(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0136687
(43) 공개일자 2023년09월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/36 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/36 (2013.01)
A61P 9/10 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-7031602(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년04월06일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2018-7032136
원출원일자(국제) 2017년04월06일
심사청구일자 2020년04월03일
(85) 번역문제출일자 2023년09월15일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2017/050297
(87) 국제공개번호 WO 2017/173494
국제공개일자 2017년10월12일
(30) 우선권주장
16164009.9 2016년04월06일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
시에스엘 리미티드
오스트레일리아 빅토리아 3052 파크빌 포플러 로드 45
(72) 발명자
파노우시스 콘
오스트레일리아 3083 빅토리아 분두라 리너커 드라이브 88
피터 칼하인츠
오스트레일리아 3123 빅토리아 호손 이스트 클리브 로드 24
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장훈

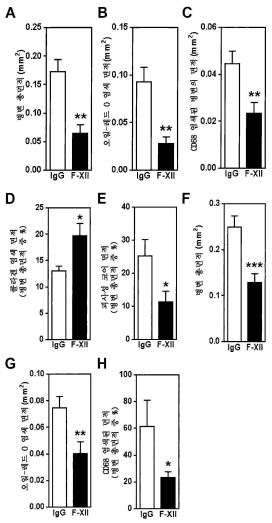
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **죽상동맥경화증의 치료 방법**

(57) 요 약

본 발명은 FXII의 억제제를 투여함으로써 대상체의 죽상동맥경화증을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 2039/505 (2013.01)
(72) 발명자
호쎄이니 하미드
오스트레일리아 3150 빅토리아 글렌 웨이벌리 니라 코트 16
첸 웅-치
오스트레일리아 3128 빅토리아 박스힐 사우스 엘가 로드 2/272

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 항-인자 XII (FXII) 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

(i) 서열번호 18에 기재된 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호 19에 기재된 서열을 포함하는 V_L; 또는

(ii) 서열번호 20에 기재된 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 21에 기재된 서열을 포함하는 경쇄.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 대상체의 죽상동맥경화증을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 죽상동맥경화증은 개발도상국에서 주요한 건강상의 부담으로서 전세계적으로 사망률과 이환율의 주된 원인으로 건강 보험 제도에 주된 경제적 부담거리이다. 급속히 확산된 비만과 진성 당뇨병은 죽상동맥경화증 관련 합병증, 예컨대 심근경색증 (MI) 및 뇌졸중의 수를 크게 증가시켰다.

[0003] 죽상동맥경화증은 동맥벽에 국한된 분명한 징후를 갖는 만성 염증성 질병이다. 죽상동맥경화증의 발달은 선천성 및/또는 후천성 면역반응 시스템에 속하는 수많은 세포와 인자들이 관련된 염증성 과정에 의해 유도된다.

[0004] 죽상동맥경화증의 발달에서 염증의 역할은 연구된 바 있다. 예를 들어, 혈액 백혈구, 숙주 방어 및 염증의 매개체인 혈액 백혈구는 죽상동맥경화증의 초기 병변에 집중 배치된다. 염증성 마커의 증가는 심근 장애와는 관계없이 급성 관상동맥 증후군을 갖는 환자의 결과를 예측하는 것으로 나타났다. 또한, 염증성 마커 C-반응성 단백질의 수준으로 나타나는 바와 같이 덜 심각한 만성 염증은 죽상경화성 합병증의 위험과 상관 관계에 있는 것으로 나타났다.

[0005] 죽상경화성 병변, 또는 죽상경화반(atherosclerotic plaque)은 넓게 두 범주로 나누어진다: 안정성 및 불안정성 (취약성으로도 불림). 통상적으로, 대체로 무증상인 안정성 죽상경화반은 세포외 매트릭스 및 평활근 세포에 풍부한 반면, 불안정성 죽상경화반은 대식세포 및 포말 세포에 풍부하고, 일반적으로 약해서 파열되기 쉽다. 죽상경화반의 불안정성은 염증성 과정에 의해 유발된다. 죽상경화반은 불안정하게 되어 징후없이 파열될 수 있어서, 폐색성 동맥 혈전의 형성을 초래한다. 파열된 죽상경화반은 염증성 세포, 예컨대 대식세포에 의해 많이 침투되는데, 상기 대식세포들은 단백질분해 효소, 예컨대 플라스미노겐 활성제, 카텝신 및 매트릭스 금속단백질분해효소 및 섬유증 조직을 분비한다. 파열된 죽상경화반은 임상적으로 심근경색증과 뇌졸중과 같은 징후를 나타낸다. 그 결과, 많은 환자들이 심장 돌연사 또는 치사성 뇌졸중을 겪게 된다.

[0006] 죽상경화성 병변에 대한 가장 통상적인 치료 옵션으로는 지질 저하제, 예컨대 스타틴 (예컨대, 로바스타틴, 프라바스타틴, 로수바스타틴, 심바스타틴, 아토바스타틴 및 플루바스타틴) 및 혈액 희석제 (예컨대, 아스피린, 클로피도그렐, 프라수그렐, 티카그렐러, 와파린 및 헤파린과 같은 항응고제)의 투여를 포함한다. 그러나, 후자의 치료제의 지속적 사용은 걷잡을 수 없는 출혈의 위험성을 증가시킨다.

[0007] 죽상동맥경화증에서의 응고 인자의 역할도 연구된 바 있다. 예를 들어, 슈네르브(Schnerb) 등 (Arterioscler Thromb Vasc Biol., 36: 475-481, 2016)은 아포지질단백질 E 및 인자 XI (FXI)가 결핍된 마우스에서 죽상동맥경화증의 발달을 연구하였다. 상기 저자들은 FXI 결핍된 마우스에서 죽종형성이 느리게 이루어짐을 밝혀냈다. 그러나, 상기 연구는 출생때부터 FXI를 결핍시킨 마우스를 기초로 한 것이고 죽상동맥경화증의 발달 이후 또는 발달 동안에 해당 단백질의 억제 효과를 연구한 것이 아니다.

[0008] 따라서, 당업계에서는 죽상동맥경화증 및 이의 혈전성 합병증에 대한 개선된 치료가 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명을 설계함에 있어서, 본 발명자들은 죽상동맥경화증, 예컨대, 죽상경화반 형성 및/또는 죽상경화반 불안정성 및 파열의 마우스 모델에서 인자 XII (FXII)를 억제하는 효과에 대하여 연구하였다. 본 발명자들은 FXII 단백질이 수많은 생물학적 경로(이 중 일부의 경로는 죽상동맥경화증, 예컨대, 염증에 관련될 수 있음)에 영향을 주고 있다는 이해를 바탕으로 FXII 억제의 효과를 연구하였다. 본 발명자들은 FXII의 억제가 죽상동맥경화증의 진행을 늦출 뿐만 아니라, 병변 중에 염증성 세포 축적의 감소, 콜라겐 침착의 증가 및 괴사성 코어 면적의 감소로 입증되는 바와 같이, 죽상경화성 병변의 발달을 약화시키고, 병변 크기를 감소시키며 불안정성 죽상경화반을 안정화시킨다는 것을 밝혀냈다. 본 발명자들은 죽상동맥경화증의 일반적으로 용인된 동물 모델, 즉, 인간에서 관찰된 상황을 모방한 모델에게 FXII의 억제제를 투여함으로써 상기 효과를 입증하였다. 그 실험적 증거들로는 죽상경화성 병변의 진행과 발달을 약화시키고, 동맥 염증을 감소시키며 죽상경화반을 안정화시킴으로써 죽상동맥경화증의 치료 및/또는 예방에 있어서 유용하다는 발견을 포함한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명자들에 의한 발견은 FXII를 억제함으로써 대상체에서 죽상동맥경화증을 치료 또는 예방하는 방법을 위한 토대를 제공한다. 또한, 본 발명자들에 의한 발견은 대상체에서 죽상동맥경화증을 치료 또는 예방하는 방법에 사용하기 위한 FXII의 억제제 또한 이에 대한 토대도 제공한다.

[0011] 다시 말해서, 본 발명자들은 (i) 대상체에서의 죽상경화반 형성의 방지 및/또는 (ii) 대상체에서의 취약형 죽상경화반의 안정화 및/또는 (iii) 대상체에서의 죽상경화반 파열의 방지에 의해, 대상체에서 죽상동맥경화증을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 인자 XII의 억제제 또는 이에 대한 토태를 제공한다.

[0012] 예를 들어, 본 발명은 FXII의 억제제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 죽상동맥경화증을 치료하는 방법을 제공한다. 또 다른 예에서, 본 발명은 FXII의 억제제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 죽상동맥경화증을 예방하는 방법을 제공한다.

[0013] 대안적인 예에서, 본 발명은 대상체에서 죽상동맥경화증을 치료하는데 사용하기 위한 FXII의 억제제를 제공한다. 또 다른 예에서, 본 발명은 대상체에서 죽상동맥경화증을 예방하는데 사용하기 위한 FXII의 억제제를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명자들은 상기 FXII의 억제제가 대상체에서 죽상경화성 병변의 진행을 감소시킬 수 있음도 밝혀냈다. 따라서, 본 발명은 추가로 대상체에서 죽상동맥경화증의 진행을 감소시키는데 사용하기 위한 FXII의 억제 방법 또는 FXII의 억제제를 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 대상체에서의 죽상경화반 파열의 위험을 감소시키거나 파열을 방지하는데 사용하기 위한 FXII의 억제 방법 또는 FXII의 억제제를 제공한다. 한 예에서, 본 발명은 불안정성 죽상경화반의 안정화에 사용하기 위한 FXII의 억제 방법 또는 FXII의 억제제를 제공한다. 한 예에서, 본 발명은 죽상경화반 형성을 방지하는데 사용하기 위한 FXII의 억제 방법 또는 FXII의 억제제를 제공한다.

[0015] 한 예에서, FXII의 억제제는 직접 억제제이다. 한 예에서, FXII의 억제제는 FXII 및/또는 FXIIa에 결합한다. 한 예에서, FXII의 억제제는 FXII 및/또는 FXIIa에 결합하여 FXII 및/또는 FXIIa의 활성을 억제한다. 예를 들어, FXII의 억제제는 FXIIa에 결합하여 FXIIa의 활성을 억제한다. 또 다른 예에서, FXII의 억제제는 FXII에 결합하여 FXII의 활성화를 억제한다. 한 예에서, FXII 및/또는 FXIIa의 활성화는 적어도 약 50%까지 억제된다. 예를 들어, FXII 및/또는 FXIIa의 활성화는 약 60%, 또는 약 70%, 또는 약 80%, 또는 약 85%, 또는 약 90%, 또는 약 95%, 또는 약 99%, 또는 약 100%까지 억제된다. FXII 및/또는 FXIIa의 활성화를 측정하는 방법은 당업계에 공지되어 있고/있거나 본원에 기술되어 있다.

[0016] 한 예에서, FXII의 억제제는 세린 프로테아제 억제제이다. 예를 들어, 상기 FXII 억제제는 인페스틴-4이다. 또 다른 예에서, 상기 FXII 억제제는 SPINK-1이다. 추가의 예에서, 상기 FXII 억제제는 인페스틴-4 또는 SPINK-1 변이체이다.

[0017] 한 예에서, FXII의 억제제는 세린 프로테아제 억제제가 아니다. 예를 들어, FXII의 억제제는 인페스틴-4가 아니다. 예를 들어, FXII의 억제제는 인페스틴-4의 변이체가 아니다. 한 예에서, FXII의 억제제는 SPINK-1이 아니다. 예를 들어, FXII의 억제제는 SPINK-1의 변이체가 아니다.

[0018] 한 예에서, 본 발명에 사용하기 위한 FXII의 억제 방법 또는 FXII의 억제제는 하기를 포함하는 FXII의 억제제를 투여하는 단계를 포함한다:

[0019] (i) 야생형 인페스틴-4 폴리펩타이드 서열 (서열번호 1), 또는 하기를 포함하는 폴리펩타이드 서열:

[0020] (a) 서열번호 1의 2-13번 위치의 N-말단 아미노산 이외의 1-5개의 아미노산 돌연변이를 함유하도록 변형된 서열번호 1; 및/또는

[0021] (b) 서열번호 1과 적어도 70% 동일하고 서열번호 1의 6개의 보존된 시스테인 잔기를 보유하는 서열; 또는

[0022] (ii) 야생형 SPINK-1 폴리펩타이드 서열 (서열번호 2), 또는 하기를 포함하는 폴리펩타이드 서열:

[0023] (a) 2-13번 위치의 N-말단 아미노산을 서열번호 1의 2-13번 위치의 N-말단 아미노산으로 대체하도록 돌연변이되고; 임의로, 서열번호 1의 서열에 대한 폴리펩타이드 서열의 상동성을 증가시키는 1-5개의 추가의 아미노산 돌연변이를 함유하도록 추가로 변형되는 서열번호 2; 및/또는

[0024] (b) 서열번호 2와 적어도 70% 동일하고 서열번호 2의 6개의 보존된 시스테인 잔기를 보유하는 서열; 및/또는

[0025] (iii) SPINK-1 돌연변이 K1 (서열번호 3), K2 (서열번호 4), 또는 K3 (서열번호 5) 중의 하나.

[0026] 한 예에서, FXII의 억제제는 세린 프로테아제 억제제 인페스틴-4의 서열을 포함한다. 예를 들어, FXII의 억제제는 서열번호 1에 기재된 서열을 포함한다.

[0027] 한 예에서, FXII의 억제제는 변형된 인페스틴-4를 포함한다. 예를 들어, FXII의 억제제는 서열번호 1의 2-13번 위치의 N-말단 아미노산 이외의 1-5개의 아미노산 돌연변이를 함유하도록 변형된 서열번호 1에 기재된 서열을 포함한다.

[0028] 또 다른 예에서, FXII의 억제제는 서열번호 1에 기재된 서열과 적어도 70%의 동일성을 가지며 서열번호 1의 6개의 보존된 시스테인 잔기를 보유하는 서열을 포함한다. 예를 들어, FXII의 억제제는 서열번호 1에 대해 약 75%의 동일성, 또는 서열번호 1에 대해 약 80%의 동일성, 또는 서열번호 1에 대해 약 85%의 동일성, 또는 서열번호 1에 대해 약 90%의 동일성, 또는 서열번호 1에 대해 약 95%의 동일성, 또는 서열번호 1에 대해 약 98%의 동일성, 또는 서열번호 1에 대해 약 99%의 동일성을 가진다.

[0029] 한 예에서, FXII의 억제제는 세린 프로테아제 억제제 SPINK-1의 서열을 포함한다. 예를 들어, FXII의 억제제는 서열번호 2에 기재된 서열을 포함한다.

[0030] 또 다른 예에서, FXII의 억제제는 2-13번 위치의 N-말단 아미노산을 서열번호 1의 2-13번 위치의 N-말단 아미노산으로 대체하도록 돌연변이되고; 임의로, 서열번호 1의 서열에 대한 폴리펩타이드 서열의 상동성을 증가시키는 1-5개의 추가의 아미노산 돌연변이를 함유하도록 추가로 변형되는 서열번호 2에 기재된 서열을 포함한다.

[0031] 또 다른 예에서, FXII의 억제제는 서열번호 2에 기재된 서열과 적어도 70%의 동일성을 가지며 서열번호 2의 6개의 보존된 시스테인 잔기를 보유하는 서열을 포함한다. 예를 들어, FXII의 억제제는 서열번호 2에 대해 약 75%의 동일성, 또는 서열번호 2에 대해 약 80%의 동일성, 또는 서열번호 2에 대해 약 85%의 동일성, 또는 서열번호 2에 대해 약 90%의 동일성, 또는 서열번호 2에 대해 약 95%의 동일성, 또는 서열번호 2에 대해 약 98%의 동일성, 또는 서열번호 2에 대해 약 99%의 동일성을 가진다.

[0032] 한 예에서, FXII의 억제제는 가변 영역 단편 (Fv)을 포함하는 단백질이다. 예를 들어, 상기 단백질은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0033] (i) 단쇄 Fv 단편 (scFv);

[0034] (ii) 이합체 scFv (di-scFv); 또는

[0035] (iii) 이원항체(diabody);

[0036] (iv) 삼원항체(triabody);

[0037] (v) 사원항체(tetrabody);

[0038] (vi) Fab;

[0039] (vii) $F(ab')_2$;

[0040] (viii) Fv;

[0041] (ix) 항체의 불변 영역, Fc 또는 중쇄 불변 도메인 (C_H)2 및/또는 C_H3에 결합된 (i) 내지 (viii) 중 하나; 또는

[0042] (x) 항체.

[0043] 한 예에서, FXII의 억제제는 항체이다. 예를 들어, 상기 항체는 항-FXII 항체이다. 또 다른 예에서, 상기 항체는 항-FXIIa 항체이다.

[0044] 예시적인 항체로는 전장 및/또는 네이키드 항체를 들 수 있다.

[0045] 한 예에서, FXII의 억제제는 재조합체, 키메라, CDR 이식화(grafted), 인간화, 합성적 인간화(synhumanized), 영장류화, 탈면역화 단백질 또는 인간 단백질이다.

[0046] 한 예에서, 상기 항체는 IgG 항체이다.

[0047] 한 예에서, 상기 항-FXII 항체는 서열번호 6에 기재된 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (V_H)을 포함한다.

[0048] 한 예에서, 상기 항-FXII 항체는 서열번호 7에 기재된 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (V_L)을 포함한다.

[0049] 한 예에서, 상기 항-FXII 항체는 서열번호 6에 기재된 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호 7에 기재된 서열을 포함하는 V_L을 포함한다.

[0050] 한 예에서, 상기 항-FXII 항체는 서열번호 6 및 서열번호 7의 V_H 및/또는 V_L의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함하는 가변 영역을 포함한다.

[0051] 한 예에서, 단백질 또는 항체는 상기 임의의 단백질 또는 항체를 코딩하는 핵산에 의해 암호화되는 모든 형태의 단백질 또는 항체, 예컨대 암호화된 C-말단 리신 잔기가 결실된 변이체, 탈아미드화 변이체 및/또는 글리코실화 변이체 및/또는 예컨대, 단백질의 N-말단에서 파이로글루타메이트를 포함하는 변이체 및/또는 N-말단 잔기가 결핍된 변이체이다.

[0052] 한 예에서, 상기 항-FXII 항체는 하기를 포함한다:

[0053] (i) 하기를 포함하는 V_H:

[0054] (a) 서열번호 6에 기재된 서열; 또는

[0055] (b) 서열번호 8에 기재된 서열을 포함하는 CDR1; 서열번호 10에 기재된 서열을 포함하는 CDR2; 및 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하는 CDR3; 또는

[0056] (c) 서열번호 8에 기재된 서열을 포함하는 CDR1; 서열번호 9에 기재된 서열을 포함하는 CDR2; 및 서열번호 11에 기재된 서열을 포함하는 CDR3; 및/또는

[0057] (ii) 하기를 포함하는 V_L:

[0058] (a) 서열번호 7에 기재된 서열; 또는

[0059] (b) 서열번호 13에 기재된 서열을 포함하는 CDR1; 서열번호 14에 기재된 서열을 포함하는 CDR2; 및 서열번호 16에 기재된 서열을 포함하는 CDR3; 또는

[0060] (c) 서열번호 13에 기재된 서열을 포함하는 CDR1; 서열번호 14에 기재된 서열을 포함하는 CDR2; 및 서열번호 15에 기재된 서열을 포함하는 CDR3.

[0061] 한 예에서, 상기 항-FXII 항체는 하기를 포함한다:

[0062] (i) 하기를 포함하는 V_H:

[0063] (a) 서열번호 8에 기재된 서열을 포함하는 CDR1;

[0064] (b) 서열번호 10에 기재된 서열을 포함하는 CDR2; 및

[0065] (c) 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하는 CDR3; 및/또는

[0066] (ii) 하기를 포함하는 V_L:

[0067] (a) 서열번호 13에 기재된 서열을 포함하는 CDR1;

[0068] (b) 서열번호 14에 기재된 서열을 포함하는 CDR2; 및

[0069] (c) 서열번호 16에 기재된 서열을 포함하는 CDR3.

[0070] 한 예에서, 상기 항-FXII 항체는 하기를 포함한다:

[0071] (i) 하기를 포함하는 V_H:

[0072] (a) 서열번호 8에 기재된 서열을 포함하는 CDR1;

[0073] (b) 서열번호 9에 기재된 서열을 포함하는 CDR2; 및

[0074] (c) 서열번호 11에 기재된 서열을 포함하는 CDR3; 및/또는

[0075] (ii) 하기를 포함하는 V_L:

[0076] (a) 서열번호 13에 기재된 서열을 포함하는 CDR1;

[0077] (b) 서열번호 14에 기재된 서열을 포함하는 CDR2; 및

[0078] (c) 서열번호 15에 기재된 서열을 포함하는 CDR3.

[0079] 한 예에서, 상기 항-FXII 항체는 하기를 포함한다:

[0080] (i) 하기를 포함하는 V_H:

[0081] (a) 서열번호 8에 기재된 CDR1;

[0082] (b) 서열번호 10에 기재된 CDR2 (여기서, 3번 위치의 X는 D이고, 4번 위치의 X는 I이고, 5번 위치의 X는 P이고, 6번 위치의 X는 T이고, 7번 위치의 X는 K이고, 8번 위치의 X는 G임);

[0083] (c) 서열번호 11에 기재된 CDR3; 및/또는

[0084] (ii) 하기를 포함하는 V_L:

[0085] (a) 서열번호 13에 기재된 CDR1;

[0086] (b) 서열번호 14에 기재된 CDR2; 및

[0087] (c) 서열번호 15에 기재된 CDR3.

[0088] 예를 들어, 상기 항-FXII 항체는 서열번호 18에 기재된 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호 19에 기재된 서열을 포함하는 V_L을 포함한다.

[0089] 한 예에서, 상기 항-FXII 항체는 람다 경쇄 불변 영역을 포함한다.

[0090] 한 예에서, 상기 항-FXII 항체는 IgG4 또는 안정화된 IgG4 불변 영역을 포함한다. 예를 들어, 상기 안정화된 IgG4 불변 영역은 카바트(Kabat) 시스템에 따른 경첩 영역의 241번 위치에 프롤린을 포함한다 (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest Washington DC United States Department of Health and Human Services, 1987 및/또는 1991).

[0091] 한 예에서, 상기 항-FXII 항체는 서열번호 20에 기재된 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 21에 기재된 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0092] 한 예에서, 상기 항-FXII 항체는 조성물 내에 존재한다. 예를 들어, 상기 조성물은 항체 가변 영역, 즉 V_H 또는 V_L을 포함하는 단백질 또는 본원에 기술된 항체를 포함한다. 한 예에서, 상기 조성물은 단백질 또는 항체의 하나 이상의 변이체를 추가로 포함한다. 예를 들어, 상기 조성물은 암호화된 C-말단 리신 잔기가 결실된 변이체, 탈아미드화 변이체 및/또는 글리코실화 변이체 및/또는 예컨대, 단백질의 N-말단에서 파이로글루타메이트를 포함하는 변이체 및/또는 N-말단 잔기, 예컨대, 항체 또는 V 영역에서 N-말단 글루타민이 결핍된 변이체 및/또는 분

비 신호의 일부 또는 전부를 포함하는 변이체를 포함한다. 암호화된 아스파라긴 잔기의 탈아미드화 변이체는 이소아스파르트산, 및 아스파르트산 동형체를 생성할 수 있거나, 또는 인접한 아미노산 잔기를 포함하는 숙신아미드도 생성될 수도 있다. 암호화된 글루타민 잔기의 탈아미드화 변이체는 글루탐산을 유도할 수 있다. 상기 서열과 변이체들의 이종성 혼합물을 포함하는 조성물은 특정 아미노산 서열에 대하여 언급하는 경우에 포함시키려 한다.

[0093] 본원에 기술된 사용을 위한 FXII의 억제 방법 또는 FXII의 억제제의 한 예에서, FXII의 억제제는 융합 파트너에 결합된다. 예를 들어, 상기 융합 파트너는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 또는 반감기 증진 폴리펩타이드를 포함한다.

[0094] 한 예에서, FXII의 억제제는 상기 융합 파트너에 직접적으로 결합된다. 또 다른 예에서, FXII의 억제제는 상기 융합 파트너에 링커를 통해 결합된다. 예를 들어, FXII의 억제제는 반감기 증진 폴리펩타이드에 직접적으로 결합된다. 또 다른 예에서, FXII의 억제제는 반감기 증진 폴리펩타이드에 링커를 통해 결합된다. 한 예에서, FXII의 억제제는 PEG에 직접적으로 결합한다. 또 다른 예에서, FXII의 억제제는 링커를 통해 PEG에 결합한다.

[0095] 한 예에서, 상기 링커는 개재 펩타이드 링커이다. 예를 들어, 상기 링커는 절단가능한 링커이다.

[0096] 한 예로서, 상기 반감기 증진 폴리펩타이드는 알부민, 아파민, 알파-태아단백질, 비타민 D 결합 단백질, 인간 알부민, 면역글로불린 및 IgG의 Fc로 이루어진 군으로부터 선택된다. 예를 들어, 상기 반감기 증진 폴리펩타이드는 알부민이다.

[0097] 한 예에서, FXII의 억제제는 링커 펩타이드를 통해 FXII 억제제에 결합된 인간 알부민을 포함하는 융합 단백질이다.

[0098] 한 예에서, FXII의 억제제는 비경구 투여된다. 예를 들어, FXII의 억제제는 정맥내, 또는 피하, 또는 척수강내 투여된다. 한 예에서, FXII의 억제제는 피하 투여된다. 또 다른 예에서, FXII의 억제제는 정맥내 투여된다.

[0099] 본원에 기술된 방법들 중 한 예에서, FXII의 억제제는 대상체에게 하나 이상의 용량으로 투여된다. 예를 들어, FXII의 억제제는

[0100] (i) 단일 용량으로; 또는

[0101] (ii) 복수의 용량으로; 또는

[0102] (iii) 지속적 주입 또는 적용으로 대상체에게 투여된다.

[0103] 한 예에서, FXII의 억제제는 단일 용량으로 대상체에게 투여된다.

[0104] 한 예에서, FXII의 억제제는 복수의 용량으로 대상체에게 투여된다. 예를 들어, FXII의 억제제는 2회분 용량, 또는 3회분 용량, 또는 4회분 용량, 또는 5회분 용량 또는 그 이상으로 대상체에게 투여된다. 예를 들어, FXII의 억제제의 각 용량의 투여는 일정 시간으로 나누어서 행한다. 예를 들어, FXII의 억제제의 각 용량의 투여는 약 1시간, 또는 약 2시간, 또는 약 3시간, 또는 약 4시간, 또는 약 6시간, 또는 약 8시간, 또는 약 12시간, 또는 약 16시간, 또는 약 20시간, 또는 약 24시간의 시간으로 나누어 행한다.

[0105] 예를 들어, FXII의 억제제의 각 용량의 투여는 수일의 기간으로 나누어 행한다. 예를 들어, FXII의 억제제의 각 용량의 투여는 약 1일, 또는 약 2일, 또는 약 3일, 또는 약 4일, 또는 약 5일, 또는 약 6일, 또는 약 7일의 기간으로 나누어 행한다.

[0106] 한 예에서, FXII의 억제제의 각 용량의 투여는 적어도 14일 또는 적어도 28일로 나누어 행한다.

[0107] 예를 들어, FXII의 억제제의 각 용량의 투여는 수주의 기간으로 나누어 행한다. 예를 들어, FXII의 억제제의 각 용량의 투여는 약 1주, 또는 약 2주, 또는 약 3주, 또는 약 4주, 또는 약 5주, 또는 약 6주로 나누어 행한다.

[0108] 한 예에서, FXII의 억제제의 각 용량의 투여는 적어도 1개월로 나누어 행한다.

[0109] 한 예에서, FXII의 억제제 투여 간 시간 간격은 투여 과정 전반에 걸쳐 동일하다. 한 예에서, FXII의 억제제 투여 간 시간 간격은 투여 과정 전반에 걸쳐 서로 다르다. 예를 들어, FXII의 억제제는 치료의 개시 시점에 주 단위로 투여한 후에, 사전에 결정된 수의 용량에 따라 월 단위로 투여한다. 한 예에서, FXII의 억제제의 투여 간 시간 간격은 가변적이다.

[0110] 한 예에서, FXII의 억제제는 지속적인 용량으로 대상체에게 투여된다. 예를 들어, FXII의 억제제는 일정 시간에

걸쳐 지속적인 주입으로 대상체에게 투여된다. 예를 들어, FXII의 억제제는 약 1분 내지 약 24시간의 시간에 걸쳐 투여된다. 예를 들어, FXII의 억제제는 약 10분 내지 약 12시간, 또는 약 10분 내지 약 6시간, 또는 약 10분 내지 약 5시간, 또는 약 10분 내지 약 4시간, 또는 약 10분 내지 약 3시간, 또는 약 10분 내지 약 2시간, 또는 약 10분 내지 약 1시간, 또는 약 30분의 시간에 걸쳐 투여된다.

[0111] 한 예에서, FXII의 억제제는 복수의 회수로 투여된다. 예를 들어, FXII의 억제제는 1회 이상 투여된다. 예를 들어, FXII의 억제제는 죽상동맥경화증이 치료 또는 예방될 때까지 투여된다. 예를 들어, FXII의 억제제는 수일 내지 수개월의 기간 동안 투여된다. 예를 들어, FXII의 억제제는 약 1일, 또는 약 2일, 또는 약 3일, 또는 약 4일, 또는 약 5일, 또는 약 6일, 또는 약 1주, 또는 약 2주, 또는 약 4주, 또는 약 6주, 또는 약 2개월 동안 투여된다.

[0112] 한 예에서, FXII의 억제제는 치료적 또는 예방학적 유효량으로 투여된다. 예를 들어, FXII의 억제제는 약 0.01 mg/kg 내지 약 1000 mg/kg의 용량으로 대상체에게 투여된다. 예를 들어, FXII의 억제제는 약 0.01 mg/kg 체중, 또는 약 0.1 mg/kg 체중, 또는 약 1 mg/kg 체중, 또는 약 50 mg/kg 체중, 또는 약 100 mg/kg 체중, 또는 약 200 mg/kg 체중, 또는 약 500 mg/kg 체중, 또는 약 1000 mg/kg 체중의 용량으로 투여된다. 예를 들어, FXII의 억제제는 약 0.001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg 체중, 또는 약 0.01 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 또는 약 0.01 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 2 mg/kg 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 1 mg/kg의 용량으로 투여된다. 한 예에서, FXII의 억제제는 약 0.01 mg/kg 내지 약 1000 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 1000 mg/kg, 또는 약 1 mg/kg 내지 약 1000 mg/kg, 또는 약 1 mg/kg 내지 약 500 mg/kg, 또는 약 10 mg/kg 내지 약 200 mg/kg, 또는 약 10 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 또는 약 50 mg/kg 내지 약 500 mg/kg, 또는 약 50 mg/kg 내지 약 200 mg/kg, 또는 약 100 mg/kg 내지 약 200 mg/kg 범위의 용량으로 투여된다. 한 예에서, FXII의 억제제는 약 10 mg/kg의 용량으로 투여된다. 한 예에서, FXII의 억제제는 약 20 mg/kg의 용량으로 투여된다.

[0113] 한 예에서, 상기 대상체는 죽상동맥경화증이 있다. 한 예에서, 상기 대상체는 죽상동맥경화증을 앓고 있는 것으로 진단받았다. 한 예에서, 상기 대상체는 죽상동맥경화증에 대한 치료를 받고 있다. 한 예에서, 상기 대상체는 죽상동맥경화증 관련 질환 (즉, 심근경색증)에 대한 치료를 받고 있다. 예를 들어, 상기 대상체는 스타틴 또는 와파린 또는 β-차단제 또는 항-혈소판 약물을 이용한 치료를 받고 있다.

[0114] 한 예에서, 상기 대상체는 이전에 심근경색증을 앓았다. 한 예에서 상기 대상체는 스타틴, 와파린 및 β-차단제를 이용한 치료를 받고 있다.

[0115] 본원에 기술된 사용을 위한 FXII의 억제 방법 또는 FXII의 억제제의 한 예에서, 상기 대상체는 죽상동맥경화증을 발달시킬 위험에 처해 있다. 이와 관련하여, FXII의 억제제는 대비적 또는 예방적 방식으로 사용되거나, 또는 초기의 예방적 방식으로 사용된다고 말할 수 있다. 죽상동맥경화증을 발달시킬 위험에 처해 있는 예시적인 대상체는 당뇨병 및/또는 비만을 앓고 있다. 예를 들어, 상기 당뇨병은 2형 당뇨병이다.

[0116] 죽상동맥경화증을 겪을 위험에 처한 대상체의 추가의 특성 또는 다른 특성들로는 하기의 특징들 중 하나 이상을 포함한다:

[0117] · 이미 협심증, 및/또는 뇌졸중 및/또는 심장마비를 앓은 적이 있고;

[0118] · 말초 동맥 질환이 있으며;

[0119] · 심장병의 가족력이 있고;

[0120] · 높은 혈장 저밀도 지질단백질 수준을 가지고;

[0121] · 낮은 혈장 고밀도 지질단백질 수준을 가지며/가지거나;

[0122] · 고혈압을 가진다.

[0123] 한 예에서, 죽상동맥경화증을 겪을 위험에 처해 있는 대상체는 높은 혈장 저밀도 지질단백질 수준을 가진다. 예를 들어, 상기 혈장 저밀도 지질단백질 수준은 적어도 160 mg/dL이다.

[0124] 한 예에서, 죽상동맥경화증을 겪을 위험에 처해 있는 대상체는 낮은 혈장 고밀도 지질단백질 수준을 가진다. 예를 들어, 상기 혈장 고밀도 지질단백질 수준은 약 50 mg/dL 미만이다.

[0125] 한 예에서, 죽상동맥경화증을 겪을 위험에 처해 있는 대상체는 고혈압을 가진다. 예를 들어, 혈압 수준은 적어도 140/90 mmHg이다.

[0126] 한 예에서, 상기 대상체의 나이는 추가로 55세 또는 그 이상, 예컨대, 65세 또는 그 이상, 또는 75세 또는 그 이상이다.

[0127] 한 예에서, 상기 대상체는 염증성 마커의 수준을 증가시켰다. 예를 들어, 상기 대상체는 C-반응성 단백질의 수준을, 예컨대, 3-5 mg/L로 증가시켰다.

[0128] 본원에 기술된 방법들 중 한 예에서, FXII의 억제제는 죽상동맥경화증의 개시 전 또는 개시 후에 대상체에게 투여된다. 예를 들어, FXII의 억제제는 예방학적으로 또는 치료적으로 투여된다. 한 예에서, 상기 억제제는 예방학적으로 대상체에게 투여된다. 한 예에서, 상기 억제제는 치료적으로 대상체에게 투여된다.

[0129] 본원에 기술된 사용을 위한 FXII의 억제 방법 또는 FXII의 억제제의 한 예에서, 대상체에서의 죽상동맥경화증은 심근경색증 또는 뇌졸중을 초래할 수 있다. 예를 들어, 죽상경화반 파열은 해당 파열 부위에 폐색성 동맥 혈전증을 초래할 수 있는데, 이는 심근경색증 또는 뇌졸중으로서 임상적으로 증상이 나타난다. 따라서, 본 발명은 본원에 기술된 방법을 수행함으로써 폐색성 동맥 혈전증 및/또는 심근경색증 및/또는 뇌졸중의 위험을 감소시키는 방법을 추가로 제공한다. 또 다른 예에서, 본 발명은 본원에 기술된 방법을 수행함으로써 폐색성 동맥 혈전증 및/또는 심근경색증 및/또는 뇌졸중을 예방하는 방법을 제공한다.

[0130] 상기에서 상술한 것들을 평가하는 방법은 당업계에 공지되어 있고/있거나 본원에 기술되어 있다.

[0131] 한 예에서, FXII의 억제제는 하기의 하나 이상의 효과를 가지기에 충분한 양으로 투여된다:

[0132] (i) 대상체에서 폐색성 동맥 혈전의 가능성을 감소시키고;

[0133] (ii) 대상체의 죽상경화반 병변 크기를 감소시키며;

[0134] (iii) 대상체의 죽상경화반 안정화를 증가시키고;

[0135] (iv) 대상체의 죽상경화반 병변 중에 염증성 세포 축적을 감소시키고/감소시키거나;

[0136] (v) 대상체에서 죽종형성형 세포군을 감소시킴.

[0137] 한 예에서, FXII의 억제제는 죽상경화반을 안정화시키는데 충분한 양으로 투여된다. 예를 들어, 대상체의 죽상경화반 병변 중에서의 지질 축적은 감소된다. 한 예에서, 대상체의 죽상경화반 병변 중에서의 콜라겐 침착은 증가된다. 한 예에서, 대상체의 죽상경화반 병변 중에서의 괴사성 코어 면적은 감소된다. 한 예에서, 대상체의 죽상경화반 병변 중에서의 평활근 세포수는 증가된다. 또 다른 예에서, 대상체의 죽상경화반 병변 중에서의 혈관세포 부착분자-1 (VCAM-1)의 발현은 감소된다. 따라서, 본 발명은 대상체에서 본원에 기술된 사용을 위한 FXII의 억제 방법을 수행하거나 또는 FXII의 억제제에 의해, 대상체의 죽상경화반 병변 중에서 지질 축적의 감소 및/또는 콜라겐 침착의 증가 및/또는 괴사성 코어 면적의 감소 및/또는 평활근 세포수의 증가 및/또는 혈관세포 부착분자-1의 발현 감소에 사용하기 위한 FXII의 억제 방법 또는 FXII의 억제제를 제공한다. 예를 들어, 상기 감소 및/또는 증가는 FXII의 억제제로 치료되지 않은 대상체에서의 죽상경화반과는 상대적이다. 한 예에서, 상기 감소 및/또는 증가는 FXII의 억제제를 이용한 치료의 개시 전의 대상체에서의 죽상경화반과는 상대적이다.

[0138] 한 예에서, FXII의 억제제는 대상체의 죽상경화반 병변에서 염증성 세포 축적을 감소시키기에 충분한 양으로 투여된다. 예를 들어, 대상체의 죽상경화반 병변에서 대식세포 축적은 감소된다.

[0139] 한 예에서, FXII의 억제제는 죽상경화반에서 죽종형성형 세포군을 감소시키기에 충분한 양으로 투여된다. 예를 들어, 죽상경화반에서 순환성 자연살상 세포 및/또는 자연살상 세포 T 세포군은 감소된다.

[0140] 본원에 기술된 방법들 중 한 예에서, FXII의 억제제는 죽상동맥경화증의 발달 전 또는 발달 후에 투여된다. 한 예에서, FXII의 억제제는 죽상동맥경화증의 발달 전에 투여된다. 한 예에서, FXII의 억제제는 죽상동맥경화증의 발달 후에 투여된다.

[0141] 한 예에서, FXII의 억제제는 죽상동맥경화증의 증상 개시 후에 투여된다. 한 예에서, FXII의 억제제는 죽상동맥경화증의 하나 이상의 증상을 완화 또는 감소시키는 용량으로 투여된다.

[0142] 죽상동맥경화증의 증상은 당업자에게는 명백할 것이고, 예를 들어 하기를 포함한다:

[0143] · 운동중 가슴 통증 또는 협심증;

[0144] · 휴식중 가슴 통증;

[0145] · 팔, 어깨, 복부, 또는 턱의 통증;

[0146] · 심정지;

[0147] · 숨가쁨;

[0148] · 전반적으로 몸이 편치 않음;

[0149] · 대상체의 팔 또는 다리의 저림 또는 쇠약;

[0150] · 말하기 어려움 또는 불분명한 발음;

[0151] · 일시적 시력 상실;

[0152] · 대상체의 얼굴의 처진 근육; 및/또는

[0153] · 피로.

[0154] 본원에 기술된 사용을 위한 FXII의 억제 방법 또는 FXII의 억제제의 한 예에서, 상기 대상체는 포유동물, 예를 들어 영장류, 예컨대 인간이다.

[0155] 본원에 기술된 사용을 위한 치료 방법 또는 FXII의 억제제는 죽상동맥경화증의 영향을 감소, 치료 또는 예방하기 위해 추가의 화합물을 투여하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0156] 또한, 본 발명은 죽상동맥경화증의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 죽상동맥경화증의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 FXII의 억제제를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0157] 또한, 본 발명은 대상체에서 죽상동맥경화증을 치료 또는 예방하기 위한 약제의 제조에 있어서 FXII의 억제제의 용도를 제공한다.

[0158] 또한, 본 발명은 대상체에서 죽상동맥경화증을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 설명서와 함께 포장된 적어도 하나의 FXII의 억제제를 포함하는 키트를 제공한다. 임의로, 상기 키트는 치료적 활성 화합물 또는 약물을 추가로 포함한다.

[0159] 또한, 본 발명은 죽상동맥경화증을 앓고 있거나 그러한 위험에 처해 있는 대상체에게 FXII의 억제제를 투여하기 위해 설명서와 함께 포장된 적어도 하나의 FXII의 억제제와 임의로는 치료적 활성 화합물 또는 약물과 함께 포함하는 키트를 제공한다.

[0160] 죽상동맥경화증 및 FXII의 억제제의 예시적인 효과를 본원에 기재할 것인데, 이는 이전 다섯 단락에 기재된 본 발명의 예들에 필요한 변경을 가하는 것을 취할 것이다.

[0161] 또한, 본 발명자들은 인간 대상체를 치료하는데 사용하기 적절한 FXII의 억제제, 예컨대, 항-FXII 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하였다. 상기 억제제는 프레임워크 영역 내의 (모든 잔기들이 아닌) 대부분의 잔기들을 생식세포 계열의 인간 항체 내의 잔기들과 동일하도록 변형시킨 친화도가 증진된(affinity matured) 인간 항체로서, 면역원성에 대한 가능성을 감소시킬 수 있다. 또한, 상기 항체는 FXIIa를 억제할 수 있으며 우수한 제조가능성의 특징을 가진다. 따라서, 본 발명은 항-FXII 항체가 서열번호 18에 기재된 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호 19에 기재된 서열을 포함하는 V_L을 포함하는, 항-FXII 항체 또는 이의 항원 결합 단편도 제공한다.

[0162] 한 예에서, 상기 항-FXII 항체는 람다 경쇄 불변 영역을 포함한다.

[0163] 한 예에서, 상기 항-FXII 항체는 IgG4 또는 안정화된 IgG4 불변 영역을 포함한다. 예를 들어, 상기 안정화된 IgG4 불변 영역은 카바트 시스템에 따른 경첩 영역의 241번 위치에 프롤린을 포함한다 (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest Washington DC United States Department of Health and Human Services, 1987 및/또는 1991).

[0164] 한 예에서, 상기 항-FXII 항체는 서열번호 20에 기재된 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 21에 기재된 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0165] 한 예에서, 본 발명은 항-FXII 항체 또는 항원 결합 단편 및 담체, 예컨대, 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0166] 한 예에서, 상기 조성물은 단백질 또는 항체의 하나 이상의 변이체를 추가로 포함한다. 예를 들어, 상기 조성물은 암호화된 C-말단 리신 잔기가 결실된 변이체, 탈아미드화 변이체 및/또는 글리코실화 변이체 및/또는 예컨대, 단백질의 N-말단에서 파이로글루타메이트를 포함하는 변이체 및/또는 N-말단 잔기, 예컨대, 항체 또는 V 영역에서 N-말단 글루타민이 결핍된 변이체 및/또는 분비 신호의 일부 또는 전부를 포함하는 변이체를 포함한다. 암호화된 아스파라긴 잔기의 탈아미드화 변이체는 이소아스파르트산, 및 아스파르트산 동형체를 생성할 수 있거나, 또는 인접한 아미노산 잔기를 포함하는 숙신아미드도 생성될 수도 있다. 암호화된 글루타민 잔기의 탈아미드화 변이체는 글루탐산을 유도할 수 있다. 상기 서열과 변이체들의 이종성 혼합물을 포함하는 조성물은 특정 아미노산 서열에 대하여 언급하는 경우에 포함시키려 한다.

[0167] 또한, 본 발명은 의학적 용도를 위한 항-FXII 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0168] 또한, 본 발명은 대상체의 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 항-FXII 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 질환은 정맥, 동맥 또는 모세혈관 혈전 형성, 심장의 혈전 형성, 인간 또는 동물 대상체의 혈액의 인공 표면과의 접촉 동안 및/또는 접촉 후의 혈전 형성, 혈전색전증 (상기 질환은 혈전의 형성 및/또는 안정화를 방지하여 3차원성 관내 혈전 성장을 방지함으로써, 또는 관내 혈전을 예방 및/또는 치료함에 의함), 간질성 폐질환, 염증, 신경성 염증 질환, 보체 활성화, 섬유소용해, 혈관신생 및 FXII/ FXIIa 유도성 키닌 형성 또는 FXII/FXIIa 매개성 보체 활성화와 관련된 질병으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0169] 또한, 본 발명은 인간 또는 동물 대상체의 관내 혈전을 치료하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 항-FXII 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 관내 혈전은 정맥, 동맥 또는 모세혈관 혈전 형성, 심장의 혈전 형성, 인간 또는 동물 대상체의 혈액의 인공 표면과의 접촉 동안 및/또는 접촉 후의 혈전 형성, 혈전색전증; 간질성 폐질환, 염증, 신경성 염증 질환, 보체 활성화, 섬유소용해, 혈관신생 및 FXII/FXIIa 유도성 키닌 형성 또는 FXII/FXIIa 매개성 보체 활성화와 관련된 질병으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환과 관련이 있다. 예를 들어, 상기 정맥 또는 동맥 혈전 형성은 뇌졸중, 심근경색증, 심정맥 혈전증, 간문맥 혈전증, 신정맥 혈전증, 경정맥 혈전증, 대뇌 정맥 부비강 혈전증, 버드-키아리 증후군 (Budd-Chiari syndrome) 또는 파제트-슈뢔터 질환 (Paget-Schroetter disease)이다.

[0170] 한 예에서, FXII/FXIIa 유도성 키닌 형성과 관련된 질병들은 유전성 혈관부종, 폐의 박테리아 감염, 트리파노소마 감염, 저혈압 쇼크, 췌장염, 샤가스병, 관절통풍, 관절염, 파종성 혈관내 응고 (DIC) 및 패혈증의 군으로부터 선택된다.

[0171] 한 예에서, 간질성 폐질환은 섬유증식성 및/또는 특발성 폐섬유증이다.

[0172] 한 예에서, 혈전 형성은 인간 또는 동물 대상체에 대해 의료 시술을 수행하는 동안 및/또는 수행한 후 상기 인간 또는 동물 대상체의 혈액을 인공 표면과 접촉시키는 동안 및/또는 접촉시킨 후에 발생하며, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 상기 의료 시술을 수행하기 전 및/또는 수행하는 동안 및/또는 수행한 후에 투여되고, 추가로

[0173] (i) 상기 인공 표면은 대상체의 혈액 부피의 적어도 80%에 노출되며, 상기 인공 표면은 적어도 0.2 ㎡이거나, 또는

[0174] (ii) 상기 인공 표면은 대상체의 신체 외부의 혈액 수집을 위한 용기이거나, 또는

[0175] (iii) 상기 인공 표면은 스텐트, 밸브, 관내 카테터, 또는 체내 혈액 펌핑 보조용 시스템이다.

[0176] 또한, 본 발명은 본원의 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로 코팅된 의료 장치를 제공하는데, 여기서 상기 장치는 인공 심폐기, 혈액의 산소공급을 위한 체외막 산소공급 시스템, 혈액의 보조 펌핑을 위한 장치, 혈액 투석 장치, 혈액의 체외 여과를 위한 장치, 혈액의 수집에 사용하기 위한 저장소, 관내 카테터, 스텐트, 인공 심장 밸브, 및/또는 상기 임의의 장치를 위한 부속품, 예컨대 배관, 캐뉼라, 원심 펌프, 밸브, 포트, 및/또는 전환기이다.

[0177] 또한, 본 발명은 의료 시술을 받은 환자에게 항-FXII 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공하는데, 여기서 상기 의료 시술은

[0178] (a) 심장,

[0179] (b) 대동맥, 대동맥궁, 경동맥, 관상동맥, 완두동맥, 척추골 뇌저동맥 순환, 두개내 동맥, 신장동맥, 간동맥, 장간막동맥, 및/또는 뇌에서 심장까지 동맥계의 혈관으로부터 선택된 적어도 하나의 혈관,

[0180] (c) 환자가 공지된 중격결손을 가지는 경우의 정맥 혈관

[0181] 중 적어도 하나와 접촉하는 것을 포함하며;

[0182] 상기 의료 시술은 적어도 하나의 표적 장기에서 허혈을 초래할 수 있는 신체 내의 상기 적어도 하나의 혈관들 중의 적어도 하나의 색전의 제거 단계를 포함하며, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 상기 의료 시술 시행 전, 시행 동안 및/또는 시행 후에 투여된다.

[0183] 또한, 본 발명은 상기 항-FXII 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하는 단계를 포함하는, 증가된 혈관 투과성, 특히 증가된 망막 혈관 투과성, 예컨대 진행성 망막증, 실명을 유발할 수 있는 망막증의 합병증, 황반 부종, 비증식성 망막증, 증식성 망막증, 망막 부종, 당뇨병성 망막증, 고혈압성 망막증 및 망막 외상과 관련된 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0184] 본 발명은 죽상동맥경화증을 치료 또는 예방하는 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0185] **도 1**은 대동맥궁 병변 (A-E) 및 대동맥궁 병변 (F-H)에서 죽상동맥경화증 발달에 대한 항-FXII 항체 치료의 효과를 나타내는 그래프이다. 항-FXII 항체 치료는 총 병변 크기 (A, F); 지질 축적 (B, G), 대식세포 수 (C, H), 콜라겐 축적 (D) 및 괴사성 코어 면적 (E)을 감소시킨다. 평균 ± SEM; n=6; *: 대조군인 독립표본 T-검정과 비교했을 때 P<0.05.

도 2는 항-FXII 항체로 치료된 죽상경화성 병변이 있는 마우스의 혈액 중의 림프구 프로파일에 대한 유세포분석을 나타내는 그래프이다. 평균 ± SEM; n=6; *: 대조군인 독립표본 T-검정과 비교했을 때 P<0.05.

도 3은 항-FXII로 치료된 죽상경화성 병변이 있는 마우스의 림프절 중의 림프구 프로파일에 대한 유세포분석을 나타내는 그래프이다. 평균 ± SEM; n=6; *: 대조군인 독립표본 T-검정과 비교했을 때 P<0.05.

도 4는 항-FXII 치료가 국소 염증을 감소시키고 대동맥궁 병변 (A, C, E, G) 및 대동맥궁 병변 (B, D, F, H)의 죽상경화반 안정화를 유도하고 있음을 나타내는 그래프이다. 대동맥궁 병변을 VCAM-1 발현 (A, B); 괴사성 코어 면적 (C, D), α-평활근 액틴 발현 (E, F) 및 콜라겐 축적 (G, H)에 대해 분석하였다. 평균 ± SEM; n=6; *: 대조군인 독립표본 T-검정과 비교했을 때 P<0.05.

도 5는 항-FXII 항체 치료가 죽상경화반 안정화를 달성함을 나타내는 그래프이다. 불안정성 죽상경화반을 기술된 탠덤 협착증 수술(tandem stenosis surgery)을 이용하여 세그먼트 I에 생성시키고 (A) 및 죽상경화반 면적 (B); 지질 함량 (C); 대식세포 축적 (D); VCAM-1 발현 (E); 괴사성 코어 면적 (F); α-평활근 액틴 발현 (G) 및 콜라겐 축적 (H)에 대하여 분석하였다. 평균 ± SEM, 항-FXIIa mAb: n=17, IgG 동형 대조군: n=16, *: 대조군인 독립표본 T-검정과 비교했을 때 P<0.05.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0186] **서열 목록 정보**

[0187] 서열번호 1은 야생형 인페스틴-4의 아미노산 서열

[0188] 서열번호 2는 야생형 SPINK-1의 아미노산 서열

[0189] 서열번호 3은 SPINK-1 돌연변이 K1의 아미노산 서열

[0190] 서열번호 4는 SPINK-1 돌연변이 K2의 아미노산 서열

[0191] 서열번호 5는 SPINK-1 돌연변이 K3의 아미노산 서열

[0192] 서열번호 6은 항-FXII 항체 3F7의 V_H의 아미노산 서열

[0193] 서열번호 7은 항-FXII 항체 3F7의 V_L의 아미노산 서열

[0194] 서열번호 8은 항-FXII 항체의 V_H CDR1의 아미노산 서열

[0195] 서열번호 9는 항-FXII 항체의 V_H CDR2의 아미노산 서열

[0196] 서열번호 10은 항-FXII 항체의 V_H CDR2의 아미노산 서열

[0197] 서열번호 11은 항-FXII 항체의 V_H CDR3의 아미노산 서열

[0198] 서열번호 12는 항-FXII 항체의 V_H CDR3의 아미노산 서열

[0199] 서열번호 13은 항-FXII 항체의 V_L CDR1의 아미노산 서열

[0200] 서열번호 14는 항-FXII 항체의 V_L CDR2의 아미노산 서열

[0201] 서열번호 15는 항-FXII 항체의 V_L CDR3의 아미노산 서열

[0202] 서열번호 16은 항-FXII 항체의 V_L CDR3의 아미노산 서열

[0203] 서열번호 17은 항-FXII 항체의 V_L CDR1의 아미노산 서열

[0204] 서열번호 18은 항-FXII 항체 gVR115의 V_H의 아미노산 서열

[0205] 서열번호 19는 항-FXII 항체 gVR115의 V_L의 아미노산 서열

[0206] 서열번호 20은 항-FXII 항체 gVR115의 중쇄의 아미노산 서열

[0207] 서열번호 21은 항-FXII 항체 gVR115의 경쇄의 아미노산 서열

[0208] 서열번호 22는 인간 인자 XII의 아미노산 서열

[0209] 서열번호 23은 성숙형의 인간 알부민의 아미노산 서열

[0210] 서열번호 24는 인페스틴-4 변이체의 아미노산 서열

[0211] 서열번호 25는 인페스틴-4 변이체의 아미노산 서열

[0212] **일반사항**

[0213] 본 명세서 전반에 걸쳐, 특별히 달리 언급되거나 문맥에서 다르게 요구되지 않는한, 단일 단계, 물질의 조성물, 단계들의 그룹 또는 물질의 조성물들의 그룹에 대한 언급은 하나 및 복수 (즉, 하나 이상)의 상기 단계들, 물질의 조성물들, 상기 단계들의 그룹 또는 상기 물질 조성물들의 그룹을 망라하는 것으로 이해해야 할 것이다.

[0214] 당업자라면 본 명세서가 구체적으로 기재된 것 이외의 변형 및 변경의 여지가 있다는 점을 알 수 있을 것이다. 본 개시내용에는 이러한 모든 변형 및 변경을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본 개시내용에는 본 명세서 내에 개별적으로 또는 총괄적으로 언급되거나 나타낸 모든 단계, 특징, 조성물 및 화합물, 및 상기 단계 또는 특징들의 모든 조합과 임의의 2종 이상의 임의의 조합을 포함한다.

[0215] 본 발명은 본원에 기재된 구체적인 예들에 의해 그 범위가 제한되지 않으며, 이러한 예들은 단지 예시의 목적을 위한 것이다. 기능적으로 균등한 생성물, 조성물 및 방법들도 분명히 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0216] 본 발명의 임의의 예는 특별히 달리 언급하지 않는 한 본 발명의 다른 예에 필요한 변경을 가하는 것을 취할 것이다.

[0217] 구체적으로 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 당업계 (예를 들어, 세포 배양학, 분자 유전학, 면역학, 면역조직화학, 단백질 화학 및 생화학)의 숙련자들에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 가질 것이다.

[0218] 달리 지시하지 않는 한, 본 명세서에 이용되는 재조합 단백질, 세포 배양물 및 면역학적 기법은 당업계의 숙련자들에게 잘 알려진 표준 절차이다. 이러한 기법들은 문헌 [J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984)], [J. Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)], [T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991)], [D.M. Glover and B.D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 및 1996)] 및 [F.M. Ausubel et al. (editors), Current

Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, 현재까지의 모든 최신정보 포함)], [Ed Harlow and David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)] 및 [J.E. Coligan et al. (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (현재까지의 모든 최신정보 포함)]와 같은 문헌 자료 전반에 걸쳐 기술되고 설명되어 있다.

[0219] 본 명세서의 가변 영역 및 이의 부분, 면역글로불린, 항체 및 이의 단편에 대한 기술 및 정의는 문헌[Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 및 1991], [Bork et al., J Mol. Biol. 242, 309-320, 1994], [Chothia and Lesk J. Mol Biol. 196:901-917, 1987], [Chothia et al. Nature 342, 877-883, 1989] 및/또는 [Al-Lazikani et al., J Mol Biol 273, 927-948, 1997] 중의 논의에 의해 보다 명확하게 알 수 있다.

[0220] 단백질 또는 항체에 대한 본 명세서의 논의는 제조 및/또는 보관하는 동안에 생성된 단백질 또는 항체의 임의의 변이체도 포함하는 것으로 이해되어야 할 것이다. 예를 들어, 제조 또는 보관하는 동안 항체는 (예컨대, 아스파라긴 또는 글루타민 잔기에서의) 탈아미드화될 수 있고/있거나, 변형된 글리코실화를 가질 수 있고/있거나, 피로글루타민으로 전환된 글루타민 잔기를 가질 수 있고/있거나, 제거 즉 탈락된(clipped) N-말단 또는 C-말단 잔기를 가질 수 있고/있거나, 불완전하게 가공처리된 신호 서열의 전부 또는 일부를 가질 수 있어, 결과적으로 항체의 말단에 존재한다. 특정 아미노산 서열을 포함하는 조성물은 상기 언급되거나 암호화된 서열 및/또는 상기 언급되거나 암호화된 서열의 변이체들의 이종성 혼합물일 수 있는 것으로 이해해야 한다.

[0221] "및/또는"이라는 용어, 예를 들어, "X 및/또는 Y"는 "X 및 Y" 또는 "X 또는 Y"를 의미하는 것으로 이해해야 하며, 양자 모두의 의미 또는 둘 중 하나의 의미를 위해 명확한 근거를 제공하기 위하여 취하는 것이다.

[0222] 본 명세서 전반에 걸쳐, "포함하다"라는 단어, 또는 "포함하는" 또는 "포함하고"와 같은 변형태는 언급된 구성요소, 또는 정수 또는 단계, 또는 상기 구성요소, 또는 정수 또는 단계들의 그룹을 포함하지만 임의의 다른 구성요소, 또는 정수 또는 단계, 또는 상기 구성요소, 또는 정수 또는 단계들의 그룹을 배제하지는 않음을 의미하는 것으로 이해해야 할 것이다.

[0223] 본 명세서에 사용되는 "~로부터 유래된"이라는 용어는 공급원으로부터 반드시 직접적으로 얻는 것이 반드시 필요한 것은 아니지만, 명시된 정수값이 특정 공급원으로부터 얻어질 수 있다는 것을 나타내기 위해 취하는 것이다.

[0224] **선택된 정의**

[0225] 하게만 인자(Hageman factor)로도 알려진 응고 인자 XII, 즉 FXII는 혈장 단백질이다. 이는 세린 프로테아제 (또는 세린 엔도펩티다아제) 부류의 효소인 인자 XIIa의 효소 전구체 형태이다. 인간에 있어서, 인자 XII는 *F12* 유전자에 의해 암호화된다. 제한할 의도없이 단지 명명법상의 목적으로, 인간 인자 XII의 예시적인 서열들은 NCBI 기준 서열: NP_000496.2; NCPI 단백질 접근 번호 NP_000496 및 서열번호 22에 기재되어 있다. 인자 XII의 추가의 서열들은 본원에 제공된 서열 및/또는 공중이 이용가능한 데이터베이스의 서열을 이용하여 확인될 수 있고/있거나, 표준 기법들 (예컨대, 문헌 [Ausubel *et al.*, (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, 현재까지 모든 최신정보 포함)] 또는 [Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]에 기술됨)을 이용하여 확인될 수 있다.

[0226] 본원에서, "인자 XII 억제제" 또는 "FXII 억제제" 또는 "FXII의 억제제"라는 용어는 인자 XII (활성화 이전, 즉, 이의 효소 전구체) 및 활성화된 인자 XII (FXIIa) 중 하나 또는 양자 모두에 대한 억제제 뿐만 아니라 FXII의 활성화에 대한 억제제를 지칭한다. 따라서, "FXII의 억제제(들)"은 FXII 및 FXIIa (αFXIIa로도 불림) 중 하나 또는 양자 모두에 대한 억제제 뿐만 아니라 FXII의 활성화에 대한 억제제, 예컨대 상기 FXIIa 분해 생성물 FXIIa 알파 및 FXIIa 베타 (FXIIf로도 불림)를 포함할 수 있다. FXII 억제제는 야생형 억제제에 대한 기능적 변이체 및 단편을 망라한다. 기능적 변이체 또는 단편이라는 것은 FXII, FXIIa 또는 FXII의 활성화를 억제하는 야생형 분자의 능력의 적어도 50% (예컨대, 약 50%, 또는 약 60%, 또는 약 70%, 또는 약 80%, 또는 약 90%, 또는 약 95%, 또는 약 99%, 또는 약 100%)를 보유하는 분자이다. 한 예에서, 상기 FXII 억제제는 비내인성 억제제인데; 즉, 이들은 인간체 또는 동물체 내에서 자연적으로 발생하는 억제제가 아닌 것이다.

[0227] 본원에서 "직접 FXII 억제제" 또는 "직접 억제제"라는 용어는 FXII (또는 FXIIa)와의 접촉 (예컨대, 결합)을 통해 작용하는 억제제를 지칭하는데, 즉, 상기 FXII 억제제는 FXII 및/또는 FXIIa에 결합하여 그의 활성 및/또는 활성화를 억제한다. 이와는 대조적으로, 간접 억제제는 FXII (또는 FXIIa) 단백질과의 접촉없이 작용할 수

있다. 예를 들어, 안티센스 RNA는 상기 FXII 유전자의 발현을 감소시키는데 사용될 수 있으며, 또는 소분자가 인자 XI와 같은 하향 FXIIa 반응 파트너와의 상호작용을 통해 FXIIa의 영향을 억제할 수 있는데; 이들은 FXII 단백질과 직접적으로 상호작용하는 것이 아니다. 따라서, 간접 억제제는, 직접 억제제와는 대조적으로, FXII 단백질에 대해 상향 또는 하향으로 작용한다. 한 예에서, 상기 FXII 억제제는 FXII 또는 FXIIa에 특이적인데, 특히 인간 FXII 또는 FXIIa에 특이적이다.

[0228] 본원에서, 단백질 또는 이의 항원 결합 부위와 항원의 상호 작용에 대해 언급할 때 "결합하다"라는 용어는, 해당 상호작용이 항원 상의 특정 구조 (예컨대, 항원성 결정인자 또는 에피토프)의 존재에 의존한다라는 것을 의미한다. 예를 들어, 항체는 단백질을 전체로서 인지하여 결합한다기 보다는 특정한 단백질 구조를 인지하여 결합한다. 항체가 에피토프 "A"에 결합하는 경우, 표지된 "A" 및 상기 단백질을 포함하는 반응 중에서 에피토프 "A" (또는 비표지된 자유 "A")를 포함하는 분자의 존재는 항체에 결합되는 표지된 "A"의 양을 감소시킬 것이다.

[0229] 본원에서, "특이적으로 결합한다" 또는 "특이적 결합"이라는 용어는, 어떤 단백질 또는 이의 항원 결합 부위가 다른 항원 또는 세포와 반응하거나 결합하는 것보다 특정 항원 또는 이를 발현하는 세포와 더욱 빈번하게, 보다 신속하게, 보다 긴 지속기간 동안 및/또는 보다 큰 친화도로 반응하거나 결합한다는 것을 의미하는 것으로 해석해야 한다. 예를 들어, 단백질 또는 이의 항원 결합 부위는, 다반응성 천연 항체 (즉, 인간에서 자연적으로 발견되는 다양한 항원에 결합하는 것으로 알려진 자연 발생 항체)에 의해 일반적으로 인식되는 항원, 또는 다른 혈액 응고 인자에 결합하는 것보다 상당히 더 큰 친화도 (예컨대, 1.5배 또는 2배 또는 5배 또는 10배 또는 20배 또는 40배 또는 60배 또는 80배 내지 100배 또는 150배 또는 200배)로 FXII (또는 FXIIa)와 결합한다. 반드시 그러한 것은 아니지만 일반적으로, 결합에 대한 언급은 특이적 결합을 의미하며, 각 용어는 다른 용어에 대한 분명한 근거를 제공하는 것으로 이해될 것이다.

[0230] "아미도 분해 활성"이라는 용어는 다른 폴리펩타이드에서 적어도 하나의 펩타이드 결합의 가수분해를 촉진하는 FXII의 억제제의 능력을 가리킨다.

[0231] 본원에서 "동일성" 또는 "동일한"이라는 용어는 동일하거나 보존적 치환을 구성하는 아미노산의 백분율 숫자를 지칭한다. 동일성은 본원에 참조로 포함되는 서열 비교 프로그램, 예컨대 GAP (Deveraux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12, 387-395)을 사용하여 측정될 수 있다. 이러한 방법으로, 본원에 언급된 것들과 유사하거나 실질적으로 다른 길이의 서열들은 배열에 갭의 삽입으로 비교될 수 있으며, 상기 갭은 예를 들어, GAP에 의해 사용된 비교 알고리즘을 통해 알아볼 수 있다.

[0232] "반감기 증진 폴리펩타이드" 또는 "HLEP"는 환자 또는 동물 내에서 *생체내* FXII 억제제의 반감기를 증가시킬 수 있는 폴리펩타이드 융합 파트너이다. 이의 예들로는 알부민 및 면역글로불린 및 이들의 단편, 예컨대 Fc 도메인, 또는 유도체를 포함하며, 이들은 FXII 억제제에 직접적으로 융합될 수 있거나, 또는 절단가능한 링커 또는 절단불가한 링커를 통해 융합될 수 있다. 발렌스(Ballance) 등 (WO 2001/79271호)은 인간 혈청 알부민에 융합된 다수의 서로 다른 치료 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드에 대해 기술하였다.

[0233] 본원에서, "알부민" 및 "혈청 알부민"이라는 용어는 인간 알부민 (HA) 및 이의 변이체를 망라한다. 제한할 의도 없이 단지 명명법상의 목적으로, 완전하게 성숙한 형태의 알부민 뿐만 아니라 다른 종의 알부민 및 이의 변이체에 대한 예시적인 서열은 서열번호 23에 기재되어 있다. 본원에서, "알부민"은 알부민의 하나 이상의 기능적 활성 (예컨대, 생물학적 활성)을 갖는, 알부민 폴리펩타이드 또는 아미노산 서열, 또는 알부민 변이체를 지칭한다. 특정 예에서, 알부민은 FXII 억제제의 치료적 활성을 안정화하거나 연장하는데 사용된다. 알부민은 임의의 척추동물, 특히 임의의 포유동물, 예를 들어, 사람, 원숭이, 소, 양 또는 돼지로부터 유래될 수 있다. 비포유동물의 알부민도 포함될 수 있으며, 이들의 예로는 이에 제한되지는 않지만, 닭 및 연어 유래의 알부민을 포함한다. 알부민이 결합된 폴리펩타이드의 알부민 부분은 치료 폴리펩타이드 부분과는 다른 동물로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 알부민 융합 단백질에 대해서는, 본원에 그 내용 전체가 참고로 포함되는 WO 2008/098720호를 참조한다.

[0234] "재조합체"라는 용어는 인위적인 유전자 재조합의 생성물을 의미하는 것으로 이해해야 한다. 따라서, 항체 가변영역을 포함하는 재조합체 단백질과 관련하여, 상기 용어는 B 세포 성숙 동안에 발생하는 천연 재조합 생성물인 대상체 체내에서 자연적으로 발생하는 항체는 포함하지 않는다. 그러나, 이러한 항체가 분리되는 경우에는, 이는 항체 가변영역을 포함하는 분리된 단백질로 간주될 것이다. 이와 유사하게, 상기 단백질을 암호화하는 핵산을 분리시켜 재조합 수단을 이용하여 발현시키는 경우, 생성된 단백질은 재조합체 단백질이다. 재조합체 단백질은, 예컨대 단백질이 발현되는 세포, 조직 또는 대상체 내에 있는 경우, 인위적인 재조합 수단에 의해 발현되는 단백질도 포함한다.

[0235] "단백질"이라는 용어는 단일 폴리펩타이드 사슬, 즉, 펩타이드 결합에 의해 연결된 일련의 인접한 아미노산들 또는 서로 공유 또는 비공유 결합된 일련의 폴리펩타이드 사슬 (즉, 폴리펩타이드 복합체)를 포함하는 것으로 해석되야 할 것이다. 예를 들어, 상기 일련의 폴리펩타이드 사슬은 적절한 화학 결합 또는 이황화 결합을 이용하여 공유 결합될 수 있다. 비공유 결합의 예로는 수소 결합, 이온 결합, 반데르발스힘 및 소수성 상호작용을 포함한다.

[0236] "폴리펩타이드" 또는 "폴리펩타이드 사슬"이라는 용어는 상기 단락으로부터 펩타이드 결합에 의해 결합된 일련의 인접한 아미노산을 의미하는 것으로 이해될 수 있을 것이다.

[0237] 당업자라면 "항체"가 다수의 폴리펩타이드 사슬, 예컨대, 경쇄 가변 영역 (V_L)을 포함하는 폴리펩타이드 및 중쇄 가변 영역 (V_H)을 포함하는 폴리펩타이드로 구성되는 가변 영역을 포함하는 단백질인 것으로 일반적으로 간주됨을 알 수 있을 것이다. 또한, 항체는 일반적으로 불변 도메인을 포함하며, 이들 중 일부는 불변 영역으로 배열될 수 있고, 상기 불변 영역은 중쇄의 경우에 불변 단편 또는 결정성 단편 (fragment crystallizable, Fc)을 포함할 수 있다. V_H 및 V_L은 상호작용하여 하나 또는 소수의 밀접하게 관련된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 영역을 포함하는 Fv를 형성한다. 일반적으로, 포유동물의 경쇄는 κ 경쇄 또는 λ 경쇄이며, 포유동물의 중쇄는 α, δ, ε, γ, μ이다. 항체는 임의의 유형 (예컨대, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 임의의 부류 (예컨대, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 및 IgA_2) 또는 임의의 하위 부류일 수 있다. "항체"라는 용어도 인간화된 항체, 영장류화된 항체, 인간 항체, 합성 인간화된 항체 및 키메라 항체를 망라한다.

[0238] "항-FXII 항체"는 FXII의 효소 전구체 및 활성화된 단백질 (FXIIa), 예컨대 FXIIa 알파 및 FXIIa 베타 분해 단편 중 하나 또는 양자 모두에 결합하고/결합하거나 이들을 억제하는 항체를 포함한다. 일부 예에서, 상기 항체는 FXIIa 또는 FXIIa의 알파 또는 베타 사슬 단편에 특이적으로 결합한다.

[0239] "전장 항체", "무결함 항체" 또는 "전항체"라는 용어는 항체의 항원 결합 단편과는 대조적으로 실질적으로 무결함 형태인 항체를 지칭하기 위하여 상호 교환하여 사용한다. 구체적으로, 전항체는 Fc 영역을 포함하는 중쇄 및 경쇄를 가지는 항체를 포함한다. 불변 도메인은 야생형 서열 불변 도메인 (예컨대, 인간 야생형 서열 불변 도메인) 또는 이의 아미노산 서열 변이체일 수 있다.

[0240] 본원에서, "가변 영역"은 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 본원에 정의된 항체의 경쇄 및/또는 중쇄의 부분을 가리키며, 상보성 결정 영역 (CDR); 즉, CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 프레임워크 영역(FR)의 아미노산 서열을 포함한다. 예시적인 가변 영역은 3개의 CDR과 함께 3개 또는 4개의 FR (예컨대, FR1, FR2, FR3 및 임의로 FR4)를 포함한다. IgNAR로부터 유래된 단백질의 경우, CDR2가 결여될 수 있다. V_H는 중쇄의 가변 영역을 가리킨다. V_L은 경쇄의 가변 영역을 가리킨다.

[0241] 본원에서, "상보적 결정 영역" (동의어, CDR; 즉, CDR1, CDR2 및 CDR3)이라는 용어는 그의 존재가 항원 결합에 필요한 것인 항체 가변 영역의 아미노산 잔기를 지칭한다. 각 가변 도메인은 통상적으로 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 확인되는 3개의 CDR 영역을 가진다. CDR 및 FR에 할당된 아미노산 위치는 미국 메릴랜드주 베데스다에 소재한 미국국립보건원의 카바트의 면역학적 관심 단백질의 서열(Sequences of Proteins of Immunological Interest, 1987 및 1991)에 따라 정의되거나, 또는 본 발명의 수행에서 사용된 다른 넘버링 시스템, 예컨대 표준(canonical) 넘버링 시스템 ([Chothia and Lesk *J. Mol Biol. 196*: 901-917, 1987]; [Chothia *et al. Nature* 342, 877-883, 1989]; 및/또는 [Al-Lazikani *et al., J Mol Biol 273*: 927-948, 1997]); IMGT 넘버링 시스템 [Lefranc *et al., Devel. And Compar. Immunol., 27*: 55-77, 2003]; 또는 AHO 넘버링 시스템 [Honnegher and Pluekthun *J. Mol. Biol., 309*: 657-670, 2001]에 의해 정의될 수 있다.

[0242] "프레임워크 영역" (FR)은 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기들이다.

[0243] 본원에서, "가변 영역 단편", 즉 "Fv"라는 용어는 V_L 및 V_H를 포함하는 다수의 폴리펩타이드 또는 단일 폴리펩타이드로 구성된 임의의 단백질로서, 상기 V_L 및 V_H가 결합하여 항원 결합 부위를 갖는, 즉 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 복합체를 형성하는 것인 단백질을 의미하는 것으로 이해해야 될 것이다. 항원 결합 부위를 형성하는 V_L 및 V_H는 단일 폴리펩타이드 사슬에 존재하거나 서로 다른 폴리펩타이드 사슬에 존재할 수 있다. 또한, 본원의 Fv (뿐만 아니라 본원의 임의의 단백질)는 동일한 항원에 결합할 수 있거나 결합할 수 없는 다수의 항원 결합 부위를 가질 수 있다. 상기 용어는 항체로부터 직접 유도되는 단편뿐만 아니라 재조합 수단을 이용하여 생성되는 상기 단편에 상응하는 단백질을 망라하는 것으로 이해해야 할 것이다. 일부 예에서, V_H는 중쇄 불변 도메

인 (C_H)1에 연결되지 않고/않거나, Vl_L은 경쇄 불변 도메인 (C_L)에 연결되지 않는다. 예시적인 Fv 함유 폴리펩타이드 또는 단백질로는 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab') 단편, scFv, 이원항체, 삼원항체, 사원항체 또는 보다 고차원의 복합체, 또는 이의 불변 영역 또는 도메인에 결합된 상술한 것들 중 임의의 것, 예컨대, C_H2 또는 C_H3 도메인, 예컨대, 미니항체 또는 항체를 포함한다. "Fab 단편"은 1가의 항원 결합 단편으로 이루어지며, 효소 파파인으로 전항체를 분해함으로써 온전한 경쇄 및 중쇄의 일부로 이루어진 단편을 수득하도록 제조될 수 있거나, 또는 재조합 수단을 이용하여 제조될 수도 있다. 항체의 "Fab' 단편"은 전항체를 펩신으로 처리한 후 환원시켜 온전한 경쇄 및 V_H를 포함하는 중쇄의 일부 및 단일 불변 도메인으로 이루어진 분자를 생성하도록 수득될 수 있다. 2개의 Fab' 단편은 각 항체마다 이러한 방식으로 처리하여 수득된다. Fab' 단편도 재조합 수단으로 제조될 수 있다. 항체의 "$F(ab')_2$ 단편"은 2개의 이황화 결합에 의해 함께 유지된 2개의 Fab' 단편의 이량체로 이루어지며, 후속 환원 없이 전항체 분자를 효소 펩신으로 처리하여 수득된다. "Fab_2" 단편은 예를 들어, 루신 지퍼 또는 C_H3 도메인을 사용하여 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 재조합 단편이다. "단쇄 Fv" 또는 "scFv"는 경쇄의 가변 영역 및 중쇄의 가변 영역이 적절한 가요성 폴리펩타이드 링커에 의해 공유 결합된 항체의 Fv를 포함하는 재조합 분자이다. 상기 논의로부터 명백하듯이, 상기 용어는 V_H 및 V_L을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0244] 본원에서, "~를 예방하는", "~를 예방하다" 또는 "예방"이라는 용어는 본원의 화합물의 투여로 질환의 적어도 하나의 증상의 전개를 정지 또는 저해시키는 것을 포함한다.

[0245] 본원에서, "~를 치료하는", "~를 치료하다" 또는 "치료"라는 용어는 본원에 기술된 단백질의 투여로 특정 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 감소 또는 제거하거나, 또는 해당 질환 또는 질병의 진행을 늦추는 것을 포함한다.

[0246] 본원에서, "대상체"라는 용어는 인간을 포함한 모든 동물, 예를 들어, 포유동물을 의미하는 것으로 해석해야 할 것이다. 예시적인 대상체로는, 이에 제한되지는 않지만, 인간 및 인간이 아닌 영장류를 포함한다. 예를 들어, 상기 대상체는 인간이다.

[0247] **죽상경화성 병변의 치료 또는 예방**

[0248] 본 발명은, 예를 들어, 대상체에게 인자 XII의 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 죽상동맥경화증을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0249] 또한, 본 발명은 대상체에게 인자 XII의 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 죽상경화반 파열을 방지하는 방법을 제공한다.

[0250] 한 예에서, 상기 대상체는 죽상동맥경화증, 또는 죽상경화성 병변을 앓고 있다. 상기 죽상경화성 병변은 안정 또는 불안정할 수 있다. 한 예에서, 상기 죽상경화성 병변은 불안정하다. 예를 들어, 죽상동맥경화증을 앓고 있는 대상체는 하기와 같은 죽상동맥경화증의 임상적으로 용인되는 증상으로 고생하고 있다:

[0251] · 운동중 가슴 통증 또는 협심증;

[0252] · 휴식중 가슴 통증;

[0253] · 팔, 어깨, 복부, 또는 턱의 통증;

[0254] · 심정지;

[0255] · 숨가쁨;

[0256] · 전반적으로 몸이 편치 않음;

[0257] · 대상체의 팔 또는 다리의 저림 또는 쇠약;

[0258] · 말하기 어려움 또는 불분명한 발음;

[0259] · 일시적 시력 상실;

[0260] · 대상체의 얼굴의 처진 근육; 및/또는

[0261] · 피로.

[0262] 한 예에서, 상기 대상체는 죽상동맥경화증과 관련된 질환을 앓았거나 앓고 있다. 예를 들어, 상기 대상체는 심근경색증을 앓았다. 한 예에서, 상기 대상체는 뇌졸중을 앓았다.

[0263] 본 발명의 방법은 동맥 계통에 있어서 어떠한 형태의 죽상동맥경화증에도 쉽게 적용시킬 수 있다. 예를 들어, 대상체는 심장, 또는 뇌, 또는 다리, 또는 골반, 또는 팔, 또는 신장에 죽상동맥경화증의 징후 및/또는 증상이 있을 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 동맥 계통의 죽상동맥경화증을 치료 또는 예방하는데 적용될 것이다.

[0264] 한 예에서, 상기 대상체는 죽상동맥경화증 또는 죽상경화성 병변을 발달시킬 위험에 처해 있으나, 죽상동맥경화증의 개시는 아직 발생하지 않았다. 대상체는 대조군 집단보다 죽상동맥경화증을 발달시킬 위험이 더 큰 경우에 위험하다. 대조군 개체군은 협심증, 뇌졸중 및/또는 심장마비를 앓지 않았거나 이에 대한 가족력이 있는 일반 개체군 (예컨대, 연령, 성별, 인종 및/또는 민족성에 의해 매칭시킴)에서 무작위로 선택된 하나 이상의 대상체를 포함할 수 있다. 대상체는 죽상동맥경화증과 관련된 "위험 인자"가 해당 대상체와 관련이 있는 것으로 밝혀진 경우에 죽상동맥경화증에 걸릴 위험한 것으로 간주될 수 있다. 위험 인자는 대상체의 개체군에 대한 통계학적 또는 역학적 연구를 통해 특정 질환과 연관된 임의의 활성, 형질, 사건 또는 특성을 포함할 수 있다. 따라서, 대상체는, 잠재된 위험 인자를 확인하는 연구에서 해당 대상체를 구체적으로 포함시키지 않은 경우라 하더라도, 죽상동맥경화증에 걸릴 위험이 있는 것으로 분류될 수 있다. 예를 들어, 높은 혈장 저밀도 지질단백질 수준을 가진 대상체는 죽상동맥경화증을 발달시킬 위험이 있는데, 이는 높은 혈장 저밀도 지질단백질 수준을 갖는 대상체의 개체군에서 그렇지 않은 대상체의 개체군에 비해 죽상동맥경화증의 빈도수가 증가되기 때문이다.

[0265] 한 예에서, 죽상동맥경화증에 걸릴 위험이 있는 대상체는 고콜레스테롤성, 당뇨병성, 비만성 및/또는 고혈압성인 환자들을 포함한다. 특히 고위험군인 대상체들은 협심증, 및/또는 뇌졸중 및/또는 심장마비를 이미 앓았던 사람들이다.

[0266] 상기 논의된 바와 같이, 본 발명의 방법은 하기의 효과들 중 하나 이상을 달성한다:

[0267] · 대상체에서 폐색성 동맥 혈전의 가능성을 감소시키고;

[0268] · 대상체의 죽상경화반 병변 크기를 감소시키며;

[0269] · 대상체의 죽상경화반 안정화를 증가시키고;

[0270] · 대상체의 죽상경화반 병변 중에 염증성 세포 축적을 감소시키고/감소시키거나;

[0271] · 대상체에서 죽종형성형 세포군을 감소시킴.

[0272] 죽상경화반 병변 크기를 평가하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 혈관조영 분석, 혈관내 초음파 또는 광 간섭성 단층촬영기법 (OCT)을 포함한다.

[0273] 죽상경화반 안정화를 평가하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 경동맥의 혈관내 초음파 분석 또는 MRI를 포함한다.

[0274] 한 예에서, 본 발명의 방법은 죽상동맥경화증 당업계에 공지되어 있거나 본원에 기술된 죽상동맥경화증의 임의의 증상을 감소시킨다.

[0275] 당업자라면 누구나 알 수 있는 바와 같이, 대상체에서 죽상동맥경화증의 증상 또는 영향의 "감소"는 죽상동맥경화증을 앓았지만 본원에 기술된 방법으로 치료를 받지 않았던 다른 대상체 또는 치료 이전의 대상체와 비교될 것이다. 이는 반드시 두 대상체를 나란히 놓고 비교할 필요는 없다. 오히려 개체군 데이터가 신뢰할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 방법으로 치료받지 않은 죽상동맥경화증을 앓고 있는 대상체의 개체군 (임의로, 예컨대, 연령, 체중, 당뇨병 상태, 콜레스테롤 수준이 치료된 대상체와 유사한 대상체의 개체군)을 평가하여 해당 평균값을 본원에 기술된 방법으로 치료된 대상체 또는 대상체의 개체군의 결과와 비교한다.

[0276] **인자 XII의 억제제**

[0277] 한 예에서, FXII의 억제제는 직접 FXII 억제제, 예컨대 특이적 FXII 억제제이다. 예를 들어, 상기 특이적 FXII 억제제는, 1:1의 몰비로 사용되는 경우, FXII 및/또는 FXIIa 이외의 혈장의 세린 프로테아제 또는 다른 내인성 단백질을 약 25% 이하로 억제한다. 예를 들어, 상기 특이적 FXII의 억제제/FXIIa 억제제는, 상기 억제제가 각 혈장의 세린 프로테아제 : 상기 억제제의 1:1의 몰비로 사용되는 경우, FXII 및/또는 FXIIa 이외의 혈장의 세린 프로테아제를 약 25% 이하로 억제한다. 한 예에서, 상기 FXII 억제제는, 1:1의 몰비로 사용되는 경우, FXII 및/또는 FXIIa 이외의 혈장의 세린 프로테아제를 약 20% 이하, 또는 약 15% 이하, 또는 약 10% 이하, 또는 약 5%

이하, 또는 약 1% 이하로 억제한다. 예를 들어, 특이적 FXII 항체는, FXIa : 해당 항체의 몰비를 1:1로 한 경우, 상기 혈장의 세린 프로테아제 FXIa를 약 5%까지 억제하는 반면, 동일한 FXII 항체는 FXIIa를 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90%까지 억제한다.

[0278] 한 예에서, 하나의 다른 혈장의 세린 프로테아제는, 각 혈장의 세린 프로테아제 대 해당 억제제를 1:1의 몰비로 사용하는 경우, 약 50% 이상까지 억제된다.

[0279] 본 발명의 또 다른 예에서, 2개의 다른 혈장의 세린 프로테아제들은, 각 혈장의 세린 프로테아제 대 해당 억제제를 1:1의 몰비로 사용하는 경우, 약 50% 이상까지 억제된다.

[0280] *세린 프로테아제 억제제*

[0281] 한 예에서, FXII의 억제제는 세린 프로테아제 억제제이다. 예를 들어, FXII의 억제제는 인페스틴-4 또는 이의 변이체에 상응하는 서열을 포함한다. 한 예에서, FXII의 억제제는 SPINK-1 또는 이의 변이체에 상응하는 서열을 포함한다.

[0282] 인페스틴-4

[0283] 한 예에서, 본 발명은 인페스틴 도메인 4 ("인페스틴-4"로 지칭함)를 포함하는 FXII의 억제제를 제공한다. 인페스틴은 샤가스병을 유발하는 것으로 알려진, 기생충인 크루스파동편모충(*Trypanosoma cruzi*)에 대한 주된 매개체인 흡혈성 곤충인 *트리아토마 인페스탄스*(*Triatoma infestans*)의 중간창자로부터 유래된 세린 프로테아제 억제제 부류이다 (Campos ITN et al. 32 Insect Biochem. Mol. Bio. 991-997, 2002; Campos ITN et al. 577 FEBS Lett. 512-516, 2004; WO 2008/098720호). 이 곤충은 섭취한 혈액의 응고를 방지하기 위해 상기 억제제를 이용한다. 인페스틴 유전자는 응고 경로에서 서로 다른 인자들을 억제할 수 있는 단백질을 유도하는 4개의 도메인을 암호화한다. 특히, 도메인 4는 강한 FXIIa의 억제제인 단백질 (인페스틴-4)을 암호화한다. 인페스틴-4는 출혈 합병증을 유발하지 않으면서 마우스에 투여되었다 (WO 2008/098720호; Hagedorn et al., Circulation 2010; 121:1510-17).

[0284] 한 실시양태에서, FXII의 억제제는 인페스틴-4를 포함한다. 본원에서, "인페스틴-4"라는 용어는 FXII를 억제하는 능력을 보유하는 야생형 펩타이드의 변이체 또는 단편을 망라한다. 제한할 의도없이 단지 명명법상의 목적으로, 인페스틴-4의 예시적인 서열은 서열번호 1에 기재되어 있다.

[0285] 한 예에서, 상기 인페스틴-4는 FXIIa를 억제하는 그 능력때문에 선택된다. 한 예에서, 상기 인페스틴-4는 인페스틴-4의 변이체를 포함하는데, 여기서 상기 변이체는 인페스틴 도메인 4, 및 임의로, 인페스틴 도메인 1, 2 및/또는 3을 포함한다. 한 예에서, 상기 인페스틴-4는 $(His)_6$-태그된 인페스틴-4 작제물이다.

[0286] 또 다른 예에서, 상기 인페스틴-4는 융합 파트너, 예컨대 인페스틴-4에 연결되거나 결합된 반감기 증진 폴리펩타이드 (예컨대, 알부민, IgG의 Fc 도메인, 또는 PEG)를 포함하는 융합 단백질이다. 한 예에서, 링커는 상기 융합 파트너를 인페스틴-4에 연결시킨다. 다양한 실시양태에서, 상기 인페스틴-4는 문헌 [Hagedorn et al., Circulation 2010; 117:1153-60]에 기술된 rHA-인페스틴-4 단백질이다. 한 예에서, 조성물은 가요성 링커에 의해 문헌 [Hagedorn et al., Circulation 2010; 117:1153-60]에 기술된 rHA-인페스틴-4 단백질에 결합된 알부민을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 인페스틴-4 FXII의 억제제들도 사용되는데, 그 예들은 본원에 그 내용 전체가 참고로 포함되는 WO 2008/098720호 및 문헌 [Hagedorn et al., Circulation 2010; 117:1153-60]에 기술되어 있다.

[0287] 한 예에서, FXII의 억제제는 인페스틴-4의 변이체이다. 본원에서, 인페스틴-4의 "변이체"라는 용어는 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 갖는 폴리펩타이드를 가리키며, 여기서 "돌연변이"라는 것은 야생형 인페스틴-4 서열 (서열번호 1)에 대한 치환, 결실, 또는 부가로 정의된다. 또한, 인페스틴-4의 "변이체"라는 용어는 야생형 또는 돌연변이된 인페스틴-4 서열의 기능적 단편도 포함한다.

[0288] 한 예에서, 야생형 인페스틴-4 서열에 대한 하나 이상의 돌연변이는 FXII를 억제하는 폴리펩타이드의 기능적 역량을 실질적으로 변형시키지 않는다. 예를 들어, 상기 하나 이상의 돌연변이는 FXII를 억제하는 폴리펩타이드의 능력을 완전하게 또는 실질적으로 제거하지 않는다. 예를 들어, 상기 변이체는 야생형 인페스틴-4의 억제 능력의 적어도 약 20%, 또는 약 30%, 또는 약 40%, 또는 약 50%, 또는 약 60%, 또는 약 70%, 또는 약 80%, 또는 약 90%, 또는 약 95%, 또는 약 98%, 또는 약 99%, 또는 그 이상을 보유한다.

[0289] 한 예에서, FXII의 억제제는 서열번호 1에 기재된 야생형 인페스틴-4 서열의 아미노 말단의 잔기 2-13번을 포함

하는 인페스틴-4 변이체를 포함한다. 예를 들어, 상기 인페스틴-4 변이체는 서열번호 24에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0290] 한 예에서, FXII의 억제제는 서열번호 1의 잔기 2-13번을 포함하고, 또한 야생형 인페스틴-4 서열 (서열번호 1)과 비교하여 서열번호 1의 잔기 2-13번 이외에 적어도 하나의 아미노산 돌연변이를 포함하는 인페스틴-4 변이체를 포함한다. 예를 들어, 상기 인페스틴-4 변이체는 적어도 2개의 아미노산 돌연변이, 또는 적어도 3개의 아미노산 돌연변이, 또는 적어도 4개의 아미노산 돌연변이, 또는 적어도 5개의 아미노산 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, FXII의 억제제는 서열번호 1의 2-13번 위치의 N-말단 아미노산 이외의 1-5개의 아미노산 돌연변이를 함유하도록 변형된 서열번호 1을 포함하는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.

[0291] 한 예에서, FXII의 억제제는 야생형 인페스틴-4 서열의 6개의 보존된 시스테인 잔기를 보유하는 인페스틴-4 변이체이다. 한 예에서, 상기 6개의 보존된 시스테인 잔기는 야생형 인페스틴-4 서열 (서열번호 1)의 6, 8, 16, 27, 31 및 48번 위치의 아미노산이다. 한 예에서, 상기 인페스틴-4 변이체는 48번 위치에 마지막의 보존된 시스테인을 포함한다. 또 다른 예에서, 시스테인 잔기의 정확한 위치, 및 서로에 대한 상대적인 위치는, 상기 인페스틴-4 변이체 서열에서의 삽입 또는 결실로 인해 야생형 인페스틴-4 서열의 6, 8, 16, 27, 31 및 48번 위치에서 바뀔 수 있다.

[0292] 한 예에서, 상기 인페스틴-4 변이체는 야생형 인페스틴-4 서열에 대해 적어도 약 70% 동일하다. 예를 들어, 상기 인페스틴-4는 야생형 인페스틴-4 서열에 대해 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%의 동일성을 가진다. 예를 들어, FXII의 억제제는 서열번호 1에 기재된 서열과 적어도 70% 동일한 서열을 가지며 서열번호 1의 6개의 보존된 시스테인 잔기를 보유하는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.

[0293] 한 예에서, FXII의 억제제는 야생형 인페스틴-4 서열의 6개의 보존된 시스테인 잔기를 보유하고/보유하거나 야생형 인페스틴-4 서열에 대해 적어도 약 70% 동일한 서열을 갖는 인페스틴-4 변이체이다.

[0294] 한 예에서, FXII의 억제제는 서열번호 1의 2-13번 위치의 N-말단 아미노산 이외의 1-5개의 아미노산 돌연변이를 함유하도록 변형된 서열번호 1; 및 서열번호 1과 적어도 70% 동일한 서열을 포함하며, 서열번호 1의 6개의 보존된 시스테인 잔기를 보유하는 인페스틴-4 변이체이다.

[0295] 한 예에서, 인페스틴-4 변이체는 야생형 인페스틴-4 서열의 보존된 N-말단 영역 아미노산 2-13번, 및 적어도 하나, 및 임의로는 5개 이하의 상기 보존된 N-말단 아미노산 이외의 아미노산 돌연변이를 포함하여, 야생형 인페스틴-4 서열과는 차이가 있다. 본원에서, 인페스틴 변이체의 "N-말단 아미노산 이외의"라는 용어는 서열번호 1의 아미노산 2-13번인 서열번호 24의 서열을 포함하는 아미노산의 연속된 구간 이외의, 상기 변이체의 폴리펩타이드 사슬을 따라 있는 임의의 아미노산을 지칭한다.

[0296] 한 예에서, 인페스틴-4 변이체는 서열번호 1의 6개의 모든 보존된 시스테인 잔기 및/또는 야생형 인페스틴-4 서열 (서열번호 1)에 적어도 약 70% 동일한 서열을 포함한다. 예를 들어, 상기 인페스틴-4 변이체는 야생형 인페스틴-4 (서열번호 1)에 대해 적어도 약 70%, 또는 약 75%, 또는 약 85%, 또는 약 90%, 또는 약 91%, 또는 약 92%, 또는 약 93%, 또는 약 94%, 또는 약 95%, 또는 약 96%, 또는 약 97%, 또는 약 98%, 또는 약 99% 동일한 서열을 포함할 수 있다.

[0297] 한 예에서, 상기 인페스틴-4 변이체는 서열번호 1의 아미노산 2-13번 뿐만 아니라 6개의 모든 보존된 시스테인 잔기를 보유하며, 야생형 인페스틴-4 서열 (서열번호 1)에 적어도 약 70% 동일하다. 예를 들어, 상기 인페스틴-4 변이체는 야생형 인페스틴-4 (서열번호 1)에 대해 적어도 약 70%, 또는 약 75%, 또는 약 85%, 또는 약 90%, 또는 약 91%, 또는 약 92%, 또는 약 93%, 또는 약 94%, 또는 약 95%, 또는 약 96%, 또는 약 97%, 또는 약 98%, 또는 약 99% 동일한 서열을 포함할 수 있다.

[0298] 한 실시양태에서, 상기 FXII 억제제는 야생형 인페스틴-4 폴리펩타이드 서열의 변이체를 포함하는데, 여기서 상기 인페스틴-4 변이체는 서열번호 1의 N-말단 아미노산 2-13번; 적어도 하나, 및 임의로는 5개 이하의 상기 N-말단 아미노산 이외의 아미노산 돌연변이; 6개의 보존된 시스테인 잔기; 및/또는 야생형 인페스틴-4 서열 (서열번호 1)에 대해 적어도 70% 동일성을 포함한다. 예를 들어, 상기 인페스틴-4는 야생형 인페스틴-4 서열 (서열번호 1)에 대해 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0299] 한 예에서, 인페스틴-4 변이체는 서열번호 25에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 한 예에서, 서열번호 24는 단편 또는 전장의 야생형 인페스틴-4 서열 (서열번호 1)의 N-말단 또는 그 부근에 부가되며, 인간 단백질

SPINK-1로부터 유래한다.

[0300] 한 예에서, 인페스틴-4는 야생형 인페스틴-4 또는 변이체 인페스틴-4 및 융합 파트너 간의 융합 작제물을 포함한다. 예를 들어, 상기 융합 파트너는 PEG 또는 반감기 증진 폴리펩타이드를 포함한다. 한 예에서, 상기 인페스틴 상기 반감기 증진 폴리펩타이드는 인간 알부민 ("HA"로 지칭함)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 HA는 재조합체 단백질 ("rHA"로 지칭함). 특정 실시양태에서, 상기 인페스틴-4와 HA 단백질은 직접 결합되거나, 또는 링커 펩타이드를 통해 결합된다. 예를 들어, FXII의 억제제는 링커 펩타이드를 통해 인페스틴-4에 결합된 인간 알부민을 포함하는 융합 단백질이다.

[0301] 한 예에서, FXII의 억제제는 FXII를 억제하는 능력을 보유하는 인페스틴-4의 변이체이다. 예를 들어, 상기 인페스틴-4의 변이체는 FXII를 억제하는 인페스틴-4와 동일한 능력을 가진다. 한 예에서, 상기 인페스틴-4의 변이체는 FXII 활성 및/또는 FXII의 활성화를 억제한다.

[0302] 한 예에서, 본 발명의 FXII의 억제제는 인간 인자 XIIa-베타에 결합하기 위해 인페스틴-4와 경쟁한다.

[0303] FXII의 기능적 억제 활성을 평가하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 시험관내 및/또는 생체내 특성화, 예컨대 FXII의 효소 활성의 억제, 연장된 응고 시간 (예컨대, 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간, aPTT)을 시험하는 직접 시험, 고유 응고 경로를 알아보는 임상적 응고 시험, 또는 응고에 대해 평가하는 생체내 방법을 포함한다.

[0304] SPINK-1

[0305] 한 예에서, FXII의 억제제는 인페스틴-4와 매우 유사한 인간 단백질을 포함한다. 예를 들어, FXII의 억제제는 SPINK-1이다. SPINK-1은 췌장에서 발현되는 카잘형(Kazal-type) 세린 프로테아제 억제제이다 (췌장 분비성 트립신 억제제, 즉 PSTI로도 알려짐). 상기 카잘형 세린 프로테아제 억제제 부류는 수많은 부류의 공지된 세린 프로테아제 억제제들 중 하나이다. 서로 다른 종들의 여러가지 유사한 단백질들에 대해 기술된 바 있다 (Laskowski M and Kato I, 49 Ann. Rev. Biochem. 593-626, 1980). 제한할 의도없이 단지 명명법상의 목적으로, SPINK-1의 예시적인 서열은 서열번호 2에 기재되어 있다.

[0306] 한 예에서, FXII의 억제제는 서열번호 2에 기재된 SPINK-2의 야생형 서열을 포함한다.

[0307] "SPINK-1"이라는 용어는 FXII를 억제하는 능력을 실질적으로 보유하는 SPINK-1의 기능적 변이체 및 단편들도 포함한다. 한 예에서, FXII의 억제제는 SPINK-1 변이체이다. 예를 들어, 야생형 서열 (즉, 서열번호 2)의 변이체는 인페스틴-4에 대한 SPINK-1 서열의 동일성을 증가시키기 위해 제조될 수 있다. 본원에서, "변이체"라는 용어는 SPINK-1의 단편 또는 돌연변이된 SPINK-1 서열을 포함한다.

[0308] 한 예에서, SPINK-1 (서열번호 2)은 2-13번 위치의 N-말단 아미노산을 서열번호 1의 N-말단 아미노산 2-13번으로 대체하도록 돌연변이된다.

[0309] 한 예에서, FXII의 억제제는 야생형 인페스틴-4 서열의 N-말단 부분을 포함하는 SPINK-1 변이체이다. 예를 들어, 상기 SPINK-1 변이체는 서열번호 1의 아미노산 2-13번을 포함한다.

[0310] 한 예에서, FXII의 억제제는 야생형 인페스틴-4 서열에 대한 SPINK-1 변이체의 동일성을 증가시키는 N-말단 아미노산 이외의 적어도 하나의 추가의 아미노산 돌연변이를 포함하는 SPINK-1 변이체이다. 예를 들어, 상기 SPINK-1 변이체는 야생형 인페스틴-4 서열에 대한 SPINK-1 변이체의 동일성을 증가시키는 N-말단 아미노산 이외의 적어도 하나, 또는 적어도 2개, 또는 적어도 3개, 또는 적어도 4개, 또는 적어도 5개의 추가의 아미노산 돌연변이를 포함한다.

[0311] 돌연변이는 치환, 결실, 및/또는 부가를 포함할 수 있다. "N-말단 아미노산 이외의" 돌연변이는 서열번호 24의 서열을 포함하는 아미노산의 연속된 구간, 즉 서열번호 1의 아미노산 2-13번 이외의 변이체의 폴리펩타이드 사슬을 따라 있는 임의의 아미노산 중의 하나 이상의 돌연변이를 지칭한다.

[0312] 한 예에서, FXII의 억제제는 2-13번 위치의 N-말단 아미노산을 서열번호 1의 2-13번 위치의 N-말단 아미노산으로 대체하도록 돌연변이된 서열번호 2를 포함하며; 임의로, 서열번호 1의 서열에 대한 폴리펩타이드 서열의 상동성을 증가시키는 1-5개의 추가의 아미노산 돌연변이를 함유하도록 추가로 변형된다.

[0313] 한 예에서, FXII의 억제제는 야생형 인페스틴-4 서열 (즉, 서열번호 1)에 대한 변이체의 동일성을 증가시키도록 돌연변이된 SPINK-1 서열을 포함하는 SPINK-1 변이체를 포함한다.

[0314] 한 예에서, SPINK-1 변이체는 야생형 인페스틴-4 서열의 N-말단 부분을 포함한다. 예를 들어, 상기 SPINK-1 변이체는 서열번호 1의 아미노산 2-13번을 포함한다.

[0315] 한 예에서, FXII의 억제제는 서열번호 2의 6개의 보존된 시스테인 잔기를 포함하는 SPINK-1 변이체를 포함한다.

[0316] 한 예에서, SPINK-1의 상기 6개의 보존된 시스테인 잔기는 야생형 SPINK-1 서열 (서열번호 2)의 9, 16, 24, 35, 38 및 56번 위치의 아미노산일 수 있다. 한 예에서, 상기 변이체는 야생형 SPINK-1 서열의 마지막 시스테인 (즉, 서열번호 2의 56번 위치의 시스테인)을 포함한다. 한 예에서, 상기 6개의 보존된 시스테인 잔기들은 돌연변이되지 않지만, 시스테인 잔기의 정확한 위치, 및 서로에 대한 상대적인 위치는, 상기 SPINK-1 변이체 서열에서의 삽입 및/또는 결실로 인해 야생형 SPINK-1 서열의 9, 16, 24, 35, 38 및 56번 위치에서 바뀔 수 있다. 그러나, 상기 예들에서, SPINK-1 변이체는 6개의 모든 시스테인 잔기들을 포함한다.

[0317] 한 예에서, FXII의 억제제는 서열번호 2에 적어도 70% 동일한 서열을 포함하는 SPINK-1 변이체를 포함한다. 예를 들어, 상기 SPINK-1 변이체는 서열번호 2에 대해 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 서열을 포함한다.

[0318] 한 예에서, FXII의 억제제는 서열번호 2와 적어도 70% 동일한 서열을 포함하고, 서열번호 2의 6개의 보존된 시스테인 잔기를 보유하는 SPINK-1 변이체를 포함한다.

[0319] 한 예에서, SPINK-1의 6개의 보존된 시스테인 잔기들은 돌연변이되지 않는다. 한 예에서, SPINK-1 서열은 야생형 인페스틴-4 서열의 N-말단 부분을 포함하도록 돌연변이된다. 예를 들어, 상기 SPINK-1 서열은 서열번호 1의 아미노산 2-13번을 포함하도록 돌연변이된다.

[0320] 한 예에서, SPINK-1 서열은 야생형 인페스틴-4 서열의 N-말단 부분을 포함하고/되거나, 야생형 SPINK-1 서열과 적어도 70% 동일한 서열을 가지도록 돌연변이된다. 예를 들어, 상기 SPINK-1 서열은 야생형 SPINK-1 서열에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 서열을 포함한다.

[0321] 한 예에서, SPINK-1 서열은 야생형 인페스틴-4 서열의 N-말단 부분을 포함하고/되거나, 야생형 SPINK-1 서열과 적어도 70% 동일한 서열을 가지고/가지거나, SPINK-1 서열 중에 N-말단 아미노산 이외의 적어도 하나의 돌연변이를 포함하도록 돌연변이된다.

[0322] 한 예에서, FXII의 억제제는 2-13번 위치의 N-말단 아미노산을 서열번호 1의 2-13번 위치의 N-말단 아미노산으로 대체하도록 돌연변이되고; 임의로, 서열번호 1의 서열에 대한 폴리펩타이드 서열의 동일성을 증가시키는 1-5개의 추가의 아미노산 돌연변이를 함유하도록 추가로 변형되는 서열번호 2를 포함하는 SPINK-1 변이체를 포함한다.

[0323] 한 예에서, FXII의 억제제는 2-13번 위치의 N-말단 아미노산을 서열번호 1의 2-13번 위치의 N-말단 아미노산으로 대체하도록 돌연변이되고; 임의로, 서열번호 1의 서열에 대한 폴리펩타이드 서열의 동일성을 증가시키는 1-5개의 추가의 아미노산 돌연변이를 함유하도록 추가로 변형되는 서열번호 2 및 서열번호 2와 적어도 70% 동일하고 서열번호 2의 6개의 보존된 시스테인 잔기를 보유하는 서열을 포함하는 SPINK-1 변이체를 포함한다.

[0324] 한 예에서, FXII의 억제제는 FXII를 억제하는 그의 능력을 실질적으로 보유하는 SPINK-1 변이체를 포함한다. 예를 들어, 상기 SPINK-1 변이체는 야생형 SPINK-1의 억제 능력의 적어도 약 20%, 또는 약 30%, 또는 약 40%, 또는 약 50%, 또는 약 60%, 또는 약 70%, 또는 약 80%, 또는 약 90%, 또는 약 95%, 또는 약 98%, 또는 약 99%를 보유한다.

[0325] 한 예에서, 본 발명의 FXII의 억제제는 인간 인자 XIIa-베타에 결합하기 위해 SPINK-1과 경쟁한다.

[0326] 한 예에서, FXII의 억제제는 K1 (서열번호 3), K2 (서열번호 4) 및 K3 (서열번호 5)로 이루어진 군으로부터 선택된 SPINK-1 변이체이다.

[0327] 한 예에서, SPINK-1 변이체는 서열번호 3에 기재된 것과 같은 K1이다.

[0328] 한 예에서, SPINK-1 변이체는 서열번호 4에 기재된 것과 같은 K2이다.

[0329] 한 예에서, SPINK-1 변이체는 서열번호 5에 기재된 것과 같은 K3이다.

[0330] 한 예에서, 인페스틴-4에 대한 동일성을 증가시키기 위해, K1에 대하여 N-말단 이외에서 추가의 아미노산 치환이 이루어질 수 있다.

[0331] 한 예에서, 인페스틴-4에 대한 동일성을 증가시키기 위해, K3에 대하여 N-말단 이외에서 추가의 아미노산 치환이 이루어질 수 있다. 예를 들어, 인페스틴-4에 대한 동일성을 증가시키기 위해, K3에 대하여 N-말단 이외의 5개의 아미노산 치환이 이루어질 수 있다.

[0332] 한 예에서, SPINK-1 변이체는 야생형 SPINK-1 서열과 적어도 약 70%의 동일성을 공유한다. 예를 들어, 상기 SPINK-1 변이체는 야생형 SPINK-1 서열과 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 97%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%의 동일성을 공유한다.

[0333] *인자 XII 항체*

[0334] 인자 XII (FXII)의 예시적인 억제제는 FXII에 결합하여 FXII 신호전달을 중화시키는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 항체 가변 영역을 포함한다. 예를 들어, 상기 항-FXII 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 FXII 및/또는 FXIIa에 결합하여 FXII 및/또는 FXIIa의 활성화 및/또는 이의 활성을 억제한다.

[0335] 한 예에서, 상기 항체 가변 영역은 FXII에 특이적으로 결합한다.

[0336] 예를 들어, FXII의 억제제는 FXII 및/또는 FXIIa에 결합하여 FXII 및/또는 FXIIa의 활성을 억제한다.

[0337] 또 다른 예에서, FXII의 억제제는 FXII 및/또는 FXIIa에 결합하여 FXII 및/또는 FXIIa의 활성화를 억제한다.

[0338] 적절한 항체 및 이의 가변 영역을 포함하는 단백질은 당업계에 공지되어 있다.

[0339] 예를 들어, 항-인자 XII 항체 및 이의 단편은 WO 2006/066878호 및 문헌 [Ravon *et al., Blood 86*: 4134-43 (1995)]에 기재되어 있다. 추가의 항-인자 XII 항체들은 WO 2013/014092호에 기재되어 있다.

[0340] 한 예에서, 상기 항-FXII 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 FXII 및/또는 FXIIa에 결합하는 항체이다.

[0341] 한 예에서, FXII 및/또는 FXIIa의 활성화는 적어도 약 50%까지 억제된다. 예를 들어, FXII 및/또는 FXIIa의 활성화는 약 60%, 또는 약 70%, 또는 약 80%, 또는 약 85%, 또는 약 90%, 또는 약 95%, 또는 약 99%, 또는 약 100%까지 억제된다.

[0342] 한 예에서, 본 발명의 FXII의 억제제는 FXIIa를 적어도 약 80%까지 억제한다. 예를 들어, 본 발명의 FXII의 억제제는, FXIIa : 억제제가 1:0.5의 몰비로 사용되는 경우, 인자 XIIa-알파를 약 80%까지 억제한다. 예를 들어, FXII의 억제제는, 인자 XIIa : 억제제가 1:0.5의 몰비로 사용되는 경우, 인자 XIIa를 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%, 또는 약 100%까지 억제한다.

[0343] 인자 XIIa 활성의 억제를 알아보는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, WO 2013/014092호에 개시된 바와 같은 시험관내 FXIIa 아미도 분해 활성 분석을 포함한다.

[0344] 한 예에서, 상기 항-FXII 항체는 인간 인자 XIIa의 아미도 분해 활성을 억제할 수 있다.

[0345] 한 예에서, 본 발명의 FXII의 억제제는 항체 3F7 또는 gVR115의 결합 친화도 또는 특이성과 유사한 인간 FXIIa에 대한 결합 친화도 또는 특이성을 가진다.

[0346] 한 예에서, 본 발명의 FXII의 억제제는 FXII에 대한 항체 3F7 또는 gVR115의 결합을 경쟁적으로 억제한다.

[0347] 한 예에서, 상기 항-FXII 항체는 비활성화된 인간 FXII에 비하여 인간 인자 XIIa-베타에 대해 적어도 2배 높은 결합 친화도를 가진다. 예를 들어, 인간 인자 XIIa-베타에 대한 결합 친화도는 비활성화된 인간 FXII에 비해 적어도 약 3배, 또는 적어도 약 4배, 또는 적어도 약 5배가 높다.

[0348] 한 예에서, 본 발명의 FXII의 억제제는 약 1×10^{-8}M 이하, 예컨대 9.5×10^{-9} M 이하, 예컨대 9×10^{-9} M 이하, 예컨대 8.5×10^{-9} M 이하, 예컨대 8×10^{-9} M 이하, 예컨대 7.5×10^{-9} M 이하, 예컨대 7×10^{-9} M 이하, 예컨대 6.5×10^{-9} M 이하, 예컨대 6×10^{-9} M 이하, 예컨대 5.5×10^{-9} M 이하, 예컨대 5×10^{-9} M의 평형 해리 상수 (KD)로 인간 인자 XIIa-베타에 결합한다.

[0349] 한 예에서, 상기 항-FXII 항체 또는 이의 단편은 서열번호 6에 기재된 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호 7에 기재된 서열을 포함하는 V_L을 포함한다.

[0350] 한 예에서, 상기 항-FXII 항체 또는 이의 단편은 서열번호 6에 기재된 서열과 적어도 85% 동일한 서열을 포함하는 V_H를 포함한다. 예를 들어, 상기 V_H 서열은 서열번호 6에 기재된 서열과 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일하다. CDR에 대한 돌연변이를 위한 예시적 위치는 본원에 기술되어 있다. 당업자라면 프레임워크 영역에 대한 돌연변이 위치를 쉽게 확인할 수 있을 것이다. 한 예에서, 언급된 서열에 대한 임의의 변화 위치는 프레임워크 영역 내에 존재한다.

[0351] 한 예에서, 상기 항-FXII 항체 또는 이의 단편은 서열번호 7에 기재된 서열과 적어도 85% 동일한 서열을 포함하는 V_L을 포함한다. 예를 들어, 상기 V_L 서열은 서열번호 7에 기재된 서열과 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일하다. CDR에 대한 돌연변이를 위한 예시적 위치는 본원에 기술되어 있다. 당업자라면 프레임워크 영역에 대한 돌연변이 위치를 쉽게 확인할 수 있을 것이다. 한 예에서, 언급된 서열에 대한 임의의 변화 위치는 프레임워크 영역 내에 존재한다.

[0352] 한 예에서, 상기 FXII의 억제제는 상기 항-FXII 항체의 V_H (서열번호 6) 및/또는 V_L (서열번호 7)의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함하는 단백질이다. 예를 들어, 단백질을 하기를 포함한다:

[0353] (i) 하기를 포함하는 V_H:

[0354] (a) 서열번호 6에 기재된 서열; 또는

[0355] (b) 서열번호 8에 기재된 서열을 포함하는 CDR1;

[0356] (c) 서열번호 9 또는 서열번호 10에 기재된 서열을 포함하는 CDR2;

[0357] (d) 서열번호 11 또는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하는 CDR3; 및/또는

[0358] (ii) 하기를 포함하는 V_L:

[0359] (a) 서열번호 7에 기재된 서열; 또는

[0360] (b) 서열번호 13 또는 서열번호 17에 기재된 서열을 포함하는 CDR1;

[0361] (c) 서열번호 14에 기재된 서열을 포함하는 CDR2;

[0362] (d) 서열번호 15 또는 서열번호 16에 기재된 서열을 포함하는 CDR3.

[0363] 또 다른 예에서, 단백질은 하기를 포함한다:

[0364] (i) 하기를 포함하는 V_H:

[0365] (a) 서열번호 8에 기재된 서열을 포함하는 CDR1;

[0366] (b) 서열번호 10에 기재된 서열을 포함하는 CDR2; 및

[0367] (c) 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하는 CDR3; 및/또는

[0368] (ii) 하기를 포함하는 V_L:

[0369] (a) 서열번호 13에 기재된 서열을 포함하는 CDR1;

[0370] (b) 서열번호 14에 기재된 서열을 포함하는 CDR2; 및

[0371] (c) 서열번호 16에 기재된 서열을 포함하는 CDR3.

[0372] 한 예에서, 단백질은 하기를 포함한다:

[0373] (i) 하기를 포함하는 V_H:

[0374] (a) 서열번호 8에 기재된 서열을 포함하는 CDR1;

[0375] (b) 서열번호 9에 기재된 서열을 포함하는 CDR2; 및

[0376] (c) 서열번호 11에 기재된 서열을 포함하는 CDR3; 및/또는

[0377] (ii) 하기를 포함하는 V_L:

[0378] (a) 서열번호 13에 기재된 서열을 포함하는 CDR1;

[0379] (b) 서열번호 14에 기재된 서열을 포함하는 CDR2; 및

[0380] (c) 서열번호 15에 기재된 서열을 포함하는 CDR3.

[0381] 또 다른 예에서, 단백질은 하기를 포함한다:

[0382] (i) 하기를 포함하는 V_H:

[0383] (a) 서열번호 8에 기재된 서열을 포함하는 CDR1;

[0384] (b) 서열번호 10에 기재된 서열을 포함하는 CDR2; 및

[0385] (c) 서열번호 11에 기재된 서열을 포함하는 CDR3; 및/또는

[0386] (ii) 하기를 포함하는 V_L:

[0387] (a) 서열번호 13에 기재된 서열을 포함하는 CDR1;

[0388] (b) 서열번호 14에 기재된 서열을 포함하는 CDR2; 및

[0389] (c) 서열번호 15에 기재된 서열을 포함하는 CDR3.

[0390] 또 다른 예에서, 단백질은 하기를 포함한다:

[0391] (i) 하기를 포함하는 V_H:

[0392] (a) 서열번호 8에 기재된 서열을 포함하는 CDR1;

[0393] (b) 서열번호 9에 기재된 서열을 포함하는 CDR2; 및

[0394] (c) 서열번호 11에 기재된 서열을 포함하는 CDR3; 및/또는

[0395] (ii) 하기를 포함하는 V_L:

[0396] (a) 서열번호 17에 기재된 서열을 포함하는 CDR1;

[0397] (b) 서열번호 14에 기재된 서열을 포함하는 CDR2; 및

[0398] (c) 서열번호 15에 기재된 서열을 포함하는 CDR3.

[0399] 한 예에서, 상기 단백질은 서열번호 8에 기재된 바와 같은 CDR1을 포함하는 V_H를 포함한다.

[0400] 한 예에서, 상기 단백질은 서열번호 8에 기재된 서열과 적어도 80% 동일한 CDR1을 포함하는 V_H를 포함한다. 예를 들어, 상기 단백질은 서열번호 8에 기재된 서열과 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 CDR1을 포함하는 V_H를 포함한다.

[0401] 한 예에서, 상기 단백질은 서열번호 9에 기재된 바와 같은 CDR2를 포함하는 V_H를 포함한다.

[0402] 한 예에서, 상기 단백질은 서열번호 9에 기재된 서열과 적어도 60% 동일한 CDR2를 포함하는 V_H를 포함한다. 예를 들어, 상기 단백질은 서열번호 9에 기재된 서열과 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 CDR2를 포함하는 V_H를 포함한다.

[0403] 한 예에서, 상기 단백질은 서열번호 10에 기재된 바와 같은 CDR2를 포함하는 V_H를 포함한다.

[0404] 한 예에서, V_H CDR2의 아미노산 서열은 3번 위치에 아르기닌 (R), 아스파라긴 (N) 또는 아스파르트산 (D) 및/또는 4번 위치에 프롤린 (P), 발린 (V), 이소루신 (I) 또는 메티오닌 (M) 및/또는 5번 위치에 세린 (S), 프롤린 (P) 또는 알라닌 (A) 및/또는 6번 위치에 글리신 (G), 루신 (L), 발린 (V) 또는 트레오닌 (T) 및/또는 7번 위치에 임의의 아미노산 및/또는 8번 위치에 트레오닌 (T), 글리신 (G) 또는 세린 (S)을 포함한다.

[0405] 한 예에서, V_H CDR2의 아미노산 서열은 3번 위치에 아스파라긴 (N) 및 4번 위치에 발린 (V) 및 5번 위치에 프롤

린 (P) 및 6번 위치에 루신 (L) 및 7번 위치에 티로신 (Y) 및 8번 위치에 글리신 (G)을 포함한다.

[0406] 한 예에서, V_H CDR2의 아미노산 서열은 3번 위치에 아스파라긴 (N) 및 4번 위치에 발린 (V) 및 5번 위치에 프롤린 (P) 및 6번 위치에 발린 (V) 및 7번 위치에 글루타민 (Q) 및 8번 위치에 글리신 (G)을 포함한다.

[0407] 한 예에서, V_H CDR2의 아미노산 서열은 3번 위치에 아스파르트산 (D) 및 4번 위치에 이소루신 (I) 및 5번 위치에 프롤린 (P) 및 6번 위치에 트레오닌 (T) 및 7번 위치에 리신 (K) 및 8번 위치에 글리신 (G)을 포함한다.

[0408] 한 예에서, V_H CDR2의 아미노산 서열은 3번 위치에 아스파르트산 (D) 및 4번 위치에 메티오닌 (M) 및 5번 위치에 프롤린 (P) 및 6번 위치에 트레오닌 (T) 및 7번 위치에 리신 (K) 및 8번 위치에 글리신 (G)을 포함한다.

[0409] 한 예에서, 상기 단백질은 서열번호 11에 기재된 바와 같은 CDR3을 포함하는 V_H를 포함한다.

[0410] 한 예에서, 상기 단백질은 서열번호 11에 기재된 서열과 적어도 80% 동일한 CDR3을 포함하는 V_H를 포함한다. 예를 들어, 상기 단백질은 서열번호 11에 기재된 서열과 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 CDR3을 포함하는 V_H를 포함한다.

[0411] 한 예에서, 상기 단백질은 서열번호 12에 기재된 바와 같은 CDR3을 포함하는 V_H를 포함한다.

[0412] 한 예에서, V_H CDR3의 아미노산 서열은 9번 위치에 이소루신 (I), 메티오닌 (M) 또는 발린 (V) 및/또는 10번 위치에 세린 (S) 또는 리신 (K) 및/또는 11번 위치에 프롤린 (P), 리신 (K), 트레오닌 (T) 또는 히스티딘 (H) 및/또는 12번 위치에 히스티딘 (H), 아스파라긴 (N), 글리신 (G) 또는 글루타민 (Q)을 포함한다.

[0413] 한 예에서, 상기 단백질은 서열번호 13에 기재된 바와 같은 CDR1을 포함하는 V_L을 포함한다.

[0414] 한 예에서, 상기 단백질은 서열번호 13에 기재된 서열과 적어도 50% 동일한 CDR1을 포함하는 V_L을 포함한다. 예를 들어, 상기 단백질은 서열번호 13에 기재된 서열과 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 CDR1을 포함하는 V_L을 포함한다.

[0415] 한 예에서, 상기 단백질은 서열번호 17에 기재된 바와 같은 CDR1을 포함하는 V_L을 포함한다.

[0416] 한 예에서, 상기 단백질은 서열번호 17에 기재된 서열과 적어도 50% 동일한 CDR1을 포함하는 V_L을 포함한다. 예를 들어, 상기 단백질은 서열번호 17에 기재된 서열과 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 CDR1을 포함하는 V_L을 포함한다.

[0417] 한 예에서, 상기 단백질은 서열번호 14에 기재된 바와 같은 CDR2를 포함하는 V_L을 포함한다.

[0418] 한 예에서, 상기 단백질은 서열번호 14에 기재된 서열과 적어도 50% 동일한 CDR2를 포함하는 V_L을 포함한다. 예를 들어, 상기 단백질은 서열번호 14에 기재된 서열과 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 CDR2를 포함하는 V_L을 포함한다.

[0419] 한 예에서, 상기 단백질은 서열번호 15에 기재된 바와 같은 CDR3을 포함하는 V_L을 포함한다.

[0420] 한 예에서, 상기 단백질은 서열번호 15에 기재된 서열과 적어도 50% 동일한 CDR3을 포함하는 V_L을 포함한다. 예를 들어, 상기 단백질은 서열번호 15에 기재된 서열과 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 CDR3을 포함하는 V_L을 포함한다.

[0421] 한 예에서, 상기 단백질은 서열번호 16에 기재된 바와 같은 CDR3을 포함하는 V_L을 포함한다.

[0422] 한 예에서, V_L CDR3의 아미노산 서열은 2번 위치에 알라닌 (A) 또는 세린 (S) 및/또는 4번 위치에 아스파르트산 (D), 티로신 (Y), 글루탐산 (E), 트레오닌 (T), 트립토판 (W) 또는 세린 (S) 및/또는 5번 위치에 알라닌 (A),

아스파라긴 (N), 이소루신 (I), 루신 (L), 발린 (V), 프롤린 (P), 글루타민 (Q) 또는 글루탐산 (E) 및/또는 6번 위치에 세린 (S), 아스파르트산 (D), 프롤린 (P), 글루탐산 (E), 글루타민 (Q) 또는 아르기닌 (R) 및/또는 7번 위치에 루신 (L) 또는 발린 (V) 및/또는 9번 위치에 글리신 (G), 루신 (L) 또는 리신 (K) 및/또는 10번 위치에 발린 (V), 알라닌 (A), 아스파르트산 (D), 트레오닌 (T), 메티오닌 (M) 또는 글리신 (G)을 포함한다.

[0423] 한 예에서, FXII의 억제제는 친화도가 증진된, 키메라, CDR 그래프트된, 또는 인간화된 항체, 또는 이의 항원 결합 단편이다. 한 예에서, 상기 항-FXII 항체는 친화도가 증진된 형태의 항체 3F7이다. 예를 들어, 상기 항-FXII 항체는 VR115, VR112, VR24, VR110 또는 VR119로부터 선택된다 (상기 항체들의 HCDR 1-3 및 LCDR1-3에 대한 서열번호는 하기 표 1에 나타나 있음).

표 1

[0424]

mAb	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
3F7	8	9	11	13	14	15
VR119	8	10	11	13	14	15
VR112	8	10	11	13	14	15
VR115	8	10	11	13	14	15
VR24	8	9	11	17	14	15
VR110	8	10	11	13	14	15

[0425] 서열번호 10은 공통서열이다. VR119는 3번 위치의 X가 N이고, 4번 위치의 X가 V이고, 5번 위치의 X가 P이고, 6번 위치의 X가 L이고, 7번 위치의 X가 Y이고, 8번 위치의 X가 G인 서열번호 10을 포함한다. VR112는 3번 위치의 X가 N이고, 4번 위치의 X가 V이고, 5번 위치의 X가 P이고, 6번 위치의 X가 V이고, 7번 위치의 X가 Q이고, 8번 위치의 X가 G인 서열번호 10을 포함한다. VR115는 3번 위치의 X가 D이고, 4번 위치의 X가 I이고, 5번 위치의 X가 P이고, 6번 위치의 X가 T이고, 7번 위치의 X가 K이고, 8번 위치의 X가 G인 서열번호 10을 포함한다. VR110은 3번 위치의 X가 D이고, 4번 위치의 X가 M이고, 5번 위치의 X가 P이고, 6번 위치의 X가 T이고, 7번 위치의 X가 K이고, 8번 위치의 X가 G인 서열번호 10을 포함한다. VR24는 서열번호 17에 기재된 LCDR1을 포함한다.

[0426] 한 예에서, 본원에 기재된 항체는 IgG4 또는 안정화된 IgG4 불변 영역을 포함한다. "안정화된 IgG4 불변 영역"이라는 용어는 Fab 암(arm) 교환 또는 Fab 암 교환을 겪게될 경향, 또는 반항체(half antibody)의 형성 또는 반항체를 형성하는 경향을 감소시키도록 변형된 IgG4 불변 영역을 의미하는 것으로 이해해야 할 것이다. "Fab 암(arm) 교환"은 IgG4 중쇄 및 부착된 경쇄 (반분자)가 또 다른 IgG4 분자의 중쇄 쌍으로 교체된, 인간 IgG4에 대한 단백질 변형의 한 유형을 가리킨다. 따라서, IgG4 분자는 2개의 다른 항원을 인식하는 2개의 다른 Fab 팔(이중 특이적 분자를 유도)을 획득할 수 있다. Fab 암 교환은 생체내에서 자연적으로 일어나며, 정제된 혈액 세포 또는 환원제, 예컨대 감소된 글루타티온에 의해 시험관내에서 유도될 수 있다. "반항체 (half antibody)"는 IgG4 항체가 해리되어 단일 중쇄 및 단일 중쇄를 각각 함유하는 2개의 분자를 형성하는 경우에 형성된다.

[0427] 한 예에서, 안정화된 IgG4 불변 영역은 카바트 시스템에 따른 경첩 영역의 241번 위치에 프롤린을 포함한다 (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest Washington DC United States Department of Health and Human Services, 1987 및/또는 1991). 상기 위치는 EU 넘버링 시스템에 따른 경첩 영역의 228번 위치에 상응한다 ([Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest Washington DC United States Department of Health and Human Services, 2001] 및 [Edelman *et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 63, 78-85, 1969*]). 인간 IgG4에서, 상기 잔기는 일반적으로 세린이다. 프롤린을 세린으로 치환한 후, IgG4 경첩 영역은 서열 CPPC를 포함한다. 이와 관련하여, 당업자라면 "경첩 영역"이 항체의 두 Fab 암 상에 이동성을 부여하는 Fc 및 Fab 영역을 연결하는 항체 중쇄 불변 영역의 프롤린이 풍부한 부분이라는 것을 인식할 수 있을 것이다. 상기 경첩 영역은 중쇄간 이황화 결합에 포함되어 있는 시스테인 잔기를 포함한다. 이는 일반적으로 카바트의 넘버링 시스템에 따라 인간 IgG1의 Glu226으로부터 Pro243까지의 구간으로 정의된다. 다른 IgG 동형의 경첩 영역은, 동일한 위치에 중쇄 간 이황화 (S-S) 결합을 형성하는 처음과 마지막 시스테인 잔기를 위치시킴으로써 IgG1 서열에 배열될 수 있다 (예를 들어, WO 2010/080538호 참조).

[0428] 안정화된 IgG4 항체의 추가적인 예로는, (EU 넘버링 시스템에 따른) 인간 IgG4의 중쇄 불변 영역에서 409번 위치의 아르기닌이 리신, 트레오닌, 메티오닌, 또는 루신으로 치환되는 항체를 들 수 있다 (예컨대, WO

2006/033386호에 기술된 바와 같음). 상기 불변의 Fc 영역은, 추가로 또는 다르게는 (EU 넘버링 시스템에 따라) 405번에 상응하는 위치에 알라닌, 발린, 글리신, 이소루신 및 루신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기를 포함할 수 있다. 임의로, 상기 경첩 영역은 241번 위치에 프롤린을 포함한다 (즉, CPPC 서열) (상기 기술된 바와 같음).

[0429] 한 예에서, 본 발명의 FXII의 억제제는 항체 3F7, 또는 이의 키메라 버전, CDR 그래프트된 버전, 또는 인간화된 버전, 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0430] 한 예에서, 항체 3F7은 서열번호 6에 기재된 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호 7에 기재된 서열을 포함하는 V_L을 포함한다. 한 예에서, 항체 3F7은 V_H (서열번호 6) 및/또는 V_L (서열번호 7)의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함한다.

[0431] 예를 들어, 항체 3F7은 서열번호 8에 기재된 CDR1, 서열번호 9에 기재된 CDR2, 서열번호 11에 기재된 CDR3을 포함하는 V_H, 및 서열번호 13에 기재된 CDR1, 서열번호 14에 기재된 CDR2, 서열번호 15에 기재된 CDR3을 포함하는 V_L을 포함한다.

[0432] 한 예에서, 본 발명의 FXII의 억제제는 항체 VR115이다.

[0433] 예를 들어, 항체 VR115는 서열번호 8에 기재된 CDR1, 서열번호 10에 기재된 CDR2 (여기서, 3번 위치의 X는 D이고, 4번 위치의 X는 I이고, 5번 위치의 X는 P이고, 6번 위치의 X는 T이고, 7번 위치의 X는 K이고, 8번 위치의 X는 G임), 서열번호 11에 기재된 CDR3을 포함하는 V_H, 및 서열번호 13에 기재된 CDR1, 서열번호 14에 기재된 CDR2, 서열번호 15에 기재된 CDR3을 포함하는 V_L을 포함한다.

[0434] 한 예에서, 상기 항체는 생식세포 계열의 항체이다. "생식세포 계열(germlined)" 항체라는 것은, 프레임워크 잔기 내로 변화가 도입된 일부 또는 전부의 체세포 돌연변이 항체가 유전체, 예컨대, 인간 유전체 중에 존재하는 원래의 서열로 뒤바뀐 항체를 말한다. 이와 관련하여, 모든 변화들이 생식세포 계열 항체에서 뒤바뀔 필요는 없다.

[0435] 예를 들어, 상기 항체는 생식세포 계열의 VR115 항체 (gVR115)이다.

[0436] 예를 들어, gVR115는 서열번호 18에 기재된 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호 19에 기재된 서열을 포함하는 V_L을 포함한다.

[0437] 한 예에서, gVR115는 람다 경쇄 불변 영역을 포함한다.

[0438] 한 예에서, gVR115는 IgG4 또는 안정화된 IgG4 불변 영역을 포함한다. 예를 들어, 상기 안정화된 IgG4 불변 영역은 카바트 시스템에 따른 경첩 영역의 241번 위치에 프롤린을 포함한다 (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest Washington DC United States Department of Health and Human Services, 1987 및/또는 1991).

[0439] 한 예에서, gVR115는 서열번호 20에 기재된 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 21에 기재된 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0440] 또 다른 예에서, 항체 또는 이의 가변 영역을 포함하는 단백질은 예컨대 당업계에 공지된 바와 같은 표준 방법을 사용하여 제조된다.

[0441] **인자 XII 억제제 융합 파트너**

[0442] 한 예에서, FXII의 억제제는 융합 파트너에 결합된다. 예를 들어, 상기 융합 파트너는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다. 한 예에서, 상기 융합 파트너는 반감기 증진 폴리펩타이드 (HLEP)를 포함한다.

[0443] *폴리에틸렌 글리콜 (PEG)*

[0444] 한 예에서, FXII의 억제제는 융합 파트너에 결합된다. 예를 들어, 상기 융합 파트너는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다.

[0445] 한 예에서, 상기 융합 파트너는 모노- 또는 폴리- (예컨대, 2-4) 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 모이어티를 포함한다. 예를 들어, 상기 모노- 폴리- (예컨대, 2-4) 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 모이어티는 FXII 억제제의 *생*

체내 반감기를 연장시킨다.

[0446] 페길화는 이용가능한 임의의 페길화 반응에 의해 수행될 수 있다. 페길화된 단백질 생성물을 제조하는 예시적인 방법은, 일반적으로 (a) 단백질이 하나 이상의 PEG 기에 부착하는 조건 하에 폴리펩타이드를 폴리에틸렌 글리콜 (예컨대, PEG의 반응성 에스테르 또는 알데하이드 유도체)과 반응시키는 단계; 및 (b) 반응 생성물(들)을 수득하는 단계를 포함할 수 있다.

[0447] 당업자라면 이에 제한되지는 않지만, 예컨대, EP 0 401 384호; [Malik et al., Exp. Hematol., 20:1028-1035 (1992); Francis, Focus on Growth Factors, 3(2):4-10 (1992)]; EP 0 154 316호; EP 0 401 384호; WO 92/16221호; WO 95/34326호; 미국 특허 5,252,714호에 기재된 것들을 포함하는, 서로 다른 PEG 부착 방법들에 대하여 알고 있을 것이다.

[0448] *반감기 증진 폴리펩타이드 (HLEP)*

[0449] 한 예에서, FXII의 억제제는 융합 파트너에 결합된다. 예를 들어, 상기 융합 파트너는 반감기 증진 폴리펩타이드 (HLEP)를 포함한다.

[0450] 다양한 반감기 증진 폴리펩타이드들이 당업자에게 공지되어 있으며, 이에 제한되지는 않지만, 본원에 기술된 것들을 포함한다.

[0451] 알부민 단백질 및 이의 변이체

[0452] 한 예로서, 상기 반감기 증진 폴리펩타이드는 알부민, 아파민, 알파-태아단백질, 비타민 D 결합 단백질, 인간 알부민, 면역글로불린 및 IgG의 Fc로 이루어진 군으로부터 선택된다. 예를 들어, 상기 반감기 증진 폴리펩타이드는 알부민 또는 이의 변이체이다.

[0453] 한 예에서, 상기 반감기 증진 폴리펩타이드는 링커를 통해 FXII의 억제제에 결합된다. 예를 들어, FXII의 억제제는 링커 펩타이드를 통해 FXII의 억제제에 결합된 인간 알부민을 포함하는 융합 단백질이다.

[0454] 한 예에서, 알부민 변이체는 인간 알부민 (HA) 서열 (예컨대, 서열번호 23)에서 유래한 적어도 10, 또는 적어도 20, 또는 적어도 40, 또는 적어도 50, 또는 적어도 60, 또는 적어도 70개의 아미노산 길이이다.

[0455] 한 예에서, 알부민 변이체는 인간 알부민 (HA) 서열 (예컨대, 서열번호 23)에서 유래한 적어도 15, 또는 적어도 20, 또는 적어도 25, 또는 적어도 30, 또는 적어도 50개 또는 그 이상의 인접한 아미노산이다.

[0456] 한 예에서, 알부민 변이체는 HA의 특정 아미노산의 전부 또는 일부를 포함한다. 알부민 변이체는 아미노산 치환, 결실, 또는 부가, 보존적 또는 비보존적 치환을 포함할 수 있으며, 여기서 이러한 변화들은 반감기 증진 폴리펩타이드의 치료적 활성을 부여하는 활성 부위 또는 활성 도메인을 실질적으로 변화시키지는 않는다. 상기 변이체는 인간 알부민 (HA) 서열로부터 약 70%, 또는 약 75%, 또는 약 80%, 또는 약 85%, 또는 약 90%, 또는 약 91%, 또는 약 92%, 또는 약 93%, 또는 약 94%, 또는 약 95%, 또는 약 96%, 또는 약 97%, 또는 약 98% 또는 약 99%의 동일성을 공유할 수 있다.

[0457] 한 예에서, 알부민 변이체는 단편이다. 한 예에서, 상기 알부민 변이체는 적어도 하나의 알부민 도메인 및/또는 이러한 도메인의 단편을 포함한다. 예를 들어, 상기 알부민 변이체는 도메인 1 (서열번호 23의 아미노산 1-194번), 또는 도메인 2 (서열번호 23의 아미노산 195-387번), 또는 도메인 3 (서열번호 23의 아미노산 388-585번) 중 적어도 하나를 포함한다. 한 예에서, 상기 알부민 변이체는 적어도 도메인 1과 2 (서열번호 23의 아미노산 1-387번), 또는 도메인 2와 3 (서열번호 23의 아미노산 195-585번), 또는 도메인 1과 3 (서열번호 23의 아미노산 1-194번 및 아미노산 388-585번)을 포함한다.

[0458] 각 도메인 자체는 2개의 동종성 서브도메인, 즉 서열번호 23의 잔기 1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491 및 512-585번과 함께 잔기 Lys106 내지 Glu119, Glu292 내지 Val315 및 Glu492 내지 Ala511을 포함하는 가요성 서브도메인간 링커 영역으로 이루어진다.

[0459] 한 예에서, 상기 알부민 변이체는 적어도 하나의 알부민의 전체 서브도메인을 포함한다. 예를 들어, 상기 알부민 변이체는 서열번호 23의 잔기 1-105, 또는 잔기 120-194, 또는 잔기 195-291, 또는 잔기 316-387, 또는 잔기 388-491, 또는 잔기 512-585를 포함한다.

[0460] 한 예에서, 알부민과 구조적으로 또는 진화론적으로 관련된 기타 단백질 ("알부민 계열의 단백질")은 HLEP, 예컨대, 이에 제한되지는 않지만, 알파-태아단백질 (WO 2005/024044호; Beattie and Dugaiczyk, 20 Gene 415-

422, 1982), 아파민 (Lichenstein et al. 269 (27) J. Biol. Chem. 18149-18154, 1994) 및 비타민 D 결합 단백질 (Cooke and David, 76 J. Clin. Invest. 2420-2424, 1985)로서 사용될 수 있다. 이러한 단백질들을 암호화하는 유전자는 인간, 마우스 및 랫트에서 동일한 염색체 영역에 맵핑되는 구조적 및 기능적 유사성이 있는 다유전자 클러스터(multigene cluster)를 나타낸다. 알부민 계열 구성원의 구조적 유사성은 이들이 HLEP로서 사용될 수 있음을 시사한다. 예를 들어, 알파-태아단백질은 생체내에서 부착된 치료적 폴리펩타이드의 반감기를 연장하는 것으로 확인된 바 있다 (WO 2005/024044호).

[0461] 한 예로서, 상기 반감기 증진 폴리펩타이드는 알파-태아단백질 및 비타민 D 결합 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된다. 예를 들어, 상기 반감기 증진 폴리펩타이드는 알파-태아단백질이다. 한 예에서, 상기 반감기 증진 폴리펩타이드는 비타민 D 결합 단백질이다.

[0462] 한 예에서, 상기 알부민 계열 단백질 또는 이의 변이체는 치료적 활성을 안정화시키거나 연장시킬 수 있다.

[0463] 한 예에서, 상기 알부민 계열 단백질 또는 이의 변이체는 FXII 또는 FXIIa 억제제에 결합된 HLEP로서 사용될 수 있다.

[0464] 한 예에서, 상기 알부민 계열 단백질 또는 이의 변이체는 임의의 척추동물로부터 유래할 수 있다. 예를 들어, 상기 척추동물은 포유동물이다. 한 예로서, 상기 포유동물은 인간, 원숭이, 소, 양, 또는 돼지가 아니다. 예를 들어, 상기 척추동물은 비포유동물이다. 예를 들어, 상기 비포유동물은 암탉 또는 연어이다.

[0465] 한 예에서, 상기 알부민 변이체는 적어도 10개의 아미노산 길이를 포함한다. 예를 들어, 상기 알부민 변이체는 이들이 유래되는 각 단백질 서열 중 약 15, 또는 약 20, 또는 약 25, 또는 약 30, 또는 약 50개의 인접한 아미노산을 포함한다. 한 예에서, 상기 알부민 변이체는 각 단백질의 특정 도메인의 전부 또는 일부를 포함한다.

[0466] 본원에서 논의된 바와 같이, 알부민 계열 구성원의 융합 단백질은 자연발생적인 다형성 변이체를 포함할 수 있다.

[0467] 면역글로불린

[0468] 한 예에서, 상기 반감기 증진 폴리펩타이드는 면역글로불린 (Ig)이다.

[0469] 상기 논의된 바와 같이, "면역글로불린"이라는 용어는 기능적 단편 및 이의 변이체, 예컨대 Fc 영역 또는 하나 이상의 Ig 불변 도메인을 망라한다. 한 예에서, 상기 Ig는 Fc 영역 또는 면역글로불린 불변 도메인(들)의 부분을 포함한다. 상기 불변 영역은 IgM, IgG, IgD, IgA, 또는 IgE 면역글로불린의 것일 수 있다. 한 예에서, 상기 치료적 폴리펩타이드 부분은 항체의 경첩 영역 또는 분해가능한 펩타이드 링커를 통해 Ig에 연결된다.

[0470] 생체내 치료 단백질의 반감기를 연장시키기 위해 치료 단백질을 면역글로불린 불변 영역에 융합시키는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예컨대, US 2004/0087778호, WO 2005/001025호, WO 2005/063808호, WO 2003/076567호, WO 2005/000892호, WO 2004/101740호, US 6,403,077호에 기술되어 있다.

[0471] 한 예에서, 상기 반감기 증진 폴리펩타이드는 면역글로불린 영역이다. 예를 들어, 상기 면역글로불린 영역은 Fc 도메인, 또는 면역글로불린의 Fc 단편 및/또는 이의 변이체이다.

[0472] 한 예에서, FXII의 억제제는 HLEP로서 Fc 도메인 또는 면역글로불린 불변 영역의 일부에 융합된다.

[0473] 한 예에서, 융합 단백질은 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 발현되는 재조합체 분자로서 제조된다. 예를 들어, 상기 융합 단백질은 박테리아, 또는 효모, 또는 식물, 또는 동물 (예컨대, 곤충) 또는 인간 세포주 또는 유전자이식 동물 중에서 제조된다.

[0474] 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 융합 단백질을 발현시키는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예컨대, WO 2008/098720호에 기술되어 있다.

[0475] **링커**

[0476] 한 예에서, 상기 반감기 증진 폴리펩타이드는 링커를 통해 FXII의 억제제에 결합된다. 예를 들어, 상기 링커는 링커 펩타이드이다.

[0477] 한 예에서, 개재 펩타이드 링커는 치료 폴리펩타이드와 HLEP 사이에 도입될 수 있다.

[0478] 예를 들어, 상기 링커는 절단가능한 링커이다. 예를 들어, 상기 링커는, HLEP가 치료적 폴리펩타이드의 특이적 활성을 방해할 가능성(예를 들어, 입체 장애에 의한 방해)을 가지고 있는 경우에는 절단가능한 링커이다.

[0479] 한 예에서, 상기 링커는 응고에 관여하는 효소에 의해 절단가능하다. 예를 들어, 상기 링커는 고유한, 외적인, 또는 통상적인 응고 경로의 응고 프로테아제에 의해 절단가능하다. 고유한 경로의 응고 프로테아제는 접촉 활성화 경로의 프로테아제, 예컨대, FXIIa, FXIa, 또는 FIXa를 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 링커는 FxIIa에 의해 절단된다. 외적인 경로의 프로테아제는 조직 인자 경로의 프로테아제, 예를 들어, FVIIa를 포함한다. 통상적인 경로의 프로테아제는 피브리노겐의 피브린으로의 전환에 관여하는 프로테아제, 예를 들어, FXa, FIIa 및 FXIIIa를 포함한다.

[0480] **스크리닝 분석**

[0481] FXII 신호전달을 억제하는 화합물은 예컨대 하기에 기술되는 것과 같이 당업계에 공지된 기법들을 사용하여 확인할 수 있다. 이와 유사하게, 본원에 기술된 방법에 사용하기에 적절한 FXII 억제제는 예컨대 하기에 기술되는 것과 같이 당업계에 공지된 기법들을 사용하여 확인하거나 예상해 볼 수 있다.

[0482] FXIIa 아미도 분해 활성

[0483] FXII에 결합하는 억제제에 대하여, FXIIa의 억제제의 아미도 분해 활성의 수준을 측정하는 시험관내 분석을 사용할 수 있다.

[0484] 한 예에서, 상기 아미도 분해 활성은 FXII의 억제제 및 완충제의 존재 하에 FXII의 분해에 대한 분석에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, FXII를 FXII의 억제제 또는 대조군의 존재 또는 부재 하에 항온배양한다. 항온배양 및 검출 기질의 첨가 후, 아미도 분해 활성을 광학 밀도에서의 변화 (즉, 색상 변화)로서 분광광도법적으로 측정한다.

[0485] 아미도 분해 활성을 효율적으로 억제하는 것으로 확인된 화합물을 FXII의 억제제로서 식별한다.

[0486] *생체내* 동물 모델

[0487] 한 예에서, 죽상동맥경화증의 동물 모델에서 FXII의 억제제의 치료 또는 예방적 효과에 대하여 시험한다.

[0488] 죽상경화성 병변에 대한 FXII의 억제제의 효과를 평가하기 위한 동물 모델은 당업계에 공지되어 있고/있거나 본원에 예시되어 있다. 예시적인 동물 모델로는, 예를 들어, ApoE 녹아웃 (-/-) 마우스 모델과 탠덤 협착증 마우스 모델을 포함한다.

[0489] *ApoE 녹아웃 동물 모델*

[0490] 한 예에서, 동물 모델은 ApoE 녹아웃 마우스 모델이다.

[0491] 예를 들어, FXII의 억제제 또는 대조군을 죽상동맥경화증의 모델, 예를 들어, ApoE-/- 마우스 모델에 투여하고, FXII의 억제제의 치료 효능을 평가한다.

[0492] 한 예에서, 상기 ApoE-/- (ApoE-KO) 마우스를 FXII의 억제제 또는 대조군을 사용하여 격일로 피하 투여로 치료한다. 한 예에서, 상기 ApoE-/- 마우스에게 21% 지방 및 0.15% 콜레스테롤을 함유하는 고지방식 (HFD)을 먹인다.

[0493] 한 예에서, FXII의 억제제의 치료 효능을 죽상경화성 병변에 대한 및/또는 형태학적 분석으로 평가한다.

[0494] FXII의 억제제의 부재 하에서와 비교하여 FXII의 억제제의 존재 하의 동물 모델에서 죽상경화성 병변의 약화는, FXII의 억제제가 죽상동맥경화증의 치료 및 죽상경화반의 안정화에 유용함을 의미하는 것이다.

[0495] *탠덤 협착증 동물 모델*

[0496] 한 예에서, 동물 모델은 탠덤 협착증 마우스 모델이다.

[0497] 예를 들어, FXII의 억제제 또는 대조군을 죽상동맥경화증의 모델, 예를 들어, 탠덤 협착증 마우스 모델에 투여하고, FXII의 억제제의 치료 효능을 평가한다.

[0498] 한 예에서, 상기 마우스는 ApoE-/- 녹아웃 마우스이다. 한 예에서, 상기 마우스에게 21% 지방 및 0.15% 콜레스테롤을 함유하는 고지방식 (HFD)을 먹인다.

[0499] 한 예에서, 상기 탠덤 협착부를 경동맥 분기점 부근의 우측 총경동맥 내로 삽입한다.

[0500] FXII의 억제제의 부재 하에서와 비교하여 FXII의 억제제의 존재 하의 동물 모델에서 죽상경화성 병변의 약화는, FXII의 억제제가 죽상동맥경화증의 치료 및 죽상경화반의 안정화에 유용함을 의미하는 것이다.

[0501] 죽상경화성 병변의 형태학적 분석

[0502] 한 예에서, 죽상경화성 병변의 발달을 약화시키는 FXII의 억제제는 조직학적 분석을 수행함으로써 확인된다.

[0503] 형태학적 분석의 적절한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 총 병변 크기, 지질 면적, 괴사성 코어 면적, 콜라겐 축적, 대식세포 축적 및 다수의 마커, 예컨대 예컨대, VCAM-1 및 α-평활근 액틴의 발현에 대한 분석을 포함한다.

[0504] 한 예에서, 지질과 총 병변 면적을 알아보기 위해 오일-레드(Oil-red) O (ORO) 표준품을 사용하고, 죽상경화성 병변 중의 괴사성 코어 면적 (무세포성 면적)을 측정하기 위해 메이어의 헤마톡실린/에오신(H&E)을 사용하며, 콜라겐을 측정하기 위해 피코 시리우스 레드(Picro-sirius Red)를 사용하여 동물 모델의 죽상경화성 병변의 저온 박편을 조직 염색한다. 각 세그먼트에 대한 조직학적 샘플의 정량화는 120 ㎛ 간격으로 수득된 연속된 6 ㎛ 섹션들 상에서 수행한다. 다양한 죽상경화반 성분들의 백분율은 총 내막 플라크 면적으로 나눈 각 특정 파라미터에 대한 양의 면적으로 정량화된다. 괴사성 코어 면적은 세포 조직이 결여된 총 플라크 면적으로 정의된다. 상대적 캡(cap) 두께는 최대 내막 두께로 나눈 어깨 및 중간 플라크영역에서의 캡 두께의 비율로 정의된다. 죽상경화성 병변 내부의 ORO 양성 및 무세포성 영역에 대한 이미지 촬영은 광학 현미경을 사용하여 수행하고, 지질 침착의 단면적은 이미지 분석 소프트웨어 (예컨대, Optimas 6.2 Video Pro-32)를 사용하여 정량화하였다. 각 마우스에 대해, 병변 크기는 30 ㎜ 간격으로 적어도 4개의 단면적으로 측정한다.

[0505] 유세포 분석법

[0506] 한 예에서, 유세포 분석을 비장, 림프절 및 혈액 중의 세포군의 분석을 위해 수행한다.

[0507] 한 예에서, 비장, 림프절 및 혈액 중의 B 림프구 및 비-B 림프구 개체군을 BD FACS Canto-II 상에서 형광색소 컨쥬케이트된 항체를 사용하여 분석한다. 예를 들어, B 세포의 분석을 위해, PE-컨쥬케이트된 항-CD19, APC-컨쥬케이트된 항-CD5 및 APC-Cy7-컨쥬케이트된 항-CD11b Ab를 사용한다. 예를 들어, 비-B 림프구 개체군의 분석을 위해, 퍼시픽 블루(Pacific Blue)-컨쥬케이트된 항-CD4, PerCP-컨쥬케이트된 항-CD8a, FITC-컨쥬케이트된 항-TCR-b 및 PE-Cy7-컨쥬케이트된 항-NK1.1 Ab를 사용한다.

[0508] FXII의 억제제의 부재 하에서와 비교하여 FXII의 억제제의 존재 하의 동물 모델에서 죽상경화성 병변의 약화는, FXII의 억제제가 죽상동맥경화증의 치료 및 죽상경화반의 안정화에 유용함을 의미하는 것이다.

[0509] **약학 조성물 및 치료 방법**

[0510] 본 발명의 일부 예에서, 상기 FXII 억제제는 80%, 또는 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 초과의 순도를 가질 수 있다. 한 예에서, 상기 FXII 억제제는 오염성 고분자, 예컨대 다른 단백질과 핵산에 대하여 99.9% 초과인 약제학적으로 순수한 상태를 가질 수 있고, 감염원 및 발열원이 없을 수 있다.

[0511] FXII를 억제하는 화합물 (동의어. 활성 성분)은 예방학적 치료 또는 치료적 치료를 위한 비경구, 국부, 경구, 또는 국소 투여, 에어로졸 투여, 또는 경피 투여에 유용하다. 한 예에서, FXII의 억제제는 비경구, 예컨대 피하 또는 정맥내 투여된다. 예를 들어, FXII의 억제제는 피하 투여된다.

[0512] 투여될 FXII의 억제제의 제제는 선택된 투여 경로 및 제형 (예를 들어, 용액, 에멀젼, 캡슐)에 따라 달라질 것이다. 투여될 FXII 억제제를 포함하는 적절한 약학 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체로 제조할 수 있다. 용액 또는 에멀젼에 있어서, 적절한 담체로는 예를 들어 수성 또는 알콜성 수용액, 에멀젼 또는 현탁액, 예컨대 식염수 및 완충 배지를 포함한다. 비경구 비히클로는 염화나트륨 용액, 링거액 덱스트로스, 덱스트로스 및 염화나트륨, 유산화 링거액 또는 고정유를 포함할 수 있다. 다양한 적절한 수성 담체들이 당업자에게 공지되어 있으며, 예컨대 물, 완충수, 완충 식염수, 폴리올 (예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜), 덱스트로스 용액 및 글리신을 포함한다. 정맥용 비히클은 각종 첨가제, 보존제 또는 유체, 영양제 또는 전해질 보충제를 포함할 수 있다 (일반적으로, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Science, 16th Edition, Mack, Ed. 1980를 참조한다). 조성물은 생리학적 조건에 근접하기 위해 필요한 pH 조절제 및 완충제 및 독성 조절제, 예를 들어 아세트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘 및 락트산나트륨과 같은 약학적으로 허용가능한 보조제를 임의로 포함할 수 있다. 추가의 약학적 첨가제로는, 예컨대 만니톨, 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카겔, 스테아르산나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 건조 탈지유 및 에탄올을 포함한다. 상기 FXII 억제제는 액체 스테이지 중에 저장될 수 있거나, 또는 저장을 위해 동결건조되어 당업계에 공지된 동결건조 및 재구성 기법에 따라 사용 전에 적절한 담체로 재구성될 수 있다.

[0513] 다르게는, 또는 덧붙여, 담체 또는 부형제는 FXII 억제제의 활성을 향상시키고/향상시키거나 FXII 억제제, 예컨

대, 프로테아제 억제제 및/또는 DNase 억제제 및/또는 RNase 억제제에 대한 억제를 감소시키는 화합물을 포함함으로써, 해당 억제제의 안정성을 향상시킬 수 있다.

[0514] 선택된 배지 중에서 활성 성분의 최적 농도는 당업자에게 공지된 절차에 따라 경험적으로 결정될 수 있으며, 목적하는 궁극적인 약제학적 제제에 따라 달라질 것이다.

[0515] FXII 억제제의 투여를 위한 용량 범위는 목적하는 효과를 달성하는데 충분히 큰 범위이다. 예를 들어, 조성물은 FXII 억제제의 치료적 또는 예방적 유효량을 포함한다.

[0516] 본원에서 사용되는 "유효량"이라는 용어는 대상체에서 FXII 및/또는 FXIIa의 신호전달을 억제/감소/방지하는데 충분한 양의 FXII 억제제를 의미하는 것으로 이해해야 한다. 당업자라면 이러한 양이, 예를 들어 FXII 억제제 및/또는 특정 대상체 및/또는 죽상동맥경화증의 유형 및/또는 중증도에 따라 달라질 수 있음을 알 수 있을 것이다. 따라서, 상기 용어로 본 발명의 내용을 특정한 양, 예컨대 FXII 억제제의 중량과 수로 한정하는 것으로 해석해서는 안된다.

[0517] 투여 용량은 과다 점성 증후군, 폐부종, 울혈성 심부전 등과 같은 부작용을 유발할 정도로 많아서는 안된다. 일반적으로, 투여 용량은 환자의 연령, 상태, 성별 및 질환의 정도에 따라 달라질 것이며, 이는 당업자에 의해 결정될 수 있다. 임의의 합병증이 발병할 경우에, 투여 용량은 개인의 의사에 의해 조절될 수 있다.

[0518] 투여 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 300 mg/kg으로 다양할 수 있으며, 예컨대 약 0.2 mg/kg 내지 약 200 mg/kg, 예를 들어 약 0.5 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 예컨대 약 10 mg/kg으로, 하루에 한번 이상, 하루 또는 수일 동안 투여된다.

[0519] 일부 예에서, FXII 억제제는 초기 (또는 부하) 용량이 후속 용량 (유지 용량)보다 많은 양으로 투여된다. 예를 들어, FXII 억제제는 약 10 mg/kg 내지 약 30 mg/kg의 초기 용량으로 투여된다. 이후, FXII 억제제는 약 0.0001 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 유지 용량으로 투여된다. 상기 유지 용량은 7-100일 마다, 예컨대 14일 또는 28일 또는 56일 또는 84일 마다 투여될 수 있다.

[0520] 일부 예에서, FXII 억제제를 후속 용량으로 사용한 것보다 낮은 용량으로 초기에 투여하는, 용량의 단계적 증가 용법이 사용된다. 이러한 용량 용법은 대상체가 초기에 이상 반응을 겪게 되는 경우에 유용하다.

[0521] 치료에 적절히 반응하지 않는 환자의 경우, 한 주에 다중 용량을 투여할 수 있다. 다르게는 또는 추가로, 투여량을 증가시킬 수 있다.

[0522] 대상체는 해당 화합물에 대해 적어도 약 2회 노출, 예를 들어 약 2회 내지 60회 노출, 및 더욱 구체적으로는 약 2회 내지 40회 노출, 가장 구체적으로는 2회 내지 20회 노출과 같이, 1회 이상의 노출 또는 1세트의 용량을 설정함에 의해, FXII 억제제를 사용하여 재치료될 수 있다.

[0523] 또 다른 예에서, 재치료는 규정된 간격으로 제공될 수 있다. 예를 들어, 후속 노출은 예컨대 약 24-28주 또는 48-56주 또는 그 이상과 같이 다양한 간격으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 상기 노출은 각각 약 24-26주 또는 약 38-42주 또는 약 50-54주의 간격으로 투여된다.

[0524] 본 발명의 방법은 죽상동맥경화증 또는 죽상경화반 파열의 예방 또는 치료를 위한 또 다른 치료학적으로 유효한 제제의 투여와 함께 본 발명에 따른 적어도 하나의 FXII 억제제의 병용 투여도 포함할 수 있다.

[0525] 한 예에서, 본원의 FXII 억제제는 죽상동맥경화증의 예방 또는 치료를 위해 현재 사용 중에 있거나 개발되고 있는 적어도 하나 이상의 추가의 공지된 화합물과 병용하여 사용된다. 이러한 공지된 화합물의 예로는, 이에 제한되지는 않지만, 스타틴 (예컨대, 로바스타틴, 프라바스타틴, 로수바스타틴, 심바스타틴, 아토바스타틴 및 플루바스타틴) 및 혈액 희석제 (예컨대, 아스피린, 와파린 및 헤파린)을 포함한다.

[0526] 상술한 내용으로부터 명백하듯이, 본 발명은 제1 화합물 및 제2 화합물의 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 대상체의 병용 치료 방법을 제공하는데, 여기서, 상기 제1 제제는 FXII 억제제이며, 제2 제제는 죽상동맥경화증의 예방 또는 치료를 위한 것이다.

[0527] 본원에 사용되는 "병용 치료"라는 어구에서 "병용"이라는 용어는 제2 제제의 존재 하에 제1 제제를 투여하는 것을 포함한다. 병용 치료 방법은 제1, 제2, 제3 또는 추가의 제제를 공동 투여하는 방법을 포함한다. 병용 치료 방법은 제1 제제 또는 추가의 제제가 제2 제제 또는 추가의 제제 존재 하에 투여하는 방법도 포함하며, 여기서 상기 제2 제제 또는 추가의 제제는 예를 들어, 사전에 투여되었을 수도 있다. 병용 치료 방법은 서로 다른 행위자에 의해 단계적으로 실행될 수도 있다. 예를 들어, 한 행위자가 제1 제제를 대상체에 투여할 수 있고, 두번째

행위자가 제2 제제를 대상체에 투여할 수 있으며, 상기 투여 단계는 제2 제제 (및/또는 추가의 제제)의 존재 하에 제1 제제 (및/또는 추가의 제제)의 투여를 하는 한, 동시에, 또는 거의 동시에, 또는 다른 시간에 수행될 수 있다. 상기 행위자와 대상체는 동일한 실체 (예컨대, 인간)일 수 있다.

[0528] 한 예에서, 본 발명은 대상체에서 죽상동맥경화증의 치료 또는 예방 방법을 제공하며, 상기 방법은 대상체에게 본 발명의 FXII 억제제를 포함하는 제1 약학 조성물 및 하나 이상의 추가의 화합물을 포함하는 제2 약학 조성물의 투여하는 단계를 포함한다.

[0529] 한 예에서, 본 발명의 방법은 죽상동맥경화증을 앓고 있고 (예컨대, 당뇨병 및/또는 콜레스테롤에 대해) 다른 치료를 받고 있는 대상체에게 FXII 억제제를 투여하는 단계를 포함한다.

[0530] **키트 및 다른 물질의 조성물**

[0531] 본 발명의 또 다른 예에서는 전술한 바와 같이 죽상동맥경화증의 치료에 유용한 FXII 억제제를 포함하는 키트를 제공한다.

[0532] 한 예에서, 상기 키트는 (a) 본원에 기재된 FXII 억제제를 포함하는 용기, 임의로 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제; 및 (b) 대상체에서 죽상동맥경화증을 치료하기 위한 설명이 있는 포장 삽지를 포함한다.

[0533] 본 발명의 실시예에 따르면, 상기 포장 삽지는 용기 내에 존재하거나 용기에 부착되어 있다. 적합한 용기는 예를 들어, 병, 바이알, 주사기 등을 포함한다. 상기 용기들은 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재질로 제조될 수 있다. 상기 용기는 죽상동맥경화증의 치료에 효과적인 조성물을 보유 또는 함유하며, 멸균된 접속 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 상기 용기는 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 마개를 가지는 정맥주사 용액의 백 또는 바이알일 수 있다). 조성물 중 적어도 하나의 활성제는 FXII 억제제이다. 라벨 또는 포장 삽지는, 해당 조성물이 치료를 받을 대상체, 예컨대 죽상동맥경화증을 앓고 있거나 걸리기 쉬운 대상체의 치료에 사용됨을 나타내며, 제공되는 FXII 억제제 및 임의의 다른 약제의 투여량과 투여 간격에 대한 구체적인 안내가 기재되어 있다. 상기 키트는 예컨대, 정균 주사용수 (BWFI), 인산염 완충 식염수, 링거액 및/또는 덱스트로스 용액과 같은 약학적으로 허용 가능한 희석 완충제를 포함하는 추가의 용기를 더 포함할 수도 있다. 상기 키트는 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 비롯한 상업적 관점 및 사용자 관점에서 바람직한 기타 물질들을 더 포함할 수도 있다.

[0534] 상기 키트는 제2 약제를 포함하는 용기를 임의로 더 포함할 수도 있는데, 여기서 제1 약제는 FXII 억제제이고, 상기 제품은 유효량의 제2 약제 또는 죽상동맥경화증을 위한 또 다른 치료제로 대상체를 치료하기 위한 포장 삽지 상에 설명을 더 포함한다. 상기 제2 약제는 상기 기술된 것들 중 임의의 것일 수 있다.

[0535] 본 발명은 하기의 비제한적인 실시예를 포함한다.

[0536] **실시예**

[0537] **실시예 1: 인자 XII 억제제 치료는 죽상경화성 병변의 진행 및 발달을 약화시킨다**

[0538] C57BL/6J 백그라운드를 갖는 암컷 ApoE-/- (ApoE-KO) 마우스 (6주령)는 8주 동안 21% 지방 및 0.15% 콜레스테롤을 함유하는 고지방식 (HFD) (SF00-219, 호주 웨스턴 오스트레일리아주 소재의 스페셜티 피즈(Specialty Feeds)을 먹이면서, 격일로 항-인자 XIIa 모노클로날 항체 3F7 (1 mg/kg) 또는 IgG 동형 대조군 (MuBM4-MuG1K)을 피하 투여받았다.

[0539] 동물들을 희생시키고 생리학적 압력 하에 10 ㎖ PBS (pH 7.4)를 사용하여 관류시키기 위해 카테터를 좌심실 내에 위치시켰다. 관류 후, 완두동맥 및 좌우측 경동맥과 함께 대동맥궁 전체를 최적의 절단 온도 (OCT) 화합물 (사쿠라 파인테크니칼, Sakura Finetechnical) 내에 매립시키고, 액체 질소로 냉동시킨 후, 박편으로 절단할 때까지 -80℃로 보관하였다.

[0540] 6 ㎛ 두께의 횡단 저온 박편인 냉동시킨 경동맥, 대동맥궁 및 대동맥동 박편을 저온유지장치 (Zeiss MICROM HM 550)를 사용하여 준비하였다. 해당 박편들을 지질과 총 병변 면적을 알아보기 위해 오일-레드 O (ORO) 표준품을 사용하고, 죽상경화성 병변 중의 괴사성 코어 면적 (무세포성 면적)을 측정하기 위해 메이어의 헤마톡실린/에오신(H&E)을 사용하며, 콜라겐을 측정하기 위해 피코 시리우스 레드를 사용하여 동물 모델의 죽상경화성 병변의 저온 박편을 조직 염색하였다. 각 세그먼트에 대한 조직학적 샘플의 정량화는 120 ㎛ 간격으로 수득된 연속된 6 ㎛ 섹션들 상에서 수행하였다. 다양한 죽상경화반 성분들의 백분율은 총 내막 플라크 면적으로 나눈 각 특정 파라미터에 대한 양의 면적으로 정량화하였다. 괴사성 코어 면적은 세포 조직이 결여된 총 플라크 면적으로 정의

하였다. 상대적 캡 두께는 최대 내막 두께로 나눈 어깨 및 중간 플라크영역에서의 캡 두께의 비율로 정의되었다. 죽상경화성 병변 내부의 ORO 양성 및 무세포성 영역에 대한 이미지 촬영은 광학 현미경을 사용하여 수행하였고, 지질 침착의 단면적은 이미지 분석 소프트웨어 (예컨대, 호주 사우스 오스트레일리아주 베드포드 파크 소재의 Optimas 6.2 Video Pro-32)를 사용하여 정량화하였다. 각 마우스에 대해, 병변 크기는 30 mm 간격으로 4개의 단면적으로 측정하였다.

[0541] 대동맥 기부 내의 죽상경화성 병변의 오일-레드 O 염색을 통해, 총 병변 크기 (도 1A) 및 지질 축적 (도 1B)이 각각 60% 및 70%까지 매우 현저하게 감소하였음을 알 수 있었다 (모든 $P < 0.05$).

[0542] 대식세포가 죽상경화성 병변의 주요 성분이므로, CD68 염색을 수행하여 대식세포 축적도 45%까지 현저하게 감소하였음을 확인하였다 ($P < 0.05$; 도 1C). 죽상경화성 병변에 대한 추가의 평가를 통해, 병변 중에 50%까지 콜라겐 침착의 현저한 증가를 확인하였다 ($P < 0.05$; 도 1D). H&E 염색을 통해 병변 중에 괴사성 코어 면적이 52%까지 현저히 감소하였음을 확인하였다 ($P < 0.05$; 도 1E). 대동맥궁 내의 죽상동맥경화증도 연구하였던 결과, 총 병변, 지질 및 대식세포 축적이 각각 50%, 47% 및 60%까지 감소하였던 것으로 나타났다 (모든 $P < 0.05$; 도 1F-H).

[0543] 유세포 분석을 비장, 림프절 및 혈액 중의 세포군의 분석을 위해 수행하였다. 비장, LN 및 혈액 중의 B 림프구 및 비-B 림프구 개체군에 대하여 BD FACS Canto-II (BD 사이언시즈(Biosciences)) 상에서 형광색소 컨쥬케이트된 항체 (달리 언급하지 않으면, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 BD 파미노겐(Pharmingen)사 제조품)를 사용하여 분석하였다. B 세포의 분석을 위해, PE-컨쥬케이트된 항-CD19, APC-컨쥬케이트된 항-CD5 및 APC-Cy7-컨쥬케이트된 항-CD11b Ab를 사용하였다. 비-B 림프구 개체군의 분석을 위해, 퍼시픽 블루-컨쥬케이트된 항-CD4, PerCP-컨쥬케이트된 항-CD8a, FITC-컨쥬케이트된 항-TCR-b 및 PE-Cy7-컨쥬케이트된 항-NK1.1 Ab를 사용하였다.

[0544] 림프구성 세포군의 유세포 분석을 통해, FXII 억제제를 사용한 장기간의 치료는 다른 림프구들에게는 영향을 미치지 않으면서 ($P < 0.05$), NK 및 NKT 세포군을 혈액 중에서는 각각 35% 및 42%까지 감소시켰으며 (도 2), 림프절에서는 각각 38% 및 47%까지 감소시켰던 것으로 나타났다 (도 3).

[0545] **실시예 2: 인자 XII 억제제 치료는 동맥 염증을 감소시키고 죽상경화반의 평활근 세포수를 증가시킨다**

[0546] FXII 억제제 치료가 죽상경화반 발달의 원동력으로서 염증을 감소시켰는지를 알아보기 위해, 혈관세포 부착분자-1 (VCAM-1; 클론 sc-1504, 산타 크루즈(Santa Cruz))의 발현에 대한 만성 FXII 억제제 (3F7) 치료의 효과를 대동맥 기부 및 대동맥궁의 죽상경화성 병변에서 조사했다. 대동맥 기부 (43%) 및 대동맥궁 (33%)의 죽상경화성 병변에서 VCAM-1 발현의 감소가 관찰되었다 (모든 $P < 0.05$; 도 4A, B).

[0547] 또한, H&E 염색을 통해서도, 동형의 IgG 모노클로날 항체로 처리된 대조군 그룹에 비해 3F7 처리된 마우스에서, 대동맥 기부 및 대동맥궁의 죽상경화성 병변 중의 무세포성 면적 (괴사성 코어)의 크기가 각각 33% 및 50% 현저히 감소되었던 것으로 나타났다 (모든 $P < 0.05$; 도 4C, D).

[0548] 또한, 본 발명자들은 α-평활근 액틴 항체 (클론 1A4; 1:100 희석; 시그마 알드리치(Sigma Aldrich))를 사용하는 면역조직화학법에 의해 죽상경화반 중의 평활근 세포의 수에 대한 FXII 억제제 치료의 효과에 대해 평가하였다. FXII 억제제 치료는 대동맥 기부 및 대동맥궁 내의 죽상경화반 중의 평활근 세포의 수를 증가시켰다 (모든 $P < 0.05$; 도 4E, F). 흥미롭게도, 병변 중의 콜라겐 함량은 대동맥 기부 또는 대동맥궁 어디에서도 변화하지 않았다 (도 4G, H).

[0549] 모든 면역조직화학적 분석에서, 검출은 벡타스타틴(Vectastain) ABC 키트 및 DAB 기질에 의해 이루어졌다. 적용된 랫트 항체의 염색 특이성의 유효성을 검사하기 위해, 랫트 IgG2B 대조군 항체를 사용하였다. 1차 항체에 따른 각 면역염색에 대한 유효성 검사를 위해서 다른 동형 대조군 항체 (염소 IgG, 래빗 IgG)들을 사용하였다. Optimus 6.2 VideoPro-32를 사용하여 항원의 발현을 정량화하였고, 상기 염색된 세그먼트들을 총 플라크 면적의 백분율로 나타내었다.

[0550] **실시예 3: 3F7 치료는 죽상경화반 안정화를 달성한다.**

[0551] 3F7이 죽상경화반을 안정화하는 가능성을 가지는지에 대한 의문에 명확한 해답을 얻기 위해, 죽상경화반 불안정성/파열에 대해 최근에 개발된 독특한 마우스 모델을 사용하였다.

[0552] 상기 모델에서, 암컷 ApoE-/- (ApoE-KO) 마우스를 6주 동안 고지방식을 섭취하게 하여 죽상동맥경화증을 만성적으로 정착시키도록 하였다. 12주령이 되는 시점에, 고지방식 개시 후 6주 후, ApoE-KO 마우스를 복강내 주사를 통한 케타민 (100 mg/kg) 및 자일라진 (10 mg/kg) 혼합물로 마취시켰다. 경부를 절개하여 우측 총경동맥을 주변

결합 조직으로부터 해부하였다. 150 ㎛ (또는 450 ㎛) 외부 직경의 탠덤 협착부를 경동맥 분기점으로부터 1 ㎜ 원위 지점과 원위 협착부로부터 3 ㎜ 근위 지점에 도입하였다. 상기 협착부 직경은 6-0 청색 편조(blue braided) 폴리에스테르 섬유 봉합선을 150 또는 450 ㎛의 바늘과 함께 경동맥 주위에 위치시켜 수득하였고, 상기 봉합선은 묶어 놓았다가 후에 제거하였다. 탠덤 협착증 수술 직후, 마우스를 추가로 7주 동안 고지방식을 섭취시키면서 FXII 억제제 또는 IgG 대조군의 동일한 요법으로 치료하였다. 동물과 조직들을 실시예 1과 2에 상기 기술된 바와 같이 처리하였다.

[0553] 도 5A에 나타난 바와 같이, 세그먼트 1은 죽상경화반 불안정성의 면적을 나타낸다. 32%의 총 병변 크기의 감소가 FXII 억제제로 치료된 마우스에서 관찰되었다 (도 5B). 지질 및 대식세포 축적도 각각 52% 및 53%까지 현저히 감소되었다 (모든 $P < 0.05$; 도 5C, D). 죽상경화반 염증에 대한 주요 척도로서 VCAM-1 발현은 3F7로 치료된 마우스의 세그먼트 1에서 30%까지 감소되었다 (도 5E). 죽상경화반 불안정성의 마커로도 간주되는 괴사성 코어 크기는 3F7 치료에 의해 32%까지 감소하였다 (도 5F). 가장 인상적이었던 것은, 세그먼트 1에서 죽상경화성 병변 중의 평활근 세포의 발현이 거의 2.5배로 현저히 증가하였다는 점이다 ($P < 0.05$; 도 5G). 흥미롭게도, 3F7에 의한 FXIIa 억제는 다양한 죽상경화반 안정화 기전들에 대한 매우 특이적인 효과를 설명하는 콜라겐 억제의 변화를 유발하지는 않았다 (도 5H).

[0554] **실시예 4: 치료된 동물의 지질 프로파일**

[0555] 3F7 또는 대조군 항체로 치료된 ApoE-/- (ApoE-KO) 마우스의 혈장 중의 콜레스테롤 프로파일 (총 콜레스테롤, 고밀도 지질단백질 콜레스테롤, 초저밀도 지질단백질/LDL 콜레스테롤 및 트리글리세라이드)을 하기에 기술된 바와 같이 측정하였다.

[0556] 콜레스테롤

[0557] 콜레스테롤 수준은 베크만 코울터 다이그노스틱스 오스트레일리아(Beckman Coulter Diagnostics Australia)사에서 공급되는 시약 및 캘리브레이터와 함께, 베크만 코울터 LX20PRO 분석기를 사용하는 시판중인 표준 효소적 분석법에 의해 측정하였다.

[0558] CHOL 시약을 사용하여 정기 엔드포인트(timed-endpoint) 방법에 의해 콜레스테롤 농도를 측정한다. 상기 반응에서, 콜레스테롤 에스테라아제 (Ce)는 콜레스테롤 에스테르를 가수분해시켜 자유 콜레스테롤과 지방산으로 만든다. 자유 콜레스테롤은 콜레스테롤 옥시다아제 (CO)에 의해 콜레스텐-3-온과 과산화수소로 산화된다. 퍼옥시다제는 과산화수소와 4-아미노안티피린 (4-AAP) 및 페놀과의 반응을 촉진하여 착색된 퀴논이민 생성물을 생성하게 된다.

[0559] SYNCHRON LX® 시스템은 자동적으로 적절한 샘플 및 시약 부피를 큐벳으로 배분시킨다. 사용된 비율은 100부의 시약에 대해 1부의 샘플이다. 상기 시스템은 520 나노미터에서 흡광도의 변화를 모니터링한다. 상기 흡광도의 변화는 샘플 내 CHOL의 농도에 정비례하며, 상기 시스템이 CHOL 농도를 계산하여 나타내는데 사용된다.

[0560] HDL 콜레스테롤

[0561] HDL콜레스테롤은 베크만 코울터 다이그노스틱스 오스트레일리아사에서 공급되는 시약 및 캘리브레이터와 함께, 베크만 코울터 LX20PRO 분석기를 사용하는 시판중인 표준 효소적 분석법에 의해 측정하였다.

[0562] 상기 직접 HDL 콜레스테롤 방법은 임의의 오프라인 사전처리 또는 원심분리 단계에 대한 필요가 없는 동종 분석법이다. 상기 방법은 HDL 지질단백질 입자만을 용해하여 HDL 콜레스테롤을 방출시켜 색원체의 존재하여 콜레스테롤 에스테라제 및 콜레스테롤 옥시다아제와 반응시키는 세제를 사용하여 착색 생성물을 만든다. 상기 세제는 표면에 흡착함으로써 콜레스테롤 효소와 LDL, VLDL 및 유상지립 지질단백질과의 반응을 억제하기도 한다. 시약 내에 포함된 다가 음이온은 LDL, VLDL 및 유상지립 지질단백질을 복합체화시킴으로써 HDL 콜레스테롤 분석에 대한 선택도를 향상시킨다.

[0563] HDLD 시약을 사용하여 정기 엔드포인트 방법에 의해 콜레스테롤 농도를 측정한다. SYNCHRON LX® 시스템은 자동적으로 적절한 HDL 콜레스테롤 및 시약 부피를 큐벳으로 배분시킨다. 사용된 비율은 93부의 시약에 대해 1부의 샘플이다. 상기 시스템은 560 나노미터에서 흡광도의 변화를 모니터링한다. 상기 흡광도의 변화는 샘플 내 콜레스테롤의 농도에 정비례하며, 상기 시스템이 HDL 콜레스테롤 농도를 계산하여 나타내는데 사용된다.

[0564] 트리글리세라이드

[0565] 트리글리세라이드는 베크만 코울터 다이그노스틱스 오스트레일리아사에서 공급되는 시약 및 캘리브레이터와 함

께, 베크만 코울터 LX20PRO 분석기를 사용하는 시판중인 표준 효소적 분석법에 의해 측정하였다.

[0566] 트리글리세라이드 GPO 시약을 사용하여 정기 엔드포인트 방법에 의해 트리글리세라이드 농도를 측정한다. 샘플 중의 트리글리세라이드는 리파아제의 작용에 의해 글리세롤과 자유 지방산으로 가수분해되었다. 글리세롤 키나제 (GK), 글리세로포스페이트 옥시다아제 (GPO) 및 호스래디쉬 퍼옥시다아제 (HPO)를 사용하는 3개의 커플링된 연속 효소 단계는 3,5-디클로로-2-하이드록시벤젠-술폰산 (DHBS)과 4-아미노안티피린의 산화적 커플링을 유도하여 적색의 퀴논이민 염료를 형성한다.

[0567] SYNCHRON LX® 시스템은 자동적으로 적절한 샘플 및 시약 부피를 큐벳으로 배분시킨다. 사용된 비율은 100부의 시약에 대해 1부의 샘플이다. 상기 시스템은 520 나노미터에서 흡광도의 변화를 모니터링한다. 상기 흡광도의 변화는 샘플 내 TG의 농도에 정비례하며, 상기 시스템이 TG 농도를 계산하여 나타내는데 사용된다.

[0568] 결과

[0569] 상기 분석의 결과를 표 2에 나타내었다. 상기 결과들은 FXII의 억제제 (3F7)가 콜레스테롤 수준의 변화없이 죽상동맥경화증과 관련하여 유익한 효과를 제공하고 있음을 보여준다.

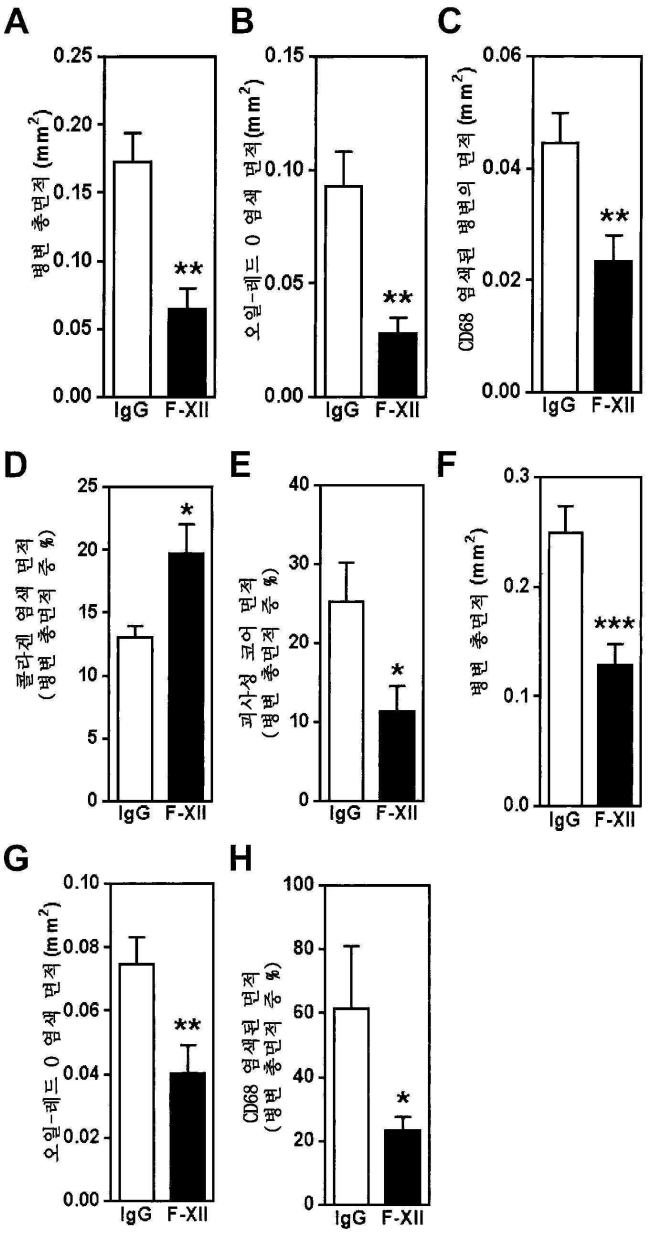
표 2

[0570]

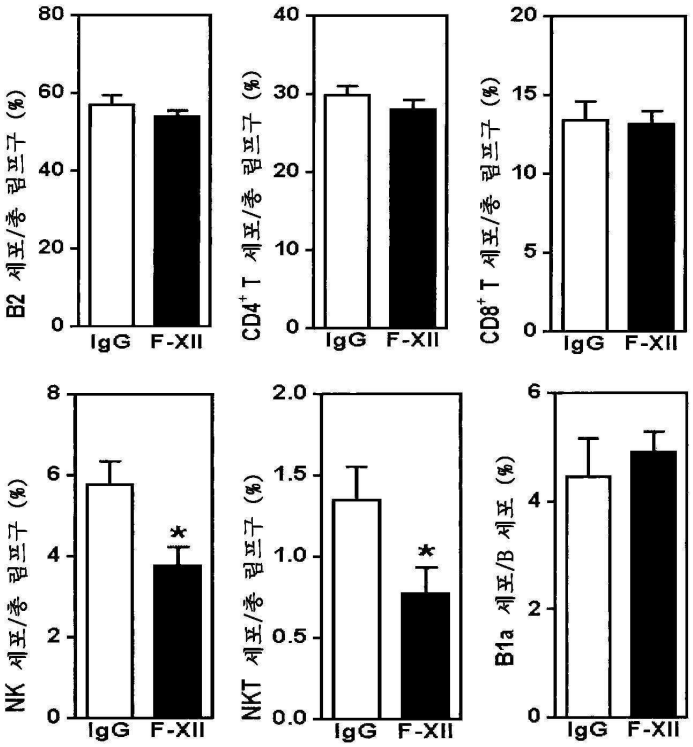
실험의 세부사항	체중 (gr)	비장 중량 (mgr)	총 콜레스테롤 (mmol/L)	VLDL/LDL 콜레스테롤 (mmol/L)	트리 글리세라이드 (mmol/L)	HDL 콜레스테롤 (mmol/L)
F-XII Ab. 치료된 T/S-ApoE-/-	36.5 (±1.3)	147 (±7.76)	21.9 (±1.3)	19.2 (±1.2)	0.87 (±0.04)	2.3 (±0.09)
IgG 대조군 치료된 T/S-ApoE-/-	38.4 (±1.4)	138 (±7.61)	24.3 (±1.05)	21.4 (±0.9)	0.88 (±0.04)	2.4 (±0.13)
F-XII Ab. 치료된 HFD-ApoE-/-	32.7 (±1.5)	173 (±13.3)	22.8 (±1.7)	19.7 (±1.5)	0.9 (±0.09)	2.7 (±0.18)
IgG 대조군 치료된 HFD-ApoE-/-	34.5 (±1.7)	149 (±8.79)	24.9 (±1.8)	21.4 (±1.6)	1.1 (±0.12)	2.9 (±0.24)

도면

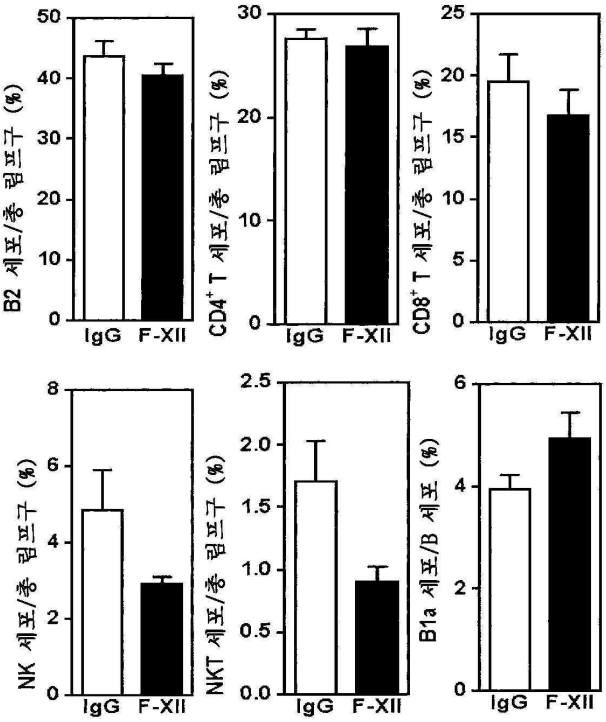
도면1


A
병변 총면적 (mm²)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
**
IgG
F-XII
B
오일-레드 O 염색 면적(mm²)
0.15
0.10
0.05
0.00
**
IgG
F-XII
C
CD68 염색된 병변의 면적 (mm²)
0.06
0.04
0.02
0.00
**
IgG
F-XII
D
콜라겐 염색 면적
(병변 총면적 중 %)
25
20
15
10
5
0
*
IgG
F-XII
E
괴사성 코어 면적
(병변 총면적 중 %)
40
30
20
10
0
*
IgG
F-XII
F
병변 총면적 (mm²)
0.3
0.2
0.1
0.0
***
IgG
F-XII
G
오일-레드 O 염색 면적 (mm²)
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
**
IgG
F-XII
H
CD68 염색된 면적
(병변 총면적 중 %)
100
80
60
40
20
0
*
IgG
F-XII

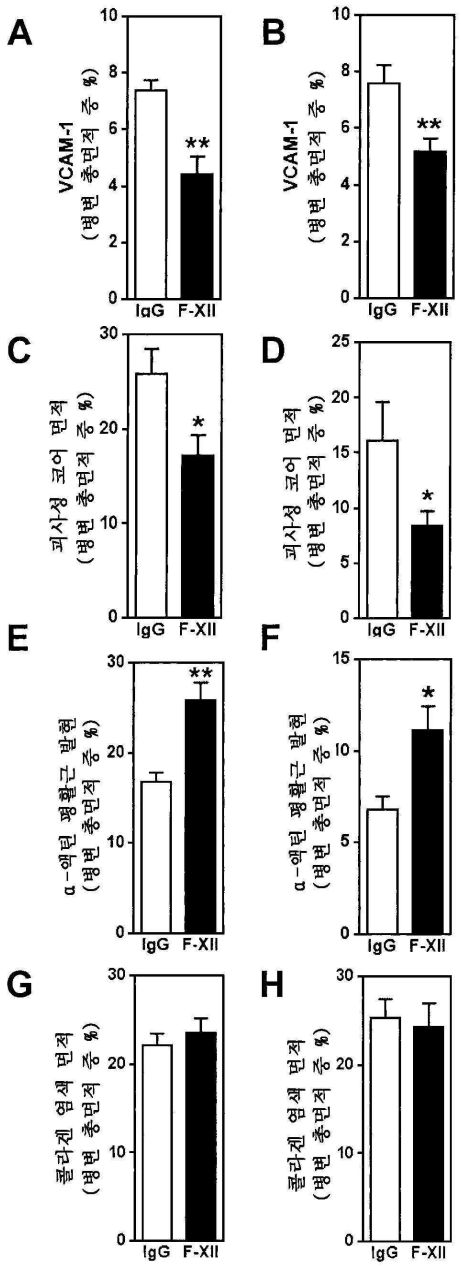
도면2


B2 세포/총 림프구 (%)
CD4+ T 세포/총 림프구 (%)
CD8+ T 세포/총 림프구 (%)
NK 세포/총 림프구 (%)
NKT 세포/총 림프구 (%)
B1a 세포/B 세포 (%)
IgG
F-XII
*

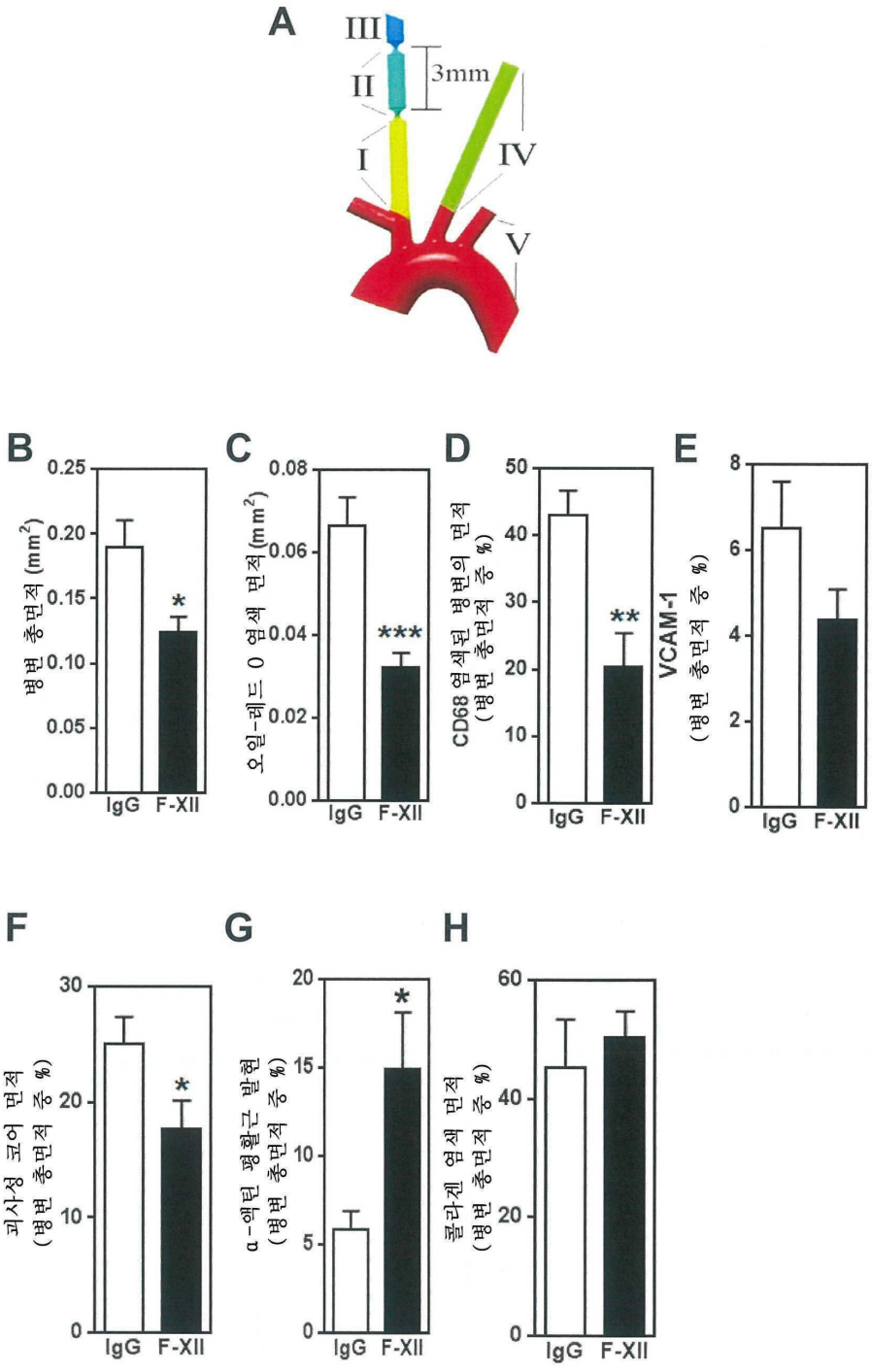
도면3


B2 세포/총 림프구 (%)
CD4+ T 세포/총 림프구 (%)
CD8+ T 세포/총 림프구 (%)
NK 세포/총 림프구 (%)
NKT 세포/총 림프구 (%)
B1a 세포/B 세포 (%)
IgG
F-XII

도면4


A
VCAM-1
(병변 총면적 중 %)
IgG F-XII
B
VCAM-1
(병변 총면적 중 %)
IgG F-XII
C
괴사성 코어 면적
(병변 총면적 중 %)
IgG F-XII
D
괴사성 코어 면적
(병변 총면적 중 %)
IgG F-XII
E
α-액틴 평활근 발현
(병변 총면적 중 %)
IgG F-XII
F
α-액틴 평활근 발현
(병변 총면적 중 %)
IgG F-XII
G
콜라겐 염색 면적
(병변 총면적 중 %)
IgG F-XII
H
콜라겐 염색 면적
(병변 총면적 중 %)
IgG F-XII

도면5



서 열 목 록

<110> CSL Limited

<120> METHOD OF TREATING ATHEROSCLEROSIS

<130> 2016_P001_A259

<160> 25

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 48

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of wild-type Infestin-4

<400> 1

Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn Tyr Val Pro Val Cys
1 5 10 15

Gly Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Gly Asn Pro Cys Met Leu Asn Cys Ala
20 25 30

Ala Gln Thr Lys Val Pro Gly Leu Lys Leu Val His Glu Gly Arg Cys
35 40 45

<210> 2

<211> 56

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of wild-type SPINK-1

<400> 2

Asp Ser Leu Gly Arg Glu Ala Lys Cys Tyr Asn Glu Leu Asn Gly Cys
1 5 10 15

Thr Lys Ile Tyr Asp Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Pro
20 25 30

Asn Glu Cys Val Leu Cys Phe Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile
35 40 45

Leu Ile Gln Lys Ser Gly Pro Cys
50 55

<210> 3

<211> 53

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SPINK-1 mutant K1

<400> 3

Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn

1 5 10 15

Tyr Val Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Pro Asn Glu Cys

20 25 30

Val Leu Cys Phe Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile Leu Ile Gln

35 40 45

Lys Ser Gly Pro Cys

50

<210> 4

<211> 53

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SPINK-1 mutant K2

<400> 4

Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn

1 5 10 15

Tyr Val Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Gly Asn Glu Cys

20 25 30

Met Leu Cys Ala Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile Leu Ile Gln

35 40 45

Lys Glu Gly Pro Cys

50

<210> 5

<211> 54

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SPINK-1 mutant K3

<400> 5

Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn

1 5 10 15

Tyr Val Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Gly Asn Glu Cys

20 25 30

Met Leu Asn Cys Ala Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile Leu Ile

35 40 45

Gln Lys Glu Gly Pro Cys

50

<210> 6

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence from a VH of an anti-FXII antibody

<400> 6

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr

20 25 30

Ile Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Gly Ile Arg Pro Ser Gly Gly Thr Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ala Leu Pro Arg Ser Gly Tyr Leu Ile Ser Pro His Tyr Tyr

100 105 110

Tyr Tyr Ala Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

115 120 125

Ser

<210> 7

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence from a VL of an anti-FXII antibody

<400> 7

Gln Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn

20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Val Ile Ser Gly Leu Arg

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Ala Ser Leu

85 90 95

Arg Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

100 105 110

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence from a VH CDR1 of an anti-FXII antibody

<400> 8

Lys Tyr Ile Met Gln

1 5

<210

> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence from a VH CDR2 of an anti-FXII antibody

<400> 9

Gly Ile Arg Pro Ser Gly Gly Thr Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence from a VH CDR2 of an anti-FXII antibody

<220><221> X

<222> (3)..(3)

<223> R or N or D

<220><221> X

<222> (4)..(4)

<223> P or V or I or M

<220><221> X

<222> (5)..(5)

<223> S or P or A

<220><221> X

<222> (6)..(6)

<223> G or L or V or T

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> X

<222> (8)..(8)

<223> G or S

<400> 10

Gly Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence from a VH CDR3 of an anti-FXII antibody

<400> 11

Ala Leu Pro Arg Ser Gly Tyr Leu Ile Ser Pro His Tyr Tyr Tyr Tyr

1 5 10 15

Ala Leu Asp Val

20

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence from a VH CDR3 of an anti-FXII antibody

<220><221> X

<222> (9)..(9)

<223> I or M or V

<220><221> X

<222> (10)..(10)

<223> S or K

<220><221>

X

<222> (11)..(11)

<223> P or K or T or H

<220><221> X

<222> (12)..(12)

<223> H or N or G or Q

<400> 12

Ala Leu Pro Arg Ser Gly Tyr Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr

1 5 10 15

Ala Leu Asp Val

20

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence from a VL CDR1 of an anti-FXII antibody

<400> 13

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn Tyr Val Tyr

1 5 10

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence from a VL CDR2 of an anti-FXII antibody

<400> 14

Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence from a VL CDR3 of an anti-FXII antibody

<400> 15

Ala Ala Trp Asp Ala Ser Leu Arg Gly Val

1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence from a VL CDR3 of an anti-FXII antibody

<220><221> X

<222> (2)..(2)

<223> A or S

<220><221> X

<222> (4)..(4)

<223> D or Y or E or T or W or S

<220><221> X

<222> (5)..(5)

<223> A or N or I or L or V or P or Q or E

<220><221> X

<222> (6)..(6)

<223> S or D or P or E or Q or R

<220><221> X

<222> (7)..(7)

<223> L or V

<220><221> X

<222> (9)..(9)

<223> G or L or K

<220><221> X

<222> (10)..(10)

<223> V or A or D or T or M or G

<400> 16

Ala Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa

1 5 10

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence from a VL CDR1 of an anti-FXII antibody

<400> 17

Ser Gly Ser Ser Glu Met Thr Val His His Tyr Val Tyr

1 5 10

<210> 18

<211> 129

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> VH of anti-FXII antibody gVR115

<400> 18

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr

20 25 30

Ile Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Gly Ile Asp Ile Pro Thr Lys Gly Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ala Leu Pro Arg Ser Gly Tyr Leu Ile Ser Pro His Tyr Tyr

100 105 110

Tyr Tyr Ala Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

115 120 125

Ser

<210> 19

<211> 110

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> VL of anti-FXII antibody gVR115

<400> 19

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn

20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Ala Ser Leu

85 90 95

Arg Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

100 105 110

<210> 20

<211> 456

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> heavy chain of anti-FXII antibody gVR1

<400> 20

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr
20 25 30

Ile Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Asp Ile Pro Thr Lys Gly Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Leu Pro Arg Ser Gly Tyr Leu Ile Ser Pro His Tyr Tyr
100 105 110

Tyr Tyr Ala Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

115 120 125

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
130 135 140

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
145 150 155 160

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
165 170 175

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr

180 185 190

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys

195 200 205

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp

210 215 220

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala

225 230 235 240

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

260 265 270

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val

275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

290 295 300

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly

325 330 335

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

340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr

355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

405 410 415

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe

420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
450 455

<210> 21

<211> 215

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> light chain of anti-FXII antibody gVR115

<400> 21

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn
20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Ala Ser Leu
85 90 95

Arg Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
100 105 110
Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
115 120 125
Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
130 135 140
Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
145 150 155 160

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
165 170 175
Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
180 185 190

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
195 200 205

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 22

<211> 615

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met Arg Ala Leu Leu Leu Leu Gly Phe Leu Leu Val Ser Leu Glu Ser
1 5 10 15

Thr Leu Ser Ile Pro Pro Trp Glu Ala Pro Lys Glu His Lys Tyr Lys
20 25 30

Ala Glu Glu His Thr Val Val Leu Thr Val Thr Gly Glu Pro Cys His
35 40 45

Phe Pro Phe Gln Tyr His Arg Gln Leu Tyr His Lys Cys Thr His Lys
50 55 60

Gly Arg Pro Gly Pro Gln Pro Trp Cys Ala Thr Thr Pro Asn Phe Asp
65 70 75 80

Gln Asp Gln Arg Trp Gly Tyr Cys Leu Glu Pro Lys Lys Val Lys Asp
85 90 95

His Cys Ser Lys His Ser Pro Cys Gln Lys Gly Gly Thr Cys Val Asn
100 105 110

Met Pro Ser Gly Pro His Cys Leu Cys Pro Gln His Leu Thr Gly Asn
115 120 125

His Cys Gln Lys Glu Lys Cys Phe Glu Pro Gln Leu Leu Arg Phe Phe
130 135 140

His Lys Asn Glu Ile Trp Tyr Arg Thr Glu Gln Ala Ala Val Ala Arg
145 150 155 160

Cys Gln Cys Lys Gly Pro Asp Ala His Cys Gln Arg Leu Ala Ser Gln
165 170 175

Ala Cys Arg Thr Asn Pro Cys Leu His Gly Gly Arg Cys Leu Glu Val

180 185 190

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

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

Ala Pro Pro Lys Pro Gln Pro Thr Thr Arg Thr Pro Pro Gln Ser Gln
325 330 335
Thr Pro Gly Ala Leu Pro Ala Lys Arg Glu Gln Pro Pro Ser Leu Thr
340 345 350
Arg Asn Gly Pro Leu Ser Cys Gly Gln Arg Leu Arg Lys Ser Leu Ser
355 360 365
Ser Met Thr Arg Val Val Gly Gly Leu Val Ala Leu Arg Gly Ala His
370 375 380

Pro Tyr Ile Ala Ala Leu Tyr Trp Gly His Ser Phe Cys Ala Gly Ser
385 390 395 400
Leu Ile Ala Pro Cys Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Gln Asp
405 410 415
Arg Pro Ala Pro Glu Asp Leu Thr Val Val Leu Gly Gln Glu Arg Arg
420 425 430

Asn His Ser Cys Glu Pro Cys Gln Thr Leu Ala Val Arg Ser Tyr Arg
435 440 445

Leu His Glu Ala Phe Ser Pro Val Ser Tyr Gln His Asp Leu Ala Leu
450 455 460
Leu Arg Leu Gln Glu Asp Ala Asp Gly Ser Cys Ala Leu Leu Ser Pro
465 470 475 480
Tyr Val Gln Pro Val Cys Leu Pro Ser Gly Ala Ala Arg Pro Ser Glu
485 490 495
Thr Thr Leu Cys Gln Val Ala Gly Trp Gly His Gln Phe Glu Gly Ala
500 505 510

Glu Glu Tyr Ala Ser Phe Leu Gln Glu Ala Gln Val Pro Phe Leu Ser
515 520 525
Leu Glu Arg Cys Ser Ala Pro Asp Val His Gly Ser Ser Ile Leu Pro
530 535 540
Gly Met Leu Cys Ala Gly Phe Leu Glu Gly Gly Thr Asp Ala Cys Gln
545 550 555 560
Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Asp Gln Ala Ala Glu Arg
565 570 575

Arg Leu Thr Leu Gln Gly Ile Ile Ser Trp Gly Ser Gly Cys Gly Asp
580 585 590
Arg Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Asp Val Ala Tyr Tyr Leu Ala Trp
595 600 605
Ile Arg Glu His Thr Val Ser
610 615

<210> 23
<211> 609
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 23
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

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

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
85 90 95
Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
100 105 110
Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
115 120 125
His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
130 135 140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
145 150 155 160
Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
165 170 175
Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
180 185 190
Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
195 200 205

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
210 215 220
Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
225 230 235 240
Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
245 250 255
Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly

260 265 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
275 280 285
Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
290 295 300
Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
305 310 315 320
Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
325 330 335

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
340 345 350
Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
355 360 365
Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
370 375 380
Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
385 390 395 400

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
405 410 415
Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
420 425 430
Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
435 440 445
Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
465 470 475 480
Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
485 490 495
Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
530 535 540
Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
545 550 555 560
Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
565 570 575
Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
595 600 605
Leu

<210> 24
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> amino acid sequence of an Infestin-4 variant
<400> 24
Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn Tyr Val
1 5 10
<210> 25
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> amino acid sequence of an Infestin-4 variant
<400
> 25
Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala
1 5 10