106369호 (Evolutec Limited)는 보체 억제제에 관한 것이다. 개시된 보체 억제제의 특정 서브세트는 C5에 지시되어 C5가 보체 활성화 경로 중의 어느 하나에 의해 C5a 및 C5b로 절단되는 것을 방지한다. 이러한 C5 절단의 억제제의 특정 예는 제WO 2004/106369호의 도 4에 나타낸 아미노산 서열의 아미노산 19 내지 168로 구성된 단백질인 오르니트도로스 모우바타 (*Ornithodoros moubata*) 종의 진드기에 의해 생성된 단백질이다. (참조의 용이성을 위해, 제WO 2004/106369호의 도 4는 본 출원에서 도 2로서 재현된다.) 제WO 2004/106369호에서, 이 단백질은 "EV576" 및 "OmCI 단백질"이라는 이름으로 알려져 있으며 보다 최근에는 "코버신(Coversin)"으로 알려졌다 (예를 들면, 참조; Jore et. al., *Nature Structural & Molecular Biology*, *Structural basis for therapeutic inhibition of complement C5*, published online on 28th March, 2016 - doi:10.1038/nsmb.3196). 이 단백질을 본원에서 "코버신"이라고 한다.

- [0028] 진드기에서, 코버신은 성숙 코버신 단백질의 N-말단에 제WO 2004/106369호의 도 4에 나타낸 아미노산 서열의 아미노산 1 내지 18을 포함하는 리더 서열을 갖는 단백질원(pre-protein)으로서 발현된다. 리더 서열은 발현 후 절단된다.
- [0029] 코버신은 또한 류코트리엔 B4 (LTB-4) 활성을 억제하는 능력을 갖는다. LTB-4에 결합하는 능력은 당업계에 공지된 표준 시험관내 검정에 의해, 예를 들면, 표지된 LTB-4에 결합하기 위해 경쟁하는 코버신과 항-LTB-4 항체 사이의 경쟁적 ELISA에 의해, 등온선 적정 열량측정법에 의해 또는 형광 적정에 의해 입증될 수 있다.
- [0030] 다양한 용도에서의 코버신 또는 이의 기능적 등가물의 사용에 관한 제WO 2007/028968호, 제WO 2008/029167호, 제WO 2008/029169호, 제WO 2011/083317호 및 제WO 2016/198133호과 같은 다수의 추가의 특허 출원이 있다. 제WO 2015/185760호는 코버신 및 이의 구조적 등가물이 C5의 다형체의 절단을 방지하는데 효과적임을 개시한다. 이러한 출원들 중의 어느 것에도 안구 질환의 치료에서의 코버신 또는 이의 기능적 등가물의 사용에 대한 개시는 없다. 모든 이러한 개시내용은 보체 시스템의 활성화와 관련된 것으로 의심되는 병태 또는 질환과 관련된다.
- [0031] Akari Therapeutics의 웹사이트 (<http://akaritx.com/sjogren/>)는 다음을 나타낸다:
- [0032] "코버신은 60일 국소 안구 독성 연구를 성공적으로 완료했으며, 코버신이 안구 표면 염증에 대해 활성을 갖는다는 증거가 있다. 코버신의 작은 분자 크기에 의해 가능해진 국소 안구 경로에 의한 전달은 필요한 약물의 총량을 감소시키고, 매우 작은 국소 용량이 전신 보체 억제의 효과를 거의 없애기 때문에, 수막염 감염의 위험 또는 잠재적 나이세리아(Neisseria) 감염 예방의 필요성을 줄이는데 상당한 이점을 갖는다.
- [0033] 코버신의 특수한 물리적 특성은 이들을 쇼그렌 증후군의 치료를 위한 매력적인 후보 약물로 만들며, 이 경로에 의해 에콜리주맙과 같은 항체 또는 전신 보체 억제를 필요로 하는 유전자 요법에 접근할 수는 없다. PNH 및 aHUS와 같은 전신 질환에 비해, 안구 약물 개발은 잠재적으로 빠르며 신약은 전형적으로 전신 대응물보다 훨씬 빨리 마케팅 승인을 얻는다."
- [0034] 본 개시는 단지 안구 표면 염증을 치료하는데 활성이 있을 수 있음을 나타낸다는 것을 알 수 있을 것이다. 그러나, 이러한 표면 염증이 영향을 받는 메커니즘의 제시는 없다. 쇼그렌 증후군에 대한 언급은 저자가 코버신이 이 증후군에 대해 효과적일 것이라고 간주하는 이유에 대해서는 제시하지 않으며 이 주장을 뒷받침하는 데이터가 있다는 제시도 없다. 코버신이 C5의 절단의 억제제인 것으로 알려져 있기 때문에, 저자는 안구의 염증이 보체 시스템의 활성화로 인한 것일 수 있다고 간주했지만, 다시 이것이 어떠한 데이터에 의해 뒷받침되지는 않는 것으로 추정된다. 웹사이트가 조회한 활성은 안구 건조증의 즉각적인 증상에 대한 활성인 것으로 보인다. 코버신이 다른 영향을 미친다는 개시나 제안은 없다. 따라서, 쇼그렌 증후군 및 다른 반흔성 안구 염증성 장애, 특히 점막 유천포창 또는 아토피성 각결막염에 의해 야기되는 안구에 대한 세포-매개 손상을 치료 또는 예방하는 방법이 여전히 요구되고 있다.
- ### 발명의 내용
- [0035] 코버신은 반흔성 안구 염증성 장애의 마우스 모델에서 증상을 감소시키는 것으로 나타났다. 코버신의 투여는 스코어링 (하기에서 보다 상세히 논의됨)에 의해 평가되는 바와 같이 마우스 모델에서 증상 또는 징후의 증증도를 감소시킨다.
- [0036] 본 발명의 제1 측면에 따르면, 반흔성 안구 염증성 장애, 특히 쇼그렌 증후군, 점막 유천포창 또는 아토피성 각결막염을 치료 또는 예방하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 상기 반흔성 안구 염증성 장애를 앓고 있거나 앓을 위험이 있는 환자에게 제WO 2004/106369호의 도 4 (이 출원의 도 2, 서열 번호 2)에 나타낸 아미노산 서열의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질 또는 이의 기능적 등가물을 함유하는 조성물을 적용함을 포함한다.
- [0037] 바람직하게는, 조성물은 광학적으로 허용되는 조성물이며 조성물은 환자의 눈에 국소 적용된다.
- [0038] 본 발명의 제2 측면에 따르면, 조성물을 반흔성 안구 염증성 장애를 앓고 있거나 앓을 위험이 있는 환자에게 적용함으로써, 반흔성 안구 염증성 장애, 특히 쇼그렌 증후군, 점막 유천포창 또는 아토피성 각결막염을 치료 또는 예방하는 방법에서 사용하기 위한, 제WO 2004/106369호의 도 4 (본 출원의 도 2, 서열 번호 2)에 나타낸 아미노산 서열의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질 또는 이의 기능적 등가물을 함유하는 조성물이 제공된다.
- [0039] 바람직하게는, 조성물은 광학적으로 허용되는 조성물이며 조성물은 환자의 눈에 국소 적용하기 위한 것이다.

- [0040] 하기에서, 용어 "코버신-타입 단백질"은 "제WO 2004/106369호의 도 4에 나타낸 아미노산 서열의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질 또는 이의 기능적 등가물"에 대한 약칭으로서 사용된다.
- [0041] 용어 "광학적으로 허용되는 조성물"은 눈에 손상을 야기하지 않으면서 눈에 적용될 수 있는 조성물을 나타낸다. 이러한 조성물은 당업계의 숙련가들에게 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 인공 눈물 및 콘택트 렌즈 사용자에 의해 사용되는 습윤 용액을 포함한다. 이러한 조성물은 물, 생리 식염수 또는 인산염-완충 염수 (PBS)만큼 간단 할 수 있지만, 하나 이상의 첨가제를 함유하는 임의의 다른 완충 용액일 수도 있다. 또한 눈은 치료 물질의 전달을 위해 또는 이온 영동에 의해 에멀젼, 연고, 크림, 에어로졸 스프레이, 젤 또는 나노입자로 치료될 수 있는 것으로 알려져 있다. 이들 조성물 중 어느 것이 본 발명의 모든 측면에서 사용될 수 있다. 이러한 광학적으로 허용되는 조성물은, 예를 들어, 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition, 2012]에 기술되어 있다.
- [0042] 코버신-타입 단백질은 바람직하게는 반흔성 안구 염증성 장애의 증상이 나타난 후 3일 이내에 환자에게 처음 투여된 다음, 증상이 나타난 후 적어도 하루에 한 번 최대 10일 또는 더 긴 시간 동안 환자에게 투여된다. 따라서, 코버신-타입 단백질은 1 내지 5일, 1 내지 6일, 1 내지 7일, 1 내지 8일, 1 내지 9일 또는 1 내지 10일 또는 그 이상, 또는 2 내지 5일, 2 내지 6일, 2 내지 7일, 2 내지 8일, 2 내지 9일 또는 2 내지 10일 또는 그 이상, 또는 3 내지 5일, 3 내지 6일, 3 내지 7일, 3 내지 8일, 3 내지 9일 또는 3 내지 10일 또는 그 이상 동안 투여될 수 있으며, 여기서 1일째는 증상이 나타난 날이다. 그러나, 쇼그伦 증후군과 같은 유전-기반 장애를 앓고 있는 환자의 경우, 치료는 장기간, 아마도 평생 동안 지속되어야 할 수 있다.
- [0043] 대안적으로, 코버신-타입 단백질은 반흔성 안구 염증성 장애의 증상이 나타난 후 언제든지 환자에게 투여될 수 있다. 치료는 최대 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6주 또는 최대 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6개월 동안 지속될 수 있다.
- [0044] 유리하게는, 코버신-타입 단백질은 적어도 하루에 한 번 또는 적어도 하루에 두 번, 바람직하게는 적어도 하루에 세 번 환자에게 투여된다.
- [0045] 바람직하게는, 코버신-타입 단백질의 국소 용량은 용량당 5 내지 50 μg , 보다 바람직하게는 용당 10 내지 40 μg , 및 가장 바람직하게는 용량당 20 내지 30 μg 이다. 대안적으로 용량은 용량당 50 내지 200 μg , 예를 들어 용량당 60 내지 150, 70 내지 125 μg 또는 용량당 대략 125 μg 일 수 있다.
- [0046] 조성물을 국소 적용시, 통상적으로 특정 수의 방울 또는 특정 길이의 연고가 눈에 적용될 수 있는 것으로 나타난다. 적용 지침을 따를 때 정확한 1일량이 투여되도록 보장하기 위해 광학적으로 허용되는 조성물 중의 코버신-타입 단백질의 농도를 조정하는 것은 숙련가에게는 일상적인 문제일 것이다. 예를 들어, 한 방울은 통상적으로 약 40 μL 이므로 0.063% w/v를 함유하는 한 방울의 용액은 25.2 μg 의 코버신을 함유할 것이다.
- [0047] 대안적으로, 조성물은 이의 코버신-타입 단백질 농도 측면에서 정의된다. 예를 들면, 조성물은 0.063% w/v, 0.125% w/v 또는 0.25% w/v의 코버신-타입 단백질, 또는 0.063% w/v 내지 0.25% w/v의 코버신-타입 단백질을 포함할 수 있다. 조성물은 0.0125% w/v 내지 0.5% w/v의 코버신-타입 단백질, 예를 들어 0.025% w/v 내지 0.4% w/v, 0.05% w/v 내지 0.3% w/v, 0.1% w/v 내지 0.25% w/v의 코버신-타입 단백질을 포함할 수 있다.
- [0048] 놀랍게도, 눈에 대한 세포-매개 손상을 예방 또는 치료하는데 있어서의 코버신-타입 단백질의 효과가 치료의 비교적 후반기에 보여지는 것으로 밝혀졌다. 실험 모델에서, 코버신-타입 단백질의 초기 적용은 증상에 유의한 영향을 미치지 않지만 지연 후, 일반적으로 코버신-타입 단백질의 최초 투여로부터 1일 내지 7일, 보다 자주 3 일 내지 5일 후, 증상이 유의적으로 감소되고 호중구 및 다른 잠재적 염증성 또는 손상 세포의 눈으로의 이동이 억제되는 것으로 관찰되었다. 하기에 의해 어떠한 방식으로든 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 이러한 효과는 C5의 절단의 억제에 의해 야기되는 것으로 간주된다. 그러나, 결과가 MAC과 같은 보체 시스템의 활성 성분으로부터 눈에 대한 즉각적인 손상이 덜하다는 것은 아니다. 오히려, C5의 절단의 억제는 호중구 및 다른 잠재적 염증성 또는 손상 세포를 눈으로 모집하는 신호전달 화합물의 생성을 방지한다.
- [0049] 또한 과립구 모집, 및 특히 안구 표면 염증과 관련된 염증에서 전염증성 매개체 LTB4의 역할에 대한 증거가 증가하고 있다 (참조; Masoudi et al., Differences in Tear Film Biochemistry of Symptomatic and Asymptomatic Lens Wearers, Optom Vis Sci. 2017 Sep;94(9):914-918; Leonardi, Allergy and allergic mediators in tears, Experimental Eye Research 117 (2013) 106-117 and Sadik et al., Neutrophils cascading their way to inflammation, Trends Immunol. 2011 October; 32(10): 452-460). 따라서, LTB4의 활성을 억제하는 본 발명에 사용되는 제제 (예를 들어 코버신, 코버신-타입 단백질 또는 변형된 코버신 폴리펩

타이드)는 LTB4 매개 염증과 관련된 징후 및 증상에 긍정적인 영향을 미칠 수 있다.

[0050] 대상체는, 치료의 결과로서, 증상의 발생률 감소, 증상의 완화, 증상의 발생 또는 재발의 억제 또는 자연, 또는 이들의 조합을 가질 수 있다. 바람직하게는 치료는 전형적인 질환 상태 증상의 감소를 초래한다. 예를 들면, 이것은 홍조, 결막부종 및 눈물남(tearing)의 감소로 나타날 수 있다. 이것은 추가로 또는 대안적으로 눈에 대한 세포 매개 손상의 감소, 및/또는 호중구 및/또는 다른 손상된 세포의 눈으로의 이동 감소로 나타날 수 있다.

[0051] 증상은 Akpek에 의해 기술된 방법을 사용하여 임상 스코어링에 따라 평가할 수 있다 (Akpek EK, Dart JK, Watson S, Christen W, Dursun D, Yoo S, O'Brien TP, Schein OD, Gottsch JD. A randomized trial of topical cyclosporin 0.05% in topical steroid-resistant atopic keratoconjunctivitis, Ophthalmology, 2004; 111: 476-82).

[0052] 5가지 증상 및 6가지 징후의 종합 점수가 사용될 수 있으며, 예를 들어, 환자가 방문할 때마다 최악의 영향을 받은 것으로 판단되는 눈(또는 환자가 양쪽 눈이 똑같이 영향을 받은 것으로 판단한 경우에는 오른쪽 눈) 하나만 점수를 매긴다. 점수매김은 0 내지 3의 규모일 수 있으며, 여기서 0은 영향을 받지 않음, 1은 약간 영향을 받음, 2는 보통의 영향을 받음, 3은 심각하게 영향을 받음. 이러한 점수매김 시스템을 사용하여 험한 증상과 징후에 대한 최대 가능 점수는 33점이다.

[0053] 다음의 증상들을 점수매길 수 있다:

[0054] 1. 가려움

[0055] 2. 눈물남

[0056] 3. 불편감 (타는 듯한 감각, 찌르는 듯한 감각 또는 이물감)

[0057] 4. 분비물

[0058] 5. 광선공포증

[0059] 다음의 징후들을 점수매길 수 있다:

[0060] 1. 구결막 충혈

[0061] 2. 족근 결막 유두 비대

[0062] 3. 점상 각막염

[0063] 4. 각막의 혈관신생

[0064] 5. 반흔성 결막염

[0065]

6. 안검염

증상	0	1	2	3
가려움	눈을 비비거나 긁고 싶지 않음	때때로 눈을 비비거나 긁고 싶음	눈을 자주 비비거나 긁을 필요가 있음	꾸준히 눈을 비비거나 긁을 필요가 있음
눈물남	정상적인 눈물 생산	눈꺼풀 가장자리에 눈물이 흐르지 않으면서 결막낭 중간감각의 양성 감각	눈꺼풀 가장자리에 걸쳐 간헐적으로 가끔씩 눈물을 흘림	눈꺼풀 가장자리에 걸쳐 꾸준히, 또는 거의 꾸준이 눈물을 흘림
불편감 (타는 듯한 감각, 찌르는 듯한 감각 또는 이물감 포함)	없음	경증	중간 정도	중증
분비물	비정상적인 분비물 없음	하부 직장 자궁 오목 주위에서 주지되는 소량의 유점액 분비물	하부 직장 자궁 오목 주위에서 및 가장자리 눈물 띠에서 주지되는 중간량의 유점액 분비물; 깨어날 때 피각질의 존재	깨어날 때 눈꺼풀이 서로 단단히 밀착됨; 눈꺼풀을 벌리려면 따뜻한 물기가 필요함; 낮동안에는 눈꺼풀을 닦는데 따뜻한 물기가 필요함
광선공포증	여려움을 경험하지 않음	빛에 경도의 여려움이 있어 눈을 가늘게 뜨고 보게 됨	중간 정도의 여려움, 어두운 안경 필요	극도의 광선공포증으로 환자가 실내에 머무르게 함; 어두운 안경으로도 자연광을 견딜 수 없음
정후	0	1	2	3
구결막 충혈	없음	경증	중간 정도	중증
족근 결막 유두 비대	유두 형성의 증거 없음	가벼운 유두 충혈	안검 결막의 부종과 심족근 혈관의 흐릿한 시야를 가진 중간 정도의 유두 비대	심적근 혈관의 시각화를 가리는 심한 유두 비대
점상 각막염 (표면 상피 각막염 및 플루오레세인으로의 각막의 점상 염색)	점상 각막염의 증거 없음	점상 각막염의 1사분면	점상 각막염의 2사분면	점상 각막염의 3 또는 이상의 사분면
각막의 혈관신생 (새로운 혈관 형성, 가장자리를 투명 각막에 2 mm까지 교차)	새로운 혈관 형성의 증가 없음	각막의 1사분면에 혈관신생의 존재	각막의 2사분면에 혈관신생의 존재	각막의 3사분면에 혈관신생의 존재
반흔성 결막염 (결막의 표면 흡터)	반흔화의 증거 없음	상피하 섬유증의 존재	원개 축소의 존재	겹구유착 형성
안검염 (눈꺼풀 피부의 충혈 및 부종과 마이봄샘 기능장애)	안검염의 증거 없음	눈꺼풀의 가벼운 발적 및 부종의 존재와 마이봄샘 기능장애	눈꺼풀 피부의 충혈, 비늘, 및 비듬과 치약 현상이 있는 중간 정도의 염증	눈꺼풀 피부에 균열, 속눈썹 상실, 및 눈꺼풀 부종이 있는 심한 염증

[0066]

바람직하게는 치료는 상기 표에 나타낸 증상 및 정후 중의 하나 이상에서의 점수의 감소를 초래한다. 바람직하게는 가려움, 눈물남, 불편감 (타는 듯한 감각, 찌르는 듯한 감각 또는 이물감), 분비물, 광선공포증, 구결막충혈, 족근 결막 유두 비대, 점상 각막염, 각막의 혈관신생, 반흔성 결막염 및 안검염 중의 하나 이상 (예를 들면 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개)에서의 점수의 감소를 초래한다.

[0068]

하나의 실시양태에서 치료는 가려움에 대한 점수의 감소를 초래한다. 하나의 실시양태에서 치료는 눈물남에 대한 점수의 감소를 초래한다. 하나의 실시양태에서 치료는 불편감 (타는 듯한 감각, 찌르는 듯한 감각 또는 이물감)에 대한 점수의 감소를 초래한다. 하나의 실시양태에서 치료는 분비물에 대한 점수의 감소를 초래한다. 하나의 실시양태에서 치료는 광선공포증에 대한 점수의 감소를 초래한다. 하나의 실시양태에서 치료는 구결막충혈에 대한 점수의 감소를 초래한다. 하나의 실시양태에서 치료는 족근 결막 유두 비대에 대한 점수의 감소를 초래한다. 하나의 실시양태에서 치료는 점상 각막염에 대한 점수의 감소를 초래한다. 하나의 실시양태에서 치료는 각막의 혈관신생에 대한 점수의 감소를 초래한다. 하나의 실시양태에서 치료는 반흔성 결막염에 대한 점수의 감소를 초래한다. 하나의 실시양태에서 치료는 안검염에 대한 점수의 감소를 초래한다.

[0069]

대상체의 일부에서는 증상이 완전히 해소될 것이며 추가로 재발하지 않을 것이다.

[0070]

일부 실시양태에서 효과는 호중구 관여의 감소 또는 예방에 의해 막개될 수 있다.

- [0071] 치료는 또한 질환의 하나 이상의 단계의 발병 전 또는 질환 단계의 진행 사이에 잠복 기간을 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서 수포가 예방될 수 있다.
- [0072] 치료는 또한 필요한 2차 치료의 양 또는 지속기간의 감소를 초래할 수 있다.
- [0073] 따라서 추가의 실시양태에서, 본 발명은 제WO 2004/106369호의 도 4 (본 출원의 도 2, 서열 번호 2)에 나타낸 아미노산 서열의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질 또는 이의 기능적 등가물을 함유하는 조성물을 상기 반흔성 안구 염증성 장애를 앓고 있거나 앓을 위험이 있는 환자에게 적용함을 포함하여, 반흔성 안구 염증성 장애, 특히 쇼그렌 증후군, 점막 유천포창 또는 아토피성 각결막염을 지닌 환자에서 눈에 대한 세포 매개 손상을 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0074] 대안적으로 언급하여, 상기 반흔성 안구 염증성 장애를 앓고 있거나 앓을 위험이 있는 환자에게 조성물을 적용함으로써 반흔성 안구 염증성 장애, 특히 쇼그렌 증후군, 점막 유천포창 또는 아토피성 각결막염을 지닌 환자에서 눈에 대한 세포 매개 손상을 감소시키는 방법에서 사용하기 위한, 제WO 2004/106369호의 도 4 (본 출원의 도 2, 서열 번호 2)에 나타낸 아미노산 서열의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질 또는 이의 기능적 등가물을 함유하는 조성물이 제공된다. 치료가 2차 치료의 양, 또는 2차 치료로의 치료 지속시간의 감소를 초래하는 경우, 감소는 본 발명의 제제의 부재하에서 사용된 2차 치료의 양에 비해 최대 또는 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80%일 수 있다. 질환 매개변수의 임의의 감소 또는 증가에 대한 임의의 언급은 치료 부재하에서 상기 대상체와 비교된다. 바람직하게는, 매개변수는 정량화될 수 있으며, 이 경우 증가 또는 감소는 바람직하게는 통계적으로 유의하다. 예를 들면 증가 또는 감소는 치료의 부재하에서 (예를 들어, 상기 치료가 시작되기 전에) 매개변수와 비교하여 적어도 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50%일 수 있다.
- [0075] 놀랍게도 치료의 효과는 고용량보다 저용량에서 더 큰 것으로 밝혀졌다. 이것은 통상적으로 치료 섭생의 경우 원치않는 부작용을 유발하지 않으면서 환자에게 가능한 한 많은 활성 물질을 제공한다는 점에서 이례적이다. 코버신은 일반적으로 부작용이 적어서 더 높은 용량으로 전신에 사용할 수 있는 것으로 알려져 있다. 그러나, 쇼그렌 증후군, 점막 유천포창 및 아토피성 각결막염과 같은 반흔성 안구 염증성 장애의 증상들은 고용량을 사용하는 것보다 저용량의 코버신을 사용하면 더 많이 감소되는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 저용량의 코버신-타입 단백질을, 특히 상기 언급된 바와 같이 연장된 기간에 걸친 사용과 조합하여 사용하는 것이 바람직하다. 하기 위해 어떠한 방식으로든 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 이 효과는 코버신-타입 단백질이 일반적으로 단백질이고 눈에 국소 적용될 때 단백질이 염증을 유발할 수 있는 것으로 밝혀졌기 때문에 나타나는 것으로 간주된다. 따라서, 더욱 저용량의 코버신-타입 단백질을 사용하는 것은 눈의 염증의 원치않는 증가와 세포 이동의 원하는 억제의 균형을 맞출 수 있다.
- [0076] 코버신-타입 단백질은 제WO 2004/106369호의 도 4 (본 출원의 도 2, 서열 번호 2)의 아미노산 서열의 아미노산 19 내지 168로 이루어진 단백질인 코버신 자체, 또는 이러한 단백질의 기능적 등가물이다.
- [0077] 코버신은 진드기 오르니트도로스 모우바타의 침샘으로부터 단리되었다. 코버신은 리포칼린 계열의 외부 구성원이며 보체 활성화를 억제하는 것으로 나타난 최초의 리포칼린 계열 구성원이다. 코버신은 C5에 결합하고 C5 전환효소에 의한 C5a 및 C5b로의 이의 절단을 방지함으로써 고전, 대체 및 렉틴 보체 경로를 억제하여, 활성 웨타이드인 C5a의 생성 및 MAC의 형성 둘 다를 억제한다. 코버신은 대략 0.02mg/ml의 IC₅₀으로 래트, 마우스 및 인간 혈청에서 C5에 결합하고 C5 전환효소에 의한 이의 절단을 방지하는 것으로 입증되었다.
- [0078] 코버신-타입 단백질은 제WO 2004/106369호의 도 4의 아미노산 서열의 아미노산 1 내지 168을 포함하거나 이들로 이루어질 수 있다. 이러한 도 4에 제공된 단백질 서열의 처음 18개 아미노산은 C5 결합 활성 또는 LTB-4 결합 활성에 필요하지 않은 신호 서열을 형성하므로 이것은, 예를 들면, (성숙 단백질이 사용되거나 단백질이 성숙 단백질의 아미노산 서열을 포함하도록) 재조합 단백질 생산 효율을 위해 생략될 수 있다.
- [0079] 코버신 단백질은 표면 플라스몬 공명 (SPR)을 사용하여 측정된 1nM의 Kd로 C5에 결합하는 것으로 입증되었다 [Roversi, P et al Journal of Biological Chemistry 2013, 288(26) 18789-18802]. 코버신 단백질의 기능적 등가물은 바람직하게는 통상적으로 360nM 미만, 보다 통상적으로 300nM 미만, 가장 통상적으로 250nM 미만, 바람직하게는 200nM 미만, 보다 바람직하게는 150nM 미만, 가장 바람직하게는 100nM 미만, 보다 더 바람직하게는 50, 40, 30, 20, 또는 10nM 미만, 및 유리하게는 5nM 미만의 Kd로 C5에 결합하는 능력을 보유하며, 여기서 상기 Kd는 표면 플라스몬 공명을 사용하여, 바람직하게는 문헌 [Roversi, P et al Journal of Biological Chemistry 2013, 288(26) 18789-18802]에 기술된 방법에 따라 결정된다.
- [0080] 코버신은 고전 보체 경로, 대체 보체 경로 및 렉틴 보체 경로를 억제한다. 바람직하게는, 코버신-타입 단백질

은 C5의 전체 입체구조를 안정화시키지만 C5 전환효소 절단 부위를 차단하지 않는 방식으로 C5에 결합한다. C5에 대한 코버신의 결합은 C5의 전체 입체구조의 안정화를 초래하지만, 세 가지 활성화 경로의 C5 전환효소에 의해 표적화된 C5 절단 부위를 직접 차단하지는 않는다. 코버신의 기능적 등가물 또한 바람직하게는 이러한 특성을 공유한다.

[0081] 코버신은 또한 LTB-4에 결합하는 것으로 입증되었다. 코버신의 기능적 등가물은 바람직하게는 또한 코버신과 유사한 친화도로 LTB-4에 결합하는 능력을 보유한다. 그러나, 이것은 코버신-타입 단백질이 C5-결합 능력을 보유하여 이러한 코버신-타입 단백질이 LTB-4에 상당히 또는 전혀 결합할 필요가 없는 경우에는 필수적이지 않다. C5-결합 능력을 보유하지만 LTB-4-결합 활성을 보유하지 않는 코버신-타입 단백질은, 예를 들어, 제WO 2010/100396호에 개시되어 있고, 이의 전체 내용은 본원에 참고로 포함된다. 감소되거나 부재하는 LTB-4-결합 능력을 갖는 이러한 코버신-타입 단백질이 본 발명의 모든 측면에서 사용될 수 있다.

[0082] 코버신은 또한 LTB-4에 결합하는 것으로 입증되었다. 코버신의 기능적 등가물이 또한 코버신과 유사한 친화도로 LTB-4에 결합하는 능력을 보유할 수 있다. 코버신-타입 단백질이 C5-결합 능력을 보유하지 않는다면, 이러한 코버신-타입 단백질은 상당한 LTB-4-결합 능력을 보유해야 한다. C5-결합 능력을 보유하지 않지만 LTB-4-결합 활성을 보유하는 코버신-타입 단백질은, 예를 들면, 2017년 4월 21일자로 출원된 공-계류중인 UK 특허 출원 제GB 1706406.4호 (출원인의 참조번호 P070475GB) 및 본 출원과 동일자로 출원된 국제 출원 제PCT/EP2018/XXXXXX호 (출원인의 참조번호 P070475WO)에 개시되어 있으며, 이들의 전체 내용은 본원에 참고로 포함된다. 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 이러한 코버신-타입 단백질이 본 발명의 모든 측면에서 사용될 수 있다.

[0083] 이러한 코버신-타입 단백질은 하기 서열을 포함하거나 이를로 이루어질 수 있다:

[0084] 서열 번호 34 (제GB 1706406.4호의 서열 번호 5)는 서열 번호 4가 Met114를 Gln으로, Met116을 Gln으로, Leu117을 Ser로, Asp118을 Asn으로, Ala119를 Gly로, Gly120을 Ser로, Gly121을 Ala로, Leu122를 Asp로, Glu123을 Asp로, Val124를 Lys로 변경하도록 변형된, 변형된 코버신의 아미노산 서열이다. (코버신 변이체 1)

[0085] 서열 번호 35 (제GB 1706406.4호의 서열 번호 6)는 서열 번호 4가 Ala44를 Asn로, Met116을 Gln로, Leu117을 Ser로, Gly121을 Ala로, Leu122를 Asp로, Glu123을 Ala로, Asp149를 Gly로 변경하도록 변형된, 변형된 코버신의 아미노산 서열이다. (코버신 변이체 2)

[0086] 서열 번호 36 (제GB 1706406.4호의 서열 번호 7)은 서열 번호 4가 Ala44를 Asn로, Met116을 Gln로, Leu122를 Asp로, Asp149를 Gly로 변경하도록 변형된, 변형된 코버신의 아미노산 서열이다. (코버신 변이체 3)

[0087] 서열 번호 37 (제GB 1706406.4호의 서열 번호 8)은 서열 번호 4가 Ala44를 Asn로 변경하도록 변형된, 변형된 코버신의 아미노산 서열이다. (코버신 변이체 4)

[0088] 서열 번호 38 (제GB 1706406.4호의 서열 번호 9)은 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124 (서열 번호 2의 아미노산 위치 132-142)에서 베타 H와 알파2 사이의 루프의 아미노산 서열이다.

[0089] 서열 번호 39 (제GB 1706406.4호의 서열 번호 10)는 코버신 변이체 1 (서열 번호 34)에서 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124에서 베타 H와 알파2 사이의 루프의 아미노산 서열이다.

[0090] 서열 번호 40 (제GB 1706406.4호의 서열 번호 11)은 코버신 변이체 2 (서열 번호 35)에서 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124에서 베타 H와 알파2 사이의 루프의 아미노산 서열이다.

[0091] 서열 번호 41 (제GB 1706406.4호의 서열 번호 12)은 코버신 변이체 3 (서열 번호 36)에서 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124에서 베타 H와 알파2 사이의 루프의 아미노산 서열이다.

[0092] 코버신-타입 폴리펩타이드는 (예를 들어 류코트리엔 또는 하이드록시에이코사노이드 결합 활성 및 감소되거나 부재하는 C5 결합을 나타내는) 변형된 코버신 폴리펩타이드로 설명될 수 있다. "변형된 코버신 폴리펩타이드"에 대한 언급은 서열 번호 2 또는 서열 번호 4의 변형된 버전, 즉 서열 번호 2의 N-말단에서 보이는 18개 아미노산 신호 서열을 갖거나 갖지 않는 코버신 폴리펩타이드에 대한 언급으로서 이해되어야 한다.

[0093] 이러한 폴리펩타이드는 류코트리엔 또는 하이드록시에이코사노이드 결합 활성 및 감소되거나 부재하는 C5 결합을 나타낼 수 있으며 1 내지 30개 아미노산 치환이 이루어진 서열 번호 4 또는 변형된 코버신 폴리펩타이드의 N 말단으로부터 최대 5개의 아미노산이 결실된 이의 단편을 포함할 수 있고, 여기서

[0094] (i) 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에서 하기 치환 (a)-(j) 중의 하나 이상이 이루어지고:

- [0095] a. Met114는 Gln, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His, 또는 Thr로 대체되고;
- [0096] b. Met116은 Gln, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His, 또는 Thr로 대체되고;
- [0097] c. Leu117은 Ser, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, 또는 Pro로 대체되고;
- [0098] d. Asp118은 Asn, Gln, Arg, Lys, Gly, Ala, Leu, Ser, Ile, Phe, Tyr, Met Pro, His, 또는 Thr로 대체되고;
- [0099] e. Ala119는 Gly, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His로 대체되고;
- [0100] f. Gly120은 Ser, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His로 대체되고;
- [0101] g. Gly121은 Ala, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His로 대체되고;
- [0102] h. Leu122는 Asp, Glu, Asn, Ala, Gln, Arg, Lys, Pro, 또는 His로 대체되고;
- [0103] i. Glu123은 Asp, Ala, Gln, Asn, Arg, Lys, Gly, Leu, Ser, Ile, Phe, Tyr, Pro, His, 또는 Thr로 대체되고;
- [0104] j. Val124는 Lys, Gln, Asn, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His, 또는 Thr로 대체되고/되거나; 여기서
(ii) 서열 번호 4에서 Ala44는 Asn, Asp, Gln, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His로 대체된다.
- [0105] 본원에서 사용되는 바와 같은 LK/E 결합 활성은 LTB4, B4 이소류코트리엔 및 이의 임의의 하이드록실화된 유도체, HETE, HPETE 및 EET를 포함하지만 이에 제한되지 않는 류코트리엔 및 하이드록시에이코사노이드에 결합하는 능력을 가리킨다. LTB4 결합이 특히 중요하다.
- [0106] 변형된 코버신 폴리펩타이드는 아래의 설명에 따라 변형된 서열 번호 2 또는 4로 구성될 수 있거나, 아래의 설명에 따라 변형된 서열 번호 2 또는 4를 포함할 수 있다.
- [0107] 서열 번호 2 및 서열 번호 4에서 비변형된 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124 (서열 번호 2의 아미노산 위치 132-142)에서 베타 H와 알파2 사이의 루프를 특징으로 한다. 이러한 루프는 아래에 나타낸 서열을 갖는다:
- [0108] -Met-Trp-Met-Leu-Asp-Ala-Gly-Gly-Leu-Glu-Val- (서열 번호 38)
- [0109] 첫 번째 Met는 서열 번호 4의 위치 114와 서열 번호 2의 위치 132에 있다.
- [0110] 변형된 코버신 폴리펩타이드에서, 서열 번호 2 또는 서열 번호 4의 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에서 하기 치환 (a)-(j) 중의 하나 이상이 이루어지도록 변형된다:
- [0111] a. Met114는 Gln, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Gln 또는 Ala로 대체되고;
- [0112] b. Met116은 Gln, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Gln 또는 Ala로 대체되고;
- [0113] c. Leu117은 Ser, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, 또는 Pro, 바람직하게는 Ser 또는 Ala로 대체되고;
- [0114] d. Asp118은 Asn, Gln, Arg, Lys, Gly, Ala, Leu, Ser, Ile, Phe, Tyr, Met Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Asn로 대체되고;
- [0115] e. Ala119는 Gly, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His, 바람직하게는 Gly 또는 Asn로 대체되고;
- [0116] f. Gly120은 Ser, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His, 바람직하게는 Ser 또는 Asn로 대체되고;
- [0117] g. Gly121은 Ala, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His, 바람직하게는 Ala 또는 Asn로 대체되고;
- [0118] h. Leu122는 Asp, Glu, Asn, Ala, Gln, Arg, Lys, Pro, 또는 His, 바람직하게는 Asp 또는 Ala로 대체되고;
- [0119] i. Glu123은 Asp, Ala, Gln, Asn, Arg, Lys, Gly, Leu, Ser, Ile, Phe, Tyr, Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Asp, Ala, Gln 또는 Asn로 대체되고;

- [0121] j. Val1124는 Lys, Gln, Asn, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Lys 또는 Ala로 대체된다.
- [0122] 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 서열 번호 2 또는 서열 번호 4의 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에서 하기 치환 (a)-(j) 중의 하나 이상이 이루어지도록 변형될 수 있다:
- [0123] a. Met114는 Gln로 대체되고;
- [0124] b. Met116은 Gln로 대체되고;
- [0125] c. Leu117은 Ser로 대체되고;
- [0126] d. Asp118은 Asn로 대체되고;
- [0127] e. Ala119는 Gly로 대체되고;
- [0128] f. Gly120은 Ser로 대체되고;
- [0129] g. Gly121은 Ala로 대체되고;
- [0130] h. Leu122는 Asp로 대체되고;
- [0131] i. Glu123은 Asp, 또는 Ala로 대체되고;
- [0132] j. Val1124는 Lys로 대체된다.
- [0133] 변형된 코버신 폴리펩타이드에는 치환 (a)-(j) 중의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개가 존재한다. 바람직하게는 치환 (a)-(j) 중의 2개 이상, 5개 이상, 또는 8개 이상이 존재한다.
- [0134] 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 서열 번호 2 또는 서열 번호 4의 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에서 하기 치환이 존재하도록 변형될 수 있다:
- [0135] a. Met114는 Gln로 대체되고;
- [0136] b. Met116은 Gln로 대체되고;
- [0137] c. Leu117은 Ser로 대체되고;
- [0138] d. Asp118은 Asn로 대체되고;
- [0139] e. Ala119는 Gly로 대체되고;
- [0140] f. Gly120은 Ser로 대체되고;
- [0141] g. Gly121은 Ala로 대체되고;
- [0142] h. Leu122는 Asp로 대체되고;
- [0143] i. Glu123은 Asp로 대체되고;
- [0144] j. Val1124는 Lys로 대체된다.
- [0145] 임의로 상기 언급된 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 Trp115는 치환되지 않는다. 바람직한 변형된 코버신 폴리펩타이드는 서열 Gln-Trp-Gln-Ser-Asn-Gly- Ser-Ala-Asp-Asp-Lys (서열 번호 39)을 갖는, 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124에서 베타 H와 알파2 사이에 루프를 갖는다.
- [0146] 변형된 코버신 폴리펩타이드에서, 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에서 하기 치환이 존재하도록 변형될 수 있다:
- [0147] a. Met114는 Gln, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Gln로 대체되고;
- [0148] b. Leu117은 Ser, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, 또는 Pro, 바람직하게는 Ser로 대체되고;
- [0149] c. Gly121은 Ala, Asp, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His, 바람직하게는 Ala로 대체되고;
- [0150] d. Leu122는 Asp, Glu, Asn, Gln, Arg, Lys, Pro, 또는 His, 바람직하게는 Asp로 대체되고;

- [0151] e. Glu123은 Asp, Ala, Gln, Asn, Arg, Lys, Gly, Leu, Ser, Ile, Phe, Tyr, Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Asp로 대체된다.
- [0152] 보다 특정한 실시양태에서;
- [0153] a. Met116은 Gln로 대체되고;
- [0154] b. Leu117은 Ser로 대체되고;
- [0155] c. Gly121은 Ala로 대체되고;
- [0156] d. Leu122는 Asp로 대체되고;
- [0157] e. Glu123은 Ala로 대체된다.
- [0158] 임의로 상기 언급된 이러한 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 Trp 115는 치환되지 않는다. 임의로 이러한 실시양태에서 Met114, Trp 115, Asp118, Ala119, Gly120 및 Val124는 치환되지 않거나, 본원의 다른 곳에서 언급된 바와 같이 보존적 치환으로 치환된다. 바람직한 변형된 코버신 폴리펩타이드는 서열 Met-Trp-Gln-Ser-Asp-Ala-Gly-Ala-Asp-Ala-Val (서열 번호 40)을 갖는, 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124에서 베타 H와 알파2 사이에 루프를 갖는다.
- [0159] 변형된 코버신 폴리펩타이드에서, 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에서 하기 치환이 존재하도록 변형될 수 있다:
- [0160] a. Met116은 Gln, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Gln로 대체되고;
- [0161] b. Leu122는 Asp, Glu, Asn, Gln, Arg, Lys, Pro, 또는 His, 바람직하게는 Asp로 대체된다.
- [0162] 보다 특정한 실시양태에서;
- [0163] a. Met116은 Gln로 대체되고;
- [0164] b. Leu122는 Asp로 대체된다.
- [0165] 임의로 상기 언급된 이러한 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 Trp 115는 치환되지 않는다. 임의로 이러한 실시양태에서 Met114, Trp 115, Leu117, Asp118, Ala119, Gly120, Gly121, Glu123 및 Val124는 치환되지 않는다. 바람직한 변형된 코버신 폴리펩타이드는 서열 Met-Trp-Gln-Leu-Asp-Ala-Gly-Gly-Asp-Glu-Val (서열 번호 41)을 갖는, 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124에서 베타 H와 알파2 사이에 루프를 갖는다.
- [0166] 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 Ala44 (서열 번호 2의 Ala62)가 Asn, Asp, Gln, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His로 대체되도록 변형될 수 있다.
- [0167] 바람직한 실시양태에서 서열 번호 4의 Ala44는 Asn로 대체된다.
- [0168] 서열 번호 4의 위치 44 (또는 서열 번호 2의 위치 62)에서의 이러한 치환은 본원에 언급된 다른 치환 중의 어느 것과 조합하여 이루어질 수 있다.
- [0169] 또 다른 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에서 하기 치환 (a)-(j) 중의 하나 이상이 존재하도록 변형될 수 있다:
- [0170] a. Met114는 Gln, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Gln 또는 Ala, 예를 들어 Gln로 대체되고;
- [0171] b. Met116은 Gln, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Gln 또는 Ala, 예를 들어 Gln로 대체되고;
- [0172] c. Leu117은 Ser, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, 또는 Pro, 바람직하게는 Ser 또는 Ala, 예를 들어 Ser로 대체되고;
- [0173] d. Asp118은 Asn, Gln, Arg, Lys, Gly, Ala, Leu, Ser, Ile, Phe, Tyr, Met Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Asn로 대체되고;
- [0174] e. Ala119는 Gly, Asp, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His, 바람직하게는 Gly 또는 Asn, 예를 들어 Gly로 대체되고;

- [0175] f. Gly120은 Ser, Asp, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His, 바람직하게는 Ser 또는 Asn, 예를 들어 Ser로 대체되고;
- [0176] g. Gly121은 Ala, Asp, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His, 바람직하게는 Ala 또는 Asn, 예를 들어 Ala로 대체되고;
- [0177] h. Leu122는 Asp, Glu, Asn, Gln, Arg, Lys, Pro, 또는 His, 바람직하게는 Asp 또는 Ala, 예를 들어 Asp로 대체되고;
- [0178] i. Glu123은 Asp, Ala, Gln, Asn, Arg, Lys, Gly, Leu, Ser, Ile, Phe, Tyr, Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Asp, Ala, Gln 또는 Asn, 예를 들어 Asp 또는 Ala로 대체되고;
- [0179] j. Val124는 Lys, Gln, Asn, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His, 또는 Thr, 바람직하게는 Lys 또는 Ala, 예를 들어 Lys로 대체되고;
- [0180] 추가로 서열 번호 4의 Ala44 (서열 번호 2의 Ala62)는 Asn, Asp, Gln, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, 또는 His, 바람직하게는 Asn로 대체된다.
- [0181] 몇몇 변형된 코버신 폴리펩타이드에서, 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에서 하기 치환이 존재하도록 변형될 수 있다:
- [0182] a. Met116은 Gln로 대체되고;
- [0183] b. Leu117은 Ser로 대체되고;
- [0184] c. Gly121은 Ala로 대체되고;
- [0185] d. Leu122는 Asp로 대체되고;
- [0186] e. Glu123은 Ala로 대체되고;
- [0187] 서열 번호 4의 Ala44는 Asn로 대체된다.
- [0188] 이러한 실시양태의 바람직한 측면에서 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에 상응하는 아미노산 잔기는 서열 번호 40에 제시된 바와 같다.
- [0189] 몇몇 변형된 코버신 폴리펩타이드에서, 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에서 하기 치환이 존재하도록 변형된다:
- [0190] a. Met116은 Gln로 대체되고;
- [0191] b. Leu122는 Asp로 대체되고;
- [0192] 서열 번호 4의 Ala44는 Asn로 대체된다.
- [0193] 이러한 실시양태의 바람직한 측면에서 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에 상응하는 아미노산 잔기는 서열 번호 41에 제시된 바와 같다.
- [0194] 몇몇 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 Asp149가 Gly, Gln, Asn, Ala, Met, Arg, Lys, Leu, Ser, Ile, Phe, Tyr, Pro, His, 또는 Thr로 대체되도록 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 Asp149가 Gly로 대체되도록 변형된다. 서열 번호 4의 위치 149 (서열 번호 2의 위치 167)에서의 이러한 치환은 본원에 언급된 다른 치환들 중의 어느 것과 조합하여 이루어질 수 있다.
- [0195] 몇몇 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에서 하기 치환이 존재하도록 변형될 수 있다:
- [0196] a. Met116은 Gln로 대체되고;
- [0197] b. Leu117은 Ser로 대체되고;
- [0198] c. Gly121은 Ala로 대체되고;
- [0199] d. Leu122는 Asp로 대체되고;

- [0200] e. Glu123은 Ala로 대체되고;
- [0201] 서열 번호 4의 Ala44는 Asn로 대체되고 서열 번호 4의 Asp149는 Gly149로 대체된다.
- [0202] 이러한 실시양태의 바람직한 측면에서 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에 상응하는 아미노산 잔기는 서열 번호 40에 제시된 바와 같다.
- [0203] 몇몇 변형된 코버신 폴리펩타이드에서, 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에서 하기 치환이 존재하도록 변형될 수 있다:
- a. Met116은 Gln로 대체되고;
- b. Leu122는 Asp로 대체되고;
- [0206] 서열 번호 4의 Ala44는 Asn로 대체되고 서열 번호 4의 Asp149는 Gly149로 대체된다.
- [0207] 이러한 실시양태의 바람직한 측면에서 서열 번호 4의 위치 114 내지 124에 상응하는 아미노산 잔기는 서열 번호 41에 제시된 바와 같다.
- [0208] 이러한 개시의 다양한 측면 및 실시양태에서, 변형된 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 2 및 서열 번호 4에서 비변형된 코버신 폴리펩타이드와는 1 내지 30개 아미노산까지 상이하다. 생성되는 변형된 코버신 폴리펩타이드가 비변형된 코버신 폴리펩타이드에 비해 LK/E 결합 활성 및 감소되거나 부재하는 C5 결합을 나타내는 한 서열 번호 2 및 서열 번호 4에서 코버신 폴리펩타이드에 임의의 변형이 이루어질 수 있다.
- [0209] 일부 실시양태에서 서열 번호 4의 위치 6, 38, 100, 128, 129, 150에서의 6개의 시스테인 아미노산은 본 발명의 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 유지된다.
- [0210] 몇몇 변형된 코버신 폴리펩타이드에서, 서열 번호 4의 Asn60 및 Asn84는 각각 Gln로 대체된다. 이러한 변형은 폴리펩타이드가 효모에서 발현되는 경우 N-결합된 과당화(hyperglycosylation)를 방지하기 위해 부위 지정 돌연변이 유발에 의해 수행될 수 있다.
- [0211] 몇몇 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 서열 번호 4의 하기 아미노산 중의 하나 이상은 LTB4에의 결합에 관련되는 것으로 생각되며 따라서 비변형된 형태로 유지될 수 있다: Phe18, Tyr25, Arg36, Leu39, Gly41, Pro43, Leu52, Val54, Met56, Phe58, Thr67, Trp69, Phe71, Gln87, Arg89, His99, His101, Asp103, 및 Trp115. 몇몇 변형된 코버신 폴리펩타이드에서, 이러한 아미노산 중의 적어도 5개, 10개 또는 15개, 또는 전부가 본 발명의 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 비변형된 형태로 유지된다. 몇몇 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 이들 아미노산 중의 하나 이상은 보존적으로 치환될 수 있다. 몇몇 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 이들 아미노산 중의 최대 5개, 10개 또는 15개, 또는 전부가 본 발명의 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 보존적으로 치환된다.
- [0212] 서열 번호 4에서 하기 위치의 아미노산은 코버신과 TSGP2 및 TSGP3 사이에 고도로 보존된다: 5, 6, 11, 13-15, 20-21, 24-27, 29-32, 35-41, 45, 47-48, 50, 52-60, 64, 66, 69-81, 83, 84, 86, 90-94, 97-104, 112-113, 115, 125-129, 132-139, 145, 148, 및 150.
- [0213] 서열 번호 4에서 하기 위치의 아미노산은 LTB4에의 결합에 관련되는 것으로 생각되고/되거나 코버신과 TSGP2 및 TSGP3 사이에 고도로 보존된다: 5, 6, 11, 13-15, 18, 20-21, 24-27, 29-32, 35-41, 43, 45, 47-48, 50, 52-60, 64, 66, 67, 69-81, 83, 84, 86, 87, 89, 90-94, 97-104, 112-113, 115, 125-129, 132-139, 145, 148, 및 150.
- [0214] 서열 번호 4에서 하기 위치의 아미노산은 LTB4에의 결합에 관련되는 것으로 생각되고/되거나 코버신과 TSGP2 및 TSGP3 사이에 고도로 보존된다: 5, 6, 11, 13-15, 18, 20-21, 24-25, 27, 30-32, 35-41, 43, 47-48, 50, 52-60, 64, 66, 67, 69-81, 83, 84, 86, 87, 89, 90-94, 98, 100, 102-104, 112-113, 115, 126, 128-129, 132-139, 145, 148, 및 150.
- [0215] 따라서, 몇몇 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 상기 아미노산은 비변형된 형태로 유지된다. 일부 실시양태에서, 이들 아미노산 중의 적어도 5개, 10개 또는 15개, 또는 전부는 본 발명의 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 비변형된 형태로 유지된다. 일부 실시양태에서 이들 아미노산 중의 하나 이상은 보존적으로 치환될 수 있다. 일부 실시양태에서 이들 아미노산 중의 최대 5개, 10개 또는 15개, 20개, 25개, 30개, 40개, 50개 또는 전부는 본 발명의 변형된 코버신 폴리펩타이드에서 보존적으로 치환된다.
- [0216] 본원에 언급된 변형된 코버신 폴리펩타이드는 전형적으로 서열 번호 2 또는 서열 번호 4와는 1 내지 30개, 바람

직하게는 2 내지 25개, 보다 바람직하게는 3 내지 20개, 보다 더 바람직하게는 4 내지 15개 아미노산까지 상이하다. 전형적으로 차이는 5 내지 12개, 또는 6 내지 10개 아미노산 변화일 것이다. 예를 들면, 1 내지 30개, 또는 2 내지 25개, 3 내지 30개, 4 내지 15개, 5 내지 12개, 또는 6 내지 10개 아미노산 치환이 서열 번호 2 또는 서열 번호 4에서 이루어질 수 있다.

[0217] 서열 번호 39에 제시된 바와 같은, 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124 (서열 번호 2의 아미노산 위치 132-142)에서 베타 H와 알파2 사이에 루프를 갖는 변형된 코버신 폴리펩타이드는 이러한 루프의 존재의 결과로서 서열 번호 4에 비해 10개의 아미노산 치환을 갖는다. 따라서 일부 실시양태에서, 본원에 언급된 변형된 코버신 폴리펩타이드는 바람직하게는 (예를 들어 서열 번호 39의 루프에서) 서열 번호 34에 제시된 것을 능가하여 서열 번호 4에 비해 1-15, 2-10, 3-5, 또는 최대 2, 3, 4 또는 5개의 추가의 치환을 갖는다.

[0218] 서열 번호 40에 제시된 바와 같은, 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124 (서열 번호 2의 아미노산 위치 132-142)에서 베타 H와 알파2 사이에 루프를 갖는 변형된 코버신 폴리펩타이드는 이러한 루프의 존재의 결과로서 서열 번호 4에 비해 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 따라서 일부 실시양태에서, 본원에 언급된 변형된 코버신 폴리펩타이드는 바람직하게는 (예를 들어 서열 번호 40의 루프에서) 서열 번호 35에 제시된 것을 능가하여 서열 번호 4에 비해 1-20, 2-15, 3-10, 또는 최대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개의 추가의 치환을 갖는다. 추가의 치환은 바람직하게는 본원의 다른 곳에 제시된 바와 같이 위치 44 및 149에서의 치환을 포함한다.

[0219] 서열 번호 41에 제시된 바와 같은, 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124 (서열 번호 2의 아미노산 위치 132-142)에서 베타 H와 알파2 사이에 루프를 갖는 변형된 코버신 폴리펩타이드는 이러한 루프의 존재의 결과로서 서열 번호 4에 비해 2개의 아미노산 치환을 갖는다. 따라서 일부 실시양태에서, 변형된 코버신 폴리펩타이드는 바람직하게는 서열 번호 36에 제시된 것을 능가하여 서열 번호 4에 비해 1-25, 2-12, 3-15, 또는 최대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15개의 추가의 치환 (예를 들어 서열 번호 41의 루프에서의 치환)을 갖는다. 추가의 치환은 바람직하게는 본원의 다른 곳에 제시된 바와 같이 위치 44 및 149에서의 치환을 포함한다.

[0220] 본원의 다른 곳에 제시된 바와 같이 서열 번호 4의 위치 44에 치환을 갖는 변형된 코버신 폴리펩타이드는 바람직하게는 서열 번호 4에 비해 1-25, 2-12, 3-15, 또는 최대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15개의 추가의 치환을 갖는다.

[0221] 상기 명백히 언급된 것 이외의 치환은 바람직하게는, 예를 들면, 하기 표에 따르는 보존적 치환이다. 두번째 컬럼의 동일 블록 및 바람직하게는 세번째 컬럼의 동일 라인의 아미노산은 서로 치환될 수 있다:

지방족	비-극성	G A P I L V
	극성 - 하전되지 않음	C S T M N Q
	극성 - 하전됨	D E K R
	방향족	H F W Y

[0222]

[0223] 바람직한 변형된 코버신 폴리펩타이드는 서열 번호 34, 35, 36, 37 중의 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어진다.

[0224] 본 발명은 또한 변형된 코버신 폴리펩타이드의 N 말단으로부터 최대 5개의 아미노산이 결실된 상기 언급된 변형된 코버신 폴리펩타이드의 단편의 사용을 포함한다. 단편은 변형된 코버신 폴리펩타이드의 N 말단으로부터의 1, 2, 3, 4 또는 5개 결실에 상응할 수 있다. 생성되는 폴리펩타이드가 변형된 코버신의 LK/E 결합 활성을 보유하고 감소되거나 부재하는 보체 억제제 활성을 갖는다면, 서열 번호 2 또는 서열 번호 4의 아미노산 서열에서 다른 위치로부터의 결실이 또한 본 발명의 일부를 형성하는 것으로 간주된다.

[0225] RaCI 단백질이 또한 C5에 결합하고 이러한 결합에 의해 C5a 및 C5b로의 C5의 전환을 억제할 수 있는 것으로 입증되었다. RaCI 단백질은 상기 인용된 Jore 논문에 기술되어 있으며, 이의 전체 내용은 본원에 참고로 포함된다.

이러한 단백질은 제WO 2015/185945호에 더욱 상세하게 기술되어 있으며, 이의 전체 내용은 본원에 참고로 포함된다.

- [0226] 제WO 2015/185945호에 제시된 바와 같이, 제1 측면에서, 제WO 2015/185945호의 발명은 다음을 포함하거나 이들로 이루어진 단리된 폴리펩타이드를 제공한다:
- [0227] (a) 서열 번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12 중의 어느 하나의 아미노산 서열;
- [0228] (b) (a)와 적어도 60% 서열 동일성을 갖는 변이체 아미노산 서열;
- [0229] (c) (a)와 적어도 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는
- [0230] (d) 적어도 40, 50, 60, 65, 70 또는 75개 아미노산 길이인 (a), (b) 또는 (c)의 활성 단편,
- [0231] 여기서 서열 동일성 수 및 서열 동일성의 결정은 제WO 2015/185945호에 개시된 바와 같다. 이를 폴리펩타이드 중의 어느 것이라도 본 발명의 모든 측면에서 사용될 수 있다.
- [0232] 참조 용이성을 위해, 제WO 2015/185945호에서 언급된 서열은 본 출원에서 아래 제시된 바와 같은 서열 번호로 제공된다:

제WO 2015/185945호에서의 서열 번호	본 출원에서의 서열 번호
1	22
2	23
3	24
4	25
5	26
6	27
7	28
8	29
9	30
10	31
11	32
12	33

- [0233]
- [0234] C5에 결합하여 이의 절단을 억제하는 단클론 항체 및 소분자가 개발되어 왔으며 다양한 질환, 특히 PNH, 건선, 류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스 및 이식 거부를 치료하기 위해 개발중이다 (Ricklin D & Lambris J, Nature Biotechnology, 25:1265-1275 (2007)). 이를 단클론 항체 및 소분자 중 어느 것이라도 본 발명의 모든 측면에서 사용될 수 있다. 그러나, 이를 단클론 항체 중 일부는 특정 C5 다형성을 갖는 대상체로부터의 C5에 결합하지 않으므로 이를 대상체에서 효과적이지 않다 (Nishimura, J et al., New Engl J. Med., 30;7: 632-639 (2014)). 바람직하게는, 코버신-타입 단백질은 항체가 아니라, 야생형 C5 뿐만 아니라 C5 다형성 (예를 들어, 에콜리주맙에 의한 치료를 비효과적으로 만들거나, 에콜리주맙으로의 치료 효능을 감소시키는 C5 다형성)을 갖는 대상체로부터의 C5에 결합하여 이의 절단을 억제하는 단백질이다. 용어 "C5 다형성"은 삽입, 결실, 아미노산 치환, 프레임-시프트, 절단에 의해 변경된 임의의 버전의 C5를 포함하며, 이를 중 어느 것은 단일 또는 다중일 수 있거나, 또는 야생형 C5에 비해 이를 변화 중 하나 이상의 조합일 수 있다. 인간 대상체에서, 야생형 C5는 수탁 번호 NP_001726.2; 버전 GI:38016947을 갖는 C5 단백질이다. C5 다형성의 예는 위치 885에서의 다형성, 예를 들어 단클론 항체 에콜리주맙의 효과를 감소시키는 Arg885Cys (c.2653C>T에 의해 암호화됨), p.Arg885His (c.2654G>A에 의해 암호화됨) 및 Arg885Ser를 포함한다 [Nishimura, J et al., New Engl J. Med., 30;7: 632-639 (2014)].

- [0235] C5 다형성을 갖는 대상체로부터의 C5를 포함한 C5에 결합하는 코버신-타입 단백질의 능력은 당업계에 공지된 표준 시험관내 검정에 의해, 예를 들어 표면 플라스몬 공명에 의해 또는 표지된 C5를 갖는 겔 상에서 단백질의 배양 후 웨스턴 블로팅에 의해 결정될 수 있다.

- [0236] C5 다형성, 예를 들어 에콜리주맙에 의한 치료를 비효과적으로 만들거나, 에콜리주맙에 의한 치료의 효능을 감소시키는 C5 다형성을 갖는 대상체로부터의 C5를 포함한 C5에 결합하는 제제의 능력은 당업계에 공지된 표준 시험관내 검정에 의해, 예를 들어 표면 플라스몬 공명 또는 표지된 C5를 갖는 겔 상에서 단백질의 배양 후 웨스턴 블로팅에 의해 결정될 수 있다. 바람직하게는, 코버신-타입 단백질은 360nM 미만, 보다 통상적으로 300nM

미만, 가장 통상적으로 250nM 미만, 바람직하게는 200nM 미만, 보다 바람직하게는 150nM 미만, 가장 바람직하게는 100nM 미만, 보다 더 바람직하게는 50, 40, 30, 20, 또는 10nM 미만, 및 유리하게는 5nM 미만의 Kd로 야생형 C5 및/또는 C5 다형성, 예를 들어 에콜리주맙에 의한 치료를 비효과적으로 만들거나, 에콜리주맙에 의한 치료의 효능을 감소시키는 C5 다형성을 갖는 대상체로부터의 C5에 결합하며, 여기서 상기 Kd는 바람직하게는 문헌 [Roversi et al, supra]에 기술된 방법에 따라 표면 플라스몬 공명을 사용하여 결정된다.

[0237] 이것은 야생형 C5 및 C5 다형성, 예를 들어 에콜리주맙에 의한 치료를 비효과적으로 만들거나, 에콜리주맙에 의한 치료의 효능을 감소시키는 C5 다형성을 갖는 대상체로부터의 C5에 대해 더 높거나 낮거나 동일한 친화도를 보일 수 있다.

[0238] 보체 활성화를 억제하는 코버신-타입 단백질의 능력은 혈청에서 보체 활성화를 억제하는 이들의 능력을 측정함으로써 결정될 수 있다. 예를 들면, 혈청에서의 보체 활성은 당업계에 공지되거나 본원에 기술된 임의의 수단에 의해 측정될 수 있다.

[0239] 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 변형된 코버신 폴리펩타이드가 사용되는 경우, C5 결합은, 예를 들면, 서열 번호 2 또는 4에서 비변형된 코버신 폴리펩타이드가 나타내는 결합에 비해 적어도 2, 5, 10, 15, 20, 50, 100배까지 감소되거나 없어질 수 있다. C5 결합은, 예를 들어, 서열 번호 2 또는 4에서 비변형된 코버신 폴리펩타이드에 비해 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95%까지 감소될 수 있다. 변형된 코버신 폴리펩타이드는 문헌 [Roversi et al. (2013) J Biol Chem. 288, 18789-18802]에 기술된 방법에 따라 표면 플라스몬 공명에 의해 결정되는 바와 같이, 또는 제GB1706406.4호의 실시예 2에 제시된 바와 같이 1 마이크로몰 이상의 KD로 C5에 결합할 수 있다.

[0240] 코버신-타입 단백질은 또한 에이코사노이드 활성을 억제하는 기능을 가질 수 있다.

[0241] 코버신-타입 단백질은 LTB-4 활성을 억제할 수 있지만, 반드시 그런 것은 아니다. 특히, 코버신-타입 단백질은 LTB-4에 결합할 수 있다. LTB-4에 결합하는 코버신-타입 단백질의 능력은 당업계에 공지된 표준 시험관내 검정에 의해, 예를 들면, 표지된 LTB-4에 결합하기 위해 경쟁하는 코버신과 항-LTB-4 항체 간의 경쟁 ELISA에 의해, 등온선 적정 열량측정법에 의해 또는 형광 적정에 의해 결정될 수 있다.

[0242] 형광 적정을 사용하여 수득된 데이터는 코버신이 200 내지 300 pM의 Kd로 LTB4에 결합한다는 것을 보여준다. 예를 들면, 인산염 완충 염수 (PBS)에서 LTB4 (Caymen Chemicals, Ann Arbor, MI, USA)에 대한 결합 활성은 분광형광계, 예를 들어 LS 50 B 분광형광계 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)에서 정량할 수 있다. 이것은 다음과 같이 수행될 수 있다:

[0243] 2 mL PBS 중의 코버신의 정제된 100 nM 용액을 자기 교반기가 장착된 석영 큐벳 (10 mm 경로 길이; Hellma, Mühlheim, Germany)에 적용하였다. 온도를 20°C로 조절하고, 평형에 도달한 후, 단백질 Tyr/Trp 형광을 280 nm (슬릿 폭: 15 nm)에서 여기시켰다. 형광 방출은 방출 최대치에 상응하는 340 nm (슬릿 폭: 16 nm)에서 측정하였다. PBS 중의 30 μM LTB4의 리간드 용액을 20 μL의 최대 부피 (전체 샘플 부피의 1%)까지 단계적으로 첨가하고, 30 s 배양 후 정상 상태 형광을 측정하였다. KD 값의 계산을 위해, 데이터를 100%의 초기 형광 강도로 정규화하고, 3 μM N-아세틸-트립토판아미드 용액의 적정을 사용하여 내부 필터 효과를 보정하고 데이터를 상응하는 리간드 농도에 대해 플롯팅하였다. 그후, 이분자 복합체 형성에 대한 질량 작용 법칙에 근거한 비선형 최소 제곱 회귀를 사용하여 공개된 공식을 사용하여 Origin 소프트웨어 버전 8.5 (OriginLab, Northampton, USA)로 데이터를 맞추었다 (Breustedt et al., 2006: Comparative ligand-binding analysis of ten human lipocalins. Biochim Biophys Acta 1764(2):161-173.).

[0244] 코버신은 1nM 미만, 보다 통상적으로 0.9nM 미만, 가장 통상적으로 0.8nM 미만, 바람직하게는 0.7nM 미만, 보다 바람직하게는 0.6nM 미만, 가장 바람직하게는 0.5nM 미만, 보다 더 바람직하게는 0.4 nM 미만, 및 유리하게는 0.3nM 미만의 Kd로 LTB4에 결합할 수 있으며, 여기서 상기 Kd는 형광 적정을 사용하여, 바람직하게는 상기 방법에 따라 결정된다. 코버신-타입 단백질은 바람직하게는 이러한 특성들을 공유한다. 특정 실시양태에서, 코버신-타입 단백질은 야생형 C5 및 C5 다형성, 예를 들어, 에콜리주맙에 의한 치료를 비효과적으로 만들거나 에콜리주맙에 의한 치료의 효능을 감소시키는 C5 다형성을 갖는 대상체로부터의 C5 둘 다 및 LTB-4에 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 코버신-타입 단백질은 감소되거나 부재하는 C5 결합을 갖지만, 예를 들어 본원에 기술된 바와 같이 LTB4에는 결합하는 상기 기술된 바와 같은 변형된 코버신 폴리펩타이드이다.

[0245] 코버신-타입 단백질 (예를 들어 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 변형

된 코버신 폴리펩타이드)은, 예를 들어 5nM, 2nM 또는 1nM 미만, 보다 통상적으로 0.9nM 미만, 가장 통상적으로 0.8nM 미만, 바람직하게는 0.7nM 미만, 보다 바람직하게는 0.6nM 미만, 가장 바람직하게는 0.5nM 미만, 보다 더 바람직하게는 0.4 nM 미만, 및 유리하게는 0.3nM 미만의 Kd로 LTB4에 결합할 수 있으며, 여기서 상기 Kd는 형광 적정을 사용하여, 바람직하게는 상기 방법에 따라 결정된다.

[0246] 따라서, 코버신-타입 단백질은 C5 전환효소에 의한 보체 C5a 및 보체 C5b로의 C5의 절단을 방지하고 또한 LTB-4 활성을 억제하는 작용을 할 수 있거나, 이것은 예를 들어 본원에 기술된 바와 같이 C5 결합이 감소되거나 없지만 LTB4에 결합하는 상기 기술된 바와 같은 변형된 코버신 폴리펩타이드일 수 있다.

[0247] C5 및 LTB-4 둘 다에 결합하는 코버신-타입 단백질을 사용하는 것이 특히 유리하다. 아래 제시된 데이터에 기초하여, 본 발명자들은 이러한 고려에 결부시키지 않으면서, C5 및 에이코사노이드 경로 둘 다가 반흔성 앙구 염증성 장애, 특히 쇼그렌 증후군, 점막 유천포창 및 아토피성 각결막염에서 관찰된 병리에 기여한다고 간주한다. 따라서, 보체-매개 질환 및 장애의 염증 효과에 관여하는 다중 경로를 억제하는 단일 코버신-타입 단백질을 사용함으로써, 보체-매개 질환 및 장애의 염증 효과에 관여하는 단일 경로만을 억제하는 제제를 사용하는 것에 비해 향상된 효과가 달성될 수 있다. 단일 분자를 투여하는 것과 관련된 추가의 실질적인 이점이 있다.

[0248] 바람직하게는, 코버신-타입 단백질은 흡혈성 절지동물로부터 유래된다. 용어 "흡혈성 절지동물"은 곤충, 진드기, 이, 벼룩 및 응애와 같은 적절한 숙주로부터 혈분을 섭취하는 모든 절지동물을 포함한다. 바람직하게는, 코버신-타입 단백질은 진드기, 바람직하게는 진드기 오르니토도로스 모우바타로부터 유래된다.

[0249] 코버신의 기능적 등가물은 야생형 C5 또는 C5 다형성, 예를 들어, 에콜리주맙에 의한 치료를 비효과적으로 만들거나, 에콜리주맙으로의 치료 효능을 감소시키는 C5 다형성을 갖는 대상체로부터의 C5 중의 어느 하나인 C5에 결합할 수 있고 C5 전환효소에 의한 C5a 및 C5b로의 C5의 절단을 방지할 수 있는 능력을 보유하는 코버신의 상동체 또는 단편일 수 있다. 상동체 또는 단편은 또한 LTB-4에 결합하는 능력을 보유할 수 있다. 이것은 LTB-4에 결합하는 능력은 보유하지만 C5에 결합하는 능력은 보유하지 않을 수 있다.

[0250] 코버신의 기능적 등가물은 또한 코버신과 구조적으로 유사하거나, 특히 야생형 C5 또는 C5 다형성을 갖는 대상체로부터의 C5 중의 어느 하나인 C5, 및/또는 LTB-4에 결합하는 코버신의 활성 부위 또는 활성 부위들의 환경에서 유사하거나 동일한 삼차 구조를 함유하는 분자, 예를 들어 합성 분자일 수 있다. C5 및 LTB-4에 결합하기 위해 필요한 코버신에서의 정확한 아미노산 잔기는 Jore 등의 상기 제공된 참고문헌에 제시되어 있다.

[0251] 상동체는, 예를 들면, 리피세팔루스 아펜디쿨라투스 (*Rhipicephalus appendiculatus*), *R.* 산귀네우스 (*R. sanguineus*), *R.* 부르사(*R. bursa*), *A.* 아메리카눔(*A. americanum*), *A.* 카제넨세(*A. cajennense*), *A.* 헤브라에움(*A. hebraeum*), 부필루스 마이크로플루스(*Boophilus microplus*), *B.* 아눌라투스(*B. annulatus*), *B.* 테콜로라투스(*B. decoloratus*), 데르마센토르 레티쿨라투스(*Dermacentor reticulatus*), *D.* 안데르소니(*D. andersoni*), *D.* 마르기나투스(*D. marginatus*), *D.* 바리아빌리스(*D. variabilis*), 헤마피살리스 이너미스(*Haemaphysalis inermis*), *Ha.* 리치아(*Ha. leachii*), *Ha.* 푼타타(*Ha. punctata*), 히알로마 아나톨리쿰 아나톨리쿰(*Hyalomma anatomicum anatomicum*), *Hy.* 드로메다리(*Hy. dromedarii*), *Hy.* 마르기나툼 마르기나툼(*Hy. marginatum marginatum*), 익소데스 리시누스(*Ixodes ricinus*), *I.* 페르술카투스(*I. persulcatus*), *I.* 스카풀라리스(*I. scapularis*), *I.* 헥사고누스(*I. hexagonus*), 아르가스 페르시쿠스(*Argas persicus*), *A.* 레플렉수스(*A. reflexus*), 오르니토도로스 에라티쿠스(*Ornithodoros erraticus*), *O.* 모우바타 모우바타(*O. moubata moubata*), *O. m.* 포르시누스(*O. m. porcinus*), 및 *O.* 사비그니이(*O. savignyi*)를 포함하는 다른 진드기 종으로부터의 코버신 단백질을 포함하는, 제WO 2004/106369호의 도 4에 명백히 확인된 바와 같은 코버신의 파라고그(parologue) 및 오르소로그(orthologue)를 포함한다.

[0252] 상동체는 또한 코버신과 동가의 기능을 갖는, 쿨렉스(*Culex*), 아노펠레스(*Anopheles*) 및 에데스(*Aedes*) 속, 특히 쿨렉스 퀸퀘파시아투스(*Culex quinquefasciatus*), 에데스 에집피(*Aedes aegypti*) 및 아노펠레스 감비에(*and Anopheles gambiae*)를 포함하는 모기 종; 테노세팔리데스 웰리스(*Ctenocephalides felis*)(고양이 벼룩)과 같은 벼룩 종, 말파리, 모래파리, 진딧물, 체체파리, 이, 진드기, 거머리 및 편형동물으로부터의 단백질을 포함한다. 상동체는 또한 *O. 모우바타*(*O. moubata*)에 존재하는 대략 18kDa의 세 가지 다른 형태의 코버신을 포함한다.

[0253] 코버신의 상동체의 확인을 위한 방법은 당업계의 숙련가들에게 명백할 것이다. 예를 들면, 상동체는 공개 및 개인 서열 데이터베이스 둘 다의 상동성 검색에 의해 확인될 수 있다. 통상적으로, 공개적으로 이용 가능한 데이터베이스가 사용되지만, 개인 또는 상업적으로 이용 가능한 데이터베이스는 특히 이들이 공개 데이터베이스에 표시되지 않은 데이터를 담고 있다면 동일하게 유용하다. 일차 데이터베이스는 일차 뉴클레오티드 또는 아미노

산 서열 데이터가 수탁되어 공개적으로 또는 상업적으로 이용 가능할 수 있는 사이트이다. 공개적으로 이용 가능한 일차 데이터베이스의 예는 GenBank 데이터베이스 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), EMBL 데이터베이스 (<http://www.ebi.ac.uk/>), DDBJ 데이터베이스 (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>), SWISS-PROT 단백질 데이터베이스 (<http://expasy.hcuge.ch/>), PIR 데이터베이스 (<http://pir.georgetown.edu/>), TrEMBL 데이터베이스 (<http://www.ebi.ac.uk/>), TIGR 데이터베이스 (<http://www.tigr.org/tdb/index.html> 참조), NRL-3D 데이터베이스 (<http://www.nbrfa.georgetown.edu>), 단백질 데이터 베이스 (<http://www.rcsb.org/pdb>), NRDB 데이터베이스 (<ftp://ncbi.nlm.nih.gov/pub/nrdb/README>), 및 OWL 데이터베이스 (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/dbbrowser/OWL/>)를 포함한다. 공개적으로 이용 가능한 이차 데이터베이스의 예는 PROSITE 데이터베이스 (<http://expasy.hcuge.ch/sprot/prosite.html>), PRINTS 데이터베이스 (<http://iupab.leeds.ac.uk/bmb5dp/prints.html>), Profiles 데이터베이스 (http://ulrec3.unil.ch/software/PFSCAN_form.html), Pfam 데이터베이스 (<http://www.sanger.ac.uk/software/pfam>), Identify 데이터베이스 (<http://dna.stanford.edu/identify>) 및 Blocks 데이터베이스 (<http://www.blocks.fhcrc.org>)이다. 상업적으로 이용 가능한 데이터베이스 또는 개인 데이터베이스의 예는 PathoGenome (Genome Therapeutics Inc.) 및 PathoSeq (이전의 Incyte Pharmaceuticals Inc.)를 포함한다.

[0254]

전형적으로, (바람직하게는 활성 부위와 같은 특정 영역에 걸쳐) 두 개의 폴리펩타이드 사이의 30% 이상의 동일성은 기능적 등가성의 표시로 간주되며 따라서 두 개의 단백질이 상동성이라는 표시로 간주된다. 바람직하게는, 상동성인 단백질은 60% 이상의 코버신과의 서열 동일성의 정도를 갖는다. 보다 바람직한 상동체는 코버신과 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 동일성 정도를 갖는다. 본원에 언급된 바와 같은 동일성 퍼센트는 NCBI (the National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 의해 지정된 디폴트 파라미터를 사용하여 BLAST 버전 2.1.3을 사용하여 결정된 바와 같다 [Blosum 62 매트릭스; 캡 개방 패널티=11 및 캡 연장 패널티=1]. 동일성 %는 관련 참조 서열 (예를 들어, 제WO 2004/106369호의 도 4의 아미노산 19-168 (본 출원의 도 2, 서열 번호 2) 또는 제WO 2004/106369호의 도 4의 아미노산 1-168 (본 출원의 도 2, 서열 번호 2)의 전체 길이에 걸쳐 있을 수 있다.

[0255]

따라서, 코버신-타입 단백질은 참조 서열, 예를 들어 제WO 2004/106369호의 도 4의 아미노산 19-168 (본 출원의 도 2, 서열 번호 2) 또는 제WO 2004/106369호의 도 4의 아미노산 1-168 (본 출원의 도 2, 서열 번호 2)과의 특정 아미노산 서열 동일성 %에 대한 언급에 의해, 예를 들어 제WO 2004/106369호의 도 4의 아미노산 19-168 (본 출원의 도 2, 서열 번호 2) 또는 제WO 2004/106369호의 도 4의 아미노산 1-168 (본 출원의 도 2, 서열 번호 2)와 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이들로 이루어진 단백질로서 설명될 수 있다. 코버신-타입 단백질이 상기 서열을 포함하는 경우, 코버신-타입 단백질은 (예를 들어 다른 단백질, 예를 들어 이종 단백질과의) 융합 단백질일 수 있다. 적합한 제2 단백질은 아래에 논의되어 있다.

[0256]

코버신의 몇몇 기능적 등가물이 도 2a에 나타내어져 있으며, 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10개 또는 그 이상의 아미노산의, 야생형 서열에 비해, 아미노산 치환, 삽입 또는 결실 (예를 들어 N 또는 C 말단으로부터의 결실)을 함유하는 돌연변이체를 포함하며 단 이러한 돌연변이체는 야생형 C5 및/또는 C5 다형성 (예를 들어 에콜리주맙에 의한 치료를 비효과적으로 만들거나, 에콜리주맙에 의한 치료의 효능을 감소시키는 C5 다형성)을 갖는 대상체로부터의 C5 및/또는 LTB-4에 결합할 수 있는 능력을 보유해야 한다. 이것은 관련 참조 서열 (즉, 제WO 2004/106369호의 도 4 (본 출원의 도 2)의 아미노산 19-168 또는 상기 도 4 (본 출원의 도 2)의 아미노산 1-168)을 기준으로 한다. 돌연변이체는 단백질의 기능 또는 활성에 불리한 방식으로 영향을 미치지 않는 보존적 아미노산 치환을 함유하는 단백질을 포함할 수 있다. 코버신의 기능적 등가물은 또한 자연 생물학적 변이체 (예를 들어, 코버신이 유래된 종 내의 대립유전자 변이체 또는 지리적 변이체)를 포함한다. 야생형 C5 및/또는 C5 다형성 (예를 들어 에콜리주맙에 의한 치료를 비효과적으로 만들거나, 에콜리주맙에 의한 치료의 효능을 감소시키는 C5 다형성)을 갖는 대상체로부터의 C5 및/또는 LTB-4에 결합하는 개선된 능력을 갖는 돌연변이체가 또한 코버신 서열에서 특정 잔기의 전체 또는 부위 돌연변이를 통해 설계될 수 있다.

[0257]

코버신의 기능적 등가물은 코버신 단백질의 단편 및 상동체를 포함하며, 단 이러한 단편은 야생형 C5 및/또는 C5 다형성 (예를 들어 에콜리주맙에 의한 치료를 비효과적으로 만들거나, 에콜리주맙에 의한 치료의 효능을 감소시키는 C5 다형성)을 갖는 대상체로부터의 C5 및/또는 LTB-4에 결합할 수 있는 능력을 보유해야 한다. 단편은, 예를 들면, 150개 미만의 아미노산, 145, 140, 135, 130, 125, 100, 75, 50개 미만 또는 심지어 25개 이하의 아미노산인 코버신 또는 코버신의 상동체로부터 유도된 폴리펩타이드를 포함할 수 있으며, 단 이들 단편은 야생형 C5 및/또는 C5 다형성 (예를 들어 에콜리주맙에 의한 치료를 비효과적으로 만들거나, 에콜리주맙에 의한

치료의 효능을 감소시키는 C5 다형성)을 갖는 대상체로부터의 C5 및/또는 LTB-4에 결합할 수 있는 능력을 보유해야 한다. 단편은, 예를 들면, 적어도 150개 아미노산, 적어도 145개 아미노산인 코버신 단백질 서열 (또는 상동체)로부터 유도된 폴리펩타이드를 포함할 수 있으며, 단 이들 단편은 보체 약행성 C5 및/또는 C5 다형성 (예를 들어 에콜리주맙에 의한 치료를 비효과적으로 만들거나, 에콜리주맙에 의한 치료의 효능을 감소시키는 C5 다형성)을 갖는 대상체로부터의 C5 및/또는 LTB4에 결합할 수 있는 능력을 보유해야 한다.

[0258] 코버신의 기능적 등가물은 바람직하게는 코버신에서 발견되는 시스테인 잔기의 패턴을 보유한다. 예를 들면, 상기 기능적 등가물은 바람직하게는 제WO 2004/106369호의 도 4 (본 출원의 도 2, 서열 번호 2)에 나타낸 서열의 아미노 말단에서 카복실 말단으로 정렬하여 32개 아미노산, 62개 아미노산, 28개 아미노산, 1개 아미노산 및 21개 아미노산의 거리로 서로에 대해 이격된 6개의 시스테인 잔기를 포함한다. 코버신 단백질의 예시적인 단편은 서열 번호 4, 서열 번호 6, 서열 번호 8, 서열 번호 10, 서열 번호 12, 서열 번호 14에 개시되어 있다. 상응하는 단편을 암호화하는 DNA는 서열 번호 3, 서열 번호 5, 서열 번호 7, 서열 번호 9, 서열 번호 11, 서열 번호 13에 개시되어 있다.

[0259] 코버신의 기능적 등가물은 제WO 2004/106369호의 도 4 (본 출원의 도 2, 서열 번호 2)에서 본원에 명백히 확인된 0. 모우바타의 단편 뿐만 아니라 상기 기술된 바와 같은 이 단백질의 상동체의 단편을 포함한다. 이러한 상동체의 단편은 전형적으로 코버신의 단편과 60% 이상의 동일성을 가질 것이지만, 보다 바람직한 상동체의 단편은 제WO 2004/106369호의 도 4 (본 출원의 도 2, 서열 번호 2)의 코버신의 단편과 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 동일성을 나타낼 것이다. 바람직하게는, 이러한 단편은 위에서 언급한 시스테인 간격을 유지할 것이다. 개선된 특성을 갖는 단편은 물론 야생형 서열의 전체 돌연변이 또는 단편화에 이은 적절한 활성 분석에 의해 합리적으로 설계될 수 있다. 단편은 야생형 C5 또는 C5의 다형성 변이체 중의 어느 하나 또는 둘 다, 또는 LTB-4에 대해 코버신과 유사하거나 더 큰 친화도를 나타낼 수 있다. 이들 단편은 코버신의 단편에 대해 상기한 크기일 수 있다.

[0260] 기능적 등가물은 또한, 예를 들면, 이종 단백질 서열에 대한 코딩 서열에 프레임으로 코버신 또는 이의 기능적 등가물을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 클로닝함으로써 수득되는 융합 단백질일 수 있다. 용어 "이종"은, 본원에서 사용되는 경우, 코버신 단백질 또는 이의 기능적 등가물 이외의 임의의 폴리펩타이드를 명시하도록 의도된다. N- 또는 C-말단에서 가용성 융합 단백질에 포함될 수 있는 이종 서열의 예는 다음과 같다: 막-결합 단백질의 세포외 도메인, 면역글로불린 불변 영역 (Fc 영역), PAS 또는 XTEN 또는 유사한 비구조화된 폴리펩타이드, 다량체화 도메인, 세포외 단백질의 도메인, 신호 서열, 배출 서열, 또는 친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있는 서열. 이들 이종 서열 중 다수는 발현 플라스미드로 상업적으로 이용 가능한데, 그 이유는 이들 서열이 이들에 융합된 단백질의 특이 생물학적 활성을 상당히 손상시키지 않으면서 추가의 특성을 제공하기 위해 융합 단백질에 일반적으로 포함되기 때문이다 (Terpe K, Appl Microbiol Biotechnol, 60: 523-33, 2003). 이러한 추가의 특성의 예는 체액에서의 보다 긴 반감기, 조직 표적화, 세포외 국재화, 또는 히스티딘, GST, FLAG, 아비딘 또는 HA 태그와 같은 태그에 의해 허용되는 바와 같은 보다 용이한 정제이다. 융합 단백질은 성분들이 이러한 링커에 의해 분리되도록 링커 서열 (예를 들어 1-50개 아미노산 길이)을 추가로 함유할 수 있다. 그러나, 본 발명의 측면 중의 어느 것에서도 융합 단백질을 사용하지 않는 것이 바람직하다.

[0261] 따라서 융합 단백질은 코버신-유사 단백질을 포함하는 단백질의 예이며, 구체적인 예로서 PAS 서열 및 코버신-타입 단백질 서열을 포함하는 단백질을 포함한다. PAS 서열은, 예를 들어, 문헌 [Schlapschy M, et al Protein Eng Des Sel. 2013 Aug;26(8):489-501], 및 제EP 08773567.6호에 기술되어 있고, PAS화(PASylation) 코버신 분자는 문헌 [Kuhn et al Bioconjugate Chem., 2016, 27 (10), pp 2359-2371]에 기술되어 있다. PAS화는 아미노산 Pro, Ala, 및/또는 Ser로 구성된 구조적으로 무질서한 폴리펩타이드 서열과 단백질의 유전자 융합을 기술한다. 이것은 XL Protein (<http://xl-protein.com/>)에 의해 개발된 기술이며 유체역학적 부피가 큰 용매화된 무작위 사슬을 이것이 융합되는 단백질에 부착하는 간단한 방법을 제공한다. 폴리펩타이드 서열은 부피가 큰 랜덤 코일 구조를 채택한다. 따라서 생성되는 융합 단백질의 크기는 이것이 융합되는 단백질보다 훨씬 더 크다. 이것은 생물학적 시스템에서 제거율(clearance)을 감소시키는 것으로 나타났다. 적절한 PAS 서열은 제EP08773567.6호 및 상기 Schlapschy 참고 문헌에 기술되어 있다. 임의의 적합한 PAS 서열이 융합 단백질에 사용될 수 있다. 예는 랜덤 코일 형태를 형성하는 적어도 약 100개의 아미노산 잔기로 이루어지고 알라닌, 세린 및 프롤린 잔기로 이루어진 (또는 프롤린 및 알라닌 잔기로 이루어진) 아미노산 서열을 포함한다. 이것은 다수의 아미노산 반복체를 포함할 수 있으며, 여기서 상기 반복체는 Ala, Ser 및 Pro 잔기 (또는 프롤린 및 알라닌 잔기)로 이루어지고 6개 이하의 연속 아미노산 잔기는 동일하다. 프롤린 잔기가 서열의 아미노산의 4% 이상 및 40% 미만을 구성할 수 있다. 서열은 다음으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 이들 서열의 전체 또는 일부로

서 이들 서열의 순환 재배치된 버전 또는 다량체를 포함할 수 있다:

[0262] ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (서열 번호 15),

[0263] AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (서열 번호 16),

[0264] APSSPSPSAPSSPSPASPSS (서열 번호 17),

[0265] SAPSSPSPSAPSSPSPASPS (서열 번호 18),

[0266] SSPSAPSPSPASPSPSSPA (서열 번호 19),

[0267] AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA (서열 번호 20) 및

[0268] ASAAAPAAASAAASAPSAAA (서열 번호 21).

[0269] 예를 들면, PAS 서열에 존재하는 반복체 중 하나, 즉 서열 번호 15-21 중 하나, 바람직하게는 서열 번호 15의 5-40, 10-30, 15-25, 18-20, 바람직하게는 20-30 또는 30개 카페가 있을 수 있다. 바람직하게는 PAS 서열은 서열 번호 15의 30개 카페를 포함하거나 이들로 이루어진다. 바람직하게는 PAS 서열은 (직접적으로 또는 링커 서열을 통해) 코버신-타입 단백질의 N 말단에 융합되며, 특정의 바람직한 실시양태에서 코버신-타입 단백질은 서열 번호 2의 아미노산 19-168, 또는 서열 번호 34 또는 서열 번호 35를 포함하거나 이들로 이루어질 수 있다. 예를 들어 융합 단백질은 (a) 서열 번호 15의 30개 카페를 포함하거나 이들로 이루어진 PAS 서열 및 (b) (i) 서열 번호 2의 아미노산 19-168, (ii) 서열 번호 34, 또는 (iii) 서열 번호 35를 포함하고, 여기서 (a)는 직접적으로 또는 링커 서열을 통해 (b)의 N 말단에 융합된다.

[0270] 융합 단백질은 성분들이 이러한 링커에 의해 분리되도록 링커 서열 (예를 들어 1-50, 2-30, 3-20, 5-10개 아미노산 길이)을 추가로 함유할 수 있다. 하나의 실시양태에서 링커 서열은 단일 알라닌 잔기일 수 있다.

[0271] PAS 서열을 포함하는 융합 단백질의 조성물은 동일 단백질의 비-PAS화 버전을 포함하는 조성물에 비해 증가된 점도를 가질 수 있다. 어떤 상황에서는 이러한 증가된 점도가 불리할 수 있다. 그러나, 본 발명에 따르는 눈 치료 (예를 들어, 국소 눈 치료)와 관련하여, 증가된 점도는 이점을 제공할 수 있다.

[0272] 코버신 및 이의 기능적 등가물은 숙주 세포에서 발현에 의해 재조합체 형태로 제조될 수 있다. 이러한 발현 방법은 당업계의 숙련가들에게 널리 알려져 있으며 문헌[Sambrook *et al* (2000) and Fernandez & Hoeffler (1998)]에 상세하게 기술되어 있다. 코버신 및 이의 기능적 등가물의 재조합체 형태는 바람직하게는 비글리코 실화된다. 바람직하게는 숙주 세포는 대장균(*E.coli*)이다.

[0273] 코버신-타입 단백질은 바람직하게는 단리된 형태, 예를 들어, 이것이 발현되는 숙주 세포 및/또는 세포 성장 배지의 적어도 하나의 성분으로부터 분리된 형태이다. 일부 실시양태에서, 코버신-타입 단백질은, 예를 들면, 전기영동 또는 크로마토그래피에 의해 결정되는 바와 같이 적어도 90%, 95% 또는 99% 순도로 정제된다. 코버신-타입 단백질은 또한 단백질 화학의 통상의 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들면, 단백질 단편은 화학적 협성에 의해 제조될 수 있다. 융합 단백질의 생성을 위한 방법은 본 기술 분야의 표준이며 당업자에게 공지되어 있을 것이다. 예를 들면, 가장 일반적인 분자 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 기술 및 면역 기술은 문헌 [Sambrook *et al* (2000) or Ausubel *et al.* (1991)]에서 찾아볼 수 있다.

[0274] 바람직하게는, 코버신-타입 단백질은 항체 또는 융합 단백질이 아니다.

[0275] 코버신-타입 단백질은 다형성 형태이든간에 C5 및 LTB-4 둘 다에 결합할 수 있는 것이 더욱 바람직하다.

[0276] 코버신-타입 단백질은 레보카블라스틴, 케토티펜 또는 로독사미드와 같은 항히스타민제와 같이 눈의 장애를 치료하는데 사용되는 다른 약제와 조합하여 사용될 수 있다. 따라서, 코버신-타입 단백질이 하나 이상의 다른 치료와 조합하여 사용되는 경우, 이것은 제2 치료로 반흔성 안구 염증성 장애, 특히 쇼그렌 증후군, 점막 유천포창 또는 아토피성 각결막염을 치료 또는 예방하는 방법에서 사용하기 위한 코버신-타입 단백질 (예를 들어 도 2의 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질) 또는 이러한 단백질의 기능적 등가물로서, 또는 코버신-타입 단백질 (예를 들어 도 2의 아미노산 서열 (서열 번호 2)의 아미노산 19 내지 168을 포함하는 단백질) 또는 이러한 단백질의 기능적 등가물로 반흔성 안구 염증성 장애, 특히 쇼그렌 증후군, 점막 유천포창 또는 아토피성 각결막염을 치료 또는 예방하는 방법에서 사용하기 위한 제2 치료로서 설명될 수 있다.

[0277] 본 발명의 모든 측면에서, 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체는 주로 인간 대상체일 것으로 예상된다. 그러나, 본 발명의 모든 측면은 포유동물 대상체, 특히 사육 포유동물 또는 양식 포유동물과 같은 다른 대상체와 관

련하여 사용될 수 있다.

[0278] 제제는 치료적 또는 예방적 유효량으로 투여될 수 있다. 용어 "치료적 유효량"은 반흔성 안구 염증성 장애를 치료하는데 필요한 제제의 양을 가리킨다. 이러한 맥락에서, "치료하는"은 장애의 중증도를 감소시킴을 포함한다.

[0279] 본원에서 사용되는 용어 "예방적 유효량"은 반흔성 안구 염증성 장애를 예방하는데 필요한 제제의 양을 가리킨다. 이러한 맥락에서, "예방하는"은, 예를 들어 제제의 투여가 시작되기 전에 장애의 존재가 검출되지 않는다면, 장애의 중증도를 감소시킴을 포함한다.

[0280] 감소 또는 개선은 본원에 기술된 바와 같은 투여 또는 제제의 부재하에서의 결과에 대한 것이다. 결과는 이러한 환자를 평가하는데 사용되는 표준 기준에 따라 평가된다. 이를 정량화할 수 있는 정도로, 상기 논의된 바와 같은 상대 점수매김 기준에서 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%의 감소 또는 개선이 존재한다.

도면의 간단한 설명

[0281] 본 출원의 도면에서:

도 1은 고전 및 대체 보체 경로를 보여주고;

도 2a는 코버신에 대한 서열을 보여주며 (서열 번호 1은 뉴클레오티드 서열이고 서열 번호 2는 아미노산 서열이다);

도 2b는 다수의 코버신 돌연변이체를 보여주고 (서열 번호 4, 6, 8, 10, 12, 14, 상응하는 단편을 암호화하는 DNA 서열은 각각 서열 번호 3, 5, 7, 9, 11 및 13이다);

도 3은 모든 눈으로부터 전체로서 점수매겨진, 난백 일부만 및 각종 다른 제제로 처리된 마우스에 대한 EIC 점수매김을 보여주고;

도 4는 임의의 주어진 동물에서 양안의 평균으로서 점수매겨진, 난백 일부만 및 각종 다른 제제로 처리된 마우스에 대한 EIC 점수매김을 보여준다.

도 5는 감소되거나 부재하는 C5-결합 활성을 갖지만 LTB-4-결합 능력을 보유하는 특정 변형된 코버신 폴리펩타이드의 서열을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0282] 본 출원에서 언급된 바와 같은 서열은 다음과 같다:

[0283] 서열 번호 1은 도 2a에 나타낸 바와 같은 뉴클레오티드 서열이다. 서열 번호 2는 성숙 단백질에는 부재하는 18개의 아미노산 신호 서열을 포함하여, 도 2a에 나타낸 바와 같은 코버신의 아미노산 서열이다.

[0284] 서열 번호 3은 서열 번호 4를 암호화하는 뉴클레오티드 서열이다.

[0285] 서열 번호 4는 성숙 코버신 아미노산 서열 (서열 번호 2의 아미노산 19-168)이다.

[0286] 서열 번호 5는 서열 번호 6을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이다.

[0287] 서열 번호 6은 성숙 코버신 아미노산 서열의 149개 아미노산 단편 (서열 번호 2의 아미노산 20-168)이다.

[0288] 서열 번호 7은 서열 번호 8을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이다.

[0289] 서열 번호 8은 성숙 코버신 아미노산 서열의 148개 아미노산 단편 (서열 번호 2의 아미노산 21-168)이다.

[0290] 서열 번호 9는 서열 번호 10을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이다.

[0291] 서열 번호 10은 성숙 코버신 아미노산 서열의 147개 아미노산 단편 (서열 번호 2의 아미노산 22-168)이다.

[0292] 서열 번호 11은 서열 번호 12를 암호화하는 뉴클레오티드 서열이다.

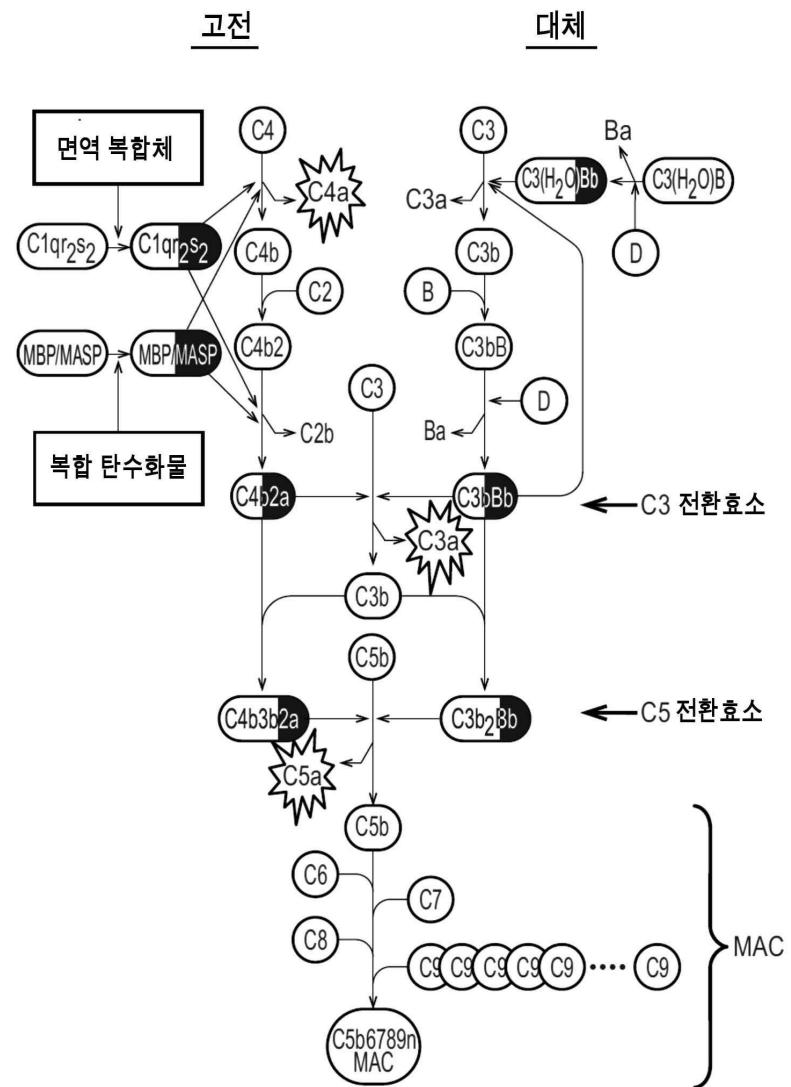
[0293] 서열 번호 12는 성숙 코버신 아미노산 서열의 146개 아미노산 단편 (서열 번호 2의 아미노산 23-168)이다.

[0294] 서열 번호 13은 서열 번호 12를 암호화하는 뉴클레오티드 서열이다.

- [0295] 서열 번호 14는 성숙 코버신 아미노산 서열의 145개 아미노산 단편 (서열 번호 2의 아미노산 24-168)이다.
- [0296] 서열 번호 15 내지 21은 PAS 서열이다.
- [0297] 서열 번호 22 내지 33은 제WO 2015/185945호의 서열 번호 1-12이다.
- [0298] 서열 번호 34 내지 41은 특정 변형된 코버신 폴리펩타이드을 정의하는데 사용되는 서열이다.
- [0299] 본 발명은 이제 이하에서 단지 예로서 보다 상세하게 설명될 것이다.
- [0300] 마우스 연구는 문헌[Ahadome S. D. et. al. in JCI Insight, 2016 Aug 4;1(12). pii: e87012]에 기술된 프로토콜에 따라 수행하였다. 이러한 프로토콜에서, 마우스에게 먼저 14일 동안 난백 알부민을 전신 주사한 다음, 15일 이후에 마우스의 눈에 국소 난백 알부민을 시험투여하였다. 18일 이후에, 마우스의 눈을 다양한 양의 코버신-타입 단백질을 함유하는 광학적으로 허용되는 용액 또는 대조물로 처리하였다.
- [0301] 마우스를 7개의 동물 그룹으로 나누었다. 그룹 1 (EIC + PBS)은 또한 각 눈에 PBS를 제공받았다. 그룹 2 (EIC + 0.063% 코버신)는 또한 0.063% (w/v) 코버신을 함유하는 PBS를 제공받았다. 이것은 각 눈에 각각 적용시 25.2 μ g의 코버신에 해당한다. 그룹 3 (EIC + 0.125% 코버신)은 또한 0.125% (w/v) 코버신을 함유하는 PBS를 제공받았다. 이것은 각 눈에 각각 적용시 50.4 μ g의 코버신에 해당한다. 그룹 4 (EIC + 0.25% 코버신)는 또한 0.25% (w/v) 코버신을 함유하는 PBS를 제공받았다. 이것은 각 눈에 각각 적용시 100.8 μ g의 코버신에 해당한다. 그룹 5 (EIC + 0.5% 코버신)는 또한 0.5% (w/v) 코버신을 함유하는 PBS를 제공받았다. 이것은 각 눈에 각각 적용시 201.6 μ g의 코버신에 해당한다. 그룹 6 (EIC + EV131)은 또한 EV131을 함유하는 PBS를 제공받았다. 그룹 7 (EIC=EV131 + 코버신 0.25%)은 또한 EV131 및 0.25% (w/v) 코버신을 함유하는 PBS를 제공받았다.
- [0302] 모든 마우스는 각 마우스의 각 눈의 상태의 중증도를 등급화하고 0 내지 10의 척도로 점수를 매기는 훈련된 조사자에 의해 검사되었고, 여기서 0은 증상의 부재를 나타내고 10은 가장 심각한 증상을 나타낸다.
- [0303] 연구의 결과가 도 3 및 4에 그래프로 나타내어져 있다. 도 3에는, 각 눈에 대한 점수가 기록되었다. 도 4에는, 각 마우스의 좌안 및 우안의 조합에 대한 평균 점수가 기록되었다. 코버신은 마우스에 대한 점수를 감소시켰으며, 연장된 치료 후 더 적은 용량 (6일째에 0.063% 내지 0.25% 코버신)에서 최고의 감소가 보여진다는 것을 도면으로부터 알 수 있다.
- [0304] 이것은 반흔성 안구 염증성 장애, 특히 쇼그렌 증후군, 점막 유천포창 및 아토피성 각결막염을 앓는 환자에서 코버신-타입 단백질로 눈을 국소 치료하면 증상이 성공적으로 감소될 것임을 명백히 입증한다.
- [0305] 본 발명은 단지 예로서 상기 기술되었으며 본 발명은 상기 언급된 특정 연구에 제한되지 않는다. 오히려 본 발명의 범위는 첨부된 청구 범위에 의해 정의된다.

도면

도면1



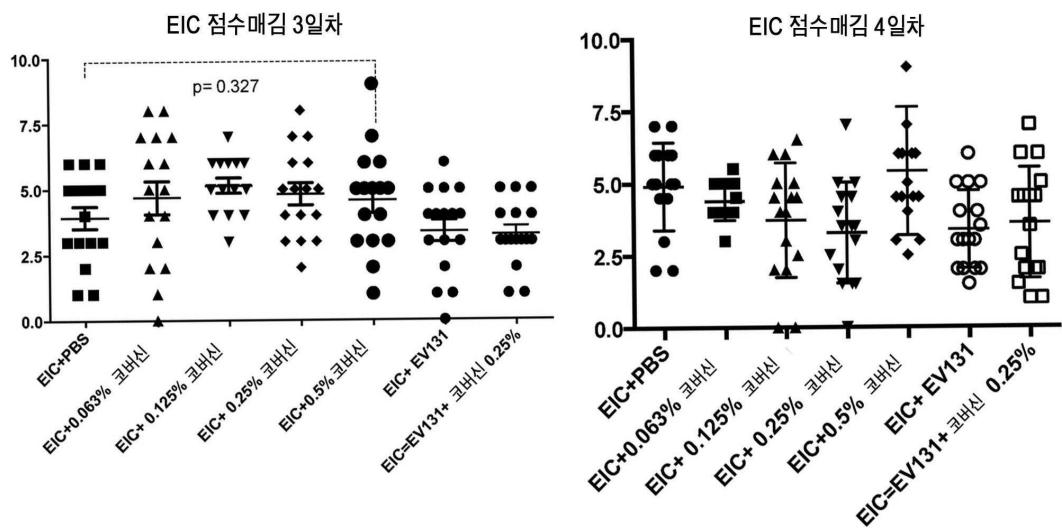
도면2a

ATGCTGGTTTGGTGACCCGTATTTCTCCTTCTGCGAACATCGCATATGCTGACAGC 60
M L V L V T L I F S F S A N I A Y A D S 20
 GAAAGCGACTGCACGTGAAGCGAACCTGTTGACGCCCTCAAGCTTCAGTGAGGGCAA 120
 E S D C T G S E P V D A F Q A F S E G K 40
 GAGGCATATGCTCTGGTGAGGTCCACGGATCCCAGCGAGGGACTGCTTGAAGGAGAA 180
 E A Y V L V R S T D P K A R D C L K G E 60
 CCAGCCGGAGAAAAGCAGGACAACACGTTGCCGGTGTGATGACGTTAAGAATGGCACA 240
 P A G E K Q D N T L P V M M T F K N G T 80
 GACTGGGCTCAACCGATTGGACGTTACTTGGACGGCGCAAAGGTAACGGCAACCCTT 300
 D W A S T D W T F T L D G A K V T A T L 100
 GGTAAACCTAACCCAAAAATAGGGAAAGTGGTCTACGACTCGCAAAGTCATCACTGCCACGTT 360
 G N L T Q N R E V V Y D S Q S H H C H V 120
 GACAAGGTGAGAAGGAAGTTCCAGATTATGAGATGTGGATGCTCGATGGGGAGGGCTT 420
 D K V E K E V P D Y E M W M L D - A G G L 140
 GAAAGTGGAAAGTCGAGTGCTGCCGTCAAAAGCTTGAAGAGTTGGCGTCTGGCAGGAACCAA 480
 E V E V E C C R Q K L E E L A S G R N Q 160
 ATGTATCCCCATCTCAAGGACTGCTAG 507
 M Y P H L K D C * 168

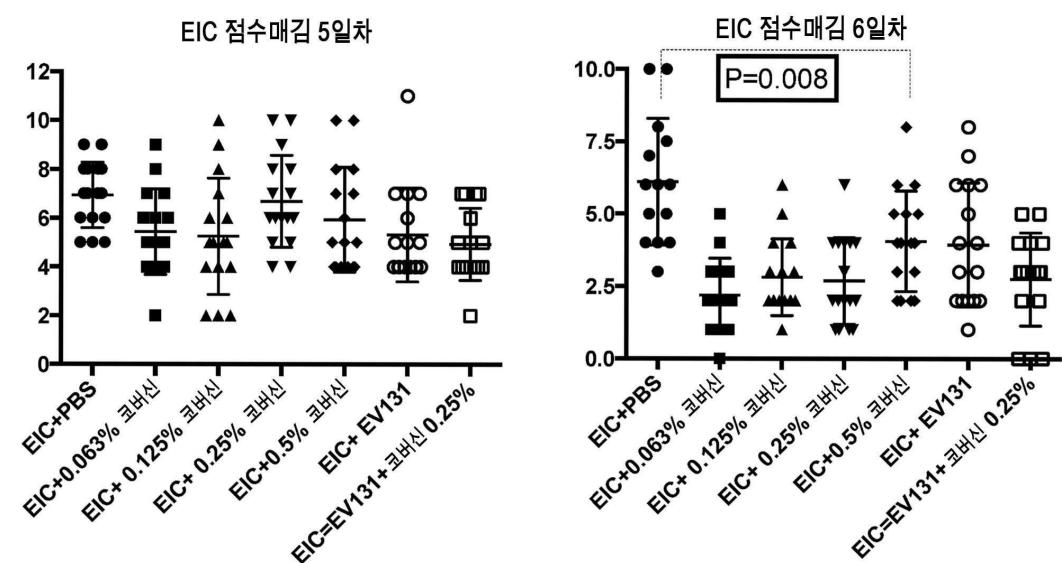
도면2b

서열 번호:4(150아미노산)	dsedctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepagekqdn tlpvmmmtfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgnltqnre vvydsqshhc hvdkvekevp dyemwmldag gleveveccr qkleelasgr nqmyphlkdc
서열 번호:6(149아미노산)	sesdctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepagekqdn tlpvmmmtfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgnltqnre vvydsqshhc hvdkvekevp dyemwmldag gleveveccr qkleelasgr nqmyphlkdc
서열 번호:8(148아미노산)	esdctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepagekqdn tlpvmmmtfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgnltqnre vvydsqshhc hvdkvekevp dyemwmldag gleveveccr qkleelasgr nqmyphlkdc
서열 번호:10(147아미노산)	sdctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepagekqdn tlpvmmmtfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgnltqnre vvydsqshhc hvdkvekevp dyemwmldag gleveveccr qkleelasgr nqmyphlkdc
서열 번호:12(146아미노산)	dctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepagekqdn tlpvmmmtfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgnltqnre vvydsqshhc hvdkvekevp dyemwmldag gleveveccr qkleelasgr nqmyphlkdc
서열 번호:14(1450아미노산)	ctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepagekqdn tlpvmmmtfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgnltqnre vvydsqshhc hvdkvekevp dyemwmldag gleveveccr qkleelasgr nqmyphlkdc

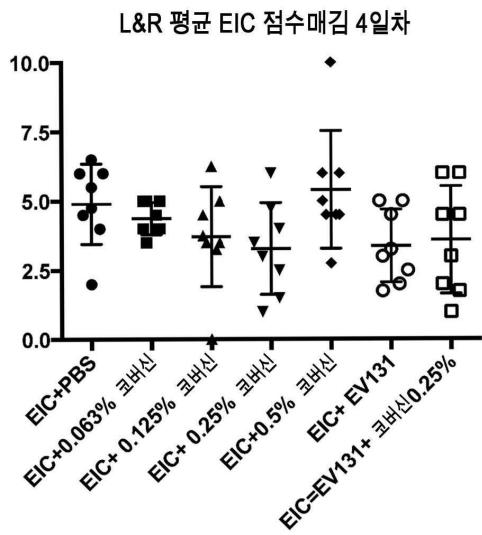
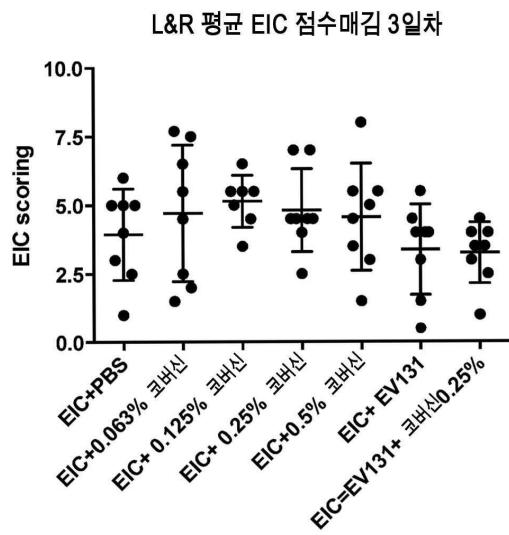
도면3a



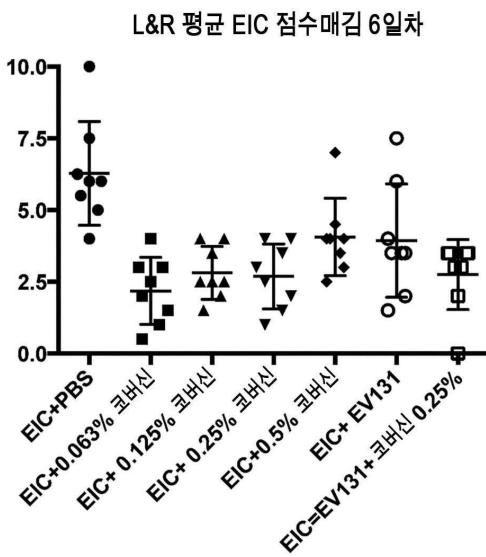
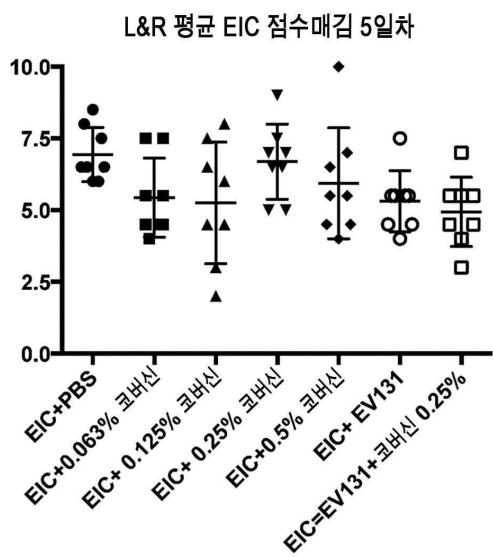
도면3b



도면4a



도면4b



도면5

돌연변이체 #1 서열 번호:34 (150 아미노산)

```
dsesdctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepagekqdn
tlpvmmntfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgnltqnre vvydsqshhc
hvdkvekevp dyeqwqsngs addkeveccr qkleelasgr nqmyphlkdc
```

돌연변이체 #2 서열 번호:35 (150 아미노산)

```
dsesdctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepngekqdn
tlpvmmntfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgnltqnre vvydsqshhc
hvdkvekevp dyemwqsdag adaveveccr qkleelasgr nqmyphlkgc
```

돌연변이체 #3 서열 번호:36 (150 아미노산)

```
dsesdctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepngekqdn
tlpvmmntfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgnltqnre vvydsqshhc
hvdkvekevp dyemwqltag gleveveccr qkleelasgr nqmyphlkgc
```

돌연변이체 #4 서열 번호:37 (150 아미노산)

```
dsesdctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepngekqdn
tlpvmmntfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgnltqnre vvydsqshhc
hvdkvekevp dyemwmltag gleveveccr qkleelasgr nqmyphlkdc
```

서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124 및 서열 번호 2의 132-142로부터의 서열 번호 38

(11개 아미노산)

mwmldagglev

코버신 변이체 1 (서열 번호 34)에서 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124로부터의 서열 번호 39
(11개 아미노산)

qwqsngsaddk

코버신 변이체 2 (서열 번호 35)에서 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124로부터의 서열 번호 40
(11개 아미노산)

mwqsdagadav

코버신 변이체 3 (서열 번호 36)에서 서열 번호 4의 아미노산 위치 114 내지 124로부터의 서열 번호 41
(11개 아미노산)

mwqldagggdev

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> VOLUTION IMMUNO PHARMACEUTICALS SA

<120> COVERSIN FOR THE TREATMENT OF CICATRISING

EYE INFLAMMATORY DISORDERS

<130> IPA191229-GB

<141> 2018-04-20

<150> GB 1706398.3

<151> 2017-04-21

<150> GB 1706406.4

<151> 2017-04-21

<160> 41

<170> SeqWin2010, version 1.0

<210> 1

<211> 507

<212> DNA

<213> Ornithodoros moubata

<400> 1

atgctggttt tggtgaccct gattttctcc ttttctgcga acatcgata tgctgacagc 60
gaaagcgcact gcactggaag cgaaccttgc ttggacgtttt aagcttcag tgaggcaaa 120

gaggcatatg tcctggtag gtccacggat cccaaagcga gggactgctt gaaaggagaa 180
ccagccggag aaaagcagga caacacgtt ccgggtatga tgacgttaa gaatggcaca 240
gactggcctt caaccgattt gacgtttact ttggacggcg caaaggtaac ggcaaccctt 300
ggtaacctaa cccaaaatag ggaagtggtc tacgactcgc aaagtcatca ctgccacgtt 360
gacaaggctcg agaaggaagt tccagattt gagatgtgga tgctcgatgc gggaggcctt 420
gaagtggaaag tcgagtgtcg ccgtcaaaag cttgaagagt tggcgctctgg caggaaccaa 480
atgtatcccc atctcaagga ctgcttag 507

<210

> 2

<211> 168

<212> PRT

<213> Ornithodoros moubata

<400> 2

Met Leu Val Leu Val Thr Leu Ile Phe Ser Phe Ser Ala Asn Ile Ala

1 5 10 15

Tyr Ala Asp Ser Glu Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala

20 25 30

Phe Gln Ala Phe Ser Glu Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu Val Arg Ser

35 40 45

Thr Asp Pro Lys Ala Arg Asp Cys Leu Lys Gly Glu Pro Ala Gly Glu

50 55 60

Lys Gln Asp Asn Thr Leu Pro Val Met Met Thr Phe Lys Asn Gly Thr
 65 70 75 80
 Asp Trp Ala Ser Thr Asp Trp Thr Phe Thr Leu Asp Gly Ala Lys Val
 85 90 95
 Thr Ala Thr Leu Gly Asn Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val Val Tyr Asp
 100 105 110
 Ser Gln Ser His His Cys His Val Asp Lys Val Glu Lys Glu Val Pro
 115 120 125
 Asp Tyr Glu Met Trp Met Leu Asp Ala Gly Gly Leu Glu Val Glu Val
 130 135 140
 Glu Cys Cys Arg Gln Lys Leu Glu Glu Leu Ala Ser Gly Arg Asn Gln
 145 150 155 160
 Met Tyr Pro His Leu Lys Asp Cys
 165

<210> 3
<211> 453
<212> DNA
<213> Ornithodoros moubata
<400> 3

gacagcggaa ggcactgcac tggaagcgaa cctgttgacg cttccaagg tttcagttag 60

ggcaaagagg catatgtcct ggtgaggtcc acggatccca aagcgaggga ctgcttggaa 120
 ggagaaccag ccggagaaaa gcaggacaac acgttgccgg tggatgtac gtttaagaat 180
 ggcacagact gggcttcaac cgattggacg ttactttgg acggcgaaa ggttaacggca 240
 acccttggta acctaaccac aaatagggaa gtggtctacg actcgcaaag tcatactgc 300
 cacgttgaca aggtcgagaa ggaagttcca gattatgaga tggatgtct cgtatgcggga 360
 gggcttgaag tggaagtcga gtgctgccgt caaaagctt aagagttggc gtctggcagg 420
 aaccaaatgt atccccatct caaggactgc tag 453

<210

> 4
<211> 150
<212> PRT
<213> Ornithodoros moubata
<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Pro His Leu Lys Asp Cys

145 150

<210> 5

<211> 450

<212> DNA

<213> Ornithodoros moubata

<400> 5

agcgaaagcg actgcactgg aagcgaacct gttgacgcct tccaagctt cagtgaggc 60

aaagaggcat atgtcctggt gaggtccacg gatccaaag cgagggactg cttgaaagga 120

gaaccagccg gagaaaagca ggacaacacg ttgccggta tcatgacgtt taagaatggc 180

acagactggg ctcaaccga ttggacgtt acttggacg ggcggaaagg aacggcaacc 240

cttgtaacc taacccaaa taggaaagtg gtctacgact cgccaaagtca tcactgccac 300

tttgacaagg tcgagaagga agttccagat tatgagatgt ggatgctcga tgccggaggg 360

cttgaagtgg aagtgcgatg ctgccgtcaa aagcttgaag agttggcgtc tggcaggaac 420

caaatgtatc cccatctcaa ggactgctag 450

<210> 6

<211> 149

<212> PRT

<213> Ornithodoros moubata

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

His Leu Lys Asp Cys

145

<210> 7

<211> 447

<212> DNA

<213> Ornithodoros moubata

<400> 7

gaaagcgact gcactggaag cgaacctgtt gacgccttcc aagcttcag tgaggcaaa 60

gaggcatatg tcctggtag gtccacggat cccaaagcga gggactgctt gaaaggagaa 120
 ccagccggag aaaagcagga caacacgtt ccggatgatga tgacgttaa gaatggcaca 180
 gactggcctt caaccgattt gacgtttact ttggacggcg caaaggtaac ggcaaccctt 240
 gtaaccta cccaaaatag ggaagtggtc tacgactcgc aaagtcatca ctgccactt 300

gacaaggctcg agaaggaagt tccagattt gagatgtgga tgctcgatgc gggagggctt 360
 gaagtggaaag tcgagtgctg ccgtcaaaag cttgaagagt tggcgcttgg caggaaccaa 420
 atgtatcccc atctcaagga ctgcttag 447

<210> 8

<211> 148

<212> PRT

<213> Ornithodoros moubata

<400> 8

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

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

Thr	Leu	Pro	Val	Met	Met	Thr	Phe	Lys	Asn	Gly	Thr	Asp	Trp	Ala	Ser
50			55					60							
Thr	Asp	Trp	Thr	Phe	Thr	Leu	Asp	Gly	Ala	Lys	Val	Thr	Ala	Thr	Leu
65			70			75			80						
Gly	Asn	Leu	Thr	Gln	Asn	Arg	Glu	Val	Val	Tyr	Asp	Ser	Gln	Ser	His
85			90			95									

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

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

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

Leu Lys Asp Cys

145

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

agcgactgca ctggaagcga acctgttgc accttccaag cttcagtga gggcaaagag 60
gcataatgtcc tggtgaggc cacggatccc aaagcgaggg actgcttgaa aggagaacca 120
gccggagaaa agcaggacaa cacgttgccg gtgatgtga cgtttaagaa tggcacagac 180
tgggcttcaa ccgattggac gtttacttig gacggcgcaa agttaacggc aacccttgtt 240
aacctaacc aaaaataggga agtggtctac gactcgaaa gtcatcaactg ccacgttgac 300
aaggctgaga aggaagttcc agattatgag atgtggatgc tcgatgcggg agggcttcaa 360
gtggaagtgc agtgctgccc tcaaaagctt gaagagttgg cgtctggcag gaaccaaatg 420
tatccccatc tcaaggactg ctag 444

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

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Lys Asp Cys

145

<210> 11

<211> 441

<212> DNA

<213> Ornithodoros moubata

<400> 11

gactgcactg gaagcgaacc tggacgcc ttccaagctt tcagtggagg caaaggaggca 60

tatgtcctgg tgagggtccac ggatccaaa gcgaggggact gcttggaaagg agaaccagcc 120

ggagaaaaaggc aggacaacac gttgcgggtg atgatgacgt ttaagaatgg cacagactgg 180

gcttcaaccg attggacgtt tactttggac ggcgcaaagg taacggcaac ccttggtaac 240

ctaaccctaaa atagggaagt ggtctacgac tcgcaaagtc atcactgcca cggtgacaag 300

gtcgagaagg aagtccaga ttatgagatg tggatgctcg atgcgggagg gcttgaagtg 360

gaagtgcgatg gctgcccgtca aaagcttggaa gagttggcgt ctggcaggaa ccaaatttat 420

ccccatctca aggactgcta g 441

<210> 12

<211> 146

<212> PRT

<213> Ornithodoros moubata

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Asp Cys

145

<210> 13

<211> 438

<212> DNA

<213> Ornithodoros moubata

<400> 13

tgcactggaa gccaacctgt tgacgccttc caagcttca gtgaggccaa agaggcatat 60
 gtccttgtga ggtccacgga tcccaaagecg agggactgct taaaaggaga accagccgga 120
 gaaaaggcagg acaaacacggtt gccggtgatg atgacgttta agaatggcac agactggct 180
 tcaaccgatt ggacgtttac ttggacggc gcaaaggtaa cggcaaccct tggtaaccta 240
 acccaaaata gggaaagtggt ctacgactcg caaagtcatc actgccacgt tgacaaggc 300

gagaaggaag ttccagatta ttagatgtgg atgctcgatg cgggaggcgt tgaatggaa 360
 gtcgagtgtc gccgtcaaaa gtttgaagag ttggcgctcg gcaggaacca aatgtatccc 420
 catctcaagg actgcttag 438

<210> 14

<211> 145

<212> PRT

<213> Ornithodoros moubata

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

Thr Gln Asn Arg Glu Val Val Tyr Asp Ser Gln Ser His His Cys His

85	90	95
----	----	----

Val Asp Lys Val Glu Lys Glu Val Pro Asp Tyr Glu Met Trp Met Leu

100	105	110
-----	-----	-----

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

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

Cys

145

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAS sequence

<400

> 15

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Ala Pro Ala

20

<210> 16

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAS sequence

<400> 16

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

1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser

20

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAS sequence

<400> 17

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

1 5 10 15

Ser Pro Ser Ser

20

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAS sequence

<400> 18

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

1 5 10 15

Ala Ser Pro Ser

20

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAS sequence

<400> 19

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

1 5 10 15

Ser Ser Pro Ala

20

<210> 20

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAS sequence

<400> 20

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

1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala

20

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAS sequence

<400> 21

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

1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala

20

<210> 22

<211> 78

<212> PRT

<213> Rhipicephalus appendiculatus

<400> 22

Glu Glu Val Lys Thr Thr Pro Ile Pro Asn His Gln Cys Val Asn Ala

1 5 10 15

Thr Cys Glu Arg Lys Leu Asp Ala Leu Gly Asn Ala Val Ile Thr Lys

20

25

30

Cys Pro Gln Gly Cys Leu Cys Val Val Arg Gly Ala Ser Asn Ile Val

35 40 45

Pro Ala Asn Gly Thr Cys Phe Gln Leu Ala Thr Thr Lys Pro Pro Met

50 55 60

Ala Pro Gly Asp Asn Lys Asp Asn Lys Glu Glu Ser Asn

65 70 75

<210> 23

<211> 74

<212> PRT

<213> Rhipicephalus appendiculatus

<400> 23

Thr Ala Glu Ala Thr Leu Ser Ile Asn Gly Gly Asp Met Cys Ile Glu

1 5 10 15

Lys Thr Cys Asn Arg Ser Ile Asp Ala Ala Gly Lys Lys Val Ile Ala

20 25 30

Gly Cys Pro Gly Gly Cys Leu Cys Val Phe Asn Val Ser Asp Val Thr

35 40 45

Tyr Pro Ala Asn Gly Thr Cys Tyr Gln Leu Ala Thr Thr Thr Asn

50 55 60

Arg Pro Gly Ala Val Met Glu Arg Glu Arg

65 70

<210> 24

<211> 78

<212> PRT

<213> Rhipicephalus appendiculatus

<400> 24

Ser Gly Glu Ser Gln Ser Ile Gln Arg Lys Gly Gln Cys Glu Glu Val

1 5 10 15

Ile Cys His Arg Lys Leu Asn His Leu Gly Glu Arg Val Thr Ser Gly

20 25 30

Cys Pro Thr Gly Cys Leu Cys Val Ile Arg Glu Pro Asp Asn Val Asp

35 40 45

Asn Ala Asn Gly Thr Cys Tyr Ala Leu Met Ser Ser Thr Thr Thr

50	55	60	
Thr Thr Thr Pro Asp Gly Thr Thr Ser Glu Glu Glu			
65	70	75	
<210> 25			
<211> 72			
<212> PRT			
<213> Rhipicephalus appendiculatus			
<400> 25			
Gln Glu Pro Thr Thr Pro Leu Lys Ala Ala Ser Gln Cys Ser Asn Val			
1	5	10	15
Lys Cys Arg Arg Arg Phe Asp His Leu Gly Asn Ser Val Thr Glu Gly			
20	25	30	
Cys Pro Ser Gly Cys Leu Cys Val Tyr Gln Ala Thr Gly Tyr Asn Gln			
35	40	45	
Glu Ala Asn Gly Thr Cys Tyr Glu Leu Met Lys Thr Ser Thr Thr			
50	55	60	
Thr Thr Glu Gly Thr Pro Ala Gln			
65	70		
<210> 26			
<211> 75			
<212> PRT			
<213>			
Rhipicephalus appendiculatus			
<400> 26			
Ser Gly Glu Ser Gln Ser Ile Gln Arg Lys Gly Gln Cys Glu Glu Val			
1	5	10	15
Thr Cys His Arg Thr Leu Asn His Leu Gly Val Ala Val Thr Ser Gly			
20	25	30	
Cys Pro Ser Gly Cys Leu Cys Val Ile Ser Ala Pro Asp Ser Ala Val			
35	40	45	
Asn Val Asn Gly Thr Cys Tyr Gln Leu Met Gly Ser Thr Ser Thr			
50	55	60	
Thr Ser Ser Thr Pro Ser Ser Glu Asp Gln Glu			

65 70 75

<210> 27

<211> 77

<212> PRT

<213> Rhipicephalus appendiculatus

<400> 27

Glu Glu Ala Asn Thr Thr Pro Ile Ser Val Lys Asp Gln Cys Ala Asn

1 5 10 15

Val Thr Cys Arg Arg Thr Val Asp Asn Arg Gly Lys Arg His Ile Asp

20 25 30

Gly Cys Pro Pro Gly Cys Leu Cys Val Leu Lys Gly Pro Asp Ser Lys

35 40 45

Asp Asn Leu Asp Gly Thr Cys Tyr Leu Leu Ala Thr Thr Pro Lys Ser

50 55 60

Thr Thr Thr Ser Thr Glu Gln Ser Phe Asn Met Glu Glu

65 70 75

<210> 28

<211> 78

<212> PRT

<213> Rhipicephalus appendiculatus

<400> 28

Ser Gly Glu Ser Gln Ser Ile Gln Arg Asn Gly Arg Cys Glu Glu Val

1 5 10 15

Thr Cys Gln Arg Lys Pro Asn His Leu Gly Val Ala Val Thr Ser Gly

20 25 30

Cys Pro Pro Gly Cys Leu Cys Val Ile Gln Ala Pro Asp Asn Ala Val

35 40 45

Asn Ala Asn Gly Thr Arg Tyr Glu Leu Met Thr Thr Thr Thr Lys

50 55 60

Thr Thr Thr Ser Gly Thr Pro Ser Ser Glu Asp Pro Glu

65 70 75

<210> 29

<211> 77

<212> PRT

<213> Rhipicephalus appendiculatus

<400> 29

Glu Glu Ala Asn Thr Thr Pro Ile Ser Val Lys Asp Gln Cys Ala Asn

1 5 10 15

Val Thr Cys Arg Arg Thr Val Asp Asn Arg Gly Lys Arg His Ile Asp

20 25 30

Gly Tyr Pro Pro Gly Cys Leu Cys Val Leu Lys Gly Pro Asp Ser Lys

35 40 45

Asp Asn Leu Asp Gly Thr Cys Tyr Leu Leu Thr Thr Pro Lys Pro

50 55 60

Thr Thr Thr Ser Thr Glu Gln Ser Phe Asn Met Glu Glu

65 70 75

<210> 30

<211> 98

<212> PRT

<213> Rhipicephalus appendiculatus

<400> 30

Met Asn Ala Met Leu Val Leu Phe Ile Ala Ser Ala Leu Phe Ile Ser

1 5 10 15

Glu His Asn Thr Glu Glu Val Lys Thr Thr Pro Ile Pro Asn His Gln

20 25 30

Cys Val Asn Ala Thr Cys Glu Arg Lys Leu Asp Ala Leu Gly Asn Ala

35 40 45

Val Ile Thr Lys Cys Pro Gln Gly Cys Leu Cys Val Val Arg Gly Ala

50 55 60

Ser Asn Ile Val Pro Ala Asn Gly Thr Cys Phe Gln Leu Ala Thr Thr

65 70 75 80

Lys Pro Pro Met Ala Pro Gly Asp Asn Lys Asp Asn Lys Glu Glu Glu

85 90 95

Ser Asn

<210> 31
<211> 104
<212> PRT
<213> Rhipicephalus appendiculatus
<400> 31

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

Asp Ala Leu Gly Asn Ala Val Ile Thr Lys Cys Pro Gln Gly Cys Leu
50 55 60
Cys Val Val Arg Gly Ala Ser Asn Ile Val Pro Ala Asn Gly Thr Cys
65 70 75 80
Phe Gln Leu Ala Thr Thr Lys Pro Pro Met Ala Pro Gly Asn Lys
85 90 95
Asp Asn Lys Glu Glu Ser Asn
100

<210> 32
<211> 86
<212> PRT
<213>
Rhipicephalus appendiculatus
<400> 32

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

50	55	60
Leu Ala Thr Thr Lys Pro Pro Met Ala Pro Gly Asp Asn Lys Asp Asn		
65	70	75
Lys Glu Glu Glu Ser Asn		
85		
<210>	33	
<211>	42	
<212>	PRT	
<213>	Rhipicephalus appendiculatus	
<400>	33	
Cys Val Asn Ala Thr Cys Glu Arg Lys Leu Asp Ala Leu Gly Asn Ala		
1	5	10
Val Ile Thr Lys Cys Pro Gln Gly Cys Leu Cys Val Val Arg Gly Ala		
20 25 30		
Ser Asn Ile Val Pro Ala Asn Gly Thr Cys		
35	40	
<210>	34	
<211>	150	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Coversin variant 1	
<400>	34	
Asp Ser Glu Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala Phe Gln		
1	5	10
Ala Phe Ser Glu Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu Val Arg Ser Thr Asp		
20 25 30		
Pro Lys Ala Arg Asp Cys Leu Lys Gly Glu Pro Ala Gly Glu Lys Gln		
35 40 45		
Asp Asn Thr Leu Pro Val Met Met Thr Phe Lys Asn Gly Thr Asp Trp		
50	55	60
Ala Ser Thr Asp Trp Thr Phe Thr Leu Asp Gly Ala Lys Val Thr Ala		
65	70	75
80		

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

85 90 95

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

100 105 110

Glu Gln Trp Gln Ser Asn Gly Ser Ala Asp Asp Lys Glu Val Glu Cys

115 120 125

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

130 135 140

Pro His Leu Lys Asp Cys

145 150

<210> 35

<211> 150

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Coversin variant 2

<400> 35

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Glu Met Trp Gln Ser Asp Ala Gly Ala Asp Ala Val Glu Val Glu Cys

115 120 125

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

130 135 140

Pro His Leu Lys Gly Cys

145 150

<210> 36

<211> 150

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Coversin variant 3

<400> 36

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Pro His Leu Lys Gly Cys

145 150

<210> 37

<211> 150

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Coversin variant 4

<400> 37

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Pro His Leu Lys Asp Cys

145 150

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Loop sequence

<400> 38

Met Trp Met Leu Asp Ala Gly Gly Leu Glu Val

1 5 10

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Loop sequence of Coversin variant 1

<400> 39

Gln Trp Gln Ser Asn Gly Ser Ala Asp Asp Lys

1 5 10

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Loop sequence of Coversin variant 2

<400> 40

Met Trp Gln Ser Asp Ala Gly Ala Asp Ala Val

1 5 10

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Loop sequence of Coversin variant 3

<400> 41

Met Trp Gln Leu Asp Ala Gly Gly Asp Glu Val

1 5 10